

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE  
— I. N. R. A. —  
STATION de SCIENCE du SOL  
Domaine Saint-Paul  
84140 MONTFAVET

Th. 028 #04  
L. Mouillat

SÉRIE A, N° 3.326

N° D'ORDRE :  
4.200

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

**Jacques RIVIÈRE**

**1<sup>re</sup> THÈSE.** — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE  
DE LA RHIZOSPHERE DU BLÉ.

**2<sup>e</sup> THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 19 décembre 1959 devant la Commission d'examen.

MM. CHOUARD            *Président.*  
ULRICH                    }  
DE CUGNAC               } *Examineurs.*

IMPRIMERIE ALENÇONNAISE  
PLACE POULET - MALASSIS  
ALENÇON (ORNE)

1959

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE  
DE LA RHIZOSPHERE DU BLÉ <sup>(1)</sup>

par

JACQUES RIVIÈRE

— Chef de travaux au laboratoire de Microbiologie  
de l'Institut National Agronomique

(1) Ce travail a été effectué au Laboratoire de Microbiologie de l'Institut National Agronomique et nous avons bénéficié des conseils bienveillants de M. J. POCHON, Chef de Service à l'Institut Pasteur. Nous remercions tout spécialement MM. les Professeurs CHOUARD, ULRICH et DE CUGNAC qui ont bien voulu accepter de faire partie de notre Jury de Soutenance.

Nos remerciements vont aussi à tous ceux qui nous ont aidé et à qui nous adressons notre amicale gratitude.

# FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen . . . . . J. PERES

## PROFESSEURS

G. JULIA . . . . .	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	PETIT . . . . .	T Biologie maritime.
FOCH . . . . .	T Mécanique physique et expérimentale.	QUENEY . . . . .	T Météorologie et dynamique atmosphérique.
DE BROGLIE . . . . .	T Théories physiques.	GALLIEN . . . . .	T Embryologie.
PRENANT . . . . .	T Anatomie et Histologie comparées.	EICHHORN . . . . .	T Biologie végétale (S. P. C. N.).
PERES . . . . .	T Mécanique des fluides et application.	DE CUGNAC . . . . .	T Biologie végétale (S. P. C. N.).
M. CURIE . . . . .	T Physique (S. P. C. N.).	M <sup>lle</sup> CAUCHOIS . . . . .	T Chimie physique.
BARRABÉ . . . . .	T Géologie structurale et Géologie appliquée.	THELLIER . . . . .	T Physique du Globe.
J. BOURCART . . . . .	T Géographie physique et Géologie dynamique.	L'HÉRITIER . . . . .	T Génétique.
PLANTEFOL . . . . .	T Botanique.	GRIVET . . . . .	T Radioélectricité.
GRASSÉ . . . . .	T Évolution des êtres organisés.	PONCIN . . . . .	T Mécanique générale.
PREVOST . . . . .	T Chimie organique.	DUBREIL . . . . .	T Arithmétique et théorie des nombres.
BOULIGAND . . . . .	T Application de l'analyse à la Géométrie.	QUELET . . . . .	T Chimie organique.
CHAUDRON . . . . .	T Chimie appliquée.	CAGNIARD . . . . .	T Géophysique appliquée.
WYART . . . . .	T Minéralogie.	CHAMPETIER . . . . .	T Chimie macromoléculaire.
TEISSIER . . . . .	T Zoologie.	CUVILLIER . . . . .	T Géologie structurale et Géologie appliquée.
MANGENOT . . . . .	T Biologie végétale.	JUNG . . . . .	T Pétrographie.
P. AUGER . . . . .	T Physique quantique et relativité.	TRILLAT . . . . .	T Microscopie et diffraction électronique.
MONNIER . . . . .	T Physiologie générale.	WIEMANN . . . . .	T Chimie organique et structurale.
PIVETEAU . . . . .	T Paléontologie.	JACQUINOT . . . . .	T Spectroscopie et physique céleste.
ROCARD . . . . .	T Physique (E. N. S.).	VASSY . . . . .	T Physique de l'atmosphère.
H. GARTAN . . . . .	T Mathématiques (E. N. S.).	DESTOUCHES . . . . .	T Théories physiques.
LAFITTE . . . . .	T Chimie générale.	M. PRUVOST . . . . .	T Géologie.
FAVARD . . . . .	T Géométrie supérieure.	AMIEL . . . . .	T Chimie générale (P. C. B.).
COULOMB . . . . .	T Physique du Globe.	HOCART . . . . .	T Minéralogie.
M <sup>lle</sup> COUSIN . . . . .	T Biologie animale (S. P. C. N.).	J.-P. MATHIEU . . . . .	T Physique (P. C. B.).
CHRÉTIEN . . . . .	T Chimie minérale.	COUTEAUX . . . . .	T Biologie animale (P. C. B.).
P. DRACH . . . . .	T Zoologie.	MAY . . . . .	T Biologie animale (P. C. B.).
KASTLER . . . . .	T Physique (E. N. S.).	CHOQUET . . . . .	T Calcul différentiel et intégral.
EPHRUSSI . . . . .	T Génétique.	FELDMANN . . . . .	T Biologie (P. C. B.).
WURMSER . . . . .	T Biologie physico-chimique.	GUINIER . . . . .	T Physique des solides.
RIVIÈRE . . . . .	T Géologie (S. P. C. N.).	JOST . . . . .	T Physiologie comparée.
GAUTHERET . . . . .	T Biologie végétale (P. C. B.).	FORTET . . . . .	T Calcul des probabilités.
LUCAS . . . . .	T Recherches physiques.	SCHWARTZ . . . . .	T Calcul différentiel et intégral.
A. THOMAS . . . . .	T Biologie cellulaire.	CHOUARD . . . . .	T Physiologie végétale.
ARNULF . . . . .	T Optique appliquée.	MALAVARD . . . . .	T Aviation.
M. MORAND . . . . .	T Enseignement de physique.	BRELOT . . . . .	T Calcul différentiel.
SOLEILLET . . . . .	T Physique.	NORMANT . . . . .	T Chimie organique.
FOURIER . . . . .	T Mécanique expérimentale des fluides.	BÉNARD . . . . .	T Chimie minérale.
DANJON . . . . .	T Astronomie.	BUVAT . . . . .	T Botanique (E. N. S.).
LAPORTE . . . . .	T Physique générale et radioactivité.	DUGUÉ . . . . .	T Statistiques mathématiques.
JANET . . . . .	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	GELOSO . . . . .	T Chimie (S. P. C. N.).
		SOULAIRAC . . . . .	T Psychophysologie.

ULRICH . . . . .	T	Physiologie végétale.	BELLAIR . . . . .	T	Géologie (S. P. C. N.).
MARÉCHAL . . . . .	T	Optique théorique et appliquée.	COTTE . . . . .	T	Physique (M. P. C.).
KIRRMANN . . . . .	T	Théories chimiques.	DUBOIS (J. E.) . . . . .	T	Chimie (S. P. N. C.).
CHADEFAUD . . . . .	T	Botanique.	LAMOTTE . . . . .		Zoologie (E. N. S.).
DESTRIAU . . . . .	T	Physique (M. P. C.).	LE ROLLAND . . . . .		Mécanique des fluides.
M <sup>lle</sup> LE BRETON . . . . .	T	Physiologie générale.	MICHEL (André) . . . . .	T	Chimie (S. P. C. N.).
SALEM . . . . .	T	Mathématiques générales.	OLMER . . . . .	T	Énergétique générale.
LELONG . . . . .	T	Mathématiques générales.	ROUANET . . . . .	T	Physique générale.
DEVILLERS . . . . .		Anatomie et Histologie comparées.	GAUTHIER . . . . .	T	Mécanique appliquée.
EHRESMANN . . . . .	T	Topologie algébrique.	BARCHEWITZ . . . . .		Chimie physique.
FRANÇON . . . . .	T	Physique (S. P. C. N.).	BROSSEL . . . . .		Physique atomique.
CLANGEAUD . . . . .	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	BUSER . . . . .		Biologie animale (P.C.B.)
GODEMENT . . . . .	T	Mathématiques (M.P.C.).	CAMUS . . . . .		Biologie végétale (P. C. B.).
PISOT . . . . .	T	Calcul des probabilités.	CASTAING . . . . .		Physique générale.
ROCH (E.) . . . . .	T	Géologie.	CURIEN . . . . .		Minéralogie et cristallographie.
SCHATZMANN . . . . .		Astrophysique.	MOYSE . . . . .		Physiologie végétale.
TERMIER . . . . .	T	Paléontologie stratigraphique.	NOIBOT . . . . .		Évolution des êtres organisés.
ZAMANSKY . . . . .	T	Mathématiques générales.	PANNETIER . . . . .		Chimie (S. P. C. N.).
LENNUIER . . . . .		Physique (M. G. P.).	POSSOMPES . . . . .		Biologie animale (P. C. B.).
RIZET . . . . .		Génétique.	PULLMANN . . . . .		Chimie théorique.
ROUTHIER . . . . .		Géologie appliquée.	TEILLAC . . . . .		Physique nucléaire et radioactivité.
M <sup>me</sup> TONNELAT . . . . .	T	Théories physiques.	TONNELAT . . . . .		Biologie physicochimique.
DIXMIER . . . . .	T	Mathématiques (M.P.C.).	VILLE . . . . .		Économétrie.
SOUCRAY . . . . .	T	Chimie générale.	WILLEMAET . . . . .		Chimie (P. C. B.).
AIGRAIN . . . . .	T	Electrotechnique.	DODÉ . . . . .	T	Chimie.
BRUSSET . . . . .		Chimie minérale.	FREYMANN . . . . .	T	Physique (S. P. C. N.).
M. LÉVY . . . . .		Physique théorique.	GUINOCHET . . . . .	T	Biologie végétale (Orsay).
M <sup>me</sup> CHAIX . . . . .		Chimie biologique.	ROLLET . . . . .	T	Chimie (P. C. B.).
M <sup>me</sup> HUREL-PY . . . . .		Biologie végétale (P. C. B.).	M <sup>lle</sup> JOSIEM . . . . .	T	Chimie (P. C. B.).
PIAUX . . . . .		Chimie. (P. C. B.).	CHEVALLEY . . . . .	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
BRUN . . . . .		Mécanique expérimentale des fluides.	ARNOULT . . . . .	T	Physique (Orsay).
LEDERER . . . . .	T	Chimie des substances organiques naturelles.	CHAPELLE . . . . .	T	Physique (P. C. B.).
M <sup>me</sup> DURREIL . . . . .	T	Mathématiques.	DELANGE . . . . .	T	Mathématiques (Orsay).
M <sup>me</sup> LELONG . . . . .	T	Mathématiques (E.N.S.).	DENY . . . . .	T	Mathématiques (Orsay).
			GERMAIN (P.) . . . . .	T	Mécanique théorique des fluides.
			LUCAS (G.) . . . . .	T	Géologie.

*Secrétaire général . . . . . C. MONIER*

## SOMMAIRE

### INTRODUCTION

I. — Définition de la rhizosphère. . . . .	11
II. — Orientation des recherches personnelles. . . . .	14

### PREMIÈRE PARTIE

#### ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE DE LA RHIZOSPHÈRE À DIVERS STADES DE LA CROISSANCE DU BLÉ

<i>Chapitre I.</i> — HISTORIQUE . . . . .	17
A. — <i>Introduction</i> . . . . .	17
B. — <i>Méthodes générales d'étude</i> . . . . .	18
I. — Microscopie directe. . . . .	18
II. — Emploi de milieux de culture . . . . .	19
1° Mise en évidence de l'action quantitative de la rhizosphère sur les micro-organismes du sol. . . . .	19
2° Mise en évidence de l'action qualitative de la rhizosphère sur les micro-organismes du sol. . . . .	21
a) Caractérisation morphologique. . . . .	23
b) Présence d'espèces et de genres particuliers . . . . .	24
c) Groupes nutritionnels. . . . .	26
d) Groupes physiologiques. . . . .	30
 <i>Chapitre II.</i> — DÉTERMINATION DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES NÉCESSAIRES A L'ÉTUDE DE LA RHIZOSPHÈRE. . . . .	 32
A. — <i>Méthodes d'études antérieures</i> . . . . .	32
I. — <i>Méthodes de prélèvement</i> . . . . .	32
II. — <i>Facteurs agissant sur l'effet rhizosphère</i> . . . . .	34
1° Teneur en eau de l'échantillon . . . . .	34
2° Influence de la région de la rhizosphère étudiée . . . . .	35
3° Influence des divers types de sol. . . . .	36
4° Influence des traitements du sol. . . . .	36

5° Influence de la microflore de la rhizosphère sur les plantes associées ou successives. . . . .	38
a) Persistance de la microflore de la rhizosphère dans les terres de culture. . . . .	38
b) Persistance des changements dans le sol apportés par la microflore de la rhizosphère. . . . .	39
6° Influence du type et du stade de la croissance de la plante. . . . .	41
B. — <i>Protocole expérimental adopté</i> . . . . .	44
I. — Prélèvement de la terre utilisée. . . . .	45
II. — Préparation des pots. . . . .	45
III. — Réalisation des semis. . . . .	46
IV. — Prélèvements des essais en vue de l'analyse. . . . .	46
1° Pots semés. . . . .	47
a) Caractérisation de la rhizosphère éloignée. . . . .	47
b) Caractérisation de la rhizosphère proche. . . . .	47
2° Pots témoins. . . . .	48
V. — Préparation des dilutions. . . . .	48
VI. — Conduite des analyses. . . . .	49
VII. — Techniques microbiologiques employées. . . . .	50
VIII. — Conditions du milieu extérieur au cours de l'expérimentation. . . . .	52
IX. — Évolution chimique des échantillons. . . . .	56
Chapitre III. — EFFET RHIZOSPHERE SUR LES GROUPES MORPHOLOGIQUES DE MICRO-ORGANISMES DU SOL. . . . .	57
A. — <i>Microflore totale et Actinomycètes</i> . . . . .	57
I. — Analyse critique des travaux antérieurs. . . . .	57
1° Microflore totale (Bactéries). . . . .	57
a) Utilisation des méthodes manométriques pour mesurer le nombre ou l'activité des Bactéries dans la rhizosphère. . . . .	57
— Dégagement de gaz carbonique. . . . .	57
— Absorption d'oxygène. . . . .	58
b) Dénombrement par l'emploi de milieux de culture. . . . .	59
2° Actinomycètes. . . . .	61
II. — Recherches personnelles. . . . .	62
1° Techniques employées. . . . .	62
a) Milieu utilisé. . . . .	62
b) Ensemencement. . . . .	62
c) Dénombrement. . . . .	63
2° Résultats. . . . .	63

3° Discussion. . . . .	68
a) Microflore totale (Bactéries). . . . .	68
b) Actinomycètes. . . . .	68
B. — <i>Champignons</i> . . . . .	69
I. — Analyse critique des travaux antérieurs. . . . .	69
II. — Recherches personnelles. . . . .	70
1° Technique employée. . . . .	70
a) Milieu utilisé. . . . .	70
b) Ensemencement. . . . .	70
c) Dénombrement. . . . .	71
2° Résultats. . . . .	71
3° Discussion. . . . .	71
C. — <i>Conclusions de l'étude de l'effet rhizosphère sur les groupes morphologiques de micro-organismes du sol</i> . . . . .	71
Chapitre IV. — EFFET RHIZOSPHERE SUR LES GROUPES PHYSIOLOGIQUES DE MICRO-ORGANISMES DU SOL . . . . .	75
A. — <i>Microflore fixatrice d'azote</i> . . . . .	75
I. — Analyse critique des travaux antérieurs. . . . .	75
II. — Recherches personnelles. . . . .	78
1° Techniques employées. . . . .	78
a) Milieux utilisés. . . . .	78
b) Ensemencements. . . . .	79
c) Dénombrements. . . . .	79
2° Résultats. . . . .	82
3° Discussion. . . . .	83
B. — <i>Microflore ammonifiante</i> . . . . .	83
I. — Analyse critique des travaux antérieurs. . . . .	83
II. — Recherches personnelles. . . . .	85
1° Technique employée. . . . .	85
a) Milieu utilisé. . . . .	85
b) Ensemencement. . . . .	86
2° Résultats. . . . .	86
3° Discussion. . . . .	89
C. — <i>Microflore nitriceuse et nitriceuse</i> . . . . .	89
I. — Analyse critique des travaux antérieurs. . . . .	89
II. — Recherches personnelles. . . . .	92
1° Technique employée. . . . .	92
a) Milieux utilisés. . . . .	92

b) Ensemencements . . . . .	93
c) Dénombrements . . . . .	93
2° Résultats . . . . .	93
3° Discussion . . . . .	98
D. — <i>Microflore dénitrifiante</i> . . . . .	98
I. — Analyse critique des travaux antérieurs . . . . .	98
II. — Recherches personnelles . . . . .	100
1° Technique employée . . . . .	100
a) Milieu utilisé . . . . .	100
b) Ensemencement . . . . .	100
2° Résultats . . . . .	100
3° Discussion . . . . .	101
E. — <i>Microflore cellulolytique aérobie</i> . . . . .	104
I. — Analyse critique des travaux antérieurs . . . . .	104
II. — Recherches personnelles . . . . .	105
1° Technique employée . . . . .	105
a) Milieu utilisé . . . . .	105
b) Ensemencement . . . . .	105
c) Dénombrement . . . . .	105
2° Résultats . . . . .	108
3° Discussion . . . . .	108
F. — <i>Microflore amylolytique</i> . . . . .	109
I. — Analyse critique des travaux antérieurs . . . . .	109
II. — Recherches personnelles . . . . .	110
1° Technique employée . . . . .	110
a) Milieu utilisé . . . . .	110
b) Ensemencement . . . . .	110
2° Résultats . . . . .	110
3° Discussion . . . . .	113
G. — <i>Conclusions de l'étude de l'effet rhizosphère sur les groupes morphologiques et physiologiques de micro-organismes du sol</i> . . . . .	113
Chapitre V. — ACTION DE QUELQUES FACTEURS SUR L'EFFET RHIZOSPHERE . . . . .	119
A. — <i>Croissance du blé : définition et caractérisation du tallage</i> . . . . .	119
B. — <i>Stade du tallage</i> . . . . .	120
I. — Introduction . . . . .	120
1° Système radicellaire . . . . .	120
a) Racines séminales . . . . .	120
b) Racines adventices . . . . .	121

2° Apparition des talles . . . . .	121
a) Talles de coléoptile . . . . .	122
b) Talles de feuille . . . . .	122
3° Facteurs influant sur le tallage . . . . .	123
a) Variété de Blé. . . . .	123
b) Durée du tallage. . . . .	123
II. — Recherches personnelles. . . . .	123
1° Conditions d'expérimentation . . . . .	123
2° Techniques employées . . . . .	124
3° Résultats . . . . .	124
4° Discussion. . . . .	124
C. — <i>Influence du type de sol et de la variété de la plante</i> . . . . .	131
I. — Introduction . . . . .	131
II. — Recherches personnelles. . . . .	131
1° Conditions d'expérimentation . . . . .	131
a) Variétés choisies. . . . .	134
b) Types de sols. . . . .	134
2° Techniques employées . . . . .	135
3° Résultats . . . . .	135
4° Discussion. . . . .	154
D. — <i>Confirmation de l'importance du tallage</i> . . . . .	158
I. — Introduction . . . . .	158
II. — Recherches personnelles. . . . .	158
1° Conditions d'expérimentation . . . . .	158
2° Techniques employées . . . . .	159
3° Résultats . . . . .	159
4° Discussion. . . . .	159
CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE . . . . .	166

## DEUXIÈME PARTIE

### ÉTUDE DES EXCRÉTIIONS RADICELLAIRES DU BLÉ À LA FIN DU STADE DU TALLAGE

Chapitre VI. — LES TRAVAUX ANTÉRIEURS . . . . .	169
A. — Introduction . . . . .	169

B. — <i>Techniques employées</i> . . . . .	172
I. — Mise en évidence de l'excrétion de substances inhibitrices. . .	172
1° Par lavage des racines . . . . .	172
2° Dans des fragments de racines . . . . .	172
3° Dans des extraits aqueux de racines . . . . .	172
4° Après des cultures aseptiques . . . . .	173
II. — Mise en évidence de l'excrétion de substances stimulantes . .	174
1° Par l'observation directe . . . . .	174
2° Dans des cultures non aseptiques . . . . .	175
3° Dans des cultures aseptiques sur gélose . . . . .	175
4° Après avoir réalisé des cultures aseptiques dans un milieu liquide ou dans du sable imprégné. . . . .	176
III. — Analyse critique des résultats . . . . .	178
1° Production expérimentale d'excrétions radicellaires . . . . .	179
2° Étude de l'action des substances obtenues sur les micro-orga- nismes du sol . . . . .	179

**Chapitre VII. — RÉALISATION EXPÉRIMENTALE D'UNE RHIZOSPHERE ARTI-  
FICIELLE . . . . . 181**

A. — <i>Cultures aseptiques</i> . . . . .	181
I. — Méthodes d'études antérieures . . . . .	181
II. — Protocole expérimental adopté. . . . .	182
1° Désinfection des grains . . . . .	182
2° Germination aseptique . . . . .	182
3° Transfert de la plante au cours de sa croissance . . . . .	182
4° Composition de la solution nutritive. . . . .	183
5° Précautions à prendre . . . . .	183
B. — <i>Rhizosphère artificielle</i> . . . . .	184
I. — Analyse critique des travaux antérieurs. . . . .	184
II. — Recherches personnelles. . . . .	185
1° Techniques employées . . . . .	185
a) Réalisation expérimentale d'une rhizosphère artificielle . .	185
b) Analyses microbiologiques effectuées . . . . .	186
c) Conduite de l'expérimentation. . . . .	186
2° Résultats . . . . .	194
3° Discussion. . . . .	194

<b>Chapitre VIII. — ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES EXCRÉTIIONS RADICELLAIRES DU BLÉ.</b>	<b>213</b>
A. — <i>Analyse critique des travaux antérieurs.</i>	213
B. — <i>Recherches personnelles.</i>	214
I. — <i>Acides volatils de la série grasse.</i>	214
1° <i>Technique.</i>	214
2° <i>Résultats.</i>	215
II. — <i>Acides organiques non volatils.</i>	215
1° <i>Technique.</i>	215
2° <i>Résultats.</i>	216
III. — <i>Oses.</i>	218
1° <i>Technique.</i>	218
2° <i>Résultats.</i>	218
IV. — <i>Acides aminés et amides.</i>	220
1° <i>Technique.</i>	220
2° <i>Résultats.</i>	220
V. — <i>Nucléotides et nucléosides.</i>	222
1° <i>Technique.</i>	222
2° <i>Résultats.</i>	224
VI. — <i>Facteurs de croissance.</i>	224
1° <i>Techniques.</i>	224
2° <i>Résultats.</i>	226
VII. — <i>Facteurs responsables de l'inhibition des Bactéries cellulolytiques aérobies.</i>	226
1° <i>Technique.</i>	226
2° <i>Résultats.</i>	226
<b>CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE</b>	<b>227</b>
<b>CONCLUSIONS GÉNÉRALES</b>	<b>230</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>234</b>

"... We are still lacking a clear idea of the importance of this phenomenon in the growth of higher plants."

WAKSMAN.  
*Soil Microbiology* (1952).

## INTRODUCTION

### I. Définition de la rhizosphère

Les premières découvertes d'HELLRIEGEL et WILFARTH (1888) concernant les nodules des racines des Légumineuses attirèrent l'attention sur les Bactéries vivant au contact des racines. Les recherches pleines de succès entreprises sur la fixation de l'azote par les Bactéries symbiotes stimulèrent les chercheurs et les engagèrent à se pencher sur le problème plus général des micro-organismes de la rhizosphère. En effet, en 1904, HILTNER introduisit le terme « rhizosphère » pour désigner la partie du sol qui est soumise à l'action du système racinaire et nota qu'elle avait une activité microbienne plus intense que le reste du sol : il définit la rhizosphère comme la région du sol où s'exerce l'action spécifique des racines. Ensuite naquit la conception que les racines des plantes ne sont pas en contact direct avec les éléments nutritifs de sol, mais par l'intermédiaire d'une gaine microbienne, étant recouvertes d'un manteau de micro-organismes qui influent sur la croissance et la santé de la plante. La concentration des micro-organismes au voisinage des racines est élevée et atteint parfois de telles proportions que la plante ne peut plus avoir de contact direct avec les solutions du sol : c'est le cas des mycorhizes ou des bactériorhizes. Dans la plupart des cas, la surface de contact est plus ou moins importante, mais toutefois la rhizosphère reste le siège d'une intense activité.

En effet, les influences réciproques que les plantes exercent sur la croissance des micro-organismes, ou que ceux-ci exercent en retour sur les plantes, sont nombreuses et diverses. Vis-à-vis des substances

nutritives, compétition ou association varient suivant les facteurs du milieu d'après NILSSON (1957), les micro-organismes d'un sol cultivé pouvant représenter une masse cellulaire du même ordre de grandeur que celle de la culture, comme l'indique JENSEN (1951).

La structure même du sol dépend de ces actions réciproques : les plantes retirent de la rhizosphère de nombreuses substances, modifient la structure du sol par la pénétration des racines, exercent une action solubilisante par l'excrétion d'acide carbonique et éventuellement introduisent de grandes quantités de matière organique dans le sol sous forme de tissus morts qui subissent un cycle de transformations par suite de l'action des micro-organismes. De même, les micro-organismes de la rhizosphère, comme l'ont montré aux États-Unis JACKSON et ses collaborateurs (1947) ainsi que NORMAN (1947) et en U. R. S. S. GELTNER (1945), jouent un grand rôle dans la formation de la structure du sol; ils peuvent aussi solubiliser des phosphates, les rendre utilisables pour les plantes d'après GERRETSEN (1948) ou, au contraire, insolubiliser d'autres éléments minéraux comme le manganèse, selon TIMONIN (1947) et STARKEY (1955).

