

DISTRIBUTION  
DE LA MICROFLORE HÉTÉROTROPHE AÉROBIE  
ET EN PARTICULIER DES BACTÉRIES DÉNITRIFIANTES  
ET FIXATRICES D'AZOTE LIBRES  
DANS LA RHIZOSPHERE DU RIZ

par S. Roussos, J.-L. Garcia, G. Rinaudo et D. Gauthier

ORSTOM, Laboratoire de Microbiologie des Sols, BP 1386,  
Dakar, Sénégal

SUMMARY

DISTRIBUTION OF HETEROTROPHIC AEROBIC MICROFLORA  
AND SPECIALLY DENITRIFYING  
AND FREE-LIVING NITROGEN-FIXING BACTERIA  
IN THE RHIZOSPHERE OF RICE

The distribution of heterotrophic aerobic bacteria, actinomycetes and fungi was estimated in three samples (rhizospheric soil (SR), rhizoplane (R) and endorhizosphere (ER)) obtained from one rice seedling which had grown in pot during four months in a Casamance grey soil. The number of microbial populations were about the same from one sample to another:  $1.1$  to  $2 \times 10^8$  bacteria,  $3.3$  to  $8.6 \times 10^6$  actinomycetes and  $0.2$  to  $8.9 \times 10^4$  fungi per gram of dry soil (SR) or dry roots (R and ER). The denitrifying and free-living nitrogen fixing bacteria were numerous ( $10^7$  bacteria/g) but lower for ER where the number of actinomycetes remained high.

Thirty-six bacterial strains have been isolated from every sample with the use of a grid of isolation. The Gram-negative bacteria were dominant in SR and R where they represented respectively 70 and 94 % of total count. The major groups were non-sporulated Gram-variable rods (SR) and *Alcaligenes*-like bacteria (ER). The pseudomonads represented quite 15 % of total count in the three samples. On the other hand, the frequency of endospore-forming Gram-positive bacteria was high only in R where the *Bacillus* group was estimated to 45 % of total count.

Manuscrit reçu le 25 octobre 1979, accepté le 13 février 1980.

24 DEC. 1980

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° B10.134 Biosols

Only 5 free-living nitrogen-fixing bacterial strains had shown a denitrifying ability.

KEY-WORDS: Microflora, Rhizosphere, Rice, Denitrification, Nitrogen, Soil; Fixation, Senegal.

## INTRODUCTION

Les études microbiologiques relatives à la rhizosphère du riz sont peu nombreuses. On sait cependant que les bactéries abondent dans les sols de rizière submergés ; en effet, le riz possède de nombreuses lacunes aériques (aérenchyme) permettant de fournir de l'oxygène à ses racines et à la microflore qui s'y développe [24]. L'effet rhizosphère du riz sur la microflore varie avec l'âge des racines et la profondeur de prélèvement de l'échantillon de sol [18]. Une étude récente a montré que le genre *Bacillus* et les actinomycètes sont dominants dans la rhizosphère du riz et qu'il n'y a pas d'effet rhizosphère (R/S) marqué pour les bactéries cellulolytiques, pour celles qui utilisent le glucose et pour les dénitrifiantes [11, 12].

Pour les bactéries dénitrifiantes, les résultats ont été variables suivant le sol ou l'époque du prélèvement [8]. Il a d'autre part été observé un effet stimulant du riz sur la dénitrification [6]. Il existe en effet dans la rhizosphère du riz, des zones anaérobies dans lesquelles les processus biologiques peuvent se manifester avec une plus grande intensité que dans le sol non planté, en raison de la présence d'une plus grande quantité de substances directement assimilables et d'une densité bactérienne souvent plus élevée [7, 17].

En ce qui concerne la fixation de  $N_2$ , Balandreau [1] a montré que le riz exerce un effet maximal sur les fixateurs aérobies, en relation avec l'existence d'un gradient d'oxydo-réduction décroissant des racines vers la périphérie. Dans une étude récente effectuée à l'IRRI, Watanabe et Barraquio [23] ont établi que la majorité des bactéries isolées de l'endorhizosphère du riz étaient fixatrices de  $N_2$  et nécessitaient de l'azote organique « en condition fixatrice ».

