

## ÉTUDE TAXONOMIQUE DE BACTÉRIES AZOTOFIXATRICES LIBRES ISOLÉES DE L'ENDORHIZOSPHERE DU RIZ

par J. L. Garcia <sup>(1)</sup> (\*), S. Roussos <sup>(1)</sup>, D. Gauthier <sup>(1)</sup>, G. Rinaudo <sup>(1)</sup>  
et M. Mandel <sup>(2)</sup> (\*\*)

<sup>(1)</sup> *Laboratoire de Microbiologie du sol, ORSTOM, B. P. 1386, Dakar, Sénégal*  
et <sup>(2)</sup> *The University of Texas, Cancer System Center,*  
*M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston, Texas (USA)*

### SUMMARY

#### TAXONOMICAL STUDY OF FREE-LIVING N<sub>2</sub>-FIXING BACTERIA ISOLATED FROM THE ENDORHIZOSPHERE OF RICE

Twenty strains of free-living N<sub>2</sub>-fixing bacteria, isolated from the endorhizosphere of rice in rice soils of Senegal, were studied on the basis of 259 morphological, physiological, biochemical and nutritional characters.

Half of them were Gram-negative small rods with polar flagella and showing a strictly respiratory metabolism; they were characteristic of the genus *Pseudomonas*. A first group of 6 strains was related to the *P. cepacia*-*P. marginata* group characterized by lophotrichous flagella; they accumulated polyhydroxybutyrate, assimilated arginine and betaine, grew at 41° C and showed a wide nutritional spectrum with DNA GC % of 67-68. The second group of 4 strains was related to the *P. lemoignei* group because of (a) its monotrichous flagella, (b) poly-β-hydroxybutyrate accumulation, (c) failure to assimilate arginine and betaine and to grow at 41° C, (d) lack of arginine dihydrolase and (e) its narrow nutritional spectrum. DNA GC % was 65. These 4 strains were also denitrifying bacteria.

Six strains were related to the genus *Alcaligenes* because of their strictly respiratory metabolism and their peritrichous flagella; their nutritional spectrum was variable and one of them was a denitrifier. DNA GC % was 68.

Manuscrit reçu le 10 novembre 1982, accepté le 17 juillet 1983.

(\*) Adresse actuelle : Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Université de Provence, 3, place Victor-Hugo, 13331 Marseille Cedex 3, France.

(\*\*) Immunopathology Laboratories International, Inc. 7000 Fannin, Suite M110, Houston, Texas 77030, USA.

26 SEPT. 1984

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 15785, ex 1

Cote : B

One strain was related to *Aeromonas hydrophila* of the *Vibrionaceae* family; it consisted of Gram-negative and oxidase-positive small rods with monotrichous polar flagella and respiratory and fermentative metabolism without gas evolution. This strain essentially assimilated sugars and its DNA GC % was 63.

Another strain was a Gram- and oxidase-negative small rod with peritrichous flagella and respiratory and fermentative metabolism with gas evolution. Sugars, organic acids and amino acids were assimilated. The DNA GC % was 53. This strain was related to *Enterobacter cloacae* of the *Enterobacteriaceae* family, but it showed the additional faculty of denitrification.

The last two strains studied were spirilla with amphitrichous flagella characteristic of the genus *Aquaspirillum*. They showed a strictly respiratory metabolism and a DNA CG % of 60-64.

This study allowed us to show the N<sub>2</sub>-fixing capacity of species of *Pseudomonas*, *Alcaligenes* and *Aeromonas* which had been devoid of N<sub>2</sub>-fixing bacteria until this time. All strains studied were microaerophilic for N<sub>2</sub> fixation.

**KEY-WORDS:** Nitrogen fixation, Endorhizosphere, Rice, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Aquaspirillum*; Free-living strains, Taxonomy, Denitrification, Sénégal.

## INTRODUCTION

Le nombre d'espèces bactériennes fixatrices de N<sub>2</sub> est relativement faible et, pour une même espèce, certaines souches ne possèdent pas cette propriété. Les diazotrophes décrits sont aérobies, anaérobies facultatifs ou stricts; ils peuvent présenter une croissance hétérotrophe ou photosynthétique. Leurs niches écologiques sont très variées, mais on ne connaît cependant pas d'espèce thermophile fixatrice de N<sub>2</sub>.

Des listes exhaustives ont été établies par plusieurs auteurs [1, 3, 6, 13, 23, 35, 36, 37]. Il n'existe cependant aucune caractéristique commune pour unir ces bactéries si ce n'est leur habileté à fixer N<sub>2</sub>. Il est certain que, depuis la généralisation de la méthode de réduction de l'acétylène, d'autres espèces fixatrices de N<sub>2</sub> du sol ou vivant en étroite association avec diverses plantes seront décrites.

Notre étude rapporte la description de 20 souches fixatrices libres n'appartenant pas au genre *Azospirillum* [32] et isolées par Rinaudo de l'endorhizosphère de différentes variétés de riz cultivées sur des sols de rizière du Sénégal. Ces souches ont été étudiées sur la base de 259 caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et nutritionnels.