Il est souvent difficile de distinguer parmi ces activités celles qui agissent sur la plante ou, inversement, celles qui agissent sur les micro-organismes du sol. De plus, si les relations entre les micro-organismes de la rhizosphère et les plantes supérieures vont de la symbiose au parasitisme, elles sont elles-mêmes instables : bien qu'ils n'aient pas vraiment prouvé qu'il y ait bénéfice mutuel entre la plante et les Champignons, MAC ARDLE (1932) et THORNTON (1935) montrent que, dans le cas des mycorhizes, on peut passer de la symbiose au parasitisme absolu suivant la vitalité des conjoints. Les bactériorhizes sont peu connues en dehors des Bactéries symbiotes des nodules des Légumineuses. Par contre, il semble que l'état le plus fréquent soit le commensalisme : les racines excrètent des substances capables d'être utilisées comme aliment par la microflore du sol; il s'ensuit que de nombreux micro-organismes prolifèrent abondamment dans leur voisinage et peuvent être considérés comme des commensaux vis-à-vis des plantes, puisqu'ils vivent de leurs produits d'excrétion. Cependant, il faut plutôt admettre que les rapports entre les plantes et les micro-organismes ne sauraient

être immuables; ainsi, des micro-organismes normalement commensaux peuvent devenir parasites si la plante s'affaiblit; d'autre part, il est probable que, parmi ces micro-organismes de la rhizosphère, certains jouent un rôle bénéfique pour la plante. C'est tout cet ensemble d'intrications que pose la notion de rhizosphère, sans compter les relations des micro-organismes entre eux qui peuvent aller de la symbiose à l'antibiose. Ces divers points de vue suscités par l'étude de la rhizosphère ont conduit au développement d'une profusion de techniques, avec des différences notables quant à la définition même de la rhizosphère. Des colorations de lames enfouies dans le sol montrent un grand nombre de Bactéries associées aux racines autour desquelles elles forment un fourreau. STARKEY (1938), puis LINFORD (1942) ont publié d'excellentes photographies de ces associations. Utilisant les méthodes classiques de dénombrement, STARKEY (1931) a étudié la variation de la population microbienne en fonction de l'éloignement des racines : l'effet rhizosphère ne se manifeste qu'à moins de 0,5 cm. PEROTTI (1926) auparavant avait tenté de définir une limite qui permettrait de différencier le sol ou « édaphosphère » de la région radicellaire ou « histosphère »; la surface, capable d'envelopper cette zone serait définie par la brusque variation de la densité bactérienne, elle passerait entre 2,5 et 0,5 cm de distance des racines. Cette conception de la rhizosphère a été discutée : certains auteurs ne s'intéressent qu'aux micro-organismes vivant au contact même des racines. Par contre, GRAF (1930) et POSCHENREIDER (1930) distinguent la rhizosphère proche de la rhizosphère éloignée. Ceci a été justifié par les travaux de BEREZOVA (1941) qui observe une différence notable entre la microflore se trouvant au voisinage des racines et celle située contre les racines, d'où le nom de *rhizosphère* pour désigner la zone proche des racines et celui de *rhizoplan* pour désigner la surface même des racines. Actuellement, presque tous les auteurs sont d'accord pour séparer la *rhizosphère proche* de la *rhizosphère éloignée* qui sont devenues des termes classiques « permettant de définir des zones d'activités différentes dans une rhizosphère donnée... » DASTE (1956).

## II. Orientation des recherches personnelles

L'étude de la rhizosphère peut se faire, d'une façon un peu schématique, en considérant le problème sous ses deux aspects différents.

a) Les plantes déterminent au voisinage de leurs racines un effet rhizosphère qui se manifeste par des modifications dans la microflore du sol.

b) Les micro-organismes de la rhizosphère ont une action sur la croissance de ces mêmes plantes.

C'est le premier aspect qui sera envisagé dans ce mémoire. Une revue historique de la question fait ressortir un grand nombre de recherches, mais avec des techniques diverses, conduisant souvent à des résultats difficilement comparables, voire contradictoires. L'évolution des techniques en microbiologie du sol rendait nécessaire une expérimentation nouvelle permettant de faire le point : étudier l'effet rhizosphère proche et éloignée d'une variété génétiquement définie, à divers stades de la croissance de la plante, dans un sol pédologiquement connu, non seulement sur les groupes morphologiques classiques des micro-organismes du sol (Bactéries, Champignons, Actinomycètes), mais aussi sur certains groupes physiologiques des cycles de l'azote et du carbone, l'étude étant limitée aux micro-organismes non symbiotes et non pathogènes.

Dans le cycle de l'azote :

- a) Le groupe des fixateurs d'azote,
- b) Le groupe des ammonifiants,
- c) Le groupe des nitreux et des nitriques,
- d) Le groupe des dénitrifiants.

Dans le cycle du carbone :

- a) Le groupe des cellulolytiques aérobies,
- b) Le groupe des amylolytiques.

Le plan de cette thèse se divise en deux parties :

#### PREMIÈRE PARTIE

Étude de l'effet rhizosphère de deux variétés de Blé semées en pots dans deux terres différentes, les cultures en plein champ ne permettant pas d'obtenir des conditions expérimentales précises.

#### DEUXIÈME PARTIE

Réalisation d'une rhizosphère artificielle après culture aseptique dans une solution minérale d'une des variétés de Blé étudiées précédemment, et étude biochimique succincte des excréctions radicellaires de la même variété cultivée dans des conditions identiques.

Il est nécessaire de souligner que, dans la plupart des publications ayant trait à la rhizosphère, l'adjectif radicaire est le plus fréquemment employé, ce qui est impropre, car il ne s'applique qu'à la racine. L'adjectif radicellaire « qui appartient ou qui se rapporte à la racine ou aux radicelles » (*cf. Larousse*) correspond tout à fait au sens qu'il faut lui donner. En effet, au fur et à mesure de la croissance de la plante, les excréctions sont d'abord radiculaires, puis radicellaires et l'on verra que ce sont ces dernières qui jouent le rôle le plus important dans l'effet rhizosphère. Les auteurs emploient indifféremment les termes exsudats, sécrétions ou excréctions pour désigner les diverses substances libérées par les racines au cours de la vie de la plante il semble que le mot « excréctions » soit le plus convenable, car il ne s'agit pas de substances liées à l'existence d'organes spécialisés (sécrétions).

## PREMIÈRE PARTIE

# ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE DE LA RHIZOSPHERE À DIVERS STADES DE LA CROISSANCE DU BLÉ

### *Chapitre I*

## HISTORIQUE

### A. — INTRODUCTION

Après une longue période où la notion de rhizosphère n'évolua pas beaucoup, vint toute une série de travaux, avec des techniques diverses, donnant lieu souvent à des interprétations confuses, même contradictoires, qu'il est bon de grouper suivant leur objet afin de voir s'il est possible d'en tirer des conclusions générales. Il faut signaler plusieurs revues bibliographiques qui permettent d'avoir une vue d'ensemble de la question, celle de CLARK (1948) particulièrement consacrée à l'action des micro-organismes de la rhizosphère sur la croissance des plantes, celle de KATZNELSON, LOCHHEAD et TIMONIN (1948) traitant de l'action des plantes supérieures sur les micro-organismes du sol, et celles de BLAIR (1951), LOCHHEAD (1952) et THORNTON (1956) qui font une synthèse de ces deux aspects.

On peut d'une part classer ces travaux en deux grands groupes, suivant les techniques utilisées, d'autre part étudier séparément les phénomènes de la fixation symbiotique, tous les auteurs étant d'accord à ce sujet, les *Rhizobium* représentant un cas particulier de la rhizosphère qui ne sera pas envisagé ici. En outre, on sait peu de choses sur la microfaune de la rhizosphère en dehors des travaux de LINFORD (1942) qui, avec beaucoup d'ingéniosité, construisit

des cellules d'observation permettant l'examen *in situ* et signala que les Nématodes et les Protozoaires étaient beaucoup plus nombreux dans la zone soumise à l'action des racines. Seul KATZNELSON (1946) trouva vingt-trois fois plus de Protozoaires dans la rhizosphère de la Betterave que dans le sol témoin correspondant; d'autres essais pour déterminer si certaines plantes exerçaient une action favorable n'ont pas donné de résultats. Seul le fait que les Protozoaires se nourrissent aux dépens des Bactéries du sol laisse supposer qu'il est probable que l'accumulation des Bactéries dans la rhizosphère soit accompagnée par une augmentation du nombre des Protozoaires. Cependant, KATZNELSON, ROUATT et PAYNE, en 1956, signalent une légère stimulation dans la rhizosphère d'un Blé à maturité cultivé en pleine terre.

## B. — MÉTHODES GÉNÉRALES D'ÉTUDE

### I. Microscopie directe

De nombreux auteurs, HULPOI (1936), KUBIENA (1938), STARKEY (1938), STILLE (1938), TIMONIN (1940) et BLAIR (1945) ont employé, soit la méthode d'apposition des lames de CHOLODNY (1930), soit l'examen direct des racines. Malheureusement, ces techniques ne permettent que d'observer le phénomène proprement dit, la morphologie des micro-organismes ainsi que leur distribution, mais ne donnent aucune possibilité d'identification ou de culture. De ce fait, la morphologie, même après coloration, ne donne aucune idée de la physiologie de ces micro-organismes et, par conséquent, de leur rôle. De plus, comme l'a montré LINFORD (1942), les lames de contact ne retiennent pas tous les micro-organismes. Pour remédier à ces défauts, ISAKOVA (1936) a recouvert ces lames de contact avec des milieux sélectifs permettant de cultiver les micro-organismes adhérents; mais, quand on enlève les racines, celles-ci entraînent un grand nombre de colonies, particulièrement les colonies rugueuses. THOM et HUMFELD (1932) examinent directement les racines au microscope, ce qui présente peu d'intérêt; LINFORD (1942), avec ses cellules

d'observation, voit que les Bactéries sont beaucoup plus nombreuses dans la zone des racines, mais les mêmes critiques peuvent lui être appliquées.

Plus récemment, avec des techniques voisines, GLATHE, BERNSTORFF et ARNOLD (1954) montrent l'importance de la rhizosphère dans l'évolution de la structure du sol, ce qui sort du cadre de cette étude. Cependant, ROVIRA, en 1956, observe que le chevelu radicellaire des jeunes plantules d'Avoine est entouré d'une grande quantité de micro-organismes, alors que la coiffe de la racine est pratiquement stérile; dans le cas de la Tomate, la coiffe et le chevelu radicellaire restent ainsi jusqu'à la fin de la germination, car la croissance des Bactéries y est beaucoup plus lente.

## II. Emploi de milieux de culture

KATZNELSON (1948) classe ces travaux en deux séries : ceux dans lesquels le dénombrement des groupes ou des espèces est fait dans des milieux sélectifs, après dilutions et ensemencements sur plaques, particulièrement employés par CREUZBURG (1928), SMITH (1928), GRAF (1930) et STARKEY (1931) pour l'étude des micro-organismes du groupe des *Radiobacter*, et ceux dans lesquels on utilise un milieu non sélectif où chaque colonie est comptée, prélevée, repiquée et étudiée du point de vue cultural, morphologique et physiologique. C'est avec ces derniers que furent obtenus les résultats les plus intéressants. Étant donné que les publications sont très nombreuses, il est nécessaire de les subdiviser suivant leur objet et d'en donner un résumé.

### 1° — MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTION QUANTITATIVE DE LA RHIZOSPHERE SUR LES MICRO-ORGANISMES DU SOL

Le fait que les Bactéries, les Actinomycètes et les Champignons soient plus nombreux dans la rhizosphère que dans le sol non soumis à l'action des racines, est admis par tous les auteurs, l'effet rhizosphère

étant surtout net sur les Bactéries. Ainsi STARKEY, dès 1931, compte dans la rhizosphère du Trèfle, et par rapport au sol témoin, 200 fois plus de Bactéries et seulement 10 fois plus de Champignons et d'Actinomycètes. THOM et HUMFELD (1932) et ADATI (1939) trouvent que les racines de diverses plantes stimulent dans l'ordre : les Bactéries, les Champignons et les Actinomycètes. Par rapport au sol témoin, dans la rhizosphère de semis de Blé, d'Avoine, de Luzerne et de Pois, TIMONIN (1940) dénombre 7 à 71 fois plus de Bactéries et d'Actinomycètes, 0,75 à 3,1 fois plus de Champignons, alors que ZUKOVSKAYA (1941), dans celle de la Pomme de terre, du Lin et du Trèfle, BALICKA (1958), dans celle de la Vesce et du Seigle, décèlent 100 à 120 fois plus de Bactéries. Pour TOLLE et RIPPEL-BALDES (1958), l'augmentation du nombre des Champignons dans la rhizosphère de diverses Céréales ne dépasse pas 3 fois celui du sol témoin correspondant.

La présence des Algues dans la rhizosphère n'a fait l'objet que de peu d'études : KATZNELSON (1946) trouve un effet stimulant dans la rhizosphère de la Betterave fourragère à maturité, KATZNELSON, ROUATT et PAYNE (1956), une inhibition nette dans celle du Blé.

Les dénombrements sur plaques de la population microbienne du sol varient dans de larges limites; pour certains auteurs, seulement quelques millions par gramme, pour d'autres, beaucoup plus. THOM, en 1938, analyse les résultats publiés dans la littérature et se range, pour le sol, à une moyenne de 50 millions par gramme. Des populations plus considérables sont presque toujours attribuées à l'action rhizosphère. Ainsi, dans la rhizosphère du Blé, de la Betterave et du Haricot, STARKEY (1931) trouve une population de 653, 427 et 199 millions respectivement : en considérant toutes les plantes ensemble, il y a 24,8 fois plus de Bactéries dans la rhizosphère que dans la terre témoin. Les autres auteurs signalent des rapports élevés, mais assez variables :

ADATI (1939) . . . . .	200
CLARK (1939) . . . . .	2 à 24
TIMONIN (1939) . . . . .	7 à 71
LOCHHEAD (1940) . . . . .	2 à 45

ZUKOVSKAYA (1941) . . . . .	100
BALICKA (1958) . . . . .	120

avec des différences suivant l'espèce et surtout le stade de la croissance de la plante. Il faut noter le travail intéressant de SABININ et MINIMA (1932) qui observent que dans un désert de sable, le sol, à une courte distance des racines, est stérile : la vie microbienne y est localisée dans la rhizosphère. Des effets rhizosphère distincts peuvent être obtenus avec des variétés différentes d'une même plante: TIMONIN (1940) trouve un plus grand nombre de Bactéries et de Champignons dans la rhizosphère des variétés de Lin et de Tabac sensibles aux Champignons pathogènes du sol que dans celle des variétés résistantes. LOCHHEAD (1940) confirme ces résultats.

EATON et RIGLER (1946) mettent en évidence que le nombre des Bactéries dans la rhizosphère d'une variété de Coton et la sensibilité à la pourriture des racines varient en sens inverse de la teneur en glucides des racines modifiée expérimentalement par des effoliations et des tailles : il est possible de produire, au sein même d'une variété de Coton, des différences dans le nombre des Bactéries de la rhizosphère et dans la sensibilité à la pourriture des racines analogues à celles qui existent entre les différentes variétés de Lin et de Tabac. Il faut tenir compte aussi de l'action des facteurs du milieu sur la microflore de la rhizosphère, bien qu'il n'y ait que peu de travaux ayant étudié cette question. Ceci sera précisé dans le *chapitre II*.

## 2° — MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTION QUALITATIVE DE LA RHIZOSPHÈRE SUR LES MICRO-ORGANISMES DU SOL

La plupart des résultats ont trait à la flore bactérienne. On ignore l'action des racines sur les Algues, sauf KATZNELSON (1946) qui dit avoir trouvé une plus grande quantité de Cyanophycées dans la rhizosphère de la Betterave fourragère. Quant aux Champignons, on en sait peu de chose. THOM et HUMFELD (1932) observent sur les racines du Blé, dans des sols acides, des colonies prédominantes de *Trichoderma* et dans des sols alcalins, surtout des *Penicillium*. TIMONIN (1939), dans le cas du Blé, de l'Avoine, de la Luzerne et

du Trèfle, ne décelez pas de différences significatives; par contre, dans celui du Lin, certains genres (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Verticillium*) sont plus nombreux dans la rhizosphère des variétés sensibles à la pourriture des racines, alors que d'autres apparaissent dans celle des variétés résistantes (*Mucor*, *Cladosporium*, *Hymenula*, *Penicillium*, *Sclerobasidium*, *Trichoderma*). WEST et HILDEBRAND (1941) trouvent des différences dans la microflore fongique de la rhizosphère du Fraisier suivant les traitements du sol : traité par de l'acide acétique, la rhizosphère contient des *Penicillium* (26 %), des *Verticillium* (28 %) et des *Cladosporium* (4 %), tandis que le sol témoin héberge des *Aspergillus* (6 %), des *Trichoderma* (12 %), des *Oothecium* (16 %), un Champignon non identifié (24 %) et d'autres formes comme *Fusarium* et *Mucor*. CLARK, en 1942, met en évidence des faits voisins chez le Coton. KATZNELSON et RICHARDSON (1943) signalent des différences dans la rhizosphère de la Tomate, malheureusement sur la fraction non identifiée de la population fongique. Dans le sol témoin d'un plant de Fraisiers, ils identifient des *Penicillium*, des *Aspergillus* et des *Fusarium*, et, près des racines, des *Cladosporium* et des *Chaetomium*. Ces résultats semblent indiquer une action sélective des racines sur la microflore fongique, mais l'interprétation est difficile par suite de la complexité des relations entre la rhizosphère, les traitements du sol et les agents responsables de la pourriture des racines des variétés sensibles.

On en sait moins encore sur les Actinomycètes quoique la microscopie directe et les dénombrements par culture indiquent une activation nette. Ce sont les recherches sur les Bactéries de la rhizosphère qui sont les plus nombreuses. En effet, depuis assez longtemps, les observations de PEROTTI (1926), FRED, BALDWIN et MCCOY (1932), ISAKOVA et SMIRNOVA (1937) et de KRASSILNIKOV (1945) avaient suggéré, qu'étant donné la grande variation des plantes dans leur composition chimique, leur physiologie et leurs besoins nutritifs, il était aisément concevable que la décomposition des cellules exfoliées ou l'excrétion de substances spécifiques conduisaient à une microflore rhizosphère typique d'une plante particulière.

On peut classer en quatre groupes les travaux consacrés aux Bactéries de la rhizosphère.

a) *Caractérisation morphologique.*

Ici, les Bactéries ne sont classées qu'en termes vagues et imprécis, tels que bâtonnets Gram négatifs, sporulés ou non, « dye-tolerant ». Les travaux d'OBRASTZOVA (1935), KRASSILNIKOV, KRISS et LITVINOV (1936), LOCHHEAD (1940), CLARK (1940), ZUKOVSKAYA (1942) et de KRASSILNIKOV (1944) concordent sur le fait que les Bactéries Gram négatives, non sporulées, se multiplient activement dans la rhizosphère d'une grande quantité de plantes, alors que les sporulées y sont bien moins nombreuses. Ces dernières, d'après STILLE (1938), CLARK et THOM (1939) et CLARK (1940), se retrouvent dans la rhizosphère de certaines plantes (Avoine, Radis) et non chez d'autres (Blé, Pois, Laitue).

Les Bactéries « dye-tolerant », c'est-à-dire capables de croître en présence de colorants divers sont, d'après CLARK (1940), plus abondantes près des racines du Coton que de celles du Blé; pour LOCHHEAD (1940), les bâtonnets courts, Gram négatifs, sont plus nombreux que les formes coccoïdes dans la rhizosphère des variétés de Lin et de Tabac sensibles à la pourriture des racines. L'ensemble de ces travaux montre que les Bactéries Gram négatives, à morphologie simple, sont prédominantes dans la rhizosphère ou relativement plus abondantes que dans le sol, alors que les Bactéries sporulées sont l'inverse. La proportion relative des différents types morphologiques près des racines et dans le sol est donnée dans une étude de CLARK (1940) faite sur 400 cultures pures isolées de la rhizosphère du Coton ou du sol environnant :

	COQUES GRAM POSITIFS (%)	BACTÉRIES GRAM NÉGATIVES (%)	BATONNETS SPORULÉS (%)
Sol . . . . .	40	20	30
Rhizosphère . . . . .	12	67	1

En 1954, FEDOROV et NEPOMILOVEV ont mis en évidence qu'il n'y avait pas de Bactéries sporulées dans la rhizosphère de *Phleum*

*pratense*, alors que la microflore du sol témoin est plus variée et en contient souvent.

b) *Présence d'espèces et de genres particuliers.*

Les Bactéries du groupe *Radiobacter* et les formes qui y sont rattachées (maintenant appelées *Agrobacterium* par BREED et ses collaborateurs depuis 1948), cultivées dans le milieu sélectif employé pour la recherche des *Rhizobium*, présentent, d'après SMITH (1928), CREUZBURG (1928), GRAF (1930) et STARKEY (1931), une forte augmentation dans la rhizosphère des Légumineuses (quoiqu'on ne les différencie pas des *Rhizobium*) et même dans celle d'autres plantes; ainsi chez le Colza, le rapport R/S, c'est-à-dire le rapport des nombres de Bactéries dans la rhizosphère et dans le sol avoisinant ou témoin, peut atteindre 86, mais en valeur absolue ces Bactéries, chez les autres plantes, sont peu nombreuses et ne constituent qu'une petite partie de la population bactérienne de la rhizosphère.

Les bâtonnets fluorescents Gram négatifs appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Xanthomonas* sont plus abondants habituellement près des racines que dans le sol, comme l'ont montré les travaux de KRASSILNIKOV, KRISS et LITVINOV (1936), CLARK (1940), ZUKOVSKAYA (1942), STARC (1943), EATON et RIGLER (1946). OBRATZOVA (1935), KRASSILNIKOV, KRISS et LITVINOV (1936) ont trouvé beaucoup de *Mycobacteriaceae* dans la rhizosphère. THOM et ses collaborateurs (1938) mettent en évidence que la majorité des Bactéries isolées de la rhizosphère d'un Blé cultivé dans un sol fumé sont des *Corynebacteriaceae* Gram positives, inhibées par le violet hexaméthylé réduisant les nitrates et nécessitant généralement de l'azote organique pour leur croissance. Des formes voisines, mais n'ayant pas la propriété de réduire les nitrates, prédominent dans la rhizosphère du Blé semé après de la Luzerne. LOCHHEAD (1940) trouve que les *Corynebacterium* et les *Proactinomyces* sont relativement moins abondants dans la rhizosphère que dans le sol, mais que les *Mycoplana* sont stimulés préférentiellement par les racines.

Seuls SEN (1929), ROKITZKAYA (1932) et KATZNELSON (1946) découvrent que les *Clostridium* sont favorisés par le développement des racines. Il n'est pas étonnant que ce groupe de micro-organismes

n'ait reçu que peu d'attention de la part des chercheurs, car le potentiel d'oxydo-réduction dans un sol de culture ou au voisinage des racines n'est pas favorable au développement des Bactéries anaérobies strictes. Ainsi KATZNELSON, ROUATT et PAYNE (1956) ne trouvent pas d'effet rhizosphère net sur les Bactéries anaérobies dans une culture de Blé à maturité.

Il y a peu de faits précis sur la présence d'espèces bactériennes typiques dans la rhizosphère. Quoique la littérature soit encore fragmentaire, elle laisse penser que certaines espèces, aussi bien que certains genres, y sont plus fréquemment rencontrés. Dans le genre *Arthrobacter*, LOCHHEAD (1948) met en évidence plus de types chromogènes dans la rhizosphère. CLARK et SMITH (1950) signalent que *B. brevis*, *B. circulans* et *B. polymyxa* constituent la fraction la plus importante des *Bacillus* dans la rhizosphère; *B. polymyxa* étant plus abondant près des racines de Céréales, *B. megatherium* près des racines du Coton. Dans le groupe des *Pseudomonas* fluorescents, les mêmes auteurs montrent que les cultures pures des variétés trouvées dans le sol sont différentes de celles de la rhizosphère : la majorité des souches isolées du sol ne fermentent pas le saccharose ou l'amidon, alors que les souches isolées au voisinage des racines le font. VALLEAU et ses collaborateurs (1942-1944) trouvent en permanence sur les racines de plantes cultivées des colonies de *Bacterium* et de *Xanthomonas* pathogènes pour le Tabac. CONTOIS (1953) étudie la microflore de la rhizosphère de l'Ananas : il cite un grand nombre d'espèces sans spécifier celles qui paraissent être les dominantes. FEDOROV et NEPOMILOVEV, en 1954, PANTOS, en 1955, décrivent un certain nombre de souches dans la rhizosphère de la Phléole et du Blé; malheureusement les isolements faits sur la gélose nutritive classique ne présentent pas beaucoup d'intérêt, ce milieu étant trop différent du sol.

Un travail très intéressant de WEBLEY et de ses collaborateurs (1952) sur la microflore de la rhizosphère des plantes colonisant les dunes montre qu'il y a une forte proportion d'*Actinomycétales* (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*) formant ce que LOCHHEAD (1940) appelle la flore indigène d'un sol. Ceci est confirmé par MILOSEVIC (1956). GYLLENBERG (1955), dans les sols vierges de Finlande, trouve que dans la rhizosphère des Graminées les bâton-

nets Gram négatifs appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Flavobacterium*, les Bactéries Gram positives, au genre *Corynebacterium*, et que les Bactéries sporulées sont voisines de *Bacillus cereus*. УАРОВА (1956), dans la rhizosphère du Blé, observe des Bactéries voisines de *Micrococcus radiatus*, de *Flavobacterium aurantiacum* et de *Pseudomonas radiobacter*, ayant une action solubilisante sur le phosphate tricalcique. Ainsi les études taxonomiques, quoique limitées, sont suffisantes pour montrer des différences qualitatives dans les microflores bactériennes de la rhizosphère et du sol témoin, quoique, pour la plupart des genres et des espèces, on ne sache pas s'ils sont activés, inhibés ou indifférents au développement des racines. Pour BORODULINA (1941), c'est la microflore de la graine qui se développe ensuite dans la rhizosphère.

c) *Groupes nutritionnels.*

Pour comprendre les relations entre les racines et la microflore du sol, il semble indispensable de connaître l'activité physiologique et les besoins nutritionnels des micro-organismes de la rhizosphère. Déjà THOM (1935) avait observé que ces micro-organismes appartenaient à des espèces actives dans la décomposition de la matière organique fraîche du sol, et non à des espèces associées à la dégradation des résidus humiques. Ce premier type de microflore est composé d'organismes à croissance rapide, avec un pouvoir saccharolytique ou protéolytique accusé, le second type, de formes à croissance plus lente, moins spécialisées dans leurs besoins nutritifs. LOCHHEAD (1940), étudiant des cultures pures de Bactéries isolées du sol et de la rhizosphère, montre que ces dernières ont une activité physiologique plus grande et qu'un plus grand pourcentage d'entre elles liquéfie la gélatine, fermente le glucose, est mobile et chromogène. KRASSILNIKOV et ses collaborateurs (1936) avaient déjà signalé que les micro-organismes prédominant dans la rhizosphère étaient des bâtonnets à fort pouvoir ammonifiant; les types cellulolytiques étaient aussi nombreux.

