

ANALYSE DE DIFFÉRENTS GROUPES  
COMPOSANT LA MICROFLORE DÉNITRIFIANTE  
DES SOLS DE RIZIÈRE DU SÉNÉGAL

par J.-L. Garcia

Laboratoire de Microbiologie du Sol, ORSTOM,  
BP. 1386, Dakar (Sénégal)

SUMMARY

ANALYSIS OF VARIOUS GROUPS OF DENITRIFYING MICROFLORA  
IN SENEGALESE PADDY SOILS

Denitrifying mesophilic and thermophilic bacteria were looked for in rice paddies of Senegal by culturing samples in medium with high concentrations of nitrate or nitrite (5 g/l) as respiratory substrate. These cultures revealed the existence of two populations.

1) a population of denitrifying mesophiles which tolerate high concentrations of nitrite, these organisms being mostly spore-formers and relatively numerous in these soils ; growth studies showed them to be very diverse: a) « nitrite-dependent » bacteria unable to reduce  $\text{NO}_3^-$  ; b) bacteria highly nitrite-tolerant with rapid growth on 5 g/l nitrite ; c) bacteria slightly nitrite-tolerant with weak or no growth on more than 3 g/l nitrite ; d)  $\text{NO}$ -tolerant bacteria which use nitric oxide as respiratory substrate for growth ; e)  $\text{N}_2\text{O}$ -deficient bacteria unable to grow on nitrous oxide ;

2) a population of denitrifying thermophilic spore-formers which are numerous in some soils and tolerate nitrite more or less well.

Measuring of the denitrifying activity of washed cells demonstrated that, in general, cells grown anaerobically on nitrite show much more activity than cells grown anaerobically on nitrate. This nitrite-tolerant population seems fairly heterogeneous, but it consists mostly of spore-forming species of the genus *Bacillus*.

KEY-WORDS: Denitrification, Soil, Nitrite ; Mesophily, Thermophily, *Bacillus*, Rice soils, Senegal.

## INTRODUCTION

Il existe trois types de bactéries nitrato-réductrices : celles qui réduisent le nitrate avec production de gaz ( $N_2O$  et  $N_2$ ), celles qui réduisent ce composé seulement jusqu'au stade du nitrite, et celles enfin qui réduisent le nitrite avec production de gaz, mais non le nitrate, et qui sont dites « nitrito-dépendantes ». Quelques espèces seulement de ce dernier type ont été décrites : 2 *Achromobacter* [8, 14], 1 *Alcaligenes odorans* var. *viridans* [3], plusieurs *Pseudomonas* [13] et 1 *Flavobacterium* [10]. Vangnai et Klein [13] estiment que ces microorganismes peuvent jouer un rôle important dans le métabolisme azoté des sols.

Les bactéries « nitrito-dépendantes » tolèrent généralement des concentrations élevées de nitrite, pouvant atteindre 0,5 % [13], alors que la majorité des autres bactéries dénitrifiantes connues sont incapables de croître en présence de 0,1 % de  $KNO_3$  [1, 2, 9]. Nous avons effectué des numérations de ces organismes dans les sols de rizière du Sénégal. De nombreuses souches ont été isolées. La croissance et l'activité dénitrifiante de certaines d'entre elles ont été étudiées.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Échantillons de sol.*

Des numérations et des isollements de bactéries dénitrifiantes ont été effectués sur des sols de rizière du Sénégal conservés durant plusieurs années à l'état sec [7] ou fraîchement prélevés et conservés à l'état humide à 4° C pendant 24 à 48 h. Ces sols proviennent des rizières de la Casamance et de la région du fleuve Sénégal.

*Numérations.*

Les numérations ont été effectuées selon la méthode du nombre le plus probable. On ensemence 5 tubes par dilution de sol, contenant un milieu faiblement gélosé ; on utilise  $KNO_3$  ou  $KNO_2$  (5 g/l) comme substrat respiratoire.

Deux milieux ont été employés :

1) un milieu de base A :  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ , 3,58 g ;  $KH_2PO_4$ , 0,98 g ;  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,03 g ;  $FeSO_4$ , 6 mg ;  $CaCl_2$ , 20 mg ;  $NH_4Cl$ , 0,5 g ; extrait de levure (Difco), 1 g ; succinate de sodium, 10 g ; agar (Difco), 2 g ; eau déminéralisée, 1 000 ml ; pH ajusté à 7,0 ;

2) un milieu complexe B [4] : « Biotrypcase » (Biomérieux), 20 g ; extrait de levure (Biomérieux), 5 g ;  $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ , 7 mg ;  $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ , 15 mg ;  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 15 mg ; saccharose, 5 g ; agar (Difco), 2 g ; eau déminéralisée, 1 000 ml ; pH ajusté à 7,0 avec KOH.

Après ensemencement, on recouvre le milieu contenu dans des tubes à essais de  $12 \times 120$  mm par un bouchon de 2 ml d'agar à 5 ‰.