Nous avons mené une étude similaire sur un sol de rizière du Sénégal en mettant particulièrement l'accent sur la répartition des souches bactériennes isolées et sur la distribution des bactéries dénitrifiantes et fixatrices d'azote dans la rhizosphère du riz.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1) Prélèvement des échantillons.

Un pied de riz (var. Moroberekan) a été cultivé pendant près de 4 mois en serre dans un pot contenant 5 kg de sol gris de Casamance (pH 5,2 ; C ‰ 3,1)

ER = endorhizosphère.

MNP = méthode du nombre le plus probable.

R = rhizoplan.

SR = sol rhizosphérique.

ayant reçu au départ 1 g de  $K_2HPO_4$  (100 kg/ha  $P_2O_5$ ), 15 g de  $CO_3Ca$  et 0,5 g de  $SO_4(NH_4)_2$  (30 kg N/ha). Un mois environ après l'épiaison, au cours de la maturation, le pied de riz est extrait du pot et la majeure partie du sol environnant est éliminée par lavage dans un bac d'eau. Le sol rhizosphérique est obtenu par lavage dans 500 ml d'eau stérile de la portion de racines comprises entre 5 et 20 cm de profondeur (18 g poids sec) ; 4 lavages successifs sont ainsi effectués avec renouvellement de l'eau à chaque opération. Le sol rhizosphérique (SR) (38,5 g poids sec) est ainsi mis en suspension dans 2 150 ml. La masse racinaire ainsi lavée est fractionnée en 16 parties égales (1,125 g poids sec) et l'une de ces fractions est sectionnée en fragments homogènes de 4 cm de long environ. Ces fragments racinaires sont mis sous agitation vigoureuse pendant 10 min dans un flacon sérum de 250 ml en position horizontale contenant 100 ml d'eau stérile, en présence de billes de verre. L'opération est répétée 5 fois avec changement de l'eau chaque fois. Le rhizoplan (R) est ainsi dilué dans un total de 500 ml d'eau. Puis les racines extraites du dernier lavage sont broyées dans un mortier et remises en suspension dans 100 ml d'eau pour l'obtention de l'endorhizosphère (ER).

Des suspensions-dilutions sont ensuite effectuées, à partir des trois échantillons précédemment obtenus, à l'aide de tubes à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile.

## 2) Évaluation des différentes flores telluriques.

Les numérations des bactéries, des actinomycètes et des champignons sont effectuées en double exemplaire, directement par étalement de 0,2 ml de ces suspensions sur boîtes de Pétri. Les numérations des bactéries dénitrifiantes, des bactéries fixatrices de  $N_2$  et de la totalité des microorganismes sont effectuées selon la méthode du nombre le plus probable (MNP), par inoculation de 0,2 ml des suspensions dans des tubes de  $12 \times 120$  mm (5 tubes par dilution) contenant 5 ml de milieu sélectif.

La composition des milieux de numération est la suivante.

**Bactéries** : « bactopectone » 10 g, glucose 5 g, extrait de levure 3 g, « bacto-agar » 15 g, eau distillée 1 000 ml, pH 7,2.

**Champignons** : « potato dextrose agar » (Difco) 30 g; eau distillée 1 000 ml ; on ajoute par filtration (Millipore 0,45  $\mu m$ ) du chloramphénicol 0,1 g, de la pénicilline 20 U et de la streptomycine 40 U.

**Actinomycètes** [14] : amidon soluble 10 g, caséine 0,3 g,  $KNO_3$  2 g, NaCl 2 g,  $K_2HPO_4$  2 g,  $MgSO_4,7 H_2O$  50 mg,  $CaCO_3$  20 mg,  $FeSO_4,7 H_2O$  10 mg, agar 15 g, eau distillée 1 000 ml, pH 6,5 ; on ajoute par filtration (Millipore 0,45  $\mu m$ ) du cycloheximide (actidione) 100 mg ; avant d'effectuer les dilutions, on ajoute une solution antibactérienne de phénol à la suspension de sol (700 mg/100 ml).

**Bactéries dénitrifiantes** [4] : « nutrient broth » (Difco) 8 g,  $KNO_3$  1 g, eau distillée 1 000 ml, pH 7 ; on utilise le réactif de Griess-Ilosvay pour la détection du nitrite, et la poudre de zinc pour celle du nitrate.