---

ARA = activité réductrice d'acétylène.  
PHB = poly-β-hydroxybutyrate.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) *Isolement des souches.*

Les isollements ont été effectués à partir de différentes variétés de riz cultivées dans divers sols de rizière du Sénégal (tableau I). Le système racinaire a été débarrassé du sol adhérent par lavage à l'eau du robinet puis stérilisé superficiellement par immersion dans une solution de chloramine T à 1 % pendant 1 h 30 min ; il a été ensuite lavé deux fois avec de l'eau stérile puis maintenu pendant 1 h dans de l'eau stérile. Des fragments de racines de 2 cm de long ont été découpés stérilement puis enfouis verticalement dans le milieu faiblement gélosé M suivant, en tube à hémolyse (3 ml/tube) :  $K_2HPO_4$  0,5 g,  $KH_2PO_4$  0,5 g,  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  0,2 g, NaCl 0,1 g,  $CaCl_2 \cdot 4 H_2O$  0,1 g,  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  10 mg,  $MnSO_4$  5 ml, solution d'oligoéléments [2] 1 ml, acide malique 4 g, agar 3 g, eau distillée q. s. p. 1 000 ml, pH ajusté à 6,8 avec NaOH 2N.

TABLEAU I. — Origine et ARA spécifique  
(nanomoles  $C_2H_4$  produit/min/mg protéine) des souches étudiées.

N°	Origine	Culture	ARA spécifique/ $pO_2$ (kPa)				
			0	0,5	1	2	5
1	RT39 Richard-Toll	Rizière inondée	0	5	15	6	0
2	DG47 Dagana	Rizière inondée	0	4	15	7	0
3	SD53 Sédhiou	Rizière inondée	0	8	6	4	0
4	SD54 Sédhiou	Rizière inondée	0	7	11	8,5	0
5	SD58 Sédhiou	Rizière inondée	0	4	24	16	0
6	SD59 Sédhiou	Rizière inondée	0	12,5	9	6	0
7	SD60 Sédhiou	Rizière inondée	0	0	9,5	9,5	0
8	BR80 Brin	Rizière pluviale	0	4	20	30	1
9	KG83 Kangodi	Rizière pluviale	0	1	18	5	2
10	BK88 Bounkilinn	Rizière pluviale	0	13,5	ND	20	0
11	DG46 Dagana	Rizière inondée	0	6	18	15	0
12	SD57 Sédhiou	Rizière inondée	0	2	8	5	0
13	DN65		ND	ND	ND	ND	ND
14	R4 Séfa	Culture riz en pot	0	3	14	22	4
15	RT38 Richard-Toll	Rizière inondée	0	11,5	22,5	10	4
16	SD55 Sédhiou	Rizière inondée	15	7	9	0	0
17	SD52 Sédhiou	Rizière inondée	ND	ND	ND	ND	ND
18	SR <sub>2</sub> Séfa	Culture riz en pot	ND	ND	ND	ND	ND
19	SR <sub>22</sub> Séfa	Culture riz en pot	0	6	19	9	0
20	R <sub>10</sub> Séfa	Culture riz en pot	0	10	23	6	0

ARA = activité réductrice d'acétylène.

ND : non déterminé.

Le développement bactérien a été apparent après 2 à 3 jours d'incubation à 30° C. Le plus souvent, des voiles sont apparus entre 2 et 5 mm sous la surface, caractéristiques de bactéries microaérophiles. Plusieurs repiquages successifs en gélose molle ont permis d'enrichir les cultures en bactéries fixatrices de  $N_2$ , qui ont été ensuite étalées sur boîte de Pétri sur le milieu M comportant 17 g d'agar/l. Les boîtes ont été mises à incuber en microaérobiose, dans un dessiccateur sous atmosphère d'azote comprenant 1 % d'oxygène. Les colonies isolées ont été repiquées sur un milieu complet (milieu M additionné de « Potato extract » (Difco) 1 g/l et d'extrait de levure (Difco) 0,1 g/l) et incubées en

aérobiose. Après plusieurs repiquages successifs et contrôle de la pureté des souches, leur capacité fixatrice de  $N_2$  a été testée selon la méthode de réduction de l'acétylène.

### 2) *Contrôle de l'aptitude à la fixation de $N_2$ .*

Le test le plus simple a consisté à inoculer le milieu M faiblement gélosé (3 %) en tubes à hémolyse munis d'un bouchon vacutainer, avec les souches isolées et à incuber à 30° C sous différentes concentrations d'oxygène (tableau I) en présence de 2 % d'acétylène introduit après 10 h d'incubation. Après 24 h d'incubation sous acétylène, la recherche de l'éthylène, par injection de 0,5 ml du mélange gazeux dans un chromatographe à ionisation de flamme « Varian Aerograph 1400 » [22], a permis d'effectuer les mesures.

### 3) *Caractères morphologiques.*

L'aspect des colonies (surface, diamètre, élévation, contour, consistance, pigmentation) a été déterminé après croissance sur « Nutrient agar » (Difco); la morphologie cellulaire (forme, mensurations, arrangement cellulaire) a été examinée au microscope sur des cellules provenant d'une culture sur « Nutrient broth » (Difco), qui permet également de noter l'aspect de la croissance en milieu liquide (importance et aspect du trouble, pellicule en surface). Le Gram a été effectué sur des cellules jeunes, et les flagelles ont été mis en évidence par la technique de Rhodes [24]. Les capsules ont été recherchées en présence d'encre de chine. Le poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) a été révélé par coloration, au noir soudan, des cellules cultivées en aérobiose en présence de 2 % de DL-3-hydroxybutyrate.

### 4) *Caractères physiologiques.*

Ont été testées sur « Nutrient broth » (Difco), les croissances à différentes températures (4°, 12°, 22°, 37°, 41° et 43° C) et à différents pH (4, 5, 6, 8 et 9), ainsi que la tolérance à des concentrations élevées de différents substrats (NaCl 0,5 %,  $KNO_3$  8 %,  $KNO_2$  0,5 % et  $NaN_3$  0,03 %).