Deux groupes de bactéries dénitrifiantes ont ainsi été dénombrées : celles qui croissent à 30° sur les deux milieux et celles qui croissent à 60° sur milieu complexe B. Dans le premier cas, l'incubation dure 15 jours et dans le second cas, 48 h. On compte comme positifs les tubes où sont apparues des bulles de gaz [12].

Parallèlement, c'est-à-dire à l'aide de dilutions plus poussées provenant d'une même suspension de sol, des numérations des bactéries qui réduisent  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$  ont été effectuées sur milieu non gélosé et additionné de nitrate (5 g/l), dans des tubes à essais de  $12 \times 120$  mm munis de bouchons « Vacutainer » (Becton Dickinson, Grenoble) et mis en incubation sous vide, en milieu de base A pour les bactéries mésophiles et en milieu complexe B pour les bactéries thermophiles. Les tubes sont comptés comme positifs s'il y a apparition d'une coloration rose après addition du réactif de Griess en fin d'incubation (présence de nitrite).

#### *Isolement de souches pures.*

Des bactéries dénitrifiantes mésophiles tolérant 5 g/l de nitrite ont été isolées, soit en milieu de base A non gélosé, soit en milieu complexe B, à partir de sol sec ou fraîchement prélevé en sol nu ou dans la rhizosphère du riz. Des bactéries dénitrifiantes thermophiles ont été isolées en milieu complexe B non gélosé, à partir de sols secs, en présence de nitrate ou de nitrite (5 g/l).

Dans tous les cas, les incubations ont été effectuées sous vide, en ballons de 250 ml contenant 50 ml de milieu. Les étalements ont été réalisés sur gélose nutritive (Difco) en boîtes de Petri, et les souches conservées à 4° en tube incliné, sur gélose nutritive renforcée par l'addition de 10 g/l d'agar dans le cas des bactéries thermophiles.

#### *Étude de la croissance.*

La croissance de quelques-unes des souches isolées a été étudiée en anaérobiose (atmosphère de  $\text{N}_2$ ) en milieu complexe B contenant des concentrations de nitrite comprises entre 0,05 et 0,6 %, à 37 ou 60°, à l'aide d'un biophotomètre enregistreur « Biolog II » (de Bonnet-Maury et Jouan, Jouan-Quétin, Paris).

#### *Mesure de l'activité dénitrifiante.*

En vue de la mesure de l'activité dénitrifiante des cellules lavées, les souches mésophiles choisies sont cultivées pendant 24 h à 30°, en anaérobiose, en milieu complexe B contenant 5 g/l de  $\text{KNO}_3$  ou  $\text{KNO}_2$ . La culture est ensuite centrifugée (20 min, 16 000 g) et les cellules sont lavées deux fois avec une solution de NaCl à 2 %, puis recueillies dans 10 ml de tampon phosphate 0,33 M, pH 7,0. Pour mesurer l'activité dénitrifiante, on utilise 1 ml de suspension bactérienne dans des flacons sérum de 125 ml contenant 25 ml de tampon et 50 mg de succinate de sodium. Les flacons sont mis sous vide pendant 5 min puis gazés à l'hélium N45 (Sté l'Air Liquide) ; l'opération est répétée trois fois. On introduit ensuite, à l'aide de seringues en plastique, 2 ml de krypton N35 qui sert d'étalon interne et l'un des quatre accepteurs d'électrons suivants :  $\text{KNO}_3$ , 50 mg ;  $\text{KNO}_2$ , 50 mg ; NO, 10 ml ; ou  $\text{N}_2\text{O}$ , 10 ml. Puis on place les flacons dans un bain-marie agité, à la température de 30°. Des analyses de l'atmosphère des flacons sont effectuées toutes les 30 min à l'aide d'un chromatographe à conductibilité thermique « Varian Aerograph 90 P4 » suivant les conditions décrites par ailleurs [5, 6].

Les résultats (deux répétitions) sont rapportés au mg d'azote total déterminé par micro-Kjeldahl.

La croissance de la souche thermophile choisie après isolement sur nitrite à 5 % est obtenue en milieu complexe B contenant 5 g/l de  $\text{KNO}_3$  ou  $\text{KNO}_2$ . Elle se produit à 55° en 21 h environ si l'on procède de la manière suivante : onensemence un ballon de 250 ml contenant 100 ml de milieu à partir d'une gélose inclinée (gélose nutritive, 23 g ; agar, 10 g ; eau déminéralisée, 1 000 ml) âgées de 8 h environ. Après 8 h d'incubation anaérobie sous  $\text{N}_2$ , onensemence un ballon de 2 l contenant 1,4 l de milieu ; cet ensemencement est réalisé automatiquement au cours de la nuit à l'aide d'un dispositif très simple : la sonnerie d'un réveil déclenche mécaniquement l'ouverture du tuyau de jonction entre les deux ballons. Après 5 h, on récolte

les cellules par centrifugation (14°, 20 min, 4 000 *g*) puis on les lave deux fois dans les mêmes conditions avec une solution saline [4] ; on les recueille enfin dans 10 ml de tampon phosphate 0,066 M, pH 7,4 [4] ; la solution de lavage et le tampon sont maintenus à 55° avant usage. Lors de la mesure de l'activité dénitrifiante, on remplace le tampon phosphate et le succinate par le milieu complexe B sans accepteur d'électrons, contenant 100 µg/ml de chloramphénicol et on effectue l'incubation des flacons à 60°.

