

Devenir d'inoculum de cyanobactéries pendant les deux premiers mois du cycle du riz sur un sol engorgé

Pierre Adrien REYNAUD
Microbiologiste ORSTOM
B.P. 1386, Dakar, Sénégal

Résumé

Deux types d'inoculations massives de Cyanobactéries sont effectuées au semis du riz I Kong Pao en vase de végétation. Un inoculum d'Oscillatoria sp. correspondant à 41 kg.ha⁻¹ d'algues sèches et un inoculum d'un mélange homogène de 5 Cyanobactéries fixatrices d'N₂ correspondant à 15 kg.ha⁻¹ d'algues sèches, en présence ou non d'azote ammoniacal.

Les variations de la croissance du riz, de la flore algale totale et fixatrice et de la fixation d'azote par les microorganismes photosynthétiques sont suivies pendant les deux premiers mois du cycle du riz sur chaque traitement.

L'inoculum d'Oscillatoria disparaît rapidement et n'a aucune influence sur la croissance du riz. Le traitement : Cyanobactéries fixatrices d'N₂ + azote ammoniacal augmente significativement la croissance du riz par rapport aux témoins. Dans ces conditions, soumise aux contaminations, la biomasse algale composée au départ uniquement de l'inoculum évolue en deux mois vers une situation d'homéostasie entre formes homocystées et formes hétérocystées.

Mots-clés : Inoculation - Cyanobactéries - Riz.

Summary

FATE OF CYANOBACTERIA INOCULUMS DURING THE TWO FIRST MONTHS OF RICE GROWTH ON A WATERLOGGED SOIL

Two sorts of heavy Cyanobacteria inoculation are done in vegetative plots at rice seedling (I Kong Pao). An Oscillatoria inoculum as 41 kg.ha⁻¹ of dry weight of algae and an homogenous mixture of five nitrogen fixing Cyanobacteria as 15 kg.ha⁻¹ dry weight, with or without N-NH₄.

Variations of rice growing, of total and nitrogen fixing algal flora and of nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms are followed during the two first months of rice growth on each treatment.

The Oscillatoria inoculum quickly disappear and is without effect on the rice growth. The N₂-fixing Cyanobacteria N-NH₄ treatment significantly increases rice growth in regard to test reference. Under these non sterile growth conditions, with possible contaminations, algal biomass composed at seedling only of the algal inoculum progress in two months towards a balance situation between homocystous and heterocystous strains.

Key words : Inoculation - Cyanobacteria - Rice.

INTRODUCTION

En 1939 DE a attribué la fertilité inhérente aux rizières tropicales asiatiques à l'activité de microorganismes photosynthétiques ayant la possibilité de fixer l'azote atmosphérique : les Cyanobactéries. Celles-ci présentent un système fixateur autonome

car la photosynthèse fournit l'énergie nécessaire au processus de fixation. Cette hypothèse a depuis été confirmée par de nombreux auteurs (voir par exemple : SINGH, 1961 ; MATERASSI et BALLONI, 1965 ; YOSHIDA *et coll.*, 1973 ; VENKATARAMAN, 1975). La preuve directe du transfert de l'azote fixé

par les Cyanobactéries dans le riz a été faite à l'aide du N15 par RENAULT *et coll.*, 1975.

Des inoculations ont été tentées avec succès aux Philippines où l'on a obtenu 23 récoltes successives de riz en 12 ans sans apport d'engrais azoté (WATANABÉ *et coll.*, 1977). Un inoculum de 340 g d'algues poids sec à l'hectare a permis à RELWANI (1963) d'augmenter significativement la récolte.

Nos observations sur l'évolution de la flore algale dans les rizières du Sénégal (REYNAUD et ROGER 1978 a) ont montré que l'établissement d'une population de Cyanobactéries fixatrices importante, par rapport à la flore algale totale, était limité par les fortes intensités lumineuses atteignant le sol ($I_{\max} \approx 80$ k lux à 13 h) et dépendait donc du couvert végétal. C'est pourquoi les Cyanobactéries fixatrices n'apparaissent qu'après le tallage.