La prototrophie vis-à-vis du glucose ou du malate a été testée sur le milieu suivant :  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$  3,77 g,  $KH_2PO_4$  0,98 g,  $NH_4Cl$  0,5 g,  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  30 mg, glucose ou acide malique 2 g, solution d'oligoéléments 1 ml, eau distillée 1 000 ml, pH ajusté à 6,8.

### 5) *Caractères biochimiques.*

L'oxydase a été recherchée sur papier filtre selon la technique de Kovacs [11] et la catalase révélée par  $H_2O_2$  à 10 vol. sur les colonies en boîte de Pétri. L'hydrolyse de l'urée a été mise en évidence sur le milieu de Ferguson modifié par Roland et coll. [26], et la fermentation du glucose, sur le milieu de Hugh et Leifson [10].

L'activité d'enzymes extracellulaires sur des milieux peptonés enrichis en macromolécules organiques (amidon, gélatine, jaune d'œuf, tween 80) ajoutées à raison de 2 g/l, a été révélée par l'apparition d'auroles autour des colonies; ces zones claires ou opalescentes ont été lues directement (jaune d'œuf et ou tween 80 [27]) ou révélées par des réactifs (iodo-ioduré pour l'amidon, et chlorure mercurique selon Frazier [5] pour la gélatine). La production de dihydroxyacétone en boîte de Pétri a été révélée à l'aide du réactif de Fehling [7]. La recherche des décarboxylases de la lysine et de l'ornithine ainsi que l'arginine dihydrolase a été faite en milieu liquide selon la méthode de Richard [25]. Les tests suivants ont été réalisés selon les procédés décrits par Skerman [28]: réaction de Voges-Proskauer, rouge de méthyle, productions d' $H_2S$  et d'indole

et croissance en milieu au citrate de Simmons. La recherche de la tryptophane désaminase a été faite à partir du milieu de Ferguson modifié par Roland et coll. [26]. La réduction du nitrate en nitrite a été recherchée sur « Nutrient broth » (Difco) additionné de 1 g/l de  $\text{KNO}_3$ , à l'aide du réactif de Griess-Ilosvay; la poudre de zinc a été utilisée pour détecter la réduction du nitrate en gaz.

Le milieu suivant a été utilisé pour tester l'assimilation du nitrate comme seule source d'azote :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g,  $\text{MgSO}_4$  0,2 g,  $\text{NaCl}$  0,1 g,  $\text{CaCl}_2$  0,1 g,  $\text{FeSO}_4$  10 mg, acide malique 4 g, glucose 2 g,  $\text{KNO}_3$  1 g, solution d'oligoéléments 1 ml, eau distillée q. s. p. 1 000 ml, pH ajusté à 6,8 avec  $\text{KOH}$ .

#### 6) *Étude nutritionnelle.*

Elle a été inspirée de celle réalisée par Stanier et coll. [30] sur le genre *Pseudomonas*. Les cultures ont été obtenues sur milieu solide composé d'une solution de base :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  3,77 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,98 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  30 mg, tampon tris- $\text{HCl}$  1M, pH 7,5, 10 ml; solution d'oligoéléments 1 ml; agar Noble (Difco) 15 g; eau distillée 1 000 ml. Nous avons testé 155 substrats organiques comme unique source de carbone et d'énergie, à raison de 2 g/l pour les glucides et de 1 g/l pour les autres composés, à l'exception du phénol dont la concentration a été réduite à 0,25 g/l.

Tous ces substrats ont été ajoutés au milieu stérile après filtration sur filtre Millipore 0,45  $\mu\text{m}$ , à l'exception du géraniol et du naphthalène, qui ont été déposés dans le couvercle après ensemencement des boîtes de Pétri. Une solution complexe de facteurs de croissance (vitamines et coenzymes) a été également ajoutée à raison de 2 ml/l, après filtration sur Millipore 0,45  $\mu\text{m}$ .

L'ensemencement des boîtes de Pétri a été réalisé au moyen d'un inoculateur multipoint selon Lovelace et Colwell [14], à partir de cultures jeunes prélevées dans de l'eau distillée stérile sur milieu gélosé. Après 15 jours d'incubation, la présence ou l'absence de croissance a été déterminée par rapport à un témoin sans substrat carboné. Les croissances dues à des mutations ont été écartées. Seules les croissances franches ont été comptées comme positives.

#### 7) *Composition en bases de l'ADN.*

L'ADN a été extrait des cellules cultivées en milieu complexe suivant la méthode de Marmur [16]. La composition en bases (GC %) a été calculée à partir de la densité de flottaison en  $\text{CsCl}$  [15].

## RÉSULTATS

Dans le tableau I sont reportés les ARA (activité réductrice d'acétylène) spécifiques des souches incubées dans une atmosphère comprenant des concentrations variables d'oxygène. Pour la majorité d'entre elles, l'activité nitrogénasique ne s'exprime qu'en présence d'une  $\text{pO}_2$  comprise entre 0,5 et 2 kPa. L'activité optimale varie beaucoup d'une souche à l'autre (de 8 à 30 nmoles  $\text{C}_2\text{H}_4/\text{min}/\text{mg}$  protéine). La majorité des souches ont une activité optimale correspondant à une  $\text{pO}_2$  de 1 kPa.

Les principaux caractères des 20 souches analysées sont reportés dans le tableau II. Le tableau III présente l'analyse de l'ADN pour 15 souches.