## RÉSULTATS

### I. — Numérations

La densité des bactéries dénitrifiantes mésophiles évaluée en milieu de base A dans 9 sols de rizière conservés à l'état sec, montre une nette prédominance des bactéries dénombrées sur nitrite ( $D_2$ ) par rapport à celles dénombrées sur nitrate ( $D_1$ ) ; en effet, le rapport  $D_2/D_1$  est dans tous les cas nettement supérieur à 1 (tableau I). Le nombre de bactéries mésophiles nitrato-réductrices produisant du nitrite ( $D_3$ ) est très élevé par rapport à  $D_1$ .

TABLEAU I. — Densité des bactéries mésophiles  
(nombre par g de sol sec) dans des sols de rizière conservés à l'état sec,  
évaluée en milieu de base A.

Origine des sols	$D_1$	$D_2$	$D_3$ (millions)	$D_2/D_1$	$D_3/D_1$
Bambato	3 400	50 000	320	14,7	94 118
Boundoum	10 000	22 000	5	2,2	500
Bounkilinn	1 600	14 000	7	8,7	4 375
Diango	2 200	12 000	3,4	5,4	1 545
Djibelor	1 400	4 000	30	2,8	21 428
M'Bang	800	7 000	5	8,7	6 250
Oussouye	2 800	180 000	90	64,3	32 143
Sébikotane	800	8 000	10	10	12 500
Tanaff	1 200	26 000	120	21,7	100 000

$D_1$  = bactéries dénombrées sur nitrate et produisant du gaz.  
 $D_2$  = bactéries dénombrées sur nitrite à 5‰ et produisant du gaz.  
 $D_3$  = bactéries nitrato-réductrices produisant du nitrite.

La densité des bactéries dénitrifiantes mésophiles dans le sol nu (S) et la rhizosphère du riz (R), évaluée en milieu de base A dans 12 sols de rizière fraîchement prélevés et conservés humides, montre, par contre, une prédominance des bactéries dénombrées sur nitrate ( $D_1$ ) par rapport

à celles dénombrées sur nitrite ( $D_2$ ) ; en effet, le rapport  $D_2/D_1$  est le plus souvent inférieur à 1 ou voisin de 1 (tableau II). Le nombre de bactéries mésophiles nitrato-réductrices produisant du nitrite ( $D_3$ ) est, dans ce cas, toujours plus élevé que celui des bactéries dénitrifiantes dénombrées sur nitrate ( $D_1$ ), mais le rapport  $D_3/D_1$  est plus faible, en général, que celui obtenu pour les sols conservés à l'état sec. Le rapport des densités de bac-

TABLEAU II. — Densité des bactéries mésophiles (nombre par g de sol sec) dans le sol nu (S) et la rhizosphère du riz (R) à partir d'échantillons frais de sols de rizière de la vallée du fleuve Sénégal, évaluée en milieu de base A.

Origine des sols		$D_1$	$D_2$	$D_3$ (millions)	$D_2/D_1$	$D_3/D_1$
Boundoum Nord	S	79 500	4 500	102	0,06	1 283
	R	405 000	24 000	1,012	0,06	2,5
Richard-Toll Canal D-1	S	1 062 000	106 000	6,195	0,10	5,8
	R	47 000	47 000	339,6	1,00	7 225
Savoigne 1	S	359 000	18 000	202	0,05	562
	R	986 000	47 900	507	0,05	514
Richard-Toll Canal D-2	S	68 500	13 700	2,74	0,20	40
	R	22 000	73 500	5	3,34	227
Savoigne 2	S	290 900	30 900	0,454	0,11	1,5
	R	174 800	116 500	68	0,67	389
Boundoum barrage	S	106 000	14 000	136,4	0,13	1 287
	R	522 000	134 000	89,5	0,25	171,5
Balky	S	1 224 500	184 000	9,2	0,15	7,5
	R	69 000	7 000	0,495	0,10	7,2
Kassack Sud	S	2 195 000	170 700	73,2	0,08	33,3
	R	2 222 000	5 000 000	500	2,25	225
Grande digue	S	103 450	163 800	51,7	1,58	500
	R	51 700	86 200	155,2	1,67	3 002
Ross-Béthio	S	11 480	147 600	8,2	12,86	714,3
	R	21 840	109 200	45,5	5,00	2 083
Dagana	S	309 400	200 200	31,85	0,65	103
	R	22 120	189 600	55,3	8,57	2 500
Fanaye	S	707 000	353 500	323,2	0,50	457
	R	220 400	394 400	371,2	1,79	1 684

$D_1$ ,  $D_2$  et  $D_3$  : cf. légende du tableau I.

téries dénombrées dans la rhizosphère et le sol nu (R/S) est variable suivant les sols dans le cas des ensembles  $D_1$  et  $D_2$  mais le plus souvent supérieur à 1 dans le cas de l'ensemble  $D_3$  (tableau III).