Avec la méthode de TAYLOR et LOCHHEAD (1938) permettant de classer les Bactéries isolées du sol à partir d'un milieu non sélectif (gélose à l'extrait de terre) selon leurs caractères nutritionnels, WEST et LOCHHEAD (1940) observent que les Bactéries de la rhizo-

sphère du Lin et du Tabac ont des besoins nutritifs plus complexes que celles des sols témoins correspondants.

La technique utilisée par les chercheurs de l'école canadienne mérite d'être exposée avec quelques détails, car elle a conduit à un travail d'ensemble dont les conclusions sont très intéressantes. Dans cette technique, des dilutions convenables de sol sont ensemencées dans un milieu gélosé à l'extrait de terre, incubées quatorze jours à 28° C, toutes les colonies (100 à 200) repiquées dans un milieu semi-solide à l'extrait de terre additionné de 0,02 p. 100 de phosphate monopotassique, 0,01 p. 100 d'extrait de levure et 0,3 p. 100 de gélose, puis testées ensuite dans sept milieux de complexité croissante, permettant de répartir les Bactéries isolées en sept groupes :

1° Bactéries à fort pouvoir de synthèse, se développant dans un milieu minéral de base ( $\text{NO}_3\text{K}$  comme seule source d'azote) avec du glucose.

2° Bactéries nécessitant des acides aminés, se développant dans le milieu de base additionné d'un mélange de dix acides aminés (cystéine, alanine, proline, asparagine, acide glutamique, acide aspartique, arginine, leucine, glyco-colle et lysine).

3° Bactéries nécessitant des facteurs de croissance, se développant dans le milieu de base additionné d'un mélange de facteurs de croissance (thiamine, biotine, pyridoxine, acide pantothénique, acide nicotinique, riboflavine et inositol) et de cystéine.

4° Bactéries nécessitant des acides aminés et des facteurs de croissance, se développant dans le milieu de base additionné des mélanges d'acides aminés et de facteurs de croissance.

5° Bactéries nécessitant les facteurs inconnus contenus dans l'extrait de levure, se développant dans le milieu de base additionné de 0,1 p. 100 d'extrait de levure DIFCO.

6° Bactéries nécessitant les facteurs inconnus contenus dans l'extrait de terre, se développant dans le milieu de base additionné d'extrait de terre.

7° Bactéries nécessitant les facteurs inconnus contenus à la fois dans l'extrait de terre et dans l'extrait de levure, se développant dans le milieu de base additionné d'extrait de terre et d'extrait de levure.

On verra dans le *chapitre II* que TAYLOR (1951) a préconisé

ultérieurement des modifications de cette technique qui n'ont pas résisté à une étude critique.

Les conclusions de LOCHHEAD et de ses collaborateurs sont les suivantes : dans la rhizosphère de toutes les plantes étudiées et par rapport au sol témoin, il y a une augmentation du pourcentage des Bactéries nécessitant des acides aminés et une diminution de celles qui ont besoin d'extrait de levure. Les différences sont d'autant plus nettes que le sol témoin est moins riche en matière organique et que les variétés de plantes sont plus sensibles à la pourriture des racines. Ces résultats sont confirmés par KATZNELSON et RICHARDSON, en 1943, avec la Tomate et, en 1948, avec le Fraisier. LOCHHEAD et THEXTON (1947) montrent que les Bactéries nécessitant des facteurs de croissance connus ne sont pas stimulées dans la rhizosphère. WEST et LOCHHEAD, en 1940, proposent que l'équilibre existant entre les groupes nutritionnels dans le sol ou dans la rhizosphère soit exprimé d'après un indice calculé en donnant une valeur négative au pourcentage des Bactéries Gram négatives se développant abondamment dans un milieu minéral simple, et une valeur positive à celui des Bactéries nécessitant des acides aminés et des facteurs de croissance; la somme de ces deux valeurs représentant l'indice d'équilibre bactérien. HILDEBRAND et WEST (1941), LOCHHEAD et CHASE, (1943), LOCHHEAD et THEXTON (1947) ont employé cet indice, mais les chercheurs autres que ceux de l'école canadienne ne l'ont pas utilisé. WALLACE et LOCHHEAD (1950) signalent que, parmi les acides aminés, le groupe du soufre (cystéine, méthionine et faurine) est le plus important et, parmi celui-ci, la méthionine a l'effet maximum; l'action est plus marquée dans le cas du Trèfle que dans celui du Lin ou du Blé. L'ensemble des conclusions des travaux de l'école canadienne est très important : un des effets rhizosphère les plus caractéristiques est la stimulation préférentielle des Bactéries à fort pouvoir de synthèse et des Bactéries nécessitant des acides aminés pour une croissance optimum, alors qu'il n'y a pas d'action semblable vis-à-vis des Bactéries nécessitant des facteurs de croissance connus, mais, au contraire, une action inhibitrice; les filtrats de culture des Bactéries se développant dans le milieu minéral de base stimulent la croissance des Bactéries nécessitant des acides aminés et inhibent celles qui nécessitent des facteurs de crois-

sance, ce qui prouve, qu'en dehors des excréctions radicellaires et de la décomposition des fragments de racines, des phénomènes d'associations et d'antagonismes jouent au sein de la rhizosphère. Cette action rhizosphère est plus marquée dans le cas des Légumineuses, ce qui est en accord avec la découverte par VIRTANEN et LAINÉ (1939) de l'excrétion d'acides aminés par les racines des Légumineuses, et moins nette après incorporation d'engrais verts. Un autre effet rhizosphère certain, d'après KATZNELSON et RICHARDSON (1943 et 1947), LOCHHEAD et THEXTON (1947), WALLACE et LOCHHEAD (1950), est l'action inhibitrice sur les Bactéries ayant des besoins en facteurs de croissance contenus dans l'extrait de terre. Pour WALLACE et LOCHHEAD (1951), après l'étude des besoins nutritionnels des Bactéries de diverses graines, les micro-organismes de la rhizosphère peuvent être considérés comme un groupe intermédiaire entre les Bactéries du sol et celles des semences.

En 1956, GYLLENBERG montre avec une technique simplifiée que les Bactéries non sporulées, isolées de la rhizosphère de Graminées dans des sols vierges de la Finlande, peuvent être classées en trois groupes :

1° Des bâtonnets courts, Gram négatifs, se développant avec  $\text{KNO}_3$  comme seule source d'azote, stimulés par des acides aminés, ne nécessitant pas de vitamines du groupe B.

2° Des bâtonnets courts, Gram négatifs, ne se développant pas avec  $\text{KNO}_3$ , nécessitant des acides aminés mais pas de vitamines du groupe B.

3° Des bâtonnets polymorphes, Gram variables à Gram positifs, nécessitant des acides aminés et des vitamines du groupe B, parmi lesquelles la biotine, la thiamine et l'acide *p*.amino-benzoïque sont les plus importantes.

En fait, dès 1956, l'opinion de LOCHHEAD et BURTON est plus nuancée : quoique les Bactéries nécessitant des facteurs de croissance soient proportionnellement moins nombreuses dans la rhizosphère des plantes étudiées (Blé, Orge et Soja), leur nombre absolu augmente, laissant supposer que ce sont les Bactéries capables de synthétiser ces facteurs qui sont stimulées préférentiellement. Cette démonstration est faite en 1957 par LOCHHEAD; il étudie les proportions relatives des Bactéries isolées d'un sol témoin et de la rhizosphère de l'Orge et du Seigle capables de synthétiser cinq facteurs

de croissance (thiamine, biotine, vitamine B<sub>12</sub>, riboflavine et « terregens factor ») : dans la rhizosphère de l'Orge, par exemple, le pourcentage relatif des Bactéries capables de synthétiser ces facteurs de croissance est plus important que dans le sol témoin et leur nombre absolu est beaucoup plus élevé, indiquant que cette synthèse joue un rôle dans les rapports plantes-micro-organismes. En 1957, également, PAYNE, ROUATT et LOCHHEAD estiment que les relations entre les micro-organismes ayant des besoins nutritionnels différents ont autant d'importance que celles existant avec les racines : en effet, la majorité des Bactéries du sol ayant des besoins simples se montrent capables de synthétiser un grand nombre d'acides aminés; la stimulation préférentielle, dans la rhizosphère, des Bactéries nécessitant des acides aminés peut être due en partie à la propriété du premier groupe de Bactéries de synthétiser des acides aminés, car elles y sont numériquement plus nombreuses.

d) *Groupes physiologiques.*

Dans des travaux récents, WALLACE et KING, en 1954, puis en 1956, ont essayé de grouper les Bactéries d'après leurs caractères morphologiques et physiologiques pour étudier l'action rhizosphère de l'Orge et de l'Avoine. Ces auteurs ont montré que les bâtonnets Gram positifs sont proportionnellement plus nombreux dans les sols témoin que dans les sols rhizosphère, surtout dans le cas de l'Avoine : il y a donc une proportion de bâtonnets Gram négatifs plus importante dans la rhizosphère de ces deux plantes; mais, dans celle de l'Orge à maturité, ils observent une augmentation du nombre des bâtonnets Gram positifs. L'étude physiologique montre qu'il y a une légère réduction du nombre des Bactéries liquéfiant la gélatine et des Bactéries amylolytiques dans la rhizosphère de l'Avoine, alors que la seule augmentation caractéristique, en pourcentage, des groupes physiologiques, dans la rhizosphère des jeunes Avoines, est celle des réducteurs de nitrates. Les auteurs concluent, un peu rapidement, qu'il n'y a pas d'augmentation, mais plutôt une diminution du pourcentage de certains groupes physiologiques dans la rhizosphère de l'Orge ou de l'Avoine semées dans des limons, et que ces différences sont plus grandes chez les plantes à maturité que chez les jeunes plantes.

C'est ainsi qu'en 1956, KATZNELSON, ROUATT et PAYNE mettent en évidence, dans la rhizosphère du Blé cultivé en pleine terre et à maturité, une augmentation importante du nombre des Bactéries ammonifiantes et dénitrifiantes, confirmant les observations de FEDOROV et NEPOMILOVEV, (1954), sur *Phleum pratense*. En 1957, KATZNELSON et ROUATT, en utilisant les tests suivants (réduction du bleu de méthylène, production de gaz et d'acide à partir du glucose, action ammonifiante et dénitrifiante), montrent que la rhizosphère de certaines plantes cultivées (Blé, Avoine, Orge et Seigle) héberge des populations physiologiquement plus actives que celles du sol témoin. La même année, en employant des tests différents (oxydation du glucose, de l'alanine, de l'acétate et du succinate), ZAGALLO et KATZNELSON confirment ces résultats dans la rhizosphère du Blé, ainsi que NILSSON dans celle de l'Avoine, de l'Orge et du Pois. Malheureusement, les techniques employées par ces auteurs ne sont pas écologiques, comme on le verra dans le chapitre suivant.

Mais le fait d'envisager l'effet rhizosphère sur la physiologie des micro-organismes se retrouve dans l'important travail de DASTE (1956) qui, après avoir mis au point une technique simple de préparation du silico-gel et déterminé de façon rigoureuse les conditions précises d'ensemencement avec des grains de terre, étudie l'effet rhizosphère de l'*Ephedra*, du Pin Maritime et du Blé sur certains groupes physiologiques de Bactéries du sol. Il obtient des résultats intéressants que l'on peut résumer ainsi : l'équilibre bactérien dans la rhizosphère est dû à tout un ensemble d'actions résultant de la production de substances toxiques (par exemple d'éphédrine) ou stimulantes, accompagnée d'association entre des Bactéries appartenant à des groupes physiologiques différents. Parmi les Bactéries de la rhizosphère du Pin, il en isole une, *Flavobacterium resinovorum*, dont les caractères nutritionnels sont très particuliers, ayant un métabolisme « rétinolytique », oligonitrophile, formant une association complexe avec les *Azotobacter*. Dans la rhizosphère de l'*Ephedra*, il observe une association cellulolytique entre un *Vibrio* et un Champignon malheureusement non identifié. L'effet rhizosphère de ces plantes sur les groupes physiologiques qu'il étudie sera revu dans le chapitre IV.

## Chapitre II

### DÉTERMINATION DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES NÉCESSAIRES À L'ÉTUDE DE LA RHIZOSPHERE

#### A. — MÉTHODES D'ÉTUDES ANTÉRIEURES

L'étude quantitative et qualitative de la rhizosphère nécessite au préalable celle des différentes techniques employées. En effet, s'il y a assez de concordance dans les méthodes de prélèvement et de traitement des échantillons, il y a déjà beaucoup moins d'accord sur les conditions expérimentales et presque plus rien de comparable dans les techniques d'analyse du phénomène. Un examen critique permettra de définir les meilleures conditions d'expérimentation.

#### I. Méthodes de prélèvement

STARKEY (1929-1931) fait des raclages de la surface radicellaire pour étudier le *rhizoplan*. CLARK (1940), MITCHELL et HOOTON (1941) les utilisent quelquefois, mais la plupart des chercheurs de cette école, THOM et HUMFELD (1932), CLARK (1939-1949), CLARK et THOM (1939), STUMBO, GAINNEY et CLARK (1942) prélèvent les racines entières avec la terre adhérente. S'il s'agit de plantes à racines fibreuses, ils utilisent tout le système radicellaire; si ce sont des plantes à racines pivotantes ou charnues, seules les racines secondaires ou jouant un rôle dans la nutrition sont retenues. Le prélèvement est fait de telle manière que la surface des racines soit préservée autant que possible en évitant de prendre les parties grosses ou charnues qui contiennent une grande quantité de matière ne faisant pas partie de la rhizosphère : pour l'étude des racines de ce type, les raclages de la surface semblent préférables. Des prélèvements identiques sont

effectués par les chercheurs canadiens, TIMONIN (1940), KATZ-NELSON (1946), LOCHHEAD et ses collaborateurs (1940 à 1957) qui ont employé la technique suivante : les plantes sont arrachées soigneusement en évitant de briser l'ensemble du système radicellaire, secouées pour éliminer toute la terre qui n'est pas vraiment adhérente aux racines, puis immergées dans une fiole contenant un volume connu d'eau stérile et agitées.

Après cette opération, les racines sont retirées, lavées, l'eau de lavage recueillie dans la fiole originelle d'où l'on fait des dilutions successives. Ensuite, les dilutions faites, on détermine, après dessiccation, le poids sec et les résultats sont rapportés à 1 gramme de terre. D'autres auteurs expriment les résultats différemment, soit par gramme de raclage de la surface des racines, suivant STARKEY (1931), soit par centimètre carré de la surface radicellaire ou par rapport au liquide de lavage des racines. Ces deux dernières méthodes sont peu utilisées. CLARK (1948) montre que le fait d'exprimer la population microbienne de la rhizosphère par gramme de terre adhérente sans tenir compte de la quantité de racines pose de sérieux problèmes. En effet, quand le matériel radicellaire est fin ou qu'il y en a peu par rapport à la terre retenue, les essais peuvent être rapportés à 1 gramme de terre; mais si ce sont des racines auxquelles peu de terre adhère, il apparaît raisonnable de faire les dénombrements par rapport à 1 gramme d'échantillon brut, c'est-à-dire comprenant les racines avec la terre retenue, comme l'ont signalé TYNER (1948), KATZNELSON, LOCHHEAD et TIMONIN (1948). Dans tous les autres cas, l'effet rhizosphère est exprimé au moyen du rapport R/S qui représente le nombre de micro-organismes dans la terre de la rhizosphère divisé par le nombre de micro-organismes dans le sol prélevé à une certaine distance des racines ou sol témoin. PANTOS (1956) emploie les techniques soviétiques de TEPPER (1945), de BEREZOVA (1946) et de FEDOROV (1951) qui permettent de séparer la *rhizosphère proche* du *rhizoplan*, mais cette recherche nécessite une trituration des racines dans de l'eau stérile conduisant à l'obtention d'une bouillie contenant à la fois des Bactéries, des cellules radicellaires, des fragments de mycélium et de la terre, qu'il est difficile de comparer au sol témoin. Il est préférable, comme il a été indiqué dans l'Introduction, de séparer la *rhizosphère proche* de la

*rhizosphère éloignée* dont les prélèvements seront faits de la manière suivante :

- a) Enlever les plantes du pot sans léser les racines;
- b) Prélever la terre n'adhérant pas aux racines, la mélanger de façon homogène, ce qui constitue la *rhizosphère éloignée*;
- c) Recueillir la terre adhérente aux racines ainsi que l'eau de lavage des racines, le mélange représentant la *rhizosphère proche*.

## II. Facteurs agissant sur l'effet rhizosphère

### 1° — TENEUR EN EAU DE L'ÉCHANTILLON

C'est là un facteur essentiel et difficile à régler. TIMONIN (1940), étudiant la rhizosphère du Lin à différents taux d'humidité du sol, trouve une population microbienne plus élevée à 30 p. 100 de saturation qu'à 60 p. 100. CLARK (1940) observe que le rapport R/S (environ 9 dans le cas de la microflore totale) ne varie pas beaucoup de 12 à 20 p. 100 d'humidité, mais qu'il diminue jusqu'à 4,5 quand le taux d'humidité s'élève à 24,5 p. 100 : il montre qu'il est pratiquement impossible de régler l'humidité dans les cultures en champ d'expérience; c'est pourquoi il est nécessaire d'expérimenter en pots. Dans une étude consacrée à l'action de l'humidité sur la population microbienne de la rhizosphère du Soja, en serre, CLARK (1948) note que les dénombrements sont plus élevés quand les racines proviennent de sols secs que de sols humides. Les poids plus élevés des échantillons bruts des racines de sols humides, leur apparence macroscopique, la plus petite proportion de matériel radicellaire, rendent plausible le fait que les différences dans les dénombrements sont dues surtout à l'adhésion plus importante de la terre sur ces racines. Les observations faites sur deux pots dans lesquels les plantes se sont développées en même temps à une faible humidité, un pot dans lequel le prélèvement est fait tel quel, l'autre après humidification jusqu'à saturation juste avant, montrent que le dénombrement est plus faible quand les racines sont prélevées dans le pot contenant le sol humidifié. Ceci est lié à une action mécanique : il n'y a en effet aucune raison de croire à une réduction du nombre des Bactéries par suite de l'humidi-

dification, un tel traitement n'étant certainement pas bactériostatique, surtout pendant un temps si court. C'est pourquoi les conditions expérimentales suivantes seront réalisées :

a) Arrosages plus ou moins fréquents suivant les conditions atmosphériques en réglant l'égalité de la teneur en eau des différents pots (pots semés et pots témoins) par pesée.

b) Quarante-huit heures avant le prélèvement, retirer les pots à analyser et les laisser dans une pièce assez fraîche (température < 15° C) sans les arroser, afin d'obtenir une humidité convenable et à peu près constante lors des différentes analyses (entre 8 et 15 %).

## 2° — INFLUENCE DE LA RÉGION DE LA RHIZOSPHERE ÉTUDIÉE

Les diverses parties du système radicellaire d'une plante isolée hébergent des populations rhizosphère différentes, au moins d'après les méthodes de culture qui les mettent en évidence. Quelques-unes de ces différences sont dues aux variations dans la composition des échantillons analysés, mais, quelles qu'en soient les raisons, les populations rhizosphère les plus importantes sont trouvées plutôt dans les parties du système radicellaire qui sont dans le profil supérieur du sol que dans les parties éloignées, d'après SABININ et MINIMA (1932) et CLARK (1939). S'il s'agit du Blé, il est intéressant de noter, avec CLARK (1939), que le plus grand nombre de micro-organismes se trouve au voisinage des racines dans les quatre premiers pouces de profondeur, même si la population du sol la plus abondante se trouve dans les 1<sup>er</sup>, 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> pouces du sol par suite d'une forte application de fumure. La concentration des Bactéries dans cette zone apparaît ainsi indépendante de la concentration des Bactéries dans le sol qui vivent normalement dans les horizons supérieurs. VOZNIAKOVSKAIA (1948) signale aussi que l'effet rhizosphère nécessite des racines vivantes. Ainsi les racines mortes du Blé n'ont aucune action rhizosphère, sauf vis-à-vis des Bactéries cellulolytiques. NILSSON (1957) démontre qu'il est nécessaire d'avoir une concentration élevée en substances excrétées par les racines, donc une forte densité de racines par rapport au sol. C'est pourquoi l'expérimenta-

tion sera faite en pots de 14 centimètres sur 14 centimètres contenant environ 1 kilogramme de terre et trois plantes par pot.

### 3° — INFLUENCE DES DIVERS TYPES DE SOL

On sait peu de choses. THOM et HUMFELD (1932) notent des variations importantes du rapport R/S quand ils cultivent du Seigle dans trois sols différents. S'ils sèment du Blé dans des sols dont le pH varie de 4,5 à 8,1 ils observent que les Bactéries de la rhizosphère sont plus nombreuses dans les sols voisins de la neutralité ou à des pH très légèrement acides, les Champignons dans les sols les plus acides ou les plus alcalins, tandis que les Actinomycètes ne présentent pas de variations en fonction du pH. ADATI (1939) montre que les rapports R/S décroissent dans l'ordre suivant selon les divers sols : limon, sable, argile et humus. CLARK (1940) fait des observations analogues. Mais on ne sait pas si la composition du sol agit directement sur les micro-organismes ou indirectement sur la croissance de la plante. POCHON (1956) et NILSSON (1957) mettent en évidence que les rapports R/S sont d'autant plus élevés que le sol témoin est moins riche en micro-organismes. Ces résultats conduiront à employer un limon argileux ayant une faible teneur en micro-organismes.

### 4° — INFLUENCE DES TRAITEMENTS DU SOL

Étant donné que les fumures organiques agissaient sur certains Champignons pathogènes des racines, de nombreuses études furent faites sur l'effet de ces amendements vis-à-vis de la microflore de la rhizosphère. En expérimentant avec des échantillons de sols fumés, témoin ou stérilisés par la chaleur, mis en pots et semés avec du Blé, CLARK (1939) trouve que la microflore de la rhizosphère est indépendante de la microflore du sol. STUMBO, GAINNEY et CLARK (1942) mettent en évidence que les facteurs de la nutrition de l'hôte ont plus d'importance que les antagonismes microbiens dans le cas

de la pourriture des racines du Blé. TIMONIN (1940), MITCHELL, HOOTON et CLARK (1941), KATZNELSON et RICHARDSON (1943) montrent que les fumures organiques ne modifient pas beaucoup la microflore de la rhizosphère. Quelquefois, cependant, il y a une influence indirecte des traitements organiques. Ainsi KATZNELSON (1946) observe que le dénombrement des Bactéries, des Champignons, des Actinomycètes et des Protozoaires atteint un maximum dans la rhizosphère de Betteraves croissant vigoureusement dans des sols fumés, au maximum de leur végétation; en outre, des plantes identiques, dans des sols non fumés, se développent beaucoup plus lentement, mais atteignent à la fin de leur croissance une taille comparable et, dans ce cas, l'effet rhizosphère est le même, quoique plus tardif. En fait, la fumure agissant sur la croissance, la vigueur et la maturité de la plante, influence indirectement la microflore de la rhizosphère; on verra, en effet, que le stade du développement de la plante a une action importante. HILDEBRAND et WEST, en 1941, trouvent que la fumure, qui agit sur l'apparition de la pourriture des racines du Fraisier, modifie les proportions relatives des groupes nutritionnels bactériens dans sa rhizosphère. Donc, des différences dans la plante-hôte, après une fertilisation organique, peuvent produire des changements dans la microflore de la rhizosphère, laquelle, en retour, peut affecter l'apparition des maladies de la pourriture des racines. Il faut signaler qu'il y a un grand nombre de travaux concernant l'action des divers amendements sur la pourriture des racines, ou consacrés à l'action du traitement des plantes (par l'application d'herbicides ou d'insecticides) sur l'effet rhizosphère, ce qui sort du cadre de cette étude. Le chaulage, d'après OBRASTZOVA (1935), augmente le nombre des Bactéries dans la rhizosphère d'environ 25 p. 100. FEDOROV et NEPOMILOVEV (1954) montrent que l'apport d'engrais organiques et minéraux exerce une action identique, observation confirmée par POCHON (1956) dans la rhizosphère du Maïs. Tout ceci incitera à utiliser une terre n'ayant reçu aucun engrais, organique ou minéral, afin d'avoir une action rhizosphère absolument naturelle.