TABLEAU II. — Caractères morphologiques, biochimiques et nutritionnels des souches étudiées.

Caractères	Souches																			
	5	8	12	13	11	1	17	18	19	20	4	2	3	6	9	15	14	16	10	7
<i>Caractères morphologiques :</i>																				
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ciliation polaire	>1	>1	>1	>1	>1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
péritriche	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	2(>1)	2(>1)
<i>Caractères biochimiques :</i>																				
oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hydrolyse gélatine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
jaune d'œuf	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
urée	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
formation dihydroxy-acétone	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
fermentation glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
prototrophie glucose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
assimilation KNO <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO <sub>3</sub> → NO <sub>2</sub>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO <sub>3</sub> → gaz	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
arginine dihydrolase	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
lysine décarboxylase	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
ornithine décarboxylase	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Voges-Proskauer	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
poly-β-hydroxybutyrate	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>Assimilation</i>																				
<i>substrats carbonés :</i>																				
— sucres et dérivés :																				
D-ribose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
raffinose	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
L-rhamnose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
D-glucose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

TABLEAU II (suite).

Caractères	Souches																			
	5	8	12	13	11	1	17	18	19	20	4	2	3	6	9	15	14	16	10	7
<i>Assimilation</i>																				
<i>substrats carbonés :</i>																				
D-fructose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
saccharose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
tréhalose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
maltose	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
cellobiose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
lactose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
désoxyribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-xylose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
amidon	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
inuline	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gluconate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
2-cétogluconate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
saccharate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
mucate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
sédoheptulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
— acides gras :																				
acétate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
propionate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
butyrate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
isobutyrate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
valérate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
isovalérianate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
caproate	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
palmitate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
laurate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
pélargonate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
caprate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
valérianate	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
— acides dicarboxyliques :																				
oxalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
malonate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
succinate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
maléate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
fumarate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

TABLEAU II (suite).

Caractères	Souches																				
	5	8	12	13	11	1	17	18	19	20	4	2	3	6	9	15	14	16	10	7	
<i>Assimilation</i>																					
<i>substrats carbonés :</i>																					
glutarate	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	
adipate	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
pimélate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	
subérate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	
sébacate	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
2-oxo-glutarate	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	
crotonate	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
— hydroxyacides :																					
D-malate	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
D(-)-tartrate	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
L(+)-tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
mésotartrate	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	
DL-β-hydroxyburate	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
DL-lactate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
glycollate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
DL-glycérate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
hydroxyméthylglutarate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
— acides organiques divers :																					
citrate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
pyruvate	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
aconitate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
laévulinate	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
citraconate	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
itaconate	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
mésaconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
formiate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
formate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
tartronate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
D-glucuronate	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DL-isocitrate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Cis-aconitate	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Trans-aconitate	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
α-D-galacturonate	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	

TABLEAU II (suite).

Caractères	Souches																				
	5	8	12	13	11	1	17	18	19	20	4	2	3	6	9	15	14	16	10	7	
<i>Assimilation</i>																					
<i>substrats carbonés :</i>																					
— polyalcools et glycols :																					
érythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glycérol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
éthylèneglycol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
propane, 1,2, diol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
butane, 2,3, diol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-phényléthanol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
— alcools :																					
méthanol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
éthanol	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
n-propanol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
isopropanol	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-butanol	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
isobutanol	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
géraniol	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
— composés aromatiques																					
non azotés :																					
D-mandélate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-mandélate	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
benzoylformate	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
benzoate	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
o-hydroxybenzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
m-hydroxybenzoate	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-hydroxybenzoate	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
phtalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
isophtalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
téréphtalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
phénylacétate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

TABLEAU II (suite).

Caractères	Souches																				
	5	8	12	13	11	1	17	18	19	20	4	2	3	6	9	15	14	16	10	7	
<i>Assimilation</i>																					
<i>substrats carbonés :</i>																					
Trans-cinnamate	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
naphtalène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
phénol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
quinat	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
testostérone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
— acides aminés aliphatiques :																					
glycocolle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
L- $\alpha$ -alanine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
D- $\alpha$ -alanine	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
$\beta$ -alanine	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
DL-sérine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
DL-thréonine	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
L-leucine	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	
DL-isoleucine	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
DL-norleucine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
DL-valine	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
L-aspartate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
L-glutamate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
L-lysine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
L-arginine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
DL-ornithine	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
L-citrulline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
DL- $\alpha$ -aminobutyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	
$\gamma$ -aminobutyrate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	
DL-norvaline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	
asparagine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	
méthionine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
L(+)-cystéine	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
L-cystine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	

TABLEAU II (suite et fin).

Caractères	Souches																				
	5	8	12	13	11	1	17	18	19	20	4	2	3	6	9	15	14	16	10	7	
<i>Assimilation</i>																					
<i>substrats carbonés :</i>																					
— acides aminés aromati-																					
ques :																					
L-histidine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
L-proline	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	++	++	++	++	-	-	-	++	-	-	-
L-tyrosine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L-phénylalanine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
DL-tryptophane	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
kynurénate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anthranilate	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>o</i> -aminobenzoate	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -aminobenzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
— amines :																					
méthylamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
éthanolamine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
benzylamine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
putrescine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
spermine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
histamine	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
tryptamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
butylamine	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucosamine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
esculine	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
— composés azotés divers :																					
bétaïne	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
sarcosine	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
créatine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hippurate	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
panthoténate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
acétamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nicotinate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
— hydrocarbures :																					
n-dodécane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-hexadécane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLEAU III. — Analyse de l'ADN (GC %)

