

**FIXATION HÉTÉROTROPHE DE L'AZOTE
DANS LA RHIZOSPHERE DU RIZ**

Gérard RINAUDO

ORSTOM – PARIS – 1983

Cet ouvrage a fait l'objet d'une THESE de DOCTORAT D'ÉTAT en Sciences Naturelles, soutenue à l'Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay.

« La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayant cause, est illicite » (alinéa 1er de l'article 40).

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal. »

R E S U M E

Le premier objectif de cette étude a consisté en une analyse détaillée de la microflore hétérotrophe aérobie de la rhizosphère du riz. Au sein de cette microflore, les microorganismes fixateurs de N_2 ont été étudiés de façon approfondie; la faculté de fixer N_2 a notamment pu être mise en évidence chez certaines espèces pour lesquelles cette propriété n'était pas connue.

Ont été ensuite examinés le rôle de la plante et l'incidence des principaux facteurs de l'environnement sur la fixation rhizosphérique de N_2 . Il a été montré en particulier, que la rhizosphère du riz était le siège d'interactions entre la microflore fixatrice et d'autres organismes rhizosphériques, ayant pour effet de stimuler ou au contraire limiter le développement de cette microflore.

Enfin, le dernier volet de cette étude a consisté à préciser l'effet de la microflore fixatrice de N_2 sur la croissance du riz, et à rechercher l'origine de cet effet. Les résultats obtenus, permettent de penser qu'au cours des premiers stades de développement de la plante, cet effet est davantage lié à la production de phytohormones, qu'à la fixation de N_2 .

Mots clés : fixation de N_2 - rhizosphère - riz - microflore -
taxonomie - réduction de l'acétylène - inoculation.

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé pour l'essentiel au Centre ORSTOM de Dakar. Nous tenons à exprimer en premier lieu notre respectueuse reconnaissance à la Direction de l'ORSTOM qui nous a permis de mener à bien nos recherches au laboratoire de Biologie des Sols de ce Centre, où nous avons trouvé des conditions de travail très favorables.

Il nous est agréable de remercier Messieurs les Professeurs P. GADAL, J.P. AUBERT et C. LIORET qui, en acceptant de présider ou de faire partie de ce jury, ont souligné l'intérêt qu'ils attachaient au problème des relations entre les plantes et les microorganismes fixateurs d'azote de la rhizosphère. Nous leur exprimons notre déférente reconnaissance.

Nous remercions particulièrement Monsieur Y. DOMMERGUES, Directeur de Recherches au C.N.R.S., qui a été l'inspirateur d'une partie importante de nos travaux. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour la somme de suggestions et de conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer.

Nos remerciements vont également à Monsieur B. MAUDINAS, Chargé de Recherches au C.N.R.S., avec qui nous avons eu de fructueuses discussions sur les cultures gnotobiotiques de riz, et à notre ami J-L. GARCIA, Maître de Recherches Principal à l'ORSTOM, qui a contribué avec compétence et efficacité à l'étude de la microflore fixatrice d'azote rhizosphérique. Nous les remercions l'un et l'autre d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Nous ne saurions oublier tous ceux qui ont apporté leur contribution à divers aspects de nos travaux. Nous citerons en particulier nos collègues de l'ORSTOM D. GAUTHIER, S. ROUSSOS, M. BOUREAU, G. GERMANI et M. RAIMBAULT, et nos collègues du CNRS H.G. DIEM et J. BALANDREAU. Nous les remercions tous sincèrement pour leur amicale collaboration.

Qu'il nous soit enfin permis de remercier Monsieur J. BAKHOUM pour son assistance technique, et Monsieur I. DIAWARA qui a assuré la dactylographie de ce mémoire.

S U M M A R Y

In the first part of the study, the aerobic heterotrophic microflora of the rice rhizosphere was surveyed. N_2 fixing microorganisms belonging to this microflora were studied in detail and new nitrogen fixing species were found.

Then we investigated the influence of the plant and environmental factors on N_2 fixation in the rice rhizosphere. Interactions between N_2 fixing microorganisms and other rhizosphere organisms could enhance or hinder the N_2 fixing activity in the rhizosphere.

Finally, experiments carried out using young seedlings suggested that N_2 fixing microorganisms affected the plant growth more by producing phytohormones than by providing nitrogen.

Key words : N_2 fixation - rhizosphere - rice - microflora - taxonomy - acetylene reduction - inoculation.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le riz constitue la base alimentaire de près de la moitié de la population mondiale. L'azote étant le principal facteur limitant la productivité des rizières, on a longtemps pensé que l'utilisation d'engrais azotés apporterait une solution au problème de l'autosuffisance alimentaire. En fait ce problème n'a toujours pas été résolu. La raison en est que la production d'engrais chimiques est grande consommatrice d'énergie dont le coût est devenu extrêmement élevé, et requiert d'importants investissements en capitaux. En conséquence, les engrais chimiques sont relativement peu utilisés dans les pays en voie de développement, notamment dans les zones à vocation rizicole (Asie du Sud-Est et Afrique), où les rendements en riz dépendent en fait de la fertilité naturelle des sols.

Lorsqu'un sol est soumis pendant de nombreuses années aux mêmes rotations culturales, sa teneur en azote tend à se stabiliser (Jenkinson et Rayner, 1977). Il est bien connu en particulier, que dans de nombreux pays Asiatiques, des rendements ont pu être obtenus durant des siècles de monoculture de riz, sans décroissance apparente de la teneur du sol en azote. Cette stabilité de la production et de la teneur en azote du sol, implique que les exportations d'azote par les récoltes ont été compensées par des apports équivalents dus pour l'essentiel à la fixation de N_2 . Les études de bilans effectuées notamment au Japon en Thaïlande et aux Philippines, ont montré que les gains d'azote en rizière irriguée traditionnelle sont de l'ordre de 50 kg par récolte (Wetselaar 1981, tableau 1).

La fixation de N_2 dépend avant tout de la présence d'une microflore fixatrice adaptée au milieu et d'une source d'énergie. Elle peut donc avoir lieu: 1) dans l'eau de submersion et à l'interface sol-eau, où les microorganismes photosynthétiques (cyanobactéries et bactéries phyto-synthétiques du cycle du soufre) tirent de la lumière l'énergie nécessaire à leur développement; 2) au niveau du système racinaire du riz qui fournit à la microflore rhizosphérique des substrats énergétiques (exsudats, lysats racinaires....); 3) au niveau du sol anaérobie (non rhizosphérique)

Tableau 1. Gain net d'azote par le système "sol-plante" (en kg/ha/récolte) en riziculture irriguée traditionnelle sans aucune fertilisation azotée (Wetselaar, 1981).

Pays	Nombre de récoltes	Azote exporté par les récoltes	Gain d'azote par le sol	Gain net d'azote	Références
Japon	253	44	0	44	Yamaguchi (1979)
Japon	21	58	-20	38	Koyama et App (1979)
Thaïlande	4	46	3	49	Firth <u>et al.</u> (1973)
Philippines	24	45	11	56	Koyama et App (1979)
Philippines	17	48	13	59	Koyama et App (1979)
Moyenne		47,8	1,4	49,2	

où la fixation de N_2 par des bactéries anaérobies se fait aux dépens des résidus végétaux en voie de décomposition.

On a longtemps attribué le maintien de la fertilité des sols de rizière à la seule présence de Cyanobactéries (De, 1936, 1939; Singh, 1961). Les études concernant le rôle de ces algues en sols de rizière sont très nombreuses (cf. la récente mise au point de Roger et Kulasoorya, 1980), et montrent qu'elles peuvent contribuer très largement à l'approvisionnement du sol en azote. Toutefois leur développement peut être considérablement limité par les fortes intensités lumineuses (Reynaud et Roger, 1978); dans les sols de rizière du Sénégal notamment, leur biomasse, exprimée en azote, excède rarement 4 kg/ha au cours d'un cycle cultural. La présence de bactéries photosynthétiques fixatrices de N_2 a également été fréquemment observée (Kobayashi et al., 1967). Ces bactéries requièrent à la fois lumière et anaérobiose pour croître, conditions qui peuvent coexister dans l'horizon de surface des sols de rizière. Toutefois leur distribution est très irrégulière et leur contribution réelle à la fixation de N_2 incertaine (Watanabe, 1978).

Sen (1929) fut le premier qui suggéra que les bactéries hétérotrophes associées au système racinaire du riz pourraient contribuer efficacement à la fixation de N_2 . Ce processus ne put toutefois être mis en évidence que bien plus tard au moyen de la méthode de réduction de l'acétylène (Rinaudo, 1970; Yoshida et Ancajas, 1971). Par la suite de nombreuses études furent consacrées à la fixation rhizosphérique de N_2 .

Relativement peu de travaux concernent la fixation de N_2 par les bactéries hétérotrophes dans le sol non rhizosphérique, bien que des quantités considérables de matière organique (pailles, litière racinaire) soient laissées au champ après récolte. Des études récentes effectuées au Japon (Wada et al., 1978; Matsugushi, 1979) montrent que les débris organiques constituent des sites de fixation de N_2 extrêmement actifs.

La contribution respective des différentes microflores hétérotrophes et phototrophes fixatrices de N_2 est difficile à établir étant donné la complexité du système et la diversité des facteurs qui contrôlent la fixation de N_2 (intensité lumineuse, température, caractères physico-chimiques du sol...). A partir des données de la littérature, Wetselaar (1981) a estimé les valeurs extrêmes (exprimées en kg N/ha/an) des contributions des différents groupes de fixateurs de N_2 :

- phototrophes : 1,5 à 50 kg N
- hétérotrophes rhizosphériques: de 10 à 34 kg N
- hétérotrophes non rhizosphériques: de 7 à 25 kg N.

Bien qu'approximatives, ces estimations montrent que chacun des trois groupes de microorganismes est susceptible de contribuer pour une part très variable à l'apport d'azote au sol.

—oo0oo—

L'objectif du travail présenté ici a été d'approfondir nos connaissances sur l'association "riz-fixateurs de N_2 rhizosphériques hétérotrophes".

Nous avons tout d'abord (chapitre I) effectué une analyse détaillée de cette microflore, à la fois qualitative et quantitative, et approfondi quelques unes de ses propriétés les plus remarquables.

La seconde partie de ce travail a été consacrée au rôle de la plante dans l'association "riz-fixateurs de N_2 " et à l'incidence des principaux facteurs de l'environnement sur la fixation rhizosphérique de N_2 . Nous avons également examiné divers types d'interactions entre la microflore fixatrice et d'autres organismes rhizosphériques.

Le dernier volet de notre étude a consisté à préciser l'effet de la microflore fixatrice de N_2 sur la croissance du riz et à rechercher l'origine de cet effet. Nous avons pour cela procédé à des essais d'inoculation de systèmes "sol-riz" avec de nombreuses souches fixatrices de N_2 rhizosphériques.

CHAPITRE I

ÉTUDE DE LA MICROFLORE HÉTÉROTROPHE AÉROBIE

FIXATRICE DE N₂

DANS LA RHIZOSPHERE DU RIZ

I. INTRODUCTION

La rhizosphère est un microhabitat particulier constitué par l'interface sol-racines. Elle peut être divisée en trois compartiments : (1) la rhizosphère sensu stricto constituée par le sol immédiatement au contact des racines; (2) le rhizoplan, formé par la surface des racines et les microorganismes qui s'y trouvent; (3) l'endorhizosphère, comprenant le cortex racinaire envahi et colonisé par des microorganismes hétérotrophes dans la phase de vieillissement des racines.

Les études concernant la microflore fixatrice de N_2 des sols de rizière sont relativement nombreuses, qu'il s'agisse de sols rhizosphériques ou de sols non rhizosphériques (cf. notamment les revues de Dommergues et Rinaudo (1979), Watanabe et Furusaka (1980), Yoshida et Rinaudo (1982).

Il s'agit le plus souvent d'observations qualitatives concernant un type de microorganisme particulier (Azospirillum, Azotobacter, sulfato-réducteurs...).

Les études de nature quantitative sont peu nombreuses. Elles montrent notamment que les fixateurs aérobies sont beaucoup plus abondants que les fixateurs anaérobies dans la rhizosphère du riz (Ishizawa et al. 1975; Balandreau et al., 1975) et que la proportion de fixateurs de N_2 au sein de la microflore hétérotrophe aérobie peut être très forte, de l'ordre de 50% (Trolldenier, 1977; Watanabe et Barraquio, 1979). Mais dans ce cas, la microflore fixatrice est considérée globalement et sa composition n'est pas précisée.

L'un des objectifs du travail que nous présentons a été d'analyser la distribution qualitative et quantitative de la microflore fixatrice hétérotrophe aérobie dans la rhizosphère du riz.

Nous avons pour cela réalisé une étude détaillée de cette microflore dans les trois compartiments d'une rhizosphère typique de riz cultivé sur sol gris de Casamance (il s'agit de sols très fréquents en moyenne Casamance, dont la fertilité naturelle est supérieure à la moyenne, et qui conviennent parfaitement à la culture du riz).

Parallèlement, nous avons effectué des prélèvements de systèmes racinaires dans de nombreux sols de rizière du Sénégal et isolé des fixateurs de N_2 à partir de fragments de racines stérilisées en surface.

Ces deux démarches nous ont permis de réunir près d'une centaine de souches fixatrices rhizosphériques dont nous avons réalisé l'étude taxonomique. Nous avons également analysé quelques propriétés de cette microflore.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Méthodes d'étude de la distribution de la microflore hétérotrophe aérobie dans les trois compartiments de la rhizosphère du riz.

L'analyse des différentes composantes de la microflore rhizosphérique (bactéries, actinomycètes et champignons) est effectuée dans les trois compartiments de la rhizosphère: sol rhizosphérique (SR), rhizoplan (R), endorhizosphère (ER).

2.1.1. *Prélèvement des échantillons*

Un pied de riz (cv. Moroberekan) est cultivé pendant près de 4 mois en serre dans un pot contenant 5 kg de sol gris de Casamance (Dianaba) ayant reçu au préalable 1 g de K_2HPO_4 , 15 g CO_3Ca et 0,5 g de $SO_4(NH_4)_2$. 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 (SR) est obtenu par lavage dans 500 ml d'eau stérile de la portion de racines comprise entre 5 et 20cm au dessous de la surface du sol. Quatre lavages successifs sont ainsi effectués avec renouvellement de l'eau à chaque opération. Le sol rhizosphérique est ainsi mis en suspension dans 2 l environ.

Pour extraire la microflore du rhizoplan, la masse racinaire est fractionnée en 16 parties égales, et l'une de ces fractions est sectionnée en fragments homogènes de 4cm de long environ. Ces fragments sont agités vigoureusement pendant 10 mn dans un flacon sérum de 250 ml 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 500 ml d'eau.

Les racines extraites du dernier lavage sont broyées dans un mortier et remises en suspension dans 100 ml d'eau stérile pour l'obtention de la microflore de l'endorhizosphère (ER).

Des suspensions dilutions (jusqu'à 10^{-6}) sont effectuées à partir des trois échantillons SR, R et ER.

2.1.2. Numération des différents groupes de microorganismes

Les numérations des bactéries, des actinomycètes et des champignons sont effectuées en double exemplaire, directement par étalement sur boîte de Pétri de 0,2ml des suspension SR, R et ER. Les numérations des bactéries fixatrices de N_2 et des bactéries dénitrifiantes sont effectuées selon la méthode du nombre le plus probable (MPN), par inoculation de 0,2ml des suspensions dans des tubes de 12 x 120 (5 tubes par dilution, 5 ml de milieu par tube).

La composition des milieux de numération est la suivante :

a - Microflore totale: "bactopeptone" 10 g, glucose 5 g, extrait de levure 3 g, "bacto agar" 15 g, eau distillée 1000 ml, pH 7,2.

b - Champignons : extrait de pomme de terre (Difco) 30 g, eau distillée 1000 ml. On ajoute par filtration (Millipore 0,45 μ m) du chloramphénicol 0,1 g, de la pénicilline 20 U et de la streptomycine 40 U.

c - Actinomycètes (Küster et Williams, 1964): amidon soluble 10 g, caséine 0,3 g, KNO_3 2 g, NaCl 2 g, K_2HPO_4 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 50 mg, $CaCO_3$ 20 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg, agar 15 g, eau distillée 1000 ml, pH 6,5. On ajoute par filtration (Millipore 0,45 μ m) du cycloheximide 100 mg. Avant d'effectuer les dilutions on ajoute une solution antibactérienne de phénol à la suspension mère (700 mg/100 ml).

d - Bactéries fixatrices de N₂: milieu M gélosé à 4 %. auquel on ajoute de l'extrait de levure (Difco) 100 mg/l.

Composition du milieu M: K₂HPO₄ 800 mg, KH₂PO₄ 200 mg, MgSO₄.7H₂O 200 mg, NaCl 100 mg, CaCl₂.4H₂O 100 mg, FeSO₄.7H₂O 10 mg, solution d'oligo éléments d'Augier 1 ml, acide malique 4 g, eau distillée 1000 ml, pH 6,8 ajusté avec NaOH 2N.

La présence de bactéries fixatrices de N₂ est décelée par le test de réduction d'acétylène: introduction de 2% d'acétylène dans le tube dès qu'apparaît une croissance bactérienne et recherche de l'éthylène produit par chromatographie en phase gazeuse, après 24 h d'incubation sous acétylène.

e - Bactéries dénitrifiantes (Focht et Joseph, 1973): bouillon nutritif (Difco) 8g, KNO₃ 1 g, eau distillée 1000 ml, pH 7. On utilise le réactif de Griess-Ilosvay pour la détection du nitrite, et la poudre de zinc pour celle de la réduction du nitrate en gaz.

2.1.3. *Isolement et identification sommaire des bactéries*

Les isolements sont effectués après étalement et incubation des suspensions dilutions sur milieu peptoné gélosé. Pour chacun des échantillons SR, R et ER, on isole 36 souches à partir des dilutions contenant entre 60 et 200 colonies, en utilisant une grille d'isolement (Bianchi et al., 1974). La purification des souches ainsi isolées est obtenue par passages successifs sur "nutrient agar" (Difco) et observation au microscope. Les souches sont conservées en pilulier à + 4°C.

La liste des caractères étudiés est la suivante :

- 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 (Rhodes, 1958);
- recherche de l'oxydase sur papier filtre (Kovacs, 1956), 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 (1973);
- étude de l'hydrolyse de l'urée sur milieu de Fergusson modifié par Roland et al. (1947);
- étude de la fermentation du glucose selon Hugh et Leifson (1953);
- production de dihydroxy-acétone révélée avec le réactif de Fehling (Gordon et al., 1973).
- 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 lues directement dans le cas de la lécithine et du Tween 80 (Sierra, 1957), ou révélées par le réactif iodo-ioduré pour l'amidon, et le chlorure mercurique pour la gélatine (Frazier, 1926);
- pour l'étude des besoins nutritionnels, le milieu minéral de base MMB comprend: $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3,77 g, KH_2PO_4 0,98 g, NH_4Cl 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 30 mg, solution d'oligo-éléments 1 ml, solution Tris-HCl 1M pH 7,5 10 ml, agar 15 g, eau distillée qsp 1000 ml. La source de carbone (glucose ou malate 0,4%) ainsi qu'une solution de vitamines (2 ml/l) sont ajoutées par filtration (Millipore 0,45 μ m). L'ensemencement des boîtes de Pétri se fait au moyen d'un inoculateur multi-points (Lovelace et Colwell, 1968).

2.2. Isolément de fixateurs de N_2 à partir de racines stérilisées en surface (fixateurs de N_2 "endolithiques").

Ces isoléments ont été effectués au moyen d'une technique inspirée de celle que Döbereiner et Day (1976) ont utilisée pour

isoler Spirillum lipoferum de l'endorhizosphère de Digitaria decumbens: stérilisation superficielle de fragments de racines, et introduction de ces fragments de racines dans un milieu sans azote faiblement gélosé.

2.2.1. Stérilisation superficielle du système racinaire

Le système racinaire est débarrassé du sol adhérent par lavage à l'eau du robinet, puis immergé dans une solution de chloramine T à 1% pendant 1 h. Il est ensuite lavé à deux reprises à l'eau stérile puis maintenu 1 h dans l'eau stérile.

2.2.2. Isolements

Des fragments de racines de 1cm de long sont découpés stérilement puis introduits verticalement dans du milieu M sans azote gélosé à 3%, en tubes à hémolyse de 10 x 70 mm (3 ml de milieu par tube). Le développement bactérien est apparent après 2 à 3 jours d'incubation à 30°C. Il se manifeste le plus souvent par l'apparition de voiles situés entre 2 et 5 mm sous la surface, caractéristiques de bactéries microaérophiles. Plusieurs repiquages successifs en gélose molle permettent d'enrichir la culture en bactéries fixatrices de N₂. Les étalements sont alors effectués sur boîtes de Pétri (milieu M gélosé à 17%) mises à incuber en aérobiose ou en microaérophilie (dans un dessiccateur en présence d'un mélange N₂-O₂ à 1% de O₂). Les colonies isolées sont repiquées sur milieu complet en aérobiose (gélouses inclinées en tube). Après plusieurs repiquages successifs et contrôle au microscope de la pureté des souches, on procède au test de réduction de l'acétylène.

Remarque : Cette technique favorise l'isolement des microorganismes à croissance rapide. On ne peut donc prétendre à l'issue des repiquages successifs que les microorganismes isolés soient des éléments dominants de la microflore fixatrice de N₂.

2.3. Constitution d'une collection de fixateurs de N₂ rhizosphériques

La collection que nous avons constituée (tableau 2) comporte:

1 - 51 souches isolées à partir de fragments de racines stérilisées superficiellement;

2 - 27 souches représentatives de la microflore fixatrice de N₂ du système "sol gris de Casamance-riz cv. Moroberekan";

3 - 5 souches de référence (Azospirillum brasilense et A. lipoferum) qui nous ont été fournies par J. Döbereiner.

- Les souches 1 à 66 proviennent de racines stérilisées superficiellement: les souches 1 à 50 sont des Azospirillum; cinq d'entre elles sont des souches de référence (A. brasilense Sp7 et Sp28: n° d'ordre 1 et 47; A. lipoferum Sp107, SpBr17 et Sp59 b: n° d'ordre 48, 49 et 50).

- Les souches 67 à 93 ont été isolées du système "sol gris-riz cv. Moroberekan". Elles sont indexées SR, R ou ER suivant qu'elles proviennent du sol rhizosphérique, du rhizoplan ou de l'endorhizosphère. Les souches 71 à 93 sont des bactéries corynéformes pigmentées en rose; elles constituent le groupe dominant de ce système.

Remarque: toutes ces souches réduisent l'acétylène en éthylène.

Nous avons également vérifié qu'elles sont capables de croître sur milieu minéral avec pour seule source d'azote, l'azote moléculaire ou l'azote ammoniacal.

2.4. Etude taxonomique des fixateurs de N₂ rhizosphériques

Basée sur l'examen de 251 caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et nutritionnels, cette étude a été réalisée avec la collaboration de J.-L. Garcia, S. Roussos et D. Gauthier.

Tableau 2. Origine des souches rhizosphériques fixatrices de N₂

N° d'ordre	N° souche	Pays d'isolement	Lieu	Culture
2	R07	Sénégal	Richard-Toll	riz inondé
3	B18	"	Bambey	ml
4	B19	"	-	-
5	B20	"	-	-
6	B21	"	-	-
7	B22	"	-	-
8	B23	"	-	-
9	B24	"	-	-
10	B25	"	-	-
11	B26	"	-	-
12	DK27	"	Dakar (Bel-Air)	-
13	S28	"	Sangalcam	maïs
14	S29	"	-	-
15	R30	"	Richard-Toll	riz inondé
16	R31	"	-	-
17	R32	"	-	-
18	R33	"	-	-
19	R36	"	-	-
20	DG43	"	Dagana	-
21	DG44	"	-	-
22	SF49	"	Séfa	riz pluvial
23	SF50	"	-	-
24	SD51	"	Sédhiou	riz inondé
25	DN61	"	Dianaba	-
26	DN63	"	-	-
27	DN64	"	-	-
28	K66	"	Kolda	riz pluvial
29	K67	"	-	-
30	K68	"	-	-
31	O70	"	Oussouye	riz inondé
32	O71	"	-	-
33	O72	"	-	-
34	O73	"	-	-
35	KR77	"	Korounaté	-
36	KG81	"	Kangodi	riz pluvial
37	KG82	"	-	-
38	BK85	"	Boukiliin	-

Tableau 2 (suite)

N° d'ordre	N° souche	Pays d'isolement	Lieu	Culture
39	BK86	Sénégal	Boukiliin	riz pluvial
40	DK93	"	Dakar(Bel-Air)	riz inondé
41	A94	France	Mas Adrien	riz inondé
42	A95	"	(Camargue)	
42	A95	"	-	-
43	A96	"	-	-
44	A97	"	-	-
45	D98	Sénégal	Djibélor	-
46	D99	"	-	-
1	Sp7(ATCC29145)	Brésil	Rio de Janeiro	<u>Digitaria</u>
47	Sp28	"	-	<u>Panicum</u>
48	Sp107	"	-	blé
49	Sp8r17(ATCC29709)	"	Brasilia	maïs
50	Sp59b(ATCC29707)	"	Rio de Janeiro	blé
51	R38	Sénégal	Richard-Toll	riz inondé
52	R39	"	-	-
53	DG46	"	Dagana	-
54	DG47	"	-	-
55	SD52	"	Sédhiou	-
56	SD53	"	-	-
57	SD54	"	-	-
58	SD55	"	-	-
59	SD57	"	-	-
60	SD58	"	-	-
61	SD59	"	-	-
62	SD60	"	-	-
63	DN65	"	Dianaba	-
64	BR80	"	Brin	riz pluvial
65	KG83	"	Kangodi	-
66	BK88	"	Boukiliin	-
67	SR2	"	Dianaba	riz inondé(pot)
68	SR22	"	-	-
69	R4	"	-	-
70	R10	"	-	-

Tableau 2. (suite et fin)

N° d'ordre	N° souche	Pays d'isolement	Lieu	Culture
71	SR1	Sénégal	Dianaba	riz inondé(pot)
72	SR5	"	-	-
73	SR7	"	-	-
74	SR12	"	-	-
75	SR13	"	-	-
76	SR18	"	-	-
77	SR20	"	-	-
78	SR25	"	-	-
79	SR26	"	-	-
80	SR29	"	-	-
81	SR31	"	-	-
82	SR32	"	-	-
83	SR61	"	-	-
84	SR62	"	-	-
85	R2	"	-	-
86	R24	"	-	-
87	R30	"	-	-
88	ER4	"	-	-
89	ER7	"	-	-
90	ER18	"	-	-
91	ER19	"	-	-
92	ER27	"	-	-
93	ER51	"	-	-

2.4.1. *Caractères morphologiques*

L'aspect de la colonie, la morphologie cellulaire, l'aspect de la culture en milieu liquide, la coloration de gram et la coloration des flagelles ont été déjà mentionnés pour l'identification sommaire des bactéries (cf § 2.1.3). Les capsules sont recherchées en présence d'encre de Chine. Le poly- β -hydroxybutyrate révélé par coloration au noir soudan des cellules cultivées en aéro-biose en présence de DL-3-hydroxybutyrate.

2.4.2. *Caractères biochimiques*

L'oxydase, la catalase, l'hydrolyse de l'urée, la fermentation du glucose, l'hydrolyse de macromolécules organiques, la production de di-hydroxyacétone et la réduction du nitrate en nitrite ou en gaz ont été déjà mentionnées (§ 2.1.3.). La recherche des décarboxylases de la lysine et de l'ornithine ainsi que l'arginine dihydrolase est réalisée selon la méthode de Richard (1968). Les tests suivants sont effectués selon les procédés décrits par Skerman (1967): réaction de Voges-Proskauer, rouge de méthyle, production d' H_2S et d'indole, croissance en milieu au citrate de Simmons. La recherche de la tryptophane désaminase est effectuée selon le procédé de Roland et al. (1947).

2.4.3. *Caractères physiologiques*

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 en différents substrats (NaCl 0,5%, KNO_3 8%, KNO_2 0,5%, azoture 0,03%) sont testées sur bouillon nutritif (Difco).

La prototrophie vis à vis du glucose ou du malate est testée sur le milieu suivant :

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 3,77 g; KH_2PO_4 , 0,98 g; NH_4Cl , 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 30 mg; glucose ou acide malique, 2 g; solution d'oligo-éléments, 1 ml; eau distillée, 1000ml; pH ajusté à 6,8.

2.4.4. Etude nutritionnelle

Cette étude est inspirée, de celle de Stanier et al. (1968) sur le genre Pseudomonas. Les cultures sont réalisées sur milieu solide comprenant la solution de base MMB dont la composition est mentionnée ci-dessus. 155 substrats organiques constituant l'unique source de carbone et d'énergie sont testés à raison de 2 g/l pour les glucides, 0,25 g/l pour le phénol et 1 g/l pour les autres composés. Tous ces substrats sont ajoutés au milieu stérile après filtration (Millipore 0,45 μ m) à l'exception du géraniol et du naphthalène qui sont déposés dans le couvercle des boîtes de Pétri après ensemencement. Une solution complexe de facteurs de croissance (vitamines et coenzymes) est également ajoutée à raison de 2 ml/l après filtration (Millipore 0,45 μ m).

L'ensemencement des boîtes de Pétri est réalisé au moyen d'un inoculateur multipoint selon Lovelace et Colwell (1968) 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 est déterminée par rapport à un témoin sans substrat carboné.

2.4.5. Analyse numérique.

Les caractères sont codés "1" pour positif ou présent et "0" pour négatif ou absent. La matrice contient 50 souches et 251 caractères. La méthode d'agrégation selon le critère de la liaison complète est utilisée. La distance entre souches et groupes de souches est calculée selon le critère du Khi 2; elle s'exprime en indices taxonomiques. Le niveau hiérarchique le plus discriminant est déterminé selon la courbe d'entrée des souches dans le dendrogramme (Bianchi, 1971).

2.4.6. Composition en bases de l'ADN

L'ADN est extrait des cellules cultivées en milieu complexe pour des souches réparties parmi les divers phénons obtenus. L'extraction est effectuée suivant la méthode de Marmur (1961):

- 1 - mise en suspension des cellules dans une solution saline EDTA pour inhiber l'activité DNase puis lyse des cellules par le lysozyme,
- 2 - après action du perchlorate de sodium qui aide à dissocier protéines et acides nucléiques, déprotéinisation par un mélange chloroforme-alcool isoamylique,
- 3 - précipitation des acides nucléiques par l'alcool éthylique, enroulement sur une baguette de verre puis dissolution en solution saline-citrate,
- 4 - séparation ADN-ARN par traitement à la ribonucléase et précipitation de l'ADN par l'isopropanol.

La composition en bases est calculée à partir de la densité de flottaison (Mandel et al., 1968).

2.5. Mesure de l'activité nitrogénasique spécifique

Une culture en phase exponentielle sur milieu riche (bouillon nutritif (Difco)) est centrifugée lavée et resuspendue avec du milieu M sans azote à une concentration de 5.10^7 cellules/ml. 25 ml de cette suspension sont placés en flacon sérum de 125 ml. L'atmosphère du flacon est remplacée par de l'argon puis on y ajoute différentes quantités d'oxygène (de 0 à 10 kPa). Les flacons sont agités 3 h à 30°C pour permettre la dérégulation de la nitrogénase en absence de croissance (Gauthier, 1978). L'activité de la nitrogénase est mesurée par la méthode de réduction de l'acétylène: introduction de 10% d'acétylène dans le flacon et mesure de la production d'éthylène au cours des 3 premières heures d'incubation.

L'ARA spécifique est exprimée en nmoles d'éthylène produit par mn et mg de protéines dosées par la méthode de Lowry et al. (1951).

2.6. Recherche de l'aptitude des souches fixatrices de N₂ à croître aux dépens de la pectine ou de diverses substances dérivées de la pectine.

La base saline des différents milieux utilisés est celle du milieu M. L'azote est apporté sous forme de NH₄Cl (20 mM). La source de carbone est selon le cas: de la pectine (Unipeptine, ruban rouge, 1,5 g/l), du galacturonate de sodium (2 g/l) de l'arabinose (2 g/l), du galactose (2 g/l), du méthanol (10⁻²M). Les cultures sont effectuées dans des flacons sérum contenant 25 ml de ces différents milieux. Après inoculation (5 x 10⁷ cellules/ml), les flacons sont incubés à 30°C avec agitation. La croissance est estimée par mesure de la densité optique à 570 nm.

3. RESULTATS

3.1. Distribution de la microflore hétérotrophe aérobie, et en particulier de la microflore fixatrice de N_2 , dans les trois compartiments de la rhizosphère du riz cv. Moroberekan cultivé sur sol gris de Dianaba.

3.1.1. *Distribution des bactéries des champignons et des actinomycètes*

Nous constatons (tableau 3) que les nombres totaux de microorganismes sont élevés (de l'ordre de 10^8 par g de sol sec ou par g de racines sèches), et varient peu lorsqu'on passe d'un compartiment à l'autre. Le nombre des bactéries fixatrices de N_2 , des bactéries dénitrifiantes et des champignons diminue dans ER par rapport à R, alors que le nombre des actinomycètes est plus élevé dans ER.

3.1.2. *Distribution des bactéries hétérotrophes en six groupes morphologiques et nutritionnels.*

Dans chaque échantillon SR, R et ER, 36 souches ont été isolées en culture pure. Ces souches ont été classées en six groupes taxonomiques définis par Bianchi et al. (1974):

- 1 - ASP = bâtonnets asporulés gram + ou variable,
- 2 - A = bâtonnets asporulés gram -, à métabolisme oxydatif, aciliés ou pérित्रiches,
- 3 - FC = bâtonnets asporulés gram -, à métabolisme fermentatif,
- 4 - P = bâtonnets asporulés gram -, à métabolisme oxydatif et ciliature polaire,
- 5 - S = bâtonnets sporulés gram +,
- 6 - C = cocci.

Tableau 3. Distribution de diverses composantes de la microflore hétérotrophe aérobie dans la rhizosphère du riz cv. Morobérékan cultivé sur sol gris de Casamance (plante de 3 mois).

Compartiment de la rhizosphère	Microflore totale	Bactéries		Actinomycètes	Champignons
		Fixatrices de N ₂	Denitrifiantes		
SR	4,3 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸	7,8 x 10 ⁷	7,2 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁵
	(2,0 x 10 ⁸)	(5,0 x 10 ⁷)	(3,6 x 10 ⁷)	(3,3 x 10 ⁶)	(7,0 x 10 ⁴)
R	1,8 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁷	1,8 x 10 ⁷	7,4 x 10 ⁶	8,9 x 10 ⁴
ER	1,2 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁶	7,5 x 10 ⁶	8,6 x 10 ⁶	2,2 x 10 ³

- SR = Sol rhizosphérique; R = rhizoplan; ER = endorhizosphère

- Les résultats expriment le nombre de microorganismes par gramme de racines sèches ou par gramme de sol sec (valeurs entre parenthèses).

La distribution des souches bactériennes a été représentée en pourcentages pour chacun des échantillons SR, R et ER (fig. 1). La distribution qualitative des bactéries varie considérablement d'un échantillon à l'autre. Les bâtonnets asporulés à gram variable dominant dans l'échantillon SR (53%). Dans l'échantillon R ce sont les bâtonnets sporulés gram⁺ (Bacillus) qui dominent (45%). Nous n'en avons trouvé aucun dans l'échantillon ER où deux groupes sont dominants les bâtonnets asporulés gram⁻ à métabolisme oxydatif dont 39% à ciliature polaire (pseudomonades en majorité) et 29% aciliés ou à ciliature péritriche (Alcaligenes en majorité).

La plupart des souches isolées sont oxydase et catalase positives (tableau 4). La majeure partie des souches des trois compartiments 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; la proportion de souches dénitrifiantes augmente dans ER (65% des souches). Relativement peu de souches fermentent le glucose.

3.1.3. Distribution des fixateurs de N₂ au sein de la microflore hétérotrophe aérobie.

La microflore fixatrice de N₂ comporte trois groupes dominants (fig. 1, surfaces hachurées).