Il nous a paru intéressant de connaître le devenir d'une inoculation algale massive au début du cycle et son incidence sur la croissance du riz. Pour cela nous avons utilisé deux inoculums différents : d'une part un mélange de cinq Cyanobactéries hétérocystées, sélectionnées pour leur haute potentialité fixatrice *in vitro* et d'autre part une Cyanobactérie homocystée possédant une activité fixatrice associée et une grande adaptabilité aux hautes intensités lumineuses (REYNAUD et ROGER 1978 b).

Nous avons suivi l'évolution des constituants de la flore algale, la fixation d'azote et l'influence de l'inoculation sur la germination et la croissance du riz pendant les deux premiers mois de son cycle, dans des vases de végétation exposés aux sources de contaminations habituelles comme l'eau d'irrigation et l'air.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

Des vases de 165 cm² de section contiennent chacun 2,3 kg de sable dunaire dit de « Cambérène ». Ce sable apporte dans chaque vase : 1,3 mg d'azote, 8,9 mg de phosphore et 4 mg de potassium. Chaque vase est posé dans un vase de plus grande taille, rempli d'eau, afin d'assurer par le fond un engorgement continu du sable. De l'eau est ajoutée dans les vases réservoirs pour compenser l'évaporation.

La variété de riz utilisée est l'I Kong Pao. Elle a été ensemencée en lignes à raison de 40 graines par vase. Après 15 jours, les plantules ont été démarriées ; on en a laissé 10 par vase et les pieds arrachés ont été rincés, séchés et pesés pour l'obtention du poids moyens des plantules. Un mois plus tard un deuxième

démariage a été effectué. On a laissé deux pieds par vase et les pieds arrachés ont été rincés, séchés et pesés. 60 jours après le semis, les deux derniers plants de chaque vase ont aussi été séchés et pesés.

2. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

La fumure de base suivante a été apportée au moment du semis : 50 kg de P₂O₅ par ha sous forme de phosphate supertriple et 90 kg de K₂O par ha sous forme de KCl. La moitié des vases reçoit en outre 50 kg de N par ha sous forme de sulfate d'ammonium. Six traitements différents ont été réalisés en cinq répétitions :

a - Témoins : TN⁺ : avec azote

TN⁻ : sans azote

b - Inoculation par un mélange de 5 souches de Cyanobactéries en culture unialgale, sélectionnées parmi les souches isolées dans les rizières du Sénégal pour leur capacité fixatrice : *Anabaena*, sp. 1, *Nostoc* sp., *Cylindrospermum* sp., *Calothrix* 1 et 2. Le mélange renferme des quantités identiques de chaque souche ; il est déposé à la pipette, après le semis en quantité correspondant à 2 mg d'N₂ par vase. Ces traitements sont désignés par : XN⁺ : avec azote

XN⁻ : avec azote

c - Inoculation par une souche de Cyanobactérie homocystée : *oscillatoria* sp. 77S23 (REYNAUD et ROGER 1978 b) en quantité correspondant à 5,45 mg d'N₂ par vase. Cette souche possédait au moment de l'inoculation une importante activité fixatrice d'azote associée. Ces traitements sont désignés par :

ON⁺ : traitement avec azote

ON⁻ : traitement sans azote

3. EVALUATION DE LA FLORE ALGALE ET DE LA FIXATION D'AZOTE

10 prélèvements du premier centimètre de sol engorgé ont été effectués à 15,45 et 60 jours avec une seringue de 5 mm de diamètre intérieur dans chaque vase.

Ces carottes regroupées par 10 dans des fioles en verre de 10 ml ont permis d'évaluer la fixation d'azote atmosphérique par la méthode de réduction de l'acétylène (STEWART *et coll.* 1967) après une incubation d'1 h à 20° C et 1500 lux. Les fioles sont mises à l'obscurité toute une nuit et ensuite une nouvelle incubation en présence d'acétylène est effectuée à l'obscurité. La fixation exprimée en nanomoles de C₂H₄.cm⁻².j⁻¹ est la différence entre les deux mesures (lumière, obscurité).