5° — INFLUENCE DE LA MICROFLORE DE LA RHIZOSPHERE  
SUR LES PLANTES ASSOCIÉES OU SUCCESSIVES

Ici se situe un phénomène que la plupart des auteurs étudiant l'effet rhizosphère paraissent avoir négligé lors de leurs expériences, sauf BALICKA (1958) qui, dans le cas de la Vesce et du Seigle, découvre que les micro-organismes de la rhizosphère d'une plante peuvent influencer sur ceux d'une autre plante se développant successivement ou simultanément dans le même sol. Ces processus microbiologiques sont dus :

a) Soit à l'établissement et à la persistance de la microflore de la rhizosphère dans les terres de culture.

b) Soit à la persistance des changements apportés par cette microflore dans le sol.

a) *Persistance de la microflore de la rhizosphère  
dans les terres de culture*

Il y a peu de faits précis sur la durée de la vie de la microflore qui s'est développée au voisinage des racines après la mort des plantes. Il paraît évident qu'une grande partie des micro-organismes associés à une culture ne persiste pas longtemps après la récolte. Dès 1912, BROWN trouve que la culture actuelle d'un sol a plus d'importance du point de vue microbiologique que les cultures précédentes. Une rotation des cultures provoque la multiplication d'un plus grand nombre de micro-organismes dans le sol qu'une même culture. Dans des sols cultivés en Pomme de terre ou en Avoine, STARKEY (1929) note un abaissement du nombre des Bactéries après la maturité et la mort des plantes. On sait généralement que les populations microbiennes les plus élevées sont observées seulement pendant de courtes périodes après l'addition de matière organique dans le sol. SMITH et HUMFELD (1931), étudiant la décomposition des engrais verts, en serre, observent que l'effet de l'enfouissement de la Vesce et du Seigle sur le nombre des micro-organismes du sol disparaît en quelques jours. Quand des plantes croissent dans un sol et qu'à la fois les tiges et les racines sont retournées et enfouies comme engrais

vert, une augmentation secondaire du nombre des micro-organismes du sol est observée après quatorze à vingt et un jours. Ces effets disparaissent ensuite en sept à quatorze jours. Un tel travail met en relief la rapidité avec laquelle des changements dans la microflore s'établissent dans le sol. Cependant, dans les cultures en pleine terre où, en règle générale, les conditions d'humidité et de température sont moins favorables pour l'activité microbienne que celles d'une serre, une plus longue période de temps est nécessaire. Dans des parcelles du Nebraska, DAWSON et Mc CALLA (1948) trouvent que l'effet stimulant de l'enfouissement des restes de récolte sur le nombre des micro-organismes du sol est important les premiers mois, puis disparaît complètement en neuf mois. Des changements qualitatifs sont observés par KRASSILNIKOV et NIKITINA (1945) : il y a une variation brutale dans les types de micro-organismes pendant la décomposition des racines. Cependant, quoiqu'il n'y ait pas de changements quantitatifs durables dans les populations microbiennes d'un sol cultivé, certains micro-organismes rhizophiles sont retrouvés à des intervalles plus ou moins éloignés après la récolte. SMITH (1928) note une augmentation du nombre des *Radiobacter* dans le sol plusieurs semaines après la disparition des Légumineuses. Selon FRED, WHITING et HASTINGS (1926), après avoir inoculé les graines, des Bactéries des nodosités ont persisté dans le sol plusieurs années après. GYLLENBERG (1957) étudie les variations saisonnières dans la composition de la microflore du sol en fonction de la croissance de l'Avoine : au début, la microflore du sol est tout à fait différente de celle de la rhizosphère, puis elle change et, à la maturité, elle devient identique. Ce changement commence depuis la surface jusqu'aux couches plus profondes du sol, permettant de conclure à une action provoquée par la croissance des racines suivie par la migration des Bactéries de la rhizosphère dans le sol.

b) *Persistence des changements dans le sol  
apportés par la microflore de la rhizosphère*

On sait depuis longtemps qu'une espèce végétale peut avoir une influence favorable ou défavorable sur d'autres plantes qui croissent à proximité ou postérieurement. Parmi ces effets avantageux ou

non, certains peuvent résulter de changements dans le milieu-sol provoqués par la microflore accompagnant certaines cultures. Étant donné que les effets d'une culture sur la structure physique d'un sol persistent pendant plusieurs années, une telle modification peut parfois expliquer l'influence d'une culture sur les suivantes; ainsi, les Graminées, par exemple, augmentent l'agrégation d'un sol et leur inclusion dans une rotation est à recommander. Cette influence favorable n'est pas observée après une courte période, mais cette structure améliorée, une fois atteinte, est plus durable que celle obtenue par l'incorporation de matière organique déjà décomposée dans le sol. BREAZEALE (1924) pense que l'effet défavorable d'une culture de Sorgho sur une culture suivante peut être dû au mauvais état de la structure du sol après. Il émet l'hypothèse que l'excrétion de cyanure par les racines du Sorgho diminue l'activité microbologique et abaisse suffisamment le pourcentage de gaz carbonique dans le sol pour que le calcium devienne moins actif, et que son remplacement dans les zéolithes par le sodium donne une défloculation du sol. Des publications de VALLEAU (1942 et 1944) signalent que certaines Bactéries pathogènes pour la Tomate et le Tabac hivernent sur les racines de diverses Graminées, ce qui rend difficile le traitement des maladies de ces plantes par la rotation des cultures : ces Bactéries sont donc des organismes adaptés à la rhizosphère de nombreuses plantes et se transmettent par des hôtes intermédiaires. PAGE et WILLARD (1947), d'autre part, remarquent qu'au point de vue de la structure du sol, la combinaison d'une Légumineuse à racines profondes et d'une Graminée semble idéale : quand on sait le rôle joué par les Bactéries dans la structure du sol, on voit que ce n'est pas uniquement la nutrition azotée de la Graminée qui importe dans cette association. En dehors de celles de BALICKA (1958), il n'y a pas eu de recherches pour étudier les rhizosphères mixtes des racines entremêlées de Luzerne et de Graminées croissant ensemble et que NICOL (1935) a mis en évidence dans des cultures sur sable; mais il est vraisemblable que la combinaison de ces deux systèmes radicellaires avec leurs microflores respectives agisse, et sur l'utilisation des éléments nutritifs, la production de facteurs de croissance et la structure du sol, en plus de la fixation de l'azote gazeux. Ces résultats fragmentaires et incomplets laissent penser

que, si la microflore caractéristique d'une culture donnée ne survit pas longtemps après la récolte, certains types de micro-organismes peuvent cependant persister plus tardivement, et que l'action indirecte de cette microflore, par ses changements dans les conditions physiques et chimiques du sol, se maintient suffisamment pour influencer sur la rhizosphère des cultures suivantes. Bien qu'aucune publication ne semble l'avoir mentionné dans l'étude de la rhizosphère, il est indispensable d'employer une terre de jachère sarclée, afin d'éviter tout effet rhizosphère, même lointain, tout apport organique ou minéral susceptible d'avoir provoqué des modifications dans la microflore, et ceci depuis plusieurs années. Cette terre est ainsi dans un état biologique stable permettant de fixer ses caractéristiques du point de vue des espèces qui l'habitent et de leur action physiologique. C'est la terre témoin de WINOGRADSKY (1949) ou *terre normale*.

6° — INFLUENCE DU TYPE ET DU STADE  
DE LA CROISSANCE DE LA PLANTE

Dans les premières recherches, les auteurs comparèrent l'effet rhizosphère de diverses plantes ayant le même âge; or ces plantes, par suite de taux de croissance variés et de périodes de maturité diverses, n'étaient pas au même stade de leur croissance. STARKEY, dès 1929, note des différences dans la population de la rhizosphère aux stades successifs de la croissance d'une même plante et il remarque que, par rapport aux divers groupes de micro-organismes, les résultats sont variables suivant les plantes. Ainsi, les racines de la Luzerne ne stimulent que légèrement les Champignons, alors que celles de l'Aubergine exercent une action appréciable. Cette plante accroît considérablement le nombre des Bactéries et des Actinomycètes dans sa rhizosphère, tandis que la Betterave et le Blé sont moins actifs; il observe une augmentation importante du nombre des Bactéries dans la rhizosphère du Colza, plus faible dans celle de la Pomme de terre. Mais en aucun cas le rapport R/S n'est supérieur à 2. Ceci s'explique par le fait que ses échantillons ne provenaient pas de la terre au contact même des racines, mais du sol qui les entourait, représentant uniquement la *rhizosphère éloignée*. D'après STAR-

KEY (1929-1931), la plupart des plantes n'exercent pas d'action importante aux premiers stades de leur croissance; l'effet maximum n'apparaît qu'à la fin, lorsque la plante a atteint une dimension importante, généralement lors de la floraison ou au début du flétrissement. A la mort, il y a une diminution rapide du nombre des Bactéries. Les plantes bisannuelles ont une action marquée même aux derniers stades de leur croissance. En 1931, il montre que l'effet rhizosphère est plus important au contact des racines, et que les Bactéries sont beaucoup plus stimulées que les Champignons ou les Actinomycètes. Il obtient les résultats résumés dans le tableau I.

TABLEAU I

INFLUENCE DES STADES DE LA VÉGÉTATION DU TRÈFLE BLANC SUR L'EFFET RHIZOSPHÈRE (exprimé en rapport R/S)

*D'après Starkey (1931).*

AGE DE LA PLANTE (en j)	RAPPORT R/S		
	BACTÉRIES	ACTINOMYCÈTES	CHAMPIGNONS
365. . . . .	50	—	—
437. . . . .	217	8,6	10

Il remarque que les plus grands nombres de Bactéries sont trouvés dans la rhizosphère des Légumineuses. GRAF (1930) fait des observations analogues. THOM et HUMFELD (1932) trouvent que les racines de la Luzerne, du Seigle et de la Vesce stimulent dans l'ordre, les Bactéries, les Champignons et les Actinomycètes. KRASSILNIKOV (1933) note que la rhizosphère de l'Arachide héberge dix à cent fois plus de micro-organismes que le sol témoin jusqu'à la floraison; vers la maturité, le nombre des Bactéries diminue, alors que celui des Champignons et des Actinomycètes continue à augmenter.

KRASSILNIKOV et ses collaborateurs (1936) observent des augmentations massives du nombre total de micro-organismes dans la rhizosphère du Blé, du Maïs, du Tournesol et du Soja : la plus grande dans celle du Soja, la plus petite dans celle du Blé. Dans le cas du Soja et du Tournesol, les augmentations les plus fortes se trouvent au début et à la fin de la croissance.

OBRASTZOVA (1935), étudiant le Théier, montre qu'en fonction de l'âge, il y a une augmentation corrélatrice du nombre des micro-organismes; ainsi une plante de deux ans héberge deux fois plus de micro-organismes. MANZON (1936), dans une publication concernant un grand nombre de plantes (Légumineuses ou non), conclut que le nombre et l'activité de la population bactérienne de la rhizosphère dépend à la fois de l'espèce de la plante et du stade de sa croissance; les dénombrements les plus élevés sont trouvés avec les Légumineuses. TIMONIN (1940), comparant les populations microbiennes de la rhizosphère de semis de Blé, d'Avoine, de Luzerne et de Pois, trouve que les rapports R/S varient de 7 à 71 pour la microflore totale (Bactéries et Actinomycètes), de 0,75 à 3,1 pour les Champignons; ce dernier groupe plus abondant dans la rhizosphère de l'Avoine et de l'Orge, le premier dans celle de la Luzerne. En général, un effet rhizosphère accru est observé quand l'âge des plantes augmente. ZUKOVSKAYA (1941), expérimentant avec la Pomme de terre, le Lin et le Trèfle, démontre que la population microbienne de la rhizosphère est environ cent fois plus grande que celle du sol témoin. Des changements de cette microflore coïncident avec la croissance de la plante, chaque plante augmentant l'activité d'une microflore spécifique. Dans le cas du Lin, BEREZOVA (1941) estime que différents types de micro-organismes sont associés aux plantes aux divers stades de leur croissance, certains à tous les stades, d'autres à quelques stades seulement, ou uniquement à la maturité.

S'il s'agit de Betteraves cultivées en pleine terre, KATZNELSON (1946) trouve qu'il y a un effet rhizosphère particulier selon l'âge des plantes sur les divers groupes de micro-organismes (Bactéries, Champignons, Actinomycètes, Algues et Protozoaires). Ainsi, dans des sols non fumés, il observe les résultats suivants (tabl. II).

On a vu plus haut (p. 21) que des effets rhizosphère distincts pouvaient être obtenus avec des variétés différentes d'une même plante. TIMONIN (1940), LOCHHEAD, TIMONIN et WEST (1940), WEST et LOCHHEAD (1940) sont concluants à cet égard: il y a toujours un plus grand nombre de Bactéries dans la rhizosphère des variétés de plantes sensibles à la pourriture des racines même quand elles ne sont pas atteintes. TIMONIN (1947) découvre que les variétés d'Avoine sensibles aux déficiences en manganèse hébergent dans

TABLEAU II

INFLUENCE DES STADES DE LA VÉGÉTATION DE LA BETTERAVE SUR L'EFFET RHIZOSPHERE  
(exprimé en rapport R/S)  
D'après Katznelson (1946).

AGE DE LA PLANTE (en j)	RAPPORT R/S		
	BACTÉRIES	ACTINOMYCÈTES	ALGUES
80. . . . .	35	3	0,4
117. . . . .	45	—	—
142. . . . .	113	30	29

leur rhizosphère un plus grand nombre de micro-organismes oxydant le manganèse sous forme inutilisable par les plantes que les variétés résistantes. Il y a donc, dans les variétés sensibles, des différences physiologiques favorables à la multiplication microbienne au voisinage des racines. Confirmation est donnée par HARPER (1950) avec des variétés de Bananiers sensibles ou résistantes à la *maladie de Panama*, par RUMKER (1951) avec diverses plantes sensibles ou résistantes à des *Fusarium* pathogènes. Cependant, ROMBOOTS (1953) n'admet pas les observations de HARPER.

L'ensemble de ces résultats amènera à étudier la rhizosphère du Blé :

- 1° En utilisant une variété définie.
- 2° A des stades bien déterminés de sa croissance.

B. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL ADOPTÉ

D'après l'étude bibliographique précédente, il apparaît indispensable d'employer une technique permettant d'étudier la microflore de la rhizosphère dans des conditions précises (milieu sol ou plante elle-même) afin d'éviter les résultats contradictoires ou imprécis dus aux différences importantes existant aussi bien dans l'interprétation du concept rhizosphère que dans les protocoles expérimentaux. En résumé, les conditions requises sont :

- une humidité inférieure à 20 p. 100;

— une quantité importante de racines par rapport à la terre de culture, de telle sorte que la distance maximum entre deux racines soit inférieure à 1 centimètre;

— un sol de limon, ayant une faible teneur en micro-organismes et maintenu plusieurs années en jachère sarclée;

— une variété bien définie, homogène, d'une plante, à des stades de sa croissance bien déterminés;

— un témoin en tout point comparable aux essais.

Par suite de la difficulté à respecter ces conditions, les conclusions des études comparatives de la rhizosphère de différentes plantes cultivées en pleine terre sont fréquemment contradictoires, ce qui rend indispensable l'emploi de culture en pots.

### I. Prélèvement de la terre utilisée

Il s'agit d'un limon argileux d'une parcelle maintenue en jachère sarclée provenant du Centre national de Recherches agronomiques de Versailles. Après quarante-huit heures de ressuyage, les mottes sont écrasées, la terre passée par le tamis n° 2, conservée douze jours dans une pièce fraîche dont le degré hygrométrique n'est pas trop bas (1) et bien mélangée.

### II. Préparation des pots

Ce sont des pots en terre cuite, homogènes, d'une même marque, de 14 centimètres sur 14 centimètres. Ils sont brossés soigneusement, immergés deux jours dans l'eau froide, lavés et stérilisés deux fois vingt minutes à 120° C. On les remplit d'environ 2 kilogrammes d'un mélange à poids égal de terre homogénéisée avec soin après passage par le tamis n° 2 et de graviers de sable de carrière passés par le tamis n° 5 et retenus sur le tamis n° 2, puis lavés et stérilisés deux fois vingt minutes à 120° C, afin d'obtenir une texture plus légère favori-

(1) La température est inférieure à 15° C et le degré hygrométrique compris entre 40 et 60 p. 100.

sant la croissance de la plante et le prélèvement des échantillons (1). Les pots remplis sont ajustés à poids constant.

### III. Réalisation des semis

L'expérience est faite avec un Blé de printemps, variété *Fylgia*. Les grains, après avoir été choisis d'après leur poids, commencent à germer pendant quarante-huit heures à la température du laboratoire, puis sont semés à raison de trois grains par pot (2). Après arrosage, les pots sont portés quelques jours dans une serre-étuve réglée à 15° C et éclairés par des tubes fluorescents type lumière du jour pendant douze heures chaque jour. Dès que possible, ils sont installés sur une terrasse bien exposée, protégés par un grillage et soumis aux conditions atmosphériques. Une moitié des pots est semée, l'autre servant de témoin.

Les arrosages sont fonction des précipitations : les pots, lors des pluies abondantes, sont mis sous abri afin d'éviter les pertes par lessivage; de même les arrosages sont fréquents, mais pas trop abondants, toujours en fonction de l'évaporation, à poids constant, afin d'avoir la même humidité dans les différents pots.

### IV. Prélèvements des essais en vue de l'analyse

La technique est la suivante (toutes les opérations étant réalisées en prenant les précautions d'asepsie habituelles) : quarante-huit heures avant de faire les analyses, les pots semés et les pots témoins sont portés dans une pièce fraîche, non arrosés, afin d'obtenir une humidité convenable et à peu près constante pour avoir des prélèvements de rhizosphère identiques (en fait l'humidité dans ces conditions varie de 8 à 15 % dans les cas extrêmes, avec une moyenne de 10 % environ).

(1) Les ouvertures des mailles des tamis PROLABO utilisés sont les suivantes :

— Tamis n° 2 : 2 millimètres. Module AFNOR 33.

— Tamis n° 5 : 5 millimètres. Module AFNOR 37.

(2) Les poids des grains sont compris entre 48 et 52 milligrammes. Ils sont semés à une profondeur de 4 à 5 centimètres environ.

Les différents prélèvements se font de la façon suivante :

1° — POTS SEMÉS

Les plantes sont enlevées avec précaution sans briser les racines pour conserver tout le chevelu radicellaire. On obtient ce résultat en décollant le bloc de terre à l'aide d'une spatule et en l'émiettant soigneusement sans léser le système radicellaire, puis en secouant légèrement les racines pour éliminer la terre qui n'adhère pas.

a) *Caractérisation de la rhizosphère éloignée*

Toute la terre contenue dans le pot est passée par le tamis n° 2 pour retenir les graviers, recueillie dans un mortier stérile et mélangée. On prélève de petites fractions (une vingtaine environ) prises au hasard à partir desquelles 5 grammes seront pesés, ce qui représente la *rhizosphère éloignée*. Étant donné la proportion importante du système radicellaire par rapport au contenu de chaque pot, on peut estimer en première approximation que tous les grains de terre sont à une distance des racines inférieure à 0,5 cm. Ces 5 grammes sont soigneusement broyés dans un mortier avec 45 millilitres d'eau ajoutés en plusieurs fois, puis recueillis dans une fiole Erlenmeyer de 250 millilitres agitée vingt-cinq fois avant de faire les dilutions. Ceci représente une dilution de la *rhizosphère éloignée* que l'on calcule après avoir fait l'extrait sec à 100° C sur une partie aliquote (v. photo 2, pl. II).

b) *Caractérisation de la rhizosphère proche*

Après avoir coupé les tiges juste au-dessus du plateau de tallage, les racines sont recueillies soigneusement (avec leur chevelu radicellaire) dans un mortier, débarrassées de la terre qu'elles retiennent par adhérence et lavées dans une fiole Erlenmeyer contenant 45 millilitres d'eau stérile, de la façon suivante :

— Cinq minutes sans agiter, puis cinq minutes en agitant

dix fois par minute, en changeant de sens chaque fois et en faisant de larges mouvements de brassage circulaire. Le contenu de la fiole est remis dans le mortier contenant la terre qui était adhérente aux racines et l'on broie comme précédemment après avoir ajouté l'eau de rinçage. Ceci constitue une dilution de la *rhizosphère proche* que l'on calcule comme dans le cas de la *rhizosphère éloignée*.

## 2° — POTS TÉMOINS

Ils sont traités exactement comme la *rhizosphère éloignée*: enlever la terre, l'émietter, la tamiser, peser 5 grammes que l'on broie avec 45 millilitres d'eau et déterminer l'extrait sec à 100° C pour calculer la dilution exacte.

## V. Préparation des dilutions

A partir de ces échantillons, il est possible de faire des dilutions jusqu'au 1/100 000 000 (de  $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ). Pour ce faire, une technique rigoureuse est indispensable : afin de préparer une série de fioles Erlenmeyer de 250 millilitres contenant 45 millilitres d'eau stérile, il est nécessaire d'employer de l'eau de source ou de puits, non distillée, ne contenant rigoureusement aucune trace d'antiseptiques auxquels les micro-organismes du sol, tout au moins certains d'entre eux, peuvent être très sensibles, et stérilisée à l'autoclave vingt minutes à 120° C.

Avec une pipette de 10 millilitres stérile, on prélève 5 millilitres de la première dilution en homogénéisant bien la suspension (aspirer et rejeter trois fois le contenu de la pipette) et on les porte dans une deuxième fiole. On transfère à l'aide d'une nouvelle pipette 5 millilitres de cette deuxième fiole dans une troisième, ... etc., en prenant les mêmes précautions d'homogénéisation des suspensions à chaque transfert et en changeant de pipette à chaque dilution (1).

(1) Dans ces conditions, le volume obtenu est suffisant pour permettre l'ensemencement des divers milieux de culture qui doit se faire immédiatement.

## VI. Conduite des analyses

Elles ont consisté à étudier à quatre stades de la croissance du Blé (germination, tallage, épiaison et maturité) l'effet rhizosphère sur les principaux groupes morphologiques et physiologiques de micro-organismes du sol, en séparant l'*effet rhizosphère proche* de l'*effet rhizosphère éloignée*. L'expérience a porté sur deux années : 1956 et 1957. Les groupes retenus sont les suivants :

### 1° Groupes morphologiques :

- Microflore totale.
- Actinomycètes.
- Champignons.

### 2° Groupes physiologiques :

- Microflore fixatrice d'azote aérobie et anaérobie.
- Microflore ammonifiante.
- Microflore nitriceuse et nitrice.
- Microflore dénitrifiante.
- Microflore cellulolytique aérobie.
- Microflore amylolytique.

Les quatre stades correspondent à des durées de la végétation résumées dans le tableau III.

### TABLEAU III

DURÉES DE LA VÉGÉTATION CORRESPONDANT AUX DIVERS STADES  
DE LA CROISSANCE DU BLÉ  
(au cours de l'expérience réalisée en 1956 et en 1957)

STADES	DURÉE DE LA VÉGÉTATION : EN JOURS	
	Essai 1956	Essai 1957
Germination . . . . .	8	8
Tallage . . . . .	64	52
Épiaison . . . . .	88	90
Maturité . . . . .	141	141

Il faut noter que la germination a été analysée huit jours après son début, après maintien de la température à 15° C, pour pouvoir déceler l'effet rhizosphère, s'il y en a un, en laissant le temps nécessaire à la prolifération des micro-organismes du sol susceptibles d'être stimulés (ou inhibés). Les durées de la végétation au moment du tallage correspondent en réalité à la fin du tallage, au début de la montée; elles diffèrent, car, en 1956, les températures et la durée d'insolation des mois correspondants ont été plus faibles. Quant à la maturité, elle correspond, en fait, à un stade plus tardif afin de pouvoir déterminer s'il y a un effet rhizosphère après le flétrissement et la mort des plantes.

#### VII. Techniques microbiologiques employées

On a eu dans le *Chapitre I* un aperçu de la diversité des techniques employées par les auteurs qui ne permettaient guère de comparer les résultats entre eux. Il n'y a malheureusement pas, en microbiologie du sol, de techniques parfaites qui devraient tenir compte d'exigences contradictoires :

1° Respecter les postulats de KOCH dont le principal, l'inoculation expérimentale du milieu par la culture pure, manque dans le cas du sol. En effet, s'il ensemence un micro-organisme quelconque dans la terre non stérilisée, BARTHEL, dès 1919, remarque qu'il n'observe aucun développement; par contre, si la terre est stérilisée, WINOGRADSKY (1925) démontre qu'elle n'est plus qu'un milieu artificiel quelconque.

2° Suivre les préceptes de la méthode directe préconisée avec succès par WINOGRADSKY (1925). Les techniques qui consistent à isoler dans un milieu gélosé, même s'il s'agit de la gélose à l'extrait de terre, des cultures pures ne donnent qu'une partie de la population du sol et, en particulier, laissent échapper, dans une certaine mesure, la microflore autochtone, à développement lent, caractéristique de la microflore normale de WINOGRADSKY; d'autre part, en l'absence même de tout germe étranger, donc de toute compétition, il se crée une ambiance biologique artificielle qui permet d'explorer les caractères potentiels d'une souche que celle-ci n'aura

peut-être jamais l'occasion de développer, comme l'indique STARKEY (1958).

Si l'on désire conserver un caractère écologique des plus importants, la compétition, qui commande la répartition des activités microbiennes dans le sol, il faut donc renoncer à la culture pure, emprunter les micro-organismes directement au milieu naturel et chercher à les cultiver dans ce milieu (cultures en terre naturelle additionnée de divers substrats) ou dans un milieu présentant des caractéristiques assez voisines (cultures auxiliaires sur silico-gel). Les techniques de WINOGRADSKY (1925) basées sur ces principes ont conduit à des résultats remarquables sur le plan qualitatif, mais se sont heurtées à des limites rapides sur le plan quantitatif : la technique d'ensemencement par grains de terre sur plaques de silico-gel imprégné donne une idée de la richesse en germes d'une terre donnée, mais ne permet pas de faire des dénombrements précis, car la dimension des grains est variable, suivant la texture de la terre, et indépendante de l'expérimentateur; si on améliore l'ensemencement en pesant la terre sur un creuset de GOOCH et en secouant légèrement pour répartir des quantités connues, en grains fins, on ne peut pas cependant l'appliquer dans tous les cas : c'est généralement impraticable quand on étudie la *rhizosphère proche*, puisque ce prélèvement ne peut être obtenu que sous forme de dilution de terre. Quant aux techniques de cultures spontanées en terre naturelle qui mettent en évidence la microflore zymogène, elles ne donnent aucune idée de son importance numérique avant l'adjonction de la substance dont on étudie la dégradation.