- 1 - Des bâtonnets asporulés à gram variable présentant une pigmentation rose et une pléomorphie marquée. Il s'agit de bactéries corynéformes. Ce groupe, présent dans les trois compartiments de la rhizosphère, est largement dominant dans SR.
- 2 - Des bâtonnets asporulés gram négatifs avec un flagelle polaire et fermentant le glucose sans production de gaz. Il s'agit de Vibrionacées (Vibrio ou Aéromonas), présents dans R et ER.
- 3 - Des bâtonnets asporulés gram négatifs, à métabolisme oxydatif

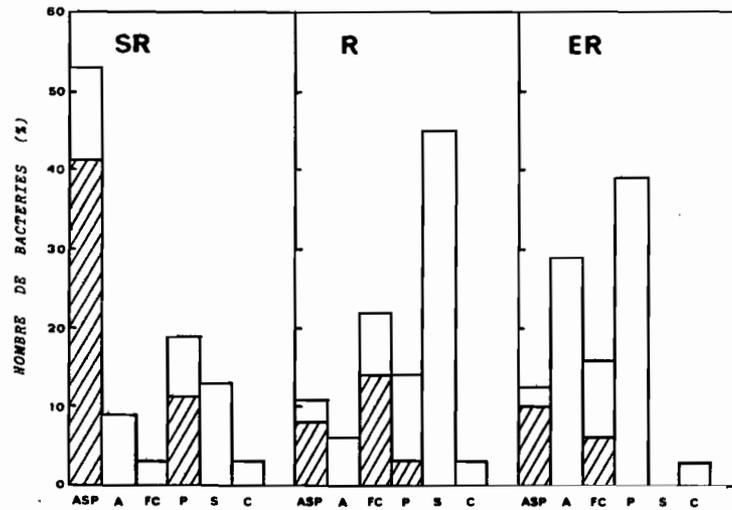


Fig. 1. Histogramme de distribution des souches bactériennes dans les trois compartiments de la rhizosphère du riz cv. Horoberekan cultivée sur sol gris de Casamance.

- Les surfaces hachurées représentent les bactéries fixatrices de N_2
- ASP, A, FC, P, S, C: cf. légende dans le texte.

Tableau 4. Caractères biochimiques et exigences nutritionnelles des bactéries appartenant à chacun des trois compartiments de la rhizosphère.

	Sol rhizosphérique	Rhizoplan	Endorhizosphère
Catalase	90	92	87
Oxydase	90	94	84
Fixation de N_2	53	25	16
Réduction de NO_3^- en NO_2^-	53	80	81
Dénitrification	47	33	65
Fermentation du glucose	3	22	16
Hydrolyse de l'urée	50	39	68
Dihydroxy acétone	25	36	52
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
Prototrophie { Glucose	31	44	61
{ Malate	84	75	77
Prototrophie : Glucose	41	64	90
+ vitamines : Malate	90	78	87

Les résultats sont exprimés en % de la population totale.

et ciliature polaire, dans SR et R. Ce groupe comporte des bactéries de type Pseudomonas, ainsi que des Spirilles dont la taille est nettement plus petite que celle d'Azospirillum.

Remarque: dans chacun des trois compartiments de la rhizosphère, nous avons recherché les fixateurs de N_2 parmi 36 souches représentatives de la microflore totale. Si nous n'avons pas trouvé d'Azospirillum, c'est que ces microorganismes ne sont pas représentatifs de cette rhizosphère. Par contre sur ce même sol, mais à partir de racines stérilisées en surface, nous avons isolé trois souches d'Azospirillum (DN 61, DN 63 et DN 64). Ces microorganismes sont donc bien présents (quoique peu nombreux); il est probable que leur isolement aura été facilité par la technique utilisée (cultures d'enrichissement successives).

La proportion de bactéries fixatrices de N_2 au sein de la microflore totale (cf. tableau 4) décroît régulièrement quand on passe de SR (53%) à R (25%) puis à ER (16%). Ces valeurs sont apparemment en contradiction avec les résultats obtenus par Watanabe et Barraquio (1979), qui ont observé dans le cas du riz cv. IR26 cultivé sur un sol des Philippines que cette proportion augmente au contraire quand on passe du sol rhizosphérique à l'endorhizosphère (2, 76 et 81% respectivement pour SR, R et ER).

La proportion des actinomycètes, par contre, augmente de SR à ER. Signalons à ce propos que Venkatesan et Rangaswami (1964) ont observé une augmentation du nombre des actinomycètes dans la rhizosphère du riz par rapport au sol non rhizosphérique. Il convient également de mentionner les résultats obtenus dans le cas du maïs par Döbereiner et Baldani (1979) qui ont observé que la proportion de bactéries résistantes à de faibles niveaux en streptomycine (20 μ g/ml) au sein de la microflore totale, était beaucoup plus forte dans

l'endorhizosphère que dans le sol. Cet ensemble de considérations nous conduit à penser que les actinomycètes, en raison de leur aptitude à produire des substances antibiotiques, pourraient exercer un certain contrôle de la colonisation rhizosphérique. Cette hypothèse sera examinée plus en détail au chapitre suivant.

3.2. Etude taxonomique des fixateurs de N₂ rhizosphériques

Cette étude a été effectuée sur :

- 50 souches du genre Azospirillum,
- 23 souches corynéformes qui constituent la microflore dominante du système "sol gris-riz cv Morobérékan",
- un troisième groupe hétérogène comprenant 20 souches.

3.2.1. Souches du genre *Azospirillum* (souches 1 à 50)

Sur les 251 caractères étudiés, 64 ont été négatifs pour l'ensemble des souches. L'emploi de la méthode d'agrégation selon le critère de la liaison complète (Bianchi, 1971), a permis de regrouper 46 souches (soit 92 % de l'ensemble) en 11 phénons. La coupure a été effectuée à l'indice 0,016 (fig. 2). Les souches se répartissent en deux ensembles A et B comportant 36 et 14 souches respectivement.

a - Caractérisation des phénons. La fréquence des caractères positifs pour les 11 phénons est présentée dans le tableau 5. La plupart des souches sont morphologiquement très voisines et répondent à la description donnée par Tarrand et al. (1978): bâtonnets gram négatifs, courts, trapus, légèrement incurvés, mobiles, larges de 1,0 μm et longs de 2,0 à 4,0 μm . Dans les cultures sur agar nutritif gélosé incliné, les bactéries présentent un cil polaire et plusieurs flagelles latéraux plus fins et de longueur d'onde plus courte. Cependant, les souches des phénons 10 et 11 n'ont qu'un cil polaire; elles sont moins larges que les souches des autres phénons qui

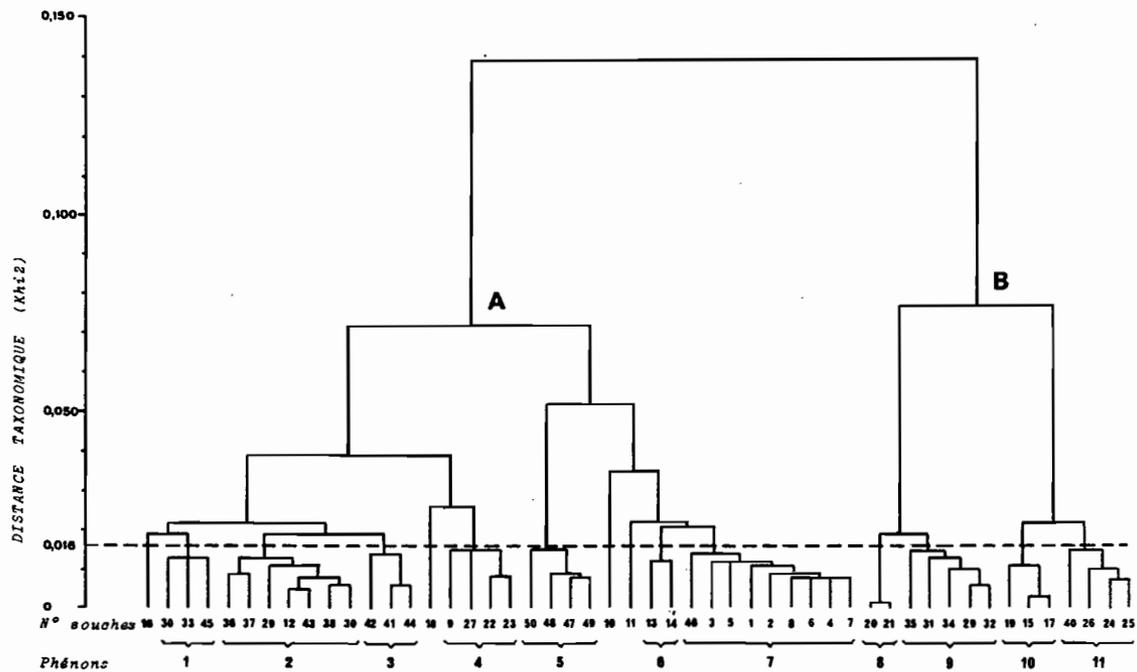


Fig. 2. Dendrogramme des souches *Azospirillum*

Tableau 5. Fréquence des caractères positifs exprimée en pourcentages, pour les phénons 1 à 11.

Caractères	Phénons										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nombre de souches	3	7	3	4	4	2	9	2	5	3	4
Flagelles polaires	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
" latéraux	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	25
Croissance à 4°	0	0	0	0	25	0	11	100	100	0	0
" 12°	100	57	100	75	100	50	89	100	100	100	75
" 41°	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	50
" 43°	66	100	100	100	25	100	66	100	100	100	50
" pH 6	66	100	100	100	100	100	100	100	100	33	100
" pH 8	33	71	100	100	100	100	100	100	100	0	0
Croissance sur:											
NaCl 5%	0	14	0	0	0	0	0	0	60	0	0
KNO ₃ 8%	0	0	33	0	0	0	0	0	100	0	0
KNO ₂ 0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0
Azoture 0,03%	0	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0
<u>Caractères biochimiques</u>											
Catalase	33	10	100	75	100	100	90	0	0	66	75
Hydrolyse de gélatine	0	0	33	0	50	100	66	0	20	0	25
Hydrolyse amidon	0	0	0	0	0	0	0	100	80	0	0
" urée	100	100	66	100	75	100	100	0	0	100	50
" tween 80	66	0	33	25	50	0	45	0	40	100	75
" jaune d'oeuf	33	0	66	0	0	0	0	0	0	100	75
NO ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33	100
NO ₃ ⁻ → gaz	100	100	100	100	50	50	66	100	100	33	50
Assimilation NO ₃ ⁻	0	30	66	50	100	100	100	100	100	66	25
Production d'H ₂ S	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0

Tableau 5. (suite)

Caractères	Phénons										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nombre de souches	3	7	3	4	4	2	9	2	5	3	4
Glucides											
D-ribose	100	100	66	100	100	0	0	0	20	33	0
D-xylose	100	100	100	100	100	100	78	100	80	100	75
D(-) arabinose	100	86	0	100	100	0	55	0	0	33	0
L-arabinose	100	100	100	75	100	100	89	100	80	100	100
raffinose	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
L-rhaminose	33	14	0	0	100	0	66	100	100	0	100
O(+)Glucose	100	100	66	100	50	50	22	100	100	100	100
O-mannose	33	14	0	50	25	50	0	100	100	100	100
D-galactose	100	100	100	100	100	100	89	100	100	100	100
β-D-fructose	66	100	66	100	100	100	89	0	0	100	100
Saccharose	33	28	0	75	75	100	0	100	100	100	100
Tréhalose	0	0	0	25	75	50	11	100	60	100	75
Maltose	33	14	0	0	0	100	22	100	100	100	100
D(+) cellobiose	0	14	0	50	50	50	0	100	100	100	75
Lactose	0	0	0	0	0	0	0	100	100	33	0
Amidon	100	14	0	0	0	50	0	100	80	0	75
Gluconate	100	100	100	100	75	100	89	0	0	0	0
2 céto-D-gluconate	100	100	33	100	100	100	89	0	0	0	100
Melibiose	66	0	0	0	0	0	0	100	100	33	0
Saccharate	33	14	66	75	0	100	0	0	0	0	0
Méthyl-D-glucoside	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
Acides gras											
Azélaïdate	0	71	0	75	0	0	0	0	0	33	0
Acétate	0	0	0	0	0	0	55	0	40	0	0
Propionate	100	86	100	75	100	0	100	100	100	33	25
Butyrate	100	100	100	100	50	100	100	0	80	0	100
Isobutyrate	100	100	100	100	0	0	100	50	100	0	25
Valérate	100	100	100	100	75	100	100	100	20	0	25
Valérienate	100	100	100	100	100	100	100	0	0	66	25
Isovalérienate	100	100	100	100	75	50	89	0	0	0	25
Caproate	66	100	100	50	0	0	0	100	100	33	25
Pelargonate	33	0	0	50	50	0	0	0	0	0	0

Tableau 5. (suite)

Caractères	Phénons										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nombre de souches	3	7	3	4	4	2	9	2	5	3	4
Acides dicarboxy-											
liques											
Malonate	66	28	0	0	25	0	0	0	0	0	0
Succinate	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0
Maléate	33	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0
Fumarate	66	28	0	50	100	100	78	0	60	0	0
Glutarate	0	43	0	50	100	100	89	0	0	0	25
Adipate	33	43	66	100	25	0	0	0	0	0	0
Pimélate	33	71	100	100	25	0	0	0	0	0	25
Subérate	33	100	100	100	50	0	0	0	0	0	25
Crotonate	100	100	100	100	100	100	89	0	0	0	0
Sébacate	33	100	100	100	25	0	0	0	0	0	75
Hydroxyacides											
2 oxo-glutarate	0	100	0	25	25	0	100	0	100	0	0
DL-malate	33	28	100	100	100	100	89	0	80	0	50
O(-)tartrate	100	0	0	75	75	0	89	0	0	0	0
L(+) tartrate	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
Mésotartrate	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	50
DL- α Hydroxybuty-											
rate	100	100	100	100	100	100	89	50	0	33	0
DL-lactate	100	100	100	75	75	100	100	100	100	0	50
DL-glycérate	100	100	100	100	100	50	89	0	0	0	0
Hydroxyméthylglu-											
tartrate	66	100	33	100	100	100	22	0	0	0	0
Acides organiques											
Citrate	100	86	100	100	100	50	55	0	0	0	50
Pyruvate	33	14	0	75	75	100	100	0	20	0	25
Aconitate	100	100	0	100	100	100	33	0	0	0	0
Lévulinate	0	43	66	75	25	0	0	100	60	0	0
Itaconate	0	14	0	0	75	100	33	0	0	0	0
Mesaconate	0	0	33	0	25	100	89	0	0	0	0
D-glucuronate	33	43	33	100	50	50	0	50	60	0	50
D-galacturonate	0	28	0	100	0	100	89	0	0	0	25
Cisaconitate	66	71	0	100	0	100	44	0	20	0	0

Tableau 5. (suite)

Caractères	Phénons										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nombre de souches	3	7	3	4	4	2	9	2	5	3	4
Trans-aconitate	100	100	0	75	0	50	11	0	0	0	0
<u>Alcools</u>											
Mannitol	66	100	0	100	50	0	0	50	0	33	75
Sorbitol	33	100	0	100	75	0	0	50	0	33	75
Inositol	33	57	0	25	25	0	0	0	0	33	0
Adonitol	0	0	0	50	25	0	0	0	0	0	0
Glycérol	100	100	100	100	0	100	89	50	20	33	75
Propane-1,2-diol	100	100	100	100	100	100	89	100	0	0	25
Butane-2,3-diol	100	100	100	100	0	100	89	50	0	0	75
Ribitol	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0
2 phényléthanol	33	100	66	100	0	0	0	0	0	33	25
Méthanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0
Ethanol	33	86	100	100	0	100	78	0	0	33	0
n-Propanol	66	71	100	100	100	100	89	50	60	33	0
Isopropanol	33	86	66	100	0	0	0	0	0	0	0
n-butanol	66	86	100	100	100	100	89	0	0	33	0
Isobutanol	66	86	100	100	0	100	55	0	0	0	0
Géranol	0	28	0	75	0	0	0	0	0	0	0
L-arabitol	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0
<u>Composés aromatiques</u> <u>et cycliques non azotés</u>											
D-mandélate	0	0	0	75	0	100	0	0	0	0	0
L-mandélate	0	0	0	25	0	100	0	0	0	0	0
Benzoyl-formate	33	0	0	0	0	0	55	0	0	0	0
Benzoate	33	0	0	0	0	0	44	0	0	33	0
m-hydroxybenzoate	66	86	100	100	25	0	11	100	80	66	25
p-hydroxybenzoate	0	43	0	0	50	100	0	0	0	0	0
Naphtalène	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0
Quinate	100	86	33	100	50	0	0	0	60	0	50
<u>Acides aminés</u> <u>aliphatiques</u>											
L- α -alanine	100	100	100	100	100	100	89	100	80	0	25
D- α -alanine	100	86	100	100	100	100	89	0	20	0	0
β -alanine	100	86	33	100	25	100	0	0	0	0	0

Tableau 5. (suite)

Caractères	Phénons										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nombre de souches	3	7	3	4	4	2	9	2	5	3	4
OL-sérine	33	28	33	75	25	100	44	0	0	0	0
OL-Thréonine	33	0	0	25	25	100	0	0	0	0	0
L-Leucine	66	100	100	100	100	100	66	0	40	66	50
OL-isoleucine	33	14	33	25	0	0	22	0	0	0	0
OL-norleucine	33	86	66	100	25	100	0	0	20	0	50
OL-valine	0	0	66	0	0	0	22	0	0	0	0
L-aspartate	100	100	100	100	100	100	89	0	80	0	25
L-glutamate	100	100	100	100	75	100	89	0	60	0	25
L-lysine	100	86	0	100	25	0	0	0	0	0	0
L-arginine	100	86	66	100	75	0	89	0	0	0	0
OL-ornithine	100	86	0	100	25	0	0	0	0	0	0
L-citrulline	33	28	33	100	0	0	0	0	0	0	0
L- α -aminobutyrate	0	0	0	0	0	100	44	0	0	0	0
γ -aminobutyrate	100	100	100	100	75	100	100	0	60	0	25
OL-norvaline	33	28	66	100	0	100	89	0	0	0	0
L-asparagine	100	86	100	100	100	0	89	0	0	0	25
L(+) cystéine	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Acides aminés</u>											
<u>cycliques</u>											
L-Histidine	66	100	100	100	25	0	44	0	80	0	25
L-Proline	100	100	100	100	100	50	89	0	80	66	100
L-tyrosine	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0
OLPhénylanine	33	86	100	100	25	0	0	0	0	0	25
P-aminobenzoate	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0
Anthranilate	0	0	0	75	0	100	0	0	0	0	0
<u>Amines et composés</u>											
<u>azotés divers</u>											
Méthylamine	0	14	0	75	0	0	0	0	0	0	0
Ethanolamine	100	86	33	100	25	100	0	0	0	0	75
Benzylamine	33	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putrescine	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-glucosamine	0	0	0	75	0	0	0	100	80	0	0
bêtaïne	100	100	0	75	25	0	11	0	0	0	25
sarcosine	100	100	0	100	25	0	0	0	0	0	0
hippurate	0	0	0	25	25	0	33	0	0	0	0

Tableau 5. (suite et fin)

Caractères	Phénons										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nombre de souches	3	7	3	4	4	2	9	2	5	3	4
Pantothénate	66	14	0	100	0	100	33	0	0	0	0
Acétamide	0	28	0	100	0	0	11	0	0	0	25
Nicotinate	33	71	66	50	50	0	0	0	0	0	0
Esculine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66	25
<u>Alcane</u>											
n-dodécane	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
n-hexadécane	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0

apparaissent souvent remplies de granules réfringents de PHB. Les colonies ont un diamètre inférieur à 2mm, un bord régulier, une surface lisse, elles sont opaques et de couleur blanche ou crème.

Toutes les bactéries sont oxydase positives, prototrophes et présentent un métabolisme de type respiratoire. Dans tous les phénons, on trouve des souches dénitrifiantes. Dans leur grande majorité, les souches croissent de 12° à 43°C et à pH 6 à 8. Elles produisent toutes de l'acide après croissance aérobie sur milieu au glucose. Très peu d'entre elles tolèrent des concentrations élevées en NaCl, KNO₃, KNO₂ ou azoture. Elles accumulent toutes des réserves de PHB après croissance sur β -hydroxybutyrate.

La séparation des souches en deux ensembles A et B est essentiellement due au nombre de substrats utilisés: 60 substrats en moyenne (soit 39%) sont utilisés par les souches de l'ensemble A, alors que les souches de l'ensemble B n'en utilisent que 28 (soit 18%). La différence d'utilisation de ces substrats par familles de composés est présentée dans le tableau 6.

Le GC % de l'ADN de quelques souches représentatives de l'ensemble A varie de 66 à 70 (tableau 7).

b - Position taxonomique. Toutes les souches de référence (A. brasilense Sp7 et Sp28; A. lipoferum Sp109, Sp Br17 et Sp 59b) sont dans l'ensemble A; elles constituent le phénon 5 à l'exception de la souche Sp7 qui se trouve dans le phénon 7 (fig. 2). La subdivision du genre Azospirillum en A. brasilense et A. lipoferum ne rend donc absolument pas compte des différences que nous avons observées entre les ensembles A et B définis à partir de l'analyse de 251 caractères.

D'autre part, selon Döbereiner et De Polli (1981), tous les Azospirillum isolés de l'endosphère du riz appartiendraient

Tableau 6. Pourcentage d'utilisation moyenne des substrats carbonés par les souches d'Azospirillum des ensembles A et B.

Substrats carbonés	Ensemble A	Ensemble B
Sucres et dérivés	40,5	55
Acides gras	42	23
Acides aliphatiques	51	10
Alcools et polyalcools	43	13,5
Composés aromatiques non azotés	12	7,5
Acides aminés	42	11,5
Amines	15,5	7

Tableau 7. GC% de l'ADN de quelques souches d'Azospirillum représentatives de l'ensemble A.

N° souche	N° phénon	GC %
1	7	70 ²¹
2	7	68
27	4	66
30	1	67
43	2	67
50	5	70 ²²

²¹Déterminé par Tarrand et al. (1978).

à l'espèce A. brasilense. Cette affirmation est en contradiction avec nos propres observations: 33 souches de notre collection ont en effet été isolées de l'endorhizosphère du riz, et parmi celles-ci 3 seulement (les souches 2, 41 et 46) sont incapables d'assimiler le glucose ce qui constitue l'un des critères d'identification d'A. brasilense.

Signalons que Franche et Elmerich (1981) ont analysé le contenu plasmidique de diverses souches d'Azospirillum, certaines d'entre elles étant issues de notre collection. Les résultats obtenus (tableau 8) montrent que les souches de l'ensemble A se différencient nettement des souches de l'ensemble B par le nombre et la masse moléculaire de leurs plasmides. Cette distinction, impossible avec la classification des souches en A. brasilense et A. lipoferum, semble confirmer la validité de la nouvelle classification que nous proposons.

3.2.2. Souches corynéformes (souches 71 à 93)

Sur les 251 caractères étudiés, 126 ont été négatifs pour l'ensemble des souches. Parmi ceux-ci, 84 substrats carbonés n'ont pas été assimilés. L'analyse de taxonomie numérique a permis de regrouper 14 souches en un seul phénon pour une distance taxonomique de 0,017 (fig. 3).

a - Caractérisation des souches. Toutes les souches se présentent sous forme de bâtonnets de 1,5 à 3 μm de long et d'une largeur inférieure à 0,5 μm , à gram variable, souvent positif. A l'exception des souches 93,84 et 83 qui sont aciliées, les cellules sont mobiles par un flagelle polaire et peuvent former de petites chaînes ou s'agglomérer en amas. Elles présentent un polymorphisme accentué avec des formes en V, en Y ou en crose. Les colonies ont un diamètre inférieur à 2mm; elles sont élevées, à bord régulier et surface lisse. Toutes présentent une pigmentation rose. Le pigment est extractible

Tableau B. Analyse des plasmides de quelques souches d'Azospirillum.

Ensemble	Azospirillum			Plasmides**	
	Souche	N° d'ordre	Phénon	Masse moléculaire (x10 ⁶ d)	
A	SF50	23	4	≥ 150 , 115 ,	13, 3,5
	DN64	27	4	≥ 150 , 115 ,	33, 29
	S28	13	6	≥ 150 , 115 ,	33, 29
	Sp7	1	7	≥ 310***, 115 ,	90, 40
	R07	2	7	≥ 310***, 115 ,	90, 20, 4
B	K67	29	9		90, 30
	KR77	35	9	115 ,	46, 27

**d'après Franche et Elmerich (1981)

*** 2 plasmides identifiés

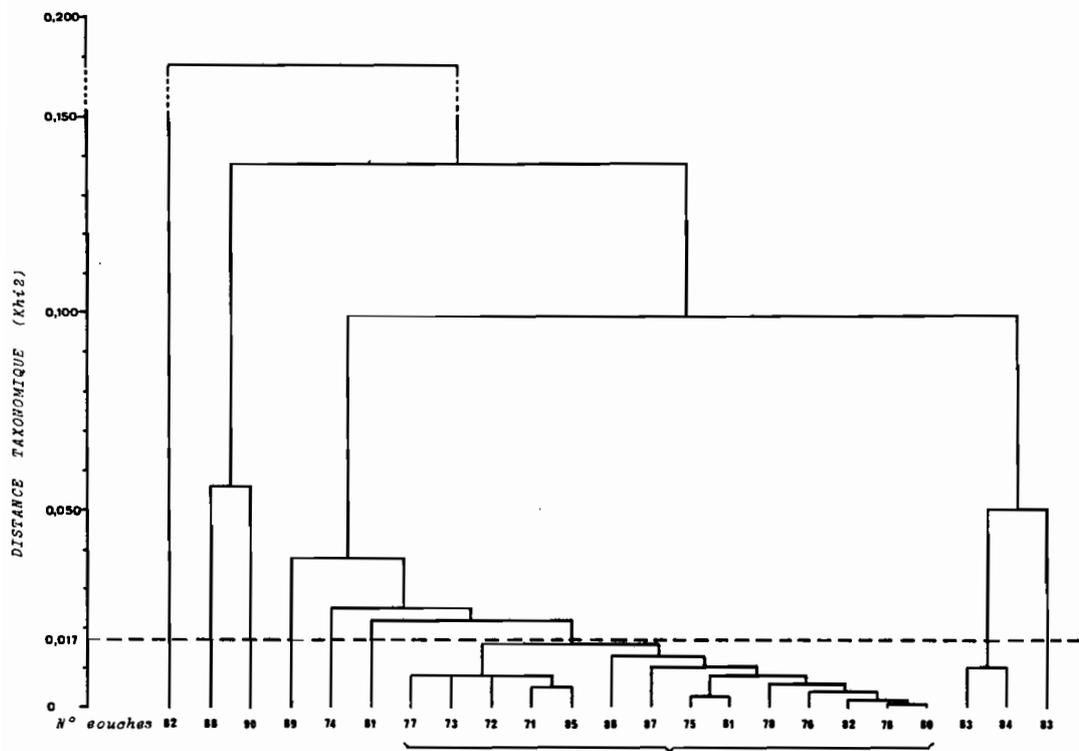


Fig. 3. Dendrogramme des souches Corynéformes fixatrices de N_2

par l'acétone: l'analyse spectrophotométrique donne un pic à 357 nm, et un autre à 475 nm avec un épaulement à 500 nm (fig. 4). Il pourrait donc s'agir d'un pigment caraténoïde ; il n'est pas extractible par l'éthanol, le méthanol, le benzène et le tétrachlorure de carbone.

Ces souches présentent toutes un métabolisme de type oxydatif. Elles sont prototrophes mais sont incapables de croître en autotrophie dans une atmosphère comprenant : H₂ 10%, CO₂ 10%, O₂ 5% et N₂ 75%. Elles sont oxydase et catalase positives. Elles croissent de 12 à 41°C ainsi qu'à pH 6 ou 8. Elles ne produisent pas d'acide sur glucose en aérobose et seules 5 d'entre elles (les souches 72, 88, 90, 92 et 93) dissimilent le nitrate en nitrite. Aucune n'assimile le nitrate. Les caractères suivants sont négatifs : production d'H₂S, VP, rouge de méthyl, tryptophane désaminase, arginine dihydrolyase, lysine et ornithine décarboxylases, hydrolyse de la gélatine, de l'amidon, du tween 80 et du jaune d'oeuf, tolérance à des concentrations élevées des substrats testés. Toutes les souches accumulent du PHB et la plupart hydrolysent l'urée à l'exception des souches 92, 93, 84 et 83.

En ce qui concerne l'assimilation des composés carbonés, la plupart des souches utilisent 38 à 40 substrats (tableau 9). C'est notamment le cas des 14 souches du phénon 1 qui se caractérisent par leur aptitude à utiliser la plupart des acides gras et organiques, mais sont incapables d'assimiler les glucides (à l'exception du gluconate) et les acides aminés. La souche 92 est capable d'assimiler 48 composés (dont 10 acides aminés), alors que la souche 90 n'en utilise que 5 (galactose, isobutyrate, valérienate, m-hydroxybenzoate et acétamide).

L'ADN de la souche 85, caractéristique du phénon 1 à un GC% de 43. Les souches 89 et 93, par contre ont un GC% de 60.

b - Position taxonomique. Compte tenu du gram et de la morphologie de nos souches qui présentent un polymorphisme prononcé

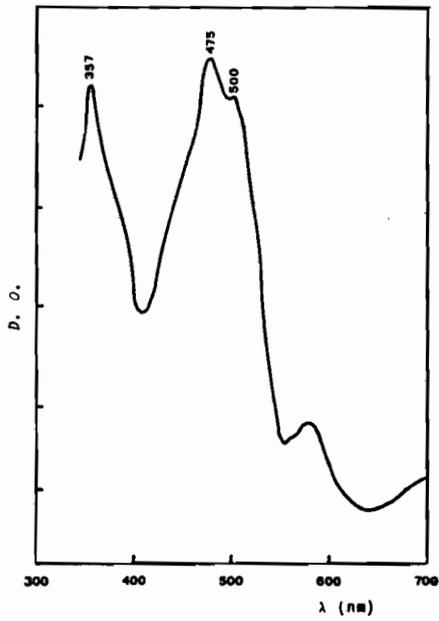


Fig. 4. Analyse spectrophotométrique du pigment rose extrait à l'acétone.

Tableau 9. Substrats carbonés utilisés par les souches corynéformes

Substrats	Souches																						
	92	88	90	89	74	91	77	73	72	71	85	86	87	75	81	78	76	82	79	80	93	84	83
<u>Sucres et dérivés</u>																							
L-Arabinose	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Glucose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Galactose	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fructose	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Tréhalose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mélibiose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Acides gras</u>																							
Azelaidate	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Acétate	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Propionate	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Butyrate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isobutyrate	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valérate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valérianate	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isovalérianate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caproate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pêlargonate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caprate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Tableau 9. (suite)

Substrats	Souches																							
	92	88	90	89	74	91	77	73	72	71	85	86	87	75	81	78	76	82	79	80	93	84	83	
<u>Acides dicarboxy</u>																								
<u>liques</u>																								
Malonate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinate	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Maléate	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fumarate	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutarate	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Adipate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Pimélate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Subérate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crotonate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-oxo-glutarate	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Sébacate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Hydroxyacides</u>																								
Malate	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
D-Tartrate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Tartrate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Méso Tartrate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Hydroxybutyrate	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactate	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycolate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycérate	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Tableau 9 (suite)

Substrats	Souches																							
	92	88	90	89	74	91	77	73	72	71	85	86	87	75	81	78	76	82	79	80	93	84	83	
<u>Acides organiques divers</u>																								
Citrate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pyruvate	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lévilinate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Citraconate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Itaconate	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Mésaconate	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Formiate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Formate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TransAconitate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<u>Polyalcools et glycols</u>																								
Glycérol	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Ethylene-glycol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Propane-1,2-diol	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

Tableau 9 (suite et fin)

Substrats	Souches																							
	92	88	90	89	74	91	77	73	72	71	85	86	87	75	81	78	76	82	79	80	93	84	83	
<u>Amines</u>																								
Ethanolamine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-Glucosamine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>Composés azotés divers</u>																								
Acétamide	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

avec notamment des formes en V en Y ou en crosse, celles-ci peuvent être rattachées au groupe des corynéformes tel qu'il est défini dans le Manuel de Bergey (Buchanan et Gibbons, 1974). Il ne nous a toutefois pas été possible d'analyser les parois dont la composition peut seule permettre de faire la distinction entre les genres Corynebacterium et Arthrobacter.

Des espèces de l'un et l'autre genre ont été signalées comme étant fixatrices de N_2 (Smyk, 1970; Cacciari et al., 1971, 1973; Berndt et al., 1976; De Bont et Leitjen, 1976; Wiegel et Schlegel, 1976).

Selon le Manuel de Bergey, il existe trois espèces du genre Corynebacterium pouvant présenter des colonies pigmentées en rose (C. michiganense, C. flaccumfaciens et C. poinsettiae), mais elles exigent des facteurs de croissance et le GC% de leur ADN varie de 67 à 73. Or nos souches sont prototrophes et ont un GC% plus bas (43 et 60)

Cacciari et al. (1971, 1973) ont décrit deux souches d'Arthrobacter pigmentées en jaune (A. giacomelloi et A. fluorescens) Mais ces souches se différencient des nôtres par divers caractères. (elles ne sont pas mobiles, dissimilent le nitrate en nitrite, assimilent le nitrate, hydrolysent la gélatine), et de plus le GC% des espèces du genre Arthrobacter est compris entre 60 et 72.

Nos souches pourraient donc appartenir à une nouvelle espèce de corynébactériacée dont le genre serait à préciser par une analyse des constituants de la paroi cellulaire.

3.2.3. *Autres souches fixatrices de N_2 (souches 51 à 70)*

Nous avons reporté au tableau 10 les principaux caractères des 20 souches analysées, et au tableau 11 l'analyse de l'ADN de 15 d'entre elles.