Après les mesures de fixation d'azote, les 50 prélèvements de chaque traitement ont été regroupés pour évaluer la composition qualitative et quantita-

tive des flores algales totale et fixatrice par la méthode des suspension-dilutions décrite par REYNAUD et ROGER (1977). Les dosages d'azote sur le sol et le riz sont effectués par la méthode de Kjeldahl.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. EFFET DE L'INOCULATION ALGALE SUR LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DU RIZ

TABLEAU I

Effet du traitement sur le pourcentage de germination (200 graines par traitement) et sur la croissance (minimum de 45 plantules par traitement) du riz I Kong Pao

	% de graines germées	Poids sec moyen des plantules en mg
Témoin N ⁺	80	24,7 ± 3,4
Témoin N ⁻	85	22,9 ± 2,5
<i>Oscillatoria</i> N ⁺	55	23,9 ± 2,9
<i>Oscillatoria</i> N ⁻	47	22,2 ± 4,6
Mélange N ⁺	80	23,9 ± 2,2
Mélange N ⁻	86	22,1 ± 1

1.1. Germination

Le tableau I montre que si l'on observe une germination voisine de 80 % avec les traitements T et X, elle n'atteint que 50 % avec les traitements O. Cette faible germination s'explique par le manque d'oxygène au niveau de la graine (KORDAN, 1976) imputable à deux facteurs complémentaires : l'irrigation par capillarité et la trop forte concentration en inoculum algal qui dans le sol engorgé abaisse considérablement le potentiel redox.

Sur le poids des plantules de 15 jours, il n'y a pas de différence significative entre les traitements.

1.2. Croissance du riz

La fig. 1 montre les variations de poids du riz dans les deux premiers mois de son cycle.

Dans tous les traitements sans azote (N⁻), l'évolution est identique. L'absence d'azote ralentit la croissance et les Cyanobactéries fixatrices, jusqu'au stade 2 mois, n'ont pas encore fourni assez d'azote au riz pour compenser cette carence.

Dans les traitements avec azote (N⁺), il existe dès le 45^e jour une différence significative entre le poids des plantules du traitement XN⁺ et des deux autres traitements. Après 60 jours le poids moyen des plants est de 243 mg pour le traitement XN⁺ alors qu'il est de 146 mg pour ON⁺ et de 143 mg pour TN⁺.

L'examen des 6 traitements traduit une action des Cyanobactéries fixatrices sur la croissance du riz, action liée à l'apport d'azote dans le milieu de culture. L'activité des Cyanobactéries est en effet intense dans ces conditions car elle n'est pas ralentie par le processus de fixation d'azote (REYNAUD, 1978). Les substances exsudées sont donc en quantités relativement importantes et certaines d'entre elles, directement assimilables par les racines du riz, favorisent sa croissance.

L'exsudation de substances de croissance pour le riz n'est pas un phénomène commun à toutes les Cyanobactéries car on ne note pas une augmentation sensible du poids des plants dans les traitements avec *Oscillatoria* par rapport au témoin.