C'est au milieu de ces exigences diverses que l'école française avec POCHON (1954) a eu le grand mérite de mettre au point un ensemble de techniques, certainement perfectibles, mais qui permettent d'étudier de façon plus précise divers groupes physiologiques de micro-organismes du sol : elles consistent à ensemercer des milieux liquides avec des dilutions de terre et à suivre par des tests chimiques simples l'évolution de l'action d'un groupe physiologique (ammonification, dénitrification, etc.) en fonction des dilutions de terre et du temps. Ce sont des méthodes artificielles, les résultats fournis n'ont pas une valeur absolue, mais elles sont fidèles, d'interprétation aisée et d'une bonne valeur comparative.

Elles permettent d'avoir une idée de la potentialité d'une terre étudiée : ainsi, par rapport au sol témoin, il est possible d'évaluer l'effet rhizosphère sur tel ou tel groupe physiologique. Leur emploi dans cette étude a permis d'expliquer certaines contradictions et surtout de faire des comparaisons valables avec un témoin convenablement choisi en tenant compte de leur valeur statistique.

#### VIII. Conditions du milieu extérieur au cours de l'expérimentation

L'expérimentation en pots s'est poursuivie de 1956 à 1958, les variations des conditions atmosphériques ayant été relevées à l'Observatoire de Montsouris qui est distant d'environ 3 kilomètres. Elles sont résumées dans les tableaux IV, V et VI. Dans l'ensemble, les températures et les durées d'insolation furent sensiblement inférieures à la moyenne, expliquant une longueur un peu élevée de la durée de la végétation.

TABLEAU IV

VARIATIONS DES CONDITIONS ATMOSPHÉRIQUES AU COURS DE L'EXPÉRIMENTATION RÉALISÉE EN 1956

OBSERVATIONS Mois	TEMPÉRATURE MOYENNE DE L'AIR °C (sous abri)						HUMI- DITÉ MOYENNE % TRI- HORAIRE	PLUIE				DURÉE D'INSOLATION h. d.	
	Mini- mum	Écarts avec la moy.	Maxi- mum	Écarts avec la moy.	Moy.	Écarts avec la moy.		Hauteur (mm)		Durée h. d.			
								Moy.	Écarts	Moy.	Écarts	Moy.	Écarts
Avril . . . . .	4,5	-1,0	13,6	-1,7	9,0	-1,4	66	51,2	+ 5,5	35,8	- 9,7	191,6	+ 5,3
Mai . . . . .	10,2	+1,4	20,7	+1,3	15,5	+1,4	61	36,3	-17,9	20,9	-18,7	273,2	+31,5
Juin . . . . .	10,8	-1,0	18,6	-4,1	14,7	-2,5	74	50,8	- 3,0	53,1	+24,1	143,3	-112,1
Juillet . . . . .	14,1	+0,3	22,9	-1,6	18,5	-0,7	75	47,9	- 8,0	28,5	- 1,3	197,6	-55,9
Août . . . . .	11,8	-1,7	21,0	-3,1	16,4	-2,4	75	88,6	+33,9	47,6	-19,1	187,8	-50,1

TABLEAU V

VARIATIONS DES CONDITIONS ATMOSPHÉRIQUES AU COURS DE L'EXPÉRIMENTATION RÉALISÉE EN 1957

OBSERVATIONS Mois	TEMPÉRATURE MOYENNE DE L'AIR °C (sous abri)						HUMI- DITÉ MOYENNE % TRI- HORAIRE	PLUIE				DURÉE D'INSOLATION h. d.	
	Mini- mum	Écarts avec la moy.	Maxi- mum	Écarts avec la moy.	Moy.	Écarts avec la moy.		Hauteur (mm)		Durée h. d.		Moy.	Écarts
								Moy.	Écarts	Moy.	Écarts		
Avril . . . . .	6,2	+0,7	15,3	-0,0	10,7	+0,3	6	10,9	-25,8	12,5	-33,0	207,1	+10,3
Mai . . . . .	1,4	-1,5	16,9	-2,5	12,1	-2,0	66	24,0	-30,2	16,0	-23,6	234,0	-7,7
Juin . . . . .	13,4	+1,6	23,9	+1,2	18,6	+1,4	67	75	+21,2	22,1	-6,9	256,5	+0,9
Juillet . . . . .	15,5	+1,7	23,9	-0,6	19,7	+0,5	71	66,7	+10,8	39,5	+9,7	176,8	-76,7
Août . . . . .	13,5	-0,0	22,3	-1,8	17,9	-0,9	72	52,3	-2,4	29,1	+0,6	215,7	-22,2

TABLEAU VI

VARIATIONS DES CONDITIONS ATMOSPHÉRIQUES AU COURS DE L'EXPÉRIMENTATION FAITE EN 1958

OBSERVATIONS Mois	TEMPÉRATURE MOYENNE DE L'AIR °C (sous abri)						HUMI- DITÉ MOYENNE % TRI- HORAIRE	PLUIE				DURÉE D'INSOLATION h. d.	
	Mini- mum	Écart avec la moy.	Maxi- mum	Écart avec la moy.	Moy.	Écart avec la moy.		Hauteur (mm)		Durée h. d.		Moy.	Écart
								Moy.	Écart	Moy.	Écart		
Avril . . . . .	4,4	-1,1	13,2	-2,1	8,8	-1,6	67	63,6	+17,9	52,9	+ 7,4	177,7	-19,1
Mai . . . . .	10,3	+1,4	19,7	+0,3	15	+0,9	75	72,1	+17,9	43,2	+ 3,6	184,1	-57,6
Juin . . . . .	11,7	-0,1	21,2	-1,3	16,5	-0,8	74	113,0	+59,2	51,4	+25,4	177,7	-77,9
Juillet . . . . .	11,4	+0,6	23,5	-1,0	19,0	-0,2	73	85,5	+29,6	27,4	-2,4	226,6	-26,9
Août . . . . .	14,8	+1,3	23,2	-0,9	19,0	+0,2	79	64,6	+ 9,9	35,0	+ 6,5	144,7	-93,2

IX. Évolution chimique des échantillons

Après avoir suivi les techniques décrites par DEMOLON (1952), l'analyse chimique de la terre contenue dans les pots aux quatre stades de la croissance étudiés a donné les résultats moyens suivants groupés dans le tableau VII.

TABLEAU VII

ANALYSE CHIMIQUE DE LA TERRE AUX DIVERS STADES  
DE LA CROISSANCE DU BLÉ  
(var. *Fylgia* cultivée dans un limon argileux réparti en pots)

DOSAGE DES ÉLÉMENTS SUIVANTS	TÉMOIN	STADES			
		Germina- tion	Tallage	Épiaison	Maturité
Humidité : ‰ . . . . .	15,50	13,25	14,50	11,25	13,50
Calcaire : ‰ . . . . .	11	14	11	10	10
pH . . . . .	7,5	7,5	7,6	7,6	7,7
Azote : ‰ . . . . .	1,40	1,40	1,37	1,37	1,34
Carbone : ‰ . . . . .	12,6	12,8	12,8	12,6	13,1
C/N. . . . .	9	9,01	9,3	9,2	9,7
Acide phosphorique : ‰	0,13	0,13	0,14	0,12	0,11
K <sub>2</sub> O : ‰ . . . . .	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06
Milliéquivalents par kg de terre . . . . .	1,30	1,27	1,06	1,06	1,27
MgO : ‰ . . . . .	0,14	0,11	0,14	0,17	0,16
Milliéquivalents par kg de terre . . . . .	7	5,4	7	8,5	8
CaO : ‰ . . . . .	4,68	5,65	5,93	5,23	5,82
Milliéquivalents par kg de terre . . . . .	167	202	212	187	208

### *Chapitre III*

## EFFET RHIZOSPHERE SUR LES GROUPES MORPHOLOGIQUES DE MICRO-ORGANISMES DU SOL

### A. — MICROFLORE TOTALE ET ACTINOMYCÈTES

#### I. Analyse critique des travaux antérieurs

##### 1° MICROFLORE TOTALE (BACTÉRIES)

Dans le Chapitre précédent on a vu que les divers auteurs trouvaient des rapports R/S variables suivant les plantes et les stades de leur croissance. De plus, pour mesurer le nombre ou l'activité des micro-organismes dans la rhizosphère, ils ont employé différentes méthodes, souvent non comparables, et que l'on peut classer ainsi :

#### a) *Utilisation des méthodes manométriques pour mesurer le nombre ou l'activité des Bactéries dans la rhizosphère*

##### *Dégagement de gaz carbonique.*

Il semble séduisant de pouvoir déterminer, dans des conditions écologiques, le nombre et l'activité des micro-organismes vivant dans la rhizosphère au moyen d'un test physiologique simple, comme JENSEN (1934), GRAY et WALLACE (1957) l'ont fait pour le sol en mesurant le dégagement de gaz carbonique.

En effet, il s'en trouve de plus grandes quantités dans les sols cultivés. Ce gaz carbonique peut provenir de deux sources, soit de la

respiration cellulaire des racines, soit, d'après WAKSMAN et STARKEY (1931), des micro-organismes décomposant les produits d'excrétions des racines ou les exfoliations corticales, environ 45 p. 100 du gaz carbonique pouvant provenir d'une activité microbienne; les proportions relatives de ces deux sources dépendent des facteurs du milieu, de la nature de la plante et du stade de son développement. STARKEY (1929) observe, au début, une légère formation de gaz carbonique, puis une augmentation importante quand les plantes ont leur croissance maximum, suivie d'une diminution après la maturité; en général, le dégagement de gaz carbonique varie parallèlement à l'effet rhizosphère sur le nombre de Bactéries. Ultérieurement, STARKEY (1931) trouve de plus grandes quantités de gaz carbonique provenant du sol adjacent aux racines que du sol éloigné et pense que le rapport entre le dégagement de gaz carbonique et le nombre de micro-organismes est simple.

STILLE (1938), comparant la quantité de gaz carbonique dégagé dans la rhizosphère de la Moutarde cultivée dans du sable stérile ou inoculé avec une suspension de sol, conclut que la production de gaz carbonique est due principalement aux micro-organismes. Une analyse d'un travail de BARKER et BROYER (1942) indique qu'en aérobiose la quantité moyenne de gaz carbonique produit par des racines broyées, en culture aseptique, en présence de manganèse, est de 0,279 mg/min; en culture non aseptique, 0,549 mg/min; soit 50 p. 100 dus aux racines; en anaérobiose, 0,108 dans des conditions aseptiques, 0,289 dans des conditions non stériles, soit 37 p. 100 dus aux racines. Malheureusement, ces expériences ne peuvent permettre de déterminer les proportions relatives du gaz carbonique produit par les racines ou par la microflore de la rhizosphère dans le sol *in situ*.

#### *Absorption d'oxygène.*

Dans le sol, CHASE et GRAY (1953) puis ROVIRA (1953) montrent que l'absorption d'oxygène est un meilleur critère que le dégagement de gaz carbonique. Mais, dans la rhizosphère, les mêmes critiques que précédemment peuvent s'y appliquer et, même dans le sol, ces techniques manométriques sont surtout employées pour suivre le

métabolisme des divers substrats que l'on y incorpore. C'est regrettable, car il faut alors employer des milieux de culture qui présentent d'autres (et nombreux) inconvénients.

b) *Dénombrement par l'emploi de milieux de culture*

Il est nécessaire d'utiliser des milieux solidifiés dont il existe un grand nombre de formules qui sont toutes à base de gélatine ou de gélose. Dans ces milieux, les dénombrements se font par la méthode standard des dilutions et ensemencements sur plaques, et les nombres obtenus sont interprétés comme l'expression de la densité et de l'activité des micro-organismes d'un échantillon donné. Mais il n'est pas possible d'attribuer à ces micro-organismes cultivés dans un milieu artificiel, riche en matière organique et en azote, un état actif au sein du sol, car les colonies peuvent provenir de germes à l'état inactif, ne représentant qu'une activité potentielle. C'est ce qui explique que les dénombrements de la microflore dite « totale » du sol varient dans de larges limites; certains auteurs trouvent seulement quelques millions par gramme; d'autres beaucoup plus. THOM (1938) discute les résultats publiés dans la littérature et se range à une moyenne de 50 millions par gramme. Des populations plus considérables sont presque toujours attribuées à l'action rhizosphère. Étudiant du Blé cultivé en pleine terre, STARKEY (1931) trouve une population rhizosphère de 653 millions par gramme, correspondant à un rapport R/S de 31, KATZNELSON, ROUATT et PAYNE (1956), 1 121 millions et 21. D'autres auteurs notent des dénombrements et des rapports variables.

a) Suivant l'espèce et l'âge de la plante.

b) Suivant la nature du sol, ce qui a été signalé dans les *chapitres I et II*.

c) Suivant le milieu de culture. En effet, les auteurs ont employé, soit des milieux organiques, tel STARKEY (1929) qui dénombre les Bactéries dans trois milieux :

- gélose à l'albumine de WAKSMAN (1932),
- gélose mannitée sans azote,
- gélose glycinée, nitratée, à l'extrait de terre,

soit des milieux plus proches de la terre, mais cependant additionnés de facteurs de croissance, comme le fait TAYLOR (1950). Or, il est indispensable d'avoir un milieu aussi voisin que possible du sol; si, par suite des techniques bactériologiques, il est impossible d'éliminer la gélose qui n'est métabolisée que par un nombre très limité d'espèces rares dans le sol, il faut prohiber toutes les substances nutritives qui ne sont pratiquement jamais rencontrées dans la terre (albumine, extrait de levure, etc.). Les études critiques de WALLACE et LOCHHEAD (1950), STEVENSON et ROUATT (1953), LOCHHEAD et BURTON (1956), démontrent que le milieu le plus convenable pour l'isolement et le dénombrement des Bactéries du sol est la gélose non sélective à l'extrait de terre (mélange de terre de culture et de terre de jardin).

Ces auteurs comparent la gélose à l'extrait de terre de LÖHNIS (1926) et celle de TAYLOR (1950) qui est enrichie avec de l'extrait de levure et des peptones (tryptone Difco) et concluent que :

1° La gélose à l'extrait de terre permet de réduire au maximum l'antagonisme entre les diverses colonies et donne toujours un nombre supérieur de colonies par rapport au même milieu enrichi.

2° Le milieu trop riche donne naissance à un grand nombre de types zymogènes qui s'étendent et envahissent la surface de la gélose (*spreaders*).

3° La mesure de l'indice de dispersion défini par EISENHART et WILSON (1943) montre que seul le milieu gélosé à l'extrait de terre reste dans des limites normales, alors qu'avec le milieu de TAYLOR (1950), il y a un fort pourcentage de variance anormale. LOCHHEAD et THEXTON (1951) observent que, pour un grand nombre de Bactéries du sol, on peut remplacer les facteurs de croissance apportés avec l'extrait de terre par de la vitamine B<sub>12</sub>. Cependant, il existe d'autres facteurs inconnus dans l'extrait de terre; ainsi LOCHHEAD et BURTON (1953) isolent le facteur T F (*Terregens factor*) dont ils étudient les propriétés (1954 à 1956).

Dans ces conditions ne sont dénombrés (sous le nom de microflore totale) que l'ensemble des Bactéries aérobies et des Actinomycètes se multipliant dans la gélose à l'extrait de terre, les résultats n'étant comparables qu'à la condition d'employer toujours la même terre dans la composition du milieu. Dans un tel milieu, l'incubation

doit être assez longue, car les colonies croissent lentement. Il est bien évident que la microflore autochtone spécialisée doit être étudiée avec les milieux électifs bien connus de WINOGRADSKY (1949). Il faut noter aussi que cette méthode n'est valable que si l'on évite dans la terre d'expérience tout apport de germes extérieurs, en particulier le fumier. En effet, celui-ci contient de grandes quantités de micro-organismes, surtout des spores bacillaires, qui germent rarement dans un sol arable normal, mais donnent de nombreuses colonies envahissantes dans les boîtes de Pétri, ce qui justifie l'emploi d'une terre de jachère pour expérimenter l'effet rhizosphère. Étant donné qu'il y a beaucoup plus de Bactéries que d'Actinomycètes, les dénombrements de la microflore dite « totale » correspondent sensiblement à ceux des Bactéries.

## 2° ACTINOMYCÈTES

Les mêmes critiques s'appliquent : beaucoup trop de milieux différents pour un même type de recherche. Ainsi STARKEY (1929) emploie la gélose à l'albumine, THOM et HUMFELD (1932) une gélose à l'extrait de terre enrichie en glycérine et en nitrates, LOCHHEAD (1938) un milieu gélosé à l'extrait de terre additionné d'extrait de levure. La plupart des auteurs conservent le même milieu pour le dénombrement de la microflore totale et des Actinomycètes : il ne semble donc pas nécessaire d'utiliser les milieux à l'asparagine recommandés par WAKSMAN (1932), ni même d'essayer de déterminer les proportions relatives du mycélium et des spores dans l'échantillon au moment du prélèvement, car l'imprécision des résultats est trop grande. On emploie donc la gélose à l'extrait de terre qui donne à la fois le dénombrement de la microflore totale et des Actinomycètes, sans pouvoir préciser s'il s'agit de formes actives ou simplement à l'état potentiel. Mais, si l'on trouve dans la rhizosphère un nombre plus élevé d'Actinomycètes que dans le sol témoin, il est vraisemblable de penser que l'on est en présence de formes actives ou récemment activées.

D'ailleurs, les observations de TIMONIN (1940) montrent que le

nombre des colonies d'Actinomycètes de la rhizosphère provenant de conidies représente un petit pourcentage du nombre total (6 à 8 %).

## II. Recherches personnelles

### 1° TECHNIQUES EMPLOYÉES

Elles sont conformes à celles décrites dans l'ouvrage de POCHON (1954) et dont voici l'essentiel :

#### a) *Milieu utilisé.*

C'est la gélose à l'extrait de terre. Il est indispensable d'employer toujours la même terre, la même gélose soigneusement lavée et la même eau pour faire des comparaisons valables (1).

#### b) *Ensemencement.*

Il est nécessaire d'ensemencer cinq boîtes par dilution à raison de II gouttes par boîte, à l'aide d'une pipette compte-gouttes faisant XX gouttes au millilitre.

Les gouttes sont déposées au centre de la plaque (constituée par de la gélose à l'extrait de terre préalablement coulée dans une boîte de Pétri et bien sèche) et étalées très soigneusement sur toute la surface avec un étaloir stérile. Les boîtes ensemencées sont laissées une heure sur la table, puis retournées et portées à incuber.

(1) On mélange à poids égal une terre de jardin (pH neutre) et de l'eau de source. On laisse macérer 24 heures à la température du laboratoire. On porte à l'autoclave 1 heure à 130° C. On filtre à chaud. On ajoute 15 p. 1 000 de gélose préalablement lavée 48 heures à l'eau courante. On ajuste le pH à 7.2 avec NaOH N. On porte à l'autoclave 20 minutes à 115° C. On filtre à chaud. On répartit en tubes de 22 × 220 millimètres à raison de 25 millilitres par tube. On bouche au coton. On stérilise 15 minutes à 112° C.

c) *Dénombrement.*

Il se fait après quinze jours d'incubation à 28° C. Il faut compter les colonies dans les boîtes qui en contiennent de 30 à 100 afin d'éviter, autant que possible, les phénomènes d'association et d'antagonisme qui jouent si les colonies sont trop rapprochées; quelquefois, on observe de petits amas serrés de colonies minuscules, toutes semblables, provenant vraisemblablement de micro-colonies au sein de la terre partiellement écrasées par l'étaleur; il est préférable de ne pas tenir compte des boîtes où l'on rencontre ce phénomène. Après avoir fait la moyenne des cinq boîtes, il faut ramener à 1 gramme de terre en poids sec le résultat obtenu.

Il est évident que le nombre trouvé n'a qu'une valeur très relative par suite :

- de la difficulté, lors des dilutions, de répartir de façon homogène les Bactéries plus ou moins fixées sur les colloïdes du sol;
- de l'imperfection de l'étalement en surface;
- de l'insuffisance du milieu de culture pour les exigences de certaines Bactéries (anaérobies strictes par exemple).

Mais dans le cadre de cette étude, on élimine le principal facteur d'erreur qui est la variation des conditions d'agrégation du sol, car il s'agit toujours de la même terre. Le dénombrement des Actinomycètes se fait avec le même mode de calcul (1).

## 2° RÉSULTATS

Ils sont donnés dans les tableaux VIII et IX et les figures 1 et 2.

(1) Les colonies d'Actinomycètes ont un aspect typique; il est cependant nécessaire de vérifier l'identification des souches par l'examen microscopique (état frais, coloration de Gram, acido-résistance).

TABLEAU VIII

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHERE VIS-A-VIS DE LA MICROFLORE TOTALE (Bactéries)

STADES ESSAIS	Années	GERMINATION		TALLAGE		ÉPIAISON		MATURITÉ	
		Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S
Témoin . . . . .	1956	10,4		14,3		10		12,6	
	1957	18,1		17,1		13,9		4,7	
Rhizosphère éloignée . . . . .	1956	18,6	1,8	61,5	4,3	8,1	0,8	18,6	1,5
	1957	17,7	1	49,2	2,9	12,9	0,9	4,8	1
Rhizosphère proche	1956	31,7	3,1	396	27,7	168,3	16,8	68	5,4
	1957	32,2	1,8	244	14,3	91,3	6,6	28,5	6

Les résultats des dénombrements sont rapportés à 1 gramme de terre en poids sec et exprimés en millions.  
R/S : rapport des nombres de Bactéries dans la rhizosphère (R) et le sol témoin (S).

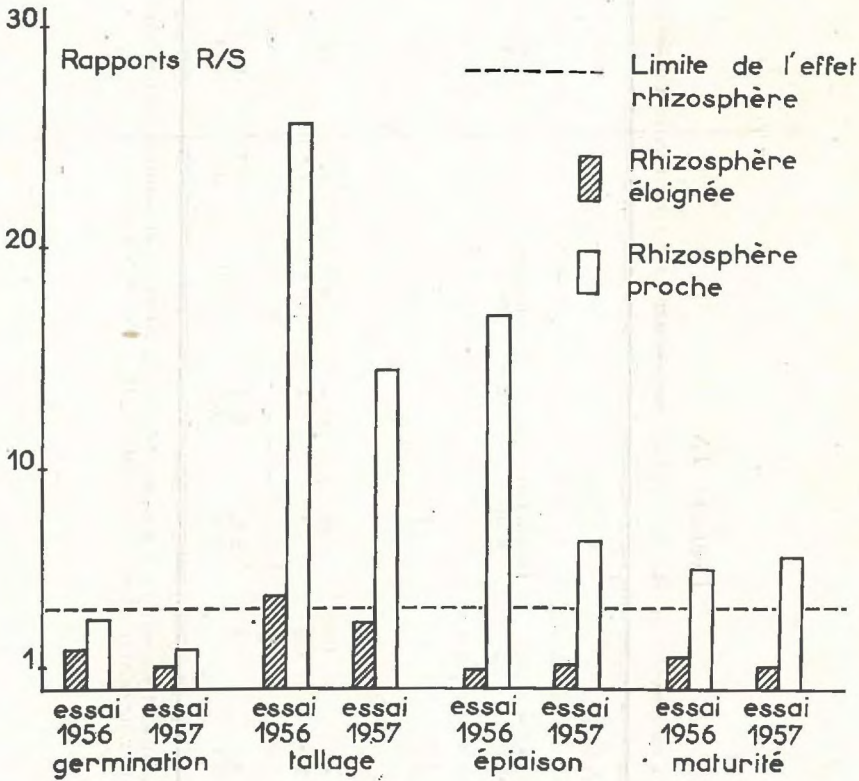


Fig. 1. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis de la microflore totale (Bactéries).

Dans la rhizosphère éloignée, on observe un effet stimulant (exprimé en rapport R/S) seulement au stade du tallage. Par contre, dans la rhizosphère proche, l'effet stimulant est maximum au moment du tallage et se maintient jusqu'à la maturité. Dans l'interprétation des résultats, on ne tient compte que des rapports R/S supérieurs à 3,3 après avoir fait la moyenne des deux essais.

TABLEAU IX

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHERE VIS-A-VIS DES ACTINOMYCÈTES

STADES Essais	Années	GERMINATION		TALLAGE		ÉPIAISON		MATURITÉ	
		Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S
Témoïn . . . . .	1956	4,4		4,5		3,2		7,3	
	1957	7,9		4,5		6,7		2,4	
Rhizosphère éloignée . . . . .	1956	8,4	1,9	52	11,5	2,2	0,7	4,4	0,6
	1957	6,3	0,8	9,6	2,1	12,1	1,8	2,5	1,1
Rhizosphère proche	1956	8,3	1,9	162	35,1	54,2	16,7	11	1,5
	1957	8,1	1	118	26,3	23,4	3,5	4,1	1,7

Les résultats des dénombrements sont rapportés à 1 gramme de terre en poids sec et exprimés en centaines de milliers.  
R/S : rapport des nombres d'Actinomycètes dans la rhizosphère (R) et le sol témoin (S).