TABLEAU III. — Rapport des densités de bactéries mésophiles dénombrées dans la rhizosphère du riz et le sol nu (R/S).

Origine des sols	$D_1$	$D_2$	$D_3$
Boundoum Nord	5,0	5,3	0,01
Richard-Toll Canal D1	0,04	0,4	54,8
Savoigne 1	2,7	2,7	2,5
Richard-Toll Canal D-2	0,3	5,4	1,8
Savoigne 2	0,6	3,8	149,6
Boundoum barrage	4,9	9,6	1,9
Balky	0,1	0,04	0,2
Kassack Sud	1,0	29,3	6,8
Grande digue	0,5	0,5	3,0
Ross-Béthio	1,9	0,7	5,5
Dagana	0,07	0,9	1,7
Fanaye	0,3	1,1	1,1

$D_1$ ,  $D_2$  et  $D_3$  : cf. légende du tableau I.

Comparons les densités des bactéries dénitrifiantes mésophiles dénombrées en milieu de base A et en milieu complexe B dans des sols conservés à l'état sec. On observe une augmentation des valeurs des ensembles  $D_1$  et  $D_2$ , le premier de ceux-ci augmentant moins que le second (tableau IV). Des observations similaires ont été faites avec des sols fraîchement prélevés (tableau IV).

La densité des bactéries dénitrifiantes thermophiles évaluée en milieu complexe B dans 18 sols de rizière conservés à l'état sec, montre une très nette prédominance des bactéries dénombrées sur nitrite ( $DT_2$ ) par rapport à celles dénombrées sur nitrate ( $DT_1$ ) ; en effet, le rapport  $DT_2/DT_1$  n'est qu'une seule fois inférieur à 1 et atteint une valeur maximale de 1.120 (tableau V). Le nombre de bactéries thermophiles nitrato-réductrices produisant du nitrite ( $DT_3$ ) est presque toujours supérieur à celui des bactéries dénitrifiantes dénombrées sur nitrate ( $DT_1$ ), mais le rapport  $DT_3/DT_1$  est nettement plus faible que celui obtenu avec les bactéries mésophiles dénombrées sur sol sec.

TABLEAU IV. — Comparaison, dans des sols de rizière conservés à l'état sec ou fraîchement prélevés, des densités de bactéries dénitrifiantes mésophiles (nombre par g de sol sec) obtenues en milieu de base A et milieu complexe B.

Nature et origine des sols		Milieu de base A			Milieu complexe B			B/A		
		D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub> /D <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub> /D <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	
Sols secs	Goudomp	3 400	2 600	0,76	30 000	500 000	16,70	8,8	192,3	
	Boukiliinn	9 000	6 000	0,66	350 000	240 000	0,68	38,8	40,0	
	Kalaban	4 000	2 200	0,55	170 000	500 000	2,90	42,5	227,3	
Sols frais	Richard-Toll Canal D-1	S	1 062 000	106 200	0,10	323 800	152 400	0,47	0,3	1,4
		R	47 000	47 000	1,00	2 058 000	882 300	0,42	438,0	187,7
	Savoigne 1	S	359 000	18 000	0,05	218 400	2 069 000	9,47	0,6	114,9
		R	986 000	47 900	0,05	2 528 700	1 609 200	0,63	2,5	33,6

D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> : cf. légende du tableau I.  
 S = sol nu.  
 R = rhizosphère du riz.

## II. — Isolement de souches pures dénitrifiantes nitrito-tolérantes

Nous avons isolé 44 souches pures dénitrifiantes mésophiles en présence de nitrite à 5 ‰, à partir de sols de rizière du Sénégal conservés à l'état sec ou fraîchement prélevés, en milieux simple ou complexe : 73 % de ces souches sont sporulées ; 57 % font fermenter le glucose en milieu minéral additionné de 5 g/l du sucre et de 1 g/l d'extrait de levure, en ampoules scellées sous vide ; 15 % seulement présentent une croissance vigoureuse ; et 11 % des souches croissent à 55°.

Seules deux souches sont « nitrito-dépendantes », c'est-à-dire qu'elles ne croissent pas en anaérobiose en présence de nitrate ; 48 % des souches croissent bien en présence de nitrite à 5 ‰ ; les autres souches tolèrent seulement 3 g/l de nitrite ; 23 % des souches croissent en anaérobiose en présence de NO (10 % de la phase gazeuse) comme substrat respiratoire. Enfin, 11 % des souches ne croissent pas aux dépens de N<sub>2</sub>O.