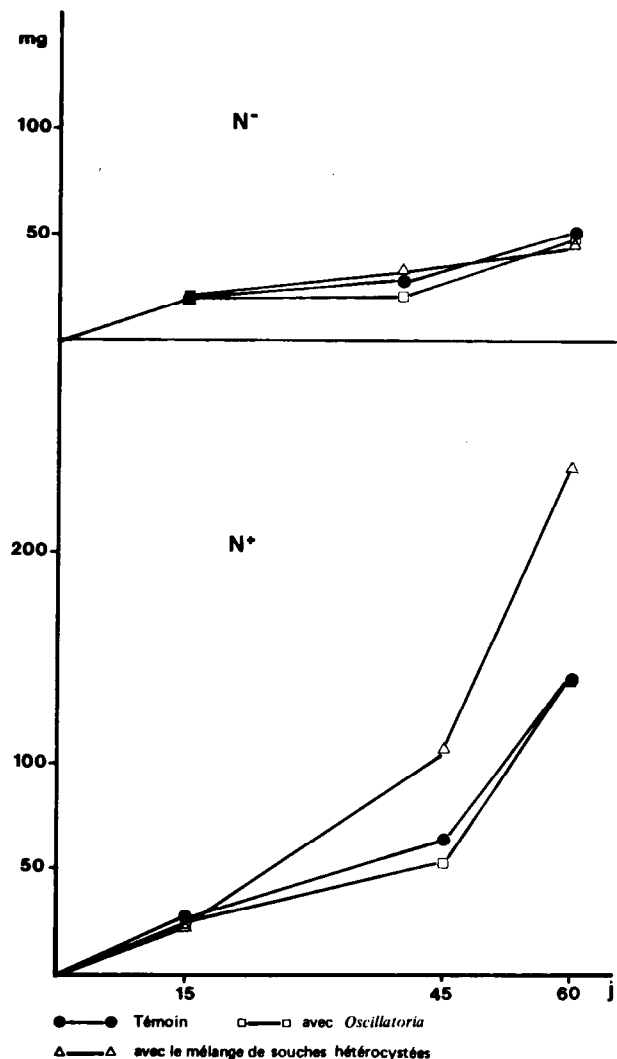


FIG. 1. - Variations du poids sec moyen d'un pied de riz dans les traitements avec et sans azote.

2. VARIATIONS DE LA FLORE ALGALE

2.1. Flore algale totale

La flore algale est composée de Diatomées, d'Algues vertes unicellulaires (genre *Chlorella*), de Cyanobactéries unicellulaires (genre *Synechococcus*), de Cyanobactéries filamenteuses non-hétérocystées des genres : *Spirulina*, *Pseudanabaena*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Phormidium* et *Plectonema*, de cyanobactéries filamenteuses hétérocystées sur lesquelles nous reviendrons. Le genre *Oscillatoria* représente entre 80 et 99 % de la biomasse des souches non fixatrices.

L'évaluation de la biomasse totale obtenue à partir des numérations est exprimée en mg d'azote par vase dans la figure 2. Ces valeurs peuvent être converties en kg de matière fraîche par hectare pour être comparées à celles qui ont été rapportées antérieurement au Sénégal (ROGER et REYNAUD, 1977). L'inoculum d'*Oscillatoria* correspond à 414 kg poids frais par ha⁻¹, celui de Cyanobactéries fixatrices à 152 kg ha⁻¹. Il existe *in situ* entre 6 et 126 kg ha⁻¹ d'algues fraîches dans les rizières du Sénégal en début de cycle et cette flore est en majorité composée de Diatomées et de Chlorophycées unicellulaires (ROGER et REYNAUD 1977). L'inoculum apporté va donc considérablement perturber le milieu. La biomasse des trois traitements ON⁻, XN⁻ et TN⁺ augmente de façon significative pendant les quinze premiers jours puis décroît régulièrement pour atteindre 30, 36 et 76 kg ha⁻¹ à la fin de l'expérience ; on remarque alors que l'on a des biomasses semblables pour ON⁺, ON⁻, TN⁺, TN⁻. Tout se passe comme si l'inoculum d'*Oscillatoria* avait été complètement détruit et qu'une flore provenant de l'eau d'irrigation ou de l'air comme celle des témoins s'était installée.

L'inoculum en Cyanobactéries fixatrices subit aussi une perte importante de sa biomasse de 152 kg

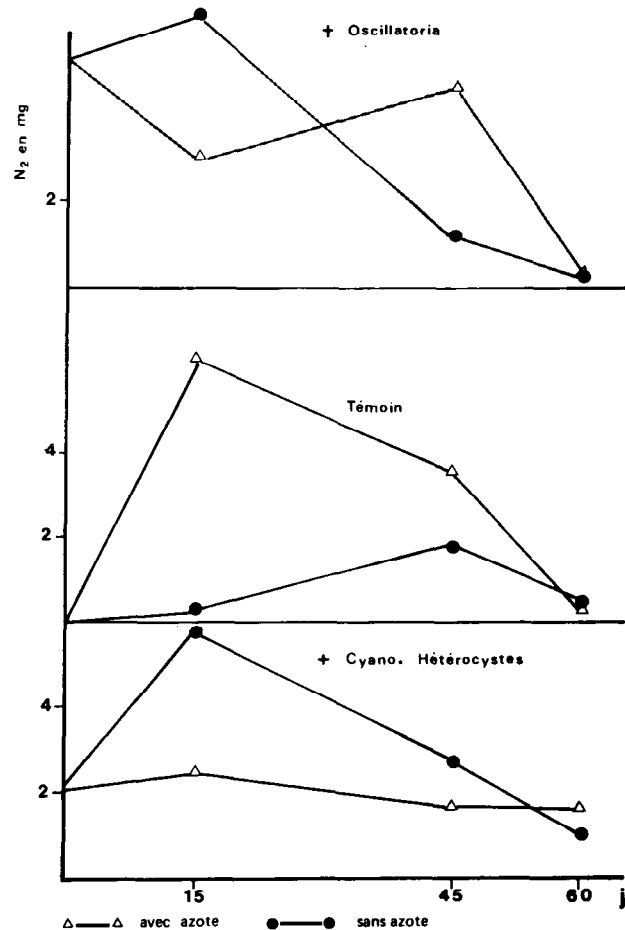


FIG. 2. - Variations de la biomasse algale totale exprimée en mg d'azote par vase.