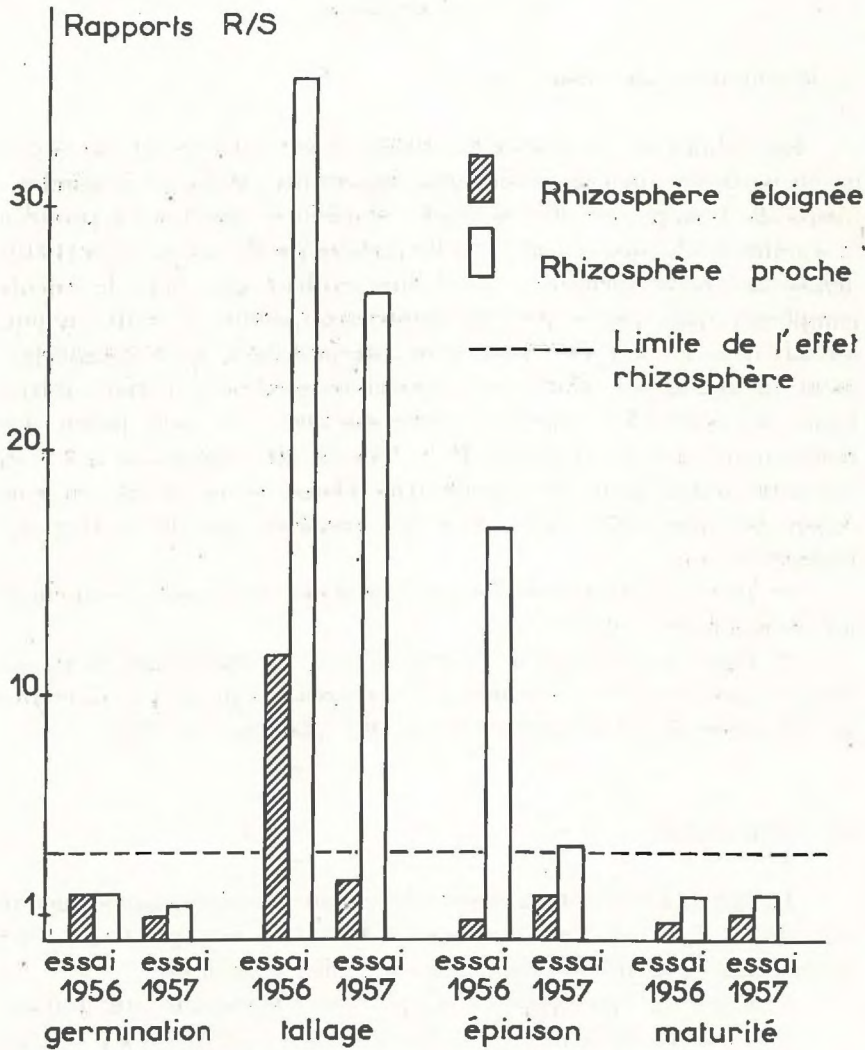


Fig. 2. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGIA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis des Actinomycètes.

Dans la rhizosphère éloignée, on observe un effet stimulant (exprimé en rapport R/S) seulement au stade du tallage. Dans la rhizosphère proche, l'effet stimulant est maximum au moment du tallage et se maintient jusqu'à l'épisaison. Dans l'interprétation des résultats, on ne tient compte que des rapports R/S supérieurs à 3,3 après avoir fait la moyenne des deux essais.

3° — DISCUSSION

a) *Microflore totale (Bactéries).*

En dehors de la maturité (1957), il est intéressant de noter qu'on n'observe pas de variations importantes dans les dénombrements du témoin aux divers stades étudiés, ce qui tend à prouver la stabilité biologique d'une terre de jachère que WINOGRADSKY (1949) dénomme « terre normale ». Il est bien évident sans faire de calculs complexes que, par suite des nombreux facteurs entrant en jeu, les différences observées, pour être interprétables, sont obligatoirement considérables. Dans les conclusions générales, l'étude statistique des méthodes employées sera discutée : on peut noter, dès maintenant, que les rapports R/S doivent être supérieurs à 3,3 ou inférieurs à 0,33 pour être significatifs. Dans ces conditions, on peut remarquer que l'effet rhizosphère se manifeste par une action stimulante et que :

1° Dans la *rhizosphère éloignée*, il y a une action nette seulement au moment du tallage.

2° Dans la *rhizosphère proche*, il y a un maximum élevé au tallage suivi d'une lente diminution progressive jusqu'à la maturité où le rapport R/S indique encore un effet stimulant notable.

b) *Actinomycètes.*

De même, les dénombrements du témoin ne varient pas beaucoup aux divers stades de la croissance du Blé que l'on a retenus. L'effet rhizosphère se manifeste aussi par une action stimulante :

1° Dans la *rhizosphère éloignée* mais seulement au tallage.

2° Dans la *rhizosphère proche*, avec un maximum au tallage, plus faible à l'épiaison et disparaissant à la maturité.

B. — CHAMPIGNONS

I. Analyse critique des travaux antérieurs

La plupart des auteurs sont d'accord pour montrer que l'action rhizosphère vis-à-vis des Champignons est beaucoup moins nette que sur les Bactéries, mais qu'elle varie toujours dans le même sens, sauf KRASSILNIKOV (1945) qui trouve que, dans la rhizosphère de l'Arachide à maturité, le nombre des Champignons continue à augmenter alors que celui des Bactéries diminue. Mais les rapports R/S diffèrent beaucoup suivant les publications (tabl. X).

TABLEAU X

EFFET RHIZOSPHERE DE QUELQUES CÉRÉALES VIS-A-VIS DES CHAMPIGNONS  
(les auteurs ont exprimé les résultats en rapports R/S)

PLANTE ÉTUDIÉE	AUTEURS	RAPPORT R/S
Blé . . . . .	STARKEY (1931)	10 à 13
Blé à différents stades de sa croissance . . . . .	TIMONIN (1940)	0,75 à 3,1
Blé à maturité . . . . .	KATZNELSON (1946)	9,6
Avoine . . . . .	ADATI (1939)	62
Céréales diverses . . . . .	TOLLE ET RIPPEL-BALDÈS (1958)	1,4 à 3

Malheureusement, ces auteurs utilisent des milieux très divers rendant impossible la comparaison des résultats :

— gélose acide de WAKSMAN (1922) employée par STARKEY (1931);

— gélose glucosée acide, à l'extrait de terre, de THOM et HUMFELD (1932);

— gélose acide, à l'extrait de terre, enrichie en glucose, en extrait de levure et en phosphates, préconisée par TIMONIN (1940).

En 1944, SMITH et DAWSON étudient systématiquement les divers milieux cités dans la recherche des Champignons du sol : milieux acidifiés de LIPMAN et BROWN (1910), WAKSMAN (1922),

BRIERLY (1928), SMITH et HUMFELD (1930), LUDWIG et HENRY (1943). Ils trouvent que c'est le milieu gélosé au rose bengale employé ultérieurement par KATZNELSON (1946) qui donne les meilleurs résultats : il élimine tous les Actinomycètes, la plupart des Bactéries et réduit les colonies envahissantes de Champignons au minimum, mais il ne permet pas d'établir l'origine des colonies (spores ou fragment de mycélium).

A ce sujet, TIMONIN (1940) avait montré qu'au voisinage des racines du Lin et du Tabac les colonies de Champignons dénombrées dans les boîtes ne provenaient pas de spores, alors que, dans le sol éloigné, la sporulation des Champignons était beaucoup plus importante. Ceci fut confirmé par AGNIHOKHRUDU (1955).

## II. Recherches personnelles

### 1° — TECHNIQUE EMPLOYÉE

C'est celle de SMITH et DAWSON (1944) modifiée par MARTIN (1950), dont voici l'essentiel :

#### a) *Milieu utilisé.*

Il s'agit du milieu à la streptomycine et au rose bengale (1).

#### b) *Ensemencement.*

Il faut trois boîtes par dilution ensemencées en surface comme dans le cas de la microflore totale (p. 62).

(1) Sa composition est la suivante :

Peptone pancréatique . . . . .	5 g
Glucose . . . . .	10 g
Phosphate monopotassique . . . . .	1 g
Gélose lavée . . . . .	20 g
Eau de source . . . . .	900 ml

Solution aqueuse de rose bengale au 1,3 000 : 100 millilitres.

Après stérilisation (20 min à 110° C), au moment de l'emploi, on ajoute à 25 millilitres de milieu préalablement fondu 1 millilitre d'une solution de sulfate de streptomycine à 75 000  $\gamma$  p. 100, soit 30  $\gamma$  par millilitre de milieu. On coule alors ce milieu dans des boîtes de Pétri préalablement stérilisées.

c) *Dénombrement.*

Il se fait après une incubation de cinq et huit jours à 28° C . Le résultat est ramené à 1 gramme de terre en poids sec après avoir fait la moyenne en prenant les mêmes précautions indiquées plus haut (p. 63). Il est nécessaire d'éliminer les colonies autres que celles des Champignons qui peuvent se développer et que l'on reconnaît aisément après un contrôle microscopique.

2° — RÉSULTATS

Ils sont donnés dans le tableau XI et la figure 3.

3° — DISCUSSION

Les variations du témoin sont assez importantes, en particulier lors de la germination dans l'expérience réalisée en 1957. Elles peuvent s'expliquer en supposant que le broyage dans le mortier a pu fragmenter un mycélium.

Lorsqu'il y a un effet rhizosphère, il est toujours stimulant avec un maximum au moment du tallage. Dans la *rhizosphère éloignée*, l'effet stimulant ne s'observe qu'à ce stade, alors que, dans la *rhizosphère proche*, il y a une action nette au tallage, à l'épiaison et à la maturité. Mais le maximum que l'on constate au moment du tallage est très élevé, peu durable, car l'effet rhizosphère se stabilise à un niveau bien inférieur dès l'épiaison.

C. — CONCLUSIONS DE L'ÉTUDE DE L'EFFET RHIZOSPHERE  
SUR LES GROUPES MORPHOLOGIQUES DE MICRO-ORGANISMES  
DU SOL

L'ensemble des résultats relatifs à l'action quantitative de la rhizosphère sur les groupes morphologiques de micro-organismes du sol montre l'importance du tallage, surtout dans la *rhizosphère proche*. Ces résultats apparaissent nettement distincts de ce que

TABLEAU XI

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHERE VIS-A-VIS DES CHAMPIGNONS

STADES ESSAIS	Années	GERMINATION		TALLAGE		ÉPIAISON		MATURITÉ	
		Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S
Témoin. . . . .	1956	4,7		3,6		6,8		5,7	
	1957	18		4,4		5,6		1,8	
Rhizosphère éloignée . . . . .	1956	4,7	1	41	11,2	9,7	1,4	5,2	0,9
	1957	14,9	0,8	12,6	2,9	4,6	0,8	2,4	1,3
Rhizosphère proche	1956	4,5	1	1 000	274	60,5	8,9	61	10,7
	1957	19,3	1,1	666	150	62,6	11,2	41,8	22,4

Les résultats des dénombrements sont rapportés à 1 gramme de terre en poids sec et exprimés en dizaines de milliers.  
R/S : rapport des nombres de Champignons dans la rhizosphère (R) et le sol témoin (S).

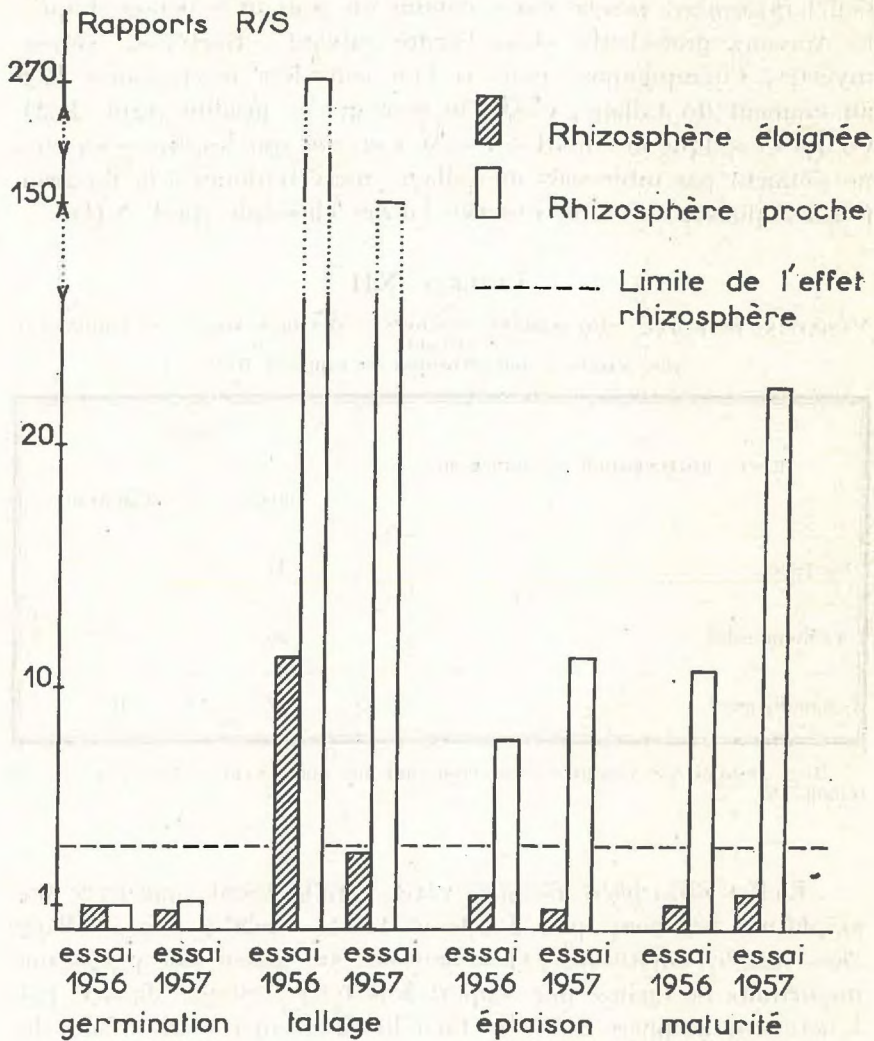


Fig. 3. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGIA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis des Champignons.

Dans la rhizosphère éloignée, on observe un effet stimulant (exprimé en rapport R/S) seulement au stade du tallage. Dans la rhizosphère proche, l'effet stimulant est maximum (très élevé) au moment du tallage et se maintient jusqu'à la maturité. Dans l'interprétation des résultats, on ne tient compte que des rapports R/S supérieurs à 3,3 après avoir fait la moyenne des deux essais.

l'on attendait des conceptions antérieures. En valeur absolue, l'effet *rhizosphère proche* varie, comme on pouvait le penser d'après les travaux précédents, dans l'ordre suivant : Bactéries, Actinomycètes, Champignons, mais si l'on considère les rapports R/S au moment du tallage, c'est l'inverse qui se produit (tabl. XII). Ce qui s'explique aisément si l'on se souvient que les divers auteurs ne s'étaient pas intéressés au tallage, mais toujours à la floraison (ou à l'épiaison) où l'on observe l'ordre classique (tabl. XII).

TABLEAU XII

VARIATIONS DE L'EFFET RHIZOSPHERE PROCHE SUIVANT LE STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ.  
(les résultats sont exprimés en rapports R/S)

EFFET RHIZOSPHERE PROCHE SUR :	STADES	
	Tallage	Épiaison
Bactéries. . . . .	21	11,7
Actinomycètes . . . . .	30,7	10,1
Champignons. . . . .	212	10

R/S : rapport des nombres de micro-organismes dans la rhizosphère (R) et le sol témoin (S).

L'effet *rhizosphère éloignée* varie parallèlement, mais avec une amplitude beaucoup plus faible et n'est décelable qu'au tallage, alors que les conditions expérimentales amenaient une proportion importante de racines par rapport à la terre contenue dans le pot. L'action rhizosphère est donc bien localisée au contact même des racines.

## Chapitre IV

### EFFET RHIZOSPHERE SUR LES GROUPES PHYSIOLOGIQUES DE MICRO-ORGANISMES DU SOL

#### A. — MICROFLORE FIXATRICE D'AZOTE

##### I. Analyse critique des travaux antérieurs

L'étude de la fixation symbiotique par les Bactéries des nodosités des Légumineuses étant laissée de côté, on s'aperçoit que dans les autres cas les résultats contradictoires sont fréquents. Dès la découverte des *Azotobacter* par BEIJERINCK (1901), HILTNER (1904) pense que ces Bactéries sont stimulées par les produits d'excrétion des racines : car, en 1902, BEIJERINCK et VAN DELDEN avaient trouvé des *Azotobacter* près des racines et associés à des *Radiobacter*. GREAVES (1918) montre que les *Azotobacter* sont plus abondants dans les sols cultivés que dans les jachères, KOSTYCHEV (1926), au voisinage des racines du Tabac, STARKEY (1929-1931), en présence de Crucifères. POSCHENRIEDER (1929-1930) observe de nombreux *Azotobacter* associés non seulement aux racines de Crucifères, mais à celles de quantités d'autres plantes. GRAF (1930) met en évidence la fixation d'azote par les *Azotobacter* dans la rhizosphère de diverses plantes, avec un maximum en juin dans la rhizosphère proche, en juillet dans la rhizosphère éloignée et une diminution de l'intensité de la fixation en août; l'action stimulante est maximum dans la rhizosphère des Légumineuses, décelable dans celle du Colza, nulle dans celle des Céréales.

TRUFFAUT et VLADYKOV (1930) isolent *Azotobacter chroococcum* dans la rhizosphère du Blé. Ces travaux sont à la base des arguments pour affirmer la présence de Bactéries fixatrices d'azote dans la rhizosphère, mais ils ne résistent guère à une étude critique en

l'absence de comparaison avec un sol témoin; quant à l'intensité de la fixation de l'azote, elle peut être due, non pas à une augmentation du nombre des fixateurs, mais au fait de souches plus actives. ROKITZKAYA (1932) recherche la présence d'*Azotobacter* dans la rhizosphère de plantes appartenant à trente et une familles et en trouve partout, sauf dans trois (Pinacées, Betulacées et Fagacées). KRASSILNIKOV (1934) conclut que ces germes sont inhibés dans la rhizosphère du Blé. Utilisant des lames de contact, HULPOI (1936) et STARKEY (1939) observent, sur diverses racines, de nombreux micro-organismes ayant une morphologie voisine. LIPMAN et STARKEY (1936) prétendent que les *Azotobacter* ne sont pas plus nombreux dans la rhizosphère. D'autres études ultérieures de CLARK (1940) et de JENSEN (1940) confirment ce point de vue. Mais MANZON (1936) avait trouvé une fixation d'azote plus forte dans la rhizosphère que dans les sols témoin; SHELOUMOVA et MENKINA (1936), une augmentation du nombre des *Azotobacter* aux premiers stades de la croissance du Blé et du Sarrasin. CLARK (1948) démontre qu'introduits dans la rhizosphère de la Tomate, ils disparaissent rapidement, alors que, dans celle du Maïs, STARC (1943), bien que ne détectant pas de cellules d'*Azotobacter* par l'observation directe du chevelu radicellaire, avait trouvé une multiplication décelée après culture dans des milieux liquides. KATZNELSON (1946), après avoirensemencé le milieu de LIPMAN (1935), ne voit pas d'action stimulante dans la rhizosphère des Betteraves. KATZNELSON et WALLACE (1947) trouvent que le Lin, seul, a un léger effet rhizosphère.

DASTE (1950) dénombre les colonies d'*Azotobacter* dans la rhizosphère du Blé, à différents stades végétatifs de la plante, et observe l'existence de phénomènes de stimulations suivis d'inhibitions dus à l'accumulation progressive, dans la rhizosphère du Blé, d'un facteur qui serait stimulant à faible dose et toxique à partir d'une certaine concentration dans le sol. En 1956, il explique les phénomènes d'inhibition exercés par l'*Ephedra* sur le développement des *Azotobacter* par le rôle des alcaloïdes abandonnés dans le sol. Dans la rhizosphère du Pin, il signale l'action importante du pH du sol et l'action favorisante d'une fraction de l'oléorésine par l'intermédiaire d'une association avec un micro-organisme oligonitrophile rétinolytique.

KATZNELSON, ROUATT et PAYNE (1956) n'observent aucun effet net dans la rhizosphère du Blé à maturité.

Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer, dans une certaine mesure, par l'emploi de méthodes différentes pour dénombrer les *Azotobacter*. Les premières découvertes de BEIJERINCK (1902) sont réalisées en ensemençant de la terre dans une solution de 1 à 2 p. 100 de mannite avec un peu de phosphates : il observe après quelques jours d'incubation la formation de voiles bruns caractéristiques ; en 1926, WINOGRADSKY fait de nombreuses objections contre l'emploi de milieux liquides ; d'après lui, lorsque des *Clostridium* fixateurs se développent au fond des tubes, ils peuvent fixer une petite quantité d'azote qui détruit l'électivité du milieu ; de plus, s'il y a beaucoup de gaz carbonique, les *Azotobacter*, avides d'oxygène, ne peuvent proliférer ; la présence de Protozoaires peut aussi empêcher la formation des voiles caractéristiques. Par suite, WINOGRADSKY (1926) considère qu'un test en milieu liquide ne peut être positif que s'il y a un grand nombre de cellules d'*Azotobacter* au départ et préconise l'emploi conjoint de plaques de terre moulées et de silicogel imprégné d'une solution convenable ensemençées avec des grains de terre. Ces méthodes sont excellentes pour détecter les *Azotobacter* dans une terre donnée, mettre en évidence certaines carences, comparer le pouvoir fixateur de différentes terres, mais ne permettent pas de faire des dénombrements ; en particulier, il est impossible, avec des prélèvements de la *rhizosphère proche* sous forme de dilutions, de réaliser des ensemençements par grains. Plus tard, JENSEN (1940) signale que les milieux liquides peuvent mettre en évidence les *Azotobacter* avec une bonne sensibilité ; TCHAN (1952) a l'idée d'employer le milieu de WINOGRADSKY liquide et de faire des comparaisons avec une culture test d'*Azotobacter chroococcum* en y additionnant, ou non, du sol contenant des Protozoaires. Ces essais montrent que les milieux liquides sont beaucoup plus sensibles que les milieux gélinés pour faire des dénombrements. AUGIER (1956), après une étude critique des différentes méthodes employées, améliore la technique de TCHAN en incorporant au milieu de l'extrait de terre et des oligo-éléments.

Il est intéressant d'indiquer en terminant cette bibliographie les controverses élevées au sujet des inoculations massives de graines

par des souches sélectionnées d'*Azotobacter*, car elles sont liées à l'étude de leur multiplication dans la rhizosphère. En U. R. S. S., plusieurs millions d'hectares sont inoculés chaque année, d'après BALLS (1945), ces inoculations ayant pour effet d'amener, selon les microbiologistes russes, un apport de facteurs de croissance, une augmentation de la teneur en azote de la plante et, par conséquent, des augmentations de rendements.

Mais tous les chercheurs étrangers qui reprennent cette question, ALLISON (1947), GAINÉY (1946), CLARK (1948) et TIMONIN (1948), dans des conditions climatiques diverses, en Australie, au Canada et aux États-Unis, n'obtiennent que des résultats négatifs. Des communications personnelles de LEMOIGNE (1955) semblent montrer que cette question est très discutée en U. R. S. S. actuellement et qu'elle est à reprendre complètement sur des bases scientifiques nouvelles.

L'étude des fixateurs anaérobies n'a pratiquement été envisagée par aucun auteur. Il semble probable que leur rôle soit assez faible dans les conditions agronomiques de nos régions tempérées. La meilleure technique pour les mettre en évidence est celle de WINOGRADSKY (1902), reprise par POUCHON (1954), qui consiste à ensemercer un silico-gel imprégné convenablement avec des grains de terre. Il n'est malheureusement pas possible de l'utiliser dans le cas de la *rhizosphère proche*.

## II. Recherches personnelles

### 1° — TECHNIQUES EMPLOYÉES

Elles sont conformes à celles décrites par POUCHON (1954) et AUGIER (1956), dont voici l'essentiel :

#### a) *Milieux utilisés.*

Ils sont de deux types :

*Silico-gel imprégné :*

- soit avec du pyruvate (fixateurs aérobies),
- soit avec du glucose (fixateurs anaérobies),

mais ne permettant que de comparer la *rhizosphère éloignée* au témoin.

*Milieu liquide.*

Il donne la possibilité de faire des dénombrements dans tous les cas (témoin, *rhizosphère proche et éloignée*).

Sa composition est la suivante :

Mannitol . . . . .	10 g	Extrait de terre . . . . .	10 ml
Solution standard de WINOGRADSKY (1926) diluée au 1/20	1 000 ml	CO <sub>2</sub> Ca . . . . .	1 g
Solution d'oligo-éléments d'AUGIER (1956) . . . . .	2 ml		

On le répartit à raison de 10 millilitres par tube à essai de 22 × 220 millimètres. On bouche au coton, on stérilise trente minutes à 110° C.

b) *Ensemencements.*

*Silico-gel :*

On ensemence 25 grains de terre par boîte, quatre boîtes par essai. On incube cinq jours à 28° C.

*Milieu liquide :*

On ensemence cinq tubes par dilution à raison de 0,5 ml par tube. On incube quinze jours à 28° C.

c) *Dénombrements.*

*Silico-gel :*

Il faut déterminer le pourcentage des grains ayant donné naissance à des colonies typiques d'*Azotobacter* (1).

(1) De plus, il est nécessaire de vérifier la présence des *Azotobacter* par un examen microscopique, après coloration à l'érythrosine, dans les conditions décrites par WINOGRADSKY (1926) et reprises par DASTE (1956).

TABLEAU XIII

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHERE VIS-A-VIS DE LA MICROFLORE AÉROBIE FIXATRICE D'AZOTE (*Azotobacter*)

STADES Essais	Années	GERMINATION		TALLAGE		ÉPIAISON		MATURITÉ	
		Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S
Témoïn . . . . .	1956	1,4		0,4		0,7		0,3	
	1957	0,5		0,25		3		1,3	
Rhizosphère éloignée . . . . .	1956	1,4	1	2,6	6,5	0,7	1	0,7	2,5
	1957	0,3	0,6	0,5	2	1,7	0,6	1,3	1
Rhizosphère proche	1956	2,6	1,8	16	40	2,2	3,1	0,7	2,5
	1957	1,8	3,6	5	20	6	2	1	0,8

Les résultats des dénombrements sont rapportés à 1 gramme de terre en poids sec et exprimés en milliers.  
R/S : rapport des nombres d'*Azotobacter* dans la rhizosphère (R) et le sol témoin (S).