**Bactéries fixatrices de  $N_2$**  :  $K_2HPO_4$  800 mg,  $KH_2PO_4$  200 mg,  $MgSO_4,7 H_2O$  200 mg,  $CaCl_2,2 H_2O$  100 mg, NaCl 100 mg,  $FeSO_4,7 H_2O$  10 mg, solution d'oligo-éléments d'Augier 1 ml, acide malique 4 g, extrait de levure 100 mg, eau distillée 1 000 ml, pH 6,8 ajusté avec NaOH 2 N, agar 3 g ; quand apparaît une croissance bactérienne (trouble du milieu) on ajoute 2 % d'acétylène dans l'atmosphère des tubes munis d'un bouchon Vacutainer ; l'éthylène est recherché par injection de 0,5 ml du mélange gazeux dans un chromatographe à ionisation de flamme « Varian Aerograph 1400 » [17].

Nous avons recherché les germes mésophiles par incubation à 30° C pendant 7 jours.

### 3) *Isolement et identification sommaire des bactéries.*

L'isolement des souches de bactéries hétérotrophes aérobies est effectué après étalement et incubation des suspensions-dilutions de chacune des trois fractions (SR, R et ER) sur le milieu peptoné gélosé. Pour chacun de ces échantillons, nous avons isolé 36 souches à partir des dilutions contenant entre 60 et 200 colonies bactériennes, en utilisant une grille d'isolement [2]. La purification des souches ainsi isolées est obtenue par passages successifs sur « nutrient agar » (Difco) et observation au microscope. Les souches de bactéries sont conservées en pilulier sur « nutrient agar » (Difco) à + 4° C.

### 4) *Liste des caractères étudiés.*

Morphologie de la culture : aspect de la colonie sur gélose nutritive (surface, pigmentation, diamètre, élévation, contour). Morphologie cellulaire (forme, dimension, sporulation, mobilité, arrangement cellulaire). Culture en bouillon nutritif (aspect du trouble, pellicule en surface), coloration de Gram, coloration des flagelles [19]. Recherche de l'oxydase sur papier-filtre [13], de la catalase ( $H_2O_2$  à 10 volumes), de la réduction du nitrate en nitrite (réactif de Griess-Ilosvay) ou en gaz (poudre de zinc) en milieu de Focht et Joseph [4]. Étude de l'hydrolyse de l'urée sur milieu de Fergusson (modifié par Roland et coll. [20]). Étude de la fermentation du glucose selon Hugh et Leifson [10]. La production de dihydroxy-acétone est révélée avec le réactif de Fehling selon Gordon et coll. [9].

L'activité d'enzymes extracellulaires sur des milieux peptonés enrichis en macromolécules organiques (amidon, gélatine, lécithine, Tween 80) ajoutées à raison de 2 g/l est révélée par l'apparition d'auréoles autour de la colonie. Ces zones sont claires et lues directement (lécithine, Tween 80 [21]) ou elles sont révélées par des réactifs (iodo-ioduré pour l'amidon et chlorure mercurique selon Frazier [5], pour la gélatine).

Pour l'étude des besoins nutritionnels, le milieu minéral de base (MMB) comprend :  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$  3,77 g,  $KH_2PO_4$  0,98 g,  $NH_4Cl$  0,5 g,  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  30 mg, solution d'oligoéléments 1 ml, solution tampon Tris-HCl 1M pH 7,5 10 ml, agar 15 g, eau distillée qsp 1 000 ml. La source de carbone et d'énergie (0,4 % p/v) ainsi qu'une solution de vitamines (0,02 % v/v) sont ajoutées au MMB par filtration (Millipore 0,45  $\mu m$ ). L'ensemencement des boîtes de Petri se fait au moyen d'un inoculateur multipoints selon Lovelace et Colwell [15].

## RÉSULTATS

### 1) *Distribution quantitative de la microflore hétérotrophe aérobic.*

Dans le tableau I sont reportées, pour les 3 échantillons de la rhizosphère du riz étudiés, les densités des bactéries hétérotrophes aérobies, des actinomycètes et des champignons. Dans le cas des bactéries, on a distingué le dénombrement total direct sur boîte de Pétri et le dénombrement — selon la MNP — en tubes à essais de la totalité des microorganismes, des bactéries nitrato-réductrices produisant du nitrite, des dénitrifiantes et des fixatrices d'azote libre.