ha⁻¹ à 76 pour XN⁻ et 115 pour XN⁺ en deux mois.

Le fait que dans la fig. 2 la biomasse totale soit plus élevée sans azote qu'avec azote dans les deux cas d'inoculation après 15 jours semble lié à l'activité

TABLEAU II

Biomasses algales et fixation d'azote 15 jours après l'inoculation

Traitements :	$\mu^3 \cdot \text{cm}^{-2}$			N_2 fixation $\text{nM C}_2\text{H}_4 \text{ cm}^{-2} \text{ j}^{-1}$
	Biomasse totale	<i>Oscillatoria</i> sp.	Cyano-fixatrices	
Témoin N ⁺	$4,12 \cdot 10^{10}$	$4,1 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^6$	10
Témoin N ⁻	$1,5 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^9$	$4,2 \cdot 10^6$	14
<i>Oscillatoria</i> N ⁺	$1,66 \cdot 10^{10}$	$1,6 \cdot 10^{10}$	$5,3 \cdot 10^5$	12
<i>Oscillatoria</i> N ⁻	$4,06 \cdot 10^{10}$	$4 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^7$	160
Mélange N ⁺	$3,9 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$	40
Mélange N ⁻	$1,11 \cdot 10^{10}$	$7,3 \cdot 10^9$	$3,4 \cdot 10^9$	70

des Cyanobactéries fixatrices qui sont plus nombreuses et dont l'activité fixatrice est plus importante. Comme le montre le tableau II l'activité des Cyanobactéries fixatrices est dans ce cas associée à une augmentation importante de la biomasse d'*Oscillatoria* sp. qui constitue la plus grande part de la biomasse totale.

2.2. Flore fixatrice d'azote

A la fig. 3 sont représentées les variations de la biomasse algale fixatrice d'azote par rapport à la biomasse totale. Dans les traitements témoins et avec *Oscillatoria* le développement des Cyanobactéries fixatrices d'azote ne devient important qu'à partir du 45^e jour. Au 15^e jour elles représentent entre 0,1 et 1,8 % de la biomasse totale.