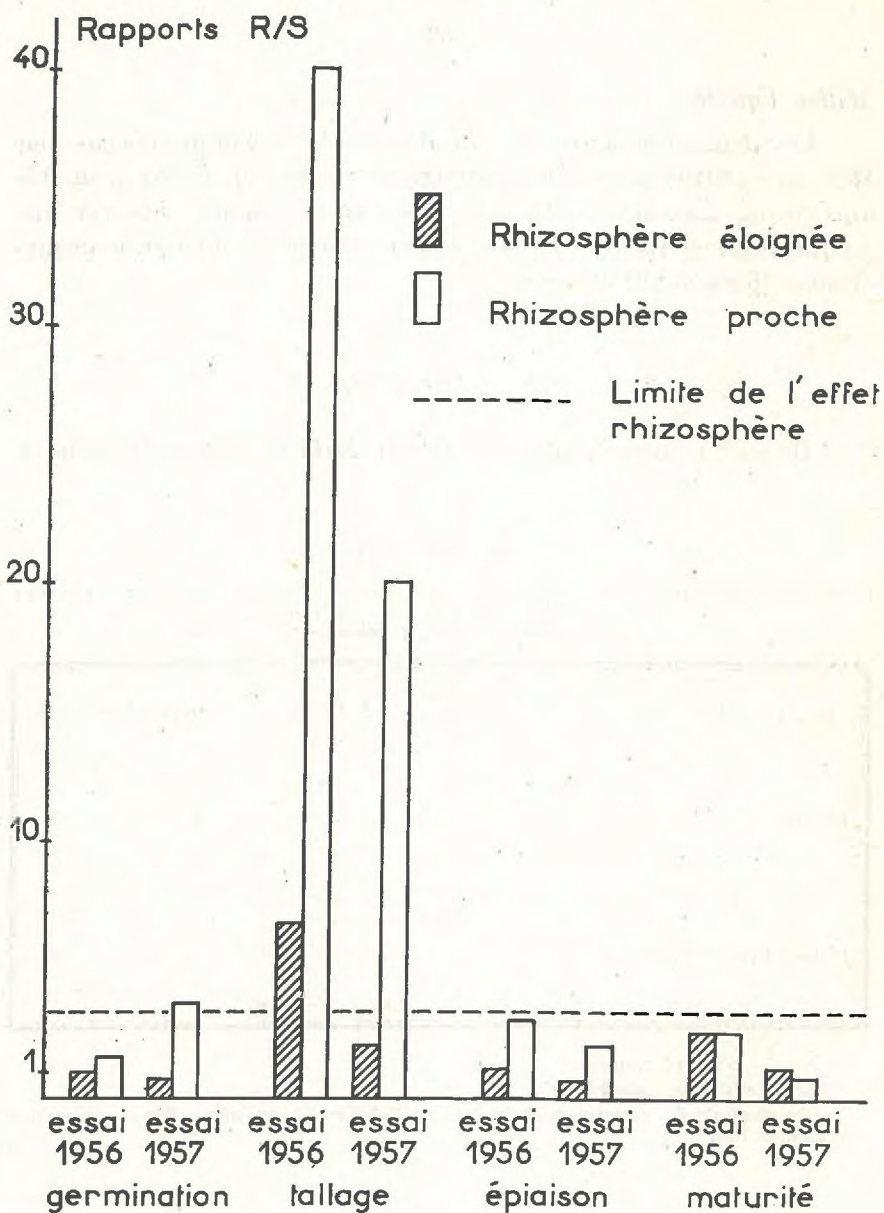


Fig. 4. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGIA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis de la microflore aérobie fixatrice d'azote (AZOTOBACTER).

L'effet rhizosphère est toujours stimulant et ne s'observe qu'au moment du tallage, mais il est beaucoup plus élevé dans la rhizosphère proche. On ne tient compte que des rapports R/S supérieurs à 3,3 après avoir fait la moyenne des deux essais.

*Milieu liquide.*

Les dénombrements se font d'après la technique décrite par McCrady (1918) qui consiste à déterminer le nombre moyen probable après avoirensemencé plusieurs tubes par dilution et observé une modification caractéristique due à la croissance des micro-organismes étudiés (présence d'un voile) (1).

2° — RÉSULTATS

Ils sont résumés dans les tableaux XIII et XIV et la figure 4.

TABLEAU XIV

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHERE ÉLOIGNÉE  
VIS-A-VIS DES FIXATEURS D'AZOTE  
(après culture sur silico-gel)

ESSAIS \ STADES	STADES	GERMI- NATION	TALLAGE	ÉPLAISON	MATURITÉ
Témoin . . . . .	A	96	90	70	68
	AN	68	60	70	98
Rhizosphère éloignée .	A	72	88	65	74
	AN	50	68	50	100

A : Fixateurs aérobies.

AN : Fixateurs anaérobies.

Les résultats des dénombrements sont exprimés en % des grains fertiles (moyenne des quatre boîtes).

(1) Il faut toujours confirmer l'interprétation par un examen microscopique.

3° — DISCUSSION

En regardant les résultats groupés dans le tableau XIV, il est évident que les différences du pourcentage des grains fertiles ne sont pas suffisantes pour affirmer la présence d'un effet rhizosphère quelconque (activateur ou inhibiteur) vis-à-vis des fixateurs aérobies ou anaérobies, d'autant plus que les dimensions des grains ne sont pas constantes.

Par contre, la figure 4 qui traduit le contenu du tableau XIII permet d'observer un effet rhizosphère limité au stade du tallage, faible dans la *rhizosphère éloignée*, mais très important dans la *rhizosphère proche*. Aux autres stades, les variations ne sont pas suffisamment grandes pour conclure à une action activatrice ou inhibitrice comme l'avaient fait d'autres auteurs. Il est permis de penser qu'au moment du tallage l'effet rhizosphère doit vraisemblablement se manifester par une multiplication des *Azotobacter* au sein des micro-colonies, ce qui expliquerait qu'il n'y ait pas d'augmentation nette du pourcentage des grains fertiles sur silico-gel.

B. — MICROFLORE AMMONIFIANTE

I. Analyse critique des travaux antérieurs

De nombreux sporulés, comme *Bacillus mycoïdes*, ou des *Pseudomonas* du type fluorescent ont une action ammonifiante intense, surtout en microflore associées, d'après WAKSMAN et LOMANITZ (1925). Or, si les sporulés sont rares dans la rhizosphère, les formes fluorescentes sont prédominantes et il paraît vraisemblable que l'ammonification soit très activée au voisinage des racines. GRAF (1930) montre que la décomposition des peptones et la production d'ammoniaque est élevée dans les échantillons de sol rhizosphère, avec un maximum en mai-juillet et une chute brusque en août, surtout dans le cas du Colza, alors que les Céréales n'exercent qu'une action légère et les Légumineuses, une faible action. ROKITZKAYA

(1932) signale la présence d'une microflore ammonifiante active dans la rhizosphère de cent soixante dix-huit plantes. THOM (1935) remarque que la plupart des micro-organismes associés aux racines des plantes appartiennent à des espèces actives dans la décomposition des matières organiques. KRASSILNIKOV et ses collaborateurs (1936) observent que les Bactéries prédominantes de la rhizosphère sont non sporulées et ammonifiantes. LOCHHEAD (1940) trouve de nombreux types liquéfiant la gélatine, TIMONIN (1947), de nombreuses formes hydrolysant la caséine.

KATZNELSON (1946), dans la rhizosphère de la Betterave, KATZNELSON, ROUATT et PAYNE (1956), dans celle du Blé, montrent qu'il y a une augmentation sensible du pourcentage des Bactéries ammonifiantes en fonction de l'âge des plantes.

Malheureusement, tous ces auteurs ont employé des méthodes qui ne sont pas écologiques : à l'aide des techniques usuelles, ils isolent de la rhizosphère un grand nombre d'espèces et cataloguent ammonifiantes celles qui se montrent capables de libérer de l'ammoniac à partir de protéines diverses, en supposant que ces Bactéries jouent ce rôle dans le sol ou la rhizosphère. WINOGRADSKY (1925) avait essayé de réaliser des conditions naturelles pour étudier cette fonction : en imprégnant des plaques de silico-gel avec des substances organiques azotées et en les ensemençant avec des grains de terre, il avait montré que l'ammonification dans le sol était un phénomène brutal et le fait d'un petit nombre d'espèces spécialisées. Il semble que cette opinion soit trop stricte. En effet, POCHON et TCHAN (1947), en enrichissant de la terre avec une quantité connue d'azote protéique (poudre de sang), en dosant journellement l'ammoniac dégagé et en suivant l'évolution de la microflore par impression sur lame, ont pu, d'une façon écologique, affirmer que ce ne sont pas toutes les Bactéries du sol capables de proliférer, au laboratoire, aux dépens de protéines diverses en libérant de l'ammoniac, qui exercent une fonction ammonifiante dans le sol ou la rhizosphère, mais que le nombre d'espèces en cause est plus élevé que ne le pensait WINOGRADSKY.

Ces faits ont amené POCHON (1947) à définir l'ammonification dans le sol comme la libération d'ammoniac, à partir des molécules aminées, par la microflore zymogène du sol. Malheureusement

l'interprétation des courbes d'ammonification est toujours difficile par suite de la volatilité de l'ammoniac, de la fixation par la terre elle-même ou de la réutilisation par la microflore. C'est alors que BARJAC et POCHON (1953) mettent au point une technique basée sur la disparition d'un acide aminé, la tyrosine, pour caractériser l'ammonification. En effet, la tyrosine est un constituant type des protéines, de structure simple, facile à caractériser par une réaction chimique spécifique et sensible. Les comparaisons avec la méthode d'enrichissement de la terre de POCHON et TCHAN (1947) sont très satisfaisantes et la simplicité de la méthode à la tyrosine permet d'évaluer rapidement le pouvoir ammonifiant de la microflore du sol. Elle est donc utilisée pour comparer l'ammonification dans le sol témoin, la *rhizosphère proche* et la *rhizosphère éloignée*.

## II. Recherches personnelles

### 1° — TECHNIQUE EMPLOYÉE

Elle est conforme à celle décrite par BARJAC et POCHON (1953) dont voici l'essentiel :

*Principe.* — Ensemencement d'un milieu liquide avec des dilutions de terre et recherche de la disparition de la tyrosine.

#### a) Milieu utilisé.

Il s'agit d'une solution saline de tyrosine préparée de la façon suivante :

Une solution de tyrosine à 0,5 % dans la solution saline standard de WINOGRADSKY (1926) diluée au 1/20 est laissée 24 heures en agitant fréquemment. On filtre sur Seitz EK. On la répartit dans des tubes à essai de 17 millimètres, stériles, bouchés au coton, à raison de 5 millilitres par tube.

b) *Ensemencement.*

On ensemence huit tubes par dilution à raison de 0,5 ml par tube. Après une incubation à 28° C, la lecture se fait après un, deux, trois, quatre, cinq, sept, neuf et onze jours (1).

On trace la courbe de la disparition de la tyrosine : en *abscisses*, les temps (en j) ; en *ordonnées*, la dilution la plus forte où la tyrosine a disparu. D'après POCHON (1954), la pente de la courbe est fonction de la rapidité du phénomène, l'intensité étant fonction de la dilution terminale : plus la dilution limite est élevée, plus l'ammonification est importante et, bien entendu, fonction du nombre d'ammonifiants dans l'échantillon étudié.

Pour comparer l'ammonification dans les divers essais, il suffit de noter, par rapport au témoin, la différence, changée de signe, des exposants des puissances de dix des dilutions les plus fortes où la tyrosine a disparu au bout du onzième jour. Par exemple, au tallage, dans la figure 5, les dilutions limites sont  $10^{-8}$  dans le cas de la *rhizosphère proche* et  $10^{-6}$  dans celui du témoin : l'effet rhizosphère est de deux, soit environ cent fois plus fort.

2° — RÉSULTATS

Ils sont donnés dans le tableau XV et les figures 5 et 6.

(1) Chaque jour, dans un tube de chaque dilution, on recherche la présence ou l'absence de la tyrosine avec la technique suivante : on prélève 2 millilitres, on les met dans un tube de Kahn et on ajoute IV gouttes (à la pipette compte-gouttes) du réactif de Millon et X gouttes d'acide acétique. On met au bain-marie à 40° C pendant trente minutes. Une coloration rose indique la présence de tyrosine.

Le réactif de Millon se prépare de la façon suivante : on fait dissoudre une partie de mercure dans deux parties d'acide nitrique à 36° B (en poids) en chauffant légèrement à la fin. Le liquide vert obtenu est étendu de deux volumes d'eau distillée.

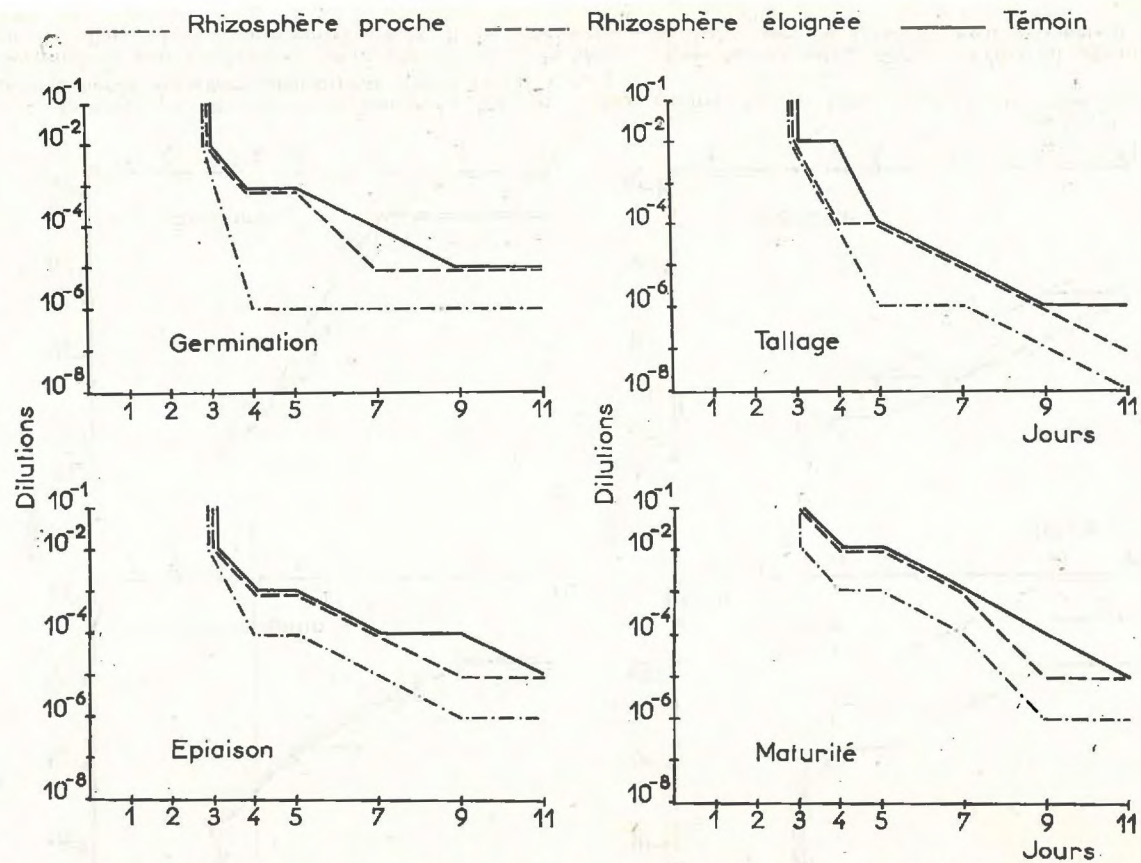


Fig. 5. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGIA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis de la microflore ammonifiante (essai 1956).

Les courbes d'ammonification représentent la disparition de la tyrosine en fonction des dilutions et du temps. L'effet rhizosphère, par rapport au témoin, est exprimé par la différence des dilutions limites le 11<sup>e</sup> jour. Dans la rhizosphère éloignée, l'effet est stimulant au moment du tallage, alors que, dans la rhizosphère proche, il apparaît à tous les stades, avec un maximum au tallage.

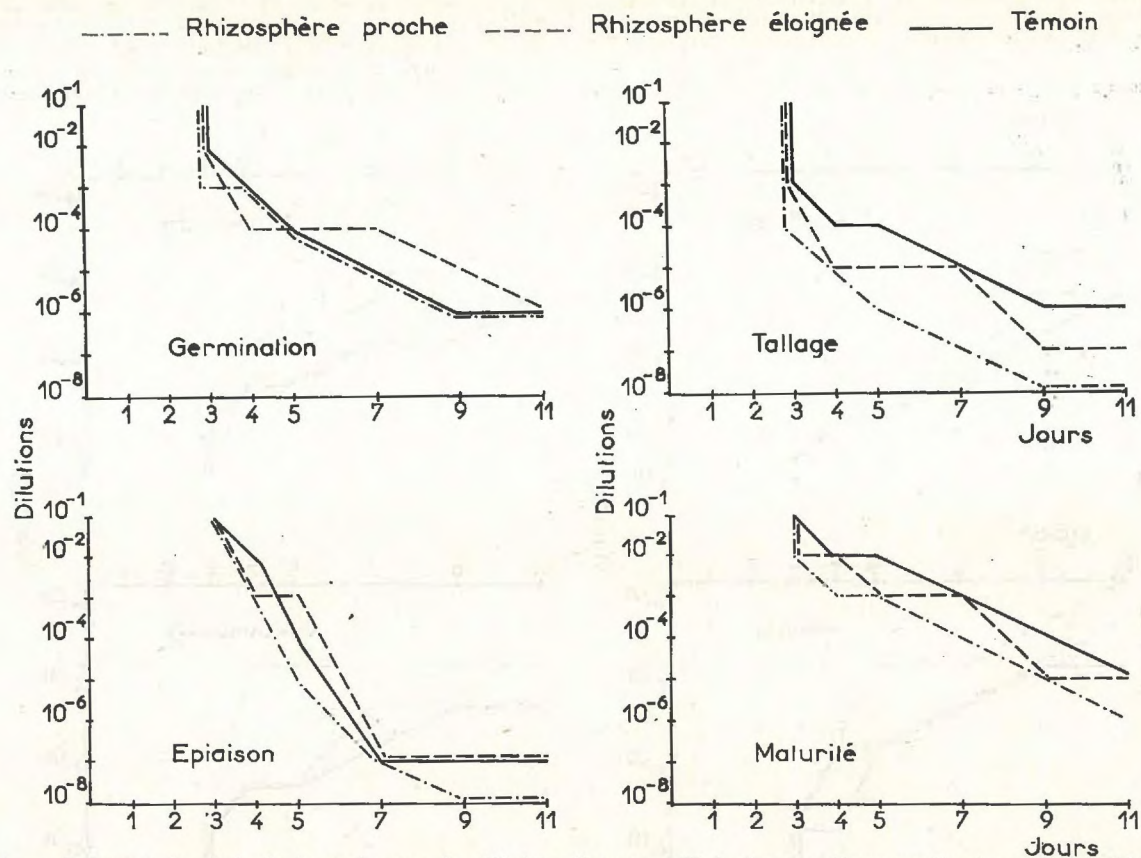


Fig. 6. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGIA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis de la microflore ammonifiante (essai 1957).

Les résultats sont interprétés comme dans le cas de la figure 5. Dans la rhizosphère éloignée, l'effet est stimulant au moment du tallage; dans la rhizosphère proche, il est maximum à ce stade, mais on l'observe aussi à l'épiaison et à la maturité.

TABLEAU XV

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHERE VIS-A-VIS DE LA MICROFLORE AMMONIFIANTE (ammonification)

STADES  ESSAIS	Années	GERMINATION	TALLAGE	ÉPIAISON	MATURITÉ
		Différence des exposants	Différence des exposants	Différence des exposants	Différence des exposants
Rhizosphère éloignée.	1956	0	1	0	0
	1957	0	1	0	0
Rhizosphère proche.	1956	1	2	1	1
	1957	0	2	1	1

Les valeurs indiquées correspondent à la différence, changée de signe, des exposants des puissances de 10 des dilutions les plus fortes où la tyrosine a disparu le onzième jour dans l'essai et le témoin.

### 3° — DISCUSSION

On ne tient compte que des résultats concordants observés en même temps dans les deux essais. Dans ces conditions, l'intensité du phénomène qui caractérise l'effet rhizosphère n'est stimulée qu'au tallage dans la *rhizosphère éloignée*. Sauf à la germination, il y a un *effet rhizosphère proche* à tous les stades, avec un maximum au moment du tallage.

#### C. — MICROFLORE NITREUSE ET NITRIQUE

##### I. Analyse critique des travaux antérieurs

L'action des plantes sur la nitrification est bien étudiée, mais il y a peu de travaux sur le nombre des Bactéries de la nitrification dans la rhizosphère. De nombreux auteurs comme LYON et BIZZELL

(1911), BROWN (1912), et WILSON (1925), signalent une accumulation de nitrates après une culture de Légumineuses. Par contre, RUSSEL (1914), dans le cas du Blé et de l'Orge, LYON, BIZZELL et WILSON (1923), dans celui du Maïs et de l'Avoine, trouvent que la nitrification est plus faible dans les sols cultivés que dans les jachères, en tenant compte de l'azote exporté par les récoltes, mais ces auteurs ne peuvent préciser s'il s'agit d'une perte d'azote ou d'une dénitrification. PINCK, ALLISON et GADDY (1945) suggèrent qu'il pourrait s'agir d'une perte d'azote à la suite de processus se produisant au contact des racines, alors que d'autres auteurs contestent cette perte. LÖHNIS (1926) prétend, au contraire, que la croissance des plantes favorise la minéralisation de l'azote. STARKEY (1929) trouve que les nitrates sont plus abondants dans les sols où des plantes bisannuelles ont été cultivées, les plantes annuelles provoquant une accumulation plus élevée que les jachères; mais il n'observe pas de différences entre les Légumineuses et les autres plantes. GRAF (1930) montre que la nitrification est plus faible à la surface des racines, légèrement plus élevée dans la *rhizosphère éloignée* que dans le sol témoin, variable suivant les plantes : aucune action chez le Colza, moindre chez les Légumineuses que chez les Céréales, le taux de la nitrification augmentant en mai-juin, diminuant brusquement en juillet et s'élevant à nouveau en août. STARKEY (1931) trouve que les nitrates sont à un taux plus élevé dans les échantillons de sols prélevés près des racines que dans ceux prélevés plus loin, et il en conclut que les sols cultivés ont un pouvoir nitrificateur supérieur à celui des sols tenus en jachère; les résultats sont d'autant plus élevés que les plantes sont plus âgées, les terres à Légumineuses nitrifient plus que les terres à Betteraves. Il estime que les échantillons pris au voisinage des racines sont plus riches en azote organique que les autres, surtout dans le cas des Légumineuses; cela suffit à expliquer la formation plus abondante de nitrates. TRUFFAUT et VLADYKOV (1930) isolent des *Nitrosomonas* dans la rhizosphère du Blé. ROKITZKAYA (1932) observe une nitrification abondante au voisinage des racines de toutes les plantes qu'elle étudie. KATZNELSON (1946) trouve une très légère action dans la rhizosphère de la Betterave, surtout au début de sa croissance, nulle dans celle du Blé à maturité (1950). GÖRING et CLARK (1949) étudient la minéralisation de

l'azote en corrélation avec la présence de culture : après la récolte, la nitrification dans les champs cultivés est environ moitié moindre que dans un champ en friche, mais ensuite, après quatre mois, la nitrification dépasse dans ces champs cultivés celle du champ en friche, étant probablement expliquée par le fait qu'il y aurait eu blocage de l'azote par la microflore de la rhizosphère. Parallèlement, l'étude des Bactéries de la nitrification montre que leur nombre n'est pas affecté par les diverses cultures. DASTE (1956) observe un effet stimulant dans la rhizosphère de l'*Ephedra distachya*, mais rien de net dans celle du Blé.

Récemment, MITROPHANOWA (1957) décrit un effet rhizosphère sur la nitrification, alors que BALICKA (1958) n'en trouve aucun.

L'ensemble de tous ces travaux n'est guère probant, les résultats variables, les auteurs n'ayant pas toujours séparé le phénomène global, la nitrification, qui est lié d'une part à l'utilisation des nitrates par les racines après leur production par les Bactéries nitrifiantes, d'autre part au blocage de ces nitrates sous forme d'azote organique par la microflore de la rhizosphère, phénomènes qui ne pourraient être séparés que par des techniques spéciales (emploi d'isotopes radio-actifs probablement), et l'action rhizosphère sur le nombre des Bactéries de la nitrification qui doit être étudiée en fonction des divers stades de la croissance de la plante. La détermination de la richesse d'une terre en ferments nitreux et nitriques est délicate. WINOGRADSKY (1931) emploie des plaques de silico-gel additionné d'un milieu salin, de carbonate de calcium et d'un sel d'ammonium pour mettre en évidence les ferments nitreux, ou d'un nitrite pour caractériser les ferments nitriques. Après incubation, il détermine le pourcentage des grains fertiles, s'il ensemence avec des grains de terre, ou le nombre de colonies par gramme de terre, s'il ensemence avec de la terre en poudre. Cette méthode écologique présente des inconvénients. Les colonies de ferments nitreux sont aisément mises en évidence, car elles s'entourent d'une auréole translucide par dissolution de l'émail calcaire, mais ces auréoles sont de taille inégale, souvent même apparaissent des auréoles en dehors des grains, d'interprétation difficile. Quant aux ferments nitriques, il est très difficile de caractériser la présence de leurs colonies autour des grains fertiles : il n'y a pas de plage de dissolution, elles appa-

raissent sous forme de petites taches jaunes autour des grains, souvent confondues avec l'auréole de diffusion des matières humiques. Le contrôle microscopique est délicat : il y a généralement peu de Bactéries, de petite taille. En 1951, KAUFFMANN et BOQUET emploient des milieux liquides qu'ils ensemencent avec des grains de terre et pratiquent un test chimique individuel sur chaque grain : la sensibilité de leur méthode est plus grande, mais elle ne donne, pour chaque grain, qu'une réponse « tout ou rien » et elle dépend, dans une certaine mesure, de la grosseur du grain de terre; aussi, pour un échantillon d'une richesse donnée en nitrificateurs, plus le grain prélevé sera gros (suivant l'expérimentateur et la texture de la terre), plus la probabilité qu'il contienne une quantité de Bactéries de la nitrification suffisante pour donner un test positif sera grande. La technique de COPPIER et BARJAC (1952) dérive de la précédente, mais permet cependant un dénombrement plus précis : après trituration dans un mortier pour séparer les Bactéries de la nitrification fixées sur les particules de carbonate de chaux, ces auteurs ensemencent des dilutions de l'échantillon dans des milieux liquides et caractérisent le phénomène de la nitration, ou de la nitritation, par un test chimique simple.