Nous pouvons tout d'abord constater que les densités de la totalité des microorganismes hétérotrophes aérobies obtenues par comptage direct sur boîte de Pétri ou par estimation suivant la MNP en tubes à essai, sont très voisines et de l'ordre de  $10^8$  bactéries/g de sol sec ou de racines sèches. Les densités varient très peu lorsque l'on passe d'un échan-

TABLEAU I. — Microflore bactériennes hétérotrophes aérobies et fongiques présentes dans les échantillons étudiés.

Échan- tillon	Bactéries						
	Totalité		Réduisant NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		Fixatrices de N <sub>2</sub> libre	Actino- mycètes	Cham- pignons
	boîte	tube	accumu- lant NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	dénitri- fiantes			
SR	2 × 10 <sup>8</sup>	3 × 10 <sup>8</sup>	6,9 × 10 <sup>7</sup>	3,6 × 10 <sup>7</sup>	5 × 10 <sup>7</sup>	3,3 × 10 <sup>6</sup>	7 × 10 <sup>4</sup>
R	1,8 × 10 <sup>8</sup>	1,1 × 10 <sup>8</sup>	3,1 × 10 <sup>7</sup>	1,8 × 10 <sup>7</sup>	1,8 × 10 <sup>7</sup>	7,4 × 10 <sup>6</sup>	8,9 × 10 <sup>4</sup>
ER	1,15 × 10 <sup>8</sup>	2,7 × 10 <sup>8</sup>	15,5 × 10 <sup>7</sup>	7,5 × 10 <sup>6</sup>	2 × 10 <sup>6</sup>	8,6 × 10 <sup>6</sup>	2,2 × 10 <sup>3</sup>

Les résultats expriment le nombre de germes/g de sol sec (SR) ou par gramme de poids sec de racines (R et ER).

SR = sol rhizosphérique ; R = rhizoplan ; ER = endorhizosphère.

tillon à l'autre. Le nombre de bactéries dénitrifiantes, de bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> et de champignons diminue dans ER par rapport à R, mais la densité des actinomycètes est cependant plus élevée dans ER.

## 2) Distribution qualitative des bactéries hétérotrophes aérobies.

Cent huit souches bactériennes, soit 36 par échantillon, ont été isolées en culture pure à l'aide d'une grille d'isolement ; 9 souches ont été par la suite écartées car elles présentaient une croissance trop lente et trop faible sur gélose nutritive. Nous avons effectué la distribution des souches en six groupes taxonomiques [2].

- 1) ASP = bâtonnets asporulés Gram<sup>+</sup> ou à Gram variable ;
- 2) A = bâtonnets asporulés Gram<sup>-</sup> à métabolisme oxydatif et aciliés ou péritriches ;
- 3) FC = bâtonnets asporulés Gram<sup>-</sup> et à métabolisme fermentatif ;
- 4) P = bâtonnets asporulés Gram<sup>-</sup> à métabolisme oxydatif et à ciliature polaire ;
- 5) S = bâtonnets sporulés Gram<sup>+</sup> ;
- 6) C = cocci.

La distribution des 99 souches retenues dans les 3 échantillons (SR, R et ER) est présentée dans le tableau II. Cette répartition a également été représentée en pourcentage sur un histogramme pour chaque échantillon (fig. 1).

La distribution qualitative des bactéries dans les 3 échantillons n'est pas uniforme. Nous pouvons, en effet, constater que les bâtonnets asporulés à Gram variable dominent dans l'échantillon SR où ils représentent 53 % de la microflore bactérienne, c'est-à-dire 5 fois plus que dans les 2 autres échantillons rhizosphériques. Dans l'échantillon R, ce sont les bâtonnets sporulés Gram<sup>+</sup> (*Bacillus*) qui dominent avec 45 % de la popu-

lation bactérienne hétérotrophe aérobie. Nous n'en avons trouvé aucun dans l'échantillon ER, et 4 fois moins dans l'échantillon SR. Enfin, dans ER, deux groupes sont dominants : des bâtonnets asporulés Gram<sup>-</sup> à métabolisme oxydatif dont 39 % à ciliature polaire (pseudomonades en majorité) et 29 % aciliés ou à ciliature péritriche (*Alcaligenes* en majorité).