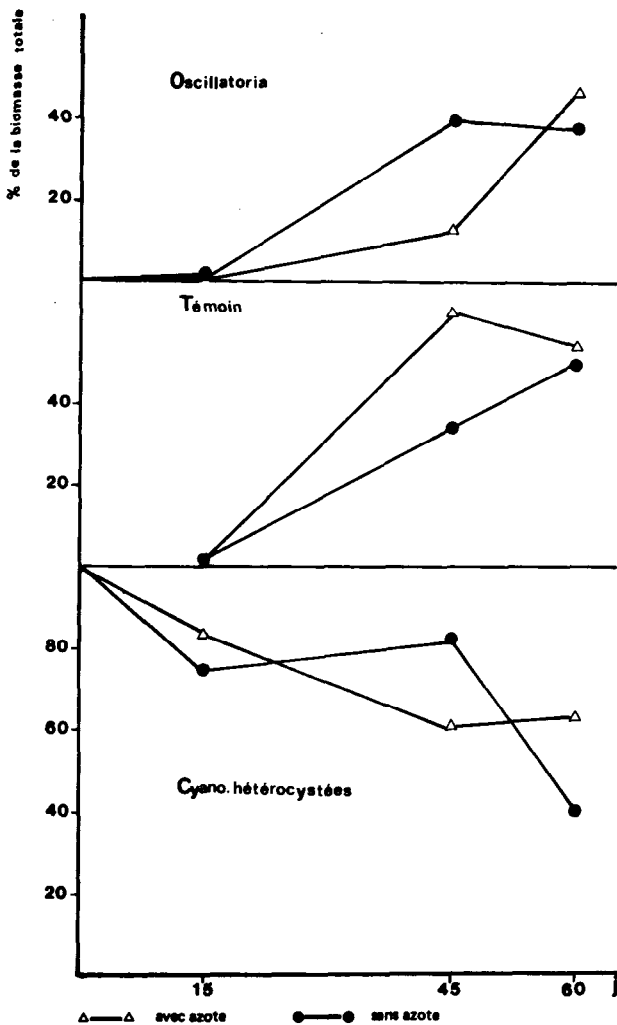


FIG. 3. - Variations au cours des deux premiers mois du cycle du riz de l'importance relative de la biomasse de Cyanobactéries fixatrices d'azote en fonction de la biomasse totale.

On remarque dans les 6 traitements une évolution convergente de la biomasse algale fixatrice qui arrive à représenter après deux mois de culture la moitié de la biomasse totale. La fig. 4 permet une observation précise de l'évolution de chaque Cyanobactérie fixatrice après 15, 45 et 60 jours.

Après 15 jours, dans le cas des traitements T et O, il existe 4 Cyanobactéries fixatrices : *Wolleea* sp., *Nostoc* sp., *Anabaena* sp 2 qui proviennent de l'eau d'irrigation et *Calothrix* sp 1 qui est identique à la souche de l'inoculum X. Le développement est beaucoup plus important dans les traitements sans azote que dans les traitements avec azote.

Après 45 jours et 60 jours par suite des contaminations dues surtout au transport des spores de vase en vase toutes les Cyanobactéries des traitements X sont présentes en T et O. Contrairement au cas précédent la biomasse fixatrice est plus importante dans les

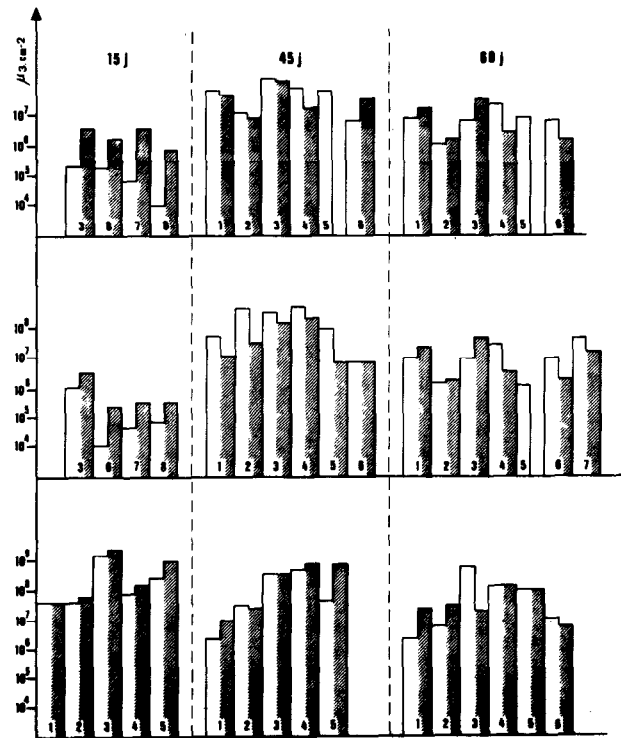


FIG. 4. - Développement des Cyanobactéries fixatrices dans chaque traitement. Les colonnes en gris correspondent aux traitements sans azote, les colonnes blanches aux traitements avec azote ; avec de haut en bas : l'inoculum *Oscillatoria*, les témoins, l'inoculum mélange de souches. Les chiffres correspondent aux espèces suivantes (de 1 à 5 espèces inoculées ; de 6 à 8 espèces colonisantes) ; 1 : *Anabaena* sp. 1 ; 2 : *Nostoc* sp. 1 ; 3 : *Calothrix* 1 ; 4 : *Cylindrospermum* sp. ; 5 : *Calothrix* 2 ; 6 : *Wolleea* sp. ; 7 : *Nostoc* sp. 2 ; 8 : *Anabaena* sp. 2.

traitements avec azote. *Calothrix* sp 2 est la seule souche à ne pas s'être établie dans les traitements TN^- et ON^- .