Souche n°	GC %	Identité
5	68	<i>P. cepacia</i> et <i>P. marginata</i>
8	63	
12	68	
13	67	
11	67	
1	67	
19	72	<i>P. lemoignei</i>
20	65	
2	68	<i>Alcaligenes</i> sp.
6	68	
9	68	
14	63	<i>Aeromonas</i> sp.
16	53	<i>Enterobacter cloacae</i>
10	60	<i>Aquaspirillum fasciculus</i>
7	64	

I. — La moitié des souches sont représentées par de petits bâtonnets de 1,5 à 3  $\mu\text{m}$  de long et 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  de large, Gram<sup>-</sup>, droits ou légèrement incurvés, mobiles par le moyen d'un ou plusieurs flagelles polaires, aérobies, chimio-organotrophes et possèdent un métabolisme de type respiratoire. Ils sont oxydase<sup>+</sup> et prototrophes. Le GC % est compris entre 63 et 72. Cette description correspond sensiblement à la définition du genre *Pseudomonas* [4, 29].

A) Un premier groupe de 6 souches (n° 5, 8, 12, 13, 11 et 1) se rattache au groupe *P-cepacia-P. marginata*. En effet, ces souches présentent un à plusieurs flagelles polaires, accumulent en réserve du PHB, utilisent l'arginine et la bêtaïne comme seule source de carbone et croissent à 41° C ; l'arginine-dihydrolase est absente chez trois souches. Leur GC % est de 67 à 68. Mais cependant, aucune ne produit de pigment non fluorescent. Elles assimilent un grand nombre de composés carbonés (de 71 à 87), principalement les sucres et dérivés, les acides gras, les acides organiques, les polyalcools, les acides aminés et les amines. La variabilité porte principalement sur l'utilisation de 42 substrats ainsi que sur la tolérance au NaCl, au KNO<sub>3</sub>, au KNO<sub>2</sub> et à l'azoture de sodium. Les colonies ont 2 à 5 mm de diamètre ; elles sont effuses, opaques, crèmes ou blanches et présentent un bord régulier et une surface lisse exceptée pour la souche n° 1 qui forme des colonies à bord crénelé et surface rugueuse.

B) Un deuxième groupe de 4 souches (n° 17, 18, 19 et 20) peut s'apparenter au groupe de *P. lemoignei*. En effet, ces souches ont un seul flagelle polaire, accumulent en réserve du PHB, n'assimilent pas l'arginine et la bêtaïne, ne possèdent pas l'arginine-dihydrolase et croissent à 41° C. Trois d'entre elles présentent également un spectre nutritionnel

très réduit (7 à 14 substrats carbonés) et n'assimilent pas les sucres, les acides gras (caprate et valérianate exceptés), les acides organiques (2-oxo-glutarate et pyruvate exceptés), les polyalcools et glycols, les composés aromatiques, les acides aminés et les amines. Seuls quelques alcools (éthanol, n-propanol) sont utilisés par toutes les souches. Le GC % de la souche n° 20 est de 65. La souche n° 19 assimile cependant 33 composés carbonés parmi les sucres, les acides gras, quelques acides organiques et alcools. Son GC % est plus élevé : 72 ; elle hydrolyse la gélatine. Ces souches présentent des colonies de 2 à 5 mm de diamètre, effuses, opaques, blanches, à bord régulier et surface lisse. Elles dissimilent toutes le nitrate en gaz.

II. — Parmi la seconde moitié des 20 souches analysées, 6 souches (n° 4, 2, 3, 6, 9 et 15) se présentent sous la forme de petits bâtonnets de 1 à 3  $\mu\text{m}$  de long et 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de large; non sporulés, mobiles par quelques flagelles péritriches, Gram<sup>-</sup>, aérobies, chimio-organotrophes, dotés d'un métabolisme respiratoire et prototrophes. Elles ne fermentent pas le glucose, elles sont oxydase<sup>+</sup> et catalase<sup>+</sup> et elles n'hydrolysent pas l'amidon et la gélatine. Elles réduisent le nitrate en nitrite, et l'une d'elles (n° 15) dénitrifie. Elles croissent à 41° C (exceptée la souche n° 15).

Les quatre premières souches assimilent de 83 à 87 substrats carbonés répartis parmi tous les groupes de composés testés. La souche n° 9 utilise 39 substrats mais aucun sucre, acide gras ou amine. La souche n° 15 assimile 36 composés mais pas d'alcools, d'acides aminés (alanine exceptée) et d'amines.

Ces souches semblent répondre à la description du genre *Alcaligenes* [4]. La teneur en GC pour les 3 souches analysées est de 68 %.

III. — La souche n° 14 se présente sous la forme de petits bâtonnets de 1,5 à 3  $\mu\text{m}$  de long avec une largeur inférieure à 0,5  $\mu\text{m}$ , Gram<sup>-</sup>, mobiles par un flagelle polaire, oxydase<sup>+</sup> et catalase<sup>+</sup>. Les colonies ont 2 à 5 mm de diamètre; elles sont convexes, translucides, crèmes et présentent un bord régulier et une surface lisse. Le glucose est fermenté avec production d'acide. La souche est prototrophe et accumule du PHB en réserve. Elle réduit le nitrate en nitrite et hydrolyse l'urée. Tous les autres tests biochimiques sont négatifs. Elle croît à 41° C. Elle assimile 33 composés carbonés dont essentiellement les sucres ainsi que quelques acides organiques, polyalcools et amines. Le GC % est de 63.