La répartition des bactéries dénitrifiantes et des bactéries fixatrices

TABLEAU II. — Distribution des différents types bactériens dans les échantillons étudiés.

Échantillon	Effectif	ASP	A	FC	P	S	C
SR	32	17	3	1	6	4	1
R	36	4	2	8	5	16	1
ER	31	4	9	5	12	0	1

ASP = bâtonnets asporulés Gram<sup>+</sup> ou à Gram variable.

A = bâtonnets asporulés Gram<sup>-</sup> à métabolisme oxydatif et aciliés ou péritriches.

FC = bâtonnets asporulés Gram<sup>-</sup> et fermentant le glucose.

P = bâtonnets asporulés Gram<sup>-</sup> à métabolisme oxydatif et à ciliature polaire.

S = bâtonnets sporulés Gram<sup>+</sup>.

C = cocci.

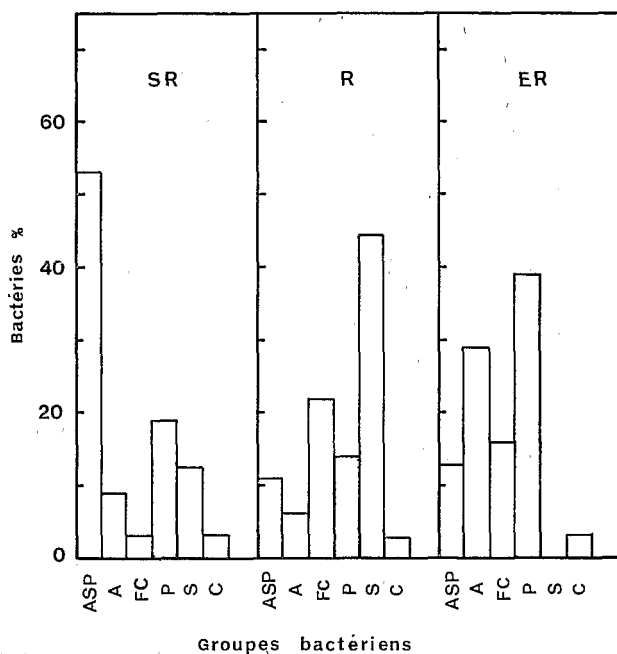


FIG. 1. — Histogramme de distribution des souches bactériennes dans les 3 échantillons de la rhizosphère du riz, SR, R et ER.

ASP, A, FC, P, S et C : cf. légende du tableau II et voir « Résultats ».

TABLEAU III. — Fréquence de la distribution des bactéries dénitrifiantes et fixatrices d'azote dans la rhizosphère du riz étudié.

Groupe bactérien	Bactéries dénitrifiantes			Bactéries fixatrices de N <sub>2</sub>		
	SR	R	ER	SR	R	ER
ASP	0	0	0	41	8	10
A	12,5	22	19	0	0	0
FC	0	0	0	0	14	6
P	15,5	3	23	12,5	3	0
S	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0

ASP, A, FC, P, S et C : cf. légende du tableau II et « Résultats ».  
Les résultats sont exprimés en % du nombre total des bactéries isolées.

de N<sub>2</sub> est représentée dans le tableau III. Ces bactéries se répartissent en 4 groupes dont l'un est commun : il y a en effet 5 souches qui présentent à la fois une activité dénitrifiante et fixatrice de N<sub>2</sub> ; ce sont des bâtonnets asporulés Gram<sup>-</sup>, à métabolisme oxydatif et à ciliature polaire. Ces bâtonnets, légèrement incurvés, font penser au genre *Spirillum*, mais leur taille est nettement plus petite que celle de *Azospirillum* qui possède ces deux propriétés [16]. Les deux groupes de bactéries dénitrifiantes sont représentés par des bâtonnets asporulés Gram<sup>-</sup>, à métabolisme oxydatif, soit à ciliature polaire (*Pseudomonas*) soit à ciliature péritriche (*Alcaligenes*). Les deux autres groupes de bactéries fixatrices d'azote comprennent le groupe dominant des bâtonnets asporulés à Gram variable, qui présentent une pigmentation rose et une pléomorphie marquée, et le groupe des bâtonnets asporulés Gram<sup>-</sup>, qui possèdent un flagelle polaire et fermentent le glucose sans production de gaz.