Dans une première étape, le manque d'azote est le facteur sélectif favorisant le développement des Cyanobactéries fixatrices ; en effet dans le milieu avec azote leur développement est limité par l'abondance des formes non fixatrices. Puis, lorsqu'un équilibre s'établit entre formes fixatrices et non fixatrices, le développement des premières devient aussi et même souvent plus important avec de l'azote dans le milieu. Il n'est pas inhibé ici par les algues indigènes comme cela a été rapporté par WILSON *et coll.* (1979).

3. VARIATIONS DE LA FIXATION D'AZOTE

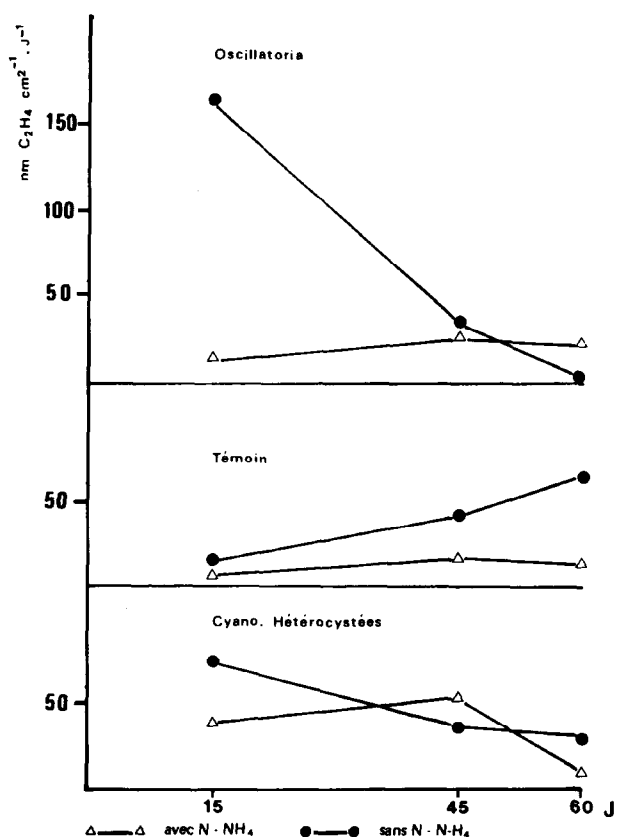


FIG. 5. - Activité fixatrice exprimée en nmoles C_2H_4 par cm^2 par jour dans le premier centimètre de sol pour chaque traitement.

La fig. 5 montre que dans les traitements avec sulfate d'ammonium, l'activité fixatrice d'azote,

mesurée par la méthode de réduction de l'acétylène en éthylène, reste à peu près constante et faible ; elle est sans rapport avec la biomasse algale totale (fig. 2) ou avec la biomasse de Cyanobactéries fixatrices d'azote (fig. 4). Cette activité correspond à une fixation de 0,7 mg N_2 par vase pour 45 j pour TN^+ à 1,2 mg N_2 par vase pour 45j pour XN^+ .

Avec le témoin sans azote, la fixation suit l'augmentation de la biomasse algale fixatrice et est parallèle à sa relative diminution chez XN^- .

La fixation d'azote très importante 15 jours après l'inoculation avec ON^- , devient nulle avec la décomposition d'*Oscillatoria* ; les Cyanobactéries fixatrices qui se développent sur ce milieu n'ont pas d'activité fixatrice car elles utilisent l'azote provenant de la décomposition d'*Oscillatoria*. Une extrapolation des mesures de fixation sur les échantillons XN^- , si la fixation observée pendant les 45 premiers jours du cycle se maintenait en permanence au cours de l'année, donnerait une fixation annuelle de 0,6 kg d'azote. ha^{-1} .

Cette valeur très basse est bien en accord avec les valeurs trouvées par ROGER et REYNAUD (1977) en début de cycle cultural où l'activité fixatrice est limitée par le pH et surtout par l'intensité lumineuse très élevée non encore compensée par le couvert végétal.

CONCLUSION

La croissance combinée des Cyanobactéries et du riz favorise le développement de ce dernier. Ce phénomène s'expliquerait plus par l'effet de substances physiologiquement actives synthétisées par les algues que par l'apport d'azote organique. L'inoculum algal épandu au début du cycle du riz évolue rapidement et il s'établit une situation d'équilibre entre formes homocystées et formes hétérocystées.