Ce profil correspond aux membres de la famille des *Vibrionaceae* et plus précisément au genre *Aeromonas* [4].

IV. — La souche n° 16 est un bâtonnet de 1,5 à 3,0  $\mu\text{m} \times 0,5$  à 1,0  $\mu\text{m}$ , Gram<sup>-</sup>, mobile avec une ciliation péritriche. Les colonies ont 2 à 5 mm

de diamètre ; elles sont effuses, translucides, blanches, avec un bord régulier et une surface lisse. La souche est oxydase<sup>-</sup> et catalase<sup>+</sup>. Elle est aérobic et fermente le glucose, le saccharose, le maltose, le mannitol, le mannose et le xylose avec production de gaz ( $H_2 + CO_2$ ) ; le lactose est fermenté avec production d'acide seulement. La souche est prototrophe et n'accumule pas de PHB. Elle dissimile le nitrate en gaz et croît en anaérobiose sur thiosulfate, fumarate et  $N_2O$  comme substrats respiratoires. Elle possède l'arginine-dihydrolase, assimile le nitrate et croît à 41° C. Le test de Voges-Proskauer est positif. Elle tolère les quatre composés (NaCl,  $KNO_3$  ;  $KNO_2$  et azoture) aux concentrations testées, ainsi qu'un pH de 5,0 ou de 9,0. Les autres tests biochimiques sont négatifs. Le GC % est de 53.

Cette souche assimile 57 composés carbonés, essentiellement les sucres et dérivés, les acides organiques et les acides aminés. Cette description permet de l'apparenter très étroitement à l'espèce *Enterobacter cloacae* [4].

V. — Les deux dernières souches étudiées (n° 10 et 7) sont des spirilles de plus de 3,0  $\mu m$  de long avec une largeur inférieure à 1,0  $\mu m$ , Gram<sup>-</sup> et mobiles ; la ciliation, de type amphitriche, présente une touffe de cils à chaque pôle. Les colonies ont un diamètre compris entre 2 et 5 mm ; elles sont effuses, translucides, de couleur crème, avec un bord régulier et une surface lisse. Ces deux souches sont aérobies, prototrophes et présentent un métabolisme de type respiratoire ; elles sont oxydase<sup>+</sup> et catalase<sup>+</sup>, hydrolysent l'urée, dissimilent le nitrate en nitrite et assimilent le nitrate. La croissance est positive de 12 à 41° C et pour un pH de 5,0 à 8,0. La souche n° 10 hydrolyse également le jaune d'œuf et le tween 80. Elle assimile 85 substrats carbonés répartis dans l'ensemble des composés testés. Le GC % est de 60. La souche n° 7 n'utilise que 76 substrats carbonés et a un GC % de 64. Cette morphologie et notamment ce type particulier de ciliation permettent de classer ces deux souches dans le genre *Aquaspirillum* [12, 31].

## DISCUSSION

La principale particularité de cette étude est, sans aucun doute, la description détaillée de plusieurs souches appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Alcaligenes* réputés ne pas comprendre d'espèces libres, fixatrices de  $N_2$ . On pense cependant, depuis longtemps, que certains *Pseudomonas* peuvent fixer  $N_2$  mais la description des souches sous l'appellation *P. azotogensis* est trop peu détaillée pour convaincre [8, 17, 21, 34]. Notre étude, calquée sur celle de Stanier et coll. [30] et appuyée par l'analyse de l'ADN, apporte maintenant des preuves irréfutables pour corroborer cette hypothèse.

Très récemment, Thomas-Bauzon et coll. [33] ont isolé et identifié de la rhizosphère du riz 3 souches fixatrices de  $N_2$  qu'ils ont apparentées

à *P. paucimobilis* [9]. Cette espèce produit un pigment jaune sur agar nutritif et serait proche de *P. cepacia*. Mais l'étude de Holmes et coll. [9] ne comporte pas d'analyse nutritionnelle pour établir une comparaison suffisante avec nos souches.

En ce qui concerne le genre *Pseudomonas*, il semblerait que l'on ait donc deux groupes d'espèces fixatrices de  $N_2$ . Le premier est apparenté au groupe *P. cepacia-P. marginata* qui présente un large spectre nutritionnel, et le deuxième au groupe de *P. lemoignei* qui assimile peu de composés carbonés. Les souches de ce deuxième groupe dénitrifient toutes, mais ce caractère a déjà été signalé pour une souche apparentée à *P. lemoignei* [19] dont le spectre nutritionnel est voisin.

Le spectre nutritionnel et la composition en bases de l'ADN semblent rattacher les 6 souches apparentées au genre *Alcaligenes* à l'espèce *A. denitrificans* [20], mais 4 d'entre elles assimilent cependant un nombre élevé d'hydrates de carbone, ce qui n'est pas habituel chez cette espèce. Ces 4 souches n'accumulent pas également de PHB ce qui pourrait cependant s'expliquer par la faible sensibilité de la technique cytologique. Mais comme aucune d'entre elles ne dénitrifie, il semblerait que ces souches appartiennent à un groupe différent de celui des deux autres appartenant au genre *Alcaligenes* dont l'une dénitrifie.

La souche apparentée au genre *Aeromonas* serait également la première description d'un membre de la famille des *Vibrionaceae* capable de fixer  $N_2$ . Elle se rapprocherait sensiblement de l'espèce *A. hydrophila* [4]; elle n'assimile cependant aucun acide aminé hormis l'aspartate.