Tableau 10. Principaux caractères des souches 51 à 70

Caractères	Souches																				
	52	53	59	60	63	64	55	67	68	70	51	54	56	57	61	65	69	58	66	62	
<u>Caractères morphologiques</u>																					
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciliation polaire	1	>1	>1	>1	>1	>1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	2(>1)	2(>1)	
Ciliation péritriche	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	
<u>Caractères biochimiques</u>																					
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Hydrolyse Gélatine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hydrolyse Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hydrolyse Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
Hydrolyse J.d'oeuf	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
Hydrolyse Urée	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	
Formation dihydroxyacétone	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fermentation Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	
Prototrophie Glucose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Assimilation KNO_3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
$NO_3^- \rightarrow$ Gaz	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	

Tableau 10. (suite)

Caractères	Souches																				
	52	53	59	60	63	64	55	67	68	70	51	54	56	57	61	65	69	58	66	62	
Arginine dihydrolase	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Lysine décarboxylase	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Ornithine décarboxylase	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PHB	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<u>Assimilation substrats carbonés</u>																					
<u>Sucres et dérivés</u>																					
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Arabinose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Raffinose	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Tréhalose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Tableau 10 (suite)

Caractères	Souches																			
	52	53	59	60	63	64	55	67	68	70	51	54	56	57	61	65	69	58	66	62
Maltose	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Lactose	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Desoxyribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-xylose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Inuline	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2-Cétogluconate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Saccharate	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Mucate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Sedoheptulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Acides gras</u>																				
Acétate	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Propionate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Butyrate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Isobutyrate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Valérate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Isovalérate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Caproate	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Palmitate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Laurate	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Pélargonate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+

Tableau 10 (suite)

Caractères	Souches																			
	52	53	59	60	63	64	55	67	68	70	51	54	56	57	61	65	69	58	66	82
Caprate	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Valérianate	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Acides dicarboxy-</u> <u>liques</u>																				
Oxalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malonate	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Succinate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Maléate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fumarate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Glutarate	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Adipate	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Pimelate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Subérate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Crotonate	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Sébacate	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
2-oxo-glutarate	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
<u>Hydroxyacides</u>																				
D-Malate	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D(-)-Tartrate	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
L(+)-Tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mesotartrate	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
DL- -Hydroxyburate	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

Tableau 10 (suite)

Caractères	Souches																			
	52	53	59	60	63	64	55	67	68	70	51	54	56	57	61	65	69	58	66	62
DL-Lactate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Glycollate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DL-Glycérate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydroxyméthylglutarate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<u>Acides organiques divers</u>																				
Citrate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Pyruvate	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aconitate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Laevulinate	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Citraconate	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Itaconate	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Mesaconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Formiate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Formate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tartronate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucuronate	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-Isocitrate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Cis-Aconitate	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Trans-Aconitate	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
α-D-Galacturonate	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Tableau 10 (suite)

Caractères	Souches																				
	52	53	59	60	63	64	55	67	68	70	51	54	56	57	61	65	69	58	66	62	
<u>Polyalcools et Glycols</u>																					
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
Mannitol	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
Inositol	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	
Adonitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
Glycérol	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Ethylèneglycol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Propane, 1-2,diol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Butane, 2,3,diol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
Ribitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
2-Phényléthanol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>Alcools</u>																					
Méthanol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ethanol	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	
n-propanol	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	
isopropanol	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
n-butanol	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
isobutanol	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	
Géranol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<u>Composés aromatiques non azotés</u>																					
O-Mandélate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tableau 10 (suite)

Caractères	Souches																				
	52	53	59	60	63	64	55	67	68	70	51	54	56	57	61	65	69	58	66	62	
L-Mandélate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoylformate	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoate	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
O-Hydroxybenzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
m-Hydroxybenzoate	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Hydroxybenzoate	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Phthalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isophtalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terephtalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phénylacétate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tans-cinnamate	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Naphtalène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Phénol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Testostérone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acides aminés aliphatiques																					
Glycocolle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L- α -Alanine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D- α -Alanine	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
β -Alanine	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
DL-Sérine	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
DL-Thréonine	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Tableau 10 (suite)

Caractères	Souches																			
	52	53	59	60	63	64	55	67	68	70	51	54	56	57	61	65	69	58	66	62
L-Leucine	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
DL-Isoleucine	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
DL-Norleucine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Valine	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
L-Aspartate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
L-Glutamate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
L-Lysine	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
L-Arginine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
DL-Ornithine	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
L-Citrulline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
DL- α -Aminobutyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
γ -Aminobutyrate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
DL-Norvaline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asparagine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Méthionine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L(+) Cystéine	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
L-Cystine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
Acides aminés aromatiques																				
L-Histidine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
L-Proline	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
L-Tyrosine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
L-Phénylalanine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Tableau 10 (suite)

Caractères	Souches																			
	52	53	59	60	63	64	55	67	68	70	51	54	56	57	61	65	69	58	66	62
DL-Tryptophane	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Kynurénate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Anthranilate	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
O-aminobenzoate	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
P-aminobenzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Amines</u>																				
Méthylamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ethanolamine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Benzylamine	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-
Putrescine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Spermine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histamine	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Tryptamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Butylamine	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D-Glucosamine	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Esculine	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<u>Composés azotés divers</u>																				
Bétaïne	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Sarcosine	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Créatine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hippurate	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Panhoténate	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 11. Analyse de l'ADN (G + C %) (souches 51 à 70)

N° souche	G + C %	Identité
52	67	} <u>Pseudomonas cepacia</u> - <u>Pseudomonas marginata</u>
53	67	
59	68	
60	68	
63	67	
64	63	
68	72	} <u>Pseudomonas lemoignei</u>
70	65	
54	68	} <u>Alcaligenes sp.</u>
61	68	
65	68	
69	63	<u>Aeromonas sp.</u>
58	53	<u>Enterobacter cloacae</u>
62	64	} <u>Aquaspirillum sp.</u>
66	60	

Les souches appartiennent aux genres Pseudomonas (10 souches), Alcaligenes (6 souches), Aeromonas (1 souche), Enterobacter (1 souche) et Aquaspirillum (2 souches).

a - Les souches 52, 53, 55, 59, 60, 63, 64, 67, 68 et 70 sont des bâtonnets de 1,5 à 3 μ m de long et 0,5 à 0,8 μ m de large, à gram négatif, droits ou légèrement incurvés, mobiles par un ou plusieurs flagelles polaires, aérobies, chimioorganotrophes et possédant un métabolisme de type respiratoire. Le GC% de l'ADN est compris entre 63 et 72. Cette description correspond sensiblement à la définition du genre Pseudomonas (Buchanan et Gibbons, 1974; Stanier et al., 1966).

- Les souches 52, 53, 59, 60, 63 et 64 se rattachent au groupe P. cepacia- P. marginata: elles ont un à plusieurs flagelles polaires, accumulent du PHB, utilisent l'arginine et la bêtaïne comme source unique de carbone, et poussent à 41°C. Ces souches n'hydrolysent pas la gélatine et l'amidon, mais hydrolysent le tween 80 et le jaune d'oeuf. Elles assimilent le nitrate et ne sont pas dénitrifiantes. Leur GC% est de 67 à 68. Elles utilisent de 71 à 87 composés carbonés (sucres et dérivés, acides gras, acides organiques, polyalcools, acides aminés et amines. 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.

- Les souches 55, 67, 68 et 70 s'apparentent au groupe P. lemoignei: elles ont un seul flagelle polaire, accumulent du PHB, n'assimilent pas l'arginine et la bêtaïne, ne possèdent pas l'arginine dihydrolase et croissent à 41°C. Les souches 55, 67 et 70 ont un spectre nutritif très réduit (de 7 à 14 substrats carbonés): elles n'assimilent pas les sucres, la plupart des acides gras et des acides organiques, les polyalcools, les composés aromatiques, les acides aminés et les amines. Seuls quelques alcools (éthanol, n-propanol)

Le sont utilisés par toutes les souches. GC% de la souche 70 est de 65. La souche 68 assimile 33 composés carbonés parmi les glucides, acides gras, acides organiques et alcools. Elle hydrolyse la gélatine. Son GC% est de 72.

Ces souches forment des colonies de 2 à 5 mm, effuses opaques, blanches, à bord régulier et surface lisse.

b - Les souches 51, 54, 56, 57, 61 et 65, se présentent sous forme de bâtonnets de 1 à 3 μm de long et de 0,5 à 1 μm de large, non sporulés, mobiles par flagelles péritriches, gram négatifs, aérobies, chimioorganotrophes, dotés d'un métabolisme respiratoire et prototrophes. Elles ne fermentent pas le glucose, sont oxydase et catalase positives et n'hydrolysent pas l'amidon et la gélatine. Elles réduisent le nitrate en nitrite. La souche 51 dénitrifie. Elles croissent à 41°C à l'exception de la souche 51.

Les souches 54, 56, 57 et 61 assimilent de 83 à 87 substrats carbonés répartis parmi les différents groupes de composés testés. La souche 65 utilise 39 substrats mais aucun sucre, acide gras ou aminé. La souche 51 assimile 36 composés mais aucun alcool, acide aminé (alanine exceptée) ou amine.

Ces souches répondent à la description du genre Alcaligenes (Buchanan et Gibbons, 1974). Les souches 54, 61 et 65 ont un GC% de 68.

c - La souche 69 se présente sous forme de bâtonnets de 1,5 à 3 μm de long, de largeur inférieure à 0,5 μm , gram négatifs, mobiles par un flagelle polaire, oxydase et catalase positifs. 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. Cette souche est prototrophe et accumule du PHB. 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: essentiellement des sucres ainsi que quelques acides organiques, polyalcools et amines. Le GC% de l'ADN est de 63. Ce profil correspond au genre Aeromonas (Buchanan et Gibbons, 1974).

d - La souche 58 est un bâtonnet de 1,5 à 3 μ m de long et 0,5 à 1 μ m de large, gram négatif, mobile par flagelles péritriches. Les colonies sur gélose nutritive ont 2 à 5 mm de diamètre; elles sont effuses, translucides, blanches, avec un bord régulier et une surface lisse. Cette souche est oxydase négative et catalase positive. Elle est aérobie et fermente le glucose, le saccharose, le maltose, le mannitol, le mannose et le xylose avec production de gaz. 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 N₂O 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 NaCl, KNO₃, KNO₂ et azoture aux concentrations testées et un pH de 5 à 9. Les autres tests biochimiques sont négatifs. Le GC% de l'ADN est 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 à l'espèce Enterobacter cloacae (Buchanan et Gibbons, 1974).

e - Les souches 62 et 66 sont des spirilles de plus de 3 μ m de long avec une largeur inférieure à 1 μ m, gram négatifs, mobiles avec une ciliation amphitriche. Les colonies sur gélose nutritive ont un diamètre compris entre 2 et 5mm; elles sont effuses, translucides, de couleur crème avec un bord régulier et une surface lisse. Ces souches sont aérobies, prototrophes et présentent un métabolisme de type respiratoire. Elles sont oxydase et catalase positives,

hydrolysent l'urée, dissimilent le nitrate en nitrite et assimilent le nitrate. La croissance est positive de 12 à 41°C et avec un pH de 5 à 8.

La souche 66 assimile 85 substrats carbonés répartis dans l'ensemble des composés testés. Le GC% de son ADN est 60. La souche 62 utilise 76 substrats et son GC% est 64. Cette description permet de classer ces deux souches dans le genre Aquaspirillum (Strength et al., 1976; Krieg, 1976).

Certaines souches du genre Aquaspirillum (A. fasciculus et A. peregrinum) ont été décrites par Strength et al. (1976) comme étant fixatrices de N₂. De même l'aptitude de l'espèce Enterobacter cloacae à fixer N₂ est connue depuis longtemps (cf. Buchanan et Gibbons, 1974). La souche que nous avons isolée (souche 58) présente toutefois la particularité d'être également dénitrifiante.

Les souches appartenant au genre Pseudomonas, par contre, étaient réputées ne pas comprendre d'espèces fixatrices de N₂ (Stanier et al., 1966), bien que certaines souches fixatrices aient été décrites comme appartenant à ce genre (Voets et Debacker, 1956; Proctor et Wilson, 1961; Hill et Postgate, 1969). Mais la description des souches P. azotogensis était trop peu détaillée pour convaincre. Notre étude apporte désormais la preuve de l'aptitude de souches du genre Pseudomonas à fixer N₂.

Enfin, c'est à notre connaissance la première fois que des souches appartenant aux genres Alcaligenes et Aeromonas sont décrites comme étant fixatrices de N₂.

3.3. Microaérophilie des souches fixatrices de N₂ rhizosphériques

Nous avons reporté au tableau 12 les ARA spécifiques de 64 souches de notre collection (dont 42 Azospirillum), incubées dans

Tableau 12. ARA spécifique des souches (exprimée en nmoles C_2H_4 /mn/mg protéines) à différentes pO_2

Souches		pO_2 (kPa)				
N° d'ordre	Type	0	0,5	1	2	5
2	<u>Azospirillum</u>	-	8	39	47	-
3	-	-	2	22	4	-
4	-	-	22	32	-	-
5	-	-	23	16	1	-
6	-	-	45	58	5	-
7	-	-	26	43	4	-
8	-	-	19	32	13	8
9	-	-	23	43	57	-
10	-	-	4	28	12	-
11	-	-	22	14	-	-
12	-	-	54	31	5	-
13	-	-	44	50	2	-
14	-	-	27	16	2	-
15	-	-	7	13	7	-
16	-	-	5	26	40	-
17	-	-	8	11	5	-
18	-	-	13	4	-	-
19	-	-	12	12	6	-
20	-	-	13	9	-	-
21	-	-	-	5	1	-
22	-	-	54	62	18	-
23	-	-	23	36	21	-
24	-	-	9	10	3	-
25	-	-	7	26	10	2
26	-	-	5	26	13	5
28	-	-	21	15	10	-
29	-	-	1	2	-	-
30	-	-	42	11	-	-
31	-	-	-	4	2	-
33	-	-	19	20	7	4
35	-	-	7	5	-	-
36	-	-	7	9	63	-
37	-	-	20	33	11	-
38	-	-	-	57	4	-
39	-	-	59	30	9	-
40	-	-	-	21	1	-

Tableau 12 (Suite et fin)

Souches		pO ₂ (kPa)				
N° d'ordre	Type	0	0,5	1	2	5
41	<u>Azospirillum</u>	-	19	8	2	-
42	-	-	34	12	2	-
43	-	-	7	33	37	-
44	-	-	7	20	-	-
45	-	-	14	49	40	-
46	-	-	24	10	1	-
51	<u>Alcaligenes</u>	-	12	23	10	4
52	<u>Pseudomonas</u>	-	5	15	6	-
53	<u>Pseudomonas</u>	-	6	18	15	-
54	<u>Alcaligenes</u>	-	4	14	7	-
56	<u>Alcaligenes</u>	-	8	6	4	-
57	<u>Alcaligenes</u>	-	7	11	9	-
58	<u>Enterobacter</u>	15	7	9	-	-
59	<u>Pseudomonas</u>	-	2	8	5	-
60	<u>Pseudomonas</u>	-	4	24	16	-
61	<u>Alcaligenes</u>	-	13	9	6	-
62	<u>Aquaspirillum</u>	-	-	10	9	-
64	<u>Pseudomonas</u>	-	4	20	30	1
65	<u>Alcaligenes</u>	-	1	18	5	2
66	<u>Aquaspirillum</u>	-	14	25	20	-
68	<u>Pseudomonas</u>	-	6	18	9	-
69	<u>Aeromonas</u>	-	3	14	22	4
70	<u>Pseudomonas</u>	-	10	23	6	-
77	Corynébacté- riacée	-	12	3	2	-
78	-	-	6	1	-	-
86	-	-	10	1	1	-
89	-	-	7	2	1	-
93	-	-	4	20	5	-

une atmosphère comprenant des concentrations variables d'oxygène (0, 0,5, 1, 2 et 5 kPa).

Pour la grande majorité des souches, l'activité nitrogénasique ne s'exprime qu'en présence d'une pO_2 comprise entre 0,5 et 2 kPa. L'activité optimale varie considérablement d'une souche à l'autre (de 2 à 63 nmoles C_2H_4 /mn/mg protéines).

Plus de la moitié des souches ont leur activité optimale correspondant à ^{une} pO_2 de 1 kPa (fig. 5), qu'il s'agisse des Azospirillum (57% des souches) ou de l'ensemble des souches testées (58% des souches).

Les activités maximales moyennes ont été comparées en fonction du type de souche. Les résultats obtenus (tableau 13) montrent que l'ARA spécifique des Azospirillum est en général plus élevée que celle des autres souches. Par ailleurs, si on considère la subdivision des Azospirillum en ensembles A et B (cf. fig. 2) on constate que l'activité des souches de l'ensemble A est environ 3 fois plus forte que celle des souches de l'ensemble B, ce qui confirme à nouveau l'intérêt de notre analyse taxonomique.

L'effet bénéfique des faibles tensions d'oxygène sur la fixation de N_2 dans la rhizosphère du riz, a été notamment suggéré par Trolldenier (1977) ainsi que par Watanabe et Barraquio (1979). Il s'explique donc par le fait qu'une grande majorité des souches de la rhizosphère sont microaérophiles pour la fixation de N_2 .

3.4. Activité pectinolytique des souches fixatrices de N_2 rhizosphériques

L'aptitude de certaines souches fixatrices de N_2 à croître aux dépens de la pectine comme seule source de carbone explique probablement qu'elles soient capables de s'insérer dans les espaces intercellulaires du cortex racinaire composés de Pectine (Umali Garcia et al., 1978; Zuberer et Silver, 1979; Matthew, 1979).

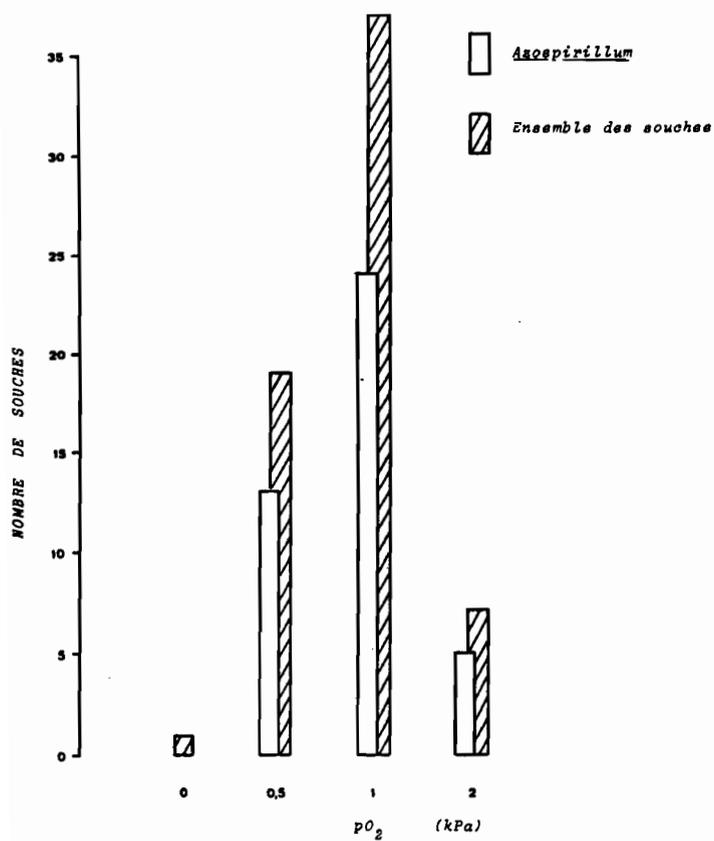


Fig. 5. Pression partielle en oxygène optimale pour les souches placées en conditions de fixation de N₂

Tableau 13. ARA spécifique maximale moyenne des souches

Souches		A R A
type	Nombre	(nmoles C ₂ H ₄ /mn/mg protéines)
<u>Azospirillum</u>		
- totalité des souches	42	30,3 ± 6,9
- ensemble A	30	37,5 ± 5,9
- ensemble B	12	12,5 ± 5,1
<u>Autres souches</u>		
- <u>Alcaligenes</u>	6	14,5
- <u>Pseudomonas</u>	7	19,5
- <u>Aquaspirillum</u>	2	17,5
- <u>Enterobacter</u>	1	15,0
- <u>Aeromonas</u>	1	22,0
- <u>Corynébactériacées</u>	5	11,0

Les observations faites par certains auteurs au microscope électronique révèlent notamment que les Azospirillum, en pénétrant dans la lamelle mitoyenne des cellules racinaires, s'entourent d'une zone transparente due à la lyse de la couche de pectine environnante (Umali Garcia et al., 1978; Matthews, 1979).

Nous avons testé 54 souches de notre collection (dont 42 Azospirillum) pour leur aptitude à utiliser la pectine ainsi que diverses substances simples susceptibles de se former lors de sa dégradation soit par hydrolyse (acide galacturonique, arabinose, galactose), soit par déméthylation (méthanol). Les résultats obtenus (tableau 14) montrent que près de la moitié des souches sont capables d'utiliser la pectine comme source unique de carbone (Azospirillum: 20 souches sur 42; autres fixateurs de N_2 : 7 souches sur 12). Parmi les composés plus simples, l'arabinose et le galactose sont utilisés par la grande majorité des souches; le galacturonate et le méthanol, par contre, ne sont utilisés que par certaines souches d'Azospirillum (galacturonate: 34 souches, méthanol: 14 souches).

La présence de fixateurs de N_2 dans les espaces intercellulaires des racines pourrait donc s'expliquer parfaitement par le fait que de nombreuses souches rhizosphériques sont capables d'utiliser la pectine ou ses dérivés.

Tableau 14. Aptitude des souches fixatrices de N_2 rhizosphériques à utiliser la pectine et ses dérivés (galacturonate, arabinose, galactose et méthanol).

Souches		Pectine	Galacturonate	Arabinose	Galactose	Méthanol
N° d'ordre	Genre					
1	<u>Azospirillum</u>	-	+	+	+	+
2	"	+	+	+	+	+
3	"	-	+	+	+	+
4	"	+	+	+	+	+
5	"	+	+	+	+	+
7	"	+	+	+	+	+
8	"	+	+	-	+	+
9	"	-	+	+	+	+
10	"	+	+	+	+	-
11	"	+	+	+	-	-
12	"	+	+	+	+	-
13	"	+	+	+	+	-
14	"	+	+	+	+	-
15	"	-	-	+	+	-
16	"	-	-	+	+	-
17	"	+	-	+	+	+
18	"	-	+	+	+	+
19	"	-	-	+	+	+
20	"	+	-	+	+	-
22	"	-	+	+	+	+
23	"	-	+	+	+	+
24	"	+	-	+	+	-
25	"	-	+	+	+	-
26	"	-	-	+	+	-
27	"	-	+	+	+	+
28	"	-	+	+	+	-
30	"	-	+	+	+	-
31	"	+	+	-	+	-
32	"	+	+	+	+	-
34	"	+	+	+	+	-
35	"	+	+	+	+	-
36	"	-	+	+	+	-
37	"	+	+	+	+	-
38	"	+	+	+	+	-

Tableau 14. (suite et fin)

Souches		Pectine	Galacturonate	Arabinose	Galactose	Méthanol
N° d'ordre	Genre					
39	<u>Azospirillum</u>	-	+	+	+	-
40		-	-	+	+	-
41	"	-	+	+	+	-
42		+	+	+	+	-
43		-	+	+	+	-
44	"	-	+	+	+	-
45		-	+	+	+	-
46		-	+	+	+	-
51	<u>Alcaligenes</u>	+	-	-	+	-
52	<u>Pseudomonas</u>	+	-	+	+	-
54	<u>Alcaligenes</u>	-	-	+	+	-
56	<u>Alcaligenes</u>	+	-	+	+	-
57	<u>Alcaligenes</u>	+	-	+	+	-
58	<u>Enterobacter</u>	+	-	+	+	-
60	<u>Pseudomonas</u>	-	-	+	+	-
61	<u>Alcaligenes</u>	+	-	+	+	-
62	<u>Aquaspirillum</u>	-	-	+	+	-
64	<u>Pseudomonas</u>	-	-	+	+	-
65	<u>Alcaligenes</u>	+	-	-	-	-
66	<u>Aquaspirillum</u>	-	-	+	+	-

4. CONCLUSIONS

Les objectifs de ce travail ont été d'une part, d'analyser la distribution de la microflore hétérotrophe aérobie dans une rhizosphère typique de riz, d'autre part d'effectuer l'étude taxonomique d'un grand nombre de souches rhizosphériques fixatrices de N_2 provenant pour la plupart de sols de rizière du Sénégal.

L'étude de la microflore rhizosphérique du riz cv. Morobekkan cultivé sur sol gris de Casamance, montre que la distribution quantitative et qualitative des différents groupes bactériens qui la composent, est très différente d'un compartiment à l'autre (fig. 1); les groupes majoritaires sont des bâtonnets asporulés à gram variable (53% dans SR), des Bacillus (45% dans R) et des Alcaligenes (29% dans ER). Le groupe des Pseudomonas dans les trois compartiments représente environ 15% de l'ensemble. La proportion de fixateurs de N_2 au sein de cette microflore (tableau 4) est élevée et diminue régulièrement quand on passe de SR (53%) à R (25%) puis à ER (16%). Le groupe de fixateurs de N_2 dominant est constitué de bâtonnets à gram variable, pléomorphes, mobiles par un flagelle polaire, formant des colonies élevées, à bord régulier, à surface lisse et pigmentées en rose; ces organismes qui possèdent une oxydase, une catalase, et hydrolysent l'urée dans leur majorité, s'apparentent aux Corynébactériacées. Ils correspondent probablement à une nouvelle espèce.

La proportion des actinomycètes augmente régulièrement quand on passe de SR (1,7%) à R (4,1%) puis à ER (7,2%). Il y a donc une relation inverse entre les proportions de fixateurs de N_2 et d'actinomycètes ce qui permet de penser que ces derniers sont susceptibles d'exercer un certain contrôle sur la colonisation rhizosphérique (nous approfondirons ce point dans le prochain chapitre).

Des différences importantes peuvent être observées entre nos résultats et ceux d'une étude du même type réalisée par Watanabe et Barraquio (1979) dans la rhizosphère du riz cv. IR 26 cultivé sur

un sol des Philippines. Ces auteurs constatent en effet que la microflore fixatrice dominante est constituée de bactéries du type Achromobacter, alors que ce sont des bactéries corynéformes qui dominent dans le cas du sol gris. Ils observent d'autre part que la proportion de fixateurs de N_2 augmente quand on passe de SR à ER, alors que sur sol gris nous avons obtenu des résultats inverses. Nous reviendrons sur ce dernier point dans le chapitre suivant.

La microflore fixatrice de N_2 dans la rhizosphère du riz, est extrêmement variée: outre les bactéries corynéformes du sol gris de Casamance, nous avons isolé des fixateurs de N_2 appartenant aux genres Azospirillum, Pseudomonas, Alcaligenes, Enterobacter, Aquaspirillum et Aeromonas. L'adaptabilité de la microflore fixatrice de N_2 considérée globalement, notamment son aptitude à utiliser les substrats les plus variés, s'explique donc par cette diversité. Toutes ces souches ont en commun la propriété d'être microaérophiles pour la fixation de N_2 . Nous avons constaté que la moitié d'entre elles sont également capables d'utiliser la pectine comme source de carbone (tableau 14) ce qui facilite probablement la colonisation des cellules racinaires vivantes au niveau des espaces intercellulaires composés de pectine. Toutefois l'aptitude à utiliser la pectine pourrait ne pas être indispensable à la colonisation intercellulaire: nous avons observé que la plupart des souches sont capables d'utiliser les produits d'hydrolyse de la pectine (galacturonate, arabinose, galactose). Tel est précisément le cas de l'Azospirillum Sp7 qui a été isolé de l'endorhizosphère de Digitaria decumbens bien qu'incapable d'utiliser la pectine comme seule source de carbone (ce point sera discuté dans le chapitre suivant).

L'étude taxonomique de 50 souches d'Azospirillum portant sur l'analyse de 251 caractères, nous a permis de les subdiviser en

deux ensembles A et B distincts (fig. 2). Nous avons reporté au tableau 15 les principaux caractères pour lesquels les souches A se différencient des souches B: elles utilisent en moyenne deux fois plus de substrats carbonés que les souches B; leur activité nitrogénasique spécifique est environ trois fois plus forte; elles ont enfin quatre à six plasmides alors que les souches B n'en ont que deux ou trois.

Il résulte de notre étude que la subdivision du genre Azospirillum en deux espèces, A. brasilense et A. lipoferum, proposée par Tarrand et al. (1978), n'est pas fondée; les cinq souches de référence que nous avons testées (A. brasilense Sp7 et Sp28, A. lipoferum Sp59 b, Sp107 et SpBr 17) font partie de l'ensemble A; quatre d'entre elles notamment (Sp28, Sp59 b, Sp107 et SpBr 17), constituent le cinquième phénon de cet ensemble (autrement dit elles ne se différencient l'une de l'autre que par très peu de caractères). Il convient donc de réviser la classification des Azospirillum comme indiqué ci-dessus.

Le second groupe de fixateurs de N_2 comprend 23 souches corynéformes. L'analyse de taxonomie numérique nous a permis de regrouper 14 d'entre elles en un seul phénon. Il ne nous a pas été possible de faire l'analyse des parois dont la composition peut seule permettre de faire la distinction entre les genres Corynébactérium et Arthrobacter. Ces souches se différencient toutefois assez nettement des corynébactéries déjà décrites comme étant fixatrices de N_2 . Elles correspondent donc probablement à une nouvelle espèce.

Enfin, l'analyse du troisième groupe de microorganismes nous a permis de mettre en évidence la faculté de fixer N_2 chez des espèces des genres Pseudomonas, Alcaligenes et Aeromonas, pour lesquelles cette propriété n'était pas connue jusqu'à ce jour.

Tableau 15. Principaux caractères permettant de différencier les Azospirillum des ensembles A et B

Caractère	Azospirillum	
	A*	B
<u>Pourcentage d'utilisation des substrats carbonés</u>		
Sucres et dérivés	40,5	55
Acides gras	42	23
Acides aliphatiques	51	10
Alcools et polyalcools	43	13,5
Composés aromatiques non azotés	12	7,5
Acides aminés	42	11,5
Amines	16,5	7
<u>Activité nitrogénasique spécifique</u> (nmoles C ₂ H ₄ /mn/mg protéines)		
	37,5	12,5
<u>Nombre de plasmides</u>		
	4-6	2-3

* Les cinq souches de référence testées (deux *A. brasiliense*, trois *A. lipoferum*) se trouvent dans l'ensemble A.

N.B. Nombre de souches testées pour les différents caractères mentionnés : 50 (analyse nutritionnelle), 42 (activité nitrogénasique spécifique) et 7 souches (analyse des plasmides).

CHAPITRE II

ÉTUDE DE QUELQUES FACTEURS
AGISSANT SUR LA FIXATION DE N₂
DANS LA RHIZOSPHERE DU RIZ

1. INTRODUCTION

La fixation de N_2 dans la rhizosphère du riz fut mise en évidence au moyen de la méthode de réduction de l'acétylène par Yoshida et Ancajas et par nous même, pratiquement au même moment, et par des techniques très différentes: incubation de fragments de racines excisées (Yoshida et Ancajas, 1971); incubation de systèmes "sol-riz" dans leur intégralité (Rinaudo et al., 1971). Nous avons par la suite perfectionné les techniques d'incubation et conçu des dispositifs de mesure dans lesquels le système "sol-riz" se trouve dans des conditions relativement proches des conditions naturelles.

Nous étudierons dans ce chapitre certains aspects du rôle de la plante dans l'association "riz-fixateurs de N_2 ", et l'incidence de quelques facteurs de l'environnement (lumière, type de sol, teneur du sol en azote ammoniacal, régime hydrique) sur la fixation rhizosphérique de N_2 . Nous examinerons également trois types d'interaction entre la microflore fixatrice et d'autres organismes rhizosphériques.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Estimation de la fixation de N_2 dans la rhizosphère du riz par la méthode de réduction de l'acétylène.

Les méthodes utilisées pour la mesure de la fixation de N_2 sont fondées soit sur les analyses d'azote (méthode des bilans d'azote ou analyses isotopiques au moyen de l'azote-15), soit sur la méthode indirecte de réduction de l'acétylène.

Ne disposant pas de l'appareillage nécessaire aux analyses isotopiques, nous avons utilisé essentiellement la méthode de réduction de l'acétylène.

2.1.1. *Principe de la méthode de réduction de l'acétylène*

Schöllhorn et Burris (1966) ainsi que Dilworth (1966) mirent en évidence de façon tout à fait indépendante et pratiquement au même moment, l'inhibition par l'acétylène de la fixation de N_2 par des extraits de Clostridium pasteurianum. Cette découverte conduisit Koch et Evans (1966) à proposer l'utilisation de la réduction de l'acétylène comme moyen de mesurer l'activité nitrogénasique.

L'intérêt de cette technique fut confirmé peu après par les études de Sloger et Silver (1967), Stewart et al. (1967) et Hardy et al. (1968).

Après un rapide rappel du mécanisme des réactions catalysées par la nitrogénase, nous examinerons les relations existant entre la réduction de l'azote moléculaire et celle de l'acétylène, puis les possibilités d'utilisation de cette méthode pour l'étude de systèmes fixateurs complexes tels que l'association "riz-fixateurs de N_2 ".

Réactions catalysées par la nitrogénase (fig. 6)

La nitrogénase est en fait un complexe enzymatique formé de deux composantes métallo-protéiques (la Molybdoferredoxine et

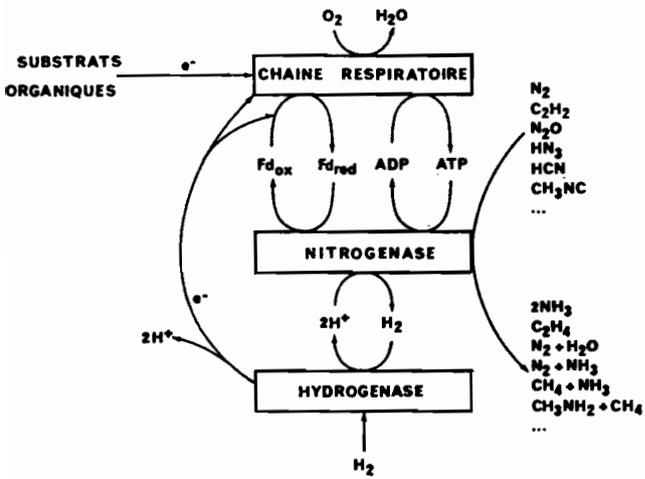
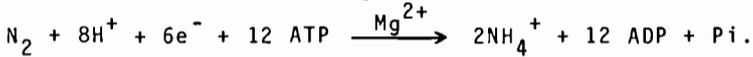


Fig. 6. Mécanisme des réactions catalysées par la nitrogénase par les fixateurs de N_2 aérobies. (Adams *et al.*, 1980).

l'Azoferredoxine). La réaction catalysée par la nitrogénase peut être schématisée de la façon suivante :

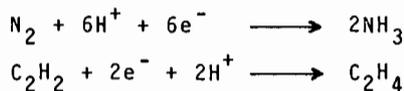


L'Azoferredoxine est le site d'activation des électrons; la Molybdoferredoxine celui de la liaison de l'azote. L'ATP et le magnésium se lient à l'Azoferredoxine pendant la réaction. Le transporteur final d'électrons est une ferredoxine ou la flavodoxine. Les électrons sont fournis par la dégradation phosphoroclastique du pyruvate qui fournit également l'ATP.

La nitrogénase a la particularité d'être très peu spécifique quant au substrat: elle peut transférer des électrons non seulement à N_2 mais aussi à N_2O , NH_3 , C_2H_2 , HCN , CH_3NC , H_3O^+ et leurs homologues (Fuchsman et Hardy, 1972). La nitrogénase peut également catalyser la réduction de protons en hydrogène. Ce dégagement d'hydrogène se traduit par une perte d'énergie pour le système s'il n'est pas recyclé par une hydrogénase (Schubert et Evans, 1976; Smith et al., 1976).

Relation entre les réactions de réduction de N_2 et de C_2H_2 .

La constante de Michaelis pour la réduction de l'acétylène est environ 10 fois plus faible que celle de la réduction de l'azote moléculaire (Hardy et al., 1973), ce qui explique la non interférence de l'azote de l'air lors de l'incubation sous acétylène (Schöllhorn et Burris, 1967). Les réactions de réduction de l'azote et de l'acétylène par la nitrogénase peuvent être schématisées de la façon suivante:



Le rapport molaire théorique C_2H_2 réduit/ N_2 fixé est donc de 3. Les facteurs de conversion déterminés expérimentalement sont fréquemment compris entre 2 et 4 qu'il s'agisse de cultures pures de microorganismes ou de systèmes complexes comme le sol ou les

systèmes "sol plante"; toutefois des valeurs plus élevées ont été mentionnées (Hardy et al., 1973). Les divergences observées peuvent être expliquées sur la base de différences fondamentales entre les réactions de réduction de l'azote et de l'acétylène:

- l'acétylène est environ 6 fois plus soluble que l'azote dans l'eau; ces gaz se différencient également pour leur aptitude à diffuser à travers les membranes cellulaires;
- l'ammoniac est métabolisé en d'autres composés dans les cellules, alors que l'éthylène, généralement, ne l'est pas;
- l'ammoniac réprime la synthèse de la nitrogénase; quand on utilise l'acétylène comme substrat, l'absence de synthèse de composés azotés peut donc se traduire par une dérégulation de la synthèse de la nitrogénase et un accroissement du facteur de conversion (Hardy et al., 1973);
- l'hydrogène provenant de la réduction des protons par la nitrogénase peut être recyclé par une hydrogénase dont l'activité est inhibée par l'acétylène (Schubert et Evans, 1976; Smith et al., 1976); Hill (1978) a montré que cette inhibition se traduit également par un accroissement du facteur de conversion.

La méthode de réduction de l'acétylène doit donc être calibrée dans les conditions expérimentales où l'on se trouve si l'on désire quantifier la fixation de N_2 . En l'absence de calibration, cette méthode ne constitue qu'une approximation de l'activité fixatrice.

Application à l'étude des systèmes fixateurs complexes.

Dès la découverte des possibilités qu'offrait l'utilisation de l'acétylène comme analogue de l'azote, la méthode de réduction de l'acétylène connut un essor considérable : au cours de l'année 1981,

cette méthode était déjà mentionnée dans plus de 100 publications (Hardy et al., 1973).

Cette expansion est due au coût modéré de l'équipement qu'elle nécessite, et à la très grande sensibilité de la méthode (environ 1000 fois supérieure à celle des analyses isotopiques).

Le principe de l'emploi de l'acétylène est simple: il suffit d'enfermer l'échantillon à étudier dans une enceinte étanche, d'introduire 10% d'acétylène et de mesurer la production d'éthylène par chromatographie en phase gazeuse. Nous verrons toutefois dans le cas du système "sol-riz" que l'interprétation des résultats obtenus par cette méthode peut poser des problèmes, et que nous avons dû élaborer des dispositifs d'incubation relativement complexes pour que le système se trouve placé dans des conditions aussi proches que possible des conditions naturelles.

2.1.2. Méthodes d'incubation utilisées au laboratoire

Pour étudier au laboratoire la fixation de N_2 dans la rhizosphère du riz, il convenait tout d'abord de concevoir des dispositifs simples permettant le développement d'un système racinaire suffisamment dense pour que les activités rhizosphériques soient mesurables, et donnant des résultats reproductibles.