Nous avons isolé 17 souches dénitrifiantes thermophiles dans des sols de rizière du Sénégal conservés à l'état sec, en milieu complexe B contenant du nitrate ; 28 souches dénitrifiantes thermophiles ont été isolées à partir des mêmes sols en milieu complexe B contenant 5 ‰ de KNO<sub>3</sub>. Des analyses effectuées au chromatographe après 24 et 48 h de croissance anaérobie en milieu liquide complexe, en flacons sérum de 125 ml, sur nitrate ou nitrite à 5 ‰, montrent que toutes les souches isolées sur nitrite sont capables de réduire le nitrate en N<sub>2</sub>O et N<sub>2</sub> mais cela beaucoup moins vigoureusement que le fait le nitrite. Réciproquement, toutes les

TABLEAU V. — Densité des bactéries thermophiles  
(nombre par g de sol sec) dénombrées en milieu complexe B  
dans des sols de rizière conservés à l'état sec.

Origine des sols	DT <sub>1</sub>	DT <sub>2</sub>	DT <sub>3</sub>	DT <sub>2</sub> /DT <sub>1</sub>	DT <sub>3</sub> /DT <sub>1</sub>
Bambato	1 600	180 000	14 000	112,5	8,7
Bema	350	12 000	3 400	34,3	9,7
Boundoum Nord	25	3 500	14 000	140,0	560,0
Bounkilinn	2 200	5 000	240 000	2,3	109,0
Diango	130	800	12 000	6,2	92,3
Djibelor	7 000	10 000	120 000	1,4	17,1
Kamobeul	110	2 200	800	20,0	7,3
Kassack	400	400	40 000	1,0	100,0
Loudia	50	280	4 000	5,6	80,0
M'Bang	250	36 000	1 200	144,0	4,8
Niaguise	22 000	7 000	120 000	0,3	5,5
Oussouye	5 000	70 000	22 000	14,0	4,4
Richard-Toll CSS	60	5 000	18 000	83,4	300,0
Richard-Toll Canal D	170	2 800	1 000	16,5	5,9
Rindiao	25	28 000	400	1 120,0	16,0
Sébkotane	17 000	180 000	40 000	10,6	2,3
Tanaff	7 000	320 000	1 200	45,7	0,2
X	35	10 000	1 000	285,7	28,6

DT<sub>1</sub> = bactéries dénombrées sur nitrate et produisant du gaz.  
DT<sub>2</sub> = bactéries dénombrées sur nitrite à 5‰ et produisant du gaz.  
DT<sub>3</sub> = bactéries nitrato-réductrices produisant du nitrite.

souches isolées sur nitrate sont capables de croître en anaérobiose sur nitrite à 5 ‰.

Toutes ces souches pures sont actuellement en cours d'étude en vue de leur identification.

### III. — Étude de la croissance

Les souches étudiées ont été choisies en fonction de leur comportement à l'égard du nitrite. Les résultats sont représentés sur la figure 1. La souche nitrito-faiblement tolérante, sporulée, ne présente pas de croissance en 48 h au-delà de 3 ‰ de nitrite, mais elle pousse bien sur nitrate. La souche nitrito-fortement tolérante, sporulée, croît sur nitrite à 6 ‰, mais sa