L'espèce *Enterobacter cloacae* est connue comme fixatrice de  $N_2$  depuis longtemps [4, 6, 13]. Notre souche est très voisine de la description du Manuel de Bergey [4] mais possède également la particularité de dissimiler le nitrate en gaz. Avec les souches du groupe *P. lemoignei* et la souche dénitrifiante de *Alcaligenes*, cette souche constituerait donc une nouvelle espèce fixatrice de  $N_2$  capable de dénitrifier et qui serait différente des souches de *Rhizobium* [38] et *Azospirillum* [18] précédemment décrites comme possédant cette propriété.

Enfin les deux souches de *Azospirillum* caractérisées par leur ciliation amphitriche confirment les observations antérieures effectuées sur les espèces *A. peregrinum* et *A. fasciculus* [12] qui fixent  $N_2$  en condition de microaérophilie.

L'effet bénéfique des faibles tensions d'oxygène sur la fixation de  $N_2$  dans la rhizosphère du riz a été notamment suggéré par Watanabe et coll. [35]. Il s'explique par le fait qu'une grande majorité des souches de la rhizosphère sont microaérophiles pour la fixation de  $N_2$ .

## RÉSUMÉ

Vingt souches libres, fixatrices de  $N_2$ , isolées de l'endorhizosphère du riz dans des sols de rizière du Sénégal, ont été étudiées sur la base

de 259 caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et nutritionnels.

La moitié d'entre elles se présentent sous la forme de petits bâtonnets Gram<sup>-</sup>, à ciliation polaire et métabolisme strictement respiratoire, caractéristiques du genre *Pseudomonas*. Un premier groupe de 6 souches est apparenté au groupe *P. cepacia-P. marginata* caractérisé par une ciliation lophotriche; elles accumulent du poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB), utilisent l'arginine et la bétaine, croissent à 41° C et présentent un large spectre nutritionnel avec un GC % de 67-68. Le deuxième groupe de 4 souches est apparenté au groupe de *P. lemoignei* en raison de la ciliation monotriche, de l'accumulation du PHB, de la non utilisation de l'arginine et de la bétaine, de la croissance à 41° C, de l'absence d'arginine-dihydrolase et d'un spectre nutritionnel réduit. Le GC % est de 65. Ces 4 souches sont dénitrifiantes.

Six souches peuvent être rattachées au genre *Alcaligenes* en raison de leur métabolisme strictement respiratoire et de leur ciliation péritriche. Leur spectre nutritionnel est variable et l'une d'entre elles dénitrifie. Le GC % est de 68.

Une souche, apparentée à l'espèce *Aeromonas hydrophila* de la famille des *Vibrionaceae*, se présente sous la forme de petits bâtonnets Gram<sup>-</sup>, à ciliation polaire monotriche et métabolisme respiratoire et fermentatif sans production de gaz. Le test de l'oxydase est positif. Elle assimile essentiellement les hydrates de carbone et présente un GC % de 63. L'une des souches est un petit bâtonnet Gram<sup>-</sup> à ciliation péritriche et métabolisme respiratoire et fermentatif avec production de gaz. Le test de l'oxydase est négatif. Elle assimile les sucres, les acides organiques et les acides aminés et son GC % est de 53. Elle est apparentée à l'espèce *Enterobacter cloacae* de la famille des *Enterobacteriaceae* mais possède la faculté supplémentaire de dissimiler le nitrate en gaz.

Les deux dernières souches étudiées sont des spirilles présentant une ciliation amphitriche caractéristique du genre *Aquaspirillum*. Leur métabolisme est strictement respiratoire et le GC % est 60-64.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence la faculté de fixer N<sub>2</sub> chez des espèces des genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Aeromonas* qui ne présentaient pas d'espèces fixatrices jusqu'à ce jour. Toutes les souches décrites sont microaérophiles pour la fixation de N<sub>2</sub>.

MOTS-CLÉS : Fixation de l'azote, Endorhizosphère, Riz, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Aquaspirillum*; Souches libres, Taxonomie, Dénitrification, Sénégal.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ABD EL MALEK, Y., HOSNY, I. & SHAWKY, B. T., Studies on the aerobic non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria, other than *Azotobacter*, in Egyptian soils. *Zbl. Bakt.* II. Abt., 1979, 134, 507-512.