### 3) Distribution de certains caractères biochimiques parmi les populations bactériennes.

Cette distribution est représentée en pourcentage dans le tableau IV. La grande majorité des souches bactériennes isolées sont oxydase<sup>+</sup> et catalase<sup>+</sup> (90 % environ dans chaque échantillon). La possession d'exoenzymes est variable suivant l'enzyme et l'échantillon, avec cependant souvent une prédominance des souches de l'échantillon ER. Environ 75 % des souches des trois échantillons sont prototrophes et présentent une meilleure assimilation du malate par rapport à celle du glucose. Un grand nombre de souches sont capables de réduire le nitrate en nitrite ; le nombre de souches dénitrifiantes augmente dans ER où il atteint 65 % des souches isolées. Par contre, le nombre de souches fixatrices de N<sub>2</sub> libre diminue régulièrement lorsque l'on passe de SR (53 %) à ER où il n'est plus que de 16 %. Les souches qui fermentent le glucose sont en nombre relativement faible.

TABLEAU IV. — Caractères biochimiques et exigences nutritionnelles comparés pour les trois échantillons SR, R et ER.

	SR	R	ER
Catalase	90	92	87
Oxydase	90	94	84
Réduction de $\text{NO}_3^-$ en $\text{NO}_2^-$	53	80	81
Dénitrification	47	33	65
Fixation de $\text{N}_2$	53	25	16
Fermentation du glucose	3	22	16
Hydrolyse de l'urée	50	39	68
Hydrolyse de l'amidon	28	47	16
Hydrolyse de la gélatine	38	47	45
Hydrolyse du Tween 80	22	28	39
Hydrolyse de la lécithine	9	8	45
dihydroxy-acétone	25	36	52
Prototrophie	Glucose	31	44
	Malate	84	75
Prototrophie + vitamines	Glucose	41	64
	Malate	90	78
	Citrate	34	53

Les résultats sont exprimés en pourcentage.

## DISCUSSION

Notre étude est basée sur la numération des colonies de bactéries, d'actinomycètes et de champignons capables de se développer sur les milieux de culture en aérobiose à 30° C. Il est bien connu que cette méthode de numération indirecte ne permet le dénombrement que d'une fraction des microflores réellement présentes dans les échantillons. Cependant seule la numération indirecte permet à la fois le dénombrement et l'étude de la structure qualitative des populations microbiennes du sol.

Les densités de bactéries hétérotrophes aérobies dans la rhizosphère du riz (var. Moroberekan) ne varient pratiquement pas lorsque l'on passe de SR à ER. Watanabe et Barraquio [23] ont observé une augmentation d'une puissance de 10 de cette densité dans ER ( $1,1 \times 10^8$ ) par rapport à la densité des bactéries dans R ( $1,5 \times 10^7$ ) et SR ( $2,3 \times 10^7$ ). Le nombre des bactéries dénitrifiantes diminue régulièrement, dans notre expérience, de SR à ER, de  $3,6 \times 10^7$  à  $7,5 \times 10^6$ . Ce résultat est cependant moins marqué lorsque l'on considère le pourcentage de souches isolées des boîtes ayant servi à la numération de la microflore bactérienne totale. Mais si l'on rapporte ce pourcentage à la densité bactérienne totale de l'échantillon correspondant, le nombre de bactéries dénitrifiantes reste plus faible dans ER que dans SR. Le nombre de bactéries nitrato-réductrices produisant du nitrite reste stable ( $6,9$  à  $15,5 \times 10^7$ ). Contrairement au résultat obtenu par Watanabe et Barraquio [23], la densité des bactéries fixatrices de  $\text{N}_2$  diminue dans ER ( $2 \times 10^6$ ) par rapport à R ( $1,8 \times 10^7$ ) et SR



( $5 \times 10^7$ ). D'ailleurs on retrouve ce résultat lorsque l'on examine la capacité fixatrice de  $N_2$  des souches isolées dans les 3 échantillons (tableau IV) : nous avons trouvé 53 % de souches fixatrices de  $N_2$  dans SR, 25 % dans R et seulement 16 % dans ER. Il serait tentant de relier cette diminution à l'augmentation dans ER du nombre d'actinomycètes ( $8,6 \times 10^6$ ) par rapport au nombre trouvé dans SR ( $3,3 \times 10^6$ ). Venkatesan et Rangaswami [22] ont également observé cette augmentation des actinomycètes dans la rhizosphère du riz et ils ont montré que le nombre d'antagonistes vis-à-vis des bactéries est plus élevé que celui des antagonistes vis-à-vis des champignons. Ces derniers sont en moins grand nombre dans ER ( $2,2 \times 10^8$ ) que dans R ( $8,9 \times 10^4$ ).