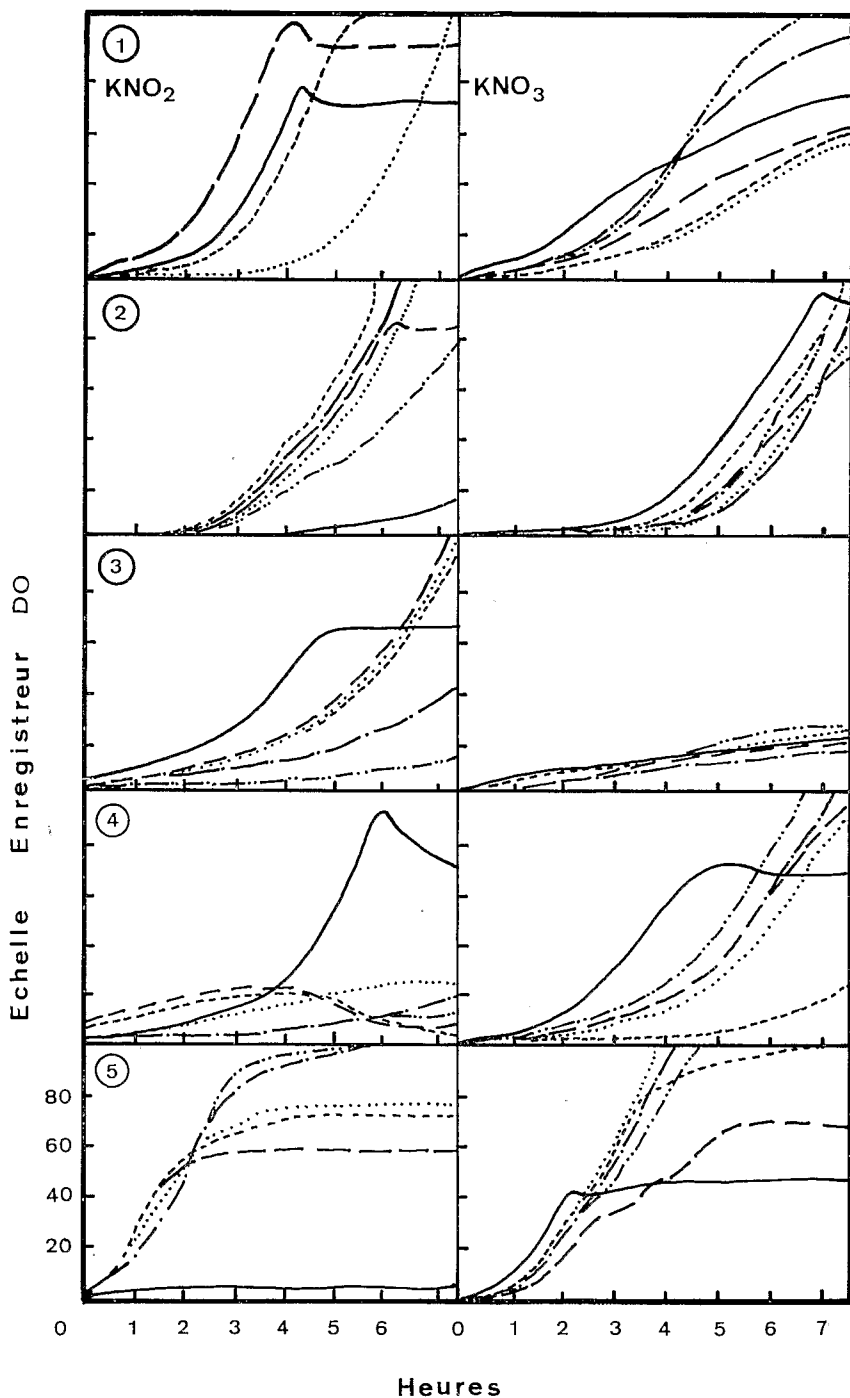


FIG. 1 — Étude au biophotomètre de la croissance des souches caractéristiques, en anaérobiose, sur  $KNO_3$  ou  $KNO_2$  comme substrat respiratoire.

1) Bactérie faiblement nitrito-tolérante ; 2) bactérie fortement nitrito-tolérante ; 3) bactérie « nitrito-dépendante » ; 4) *B. azotoformans* ; 5) bactérie thermophile.

Concentrations : — = 0,5 g/l ; - - = 1,0 g/l  
 - - - = 2,0 g/l ; . . . = 3,0 g/l  
 - · - · = 5,0 g/l ; - · - · - · = 6,0 g/l.

croissance sur nitrate est moins rapide. La souche « nitrito-dépendante », non sporulée, tolère bien le nitrite mais ne présente qu'une croissance très faible sur nitrate. La souche de *Bacillus azotoformans* [11] n'a poussé qu'en présence de 0,5 g/l de nitrite. Enfin, la souche thermophile sporulée, isolée sur nitrite, croît bien en présence de nitrite à 6 ‰.

#### IV. — Mesure de l'activité dénitrifiante

Le tableau VI rend compte des activités nitrate-, nitrite-, oxyde nitrique- et oxyde nitreux-réductases maximales des cellules lavées de bactéries mésophiles, après culture anaérobie sur nitrate ou nitrite à 5 ‰. Rapportées au mg d'azote, ces activités sont en général plus élevées pour les cellules issues d'une culture sur nitrite dans le cas des bactéries nitrito-tolérantes. L'activité oxyde nitreux-réductase de la bactérie fortement nitrito-tolérante est élevée, et il n'y a accumulation de  $N_2O$  avec aucun des substrats respiratoires. Par contre, l'oxyde nitreux s'accumule sur nitrate, nitrite et oxyde nitrique pour les cellules de la bactérie faiblement nitrito-tolérante ayant poussé sur nitrate, et uniquement sur  $NO$  pour celles provenant d'une culture sur nitrite. Les cellules de la bactérie fortement nitrito-tolérante sont nettement plus actives que celles de la bactérie faiblement nitrito-tolérante. L'activité maximale a été obtenue sur  $N_2O$  dans les deux cas.

Les cellules de *B. azotoformans* ont accumulé  $N_2O$  sur nitrite. Enfin, les cellules de la bactérie « nitrito-dépendante » n'ont pas réduit le nitrate et ont accumulé  $N_2O$  seulement sur  $NO$ .