Les premières analyses que nous avons effectuées, ont consisté à incuber des systèmes "sol-riz" de 3 semaines en flacon sérum en présence d'acétylène (Rinaudo et al., 1971). Les activités les plus fortes étant obtenues en l'absence d'oxygène, nous avons été tenté d'effectuer les incubations en anaérobiose stricte. Cette solution n'était évidemment pas satisfaisante. Il a été en effet bien établi que les fixateurs de N_2 aérobies sont beaucoup plus nombreux que les fixateurs anaérobies dans la rhizosphère du riz (Ishizawa et al., 1975; Balandreau et al., 1975; Trollidenier, 1977). Nous ne pouvons donc prétendre que les résultats obtenus au moyen de

cette technique d'incubation correspondaient à l'activité réelle, bien que l'intégrité de la plante ait été respectée.

Ces considérations nous ont amené à concevoir des dispositifs originaux dans lesquels les parties aériennes de la plante se trouvent dans l'air, et le sol rhizosphérique en anaérobiose. Le système se trouve ainsi dans des conditions très proches des conditions naturelles.

Dispositifs expérimentaux

a - Dispositifs nécessitant le transfert du système "sol-riz" (fig. 7). Le sol préalablement séché et tamisé, est introduit dans des tubes pyrex de 14 x 220mm sur une hauteur de 17cm (20 g de sol environ) et amené à saturation. Des graines de riz sont mises à prégermer pendant 3 jours dans une boîte de Pétri sur disque de papier filtre humide. On dispose au sommet de chaque colonne de sol une plantule de riz. Les tubes de verre sont entourés d'une gaine en plastique opaque sur toute la hauteur du sol afin d'éviter le développement ultérieur d'algues. On prépare également des témoins non ensemencés en riz. Les tubes sont alors disposés dans une chambre de culture sous des lampes à vapeur de mercure Mazda MAFD 400 (éclairage au niveau des plantules: 20000 lux environ; photopériode: 12 h d'illumination; température comprise entre 28°C et 32°C).

Les analyses sont généralement effectuées quand les plantules sont âgées de 3 semaines. L'incubation sous acétylène est effectuée dans un dispositif d'incubation (dispositif RT) permettant d'isoler sol rhizosphérique et parties aériennes de la plante dans des compartiments distincts (Raimbault et al., 1977).

Le transfert du système "sol-riz" dans le dispositif RT est obtenu en reliant la partie inférieure du tube de 14 x 220 mm à la partie supérieure du dispositif (diamètre 14mm) au moyen d'un joint de caoutchouc, et en créant une dépression de manière à le faire

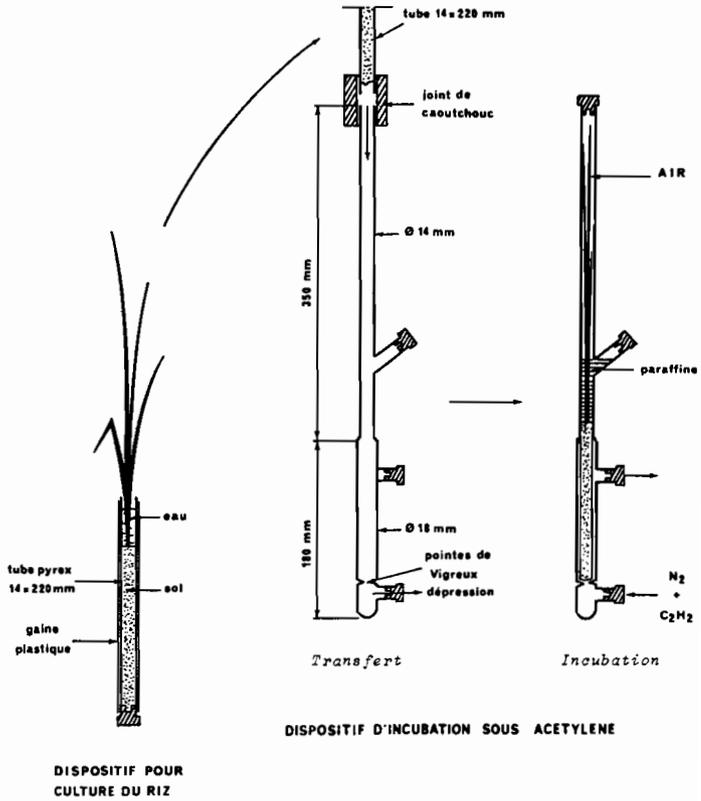


Fig. 7. Dispositifs expérimentaux nécessitant le transfert du système "sol-riz" pour la mesure de l'ARA rhizosphérique (dispositif RT).

coulisser jusqu'à ce qu'il repose sur les pointes de Vigreux . Le sol se trouve alors dans le compartiment inférieur du dispositif (diamètre 18mm) et on l'isole des parties aériennes de la plante par un bouchon de paraffine (mélange paraffine solide-huile de paraffine coulé en surfusion à 40°C). On chasse l'air du compartiment inférieur par un courant d'azote gazeux puis on y introduit 10% d'acétylène. L'incubation a lieu dans la chambre de culture. En période d'éclairage, un cache est placé sur le compartiment inférieur afin de maintenir le sol à l'obscurité.

b - Dispositif permettant les mesures d'ARA sans transfert du système "sol-riz" (fig. 8). Le dispositif RP utilisé comporte un tube de chlorure de polyvinyl opaque évasé dans sa partie supérieure pour faciliter le repiquage du riz (hauteur 250mm, diamètre intérieur: 31mm, diamètre extérieur: 40cm), et un tube intérieur constitué par un fin grillage en acier inoxydable (hauteur 210mm, diamètre 15mm, maille: 200 μ m) centré sur le bouchon qui obture la partie inférieure du dispositif. Le sol (environ 200 g) est disposé en couronne autour du tube intérieur. Trois graines de riz prégermées sont repiquées en surface. Durant toute la croissance des plantes, le puits central est occupé par un tube de verre de 14 mm de diamètre, qui est enlevé quand les plantules sont âgées de 3 semaines, pour la mesure de réduction d'acétylène: après obturation de la partie supérieure du dispositif par de la paraffine coulée en surfusion à la surface du sol on chasse l'air du puits central par un courant d'azote au moyen d'une longue aiguille introduite à sa partie inférieure, on ferme le puits central par un bouchon de caoutchouc dès que l'on retire l'aiguille, et on injecte 10% d'acétylène par pique à travers le bouchon (Rinaudo et al., 1978).

Les conditions d'incubation sont ainsi tout à fait comparables à celles du dispositif RT: les parties aériennes de la plante sont dans l'air, et le sol maintenu en anaérobiose. Les échanges gazeux entre le sol et le puits central, se font à travers le grillage

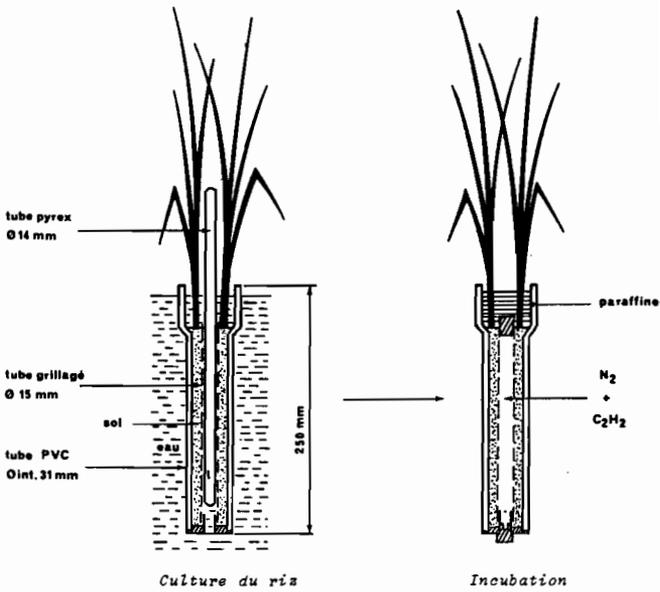


Fig. 8. Dispositif expérimental permettant la mesure de l'ARA rhizosphérique sans transfert du système "sol-riz" (dispositif RP).

métallique. Ce dispositif présente l'avantage de permettre la culture du riz sur sol drainé: il suffit pour cela de maintenir le niveau d'eau suffisamment bas pour que le sol ne soit humidifié que par capillarité. La teneur en eau du sol est alors comprise entre la capacité au champ et la saturation.

Cinétique de réduction de l'acétylène.

Contrairement aux cultures pures de microorganismes fixateurs de N_2 qui réduisent l'acétylène sans latence, on observe dans l'un et l'autre cas (dispositif RT: fig. 9 et 10; dispositif RP: fig. 11) une latence de 2 à 3 heures, suivie d'une phase linéaire de production d'éthylène.

Dans le cas du dispositif RT, on observe que la majeure partie de l'éthylène formé (environ 90%) diffuse à travers le sol dans le compartiment inférieur, que l'acétylène ait été introduit dans le compartiment inférieur (fig. 9 A) ou dans la partie supérieure du dispositif, au niveau des parties aériennes (fig. 9 B). Nous constatons d'autre part (fig. 10) que l'ARA rhizosphérique est plus forte de jour que de nuit et que l'activité du sol non rhizosphérique (non ensemencé en riz) est pratiquement nulle.

Explication de la latence initiale.

Les cinétiques de réduction de l'acétylène sont identiques dans les deux cas (dispositif RT: fig. 9; dispositif RP: fig. 11). La latence observée (2-3 h) est probablement due à l'obstacle constitué par le sol saturé en eau à la libre diffusion des gaz, notamment à la solubilisation de l'éthylène dans la solution du sol.

Dans le cas du dispositif RT, nous avons pu supprimer cette latence en saturant la solution du sol en éthylène (addition de 30 nmoles C_2H_4 dans le compartiment inférieur) préalablement à l'introduction de l'acétylène (fig. 12).

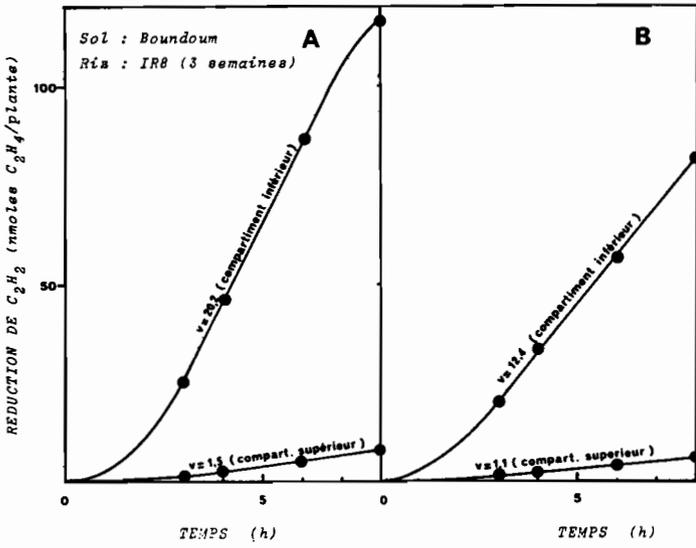


Fig. 9. Cinétique de réduction de l'acétylène :
Mesures avec le dispositif RT; introduction de
l'acétylène dans le compartiment inférieur (A),
ou dans le compartiment supérieur (B).
(v : nmoles C_2H_4 /plante/h).

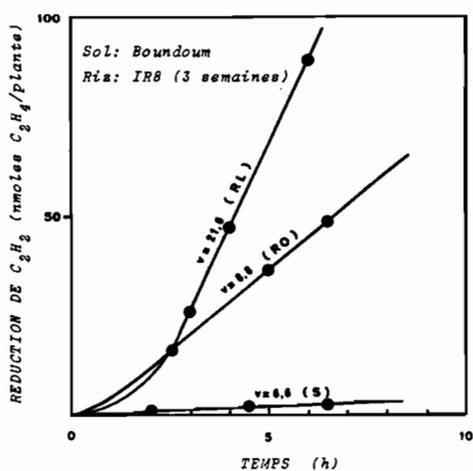


Fig. 10. Cinétique de réduction de l'acétylène à l'obscurité (Ro), au début de la période de lumière (RL) et dans le sol non rhizosphérique (S). Mesures avec le dispositif RT.

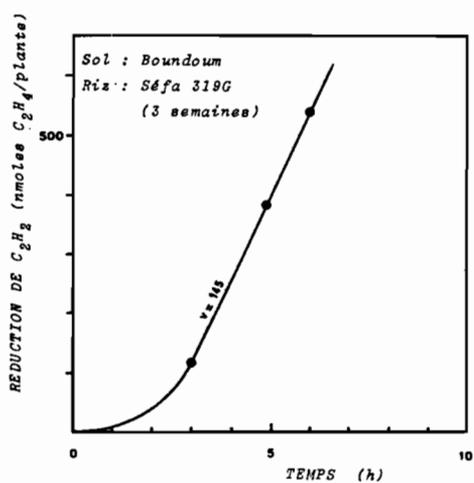


Fig. 11. Cinétique de réduction de l'acétylène.
Mesures avec le dispositif RP.

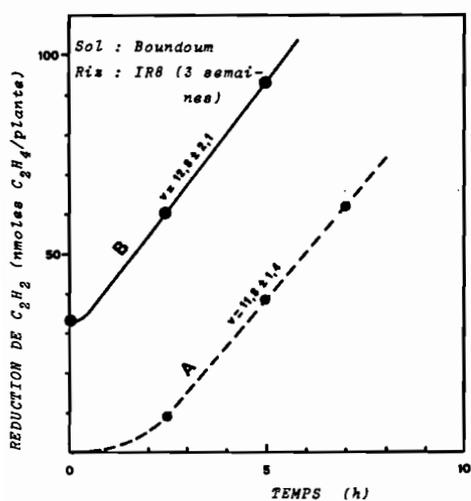


Fig. 12. Suppression de la latence initiale (courbe A) par introduction d'éthylène préalablement à l'incubation sous acétylène (courbe B). Mesures avec le dispositif RT.

Il en serait probablement de même avec le dispositif RP. Nous avons toutefois réalisé une autre expérience avec ce dispositif, consistant à remplacer le sol par un mélange comprenant 9/10 de sable + 1/10 de sol. On constate alors qu'il n'y a pratiquement plus de latence (fig. 13). L'explication de ce phénomène est simple : en raison de la forte proportion de sable dans le mélange utilisé, quand le dispositif est placé en condition d'incubation, la majeure partie de l'eau draine vers le fond du tube; il n'y a donc pratiquement plus d'obstacle à la libre diffusion des gaz entre le sol rhizosphérique et le puits central.

2.1.3. *Mesure in situ*

Les premiers essais d'estimation de la fixation de N_2 (C_2H_2) en sols de rizière ont été effectués à partir de racines excisées (Yoshida et Ancajas, 1971, 1973). Par la suite la plupart des analyses ont été effectuées au moyen de techniques du type de celle que Balandreau et Dommergues (1971) ont préconisée: les parties aériennes de la plante sont enfermées dans une enceinte transparente et mises en contact avec l'acétylène, la diffusion de ce gaz jusqu'aux racines se faisant par les canaux aëriifères de la plante (Lee et al., 1977; Boddey et al., 1978; Baldensperger, 1980).

Dispositif d'incubation

La technique que nous avons mise au point (Rinaudo et al., 1977) consiste à utiliser un sac en plastique transparent de 100 μ m d'épaisseur, étroit (16 cm de largeur), et dont la hauteur est fonction de la taille du riz (de 20 à 100 cm). Le sac est simplement maintenu en place par un bracelet de caoutchouc placé à sa partie inférieure, l'étanchéité du dispositif étant assurée par l'eau de submersion. Injections et prélèvements de gaz se font par piqûre à travers une rondelle de caoutchouc collée sur le sac (fig. 14).

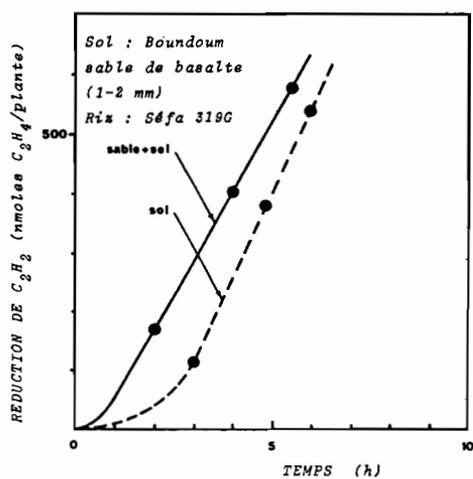


Fig. 13. Suppression de la latence initiale par le remplacement du sol par un mélange "sable + sol".
Mesures avec le dispositif RP.

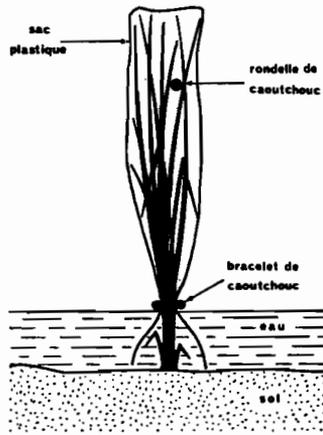


Fig. 14. Dispositif pour la mesure in situ de l'ARA dans la rhizosphère du riz.

La mise en place de ce dispositif est donc simple. De plus, les parties aériennes de la plante se trouvent enfermées dans un volume relativement faible (de 0,5 à 3 l suivant sa taille) ce qui améliore la sensibilité de la mesure, l'éthylène produit étant peu dilué. Enfin, les parties aériennes sont isolées du sol, ce qui ne permet que les échanges gazeux à travers la plante et prévient les interférences éventuelles avec les cyanophycées fixatrices de N_2 présentes à l'interface sol-eau. Dès que le sac est en place on introduit par injection à travers la rondelle de caoutchouc de l'acétylène (environ 10%) ainsi qu'un gaz traceur, le propane (de l'ordre de 0,5%). Un prélèvement effectué au temps zéro permet de déterminer la dilution de l'acétylène ainsi que le volume concerné par la diffusion des gaz.

Cinétique de réduction de l'acétylène.

On observe (fig. 15) une phase de latence de 4 à 5 h suivie d'une phase linéaire de production d'éthylène. Il n'est évidemment pas possible de supprimer la latence initiale comme nous l'avons fait avec les dispositifs d'incubation RT et RP. Celle-ci résulte en effet du temps nécessaire au transfert de l'acétylène des feuilles vers les racines puis au retour de l'éthylène produit dans l'atmosphère extérieure (cf. notamment Lee et Watanabe, 1977).

Limites de la technique de mesure in situ

La technique que nous avons mise au point, utilise la particularité du riz de permettre les échanges gazeux entre l'atmosphère extérieure et le sol. Les échanges gazeux étant contrôlés par les mouvements stomatiques de la plante, on peut craindre que la pression partielle en acétylène au niveau des sites fixateurs soit insuffisante et que l'ARA rhizosphérique ne s'exprime pas totalement. Pour vérifier cette hypothèse nous avons réalisé deux expériences simples :

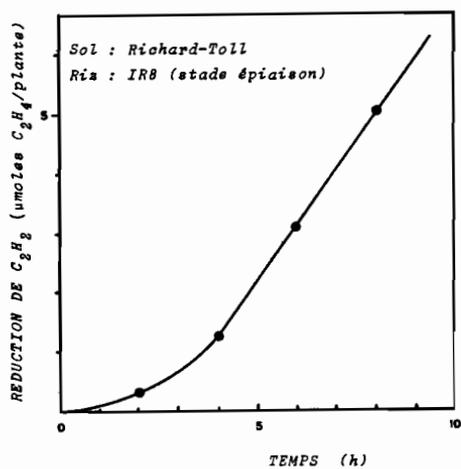


Fig. 15. Cinétique de réduction de l'acétylène.
Mesures in situ.

- 1 - in situ : introduction de 8 et 15% d'acétylène dans le sac d'incubation;
- 2 - sur dispositif de culture au laboratoire (fig. 7): introduction de 10, 20 et 30% d'acétylène au niveau des parties aériennes de la plante, celles-ci étant placées dans un tube retourné, rendu solidaire du tube de culture par un joint de caoutchouc.

Les résultats obtenus dans l'un et l'autre cas (fig. 16 A et 16 B), montrent clairement que l'ARA rhizosphérique croît avec l'augmentation de la concentration en acétylène dans l'atmosphère d'incubation, ce qui signifie qu'avec les concentrations en acétylène généralement utilisées (10%), l'ARA rhizosphérique est sous-estimée.

Par ailleurs, rien ne prouve que la totalité de l'éthylène produit, diffuse à travers la plante vers l'enceinte extérieure. Si l'on considère que la microflore fixatrice de N_2 peut être subdivisée en fixateurs endo-rhizosphériques et en fixateurs exo-rhizosphériques comme l'ont fait Boyle et Patriquin (1981) dans le cas de Spartina alterniflora, on ne peut exclure que l'éthylène produit par les fixateurs de N_2 extérieurs aux racines demeure dans le sol rhizosphérique, ou qu'il soit repris par les systèmes racinaires voisins (cf. Balandreau et al., 1975). Nous avons en effet constaté avec le dispositif RT (fig. 9) que la majeure partie de l'éthylène formé (environ 90%) diffuse à travers le sol dans le compartiment inférieur de ce dispositif, même dans le cas où l'acétylène est introduit au niveau des feuilles.

Les mesures effectuées in situ doivent donc être interprétées avec prudence.

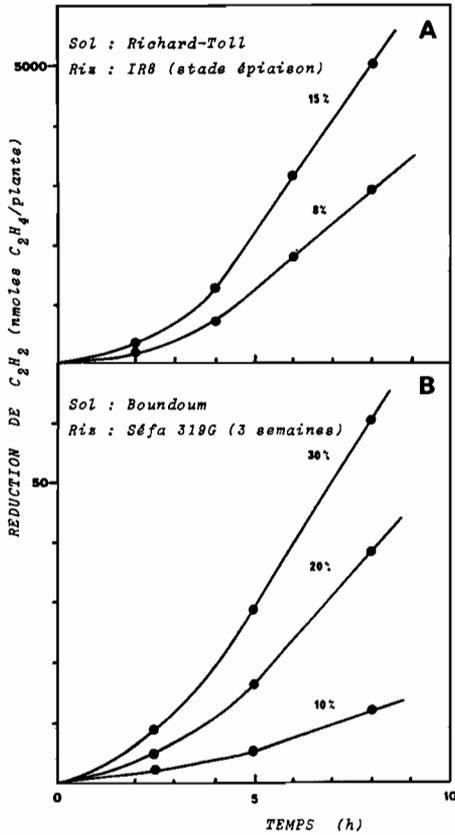


Fig. 16. Effet de la pression partielle d'acétylène sur la réduction d'éthylène dans la rhizosphère du riz.

A : mesures in situ

B : mesures sur dispositif de culture au laboratoire; conditions d'incubation comparables à celles de la mesure in situ.

2.1.4. Prélèvement des échantillons de gaz et analyses

a - Prélèvements. Dans le cas des études de laboratoire au moyen des dispositifs d'incubation RT ou RP, les prélèvements de gaz se font avec des seringues hypodermiques de 1ml au cours de la phase linéaire de production d'éthylène. L'acétylène est introduit 2 heures après le début de la période d'éclairement et les prélèvements sont effectués après 4 et 6 heures d'incubation.

Pour les mesures in situ, les prélèvements de gaz se font au moyen d'aiguilles doubles vacutainer (BD Mérieux) introduites d'une part dans le sac d'incubation, d'autre part dans un tube vacutainer de 7ml dans lequel on a fait le vide au préalable. On conserve ainsi les échantillons de gaz jusqu'au retour au laboratoire. Les prélèvements ont lieu au temps zéro (afin de déterminer le volume exact dans lequel diffusent les gaz) puis au cours de la phase linéaire de production d'éthylène (après 5 et 7 h d'incubation sous acétylène).

b - Analyses. Les analyses d'éthylène se font par chromatographie en phase gazeuse. Nous utilisons un chromatographe Varian Aérograph modèle 1400, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et muni d'une colonne en acier inoxydable de 150 x 0,3 cm remplie de 10% Na_3PO_4 sur Sphérosil XOB 075, 80-100 mesh (Péchiney Saint-Gobain).

Les gaz apparaissent au niveau du détecteur dans l'ordre suivant : méthane, éthylène, propane et acétylène. Les débits et températures sont ajustés de manière à obtenir une séparation correcte des constituants du mélange gazeux injecté, avec un temps de rétention minimal :

<u>températures</u>	: injecteur	: température ambiante
	four-colonne	: 50°C ou 70°C
	détecteur	: 150°C
<u>débits</u>	: azote	: 40 ml/mn
	hydrogène	: 30 ml/mn
	air	: 360 ml/mn

Quand le mélange gazeux ne comporte pas de propane, la température du four-colonne est régulée à 70°C. Les temps de rétention sont alors les suivants : méthane, 25 sec; éthylène, 35 sec; acétylène, 50 sec.

Si l'on introduit du propane dans l'atmosphère d'incubation, la température du four-colonne est amenée à 50°C. On obtient les temps de rétention suivants: méthane, 30sec, éthylène, 40 sec; propane, 50 sec; acétylène, 65 sec.

2.1.5. Calculs.

La transformation des hauteurs de pics d'éthylène en nmoles C_2H_4 se fait par référence à un étalon. Une dilution étalon d'éthylène est préparée par introduction de 0,57 ml d'éthylène dans un flacon sérum de 570 ml (dilution 10^{-3}). La concentration de cette dilution étalon est de $\frac{10^6}{22400}$ nmoles C_2H_4 /ml. L'injection au chromatographe de 0,5 ml de cette dilution donne un pic de hauteur $h \times A$ cm (A = facteur d'atténuation).

Supposons que l'injection de 0,5ml d'un mélange gazeux de volume V ml renfermant X nmoles C_2H_4 donne un pic de 1 cm. Les hauteurs des pics étant proportionnelles aux quantités injectées, on peut écrire :

$$\frac{X}{V} : \frac{10^6}{22400} = \frac{1}{h \times A} \quad \text{soit} \quad X = \frac{44.64}{A} \times \frac{V}{h}$$

Dans le cas présent, le facteur d'atténuation A est de 128.

L'égalité précédente devient :

$$X = 0,35 \frac{V}{h}$$

expression dans laquelle V est le volume gazeux (en ml) et h la hauteur du pic étalon C_2H_4 (en cm) avec l'atténuation 128.

La conversion des pics d'éthylène en nmoles C_2H_4 , s'obtient donc simplement en multipliant leur hauteur(en cm)par cette valeur X .

Remarque : l'utilisation d'un traceur (le propane) a été préconisée par Balandreau et Dommergues (1971) pour les mesures de réduction d'acétylène in situ. On se trouve en effet dans ce cas en présence d'un système ouvert pour lequel il convient de déterminer le volume intéressé par la diffusion des gaz. L'introduction dans ce système d'une quantité connue de propane, permet d'une part de calculer par référence avec un étalon, le volume exact dans lequel diffusent les gaz, d'autre part de corriger les pics d'éthylène mesurés au cours de l'incubation.

2.2. Sols et matériel végétal

Les sols utilisés proviennent pour la plupart de rizières du Sénégal. Les principales propriétés physicochimiques de ces sols sont présentées en annexe.

Les criblages de cultivars de riz ont été effectués sur des variétés tropicales qui nous ont été fournies par M. Magne (Station Rizicole de Djibélor, ISRA, Casamance), et des mutants des variétés Césariot et Cigalon, sélectionnés par M. Marie Station d'Amélioration des Plantes, INRA, Montpellier).

2.3. Dosage de l'azote ammoniacal

La teneur du sol en azote ammoniacal est déterminée suivant la technique colorimétrique proposée par Jackson (1964): extraction par une solution de chlorure de sodium 10N acidifiée à pH 2,5 et colorimétrie avec le réactif de Nessler.

2.4. Inoculations bactériennes

Ces inoculations ont été effectuées pour les études d'interactions entre les fixateurs de N_2 et d'autres microorganismes rhizos-

phériques (bactéries pectinolytiques et actinomycètes).

Les microorganismes sont introduits dans les tubes de culture de 14 x 220mm sous forme d'inoculum sur tourbe, à raison de $5 \cdot 10^9$ bactéries par tube (soit environ $2 \cdot 10^8$ /g sol). Les microorganismes sont cultivés sur milieu complet, centrifugés puis resuspendus avec du tampon phosphate 0,02 M, pH 7. La suspension obtenue est mélangée intimement à de la tourbe stérile ($5 \cdot 10^9$ bactéries/g tourbe) avant d'être incorporée au sol (1 g de tourbe/tube).

2.5. Nématodes parasites du riz.

L'effet des nématodes sur l'ARA dans la rhizosphère du riz a été étudié en collaboration avec G. Germani (laboratoire de Nématologie, ORSTOM, Dakar). Les nématodes utilisés appartiennent au genre Hirschmanniella (H. spinicaudata et H. orizae), très fréquent en Afrique de l'Ouest. Le riz est cultivé en tube de culture de 14x220mm. L'essai comporte 3 traitements :
sol infesté avec 500 H. spinicaudata ou H. orizae, témoin sans nématodes.

3. RESULTATS

3.1. Influence du génotype du riz

Divers travaux ont montré que l'aptitude d'un végétal à être colonisé par des bactéries fixatrices de N_2 , pouvait dépendre de la variété choisie. Ces travaux concernent notamment le blé (Neal et al., 1970, 1973, 1976), le maïs (Von Bülow et Döbereiner, 1975), la canne à sucre (Ruschel et al., 1975), des graminées fourragères telles que Paspalum notatum et Pennisetum purpureum (Döbereiner et al., 1972, 1975). Les comparaisons entre variétés ou entre mutants de riz que nous avons effectuées ont eu pour but d'estimer le rôle du végétal dans l'association "riz-fixateurs de N_2 ".

3.1.1. *Comparaison de diverses variétés de riz*

Nous avons cultivé 28 variétés tropicales sur un même sol non stérile (Djibélor, Basse Casamance) et mesuré les ARA rhizosphériques à 3 semaines. L'analyse des résultats obtenus (tableau 16) montre que l'ARA rhizosphérique varie de 1 à 5 suivant la variété utilisée et qu'il n'y a pas de corrélation entre l'ARA rhizosphérique et le poids sec des plantes. Il est à noter d'autre part que les variétés DJ 684 D et DJ 346 D permettent des activités plus fortes que les variétés parentales dont elles sont issues (Taichung Native 1 et Ebandioulaye), et que les variétés Séfa 319 G et Séfa 302 G, qui proviennent toutes deux de croisements entre les variétés Tun-Sart et Taichung Native 1, se différencient nettement l'une de l'autre (Rinaudo, 1977). L'efficacité de l'association "riz-fixateurs de N_2 " semble donc conditionnée par des caractères génétiques de la plante hôte. Certaines variétés semblent plus aptes que d'autres à s'associer à la microflore fixatrice de N_2 native.

Tableau 16. ARA rhizosphérique de 28 variétés de riz tropicales cultivées sur sol de Ojibélor (plantes de 3 semaines)

Variété	ARA (nmoles C ₂ H ₄ /h)		Poids sec des plantes (mg)
	Par plante	Par g racines sèches	
Séfa 319 G ^{*x}	13,2 ± 2,7	281 ± 60	112 ± 14
MI 48 *	12,4 ± 3,1	302 ± 68	101 ± 9
80 2	12,3 ± 3,2	173 ± 48	158 ± 16
OS6 *	11,7 ± 1,6	267 ± 32	98 ± 10
IRAT 10 *	11,2 ± 3,2	203 ± 55	114 ± 11
DJ 684 D	11,2 ± 1,9	224 ± 34	114 ± 16
DJ 346 D	10,9 ± 2,0	179 ± 28	127 ± 8
IRAT 13 *	10,5 ± 2,6	284 ± 61	79 ± 10
Thin Thoiu Nay	10,0 ± 2,8	198 ± 64	105 ± 20
IR 1529-680-3	8,7 ± 3,7	223 ± 85	89 ± 4
CG 75	8,6 ± 3,1	178 ± 67	113 ± 8
CG 160	8,5 ± 2,5	224 ± 57	79 ± 5
IR 442	8,2 ± 2,2	264 ± 45	71 ± 4
Pokkali	7,4 ± 2,6	112 ± 32	147 ± 14
Taichung Native 1	7,2 ± 1,9	157 ± 28	108 ± 15
Séfa 302 G *	7,1 ± 1,9	148 ± 23	99 ± 11
IR 20	7,0 ± 2,1	152 ± 43	114 ± 10
I Kong Pao	7,0 ± 2,0	250 ± 61	68 ± 15
Vijaya	6,4 ± 3,2	215 ± 96	85 ± 10
Faro 8	6,3 ± 4,3	130 ± 85	119 ± 13
CG 131	5,9 ± 2,6	169 ± 53	97 ± 5
Hong Sun	5,9 ± 1,0	72 ± 13	147 ± 16
IR 5	5,9 ± 1,5	100 ± 20	119 ± 15
Ebandioulaye	5,7 ± 2,0	168 ± 74	102 ± 6
IR 8	5,6 ± 2,1	126 ± 36	102 ± 8
Ratna	4,6 ± 1,9	81 ± 32	113 ± 15
IR 630-27	3,5 ± 0,7	61 ± 12	119 ± 25
A pura	2,5 ± 0,5	81 ± 24	96 ± 6

* Variétés pluviales.

3.1.2. Comparaison de mutants de riz

Nous avons mesuré l'ARA dans la rhizosphère de 46 mutants de plantules de riz âgées de trois semaines, cultivées dans un sol de Camargue (mas Adrien) non stérile. Ces mutants des variétés de riz Cesariot et Cigalon, n'avaient pas été retenus en fonction de leur aptitude à la fixation de N_2 , mais pour leur intérêt botanique (mutants visibles, morphologiques) comme sous produits d'expériences ^{de} mutagénèse. Les résultats obtenus (tableaux 17 et 18) montrent que les ARA varient de 1 à 10 suivant le mutant de riz. Cette expérience, en conformité avec l'expérience antérieure, montre que l'efficacité de l'association "riz-bactéries fixatrices de N_2 " est bien contrôlée par des caractères génétiques de la plante-hôte.

3.1.3. Influence du choix des partenaires du système "sol-riz".

Au vu des résultats de ce criblage nous pourrions être tenté de classer les cultivars de riz en fonction de leur aptitude à la fixation de N_2 rhizosphérique.

Afin de contrôler le bien fondé d'une telle démarche, nous avons réalisé une expérience consistant à tester sur deux sols (le sol du Mas Adrien et le sol gris de Casamance), le cultivar Cigalon, ainsi que les mutants qui avaient donné les résultats extrêmes dans notre classement sur sol du Mas Adrien (Cigalon microaristé, Cimejap haute tige). Les résultats obtenus (tableau 19) montrent que le classement des variétés de riz n'est valable que pour un sol déterminé: sur sol du Mas Adrien, l'ARA rhizosphérique est médiocre avec le mutant Cigalon microaristé mais exceptionnellement forte avec le mutant Ciméjap haute tige; sur sol gris, par contre, il n'y a plus de différences significatives entre ces deux mutants et le cultivar Cigalon. Il y a donc lieu de faire preuve de la plus grande prudence

Tableau 17. ARA rhizosphérique de 18 mutants de la variété de riz Césariot cultivés sur sol de Camargue (plantes de 3 semaines).

Mutants *	ARA (nmoles C_2H_4/h)	
	Par plante	Par g racines sèches
Rampant 2	233 ± 168	5320 ± 3010
Criblé à glumelles bicolores	208 ± 117	4890 ± 2770
Grain très long non perlé	159 ± 101	3310 ± 2190
Grain long α_x	139 ± 129	2870 ± 2730
Rampant 1	137 ± 85	2890 ± 1670
Raïde I	109 ± 108	1560 ± 1250
Tardif à grain long très perlé	104 ± 78	2010 ± 1370
Petit pois	97 ± 95	2020 ± 1800
Raïde tardif à grain fin	88 ± 75	1820 ± 1600
Criblé	84 ± 46	1550 ± 860
Témoin 2	71 ± 33	2120 ± 1470
Témoin 1	59 ± 53	1480 ± 1100
Grain très long perlé	57 ± 37	950 ± 380
Raïde II	54 ± 23	1170 ± 470
Glumelles chamois	53 ± 12	1270 ± 580
Glumelles bicolores	40 ± 12	630 ± 190
Rachis noir	35 ± 20	860 ± 470
Piment	22 ± 18	690 ± 580
Glumelles chocolat	22 ± 14	500 ± 300
Court à grain grossi	2 ± 1	80 ± 40

* La dénomination des mutants est de M. Marie.