Les fortes densités en actinomycètes observées dans l'ER du riz peuvent être rapprochées des résultats obtenus par Dobereiner et Baldani [3] qui ont montré que, dans la population de bactéries isolées de racines de maïs stérilisées superficiellement, la proportion de bactéries résistantes à de faibles niveaux de streptomycine ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) était plus de mille fois supérieure à celle de la population du sol. Il est donc vraisemblable que les actinomycètes jouent un rôle important dans la colonisation rhizosphérique.

Pour la numération des bactéries fixatrices de  $N_2$ , nous avons employé le malate alors que Watanabe et Barraquio [23] ont utilisé le glucose. Or, dans le tableau IV, il apparaît que le glucose favorise plutôt les bactéries de ER. Cela pourrait expliquer qu'à l'inverse de nos résultats, Watanabe et Barraquio [23] observent un nombre croissant de bactéries fixatrices de l'extérieur vers l'intérieur des racines. Mais l'utilisation du malate semble néanmoins préférable car il apparaît dans le tableau IV, qu'un plus grand nombre de bactéries l'utilisent dans les échantillons SR, R et ER.

L'étude de la distribution qualitative des souches bactériennes isolées (fig. 1) montre la diversité des 3 échantillons analysés ; ce qui confirme la validité de la méthode de séparation utilisée. Les bâtonnets à Gram variable dont une forte proportion présente un pigment rose, constituent la microflore dominante du SR (53 %) ; ces organismes à Gram variable sont pléomorphes, mobiles par un flagelle polaire, forment des colonies élevées, dont le diamètre est inférieur à 5 mm, colonies à bord régulier, opaques et pigmentées en rose et à surface lisse. Ces organismes possèdent une oxydase, une catalase et hydrolysent l'urée dans leur majorité. Une étude plus approfondie de leur identité est en cours.

## RÉSUMÉ

La distribution des bactéries hétérotrophes aérobies, des actinomycètes et des champignons a été estimée dans trois échantillons (sol rhizosphérique (SR), rhizoplan (R) et endorhizosphère (ER) obtenus à partir d'un pied de riz cultivé pendant 4 mois sur un sol gris de Casamance. Les densités observées sont importantes et du même ordre de grandeur pour les

3 échantillons : 1,1 à  $2 \times 10^8$  bactéries, 3,3 à  $8,6 \times 10^6$  actinomycètes et 0,2 à  $8,9 \times 10^4$  champignons/g de sol sec (SR) ou de poids sec de racines (R et ER). Les populations de bactéries dénitrifiantes et fixatrices d'azote libres sont élevées ( $10^7$  germes/g), mais moins importantes dans ER où le nombre d'actinomycètes demeure élevé. Trente-six souches bactériennes ont été isolées au moyen d'une grille dans chacun des 3 échantillons. Les bactéries à Gram négatif dominant dans SR et R où elles représentent respectivement 70 à 94 % de l'ensemble ; les groupes majoritaires sont des bâtonnets asporulés à Gram variable (SR) et les *Alcaligenes* (ER). Le groupe des *Pseudomonas* dans les 3 échantillons représente environ 15 % de l'ensemble. Par contre, la fréquence des microorganismes à Gram positif sporulés n'est élevée que dans R dans lequel le groupe des *Bacillus* représente 45 % de l'ensemble. Cinq souches fixatrices de  $N_2$  possèdent la faculté de dénitrifier.