- [2] AUGIER, J., A propos de la numération des *Azotobacter* en milieu liquide. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 91, 759-765.
- [3] BARRAQUIO, W. L., DE GUZMAN, M. R., BARRION, M. & WATANABE, I., Population of aerobic heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland and dryland rice. *Appl. environ. Microbiol.*, 1982, 43, 124-128.
- [4] BUCHANAN, R. E. & GIBBONS, N. E., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- [5] FRAZIER, W. C., A method for the detection of changes in gelation due to bacteria. *J. infect. Dis.*, 1926, 39, 302-309.
- [6] GORDON, J. K., Introduction to the nitrogen-fixing prokaryotes, in « The prokaryotes » (M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows & H. G. Schlegel), vol. I (p. 781-794), Springer-Verlag, Berlin, 1981.
- [7] GORDON, R. E., HAYNES, W. C. & HOR-NAY PANG, The genus *Bacillus*, in « Agriculture Hand Book », n° 427, v. s. Dept. Agric., Washington, 1973.
- [8] HILL, S. & POSTGATE, J. R., Failure of putative nitrogen-fixing bacteria to fix nitrogen. *J. gen. Microbiol.*, 1969, 58, 277-285.
- [9] HOLMES, B., OWEN, R. J., EVANS, A., MALNICK, H. & WILLCOX, W. R., *Pseudomonas paucimobilis*, a new species isolated from human clinical specimens, the hospital environment and other sources. *Int. J. syst. Bact.*, 1977, 27, 133-146.
- [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] KOVACS, N., Identification of *Pseudomonas pyocyana* by oxydase reaction. *Nature (Lond.)*, 1956, 178, 703.
- [12] KRIEG, N. R., Biology of the chemoheterotrophic spirilla. *Bact. Rev.*, 1976, 40, 55-115.
- [13] LA RUE, T. A., The bacteria, in « A treatise on dinitrogen fixation », section III: Biology (R. W. F. Hardy & W. S. Silver (p. 19-62), John Wiley and Sons, New-York, 1977.
- [14] LOVELACE, T. E. & COLWELL, R. R., A multipoint inocular for Petri dishes. *Appl. Microbiol.*, 1968, 18, 944-945.
- [15] MANDEL, M., SCHILDKRAUT, C. L. & MARMUR, J., Use of CsCl density gradient analysis for determining the guanine plus cytosine content of DNA, in « Methods in enzymology » (S. P. Colowick & N. O. Kaplan), 12 B, (p. 184-195), Academic Press, London, New-York, 1968.
- [16] MARMUR, J., A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, 1961, 3, 208-218.
- [17] NAIR, S. K. & TAURO, P., Effect of inoculation with *Pseudomonas azotogensis* on the yield and straw weight of wheat. *Plant a Soil*, 1979, 52, 453-455.
- [18] NEYRA, C. A., DÖBEREINER, J., LALANDE, R. & KNOWLES, R., Denitrification by N<sub>2</sub>-fixing *Spirillum lipoferum*. *Canad. J. Microbiol.*, 1977, 23, 300-305.
- [19] PICHINOTY, F., MANDEL, M., GREENWAY, B. & GARCIA, J. L., The isolation and properties of a denitrifying bacterium related to *Pseudomonas lemoignei*. *Int. J. syst. Bact.*, 1977, 27, 346-348.
- [20] PICHINOTY, F., VERON, M., MANDEL, M., DURAND, M., JOB, C. & GARCIA, J. L., Étude physiologique et taxonomique du genre *Alcaligenes* : *A. denitrificans*, *A. odorans* et *A. faecalis*. *Canad. J. Microbiol.*, 1978, 24, 743-753.
- [21] PROCTOR, M. H. & WILSON, P. W., Biotin in nitrogen fixation by a pseudomonas. *Z. allg. Mikrobiol.*, 1961, 1, 175.
- [22] 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.

- [23] RENNIE, R. J., Dinitrogen-fixing bacteria: computer-assisted identification of soil isolates. *Canad. J. Microbiol.*, 1980, 26, 1275-1283.
- [24] RHODES, M. E., The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver-plating staining method. *J. gen. Microbiol.*, 1958, 18, 639-648.
- [25] RICHARD, D., Techniques rapides de recherche des lysine-décarboxylase, ornithine-décarboxylase et arginine-dihydrolase dans les germes *Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Moraxella*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, 114, 425-430.
- [26] ROLAND, F., BOURDON, D. & SZTRUM, S., Différenciation rapide des *Enterobacteriaceae* sans action sur le lactose. *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, 73, 914.
- [27] 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.
- [28] SKERMAN, V. B. D., A guide to the identification of the genera of bacteria. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1967.
- [29] STANIER, R. Y., Réflexions sur la taxonomie des *Pseudomonas*. *Bull. Inst. Pasteur*, 1976, 74, 255-270.
- [30] STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M., The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.*, 1966, 43, 159-271.
- [31] STRENGTH, W. J., ISANI, B., LINN, D. M., WILLIAMS, F. D., VANDERMOLEN, G. E., LAUGHON, B. E. & KRIEG, N. R., Isolation and characterization of *Aquaspirillum fasciculus* sp. nov. a rodshaped, nitrogen-fixing bacterium having unusual flagella. *Int. J. syst. Bact.*, 1976, 26, 253-268.
- [32] TARRAND, J. J., KRIEG, N. R. & DÖBEREINER, J., A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canad. J. Microbiol.*, 1978, 14, 967-890.
- [33] THOMAS-BAUZON, D., WEINHARD, P., VILLECOURT, P. & BALANDREAU, J., The spermosphere model. — I. Its use in growing, counting, and isolating  $N_2$ -fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Canad. J. Microbiol.*, 1982, 28, 922-928.
- [34] VOETS, J. B. & DEBACKER, J., *Pseudomonas azotogensis* nov. sp., a new free-living nitrogen-fixing bacterium. *Naturwissenschaften*, 1956, 43, 40-41.
- [35] WATANABE, I., BARRAQUIO, W. L., DE GUZMAN, M. R. & CABRERA, D. A., Nitrogen-fixing (acetylene reduction) activity and population of aerobic heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland rice. *Appl. environ. Microbiol.*, 1979, 37, 813-819.
- [36] WATANABE, I. & FURUSAKA, C., Microbial ecology of flooded rice soils. *Advanc. Microb. Ecol.*, 1980, 4, 125-168.
- [37] WRIGHT, S. F. & WEAVER, R. W., Enumeration and identification of nitrogen-fixing bacteria from forage grass roots. *Appl. environ. Microbiol.*, 1981, 42, 97-101.
- [38] ZABLOTOWICZ, R. M., ESKEW, D. L. & FOCHT, D. D., Denitrification in *Rhizobium*. *Canad. J. Microbiol.*, 1978, 24, 757-760.