Les activités dénitrifiantes maximales de la bactérie thermophile figurent dans le tableau VII. L'activité des cellules issues d'une culture sur nitrite est nettement supérieure à celle des cellules issues d'une culture sur nitrate ; ces dernières accumulent  $N_2O$  sur  $NO_2^-$  et  $NO$ , tandis que l'oxyde nitreux produit par les premières sur  $NO_3^-$  est ensuite rapidement réduit en  $N_2$ . L'activité maximale a été obtenue sur  $N_2O$  pour les deux cultures.

## DISCUSSION

Notre étude montre qu'il existe dans les sols de rizière du Sénégal des bactéries dénitrifiantes qui tolèrent des concentrations de nitrite très élevées. Dans leur majorité, ces bactéries sont sporulées et appartiennent au genre *Bacillus*. Elles représentent une fraction importante de la microflore dénitrifiante totale. On notera que les ensembles  $D_1$  et  $D_2$  ne sont pas exclusifs puisque la plupart des organismes nitrate- et nitrito-réducteurs ainsi que les organismes nitrito-tolérants sont inclus dans les deux. Inversement, un organisme peut être exclu de  $D_2$  aussi bien par sa sensibilité au nitrite que par son incapacité de le réduire. De même, un organisme peut être exclu de  $D_1$  par son inaptitude à réduire le nitrate ou par son inaptitude à réduire le nitrite. L'emploi d'un milieu complexe riche permet la croissance d'un nombre beaucoup plus élevé de bactéries nitrito-tolérantes.

TABLEAU VI. — Activité dénitrifiante maximale ( $\mu\text{l}$  de gaz accumulé/mg N/h) des cellules lavées de bactéries mésophiles, mesurée à  $37^\circ$  par chromatographie en phase gazeuse.

Souche	Culture anaérobie sur	Accepteur d'électrons	Gaz accumulés		
			NO	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub>
Bactérie fortement nitrito-tolérante	nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	0	74
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	0	159
		NO	—	0	48
		N <sub>2</sub> O	—	—	352
	nitrite	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	0	55
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	0	445
		NO	—	0	153
		N <sub>2</sub> O	—	—	770
Bactérie faiblement nitrito-tolérante	nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	25	34
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	49	0
		NO	—	35	22
		N <sub>2</sub> O	—	—	40
	nitrite	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	0	78
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	0	73
		NO	—	157	19
		N <sub>2</sub> O	—	—	191
Bactérie « nitrito-dépendante »	nitrite	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	0	0
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	0	76
		NO	—	82	0
		N <sub>2</sub> O	—	—	34
<i>B. azotoformans</i>	nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	180	305
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	356	280
		NO	—	0	101
		N <sub>2</sub> O	—	—	397

Tableau VII. — Activité dénitrifiante maximale  
des cellules thermophiles lavées,  
mesurée à 60° par chromatographie en phase gazeuse.

Culture anaérobie sur	Accepteur d'électrons	µl de gaz accumulé/mg N/h		
		NO	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub>
nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	0	89
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	78	17	116
	NO	—	46	46
	N <sub>2</sub> O	—	—	767
nitrite	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	409	1 135
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	0	2 275
	NO	—	0	600
	N <sub>2</sub> O	—	—	5 070

Cette population de bactéries nitrito-tolérantes est très diversifiée puisqu'on y rencontre des germes incapables de réduire NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, des germes oxyde nitrique-tolérants qui croissent en présence de NO et des germes oxyde nitreux-déficients incapables de croître en présence de N<sub>2</sub>O. La tolérance envers le nitrite varie suivant les souches, et l'on peut distinguer des bactéries nitrito-fortement tolérantes qui croissent rapidement en présence de 5 g/l de KNO<sub>2</sub> et des bactéries faiblement nitrito-tolérantes dont la croissance est faible ou nulle au-delà de 3 g/l.

Les bactéries dénitrifiantes thermophiles sont relativement nombreuses dans certains sols de rizière. La numération en présence de nitrite donne des valeurs plus élevées que la numération en présence de nitrate. Toutes les souches croissent en présence de nitrite à concentration élevée. Ces bactéries thermophiles sont toutes sporulées et appartiennent au genre *Bacillus* ; leur étude détaillée est en cours, mais le groupe apparaît déjà très hétérogène. Il semble en être de même pour les bactéries mésophiles sporulées. Enfin, parmi les bactéries non sporulées, moins nombreuses, figurent sans doute des espèces appartenant au genre *Pseudomonas*.

Ces bactéries nitrito-tolérantes qui se trouvent en grand nombre dans les sols de rizière, doivent jouer un rôle dans le processus de la dénitrification. Il est rare de déceler des nitrites dans ces sols dans lesquels, pourtant, le nombre de bactéries nitrato-réductrices produisant NO<sub>2</sub><sup>-</sup> est extrêmement élevé. Ces bactéries pourraient jouer un rôle effectif dans la réduction dissimilatrice du nitrate, les bactéries nitrito-tolérantes prenant le relais pour réduire le nitrite en gaz, au fur et à mesure de sa formation.