Tableau 18. ARA rhizosphérique de 28 mutants de la variété de riz Cigalon cultivés sur sol de Camargue (plantes de 3 semaines)

Mutants *	ARA (nmoles C ₂ H ₄ /h)	
	Par plante	Par g racines sèches
Cimejap haute tige	370 ± 80	7370 ± 1970
Cimejap à grain allongé	319 ± 80	7310 ± 2140
Cimejap glabre à grain allongé	281 ± 82	7570 ± 2760
Cigalons β	239 ± 100	6900 ± 1850
Cigatrans à grain allongé	235 ± 77	4660 ± 1990
Cigalon maculé noir II	224 ± 53	4470 ± 2350
Cigalon gros grain microaristé	219 ± 113	840 ± 2200
Cigalon α	219 ± 82	5900 ± 2010
Cigatrans 5	204 ± 147	6180 ± 3580
Cigatrans 2	199 ± 50	3880 ± 1770
Cigatrans glumelles semi panachées	196 ± 67	4900 ± 2250
Cigalon gros grain peu perlé	186 ± 100	6170 ± 2950
Cigalon témoin ²	183 ± 70	4450 ± 1210
Cigatrans court vitreux	161 ± 85	4800 ± 2900
Cigalon glumelles brunes	160 ± 62	3980 ± 1910
Cigalon apicatrophie	149 ± 104	4050 ± 2960
Cigalon court dressé	142 ± 51	4150 ± 1890
Cigalon à grain allongé	126 ± 43	3330 ± 1430
Cigalon maculé noir I	120 ± 51	1990 ± 750
Cigalon témoin 1	116 ± 92	3660 ± 3150
Cigalon petit grain sans perle	113 ± 56	4570 ± 2940
Cigalon compact II	101 ± 77	3370 ± 2210
Cigalon glumelles panachées	100 ± 32	2380 ± 670
Cigalon graines fauves II	93 ± 25	2550 ± 960
Cigalon compact I	84 ± 43	2010 ± 1270
Cigalon court sans perle	69 ± 33	1800 ± 790
Cigalon court grain allongé subaristé	61 ± 30	1430 ± 550
Cigalon court engageant	48 ± 23	1410 ± 690
Cigalon très tardif	44 ± 33	1290 ± 890
Cigalon microaristé	28 ± 11	860 ± 460

* La dénomination des mutants est de M. Marie

Tableau 19. ARA dans la rhizosphère du riz cv. Cigalon et de deux mutants de cette variété de riz cultivés sur sol du Mas Adrien (Camargue) et sur sol gris (Sénégal) (plantes de 3 semaines)

Sol	Riz	ARA (nmoles C ₂ H ₄ /h)	
		Par plante	Par g racines sèches
Mas Adrien (Camargue)	cv. Cigalon	151 ± 54	4079 ± 1383
	Mutant Cigalon microaristé	28 ± 11	861 ± 456
	Mutant Cimejap haute tige	370 ± 80	7368 ± 1971
Sol gris (Sénégal)	cv. Cigalon	84 ± 20	2589 ± 466
	Mutant Cigalon microaristé	79 ± 27	3682 ± 1254
	Mutant Cigalon haute tige	82 ± 17	2330 ± 595

dans l'interprétation des résultats des criblages de cultivars de riz que l'on pourrait envisager d'effectuer. Ces criblages devraient en effet tenir compte de la composition de la microflore fixatrice de N_2 et, vraisemblablement de certains autres éléments de la microflore du sol.

3.2. Action de la coupe des parties aériennes de la plante

Cette expérience a été effectuée avec trois sols de rizière de Côte d'Ivoire (Dabou, Abengourou et Yamoussokro), sur des plantes âgées de 14 et 21 jours.

L'effet de la coupe est très spectaculaire: au cours des 48 heures qui suivent on observe une très forte diminution (environ 80%) de l'ARA rhizosphérique (fig. 17).

On sait que la microflore rhizosphérique s'alimente dans une large mesure à partir des exsudats et des produits de décomposition des racines (Rovira 1969, Martin, 1977). On sait d'autre part que des variations de l'intensité d'éclairement des plantes induisent des modifications de la composition quantitative et qualitative des micropopulations rhizosphériques et de leurs activités (Rovira, 1959, Rouatt et Katznelson, 1960; Balandreau et al., 1971). La brutale diminution de l'ARA rhizosphérique après l'élimination des organes photosynthétiques de la plante, montre que pour de jeunes plants de riz, la fixation de N_2 dépend pour l'essentiel de composés organiques exsudés très rapidement après translocation.

3.3. Variations de l'ARA rhizosphérique au cours d'un cycle végétatif complet du riz.

Cette étude a eu lieu de janvier à août 1975 sur une parcelle irriguée de la région de Richard-Tollensemencée en riz IR8. Des températures relativement fraîches jusqu'au mois de mars ont retardé la levée du riz, ce qui explique la durée inhabituelle du cycle (180 j)

Les analyses ont été effectuées à intervalles de trois

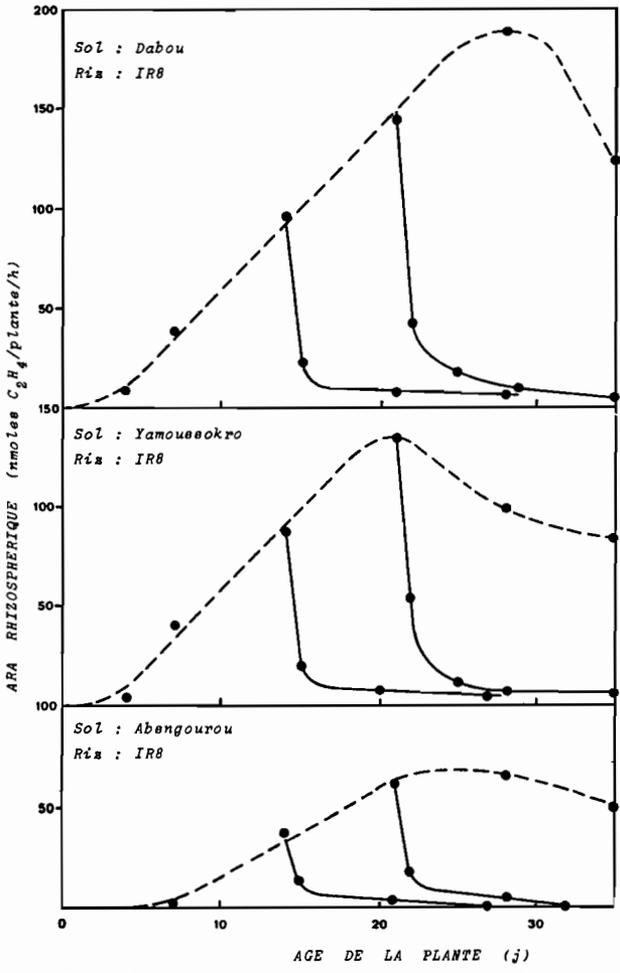


Fig. 17. Influence de la coupe des parties aériennes sur l'ARA rhizosphérique (----: plante entière; —: plante coupée).

semaines au moyen du dispositif de mesure in situ (§ 2.1.3.): début de l'incubation vers 11 h, les prélèvements de gaz étant effectués aux temps 0, 5 et 7 h.

Les résultats obtenus (fig. 18) montrent que les activités les plus fortes s'observent au cours de la seconde moitié du cycle: au moment de la floraison, l'ARA passe brutalement de 300 à 1600 nmoles C_2H_4 /plante/h. Si l'on se réfère aux différentes étapes de décomposition des racines décrites par Martin (1977), ces fortes activités correspondent au stade ultime de dégénérescence du système racinaire qui se traduit par la mort des racines et la décomposition de l'endoderme. Elles impliquent l'intervention de microorganismes capables de dégrader les résidus racinaires riches en glucides de haut poids moléculaire en composés plus simples qui seront assimilés par les fixateurs de N_2 .

3.4. Influence du type de sol

La fixation de N_2 dans la rhizosphère du riz est susceptible de varier dans de grandes proportions suivant le sol utilisé. A titre d'exemple nous avons reporté au tableau 20, les ARA mesurées dans la rhizosphère de plants de riz cv. Séfa 319 G de 3 semaines cultivés sur différents sols non stériles. On observe que l'ARA sur sol gris de Casamance (Dianaba) est 2 à 3 fois supérieure aux ARA mesurées sur deux sols argileux des Philippines (Maahas clay et Maligaya clay), bien que ces derniers, plus riches, permettent un meilleur développement du riz. La différence est encore plus marquée si l'on considère les résultats de l'expérience 2: les ARA rhizosphériques sur sol de Boundoum et sur sol du Mas Adrien (Camargue) sont dans le rapport 1/20 environ.

Des variations d'une telle amplitude mettent en évidence le rôle essentiel du sol dans l'association "plante-bactéries fixatrices", bien qu'on ne puisse dire quels sont les facteurs qui en sont responsables.

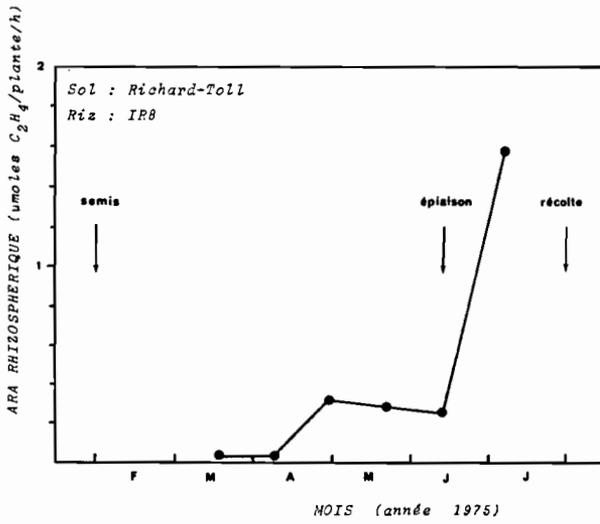


Fig. 18. Mesure in situ de l'ARA rhizosphérique au cours d'un cycle de riz inondé.

Tableau 20. ARA rhizosphérique de plants de riz cv. Séfa 319 G de 3 semaines cultivés sur différents sols.

Sol	ARA (nmoles C ₂ H ₄ /h)		Poids sec (mg/plante)	
	Par plante	Par g racines sèches	Parties aériennes	Racines
<u>Expérience 1*</u> (Rinaudo et al., 1978)				
Maahas clay (Philippines)	61 ± 19	352 ± 88	364 ± 16	174 ± 33
Maligaya clay (Philippines)	126 ± 26	484 ± 135	535 ± 26	266 ± 21
Sols gris (Sénégal)	201 ± 48	1357 ± 344	169 ± 20	149 ± 13
<u>Expérience 2**</u>				
Boundoum (Sénégal)	8 ± 2	168 ± 48	66 ± 6	49 ± 6
Mas Adrien (Camargue)	174 ± 99	5420 ± 3630	84 ± 5	34 ± 3

* Mesure avec le dispositif RP

** Mesure avec le dispositif RT

Nous avons reporté au tableau 21 les résultats d'une étude réalisée à partir de 21 sols de rizière du Sénégal, destinée à rechercher les corrélations pouvant exister entre l'ARA rhizosphérique et les principales caractéristiques physico-chimiques de ces sols. L'analyse de ces résultats montre qu'il n'existe aucune relation significative entre l'ARA rhizosphérique et les différents paramètres physico-chimiques analysés.

Il est intéressant de noter qu'au cours de cette étude, d'autres activités microbiennes ont pu être corrélées avec certains paramètres physico-chimiques des sols. Ainsi le nombre de cyanobactéries fixatrices de N_2 est étroitement liée au pH; le potentiel dénitrifiant est en étroite corrélation avec le taux de carbone; la densité et l'activité des bactéries méthanigènes sont d'autant plus importantes que le pH est élevé et que la teneur en chlorures et le Eh sont faibles (Garcia et al., 1974). La raison en est vraisemblablement que ces paramètres sont le fait de microflore relativement spécialisées, ayant des exigences assez bien définies. La fixation rhizosphérique de N_2 , par contre, est le fait d'une microflore extrêmement complexe (cf. Chapitre I) donc susceptible de s'adapter aux conditions de milieu les plus variées.

La variabilité de l'ARA rhizosphérique en fonction du type de sol ne paraissant pas, en première analyse, due à l'intervention de facteurs physico-chimiques, reste donc l'effet de facteurs biologiques. Nous donnerons au cours de ce chapitre quelques exemples d'interactions entre la microflore fixatrice de N_2 et d'autres organismes rhizosphériques.

3.5. Effet de l'azote ammoniacal

La répression de la synthèse de la nitrogénase par l'ion NH_4^+ est bien établie pour tous les types de microorganismes (à

Tableau 21. Fixation rhizosphérique de N₂ [C₂H₂] et caractéristiques physico-chimiques de 21 sols de rizière du Sénégal (riz cv. IR8, plantes de 3 semaines)

Sol	ARA(nmoles C ₂ H ₄ /g sol/h)	Texture	C %	N %	C/N	S-SO ₄ ⁻⁻ (ppm)	N-NO ₃ ⁻ (ppm)	Cl ⁻ (meq/100g)	pH**	Eh** (mV)
Boundoum	21,4	A	13,49	0,58	23,2	204	0	0,96	6,5	- 85
Djibélor	18,6	L	23,29	1,48	15,7	53	0	4,13	6,2	- 135
Oussouye	15,2	LS	15,00	1,12	13,3	83	3,2	0	6,7	- 145
Roos-Béthio	13,5	A	13,34	0,76	17,5	162	0,5	1,24	6,1	- 80
Kaolack	11,5	LF	7,14	0,63	11,3	144	9,8	1,82	6,5	- 150
Silink	10,2	LS	9,23	0,49	18,8	95	1,2	0	6,5	- 170
Djibélor	10,2	LAS	32,96	2,49	13,2	208	6,6	0	6,1	- 155
Keur Oiallo	10,1	LA	6,59	0,38	17,3	72	0	0	6,7	- 115
Boukilling	8,8	A	22,86	1,48	15,4	74	0	0,96	5,8	+ 30
Tanaff	8,1	LA	24,57	1,42	17,3	67	0	0	6,3	- 120
Ntigar	7,3	LA	6,98	0,59	11,8	86	0	0,62	6,4	- 80
Goudomp	6,2	LS	8,93	0,63	14,1	84	5,7	0,80	6,4	- 155
Djibélor	6,0	LAS	11,80	0,81	14,5	244	0,6	0	6,1	- 15
Kamobeul	4,9	LS	7,51	0,63	11,9	70	2,4	0	6,2	- 75
Loudia	4,7	SL	20,79	1,34	15,5	69	3,0	0	6,3	- 55
Bignona	3,0	A	27,50	1,93	14,2	286	0	3,73	5,0	+ 115
Sambato	2,2	LS	20,83	1,71	17,3	77	0	0	6,5	- 160
Niaguissé	1,6	LA	15,39	1,01	15,2	402	0	1,58	6,4	- 175
Diango	1,3	LA	18,17	1,29	14,0	94	4,0	1,16	6,3	- 120
Boutlat	0,4	SL	3,77	0,38	9,9	89	0	0	5,9	+ 230
Thiaroye	0,2	LAS	18,45	1,34	13,7	995	41,8	5,37	5,9	- 160

* Texture : A : argile; LA: limon argileux; LAS: limon argilo-sableux; LF: limon fin; LS: limon sableux; SL: sable limoneux.

** pH et Eh ont été mesurés sur des sols maintenus 3 semaines en condition de submersion.

l'exception de certains mutants dérèprimés).

Afin de contrôler l'effet de l'azote ammoniacal sur la fixation rhizosphérique de N_2 , nous avons conduit une expérience avec un sol de Djibélor (Casamance) dont la teneur initiale en azote ammoniacal était relativement élevée (83 ppm) et auquel nous avons ajouté différentes quantités de sulfate d'ammoniaque (de 0 à 150 ppm $N-NH_4$). Le sol, introduit en tubes de 14 x 220 mm, a été ensemencé en riz cv. IR8. Nous avons déterminé l'ARA rhizosphérique à 3 semaines et suivi les variations de la teneur du sol en azote ammoniacal au cours de la croissance de la plante.

L'ARA rhizosphérique à 3 semaines est optimale pour un apport initial de 40 ppm $N-NH_4$ (fig. 19). La teneur du sol en azote ammoniacal est alors nulle quelle que soit la quantité de sulfate d'ammoniaque apportée (fig. 20), en raison de la nutrition azotée de la plante; il ne devrait donc pas y avoir de diminution de l'ARA rhizosphérique puisque la synthèse de la nitrogénase n'est plus réprimée. Le fait que l'ARA rhizosphérique augmente avec un apport initial compris entre 0 et 40 ppm $N-NH_4$, et diminue quand cet apport est supérieur à 40 ppm $N-NH_4$, résulte probablement de la conjonction de deux phénomènes qui ont un effet inverse sur l'activité nitrogénasique: (1) l'azote combiné absorbé par la plante provoque une exsudation plus massive de substrats énergétiques; (2) la présence d'azote combiné dans le sol entraîne un déséquilibre de la microflore rhizosphérique au détriment des fixateurs de N_2 .

Lorsque le niveau d'azote combiné est redevenu compatible avec la synthèse de la nitrogénase, la fixation de N_2 peut avoir lieu. La répression de la synthèse de la nitrogénase par l'ion NH_4^+ au niveau de la rhizosphère du riz est donc temporaire. Trolldenier (1977) obtint des résultats analogues aux nôtres avec un apport de 140 kg N - urée par hectare (inhibition temporaire de l'ARA rhizos-

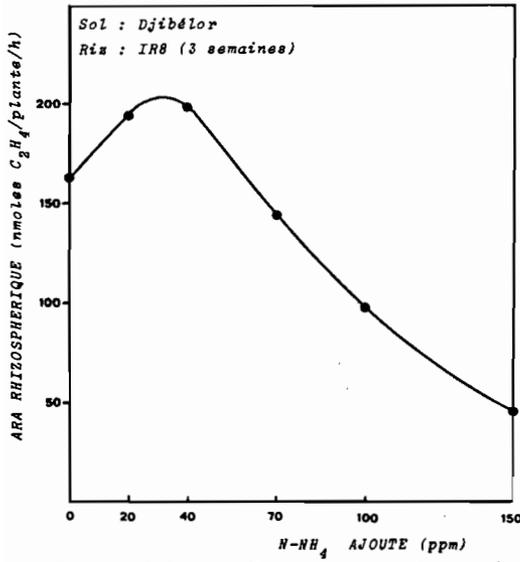


Fig. 19. Influence d'un apport d'azote ammoniacal sur l'ARA rhizosphérique.

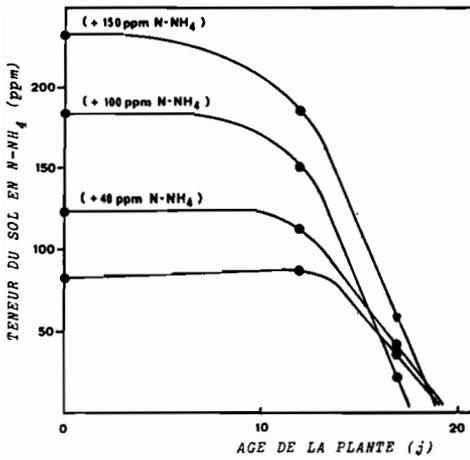


Fig. 20. Variations de la teneur du sol en azote ammoniacal au cours du développement du riz.

phérique puis activité supérieure à celle des témoins n'ayant pas reçu d'engrais). Pour une association plante-bactérie, l'effet de l'azote combiné sur la fixation de N_2 peut donc être bénéfique.

3.6. Effet de l'engorgement

La rhizosphère du riz peut être considérée comme une interface aérobie-anaérobie entre la surface des racines qui diffuse de l'air et le sol réducteur, et l'on sait que dans les milieux naturels, une telle interface est fréquemment le siège de fortes activités fixatrices de N_2 (Rice et al., 1967 ; Magdoff et Bouldin, 1970).

Afin de préciser l'effet de l'engorgement sur la fixation rhizosphérique de N_2 , nous avons cultivé pendant 3 semaines du riz cv. Séfa 319 G sur un sol de Boundoum (Région du Fleuve) au moyen du dispositif RP (cf. fig. 8) conçu précisément pour mesurer l'ARA rhizosphérique sur sol engorgé ou exondé.

Les résultats obtenus (tableau 22) montrent que l'engorgement du sol stimule considérablement la fixation de N_2 : l'ARA rhizosphérique (exprimée en nmoles C_2H_4 /plante) est en effet 5 fois plus forte sur sol engorgé que sur sol exondé. On constate également que l'engorgement favorise le développement du riz; le système racinaire est deux fois plus dense qu'en sol exondé. Ce dernier point est du reste bien connu des riziculteurs qui savent que les rendements en grains sont environ deux fois supérieurs en culture inondée qu'en culture pluviale.

La stimulation de la fixation de N_2 s'expliquerait donc par "l'effet interface aérobie-anaérobie" (l'activité spécifique exprimée en nmoles C_2H_4 /g racines sèches, est environ 2 fois plus forte en sol inondé qu'en sol exondé), mais probablement aussi par une exsudation plus intense de substrats énergétiques due à une croissance plus vigoureuse du riz.

Tableau 22. Influence du régime hydrique sur l'ARA rhizosphérique et le développement végétatif du riz cv. Séfa 319 G cultivé pendant 3 semaines sur sol de Boundoum (Région du Fleuve Sénégal).

Culture	ARA (nmoles C_2H_4/h)		Poids secs (mg/plante)	
	Par plante	Par g racines sèches	Parties aériennes	Racines
Sol exondé	35 ± 7	460 ± 75	234	77
Sol engorgé	155 ± 25	997 ± 175	330	159

L'effet bénéfique de l'engorgement des sols de rizière sur la fixation de N_2 est bien connu en ce qui concerne les fixateurs photosynthétiques. Dans le cas de la rhizosphère du riz, par contre, cet effet n'avait été mis en évidence jusqu'ici que par Yoshida et Ancajas (1973) ainsi que par Trolldenier (1977).

3.7. Association fixateurs de N_2 -pectinolytiques

Nous avons mis en évidence (chapitre I) l'aptitude de nombreuses bactéries rhizosphériques fixatrices de N_2 à croître aux dépens de la pectine ou de ses dérivés. En particulier nous avons constaté que l'Azospirillum Sp7 est incapable d'assimiler la pectine mais peut utiliser le galacturonate, l'arabinose, le galactose et le méthanol. Par ailleurs, H.G. Diem a isolé à partir du sol du Mas Adrien (Carnegie) une bactérie douée d'une forte activité pectinolytique (souche RP2) mais incapable de fixer N_2 .

Afin de contrôler l'aptitude de ces deux microorganismes à s'associer, nous les avons introduits séparément ou simultanément dans la rhizosphère du système "sol de Bel Air-riz cv. Moroberekan", et étudié leur effet sur l'ARA rhizosphérique et la croissance du riz.

Le nombre de microorganismes dans le sol rhizosphérique est de l'ordre de 10^8 par gramme de sol. Afin de déplacer l'équilibre biologique au profit des microorganismes introduits nous avons choisi de les incorporer au sol sous forme d'inoculum sur tourbe, à raison de $2 \cdot 10^8$ bactéries par gramme de sol. Les mesures ont été effectuées sur des systèmes de 3 semaines.

Les résultats obtenus (tableau 23) mettent en évidence un effet synergique de l'association Sp7 + RP2, tant en ce qui concerne l'ARA rhizosphérique qu'en ce qui concerne le développement végétatif du riz. Dans l'état actuel de nos connaissances il nous est impossible de dire quel est le rôle respectif de l'un et l'autre microorganismes.

Tableau 23. Inoculation du système sol de "Bel-Air-riz cv. Moroberekan" par Azospirillum Sp7, et une bactérie pectinolytique, RP2: incidence sur l'ARA rhizosphérique et le développement végétatif du riz (mesures à 3 semaines).

Inoculum *	ARA rhizosphérique (nmoles C ₂ H ₄ /plante/h)	Poids sec (mg/plante)	
		Parties aériennes	Racines
Témoin	131 ± 25	82 ± 8	46 ± 7
Sp7	200 ± 48	116 ± 14	51 ± 8
RP2	157 ± 28	122 ± 9	60 ± 6
Sp7 + RP2	232 ± 51	141 ± 12	72 ± 7

* Chaque inoculum est constitué des bactéries Sp7 et RP2 vivantes ou autoclavées suivant le traitement.

On peut toutefois supposer que les bactéries pectinolytiques sont susceptibles de favoriser la colonisation des cellules corticales par les fixateurs de N_2 et stimuler leur activité en mettant à leur disposition des substrats provenant de la dégradation de la pectine.

3.8. Association fixateurs de N_2 - actinomycètes

Nous avons reporté au tableau 24 les résultats de l'étude du système "sol gris-riz cv. Moroberekan" concernant la distribution des fixateurs de N_2 et des actinomycètes dans les trois compartiments de la rhizosphère (cf. chapitre I), ainsi que les résultats d'une étude analogue réalisée avec le système "sol de Bel-Air-riz cv. Moroberekan".

L'analyse de l'ensemble de ces données montre dans l'un et l'autre cas, une relation inverse entre les proportions de fixateurs de N_2 et d'actinomycètes. Cette observation nous a amené à émettre l'hypothèse d'un effet antagoniste des actinomycètes vis-à-vis de la microflore fixatrice de N_2 .

Nous avons donc effectué des expériences ayant pour objet : (1) de contrôler l'effet des actinomycètes vis-à-vis de la microflore fixatrice native, (2) de mettre à profit l'antagonisme des actinomycètes vis-à-vis d'une partie de la microflore rhizosphérique pour faciliter l'introduction dans la rhizosphère de fixateurs de N_2 susceptibles de se développer en présence d'actinomycètes. Ces expériences ont été réalisées avec le système "sol gris-riz cv. Moroberekan". Nous avons choisi deux actinomycètes (A_1 et A_{15}) puis recherché des fixateurs de N_2 susceptibles de croître en leur présence (absence de zone de lyse sur milieu solide). Nous avons ainsi sélectionné la souche R4 (Aeromonas, n° d'ordre 69). Comme précédemment les microorganismes ont été incorporés au sol sous forme d'inoculum sur tourbe, les mesures étant effectuées sur des systèmes "sol-riz" de 3 semaines.

Tableau 24. Distribution de la microflore totale, de la microflore fixatrice de N₂ et des actinomycètes dans la rhizosphère du riz cv. Moroberekan cultivé sur sol gris de Casamance et sur sol de Bel-Air.

Système	Microflore totale *	% de la microflore totale	
		Fixateurs de N ₂	Actinomycètes
<u>"Sol gris-riz cv. Moroberekan"</u>			
sol rhizosphérique	2,0 x 10 ⁸	53	1,7
rhizoplan	1,8 x 10 ⁸	25	4,1
endorhizosphère	1,2 x 10 ⁸	16	7,2
<u>"Sol de Bel-Air-riz cv. Moroberekan"</u>			
sol rhizosphérique	2,4 x 10 ⁹	17	0,5
rhizoplan	1,6 x 10 ⁹	28	0,1
endorhizosphère	2,4 x 10 ⁷	50	0,1

* Nombre de microorganismes exprimés par g de sol sec (sol rhizosphérique) ou par g de racines sèches (rhizoplan et endorhizosphère).

Remarque : les souches A1, A15 et R4 proviennent de l'endorhizosphère du système "sol gris-riz cv. Moroberekan" et sont représentatives de ce système.

Les résultats obtenus (tableau 25) confirment le rôle antagoniste des actinomycètes vis-à-vis de la microflore fixatrice native: l'inoculation du sol par les actinomycètes A1 et A15 provoque une diminution sensible (25% environ) de l'ARA rhizosphérique (expérience 1). Toutefois les résultats de l'expérience 2 montrent que l'on peut utiliser l'aptitude des actinomycètes à produire des substances antibiotiques au profit de fixateurs de N_2 sélectionnés pour leur résistance aux antibiotiques produits : l'inoculum mixte "fixateurs de N_2 -actinomycètes" accroît l'ARA rhizosphérique d'environ 75% par rapport à l'inoculum "fixateurs de N_2 seuls".

Les actinomycètes peuvent donc être considérés comme l'un des facteurs biologiques susceptibles de contrôler la colonisation rhizosphérique. La plupart des études relatives aux interactions "actinomycètes-fixateurs de N_2 " concernent l'effet antagoniste des actinomycètes vis-à-vis de la microflore fixatrice native (Patel, 1974, Diem et al., 1977; Panthier et al., 1979). Nos résultats montrent que l'on peut mettre à profit l'aptitude des actinomycètes à produire des antibiotiques, en les associant à des fixateurs de N_2 "résistants". L'effet d'une telle association sur la fixation rhizosphérique de N_2 peut être bénéfique dans la mesure où les partenaires de cette association ont été convenablement choisis.

3.9. Nématodes parasites du riz.

Le riz est l'hôte de prédilection de nombreuses espèces de nématodes du genre Hirschmanniella. H. spinicaudata et H. orizae sont très fréquents en Afrique de l'Ouest où l'on a observé un gradient

Tableau 25. Inoculation du système "sol gris (non stérile)-riz cv. Moroberekan" par une bactérie fixatrice de N_2 (R4) et deux actinomycètes (A1 et A15). Incidence sur l'ARA rhizosphérique mesurée à 3 semaines (Rinaudo et al., 1981).

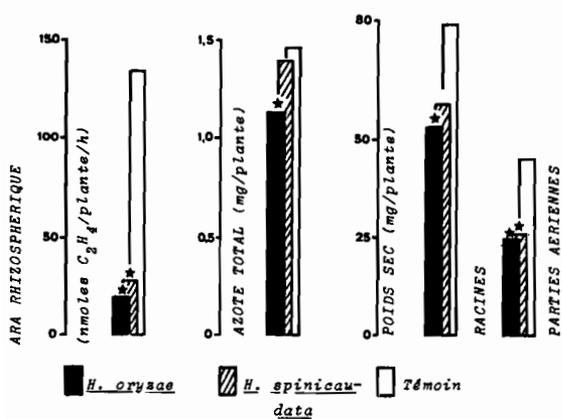
Inoculum	A R A (nmoles C_2H_4 /plante/h)
<u>Expérience 1</u>	
- Témoin *	173 ± 23
- Actinomycètes (A1 et A15)	130 ± 83
<u>Expérience 2</u>	
- Fixateur de N_2 (R4) *	132 ± 34
- Fixateur de N_2 (R4) + actinomycètes (A1 + A15)	234 ± 116

* Inoculum "A1 + A15" autoclavé

dans la distribution des deux espèces: la première est dominante dans les zones humides alors que la seconde est plus fréquente dans les régions sahéliennes (Fortuner et Merny, 1979). L'une et l'autre ont un effet dépressif sur le tallage et la floraison du riz, le développement des racines et des parties aériennes et le rendement en grains (Babatola et Bridge, 1979).

L'effet des nématodes H. orizae et H. spinicaudata sur l'ARA rhizosphérique et le développement du riz, a été étudié dans le cas de systèmes "riz cv. Moroberekan-sol de Bel Air" de trois semaines (fig. 21). L'un et l'autre ont un effet très marqué sur le développement végétatif du riz: on observe par rapport aux témoins non inoculés une réduction très nette du poids sec des plantes (de l'ordre de 30% pour les racines et de 40% pour les feuilles). La diminution de l'ARA rhizosphérique est considérable: 80% avec H. spinicaudata et 90% avec H. orizae. La nutrition azotée du riz paraît moins affectée par les nématodes: sa teneur en azote n'est réduite significativement que dans le cas d'H. orizae (de l'ordre de 20%).

La fixation de N_2 dans la rhizosphère de plants de riz de 3 semaines dépend essentiellement de l'exsudation racinaire. On peut donc supposer que l'infestation du riz par des nématodes provoque de profondes perturbations du métabolisme de la plante se traduisant notamment par une forte diminution du taux d'exsudation. Le contrôle de cette hypothèse nécessiterait que l'on effectue des expériences complémentaires avec marquage au ^{14}C .



* Significativement différent du témoin à $P = 0,01$

Fig. 21. Effet des nématodes *H. oryzae* et *H. spinicaudata* sur l'ARA rhizosphérique et le développement du riz (système "sol de Bel-Air-riz cv. Moroberekan" de 3 semaines).

4. CONCLUSIONS

La fixation de N_2 dans la rhizosphère du riz peut varier dans de grandes proportions suivant le sol ou le cultivar utilisés; de plus, elle est soumise à l'influence d'un grand nombre de facteurs de l'environnement, y compris certains éléments de la microflore ou de la microfaune du sol, ce qui ajoute à la complexité du système "sol-riz". Un certain nombre de faits toutefois, ont pu être mis en évidence qui permettent de mieux cerner le rôle de certaines composantes de ce système.

Nous avons tout d'abord observé que l'ARA rhizosphérique peut varier de 1 à 5 (tableau 16) suivant la variété de riz utilisé. Des résultats analogues aux nôtres ont également été obtenus par Lee et Yoshida (1977), Lee et al. (1977), Hirota et al. (1978), Habte et Alexander (1980), Sano et al. (1981). Le plus souvent, ces criblages ont été effectués au stade floraison, alors que les nôtres ont été faits avec des plantes de 3 semaines. Habte et Alexander (1980) ont toutefois observé une bonne corrélation entre les ARA rhizosphériques mesurées à 3 semaines et au stade floraison.

Les résultats obtenus avec des mutants des variétés Césariot et Cigalon (tableaux 17 et 18) confirment le contrôle de la fixation de N_2 par le génotype de la plante: dans l'un et l'autre cas l'ARA rhizosphérique varie de 1 à 10 suivant le mutant utilisé. Toutefois, le fait que des mutants Cigalon cultivés sur sol de Camargue donnent des ARA rhizosphériques extrêmes et ne se différencient plus pour ce caractère quand ils sont cultivés sur sol gris de Casamance (tableau 19), souligne la complexité des relations existant entre la plante, la microflore fixatrice de N_2 et, vraisemblablement d'autres composantes de la microflore rhizosphérique. Il nous paraît donc difficile,

en l'état actuel de nos connaissances de préconiser la manipulation génétique du végétal en vue d'accroître la fixation rhizosphérique de N_2 .

La plante fournit à la microflore fixatrice des substrats énergétiques que l'on peut classer en trois groupes : les exsudats racinaires, c'est à dire les substances libérées dans le milieu par des racines intactes (Rovira, 1969); les lysats racinaires constitués surtout de cellules de l'épiderme et du cortex des racines vivantes (Martin, 1977); la litière racinaire, c'est à dire les matériaux provenant de racines mortes en voie de décomposition (Waid, 1974). Nous avons montré que pour des plantes jeunes (3 semaines) la fixation de N_2 dépend pour l'essentiel de l'exsudation racinaire (fig. 17).

A des stades plus avancés du développement de la plante, il est probable que les lysats racinaires puis la litière racinaire constituent l'essentiel des substrats énergétiques disponibles. Nous avons en effet observé que les activités fixatrices les plus fortes se situent après la floraison (fig. 18). Elles correspondent donc au stade ultime de dégénérescence des racines décrit par Martin (1977): envahissement de l'épiderme et du cortex par la microflore rhizosphérique puis décomposition de l'endoderme et mort des racines.

La répression de la synthèse de la nitrogénase par l'ion NH_4^+ se vérifie dans la rhizosphère du riz, mais n'est que temporaire. Des apports modérés d'azote combiné ont pour effet de stimuler l'activité nitrogénasique (fig. 19) en raison d'une part de l'assimilation rapide des ions ammonium par la plante (fig. 20), d'autre part d'une exsudation plus massive de substrats carbonés. Sur le plan pratique, ces résultats suggèrent que l'on préconise l'application de doses "starter" d'engrais azotés qui sont bénéfiques au développement de la plante sans pour autant nuire à la fixation de N_2 .

L'engorgement du sol stimule considérablement la fixation rhizosphérique de N_2 (tableau 22). Cette stimulation est probablement due à un effet interface "aérobie-anaérobie" entre le sol réducteur et la surface des racines qui laisse diffuser de l'air (Luxmoore et al., 1970; Armstrong, 1970); dans ce gradient, les différentes composantes de la microflore fixatrice rhizosphérique sont susceptibles de trouver les potentiels permettant l'expression optimale de leur activité, ce qui explique sans doute que la rhizosphère du riz soit l'un des systèmes rhizosphériques les plus efficaces que l'on connaisse du point de vue fixation de N_2 . Nous avons également observé que le développement du riz est plus vigoureux en sol inondé qu'en sol exondé, ce qui se traduit probablement par une exsudation plus massive de substrats énergétiques.