MOTS-CLÉS : Microflore, Rhizosphère, Riz, Dénitrification, Azote, Sol ; Fixation, Sénégal.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BALANDREAU, J., Activité nitrogénasique dans la rhizosphère de quelques graminées. Thèse Doct. Sci. Nancy I, 1975, 162 p.
- [2] BIANCHI, A. J. M., BIANCHI, M. A. G., BEN SOUSSAN, M. G., BOUDABOUS, A., LIZARRAGA, M. L., MARTY, D. & ROUSSOS, S., Étude des potentialités cataboliques des populations bactériennes isolées des sédiments et des eaux proches du fond en mer de Norvège, in *Géochimie organique des sédiments Marins Profonds*, Orgon 1, Mer de Norvège 15-31, C. N. R. S., 1974.
- [3] DOBEREINER, J. & BALDANI, V. L. D., Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Canad. J. Microbiol.*, 1979, 25, 1264-1269.
- [4] FOCHT, D. D. & JOSEPH, H., An improved method for the enumeration of denitrifying bacteria. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1973, 37, 698-699.
- [5] FRAZIER, W. C., A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. infect. Dis.*, 1926, 39, 302-309.
- [6] GARCIA, J.-L., Influence de la rhizosphère du riz sur l'activité dénitrifiante potentielle des sols de rizière du Sénégal. *Oecol. Plant.*, 1973, 8, 315-323.
- [7] GARCIA, J.-L., Effet rhizosphère du riz sur la dénitrification. *Soil. Biol. Biochem.*, 1975, 7, 139-141.
- [8] GARCIA, J.-L., Analyse de différents groupes composant la microflore dénitrifiante des sols de rizière du Sénégal. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1977, 128 A, 433-446.
- [9] GORDON, R. E., HAYNES, W. C. & HOR-NAY PANG, The genus *Bacillus*. *Agriculture, Handbook*, 427, Department of Agriculture, Washington, 1973.
- [10] HUGH, R. & LEIFSON, E., The Taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bact.*, 1953, 66, 24-26.
- [11] KIMURA, M., WADA, H. & TAKAI, Y., Studies on the rhizosphere of paddy rice. — II. Microbiological features of the rhizosphere. *J. Sci. Soil Man.* (Japan), 1977, 48, 91-95.

- [12] KIMURA, M., WADA, H. & TAKAI, Y., Studies on the rhizosphere of paddy rice. — III. Microbiological features of the rhizosphere. *J. Sci. Soil. Man. (Japan)*, 1977, 48, 111-114.
- [13] KOVACS, N., Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by oxidase reaction. *Nature (Lond.)*, 1956, 178, 703.
- [14] KÜSTER, E. & WILLIAMS, S. T., Solution of media for isolation of streptomycetes. *Nature (Lond.)*, 1964, 202, 928-929.
- [15] LOVELACE, T. E. & COLWELL, R. R., A multipoint inoculator for petri dishes. *Appl. Microbiol.*, 1968, 18, 944-945.
- [16] NEYRA, C. A., DOBEREINER, J., LALANDE, R. & KNOWLES, R., Denitrification by nitrogen-fixing *Spirillum lipoferum*. *Canad. J. Microbiol.*, 1977, 23, 300-305.
- [17] RAIMBAULT, M., RINAUDO, G., GARCIA, J.-L. & BOUREAU, M., A device to study metabolic gases in the rice rhizosphere. *Soil. Biol. Biochem.*, 1977, 9, 193-196.
- [18] RANGASWAMI, G. & VENKATESAN, R., The rhizosphere microflora of rice plants as influenced by soil depth and root maturity. *Curr. Sci.*, 1964, 33, 181-183.
- [19] RHODES, M. E., The cytology of *Pseudomonas* species as revealed by a silver plating staining method. *J. gen. Microbiol.*, 1958, 18, 639-648.
- [20] ROLAND, F., BOURDON, D. & SZTURM, S., Differentiation rapide des *Enterobacteriaceae* sans action sur le lactose. *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, 73, 914-916.
- [21] SIERRA, G., A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of contact between the cells and fatty acid substances. *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1957, 23, 15-22.
- [22] VENKATESAN, R. & RANGASWAMI, G., Quantitative and quality studies of actinomycetes population from non-rhizosphere soil, rhizosphere of rice and stubble root surface. *Indian J. Microbiol.*, 1964, 4, 110-120.
- [23] WATANABE, I. & BARRAQUIO, W. L., Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living  $N_2$ -fixing organisms from rice roots. *Nature (Lond.)*, 1979, 277, 565-566.
- [24] YOSHIDA, T., Microbial metabolism of flooded soils, in « Soil Biochemistry » (E. A. Paul & A. D. McLaren), 3, (p. 83-122), M. Dekker Inc., New York, 1975.