## RÉSUMÉ

Des numérations de bactéries dénitrifiantes mésophiles et thermophiles ont été effectuées dans des sols de rizière du Sénégal à l'aide de nitrate ou de nitrite à concentration élevée (5 g/l) comme substrat respiratoire. Elles ont révélé l'existence de deux populations de bactéries.

1) On observe une population de bactéries dénitrifiantes mésophiles, tolérant des concentrations élevées de nitrite. Ces organismes sont en majorité sporulés et relativement nombreux dans ces sols. Des études de croissance ont démontré leur grande diversité : *a*) des bactéries « nitrito-dépendantes » incapables de réduire  $\text{NO}_3^-$  ; *b*) des bactéries fortement nitrito-tolérantes, qui présentent une croissance rapide en présence de 5 g/l de  $\text{KNO}_2$  ; *c*) des bactéries faiblement nitrito-tolérantes dont la croissance est faible ou nulle au-delà de 3 g/l de  $\text{KNO}_2$  ; *d*) des bactéries  $\text{NO}$ -tolérantes, utilisant pour leur croissance l'oxyde nitrique comme substrat respiratoire ; *e*) des bactéries  $\text{N}_2\text{O}$ -déficientes, incapables de croître en présence de  $\text{N}_2\text{O}$ .

2) On observe, de plus, une population de bactéries dénitrifiantes thermophiles sporulées, nombreuses dans certains sols, et qui tolèrent plus ou moins bien le nitrite.

Des mesures de l'activité dénitrifiante de cellules lavées ont montré qu'en général les cellules issues d'une culture anaérobie sur nitrite ont une activité nettement plus grande que celle des cellules issues d'une culture anaérobie avec nitrate. Cette population nitrito-tolérante semble assez hétérogène, mais elle comprend principalement des espèces sporulées appartenant au genre *Bacillus*.

MOTS-CLÉS : Dénitrification, Sol, Nitrite ; Mésophilie, Thermophilie, *Bacillus* ; Rizière, Sénégal.

## REMERCIEMENTS

L'auteur exprime ses remerciements à MM M. Mouraret et F. Pichinoty pour leurs conseils ainsi qu'à MM J. Bakhoum et C. Barrier pour leur assistance technique.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOLLAG, J. M., ORCUTT, M. L. & BOLLAG, B., Denitrification by isolated soil bacteria under various environmental conditions. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1970, 34, 875-879.
- [2] BOVELL, C., The effect of sodium nitrite on the growth of *Micrococcus denitrificans*. *Arch. Microbiol.*, 1967, 59, 13-19.
- [3] CHATELAIN, R., Réduction du nitrite par *Alcaligenes odorans* var. *viridans*. *Ann. Inst. Pasteur* 1969, 116, 498-500.

- [4] DOWNEY, R. J., Nitrate reductase and respiratory adaptation in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bact.*, 1966, 91, 634-641.
- [5] GARCIA, J.-L., Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal : mesure de l'activité dénitrifiante. *Soil Biol. Biochem.*, 1974, 6, 79-84.
- [6] GARCIA, J.-L., Évaluation de la dénitrification dans les rizières par la méthode de réduction de  $N_2O$ . *Soil Biol. Biochem.*, 1975, 7, 251-256.
- [7] GARCIA, J.-L., RAIMBAULT, M., JACQ, V., RINAUDO, G. & ROGER, P., Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal : relations avec les propriétés physicochimiques et influence de la rhizosphère. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 1974, 11, 169-185.
- [8] GAWEL, L. J., The respiration characteristics of Ocean Bay sediments and selected marine isolates. Doct. Thesis Oregon State Univ., Corvallis.
- [9] PAYNE, W. J., Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bact. Rev.*, 1973, 37, 409-452.
- [10] PICHINOTY, F., BIGLIARDI-ROUVIER, J., MANDEL, M., GREENWAY, B., METENIER, G. & GARCIA, J.-L., The isolation and properties of a denitrifying bacterium of the genus *Flavobacterium*. *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1976, 42, 349-354.
- [11] PICHINOTY, F., de BARJAC, H., MANDEL, M., GREENWAY, B. & GARCIA, J.-L., Une nouvelle bactérie sporulée, dénitrifiante, mésophile : *Bacillus azotiformans* n. sp. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1976, 127 B, 351-361.
- [12] STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M., The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.*, 1966, 43, 159-171.
- [13] VANGNAI, S. & KLEIN, D. A., A study of nitrite-dependent dissimilatory micro-organisms isolated from Oregon soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1974, 6, 335-339.
- [14] YOUATT, J. B., Denitrification of nitrite by a species of *Achromobacter*. *Nature (Lond.)*, 1954, 173, 826-827.