La notion de type de sol est complexe: elle intègre à la fois les caractères physico-chimiques du sol et ses composantes biologiques. Nous avons constaté (mais sans pouvoir l'expliquer) que l'ARA rhizosphérique est multipliée par un facteur de 20 quand on passe du sol de Boundoum au sol du Mas Adrien, l'un et l'autre étant ensemencés avec la même variété cv. Séfa 319 G (tableau 20). De même nous n'avons trouvé aucune relation simple entre l'ARA rhizosphérique et les principales caractéristiques physico-chimiques de 21 sols de rizière du Sénégal (tableau 21). Cette absence de relation s'explique probablement en partie par le fait que la microflore fixatrice de N_2 est extrêmement complexe (cf. chapitre I), donc susceptible de s'adapter aux conditions de milieu les plus variées; elle suggère également l'intervention de facteurs biologiques susceptibles d'interagir avec la microflore fixatrice. Nous avons donné trois exemples illustrant ce type d'interaction.

En premier lieu nous avons mis en évidence un effet synergique de l'association entre l'Azospirillum Sp7 et une bactérie pectinoly-

tique (RP2), se traduisant par une amélioration significative de l'ARA rhizosphérique et du développement végétatif du riz (tableau 23). L'effet bénéfique de cette association nous permet de penser que les pectinolytiques pourraient favoriser la colonisation du cortex racinaire par les fixateurs de N_2 et stimuler leur activité en mettant à leur disposition des composés organiques de bas poids moléculaire (galacturonate, arabinose, galactose, méthanol) provenant de la dégradation de la pectine. On trouve dans la littérature de nombreux exemples mettant en évidence des interactions de nature synergique entre la microflore fixatrice et d'autres microorganismes (Parker, 1955; Okuda et al., 1960; Rubenchik, 1963; Kobayashi et al., 1965; Dommergues et Mufatschiev, 1965; Florenzano et al., 1968; Line et Loutit, 1973). Signalons en particulier que Remacle et Rouatt (1968) ont observé dans la rhizosphère de l'orge un accroissement du nombre d'Azotobacter en présence de bactéries pectinolytiques.

Certains travaux suggèrent l'effet antagoniste d'actinomycètes vis-à-vis de la microflore fixatrice de N_2 (Patel, 1974; Diem et al., 1977; Döbereiner et Baldani, 1979). L'analyse du système "sol gris-riz cv. Moroberekan" que nous avons faite (chapitre I) nous a amené à émettre l'hypothèse selon laquelle la distribution des différents groupes de fixateurs de N_2 dans les trois compartiments de la rhizosphère, pourrait être contrôlée par des actinomycètes. Les expériences complémentaires réalisées avec ce système "sol-riz" confirment le rôle antagoniste des actinomycètes vis à vis de la microflore fixatrice native considérée globalement (tableau 25). Nous avons montré toutefois que l'on pouvait mettre à profit l'aptitude des actinomycètes à synthétiser des substances antibiotiques, en sélectionnant des fixateurs de N_2 résistants aux antibiotiques produits, ce qui permet de réaliser un inoculum mixte "fixateurs de N_2 -actinomycètes" plus efficace que l'inoculum "fixateurs de N_2 seuls".

Nous avons enfin montré que les nématodes parasites du riz doivent être considérés comme un facteur limitant majeur de la fixation de N_2 . En l'espace de trois semaines l'infestation du riz par des nématodes du genre Hirschmanniella provoque une diminution de l'activité fixatrice très spectaculaire (de l'ordre de 90%, fig. 21). Il convient de rappeler à ce propos que des observations analogues ont été également faites dans le cas de systèmes symbiotiques (Germani et al., 1980).

CHAPITRE III

ORIGINE DE L'EFFET DE LA MICROFLORE FIXATRICE DE N_2
SUR LA CROISSANCE DU RIZ :
FIXATION DE N_2
OU
SYNTHÈSE DE PHYTOHORMONES

1. INTRODUCTION

Les fixateurs de N_2 sont très nombreux dans la rhizosphère du riz où ils constituent une proportion importante de la microflore totale. Nous l'avons montré dans le cas du riz cv. Morobekkan cultivé sur sol gris de Casamance ou sur sol de Bel Air; Trolldenier (1977) ainsi que Watanabe et Barraquio (1979) ont obtenu des résultats analogues aux nôtres (cf. tableau 26).

La quantité d'azote fixée en rizière par les hétérotrophes rhizosphériques au cours d'un cycle cultural est de l'ordre de 20 kg à l'hectare (Wetselaar 1981), et l'on sait qu'une partie de cet azote est rapidement assimilée par la plante (Ito et Watanabe, 1981; Eskew et al., 1981; Maudinas et al., 1981).

Par ailleurs, il a été montré que certains fixateurs de N_2 sont capables de produire des phytohormones susceptibles de stimuler le développement des plantes. C'est notamment le cas d'Azotobacter chroococcum (Vancura, 1961; Brown et Burlingham, 1968), d'Azotobacter paspali (Barea et Brown, 1974) et de nombreuses souches d'Azospirillum (Gaskins et al., 1977; Reynders et Vlassak, 1978; Tien et al., 1979). Il y a donc tout lieu de supposer que de tels microorganismes pourraient agir sur la croissance de la plante par l'azote qu'ils fixent, mais aussi en produisant des phytohormones.

Tableau 26. Distribution de la microflore hétérotrophe aérobie et des fixateurs de N_2 dans la rhizosphère du riz.

Système	Microflore totale(T)	Fixateur de N_2 (F)	$\frac{F}{T} \times 100$
<u>Sol gris-riz cv. Moro-bérékan</u>			
S	$2,0 \times 10^8$	$10,6 \times 10^7$	53
R + E	$3,2 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$	22
<u>Sol Bel Air-riz cv. Moroberekan</u>			
S	$2,4 \times 10^9$	$4,1 \times 10^8$	17
R + E	$1,6 \times 10^9$	$4,6 \times 10^8$	28
<u>Sol Philippines - riz cv. IR26**</u>			
S	$2,3 \times 10^7$	$0,6 \times 10^6$	2
R + E	$12,5 \times 10^7$	$10,0 \times 10^7$	80
<u>Sol-riz cv. IR20***</u>			
R + E	$1,8 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$	44
<u>Sol-riz cv. IR8***</u>			
R + E	$2,6 \times 10^8$	$5,9 \times 10^7$	23

Les résultats sont exprimés par gramme de sol sec (S) ou de racines sèches (R+E).

S = sol rhizosphérique, R + E = rhizoplan + endorhizosphère

** Watanabe et Barraquio (1979)

***Trollidner (1977).

Afin de voir dans quelle mesure l'un et l'autre de ces processus agissent sur la croissance de la plante, nous avons procédé à des expériences d'inoculation de systèmes "sol-riz" avec 39 souches fixatrices de N_2 de notre collection. A cet effet nous avons choisi des bactéries isolées de l'endorhizosphère dont on peut raisonnablement penser qu'elles sont aptes à vivre en association avec la plante.

2. MATERIEL ET METHODES

Pour étudier l'effet d'un microorganisme fixateur de N_2 sur la croissance du riz la solution la plus simple consiste à cultiver le riz en conditions gnotobiotiques en présence de ce micro-organisme. Maudinas et al. (1981) ont ainsi réussi à cultiver du riz (cv. Delta) jusqu'à maturité sur milieu dépourvu d'azote combiné en présence de fixateurs de N_2 et montré qu'une partie de l'azote fixé était assimilée par la plante; mais les souches utilisées, Azotobacter chroococcum et Rhodopseudomonas capsulata, n'étaient pas des bactéries rhizosphériques typiques. Les résultats obtenus par Hamad-Farès (1976) avec son modèle gnotobiotique (culture stérile de riz cv. IR8 sur sable) montrent qu'en présence de fixateurs de N_2 rhizosphériques (Beijerinckia camargensis ou Enterobacter cloacae, tous deux micro-aérophiles), les fixations de N_2 [C_2H_2] sont très faibles (20 fois plus faibles environ que les activités mesurées en présence d'un mélange comprenant 9/10 de sable + 1/10 de sol non stérile).

La microflore native du sol contribue donc à l'établissement de conditions favorables à la fixation de N_2 . Il est probable que cette microflore permet d'une part une diminution rapide de la pression partielle en oxygène du milieu jusqu'à un niveau compatible avec la fixation de N_2 (la plupart des diazotrophes rhizosphériques ne fixent N_2 qu'en microaérophilie), et stimule d'autre part la libération de composés énergétiques par la plante (Martin 1977).

Nous avons donc choisi d'effectuer la plupart des essais d'inoculation auxquels nous avons procédé, sur sol non stérile, respectant ainsi l'intégrité du "milieu rhizosphère" dont la microflore native est une composante essentielle.

2.1. Sols et matériel végétal

Tous les essais ont été effectués sur sol de Bel Air ou sur sol gris de Casamance, ensemencés le plus souvent avec du riz cv. Moroberekan.

2.2. Souches fixatrices de N₂

Nous avons utilisé 27 souches d'Azospirillum, six Alcaligenes (n°51, 54, 56, 57, 61 et 65), trois Pseudomonas (n°52, 50 et 64), un Enterobacter (n°55) et deux Aquaspirillum (n°62 et 66).

Nous avons utilisé également deux mutants de l'Azospirillum Sp7: la souche Sp7001, streptomycine résistante, qui nous a été fournie par D. Gauthier (laboratoire de Microbiologie des Sols, ORSTOM, Dakar) et la souche Sp7204, non fixatrice de N₂ (mutant fix⁻), sélectionnée pour ce caractère dans le service de physiologie cellulaire du Pr. Aubert (Institut Pasteur, Paris).

2.3. Préparation des inoculums

Les sols ont été inoculés à raison de $2 \cdot 10^8$ bactéries par gramme de sol, sous forme d'inoculum sur tourbe.

2.3.1. *Systèmes "sol-riz" de 3 semaines*

Le microorganisme est cultivé sur milieu complet, centrifugé puis resuspendu avec du tampon phosphate 0,02M, pH 7. La suspension obtenue est mélangée intimement à de la tourbe stérile ($5 \cdot 10^9$ bactéries/g tourbe). On introduit en tubes pyrex de 14 x 220 mm un mélange "sol non stérile + tourbe" (1 g de tourbe par tube, soit environ $2 \cdot 10^8$ bactéries/g sol). Chaque tube est alors ensemencé avec

un grain de riz prégermé. ARA rhizosphériques et poids secs sont mesurés à 3 semaines.

Remarques:

- Tous les essais d'inoculation ont comporté des témoins préparés avec la même quantité de bactéries autoclavées.

- Nous avons effectué une expérience préliminaire avec la souche Sp7001 (streptomycine résistante) afin d'estimer le devenir d'un tel inoculum. Les résultats obtenus après 3 semaines de cultures (tableau 27) montrent : 1) que le nombre total de bactéries par gramme de sol est compris entre 10^7 et 10^8 , que le sol soit inoculé ou non, 2) que la proportion d'Azospirillum Sp7001 par rapport à la microflore totale reste relativement forte, surtout au niveau du rhizoplan et de l'endorhizosphère.

2.3.2. Cultures en pot

Quelques essais ont été conduits dans des pots en plastique pouvant contenir 5 kg de sol, donc permettant de cultiver le riz jusqu'à maturité. Chaque pot reçoit 0,7 g K_2HPO_4 .

Le riz est tout d'abord cultivé en sachet plastique sur 200 g d'un mélange "sol + tourbe inoculée" (par sachet : 10 g de tourbe à raison $5 \cdot 10^9$ bactéries/g de tourbe ; 3 plants de riz). Quand les plantes sont âgées de 3 semaines, le sachet est ouvert avec des ciseaux, et le système "sol-riz" mis en place au centre du pot. Le sol est maintenu sous eau pendant toute la durée de l'expérimentation. Cette technique a pour but de faciliter la colonisation des racines par le microorganisme introduit au cours des premiers stades de développement du riz.

Tableau 27. Inoculation de systèmes "sol-riz" par Azospirillum Sp7001 ; devenir de l'inoculum après 3 semaines de culture en tubes de 14 x 220 mm.

Système "sol-riz"	Nombre de bactéries à 3 semaines	
	Sol rhizosphérique (N/g sol sec)	Rhizoplan + Endorhizosphère (N/g racines sèches)
<u>Sol gris-riz cv. Moroberekan</u>		
a) non inoculé : microflore totale	$5,2 \times 10^7$	$2,9 \times 10^9$
b) inoculé : microflore totale	$4,8 \times 10^7$	$1,8 \times 10^9$
<u>Azospirillum</u> Sp7001	$1,1 \times 10^7$ (22 %)	$1,0 \times 10^9$ (55 %)
<u>Sol de Bel-Air - riz cv. Moroberekan</u>		
a) non inoculé : microflore totale	$2,0 \times 10^7$	$2,1 \times 10^9$
b) inoculé : microflore totale	$2,2 \times 10^7$	$3,5 \times 10^9$
<u>Azospirillum</u> Sp7001	$0,2 \times 10^7$ (8 %)	$0,7 \times 10^9$ (21 %)

- Inoculum : 2×10^8 bactéries par gramme de sol sec.

- Les valeurs entre parenthèses représentent la proportion d'Azospirillum Sp7001 par rapport à la microflore totale.

2.3.3. Cultures en parcelles de 2m²

Des fosses de 1 x 2m sur une profondeur de 50 cm, ont été creusées dans l'enclos du centre ORSTOM de Bel-Air. Après la mise en place d'une bache plastique (épaisseur 200 μ m), la fosse a été remplie sur une hauteur de 40cm par du sol de Bel-Air (horizon de surface : 0-20cm). Les parcelles de 2m² ainsi obtenues sont parfaitement étanches et permettent la culture irriguée du riz.

Chaque parcelle reçoit 22 g de supertriple ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$), 30 g de KCl et de l'urée : une dose starter (6,5 g d'urée soit 15 kg N/ha) ou une dose plus forte (26 g soit 60 kg N/ha). Les parcelles sont repiquées à partir de pépinières de 3 semaines (poquets de trois brins, espacement des poquets : 20 cm). L'inoculation a lieu au niveau des pépinières : celles-ci sont réalisées dans des bacs en plastique sur un mélange "sol de Bel-Air - tourbe inoculée" (5% de tourbe inoculée à raison de $5 \cdot 10^9$ bactéries/g tourbe). La hauteur du mélange "sol + tourbe" dans les bacs est faible (environ 3cm) ; on obtient ainsi un enchevêtrement très dense de racines, en présence d'un inoculum bactérien relativement important. Ce sont ainsi des plantules préinoculées que l'on introduit dans les parcelles lors du repiquage. Le sol est par la suite maintenu sous eau pendant toute la durée de l'expérimentation.

3. RESULTATS

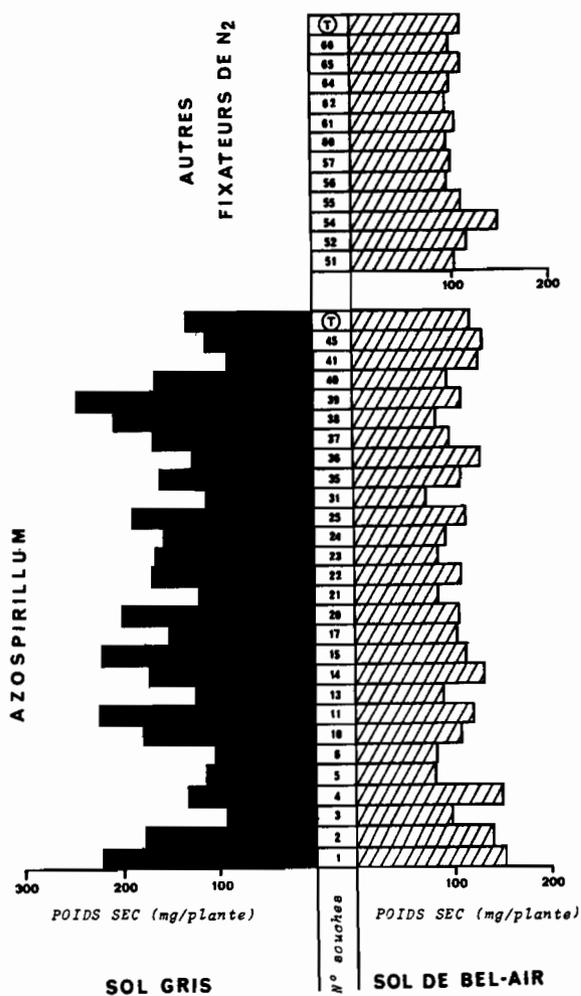
3.1. Effet de l'inoculation par des fixateurs de N₂ sur la croissance du riz.

3.1.1. *Systèmes "sol-riz" de 3 semaines*

Le riz cv. Moroberekan a été cultivé en tubes pyrex de 14 x 220mm. Les Azospirillum ont été inoculés à la fois sur sol gris de Casamance et sur sol de Bel Air. Les autres souches fixatrices de N₂ n'ont été testées que sur sol de Bel Air. Les résultats obtenus ont été reportés à la figure 22 pour l'ensemble des souches.

Les souches fixatrices de N₂ autres qu'Azospirillum ont relativement peu d'effet sur le développement végétatif du riz. Seule la souche n°54 (Alcaligenes) provoque une augmentation significative du poids sec des plantes.

Les souches de type Azospirillum, par contre, sont susceptibles de modifier dans de grande proportions le développement végétatif du riz. Suivant la souche introduite, le poids sec varie de 74 à 153 mg dans le cas du sol de Bel Air (témoin: 120 mg), et de 88 à 243 mg dans le cas du sol gris (témoin: 129 mg). Il est à remarquer que l'effet de l'inoculation par une souche donnée dépend du sol inoculé. Nous avons réparti les souches d'Azospirillum en quatre groupes en fonction de leur incidence sur le poids sec des plantes dans l'un et l'autre sol. On constate (tableau 28) que les souches ne se répartissent pas également entre les quatre groupes : 18 souches sur 27 ont un effet bénéfique sur le développement du riz cultivé sur sol gris, alors qu'on n'en compte que 7 dans le cas du sol de Bel Air. Les plantes cultivées sur sol gris sont donc, plus que les plantes cultivées sur sol de Bel-Air, susceptibles de réagir favorablement à l'inoculation par Azospirillum.



(T) *Témoin (bactéries autoclavées)*

Fig. 22. Effet de l'inoculation de systèmes "sol-riz" par diverses souches fixatrices de N_2 , sur le poids sec des plantes à 3 semaines.

Tableau 28. Inoculation de systèmes "sol-riz" par diverses souches d'Azospirillum: effet sur le développement végétatif du riz à 3 semaines (riz cv. Moroberekan).

Inoculum		Effet sur le poids sec du riz	
Nombre de souches	N° des souches	Sol de Bel-Air	Sol gris
4	1, 2, 4, 14	+	+
3	36, 41, 45	+	-
14	10, 11, 15, 17, 20, 22, 23, 24, 25, 35 37, 38, 39, 40	-	+
6	3, 5, 6, 13, 21, 31	-	-

+ = augmentation du poids sec des plantes par rapport au témoin

- = diminution du poids sec des plantes par rapport au témoin.

3.1.2. *Systèmes sol-riz de 1 mois inoculés par Azospirillum Sp7 (cultures en pots).*

Il apparaît que l'Azospirillum Sp7 (souche n°1) améliore fortement la croissance du riz à la fois sur sol de Bel-Air et sur sol gris de Casamance (fig. 22); seule la souche n°39 stimule davantage le développement du riz cultivé sur sol de Bel-Air. Nous avons testé l'Azospirillum Sp7 en présence de 7 variétés de riz cultivées sur sol de Bel-Air. Cette expérience a été réalisée en pots contenant 5 kg de sol. Les résultats obtenus (tableau 29) mettent en évidence l'aptitude exceptionnelle de cette souche à promouvoir le développement du riz: par rapport aux plantes témoin, l'augmentation du poids sec des parties aériennes se situe entre 7% et 64% (moyenne 29%) et l'augmentation du poids sec des racines entre 0% et 156% (moyenne: 64%).

3.1.3. *Systèmes "sol-riz" cultivés jusqu'à maturité*

Le riz cv. Moroberekan a été cultivé sur sol de Bel-Air jusqu'à maturité (120 j), dans des pots renfermant 5 kg de sol ainsi que sur des parcelles de 2m². Trois souches d'Azospirillum ont été utilisées: la souche Sp7 (n°1) qui, sur ce sol améliore le poids sec du riz, et les souches BK85 (n°38) et DK 93 (n°40), qui ont au contraire un effet dépressif sur la croissance du riz cultivé sur sol de Bel-Air (cf. fig.22). L'inoculum a été apporté sur tourbe (cf. § 2.3).

Nous avons reporté à la figure 23 les rendements en grains obtenus à l'issue du cycle végétatif des plantes. Nous y avons également mentionné les résultats obtenus avec des plants de 3 semaines cultivés sur tubes de 14 x 220 mm.

Dans le cas de cultures en pots, l'effet de l'inoculation sur les rendements en riz n'est sensible que si l'on compare les résultats obtenus avec les souches BK85 et Sp7. Les différences

Tableau 29. Effet de l'inoculation du sol de Bel Air par Azospirillum Sp7, sur le développement végétatif de diverses variétés de riz (culture en pots contenant 5 kg de sol, trois plantes par pot).

Riz	Inoculum*	Poids sec à 1 mois (mg/pot)	
		Parties aériennes	Racines
	0	412	273
cv. Moroberekan	+	574 (+ 39%)	418 (+ 53%)
	0	438	255
cv. I Kong Pao	+	616 (+ 41%)	484 (+ 90%)
	0	545	223
cv. IR 15	+	583 (+ 7%)	314 (+ 41%)
	0	480	285
cv. IR 2071	+	571 (+ 19%)	371 (+ 30%)
	0	495	335
cv. DJ684D	+	541 (+ 9%)	334 (0 %)
	0	413	187
cv. Kuang Shi Shing	+	508 (+ 23%)	338 (+ 81%)
	0	363	189
cv. 1R29	+	596 (+ 64%)	483 (+ 156%)

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux augmentations de poids sec par rapport au témoin non inoculé (bactéries autoclavées).

*Inoculum: Azospirillum Sp7 sur tourbe (0: bactéries autoclavées, + : bactéries vivantes).

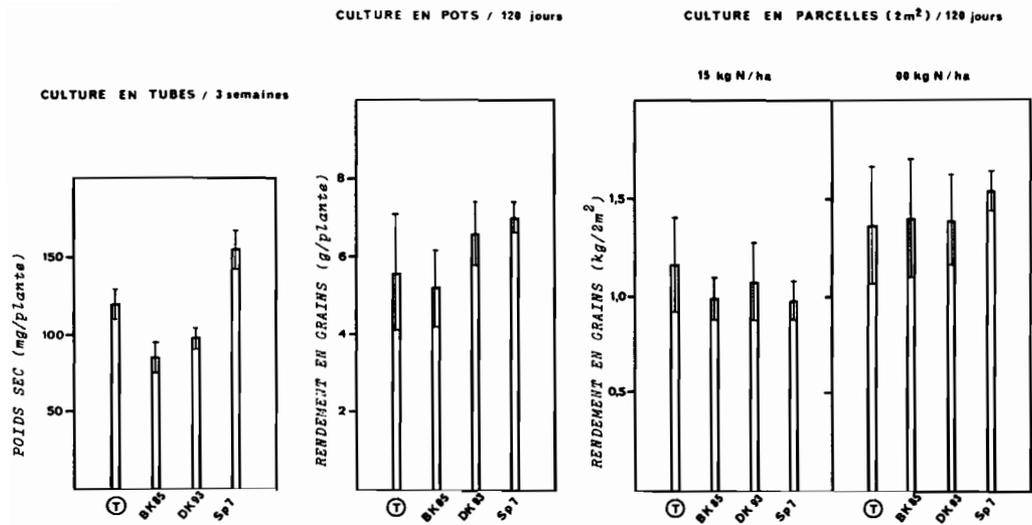


Fig. 23. Effet de l'inoculation du système "soi de Bel-Air-riz cv. Moroberekan" par trois souches d'*Azospirillum*, sur le poids sec des plantes à 3 semaines et les rendements en grains à 120 jours.

observées sont toutefois moins marquées que celles que l'on observe à 3 semaines. Dans le cas de cultures en parcelles de 2m² par contre, il n'y a plus d'effet significatif quel qu'ait été l'apport initial d'azote urée (dose starter: 15 kg N/ha ou dose plus forte: 60 kg N/ha).

Cette inefficacité (relative ou totale suivant le cas) de l'inoculation de plantes cultivées jusqu'à maturité pourrait être due à la non prolifération de l'inoculum après que les systèmes aient été transférés dans un volume de sol plus vaste. En effet, durant les 3 semaines qui précèdent ce transfert, la totalité du système racinaire se trouve en présence d'un inoculum bactérien dense, donc ayant un effet marqué sur la croissance du riz; les résultats obtenus dans le cas de cultures de 3 semaines en tubes de 14 x 220mm sont parfaitement significatifs à cet égard. Après transfert, par contre, les racines poursuivent leur développement dans du sol dépourvu d'inoculum bactérien, donc en présence de la seule microflore native. L'effet de l'inoculation serait ainsi d'autant moins prononcé que la proportion de racines mises en présence d'un inoculum dense, est plus faible.

Devenir de l'inoculum bactérien au cours du développement du riz

L'objet de cette expérience a été de vérifier l'hypothèse selon laquelle il n'y aurait pas prolifération de l'inoculum au cours du développement du riz. Nous avons utilisé le même système "sol-riz" (sol de Bel-Air-riz cv. Moroberekan) et choisi l'Azospirillum Sp7 qui s'est avéré être le plus efficace dans le cas de plantes de 3 semaines cultivées sur sol de Bel-Air. Plus précisément nous avons utilisé la souche Sp7001, mutant spontané de Sp7 résistant à la streptomycine. L'inoculum a été introduit dans toute la masse de sol à raison de 10⁸ bactéries par gramme de sol. Des numérations ont été effectuées à divers stades de croissance du riz, sur le sol environ-

nant (S), ainsi qu'à partir de racines préalablement lavées modérément puis broyées (R). Les comptages ont été effectués sur milieu gélosé contenant 1% de streptomycine.

Les résultats obtenus (fig. 24) confirment notre hypothèse de départ: l'inoculum introduit ne prolifère pas; bien plus sa densité décline d'environ trois puissances de 10 au cours du développement de la plante. La colonisation des racines par l'Azospirillum Sp7001 (R) est effective mais demeure relativement discrète (de l'ordre de 10^6 bactéries/g racines sèches). Si l'on se réfère aux comptages effectués par ailleurs avec le système "sol de Bel-Air-riz cv. Moroberekan" (tableau 26), on constate que le nombre total de fixateurs de N_2 correspondant (rhizoplan + endorhizosphère) est de l'ordre de 10^8 bactéries par gramme de racines sèches. Autrement dit la souche Sp7001 représente seulement 1% des fixateurs de N_2 ayant colonisé les racines.

3.2. Origine de l'effet observé sur des plantes de 3 semaines

L'introduction de fixateurs de N_2 dans la rhizosphère du riz peut avoir un effet très marqué sur le développement de plants de 3 semaines (§ 3.1.1.); c'est notamment le cas avec certaines souches d'Azospirillum.

L'objet des expériences que nous présentons maintenant est de déterminer si cet effet est dû à la fixation de N_2 ou à l'aptitude des souches à produire des phytohormones.

3.2.1. *Relation développement du riz-fixation de N_2*

a - Incidence de l'inoculation sur l'ARA rhizosphérique

Les souches utilisées sont les mêmes qu'au § 3.1.1.

L'inoculation par Azospirillum est susceptible de modifier profondément la fixation de N_2 (fig. 25): l'ARA rhizosphérique varie dans

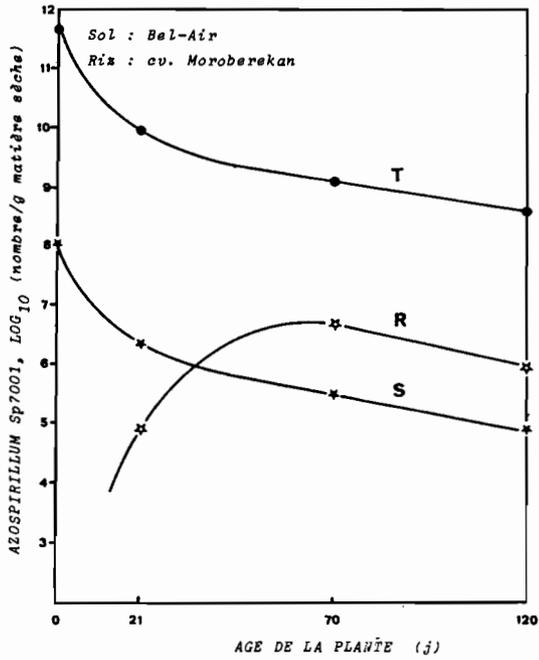


Fig. 24. Devenir de l'inoculum *Azospirillum* Sp7001 dans le sol (S) et dans la rhizosphère (R= rhizoplan + endorhizosphère) au cours du développement du riz.
(S : nombre/g sol sec, R: nombre/g racines sèches, T : nombre total/pot).



(T) Témoin (bactéries autoclavées)

Fig. 25. Effet de l'inoculation de systèmes "sol-riz" par diverses souches fixatrices de N₂, sur l'ARA rhizosphérique à 3 semaines.

des proportions considérables (rapport de 1 à 10) suivant la souche utilisée (de 35 à 322 nmoles C_2H_4 /plante/h dans le cas du sol de Bel-Air, témoin: 192 nmoles C_2H_4 ; de 22 à 158 nmoles C_2H_4 dans le cas du sol gris, témoin: 60 nmoles C_2H_4). L'effet de l'inoculation par une souche donnée dépend du sol inoculé. Nous avons réparti les souches d'Azospirillum en quatre groupes, en fonction de l'incidence de l'inoculation sur l'ARA rhizosphérique dans l'un et l'autre sol (tableau 30): on constate que les souches se répartissent à peu près également entre les quatre groupes.

Les souches fixatrices de N_2 autres qu'Azospirillum donnent lieu à des résultats analogues (fig. 25) encore que les variations observées soient moindres que dans le cas des Azospirillum (l'ARA rhizosphérique varie de 100 à 245 nmoles C_2H_4 /plante/h, témoin: 185 nmoles C_2H_4).

b - Relation entre l'ARA rhizosphérique et l'ARA spécifique "in vitro" des souches introduites.

Nous avons classé les différentes souches testées en fonction de leur ARA spécifique optimale in vitro (cf. Chapitre I) et comparé ces valeurs aux ARA rhizosphériques correspondantes (fig. 26). Il apparaît qu'il n'y a aucune relation entre l'ARA spécifique des souches, et leur effet sur l'ARA rhizosphérique, qu'il s'agisse d'Azospirillum ou des autres souches fixatrices de N_2 . Autrement dit, l'étude in vitro de l'activité nitrogénasique des souches, ne renseigne pas sur leur activité éventuelle au niveau de la rhizosphère du riz. Cette absence de relation s'explique par le fait que l'effet de la souche introduite sur l'ARA rhizosphérique du système dépend non seulement des propriétés intrinsèques de cette souche mais aussi de nombreux autres facteurs (interactions avec les diverses composantes de la microflore rhizosphérique, nature des substrats disponibles, etc...).

Tableau 30. Inoculation de systèmes "soi-riz" par diverses souches d'*Azospirillum*: effet sur l'ARA rhizosphérique à 3 semaines (riz cv. Moroberekan).

Inoculum		Effet sur l'ARA rhizosphérique	
Nombre de souches	N° des souches	Sol de Bel-Air	Sol gris
7	13,20,21,24,25,31,35	+	+
7	1,5,14,15,36,40,41	+	-
6	10,11,17,23,37,38	-	+
7	2,3,4,6,22,39,45	-	-

+ = augmentation de l'ARA rhizosphérique par rapport au témoin
 - = diminution de l'ARA rhizosphérique par rapport au témoin.

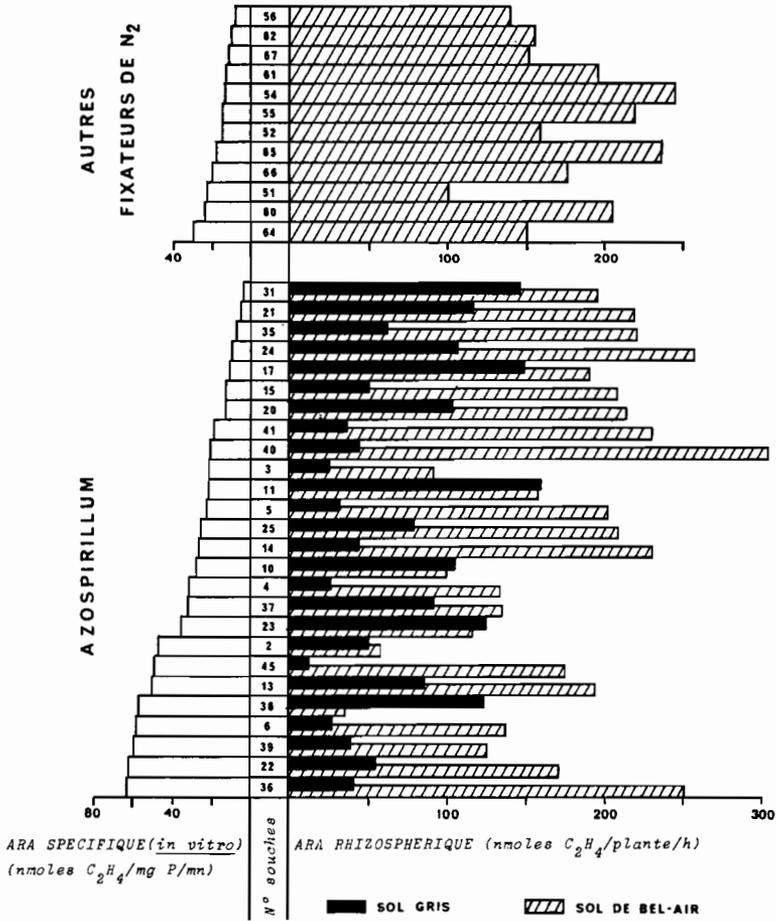


Fig. 26. Inoculation du système "sol-riz" avec diverses souches fixatrices de N₂. Relation entre l'ARA spécifique optimale des souches *in vitro* et l'ARA rhizosphérique correspondante (*in vitro* et l'ARA rhizosphérique correspondante (à 3 semaines).

c - Relation entre ARA rhizosphérique et développement végétatif du riz.

Aucune relation simple ne peut être mise en évidence entre l'ARA rhizosphérique et le poids sec des plantes mesurés à 3 semaines, que le sol ait été inoculé avec Azospirillum ou avec d'autres fixateurs de N_2 (fig. 27). Afin de faciliter l'analyse des résultats obtenus, nous avons dans le cas des seuls Azospirillum, regroupé les souches en fonction de leur effet sur l'un et l'autre de ces paramètres (tableau 31). On observe que la distribution des souches est très différente suivant le sol considéré : 10 souches améliorent à la fois l'ARA rhizosphérique et le poids sec des plantes dans le cas du sol gris, alors que deux souches seulement ont le même effet dans le cas du sol de Bel-Air. Si on considère maintenant l'ensemble des résultats pour les deux sols, on constate que très peu de souches peuvent être regroupées. En particulier, aucune souche n'est capable d'améliorer à la fois l'ARA rhizosphérique et le poids sec du riz dans les deux sols. Il est donc clair qu'il n'y a aucune relation entre fixation rhizosphérique de N_2 et développement végétatif du riz à 3 semaines.

Cette conclusion est parfaitement illustrée dans le cas de la souche Sp7 introduite dans la rhizosphère du riz cv. Moroberekan cultivé sur trois sols (tableau 32): l'Azospirillum Sp7 provoque une très forte augmentation du poids sec des plantes avec les trois sols, mais l'ARA rhizosphérique n'est stimulée que sur sol de Bel-Air.