Dans le cas de l'inoculum d'un mélange de souches hétérocystées, ces Cyanobactéries demeurent les principaux constituants de la biomasse fixatrice. Celle-ci pourrait être de nouveau importante après le tallage grâce à un ombrage et à des conditions physicochimiques qui favorisent les Cyanobactéries fixatrices (ROGER et REYNAUD, 1977). Un apport de phosphore et de molybdène comme le préconise VENKATARAMAN (1972) et une deuxième inoculation pourraient accélérer la prédominance des souches fixatrices.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'ORSTOM le 11 août 1980.

BIBLIOGRAPHIE

- DE(P.K.), 1939. - The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields. *Proc. R. Soc. Lond.*, 127 B : 121-139.
- KORDAN (H.A.), 1976. - Oxygen as an Environmental factor in Influencing Normal Morphogenetic Development in Germinating Rice Seedlings. *J. of Exp. Bot.*, 27 (100) : 947-952.
- MATERASI (R.), BALLONI (W.), 1965. - Quelques observations sur la présence de microorganismes autotrophes fixateurs d'azote dans les rizières *Ann. Inst. Pasteur*, 109 : 218-223.
- RELWANI (L.L.), 1963. - Role of blue-green algae on paddy yield. *Curr. Sci.* 32 : 417-418.
- RENAUT (J.), SASSON (A.), PEARSON (H.W.) et STEWART (W.D.P.), 1975. - Nitrogen fixing algae in Morocco. Pages 229-246 in W.D.P. Stewart ed. « Nitrogen fixation by free-living microorganisms. Cambridge Univ. Press, Cambridge London.
- REYNAUD (P.A.), 1978. - La nitrogénase des Cyanobactéries : comparaison de l'activité *in vivo* et *in vitro* des formes hétérocystées, homocystées et unicellulaires *Cah. O.R.S.T.O.M. ser. Biol.*, vol. XIII, n° 2 : 143-156.
- REYNAUD (P.A.), ROGER (P.A.), 1977. - Milieux sélectifs pour la numération des Algues eucaryotes, procaryotes et fixatrices d'azote *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 14 : 421-428.
- REYNAUD (P.A.), POGER (P.A.), 1978 a. - N₂-fixing algal biomass in Senegal rice fields. *Ecol. Bull. Stockholm* 26 : 148-157.
- REYNAUD (P.A.), ROGER (P.A.), 1978 b. - Phototactisme et photocinèse agrégative chez *Oscillatoria* sp. 77S23. *Cah. O.R.S.T.O.M., ser. Biol.*, vol. XIII, n° 2 : 157-164.
- ROGER (P.), REYNAUD (P.), 1977. - La biomasse algale dans les rizières du Sénégal : importance relative des Cyanobactéries fixatrices de N₂. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 14 (4) : 519-530.
- SINGH (R.N.), 1961. - The role of blue-green algae in nitrogen economy of Indian agriculture. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, 175 p.
- STEWART (W.D.P.), FITZGERALD (G.P.), BURRIS (R.H.), 1967. - In situ studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 58 : 2071-2078.
- VENKATARAMAN (G.S.), 1972. - Algal biofertilizers and rice cultivation. Today & Tomorrow's printers & publishers New Delhi, 75 pp.
- VENKATARAMAN (G.S.), 1975. - The role of blue-green algae in tropical rice production. Pages 207-218 in W.D.P. Stewart, ed. Nitrogen fixation by free-living microorganisms. Cambridge University Press, Cambridge-London.
- WATANABE (I.), LEE (K.K.), ALIMAGNO (B.V.), SATO (M.), DEL ROSARIO (D.C.), et de GUZMAN (M.R.), 1977. - Biological nitrogen fixation in paddy field studies in situ acetylene-reduction assays. *IRRI Research Paper Ser.*, n° 3 : 1-16.
- WILSON (J.T.), GREENE (S.), ALEXANDER (M.), 1979. - Effect of Interactions Among Algae on Nitrogen Fixation by blue-green algae (Cyanobacteria) in Flooded Soils. *Applied and Environm. Microbiol.* 38 (5) : 916-921.
- YOSHIDA (T.), RONCAL (R.A), BAUTISTA (E.M.), 1973. - Atmospheric nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms in a submerged Philippine soil. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 19 : 117-123