3.2.2. *Aptitude de diverses souches d'Azospirillum à produire des phytohormones: effet sur le développement du riz.*

Les essais d'inoculation de systèmes "sol-riz" par des

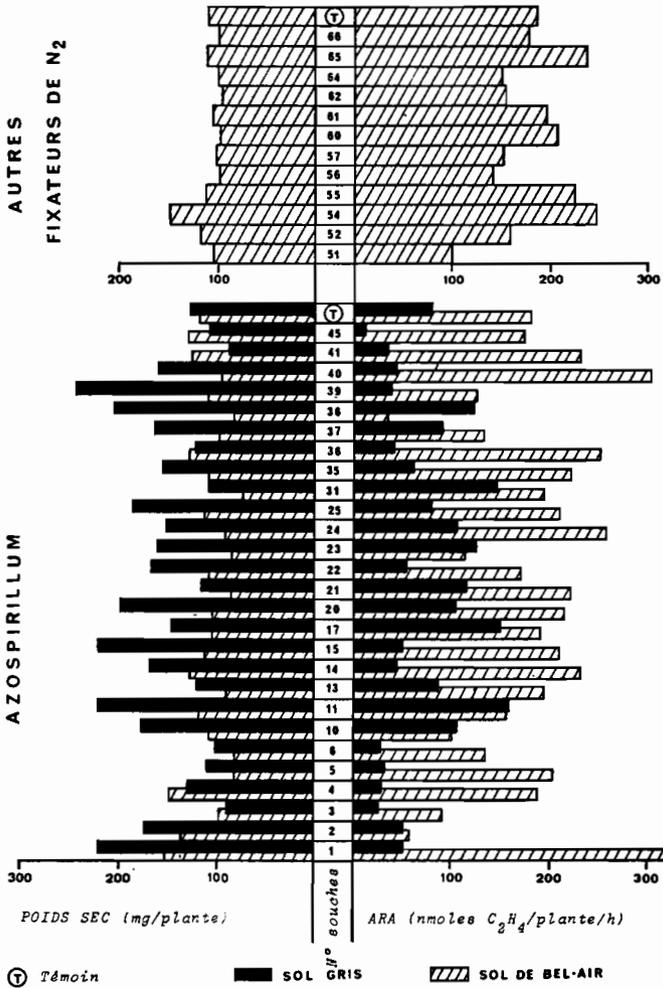


Fig. 27. Effet de l'inoculation de systèmes "sol-riz" par diverses souches fixatrices de N₂, sur l'ARA rhizosphérique et le poids sec des plantes à 3 semaines.

Tableau 31. Inoculation de systèmes "sol-riz" par diverses souches d'*Azospirillum*: effet sur l'ARA rhizosphérique et le développement végétatif du riz à trois semaines (riz cv. Moroberekan)

Sol	Inoculum		Effet sur l'ARA rhizosphérique	Effet sur le poids sec
	Nombre de souches	N° des souches		
Sol de Bel Air	2	36, 41	+	+
	13	5,13,15,20,21,24,25,26,27,28,31,35,40	+	-
	3	2, 4, 45	-	+
	15	3,6,10,11,12,17,22,23,29,33,34,37,38,39,42	-	-
Sol gris	10	10,11,17,20,23,24,25,35,37,38	+	+
	3	13, 21, 31	+	-
	8	1,2,4,14,15,22,39,40	-	+
	7	3,4,5,6,36,41,45	-	-
Sol de Bel Air et sol gris	0	-	+	+
	3	13, 21, 31	+	-
	2	2, 4	-	+
	2	3, 6	-	-

+ = augmentation par rapport au témoin

- = diminution par rapport au témoin.

Tableau 32. Influence de l'inoculation avec *Azospirillum* Sp7 sur l'ARA rhizosphérique et le développement végétatif du riz cv. Moroberekan cultivé sur différents sols (mesures à 3 semaines).

Sol	Inoculum ²²	A R A (nmoles C ₂ H ₄ /plante/h)	Poids sec (mg/plante)	
			Parties aériennes	Racines
Sol gris	0	60 ± 26	48 ± 26	68 ± 11
	+	50 ± 21	136 ± 13	85 ± 12
Bel Air	0	200 ± 33	75 ± 14	45 ± 5
	+	322 ± 46	106 ± 17	47 ± 3
Boundoum	0	61 ± 16	62 ± 15	48 ± 6
	+	47 ± 31	125 ± 18	84 ± 9

²²Inoculum: *Azospirillum* Sp7 sur tourbe (0 : bactéries autoclavées, + : bactéries vivantes).

Azospirillum, ont montré qu'il n'y a aucune relation entre le développement végétatif du riz et la fixation rhizosphérique de N_2 , dans le cas de plantes de 3 semaines.

Par ailleurs il est désormais bien établi que de nombreuses souches d'Azospirillum sont capables de produire des phytohormones : acide indole acétique, acide indole lactique, gibberelline, diverses substances de type cytokinine (Gaskins et al., 1977, Reynders et Vlassak, 1978; Tien et al., 1979).

Les expériences que nous présentons maintenant ont eu pour objet de rechercher les relations pouvant exister entre le développement végétatif du riz et l'aptitude de quelques souches d'Azospirillum à synthétiser des phytohormones.

a - Relation entre la production de phytohormones par Azospirillum et le développement du riz à 3 semaines.

Certaines souches d'Azospirillum de notre collection (070: n°31, S29: n°14, R07: n°2 et Sp7: n°1), ont été analysées par Diem et Tien par chromatographie liquide à haute pression (résultats non publiés) au Département de Science du Sol de l'Université de Floride (Gainesville), pour leur aptitude à produire des phytohormones.

Nous avons reporté à la figure 28 la production d'acide indole acétique, d'acide gibbèrellique et de cytokinine par les Azospirillum 070, S29, R07 et Sp7, et à la figure 29 le poids sec des plantes et l'ARA rhizosphérique à 3 semaines de systèmes "sol-riz" inoculés par ces souches.

Nous remarquons à nouveau qu'il n'y a aucune relation entre poids sec des plantes et ARA rhizosphérique (sur sol gris ou sur sol de Bel-Air). Par contre, apparaît assez nettement une corrè-

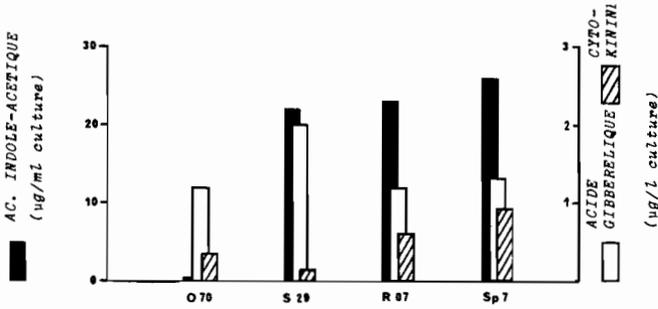


Fig. 28. Analyse des phytohormones produites in vitro par quatre souches d'Azospirillum (O70, S29, R07, Sp7) cultivées en présence de tryptophane (50 mg/l).

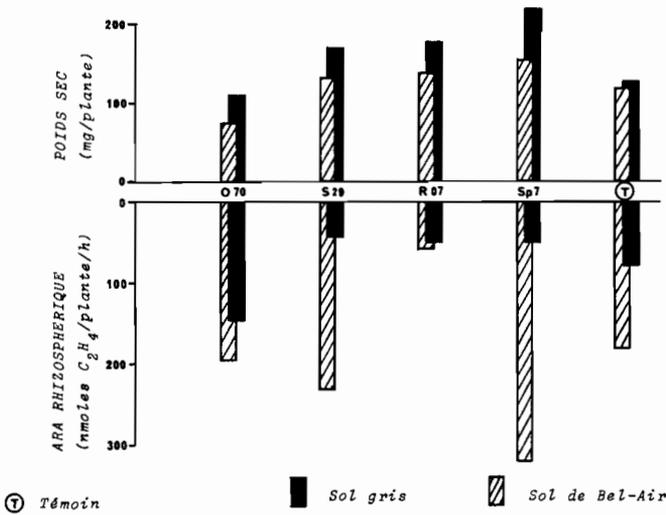


Fig. 29. Effet de l'inoculation de systèmes "sol-riz" par quatre souches d'Azospirillum (O70, S29, R07, Sp7) sur le poids

lation entre la production d'AIA in vitro et le poids sec des plantes: le poids sec des plantes inoculées par l'Azospirillum 070 qui produit très peu d'AIA, est nettement plus faible que le poids sec des plantes inoculées par les trois autres souches d'Azospirillum dont la production en AIA est forte. Ce résultat se vérifie à la fois sur sol gris et sur sol de Bel-Air. L'effet bénéfique sur le développement du riz de l'inoculation par Azospirillum semble donc être lié plus précisément à cette phytohormone.

b - Inoculation du riz cv. Moroberekan par Azospirillum Sp7 et Azospirillum 7204 (mutant fix⁻ de Sp7)

Des graines de riz préalablement axénisées (2mn dans HgCl₂ 1%) ont été introduites sur un mélange sable (9/10) - sol gris (1/10) stérile ou non stérile. Ces systèmes ont été inoculés 3 jours plus tard par les Azospirillum Sp7 et Sp7204 (fix⁻) introduits à raison de 10⁸ bactéries par gramme de mélange sable + sol. Nous avons mesuré l'ARA rhizosphérique et le poids sec des plantes à 3 semaines. Les résultats obtenus figurent au tableau 33.

L'introduction des souches Sp7 ou Sp7204 en conditions non stériles ne modifie pas sensiblement l'activité nitrogénasique et le développement végétatif du riz.

Dans le cas des systèmes stériles, par contre, des différences importantes peuvent être observées. Seuls les systèmes inoculés par la souche Sp7 réduisent l'acétylène; ce résultat était aisément prévisible car la souche Sp7204 n'est pas fixatrice de N₂. On remarquera surtout, que les deux souches provoquent une augmentation très significative (environ 75%) du poids sec des plantes. Cette stimulation du développement du riz est probablement liée à la production par ces souches de phytohormones. Le fait que la

Tableau 33. Inoculation de systèmes "sol-riz" stériles ou non stériles par Azospirillum Sp7 et un mutant fix⁻, Azospirillum 7204 : effet sur le poids sec des plantes et l'ARA rhizosphérique à 3 semaines.

Inoculum	Systèmes non stériles		Systèmes stériles	
	A R A (nmoles C ₂ H ₄ /h)	Poids sec (mg)	A R A (nmoles C ₂ H ₄ /h)	Poids sec (mg)
Témoin	85 a	215 a	0 a	146 a
Sp7	73 a	192 a	8 b	235 b
Sp7204	62 a	207 a	0 a	233 b

***Mélange sable (9/10) - sol gris (1/10) introduit dans des tubes de 50 x 500mm à raison de 200 g de mélange par tube,ensemencé par du riz cv. Moroberekan (6 graines par tube)

***Témoin: culture d'Azospirillum autoclavée

AB : Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à P = 0,05.

souche Sp7204 provoque sur le riz le même accroissement de poids sec que la souche Sp7, semble indiquer que la mutation qui la rend incapable de fixer N_2 , n'a pas affecté son aptitude à synthétiser des phytohormones.

La mise en évidence de l'effet bénéfique sur le développement du riz de deux souches d'Azospirillum dont l'une (Sp7204) est incapable de fixer N_2 , nous paraît constituer une preuve supplémentaire en faveur du rôle des régulateurs de croissance.

4. CONCLUSIONS

Suivant que l'on considère des plants de riz jeunes (3 semaines) ou à maturité, les effets de l'inoculation du sol par des fixateurs de N_2 peuvent être très différents.

Dans le cas de plantes de 3 semaines, l'introduction de fixateurs de N_2 dans la rhizosphère peut modifier dans des proportions très importantes le développement de la plante (fig. 22). L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus, nous permet d'affirmer que pour des plantes jeunes il n'y a aucune relation entre la fixation de N_2 [C_2H_2] et le développement végétatif du riz (fig. 27). Il apparaît même que certaines souches peuvent avoir des effets inverses sur l'ARA rhizosphérique ou le poids sec des plantes en fonction du sol utilisé (tableau 31). La variabilité des effets de l'inoculation suivant la souche introduite ou le type de sol est probablement la conséquence d'interactions entre le microorganisme introduit et la microflore native (dans le chapitre précédent, nous avons donné quelques exemples illustrant l'incidence éventuelle de telles interactions sur les fixateurs de N_2).

L'absence de corrélation entre le développement de la plante et l'ARA rhizosphérique permet de penser que les augmentations de rendement pourraient être dues à la production de phytohormones plutôt qu'à la fixation de N_2 . Les résultats que nous avons obtenus dans le cas de plants de riz de 3 semaines inoculés avec A. brasilense Sp7 ou un mutant fix^- de cette souche (A. brasilense Sp7204), constituent un argument supplémentaire en faveur du rôle des phytohormones produites par Azospirillum: on obtient avec l'une et l'autre souche une augmentation très significative (environ 75%) du poids sec des plantes (tableau 33). L'effet bénéfique de certaines souches d'Azospirillum sur le développement du riz paraît être lié

plus précisément à leur aptitude à produire de l'acide indole-acétique: nous avons observé dans le cas de quatre souches d'Azospirillum capables de produire diverses phytohormones une corrélation positive entre leur production d'AIA in vitro (fig. 28), et les poids secs correspondants de plants de riz de 3 semaines inoculés par ces souches (fig. 29).

Si l'on peut dans le cas d'essais de laboratoire concernant des plantes jeunes, améliorer de façon très significative le développement végétatif du riz en introduisant dans le sol certaines souches d'Azospirillum, il n'en va pas de même in situ avec des plantes cultivées jusqu'à maturité; l'effet sur les rendements en grains est très limité dans le cas de cultures en pots, et nul en parcelles de 2m^2 (fig. 23). Nous avons attribué cette inefficacité de l'inoculation au déclin du nombre des bactéries introduites (environ 3 puissances de 10) au cours de la croissance du riz (fig. 25). L'effet bénéfique de l'inoculation ne peut être durable que dans la mesure où le microorganisme introduit vit en étroite association avec la plante, et se multiplie dans la rhizosphère au fur et à mesure du développement racinaire. Or tel n'est pas le cas. Il nous paraît donc illusoire d'espérer accroître les rendements en riz par inoculation bactérienne. Cela ne signifie évidemment pas que la plante ne tire pas bénéfice de la présence de fixateurs de N_2 rhizosphériques. App et al. (1980) ont estimé que la fixation de N_2 rhizosphérique correspondait à environ 20% de l'azote assimilé par la plante, et Ito et Watanabe (1981) ont montré que l'azote fixé était plus rapidement assimilé par le riz que l'azote combiné. Il est probable qu'au cours de son développement jusqu'à maturité le riz bénéficie à la fois de l'azote fourni par

les fixateurs de N_2 et de leur aptitude à produire des phytohormones. Mais en l'état actuel de nos connaissances, il nous est impossible de faire la part de l'un et l'autre phénomènes.

Au cours des toutes dernières années les essais d'inoculation ont été très fréquents dans le cas de cultures sur sols exondés (maïs, blé, sorgho, graminées fourragères) inoculées avec diverses souches d'Azospirillum (cf. notamment Boddey et Döbereiner, 1982). Comme nous l'avons nous même constaté avec des plants de riz de 3 semaines, l'effet de ces inoculation est extrêmement variable. Ainsi, selon Albrecht et al. (1977), l'inoculation du maïs par A. brasilense n'a aucun effet. A l'inverse, Okon et al. (1981) observent que l'inoculation de divers cultivars de maïs, de sorgho ou de graminées fourragères par A. brasilense, a un effet très marqué à la fois sur l'ARA rhizosphérique et les rendements. Nous mentionnerons également les travaux effectués par Smith et al. (1976, 1977, 1978) en Floride: sur 40 génotypes appartenant à cinq genres de graminées tropicales, seuls deux génotypes, Digitaria decumbens var. transvala et Panicum maximum, répondent positivement à l'inoculation par A. brasilense; bien que l'inoculation ait apporté dans certains cas jusqu'à 40 kg d'azote à l'hectare (Smith et al., 1977), aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les rendements et les ARA rhizosphériques (Smith et al., 1978).

Perspectives agronomiques

Les résultats de nos essais en parcelles de $2m^2$ paraissent exclure la possibilité d'améliorer les rendements en riz par inoculation.

Dans le cas de graminées cultivées sur sols exondés par contre, des augmentations significatives de rendements ont parfois

été obtenus par inoculation avec A. brasilense. Parmi les travaux les plus récents, citons ceux de Hegazi et al. (1981) concernant des essais d'inoculation de blé en Egypte, ainsi que ceux de Okon et al. (1981) et Kapulnik et al. (1981) réalisés en Israël avec le maïs, le sorgho, le blé et diverses graminées fourragères ; selon ces différents auteurs, l'inoculation par A. brasilense aurait un effet marqué à la fois sur les rendements et l'ARA rhizosphérique. Les plantes inoculées bénéficieraient donc à la fois de l'azote fixé par Azospirillum et de son aptitude à produire des phytohormones.

La possibilité d'améliorer les rendements par inoculation avec des fixateurs de N_2 pourrait être liée au type de culture (culture sur sol engorgé ou culture sur sol exondé). Dans le cas de culture sur sol exondé, les augmentations de rendements observées par certains auteurs sont probablement la conséquence d'un accroissement relatif du nombre de fixateurs de N_2 dans la rhizosphère des plantes inoculées, phénomène facilité par le fait qu'il s'agit de sols sableux n'ayant jamais été irrigués avant leur mise en culture, et dont la microflore native est faible. Dans le cas du riz cultivé sur sol engorgé, par contre, la proportion de fixateurs de N_2 au sein de la microflore rhizosphérique est si forte qu'il nous paraît illusoire d'espérer l'améliorer de façon significative par inoculation. Tout au plus pourra-t-on modifier sensiblement la composition de la microflore fixatrice en remplaçant certaines composantes de cette microflore par un microorganisme plus efficace. Les essais d'inoculation que nous avons effectués sur parcelles de $2m^2$ ont échoué en raison

du déclin de l'inoculum au sein de la microflore native. Une solution à ce problème pourrait consister à utiliser non plus un inoculum classique constitué par une souche fixatrice de N_2 , mais un inoculum mixte "fixateurs de N_2 -actinomycètes compatibles", les actinomycètes associés ayant pour effet de faciliter l'introduction des fixateurs de N_2 dans la rhizosphère du riz (cf. Chapitre II).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La fixation de N_2 dans la rhizosphère du riz est d'abord fonction de la plante et de la microflore fixatrice associée aux racines, l'un et l'autre des partenaires de cette association étant sous la dépendance de facteurs de l'environnement qui agissent sur le système.

Le premier objectif du travail présenté ici a consisté en une analyse détaillée, à la fois qualitative et quantitative, de la microflore hétérotrophe aérobie de la rhizosphère du riz. Au sein de cette microflore, nous avons bien évidemment étudié de façon plus approfondie les microorganismes fixateurs de N_2 .

Dans une seconde étape, nous avons étudié quelques uns des principaux facteurs susceptibles de contrôler la fixation rhizosphérique de N_2 . En particulier, et cela nous paraît important, nous avons montré que la rhizosphère du riz était le siège d'interactions entre la microflore fixatrice et d'autres organismes rhizosphériques ayant pour effet de stimuler ou au contraire de limiter le développement de cette microflore ; nous en avons donné divers exemples qui nous paraissent bien illustrer la complexité du système "sol-riz".

Enfin, le dernier volet de notre étude a consisté à préciser l'effet de la microflore fixatrice de N_2 sur la croissance du riz, et à rechercher l'origine de cet effet.

PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

- Microflore rhizosphérique fixatrice de N₂

La microflore fixatrice de N₂ est extrêmement variée : nous avons isolé des souches appartenant aux genres Azospirillum, Pseudomonas, Alcaligenes, Enterobacter, Aquaspirillum, Aeromonas, ainsi que des souches corynéformes.

Une étude taxonomique des souches d'Azospirillum, fondée sur l'analyse de 251 caractères, nous a permis de les subdiviser en deux ensembles A et B distincts. Cette distinction qui est due pour l'essentiel au nombre de substrats carbonés utilisés, porte également sur l'activité nitrogénasique spécifique des souches ainsi que sur leur contenu plasmidique. Nos résultats remettent en cause la subdivision du genre Azospirillum en deux espèces : A. brasilense et A. lipoferum, proposée par Tarrand et al. en 1978. Les souches corynéformes que nous avons isolées se différencient nettement des corynébactéries déjà décrites comme étant fixatrices de N₂, qu'elles appartiennent aux genres Corynebacterium ou Arthrobacter. Elles correspondent donc probablement à une nouvelle espèce. Le genre Pseudomonas a été longtemps réputé ne pas comprendre d'espèces fixatrices de N₂ (Stanier et al., 1966). Notre étude apporte désormais la preuve irréfutable de l'aptitude de souches du genre Pseudomonas à fixer N₂. Enfin, c'est à notre connaissance la première fois que des souches appartenant aux genres Alcaligenes et Aeromonas sont décrites comme étant fixatrices de N₂.

La proportion des fixateurs de N_2 au sein de la microflore flore totale est forte. Toutes les souches isolées ont en commun la propriété d'être microaérophiles pour la fixation de N_2 . La moitié d'entre elles sont également capables d'utiliser la pectine comme source de carbone, ce qui facilite probablement leur insertion dans le cortex racinaire au niveau des espaces intercellulaires.

- Rôle de la plante

La microflore rhizosphérique s'alimente dans une large mesure à partir des exsudats et des produits de décomposition des racines.

La plante joue également un rôle essentiel dans la distribution de la microflore rhizosphérique : nous avons constaté que la distribution qualitative et quantitative de cette microflore est très différente suivant le compartiment de la rhizosphère considéré (sol rhizosphérique, rhizoplan, endo-rhizosphère).

La fixation de N_2 (C_2H_2) peut varier dans de grandes proportions suivant le cultivar utilisé ; les expériences effectuées avec des mutants de riz, ont confirmé le contrôle de la fixation de N_2 par le génotype de la plante.

- Répression de la synthèse de la nitrogénase par l'ion NH_4^+

Cette répression n'est que temporaire dans la rhizosphère du riz en raison de la nutrition azotée de la plante. Des

apports modérés d'azote combiné stimulent au contraire l'exsudation racinaire, ce qui provoque une amélioration sensible de la fixation de N_2 . Pour une association plante-bactéries, l'effet de l'azote combiné sur la fixation de N_2 peut donc être bénéfique.

- Interactions entre les fixateurs de N_2 et d'autres organismes rhizosphériques

Le sol constituant le "milieu" dans lequel se développe la plante, son incidence sur la fixation rhizosphérique de N_2 est évidente. De fait, nous avons observé que l'ARA rhizosphérique peut varier dans de très grandes proportions suivant le type de sol. Toutefois, aucune relation simple n'a pu être mise en évidence entre l'ARA rhizosphérique et les principales caractéristiques physico-chimiques de 21 sols de rizière du Sénégal. Cette absence de relation suggère l'intervention de facteurs biologiques susceptibles d'interagir avec cette microflore. Nous avons donné trois exemples illustrant ce type d'interaction.

1 - L'association entre une bactérie pectinolytique (RP2) et l'Azospirillum Sp7 qui est incapable d'utiliser la pectine comme seule source de carbone mais assimile ses produits de dégradation, se traduit par une amélioration significative de l'ARA rhizosphérique et de la croissance du riz. Cet effet bénéfique permet de penser que les bactéries pectinolytiques pourraient favoriser la colonisation par les fixateurs de N_2 du cortex racinaire au niveau des espaces intercellulaires composés de pectine, et stimuler leur activité en mettant à leur disposition des substrats provenant de la dégradation de la pectine.

2 - Nous avons mis en évidence l'effet antagoniste d'actinomycètes vis à vis de la microflore fixatrice de N_2 . Il est apparu toutefois que l'on pourrait mettre à profit l'aptitude des actinomycètes à synthétiser des substances antibiotiques, en sélectionnant des fixateurs de N_2 résistants aux antibiotiques produits : nous avons ainsi réalisé un inoculum mixte "fixateurs de N_2 -actinomycètes", plus efficace que l'inoculum "fixateurs de N_2 seuls".

3 - Nous avons montré que les nématodes parasites du riz du genre Hirschmanniella doivent être considérés comme un facteur limitant majeur de la fixation de N_2 .

- Effet de la microflore fixatrice de N_2 sur la croissance du riz

Nous avons procédé à des essais d'inoculation de systèmes "sol-riz" avec de nombreuses souches fixatrices de N_2 rhizosphériques.

Dans le cas de plantes jeunes (3 semaines) l'introduction d'un fort inoculum dans la rhizosphère du riz peut modifier dans des proportions importantes le développement du riz. Toutefois, l'effet de l'inoculation est extrêmement variable suivant la souche introduite ou le type de sol, en raison très probablement d'interactions entre l'inoculum et la microflore native.

Dans le cas de plantes cultivées jusqu'à maturité, l'inoculation (effectuée au niveau de la pépinière) est sans effet sur les rendements en grains. Nous avons attribué l'échec

de cette inoculation au déclin de l'inoculum au sein de la microflore native au cours du développement du riz. Ce résultat paraît exclure la possibilité d'améliorer les rendements en riz par inoculation. L'effet bénéfique de l'inoculation observé avec certaines souches dans de cas de plantes de 3 semaines, ne peut en effet être durable que dans la mesure où le microorganisme introduit vit en étroite association avec la plante et se multiplie dans la rhizosphère au fur et à mesure de son développement. Une solution à ce problème pourrait consister à utiliser un inoculum mixte "fixateurs de N_2 -actinomycètes".

- Aptitude de certaines souches fixatrices de N_2 à produire des phytohormones : effet sur la croissance du riz

Certaines souches fixatrices de N_2 (Azospirillum notamment) ont un effet marqué sur la croissance du riz au cours des trois premières semaines de son développement. Nous n'avons cependant trouvé aucune relation entre l'ARA rhizosphérique et le développement du riz. Par contre, l'inoculation de systèmes "sol-riz" stériles par l'Azospirillum Sp7 ou un mutant fixe de cette souche (Sp7204), s'est traduit dans l'un et l'autre cas par une augmentation très significative du poids sec des plantes, ce qui constitue un argument en faveur du rôle des phytohormones produites par Azospirillum.

L'effet bénéfique de certaines souches d'Azospirillum sur la croissance du riz paraît être lié plus précisément à leur aptitude à produire de l'acide indole acétique : nous avons observé avec quatre souches d'Azospirillum une corrélation positive entre leur production d'AIA in vitro et les poids secs

correspondants des plants de riz inoculés par ces souches. Il convient toutefois, de faire preuve de réserve car ces inoculations ont été effectuées sur sol non stérile.

Dans le cas de plantes cultivées jusqu'à maturité, il est probable que le riz bénéficie à la fois de l'azote fourni par les fixateurs de N_2 , et de leur aptitude à produire des phytohormones. Mais en l'état actuel de nos connaissances, il nous est impossible de faire la part de l'un et l'autre phénomène.

R E F E R E N C E S

- ALBRECHT, S.L., OKON, Y. & BURRIS, R.H. (1977).
Effects of light and temperature on the association between Zea mays and Spirillum lipoferum. Plant Physiol. 60: 528-531
- APP, A.A., WATANABE, I., ALEXANDER, M., VANTURA, W., DAEZ, C., SANTIAGO, T. & DE DATTA, S.K. (1980).
Non symbiotic nitrogen fixation associated with the rice plant in flooded soils. Soil Sci. 130: 283-289.
- ARMSTRONG, W. (1970). Rhizosphere oxydation in rice and other species: a mathematical model based on the oxygen flux component. Physiol. Plant. 23: 623-630.
- ASANUMA, S., TANAKA, H. & YATAZAWA, M. (1979).
Rhizoplane microorganisms of rice seedlings as examined by scanning electron microscopy, Soil Sci. Pl. Nutr. 25: 539-551.
- BABATOLA, J.O. & BRIDGE, J. (1979). Pathogenicity of Hirschmanniella oryzae, H. spinicaudata, and H. imamuri on rice. J. Nematol. 11: 128-132.
- BALANDREAU, J.P. & DOMMERGUES, Y.R. (1971).
Mesure in situ de l'activité nitrogenasique. C.R. Acad. Sci. Paris, sér. D 273: 2020-2023.
- BALANDREAU, J., WEINHARD, P., RINAUDO, G. & DOMMERGUES, Y. (1971).
Influence de l'intensité de l'éclaircissement de la plante sur la fixation non symbiotique de l'azote dans la rhizosphère. Oecol. Plant. 6: 341-351.
- BALANDREAU, J., RINAUDO, G., HAMAD-FARES, I. & DOMMERGUES, Y. (1975).
N₂ fixation in paddy soils. In: Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms, W.D.P. Stewart. (ed.), Cambridge University Press, pp. 57-70.
- BALANDREAU, J., RINAUDO, G., OUMAROV, M. & DOMMERGUES, Y. (1976).
Asymbiotic nitrogen fixation in paddy soils. In: Proc. Ist Intern. Symposium N₂-Fixation, Pullman, W.E. Newton & C.J. Nyman (eds), Washington state University Press, pp. 611-628.

- BALDENSPERGER, J.F. (1980). Heterotrophic nitrogen fixation (acetylene reduction) associated to flooded rice : a modified measurement technique in the field. *Plant Soil* 57: 439-453.
- BARBER, D.A. & MARTIN, J.K. (1976). The release of organic substances by cereal roots into soil. *New Phytol.* 76: 69-80.
- BAREA, J.M. & BROWN, M.E. (1974). Effects of plant growth produced by Azotobacter paspali related to synthesis of plant growth regulating substances. *J. Appl. Bacteriol.* 37: 583-593.
- BARRAQUIO, W.L. & WATANABE, I. (1981). Occurrence of aerobic nitrogen fixing bacteria in wetland and dryland plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 27: 121-125.
- BEIJERINCK, M.W. (1925). Uber ein Spirillum, welches freien Stickstoff binden kann. *Centr. Bacteriol. Parasitenk. II. Abt.* 63: 353-359.
- BERNDT, H., OSTWAL, K.P., LALUCAT, J., SCHUMANN, C., MAYER, F. & SCHLEZEL, H.G. (1976). Identification and physiological characterization of the nitrogen fixing bacterium Corynebacterium autotrophicum GZ29. *Arch. Microbiol.* 108: 17-26.
- BIANCHI, A. (1971). Distribution de certaines bactéries hétérotrophes aérobies dans les sédiments profonds de Méditerranée orientale. *Marine Biol.* 11: 106.
- BIANCHI, A.J.M., BIANCHI, M.A.G., BENSOUSSAN, M.G., BOUDABOUS, A., LIZARRAGA, M.L., MARTY, D. & ROUSSOS, S. (1974). Etude 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, CNRS, 1974.
- BODDEY, R.M. QUILT, P. & AHMAD, N. (1978). Acetylene reduction in the rhizosphere of rice: method of assay. *Plant Soil* 50: 567-574.

- BODDEY, R.M. & DOBEREINER, J. (1982). Associations of Azospirillum and other diazotrophs with tropical gramineae. In: Non-Symbiotic Nitrogen Fixation and Organic Matter in the Tropics, 12th Int. Congr. Soil Science, New Delhi, India, pp. 28-47.
- BONT, J.A.M. (De) & LEITJEN, M.W.M. (1976). Nitrogen fixation by hydrogen-utilizing bacteria. Arch. Microbiol. 107: 235-240.
- BOYLE, C.D. & PATRIQUIN, D.G. (1981). Endorhizal and exorhizal acetylene reducing activity in a grass. (Spartina alterniflora Loisel) - diazotrophe association. Plant Physiol. 66: 276-280.
- BROWN, M.E. & BURLINGHAM, S.K. (1968). Production of plant growth substances by Azotobacter chroococcum. J. Gen. Microbiol. 53: 135-144.
- BROWN, M.E. (1976). Role of Azotobacter paspali in association with Paspalum notatum. J. Appl. Bacteriol. 40: 341-348.
- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- CACCIARI, I. GIOVANNOZZI-SERMANNI, G., GRAPPELI, A. & LIPPI, D. (1971). Nitrogen fixation by Arthrobacter sp. I. Taxonomic study and evidence of nitrogenase activity of two new strains. Ann. Microbiol.(Roma) 21: 97-105.
- CACCIARI, I. & LIPPI, D. (1973). Nitrogen fixation by Arthrobacter sp.II. Ability to fix nitrogen by some Arthrobacter sp. isolated from soil. Ann. Microbiol. (Roma) 23: 69-73.
- DAY, J.M., NEVES, M.C.P. & DOBEREINER, J. (1975). Nitrogenase activity on roots of tropical grasses. Soil Biol. Biochem. 7: 107-112.
- DE, P.K. (1936). The problem of the nitrogen supply of rice. Part I: fixation of nitrogen in the rice soils under waterlogged conditions. Ind. J. Agric. Sci. 6: 1237-1242.
- DE, P.K. (1939). The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields. Proc. R. Soc. London 127 B: 121-139.

- DIEM, H.G., GODBILLON, G. & SCHMIDT, E.L. (1977). Application of the fluorescent antibody technique to the study of an isolate of Beijerinckia in soil. *Can J. Microbiol.* 23: 161-165.
- DIEM, H.G., ROUGIER, M., HAMAD-FARES, I., BALANDREAU, J. & DOMMERGUES, Y. (1978). Colonization of rice roots by diazotrophic bacteria. In: *Environmental Role of Nitrogen-fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria*. *Ecol. Bull. (Stockholm)* 26: 305-311.
- DIEM, H.G. & DOMMERGUES, Y.R. (1979). Significance and improvement of rhizospheric nitrogen fixation. In: *Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation*, N.S. Subba Rao (ed.), Oxford & IBH Publishing Co., pp. 190-226.
- DILWORTH, M.J. (1966). Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from Clostridium pasteurianum. *Biochem. Biophys. Acta.* 127: 285-294.
- DOBEREINER, J., DAY, J.M. & DART, P.J. (1972). Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the Paspalum notatum-Azotobacter paspali association. *J. Gen. Microbiol.* 71: 103-116.
- DOBEREINER, J. & DAY, J.M. (1974). Associative symbioses in tropical grasses. Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: *Proc. 1st Int. Symp. Nitrogen Fixation*, Washington State Univ., pp 513-538.
- DOBEREINER, J. & DAY, J.M. (1975). Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. In: *Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms*, W.D.P Stewart (ed.), Cambridge University Press, pp. 39-56.
- DOBEREINER, J. & DAY, J.M. (1976). Associative symbiosis and free-living systems. In: *Proc. 1st Int. Symp. Nitrogen Fixation*, W.E. Newton & C.J. Nyman (eds), Washington University Press, pp. 513-538.
- DOBEREINER, J. & BALDANI, V.L.D. (1979). Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant Azospirillum lipoferum and other bacteria. *Can J. Microbiol.* 25: 1264-1269.

- DOBBEREINER, J. & DE POLLI, H. (1981). Diazotrophic rhizocoenosis. In: Associative N_2 fixation, B. Vose & A.P. Ruschel (eds), Vol. I., CRC Press, Florida.
- DOMMARGUES, Y.R. & MUTAFTSCHIEV, S. (1965). Fixation synergique de l'azote atmosphérique dans les sols tropicaux. Ann. Inst. Pasteur 109: 112-120.
- DOMMARGUES, Y.R. (1978). The plant-microorganism system. In: Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and Plants, Y.R. Dommergues & S.V. Krupa (eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 1-36.
- DOMMARGUES, Y.R. & RINAUDO, G. (1979). Factors affecting N_2 fixation in the rice rhizosphere. In: Nitrogen and Rice, International rice Research Institute, Los Banos, Philippines, pp. 241-260.
- ESKEW, D.L. EAGLESHAM, R.J. & APP, A.A. (1981). Heterotrophic $^{15}N_2$ fixation and distribution of newly fixed nitrogen in a rice flooded soil system. Plant Physiol. 68: 48-52.
- FIRTH, P., THITIPOCA, H., SUTHIPRADIT, S., WETSELAAR, R. & BEECH, D.F. (1973). Nitrogen balance studies in the Central Plain of Thailand. Soil Biol. Biochem. 5: 41-46.
- FLORENZANO, G., MATERASSI, R. & FAVILLI, F. (1968). Indagini sperimentali sul sinergismo Beijerinckia-Lipomyces nell'azotofissazione, Ric. Sci. 38: 1273-1276.
- FOCHT, D.D. & JOSEPH, H. (1973). An improved method for the enumeration of denitrifying bacteria. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 37: 698-699.
- FORTUNER, R. & MERNY, G. (1979). Root-parasitic nematodes of rice. Rev. Nematol. 2: 79-102.
- FRANCHE, C. & ELMERICH, C. (1981). Physiological properties and plasmid content of several strains of Azospirillum brasilense and A. lipoferum. Ann. Microbiol. 132 A:3-18.

- FRAZIER, W.C.A. (1926). A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. Infect. Dis.* 39: 302-309.
- GARCIA, J.L., RAIMBAULT, M. JACQ, V., RINAUDO, G. & ROGER, P. (1974). Activités microbiennes dans les sols de rizière du Sénégal: relation avec les caractéristiques physicochimiques et influence de la rhizosphère. *Rev. Ecol. Biol. Sol* 11: 169-185.
- GASKINS, M.H., GARCIA, M., TIEN, T.M. & HUBBELL, D.H. (1977). N_2 fixation and growth substance production by Spirillum lipoferum and their effects on plant growth. *Plant Physiol.* 59 (Suppl.): 128.
- GAUTHIER, D. (1978). Etude de la fixation de l'azote chez Azospirillum brasiliensis. Thèse Doct. Spécialité, Univ. Paris VII.
- GERMANI, G., DIEM, H.G. & DOMMERGUES, Y. (1980). Influence of 1,2 dibromo-3-chloropropane fumigation on nematode population, mycorrhizal infection, N_2 fixation and yield of field grown groundnut. *Rev. Nématol.* 3: 75-78.
- GORDON, R.E., HAYNES, W.C. & HOR-NAY PANG (1973). The genus Bacillus. Agriculture, Handbook 427, Department of Agriculture, Washington.
- HABTE, M. & ALEXANDER, M. (1980). Effect of rice plants on nitrogenase activity of flooded soils. *Appl. Env. Microbiol.* 40: 507-510.
- HAMAD-FARES, I. (1976). La fixation de l'azote dans la rhizosphère du riz. Thèse d'état, Univ. Nancy I.
- HARDY, R.W.F. & KNIGHT, E., Jr. (1967). ATP- dependant reduction of azide and HCN by N_2 -fixing enzymes of Azotobacter vinelandii and Clostridium pasteurianum. *Biochemim. Biophys. Acta* 139: 69-90.
- HARDY, R.W.F., HOLSTEN, R.D., JACKSON, E.K. & BURNS, R.C. (1968). The acetylene ethylene assay for N_2 fixation; laboratory and field evaluation. *Pl. Physiol.* 43: 1185-1207.
- HARDY, R.W.F., BURNS, R.C. & HOLSTEN, R.D. (1973). Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 5: 47-81.

- HEGAZI, N.A., KHAWAS, H. & MONIB, M. (1981). Inoculation of wheat with Azospirillum under Egyptian conditions. In: Current Perspectives in Nitrogen Fixation, A.H. Gibson & W.E. Newton (eds), Austr. Acad. Sci., Canberra, p. 493.
- HILL, S. & POSTGATE, J.R. (1969). Failure of putative nitrogen-fixing bacteria to fix nitrogen. J. Gen. Microbiol. 58: 277-285.
- HILL, S. (1978). Factors influencing the efficiency of nitrogen fixation in free-living bacteria. In: Environmental Role of Nitrogen-fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria, Ecol. Bull. (Stockholm) 26: 130-136.
- HIROTA, Y. FUJII, T., SANO, Y. & IYAMA, S. (1978). Nitrogen fixation in the rhizosphere of rice. Nature 276: 416-417.
- HOLDEN, J. (1975). Use of nuclear staining to assess rates of cell death in cortices of cereal roots. Soil Biol. Biochem. 7: 333-334.
- HUGH, R. & LEIFSON, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bact. 66: 24-26.
- IRRI (1973). Modern varieties without fertilizer. IRRI Reporter 3/73. International Rice Research Institutes, Los Banos, Philippines.
- ISHIZAWA, S. SUZUKI, T. & ARARAGI, M. (1975). Ecological study of free-living nitrogen fixers in paddy soil. In: Nitrogen fixation and Nitrogen cycle, J.I.B.F. synthesis, H. Takahashi (ed.), Tokyo University Press, pp. 41-50.
- ITO, O., CABRERA, D. & WATANABE, I. (1980). Fixation of dinitrogen-15 associated with rice plants. Appl. Environ. Microbiol. 39: 554-558.
- ITO, O. & WATANABE, I. (1981). Immobilization, mineralisation and availability to rice plants of nitrogen derived from heterotrophic nitrogen fixation in flooded soil. Soil Sci. Pl. Nutr. 27: 169-176.
- JACKSON, M.L. (1960). Soil chemical analysis. Prentice-Hall inc., Englewood Cliffs, N.J.

- JENKINSON, D.S. & RAYNER, J.H. (1977). The turnover of soil organic matter in some of the Rothamsted classical experiments. *Soil Sci.* 123: 298-305.
- KAPULNIK, Y., KIGEL, J. OKON, Y., NUR, I. & HENIS, Y. (1981). Effect of Azospirillum inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, Sorghum and Panicum. *Plant Soil* 61: 65-70.
- KNOWLES, R. (1977). The significance of asymbiotic dinitrogen fixation by bacteria. In: A treatise on Dinitrogen Fixation, Sect. 4: Agronomy, R.W.F. Hardy & A.H. Gibson (eds.), Wiley & Sons New York, pp. 33-83.
- KOBAYASHI, M., KATAYAMA, T. & OKUDA, A. (1965). Nitrogen-fixing microorganisms in paddy soils. 13,14. Nitrogen fixation in mixed culture of photosynthetic bacteria (R. capsulatus species) with with other heterotrophic bacteria. (3) Association with B. subtilis (4) Association with B. megaterium. *Soil Sci. Plant Nutr.* 11: 74-83.
- KOBAYASHI, M., TAKAHASHI, E. & KAWAGUCHI, K. (1967). Distribution of nitrogen-fixing microorganisms in paddy soils of Southeast Asia. *Soil Sci.* 104: 113-118.
- KOCH, B. & EVANS, H.J. (1966). Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. *Pl. Physiol.* 41: 1748-1750.
- KOVACS, N. (1956). Identification of Pseudomonas pyocyanea by oxidase reaction. *Nature* 178: 703.
- KOYAMA, T. & APP, A. (1979). Nitrogen balance in flooded rice soils. In: Nitrogen and Rice, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, pp. 95-104.
- KRIEG, N.R. (1976). Biology of the chemioheterotrophic. Spirilla *Bacteriol. Rev.* 40: 55-115.
- KUSTER, E. & WILLIAMS, S.T. (1964). Solution of media for isolation for streptomycetes. *Nature* 202: 928-929.

- LEE, K.K. & WATANABE, I. (1977). Problems of acetylene reduction technique applied to water-saturated paddy soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 654-660.
- LEE, K.K. & YOSHIDA, T. (1977). An assay technique of measurement of nitrogenase activity in root zone of rice for varietal screening by the acetylene reduction method. *Plant Soil* 46: 127-134.
- LEE, K.K., ALIMAGNO, B. & YOSHIDA, T. (1977a). Field technique using the acetylene reduction method to assay nitrogenase activity and its association with the rice rhizosphere. *Plant Soil* 47: 519-526.
- LEE, K.T. CASTRO, T. & YOSHIDA, T. (1977b). Nitrogen fixation throughout growth, and varietal differences in nitrogen fixation by the rhizosphere of rice planted in pots. *Plant Soil* 48: 613-619.
- LINE, M.A. & LOUTIT, M.W. (1973). Nitrogen fixation by mixed cultures of aerobic and anaerobic microorganisms in an anaerobic environment. *J. Gen. Microbiol.* 74: 179-180.
- LOVELACE, T.E. & COLWELL, R.R. (1968). A multipoint inoculator for petri dishes. *Appl. Microbiol.* 18: 944-945.
- LOWRY, O.H. ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- LUXMOORE, R.J., STOLZY, L.H. & LETEY, J. (1970). Oxygen diffusion in the soil-plant system. *Agron. J.* 62: 317-332.
- MAC RAE, I.C. (1975). Effect of applied nitrogen upon acetylene reduction in the rice rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 7: 337-338.
- MACURA, J. (1968). Physiological studies of rhizosphere bacteria. In: *The Ecology of Soil Bacteria*, T.R.G. Gray & D. Parkinson (eds), Liverpool University Press, pp. 379-395.

- MAGDOFF, F.R. & BOULDIN, D.R. (1970). Nitrogen fixation in submerged soil-sand-energy material media and the aerobic-anaerobic interface. *Plant Soil* 33: 49-61.
- MANDEL, M., SCHILDKRAUT, C.L. & MARMUR, J. (1968). Use of CsCl density gradient analysis for determining the guanine plus cytosine content of DNA. In: *Methods in Enzymology*, vol. 12B, S.P. Colowick & N.O. Kaplan (eds), Academic Press Inc., New York, pp. 184-195.
- MARMUR, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.
- MARTIN, J.K. (1977). Factors influencing the loss of inorganic carbon from wheat roots. *Soil Biol. Biochem.* 9: 1-7.
- MATSUGUCHI, T., TANGCHAM, B. & PATIYUTH, S. (1975). Free-living nitrogen fixers and acetylene reduction in tropical rice field. *Jap. Agric. Res. Q.* 8: 253-256.
- MATSUGUSHI, T. (1979). Factors affecting heterotrophic nitrogen fixation in submerged rice soils. In: *Nitrogen and Rice*, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, pp. 207-222.
- MATSUGUCHI, T., SHIMOMURA, T. & LEE, S.K. (1979). Factors regulating acetylene reduction assay for measuring heterotrophic nitrogen fixation in waterlogged soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 25: 333-336.
- MATTHEWS, S.W. (1979). A cytological investigation of the association between *Azospirillum brasilense* and some C-4 grasses. Ph.D. Thesis, Univ. Florida, Gainesville.
- MAUDINAS, B., CHEMARDIN, M., YOVANOVITCH, E. & GADAL, P. (1981). Gnotobiotic cultures of rice plants up to ear stage in the absence of combined nitrogen source but in the presence of free-living nitrogen fixing bacteria *Azotobacter vinelandii* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *Plant Soil* 60: 85-97.

- NEAL, J.L., ATKINSON, T.G. & LARSON, R.I. (1970). Changes in the rhizosphere microflora of spring cheat induced by disomic substitution of a chromosome. *Can. J. Microbiol.* 16: 153-158.
- NEAL, J.L., RUBY, J.R., LARSON, R.I. & ATKINSON, T.G. (1973). Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. *Plant Soil* 39: 209-212.
- NEAL, J.L. (Jr) & LARSON, R.I. (1976). Acetylene reduction by bacteria isolated from the rhizosphere of wheat. *Soil Biol. Biochem.* 8: 151-155.
- OKON, Y., KAPULNIK, Y., SARIG, S., NUR, I., KIGEL, J. & HENIS, Y. (1981). Azospirillum increases cereal crop yields in fields of Israel. In: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, A.H. Gibson & W.E. Newton (eds), Austr. Acad. Sci., Canberra, p. 492.
- OKUDA, A., YAMAGUCHI, M. & KOBAYACHI, M. (1960). Nitrogen-fixing microorganisms in paddy soils. 5. Nitrogen fixation in mixed culture of photosynthetic bacteria (Rhodopseudomonas capsulatus species) with other heterotrophic bacteria (1). *Soil Plant Food* 6: 35-39.
- OLD, K.M. & NICOLSON, T.H. (1975). Electron microscopical studies of the microflora of roots in sand dune grasses. *New Phytol.* 74: 51-58.
- PANTHIER, J.J., DIEM, H.G. & DOMMERGUES, Y.R. (1979). A rapid method of enumerating and isolating soil actinomycetes antagonistic towards Rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* 11: 443-445.
- PARKER, C.A. (1955). Non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria in soil. II. Studies on Azotobacter. *Aust. J. Agric. Res.* 6: 388-397.
- PATEL, J.J. (1974). Antagonism of actinomycetes against Rhizobia. *Plant Soil* 41: 395-402.
- PROCTOR, M.H. & WILSON, P.M. (1961). Biotin in nitrogen fixation by a pseudomonad. *Z. Allg. Mikrobiol.* 1: 175.

- RAIMBAULT, M., RINAUDO, G., GARCIA, J.-L. & BOUREAU, M. (1977).
A device to study metabolic gases in the rice rhizosphere.
Soil Biol. Biochem. 9: 193-196.
- REMACLE, J. & ROUATT, J.W. (1968). Culture mixte d'Azotobacter chroococ-
cum et de germes pectinolytiques dans la rhizosphère de l'orge.
Ann. Inst. Pasteur 115: 745-754.
- REYNAUD, P.A., & ROGER, P.A. (1978). N₂-fixing algal biomass in
Senegal rice fields. In: Environmental Role of Nitrogen-fixing
Blue-green algae and Asymbiotic bacteria. Ecol. Bull.
(Stockholm) 26: 148-157.
- REYNDERS, L. & VLASSAK, K. (1979). Conversion of tryptophan to indol-
acetic acid by Azospirillum brasilense. Soil Biol. Biochem. 11:
547-548.
- RHODES, M.E. (1958). The cytology of Pseudomonas species as revealed
by a silver plating staining method. J. Gen. Microbiol 18: 829-836.
- RICE, WA, PAUL, E.A. & WETTER, L.R. (1967). The role of anaerobiosis
in a symbiotic nitrogen fixation. Can. J. Microbiol. 13: 829-836.
- RICHARD, D. (1968). Techniques rapides de recherche des lysine-décar-
boxylase, ornithine-décarboxylase et arginine-dihydrolase dans
les genres Pseudomonas, Alcaligenes et Moraxella. Ann. Inst.
Pasteur 114: 425-430.
- RINAUDO, G. (1970). Fixation biologique de l'azote dans trois
types de sols de rizières de Côte d'Ivoire. Thèse d'Ingénieur
Docteur, Univ. Montpellier.
- RINAUDO, G. BALANDREAU, J. & DOMMERGUES, Y. (1971). Algal and
bactériale non symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. Plant
Soil, Special Vol.: 471-479.
- RINAUDO, G. (1977). La fixation d'azote dans la rhizosphère du riz:
importance du type variétal. Cah. ORSTOM, sér. Biol. 12: 117-119.
- RINAUDO, G., HAMAD-FARES, I. & DOMMERGUES, Y. (1977). N₂ fixation in
the rice rhizosphere: methods of measurements; practices suggested
to enhance the process. In: Biological N₂-fixation in Farming
Systems of the Tropics, A. Ayanaba & P.J. Dart (eds), John Wiley
& Sons, pp. 313-324.

- RINAUDO, G., AUFEUVRE, M.A. & BOUREAU, M. (1978). Dispositif pour l'estimation de la fixation d'azote rhizosphérique en sol drainé ou engorgé. Cah. ORSTOM, sér. Biol. 13: 165-170.
- RINAUDO, G. & GERMANI, G. (1981). Effect of the nematodes Hirschmaniella oryzae and H. spinicaudata on the N₂ fixation in the rice rhizosphere. Rev. Nématol. 4: 171-172.
- RINAUDO, G., GAUTHIER, D. & DOMMERGUES, Y.R. (1981). Enhancement of associative N₂ fixation through manipulation of the rhizosphere microflora. In: Associative N₂ Fixation, B. Vose & A.P. Ruschel (eds), Vol. 1, CRC Press, Florida.
- ROGER, P.A. & KULASOORIYA, S.A. (1980). Blue-green algae and rice. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, 112 p.
- ROLAND, F., BOURDON, D. & SZTURM, S. (1947). Différenciation rapide des Enterobacteriaceae sans action sur le lactose. Ann. Inst. Pasteur 73: 914-916.
- ROUATT, J.W. & KATZNELSON, H. (1960). Influence of light on bacterial flora of roots. Nature 86: 659-660.
- ROUSSOS, S., GARCIA, J.L., RINAUDO, G. & GAUTHIER, D. (1980). Distribution de la microflore hétérotrophe aérobie et en particulier des bactéries dénitrifiantes et fixatrices d'azote libres dans la rhizosphère du riz. Ann. Microbiol. 131 A: 197-207.
- ROVIRA, A.D. (1959). Root excretions in relation to the rhizosphere effect. 4. Influence of plant species, age of plant, light, temperature and calcium nutrition on exudation. Plant Soil 11: 53-64.
- ROVIRA, A.D. (1969). Plant root exudates. Bot.Rev. 35: 35-37.
- RUBENCHIK, L.I. (1963). Azotobacter and its use in agriculture. Israel program for scientific translations, Jerusalem, Oldbourne Press, London, 278 p.

- RUSCHEL, A.P. HENIS, Y. & SALATI, E. (1975). Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugarcane seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 7: 181-182.
- SANO, Y., FUJII, T., IYAMA, S., HIROTA, Y. & KOMAGATA, K. (1981). Nitrogen fixation in the rhizosphere of cultivated and wild rice strains. *Crop. Sci.* 21: 758-761.
- SCHÖLLHORN, R. & BURRIS, R.H. (1966). Study of intermediates in nitrogen fixation. *Fed. Proc.* 25: 710.
- SCHÖLLHORN, R. & BURRIS, R.H. (1967). Acetylene as a competitive inhibitor of N_2 fixation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58: 213-216.
- SCHUBERT, K.R. & EVANS, H.J. (1976). Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73: 1207-1211.
- SEN, M.A. (1929). Is bacterial association a factor in nitrogen assimilation by rice plant. *Agric. J. India*, 24: 229-231.
- SIERRA, G.A. (1957). 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 23: 15-22.
- SINGH, R.N. (1961). Role of blue-green algae in nitrogen economy of Indian agriculture. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, 175 p.
- SKERMAN, V.B.D. (1967). A guide to the identification of the genera of bacteria. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- SLOGER, C. & SILVER, W.S. (1967). Biological reduction catalyzed by symbiotic nitrogen-fixing tissues. *Bacteriol. Proc.*, p 112.
- SMITH, L.A., HILL, S. & YATES, M.G. (1976). Inhibition by acetylene of conventional hydrogenase in nitrogen-fixing bacteria. *Nature* 262: 209-210.

- SMITH, R.L., BOUTON, J.H., SCHANK, S.L., QUESENBERRY, K.H., TYLER, M.E., MILAM, J.R., GASKINS, M.H. & LITTELL, R.C. (1976). Nitrogen fixation in grasses inoculated with Spirillum lipoferum. Science 193: 1003-1005.
- SMITH, R.L. BOUTON, J.H. SCHANK, S.C. & QUESENBERRY, K.H. (1977). Yield increases of tropical grain forage grasses after inoculation with Spirillum lipoferum in Florida. In: Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems in the Tropics, A. Ayanaba & P.J. Dart (eds)., John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 307-311.
- SMITH, R.L., SCHANK, S.C., BOUTON, J.H. & QUESENBERRY, K.H. (1978). Yield increases of tropical grasses after inoculation with Spirillum lipoferum. Ecol. Bull. (Stockholm) 26: 380-385.
- SMYK, B. (1970). Fixation of atmospheric nitrogen by the strains of Arthrobacter. Zentbl. Bakt. Parasitenk. Abt II, 124: 231-237.
- STANIER, R.Y. PALLERONI, N.J. & DOUDOROFF, M. (1966). The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43: 159-271.
- STEWART, W.D.P., FITZGERALD, G.P. & BURRIS, R.H. (1967). In situ studies on N₂ fixation, using the acetylene reduction technique. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58: 2071-2078.
- STRENGTH, W.J., ISANI, B., LINN, D.M., WILLIAMS, F.D. VANDERMOLLEN, G.E. LAUGHON, B.E. & KRIEG, N.R. (1976). Isolation and characterization of Aquaspirillum fasciculus sp. nov., a rod-shaped nitrogen-fixing bacterium having unusual flagella. Int. J. Syst. Bacteriol. 26: 253-268.
- TARRANT, J.J. KRIEG, N.R. & DOBEREINER, J. (1978). A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus, Azospirillum gen. nov. and two species, Azospirillum lipoferum (Beijerinck) comb. nov. and Azospirillum brasilense sp. nov. Can. J. Microbiol. 24: 967-980.
- TIEN, T.M., DIEM, H.G. GASKINS, M.H. & HUBBLELL, D.H. (1981). Production of polygalacturonic acid trans-eliminase by Azospirillum species. Canad. J. Microbiol. 27: 426-431.

- TROLLDENIER, G. (1977). Influence of some environmental factors on nitrogen fixation in the rhizosphere of rice. *Plant Soil* 47: 203-217.
- UMALI-GARCIA, M., HUBBELL, D.H. & GASKINS, M.H. (1978). Process of infection of Panicum maximum by Spirillum lipoferum. In: Environmental Role of Nitrogen-fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria. *Ecol. Bull.* (Stockholm) 26: 373-379.
- VANCURA, V. (1961). Detection of gibberellic acid in Azotobacter cultures. *Nature* 192: 88-89.
- VENKATESAN, R. & RANGASWAMI, G. (1964). Quantitative and qualitative studies of actinomycetes population from non-rhizosphere soil rhizosphere of rice and stubble root surface. *Ind. J. Microbiol.* 4: 110-120.
- VOETS, J.B. & DEBACKER, J. (1956). Pseudomonas azotogensis nov. sp., a new free-living nitrogen-fixing bacterium. *Naturwissenschaften* 43: 40-41.
- VON BULOW, J.F.W. & DOBEREINER, J. (1975). Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72: 2389-2393.
- WADA, H., PANICHSAKPATANA, S. KIMURA, M. & TAKAI, Y. (1979). Organic debris as micro-site for nitrogen fixation. *Soil Sci. Plant Nutr.* 25: 453-456.
- WAID, J.S. (1974). Decomposition of roots. In: *Biology of plant litter decomposition*, C.H. Dickinson & G.J.F. Pugh (eds), vol. I. Academic Press, London, pp. 175-211.
- WATANABE, I., LEE, K.K., ALIMAGNO, B.V. SATO, M., DEL ROSARIO, D.C. & De GUZMAN, M.R. (1977). Biological nitrogen fixation studies by in situ acetylene-reduction assays. IRR Research Paper series N°3, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- WATANABE, I. (1978). Biological nitrogen fixation in rice soils. In: *Soils and Rice*, International Rice Research Institute, Los Banos Philippines, pp. 465-478.

- WATANABE, I. & BARRAQUIO, W.L. (1979). Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living N_2 -fixing organisms from rice roots. *Nature* 277: 565-566.
- WATANABE, I. & FURUSAKA, C. (1980). Microbial ecology of flooded rice soils. In: *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 4, M. Alexander (ed.), Plenum Publishing corporation, pp. 125-168.
- WETSELAAR, R. (1981). Nitrogen inputs and outputs of an unfertilized paddy field. In: *Terrestrial Nitrogen Cycles*, *Ecol. Bull.* (Stockholm) 33: 573-583.
- WIEGIEL, J. & SCHLEGEL, H.G. (1976). Enrichment and isolation of nitrogen fixing hydrogen bacteria. *Arch. Microbiol.* 107: 139-142.
- YAMAGUCHI, M. (1979). Biological nitrogen fixation in flooded rice field. In: *Nitrogen and Rice*, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, pp. 193-204.
- YOSHIDA, T. & ANCAJAS, R.R. (1971). Nitrogen fixation by bacteria in the root zone of rice. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 35: 156-158.
- YOSHIDA, T., ANCAJAS, R.R. & BAUTISTA, E.M. (1973). Atmospheric nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms in a submerged Philippine soil. *Soil Sci. Pl. Nutr.* 19: 117-123.
- YOSHIDA, T. & ANCAJAS, R.R. (1973). Nitrogen fixing activity in upland and flooded rice fields. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 37: 42-45.
- YOSHIDA, T. & RINAUDO, G. (1982). Heterotrophic N_2 fixation in paddy soils In: *Microbiology of Tropical soils and Plant Productivity*. Y. Dommergues, & H.G. Diem (eds), Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 75-107.
- ZUBERER, D.A. & SILVER, W.S. (1979). N_2 fixation (acetylene reduction) and the microbial colonization of mangrove roots. *New Phytol.* 82: 467-471.

ANNEXES

QUELQUES CARACTERISTIQUES DES SOLS UTILISES

Sol		Texture**	C %	N %	pH ***
Djibélor	} Sénégal	LAS	33,0	2,5	6,1
Boundoum		A	13,5	0,6	6,5
Dakar-Bel-Air		S	3,0	0,3	7,2
Dianaba (Sol gris)		LS	3,1	0,3	6,5
Dabou	} Côte d'Ivoire	A	47,0	2,9	6,3
Abengourou		LA	31,7	2,3	6,6
Yamoussokro		SL	17,8	1,5	6,9
Las Adrien (Camargue)		LA	12,0	1,5	7,4

**Texture: A: argile; LA: limon argileux; LS: limon sableux; LAS: limon argilo-sableux; S: sable; SL: sable limoneux.

***Le pH a été mesuré sur des sols maintenus 3 semaines en conditions de submersion.

PUBLICATIONS

1. RINAUDO, G. (1970). Fixation biologique de l'azote dans trois types de sols de rizières de Côte d'Ivoire - Thèse d'Ingénieur Docteur, Faculté des Sciences de Montpellier.
2. RINAUDO, G., BALANDREAU, J. & DOMMERGUES, Y. (1971). Algal and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. *Plant Soil, Special Volume* : 471-479.
3. RINAUDO, G. & DOMMERGUES, Y. (1971). Validité de l'estimation de la fixation biologique de l'azote dans la rhizosphère, par la méthode de réduction de l'acétylène - *Ann. Inst. Pasteur* 121 : 93-99.
4. BALANDREAU, J., WEINHARD, P., RINAUDO, G. & DOMMERGUES, Y. (1971). Influence de l'intensité de l'éclairement de la plante sur la fixation non symbiotique de l'azote dans la rhizosphère - *Oecol. Plant.* 6 : 341-351.
5. WEINHARD, P., BALANDREAU, J., RINAUDO, G. & DOMMERGUES, Y. (1971). Fixation non symbiotique de l'azote dans la rhizosphère de quelques non légumineuses tropicales - *Rev. Ecol. Biol. Sol* 8 : 367-373.
6. DOMMERGUES, Y., BALANDREAU, J., RINAUDO, G. & WEINHARD, P. (1973). Non-symbiotic nitrogen fixation in the rhizosphere of rice, maize and different tropical grasses - *Soil Biol. Biochem.* 5 : 83-89.
7. RINAUDO, G. (1974). Fixation biologique de l'azote dans trois types de sols de rizières de Côte d'Ivoire - *Rev. Ecol. Biol. Sol* 11 : 149-168.
8. GARCIA, J.-L., RAIMBAULT, M., JACQ, V., RINAUDO, G. & ROGER, P. (1974). Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal : relations avec les propriétés physico-chimiques et influence de la rhizosphère - *Rev. Ecol. Biol. Sol* 11 : 169-185.

9. BALANDREAU, J., RINAUDO, G., HAMAD-FARES, I. & DOMMERGUES, Y. (1975). Nitrogen fixation in the rhizosphere of rice plant. In : Stewart, W.D.P. (ed.). Nitrogen Fixation by Free Living Microorganisms, pp. 57-70, Cambridge University Press.
10. BALANDREAU, J., RINAUDO, G., OUMAROV, M. & DOMMERGUES, Y. (1976). Asymbiotic nitrogen fixation in paddy soils - In : Newton, W.E. & Nyman C.J. (eds.) Proc. 1st Intern. Symposium N₂-Fixation, pp. 611-628. Pullman, Washington State University Press.
11. RAIMBAULT, M., RINAUDO, G., GARCIA, J.-L. & BOUREAU, M. (1977). A device to study metabolic gases in the rice rhizosphere - Soil Biol. Biochem. 9 : 193-196.
12. RINAUDO, G., HAMAD-FARES, I. & DOMMERGUES, Y. (1977). N₂-fixation in the rice rhizosphere : methods of measurements ; practices suggested to enhance the process - In : Ayanaba, A. & Dart, P.J. (eds.) Biological N₂-fixation in Farming Systems of the Tropics, pp. 313-324, John Wiley & Sons.
13. RINAUDO, G. (1977). La fixation d'azote dans la rhizosphère du riz : importance du type variétal - Cah. ORSTOM, sér. Biol. 12 : 117-119.
14. ROGER, P., REYNAUD, P., RINAUDO, G., DUCERF, P. & TRAORE, T. (1977). Mise en évidence de la distribution log normale de l'activité réductrice d'acétylène in situ. Cah. ORSTOM sér. Biol. 12 : 133-139.
15. BALANDREAU, J., DUCERF, P., HAMAD-FARES, I., WEINHARD, P., RINAUDO, G., MILLIER, C. & DOMMERGUES, Y. (1978). Limiting factors in grass nitrogen fixation - In : Dobereiner, J., Burris, R.H. & Hollaender, A. (eds.). Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics, pp. 275-302, Plenum Press, New York & London.

16. RINAUDO, G., AUFEUVRE, M.A. & BOUREAU, M. (1978). Dispositif pour l'estimation de la fixation d'azote rhizosphérique en sol drainé ou engorgé - Cah. ORSTOM, sér. Biol. 13 : 165-170.
17. DOMMERGUES, Y. & RINAUDO, G. (1979). Factors effectings N_2 -fixation in the rice rhizosphere. In : Nitrogen and Rice, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, pp. 241-260.
18. GANRY, F., GUEYE, F., RINAUDO, G. & DOMMERGUES, Y. (1979). Reduction of nitrogen losses during the composting process by inoculation with *Beijerinckia* and *Enterobacter cloacae* - In : Proc. Int. Symp. Humus et Planta, pp. 327-330.
19. ROUSSOS, S., GARCIA, J.-L., RINAUDO, G. & GAUTHIER, D. (1980). Distribution de la microflore hétérotrophe aérobie et en particulier des bactéries dénitrifiantes et fixatrices d'azote libres, dans la rhizosphère du riz - Ann. Microbiol. 131 A : 197-207.
20. RINAUDO, G., GAUTHIER, D. & DOMMERGUES, Y. (1981). Enhancement of associative N_2 -fixation through manipulation of the rhizosphere microflora - In : Associative N_2 Fixation, Vose, B. & Ruschel, A.P. (eds.), Vol. 1, CRC Press, Florida.
21. GAUTHIER, D. & RINAUDO, G. (1981). Etudes de quelques souches d'*Azospirillum* isolées au Sénégal : effet de l'inoculation par ces souches d'un système sol-riz non stérile - Cah. ORSTOM, sér. Biol. 43: 27-31.
22. RINAUDO, G. & GERMANI, G. (1981). Effect of the nematode *Hirschmanniella spinicaudata* on the nitrogen fixation in the rice rhizosphere - Cah. Nematol. 4 : 171-172.

23. RINAUDO, G. DREYFUS, B. & DOMMERGUES, Y. (1981). *Sesbania rostrata* as a green-manure for rice in West Africa. In : Workshop on Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture, Cali, Columbia, March 1981.
24. RINAUDO, G., DREYFUS, B. & DOMMERGUES, Y. (1982). *Sesbania rostrata* green-manure and the nitrogen content of rice crop and soil. Soil. Biol. Biochem (à paraître).
25. YOSHIDA, T. & RINAUDO, G. (1982). Heterotrophic N₂ fixation in paddy soils. In : Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity. Dommergues, Y. & Diem, H.G. (eds.), Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 75-107.

T A B L E D E S M A T I E R E S

	Pages
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
<u>CHAPITRE I</u> : ETUDE DE LA MICROFLORE HÉTÉROTROPHE AÉROBIE FIXATRICE DE N ₂ DANS LA RHIZOSPHERE DU RIZ	7
1. INTRODUCTION	9
2. MATERIEL ET METHODES	11
2.1. Méthodes d'étude de la distribution de la microflore hétérotrophe aérobie dans les trois compartiments de la rhizosphère du riz	
2.1.1. Prélèvement des échantillons	
2.1.2. Numération des différents groupes de micro- organismes	12
2.1.3. Isolement et identification sommaire des bactéries	13
2.2. Isolement de fixateurs de N ₂ endorhizosphériques à partir de racines stérilisées en surface	14
2.2.1. Stérilisation superficielle du système racinaire	15
2.2.2. Isolements	
2.3. Constitution d'une collection de fixateurs de N ₂ rhizosphériques	16
2.4. Etude taxonomique des fixateurs de N ₂ rhizosphériques	
2.4.1. Caractères morphologiques	20
2.4.2. Caractères biochimiques	
2.4.3. Caractères physiologiques	

	Pages
2.4.4. Etude nutritionnelle	21
2.4.5. Analyse numérique	
2.4.6. Composition en bases de l'ADN	22
2.5. Mesure de l'activité nitrogénasique spécifique	
2.6. Recherche de l'aptitude des souches fixatrices de N ₂ à croître aux dépens de la pectine ou de diverses substances dérivées de la pectine.	23
3. RESULTATS	24
3.1. Distribution de la microflore hétérotrophe aérobie, en particulier de la microflore fixatrice de N ₂ , dans les trois compartiments de la rhizosphère du riz cv. Moroberekan cultivé sur sol gris de Dianaba.	
3.1.1. Distribution des bactéries des champignons et des actinomycètes	
3.1.2. Distribution des bactéries hétérotrophes en six groupes morphologiques et nutritionnels	
3.1.3. Distribution des fixateurs de N ₂ au sein de la microflore hétérotrophe aérobie	26
3.2. Etude taxonomique des fixateurs de N ₂ rhizosphériques	30
3.2.1. Souches du genre <u>Azospirillum</u>	
3.2.2. Souches corynéformes	40
3.2.3. Autres souches fixatrices de N ₂	50
3.3. Microaérophilie des souches fixatrices de N ₂ rhizosphériques	65
3.4. Activité pectinolytique des souches fixatrices de N ₂ rhizosphériques	68
4. CONCLUSIONS	74

	Pages
<u>CHAPITRE II</u> : ETUDE DE QUELQUES FACTEURS AGISSANT SUR LA FIXATION DE N ₂ DANS LA RHIZOSPHERE DU RIZ	79
1. INTRODUCTION	81
2. MATERIEL ET METHODES	82
2.1. Estimation de la fixation de N ₂ par la méthode de réduction de l'acétylène	
2.1.1. Principe de la méthode	
2.1.2. Méthodes d'incubation utilisées au laboratoire	86
2.1.3. Mesure <u>in situ</u>	96
2.1.4. Prélèvement des échantillons de gaz et analyses	103
2.1.5. Calculs	104
2.2. Sols - Matériel végétal	105
2.3. Dosage de l'azote ammoniacal	
2.4. Inoculations bactériennes	
2.5. Nématodes parasites du riz	106
3. RESULTATS	107
3.1. Influence du génotype du riz	
3.1.1. Comparaison de diverses variétés de riz	
3.1.2. Comparaison de mutants de riz	109
3.1.3. Influence du choix des partenaires du système "sol-riz"	
3.2. Action de la coupe des parties aériennes de la plante	113
3.3. Variations de l'ARA rhizosphérique au cours d'un cycle végétatif complet de riz	
3.4. Influence du type de sol	115
3.5. Effet de l'azote ammoniacal	118

	Pages
3.6. Effet de l'engorgement	122
3.7. Association fixateurs de N ₂ -pectinolytiques	124
3.8. Association fixateurs de N ₂ -actinomycètes	126
3.9. Nématodes parasites du riz	128
4. CONCLUSIONS	132
<u>CHAPITRE III</u> : ORIGINE DE L'EFFET DE LA MICROFLORE FIXATRICE DE N ₂ SUR LA CROISSANCE DU RIZ : FIXATION DE N ₂ OU SYNTHÈSE DE PHYTOHORMONES.	137
1. INTRODUCTION	139
2. MATERIEL ET METHODES	141
2.1. Sols et matériel végétal	142
2.2. Souches fixatrices de N ₂	
2.3. Préparation des inoculums	
2.3.1. Systèmes "sol-riz" de 3 semaines	
2.3.2. Cultures en pots	143
2.3.3. Cultures en parcelles de 2m ²	145
3. RESULTATS	146
3.1. Effet de l'inoculation par des fixateurs de N ₂ sur la croissance du riz	
3.1.1. Systèmes "sol-riz" de 3 semaines	
3.1.2. Systèmes "sol-riz" de 1 mois inoculés par <u>Azospirillum</u> Sp7 (culture en pots)	149
3.1.3. Systèmes "sol-riz" cultivés jusqu'à maturité	
3.2. Origine de l'effet observé sur des plantes de 3 semaines	153

	Pages
3.2.1. Relation développement du riz-fixation de N ₂	
3.2.2. Aptitude de diverses souches d' <u>Azospirillum</u> à produire des phytohormones; effet sur le développement du riz	159
4. CONCLUSIONS	168
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	173
RÉFÉRENCES	183
ANNEXES	201
1. CARACTERISTIQUES DES SOLS UTILISES	203
2. PUBLICATIONS	205

ooo0ooo