## II. Recherches personnelles

### 1° — TECHNIQUE EMPLOYÉE

Elle est conforme à celle décrite par COPPIER et BARJAC (1952) dont voici l'essentiel :

#### a) Milieux utilisés.

Il s'agit de deux milieux liquides minéraux dont la composition est la suivante :

	<i>Ferments nitreux</i>	<i>Ferments nitriques</i>
Solution saline standard de WINOGRADSKY (1926) dilué au 1/20 . . . . .	1 000 ml	1 000 ml
Sulfate d'ammonium . . . . .	0,5 g	—
Nitrite de sodium . . . . .	—	1 g
Carbonate de calcium . . . . .	1 g	1 g

On les répartit dans des tubes à hémolyse à raison de 1 millilitre par tube. On bouche au coton, on stérilise vingt minutes à 110° C.

b) *Ensemencements.*

Dans chacun des deux milieux, on ensemence quatre tubes par dilution, à raison de 0,5 ml par tube. Après quinze jours d'incubation à 28° C, on recherche la présence de nitrites et de nitrates avec le réactif à la diphénylamine sulfurique (1).

c) *Dénombrements.*

Ils se font d'après la technique déjà signalée de McCrady (1918).

Le nombre obtenu est toujours inférieur à la réalité, car on ne connaît pas le nombre minimum de Bactéries nitrifiantes nécessaires et suffisantes qui doivent être ensemencées dans chaque tube pour donner une réaction positive.

2° — RÉSULTATS

Ils doivent être interprétés avec prudence et n'ont qu'une valeur comparative.

Ils sont donnés dans les tableaux XVI et XVII et les figures 7 et 8.

(1) Dans les tubes au sulfate d'ammonium (ferments nitreux), on recherche les tubes dans la série des dilutions contenant des nitrites ou des nitrates en versant, dans chaque tube, X gouttes d'acide sulfurique concentré et X gouttes de réactif. La présence de nitrites ou de nitrates se traduit par une coloration bleue.

Dans les tubes au nitrite de sodium (ferments nitriques), on recherche les tubes contenant des nitrates, après avoir éliminé les nitrites restants en versant, dans chaque tube, quelques milligrammes d'urée et X gouttes d'acide sulfurique concentré pur exempt de nitrates. Les nitrites sont décomposés, on recherche alors les nitrates comme précédemment.

Le réactif à la diphénylamine sulfurique se prépare de la façon suivante :

Diphénylamine . . . . .	1 g
Acide sulfurique . . . . .	100 ml

On verse sur 20 millilitres d'eau distillée et on conserve dans un flacon brun.

TABLEAU XVI

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHERE VIS-A-VIS DE LA MICROFLORE NITREUSE

STADES ESSAIS	Années	GERMINATION		TALLAGE		ÉPIAISON		MATURITÉ	
		Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S
Témoïn . . . . .	1956	4		500		0,5		2,8	
	1957	0,8		1,4		16,5		2,5	
Rhizosphère éloignée . . . . .	1956	1,2	0,3	2 800	5,6	0,8	1,6	1,4	0,5
	1957	1,6	2	14	10	16,5	1	2,5	1
Rhizosphère proche	1956	4	1	28 000	56	2,8	5,6	2,8	1
	1957	1,4	1,7	140	100	40	2,4	3,5	1,4

Les résultats des dénombrements sont rapportés à 1 gramme de terre en poids sec et exprimés en milliers.  
R/S : rapport des nombres de ferments nitreux dans la rhizosphère (R) et le sol témoin (S).

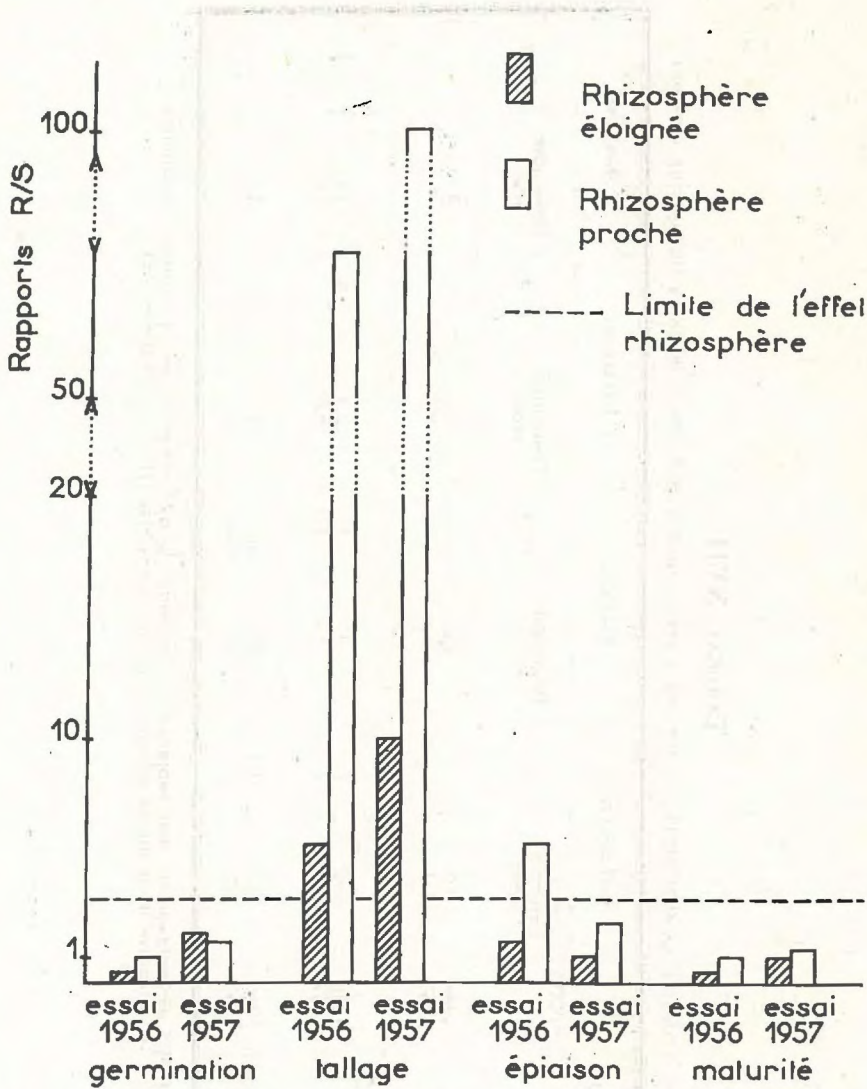


Fig. 7. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGIA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis de la microflore nitréuse.

L'effet rhizosphère (exprimé en rapport R/S) est toujours stimulant et ne s'observe surtout qu'au moment du tallage, mais il est beaucoup plus élevé dans la rhizosphère proche. On ne tient compte que des rapports R/S supérieurs à 3,3 après avoir fait la moyenne des deux essais (dans ces conditions, on estime qu'il y a un effet rhizosphère proche à l'épiaison).

TABLEAU XVII

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHERE VIS-A-VIS DE LA MICROFLORE NITRIQUE

STADES ESSAIS	Années	GERMINATION		TALLAGE		ÉPIAISON		MATURITÉ	
		Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S
Témoin . . . . .	1956	0,7		12		0,5		14	
	1957	1,4		0,8		5,5		2,5	
Rhizosphère éloignée . . . . .	1956	0,7	1	12	1	2,8	5,6	5	0,4
	1957	1,4	1	1,4	1,7	5,5	1	2,5	1
Rhizosphère proche	1956	3,2	4,6	1 900	160	14	28	15	1
	1957	2,8	2	26	32,5	55	10	2,5	1

Les résultats des dénombrements sont rapportés à 1 gramme de terre en poids sec et exprimés en milliers.  
R/S : rapport des nombres de ferments nitriques dans la rhizosphère (R) et le sol témoin (S).

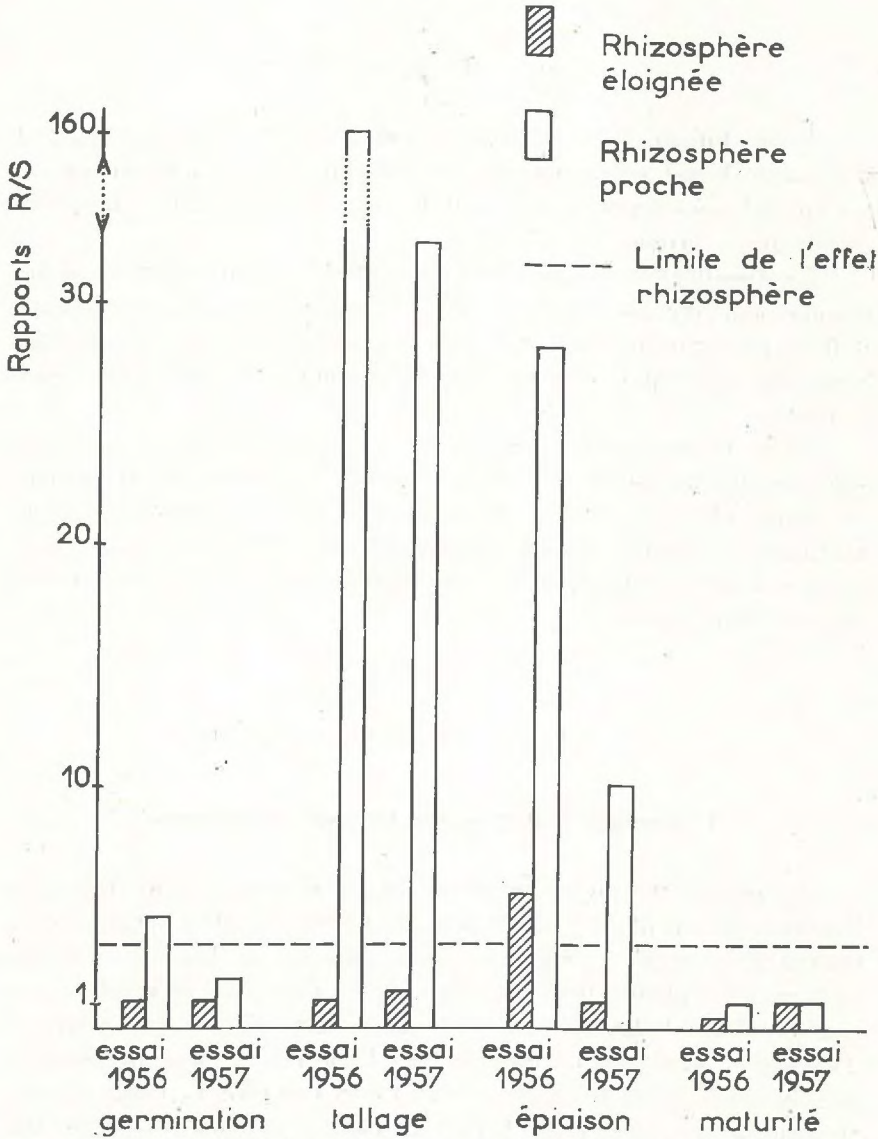


Fig. 8. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGIA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis de la microflore nitrifique.

L'effet rhizosphère proche (exprimé en rapport R/S) est maximum au tallage, encore élevé à l'épisaison, nul aux autres stades. On ne tient compte que des rapports R/S supérieurs à 3,3 après avoir fait la moyenne des deux essais, ce qui explique qu'il n'y a pas d'effet rhizosphère éloignée.

3° — DISCUSSION

Il est difficile de dénombrer les nitrificateurs qui sont souvent sous forme de nids entourant les particules de carbonate de chaux, ou quelquefois sous forme d'amas ou de zoogléas impossible à dissocier, même après broyage.

Les teneurs des témoins sont en général du même ordre que celles données par WINOGRADSKY (1933) : quelques centaines à quelques milliers par gramme de terre, mais il y a cependant de très grandes variations sans qu'il soit possible de donner une explication satisfaisante.

Dans la *rhizosphère proche*, les ferments nitreux et nitriques sont stimulés au tallage et à l'épiaison, avec un maximum au moment du tallage, alors que, dans la *rhizosphère éloignée*, il y a une stimulation au tallage seulement dans le cas des ferments nitreux. Il faut considérer comme douteux les effets rhizosphère qui n'ont pas été trouvés dans les deux essais.

D. — MICROFLORE DÉNITRIFIANTE

I. Analyse critique des travaux antérieurs

Ce groupe de micro-organismes a été plus étudié que celui des Bactéries nitrificatrices; ROKITZKAYA (1932), KRASSILNIKOV (1934), OBRASTZOVA (1934), KRASSILNIKOV, KRISS et LITVINOV (1936) mettent en évidence, parmi les Bactéries isolées de la rhizosphère, un grand nombre de Bactéries dénitrifiantes, dont *Bacillus denitrificans*. THOM et CLARK (1938) trouvent des Bactéries de la dénitrification près des racines du Blé, dans un sol fumé, LOCHHEAD (1940), dans la rhizosphère des variétés de Lin et de Tabac sensibles à la pourriture des racines et en plus grand nombre que dans celle des variétés résistantes. KATZNELSON (1946) étudie le phénomène de la dénitrification dans une culture de Betteraves fourragères et montre qu'il y a une forte augmentation du nombre des Bactéries dénitri-

fiantes dans la rhizosphère, surtout à maturité. Dans la rhizosphère de l'Orge, du Chêne et du Blé, BEREZOVA (1946), TIMONIN (1947), NETTE (1955), KATZNELSON, ROUATT et PAYNE (1956), FEDOROV et PANTOS observent un effet stimulant sur ces Bactéries. Malheureusement, ces auteurs se sont contentés, soit d'employer la technique de WAKSMAN (1932) qui consiste à ensemencer un milieu liquide (asparagine-nitrate) avec 100 milligrammes des divers échantillons et à suivre la disparition des nitrates, soit d'isoler dans des milieux divers les Bactéries se développant à partir de prélèvements de la rhizosphère et de tester leur pouvoir de réduction des nitrates dans un milieu liquide, pour en déduire qu'il y a un plus ou moins grand pourcentage de Bactéries dénitrifiantes. Il faut d'ailleurs s'entendre sur le terme même de dénitrification. WAKSMANN (1932) classe les Bactéries réduisant les nitrates en trois groupes :

1° Micro-organismes réduisant les nitrates en nitrites. Ce groupe est le plus nombreux, comprenant les Bactéries les plus banales dont il est pratiquement impossible de démontrer l'activité réelle dans le sol.

2° Micro-organismes réduisant les nitrates en ammoniac. Ce groupe est aussi très important et comprend pratiquement toute la microflore ammonifiante, car rares sont les espèces ammonifiant les protéines qui ne puissent, en même temps, réduire les nitrates en ammoniac.

3° Micro-organismes réduisant les nitrates en azote gazeux. Ce groupe contient peu de Bactéries, mal individualisées, qui, pour les auteurs russes, sont considérées comme les vraies dénitrifiantes. Cette dénitrification est alors un processus essentiellement anaérobie dont les conditions sont rarement réalisées dans une terre de culture. Au contraire, POCHON (1954) envisage la dénitrification comme la réduction des nitrates : c'est alors un processus normal de la microflore tellurique. Il critique les techniques précédentes comme éloignées des conditions écologiques, n'apprenant rien sur le pouvoir dénitrifiant d'un sol. Il est intéressant d'essayer d'apprécier ce pouvoir dénitrifiant dû à l'action rhizosphère ; s'il est plus élevé que celui du sol témoin, il est vraisemblable de supposer que la dénitrification est augmentée au sein de la rhizosphère. D'un autre côté, comme la réduction des nitrates est une propriété commune à de nombreux

micro-organismes du sol, il ne semble pas que le simple pourcentage des souches isolées ayant cette propriété puisse donner une idée de la dénitrification dans la rhizosphère.

## II. Recherches personnelles

### 1° — TECHNIQUE EMPLOYÉE

Elle est conforme à celle décrite par BARJAC (1952) qui permet d'évaluer le potentiel dénitrifiant d'un sol donné et, par conséquent, de comparer le témoin, la *rhizosphère proche* et la *rhizosphère éloignée*.

Le principe est le suivant :

On enseme un milieu liquide salin avec des dilutions de terre et on recherche la disparition des nitrates.

#### a) Milieu utilisé.

Il s'agit d'un milieu salin, glucosé, nitraté, dont la composition est la suivante :

Nitrate de potassium . . . . .	2 g	Carbonate de calcium . . . . .	5 g
Glucose . . . . .	10 g	Solution saline standard de WINOGRADSKY (1926) diluée au 1/20. . . . .	1 000 ml

On le répartit dans des tubes à hémolyse à raison de 1 millilitre par tube. On bouche au coton, on stérilise vingt minutes à 110° C.

#### b) Ensemencement.

On enseme huit tubes par dilution à raison de 0,5 ml par tube. Après une incubation à 28° C, la lecture se fait après un, deux, trois, quatre, cinq, sept, dix et treize jours (1).

On trace une courbe de la disparition des nitrates en fonction du temps et des dilutions limites et on compare l'effet rhizosphère au témoin par une méthode analogue à celle employée dans l'étude de la microflore ammonifiante (p. 86).

### 2° — RÉSULTATS

Ils sont donnés dans le tableau XVIII et les figures 9 et 10.

(1) Chaque jour, dans un tube de chaque dilution, on recherche la présence ou l'absence des nitrates avec la technique décrite dans l'étude des ferments nitriques. L'absence de coloration bleue indique la disparition des nitrates.

TABLEAU XVIII

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHERE  
VIS-A-VIS DE LA MICROFLORE DÉNITRIFIANTE  
(dénitrification)

STADES  ESSAIS	Années	GERMINA- TION	TALLAGE	ÉPIAISON	MATURITÉ
		Différence des exposants	Différence des exposants	Différence des exposants	Différence des exposants
Rhizosphère éloignée. . .	1956	0	1	0	0
	1957	0	1	1	0
Rhizosphère proche. . .	1956	1	2	1	0
	1957	1	2	1	0

Les valeurs indiquées correspondent à la différence, changée de signe, des exposants des puissances de 10 des dilutions les plus fortes où les nitrates ont disparu le treizième jour dans l'essai et le témoin.

### 3° — DISCUSSION

Comme on pouvait le prévoir, l'effet rhizosphère sur la microflore ammonifiante et sur la microflore dénitrifiante varie presque parallèlement. On ne tient compte que des résultats observés en même temps dans les deux essais. Dans ces conditions, on voit qu'il y a une action stimulante limitée au tallage dans la *rhizosphère éloignée* (en effet la stimulation, à l'épiaison, ne s'observe que dans une seule expérience, en 1957). Par contre, il y a un *effet rhizosphère proche* stimulant à la germination, au tallage et à l'épiaison, avec un maximum au moment du tallage.

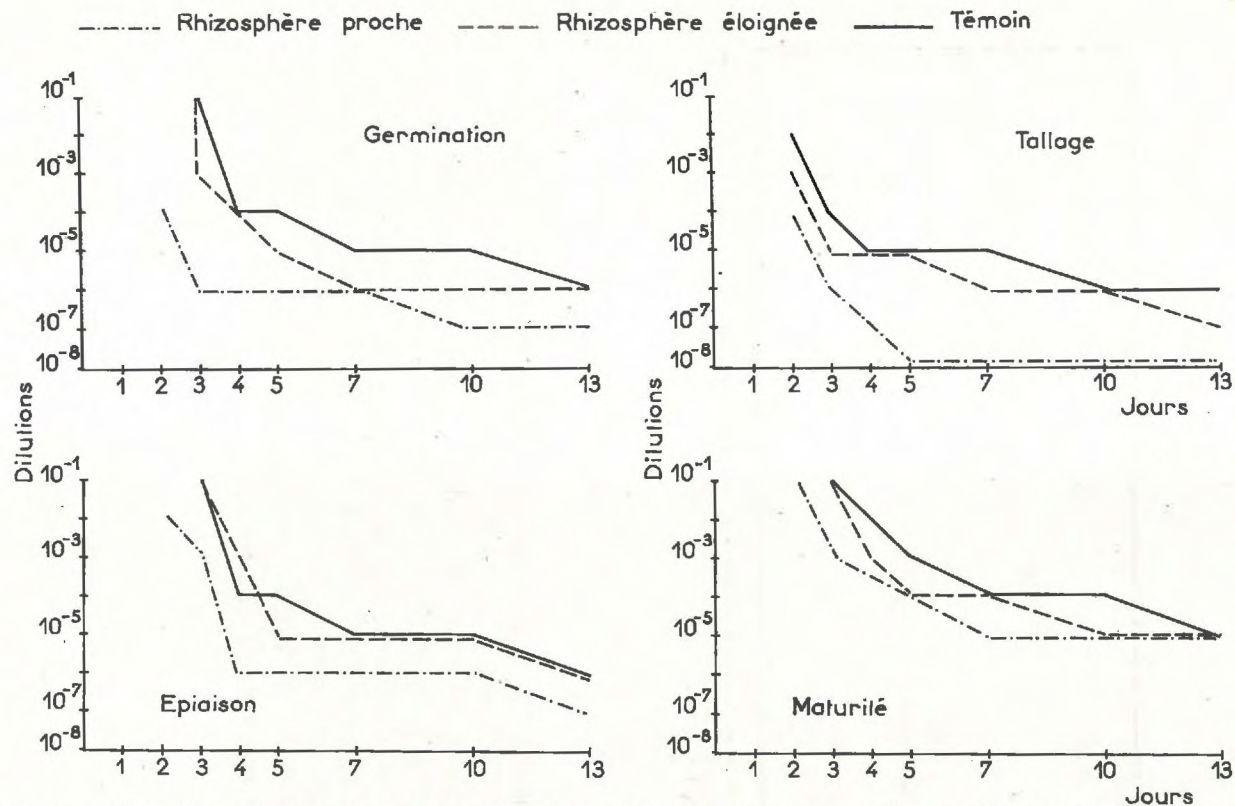


Fig. 9. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGIA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis de la microflore dénitrifiante (essai 1956).

Les courbes de dénitrification représentent la disparition des nitrates en fonction des dilutions et du temps. L'effet rhizosphère, par rapport au témoin, est exprimé par la différence des dilutions limites le 13<sup>e</sup> jour. Dans la rhizosphère éloignée, l'effet est stimulant au moment du tallage; dans la rhizosphère proche, il est maximum à ce stade, mais on l'observe aussi à la germination et à l'épiaison.

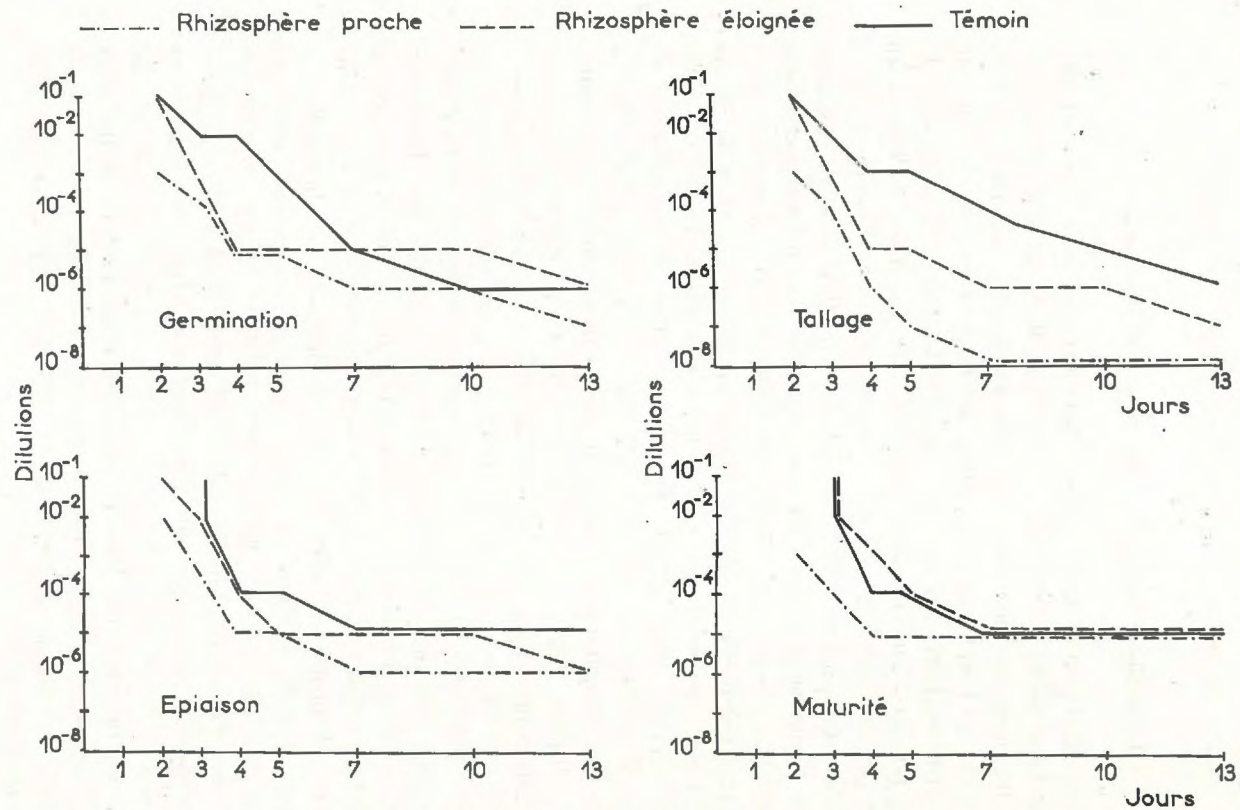


Fig. 10. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGIA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis de la microflore dénitrifiante (essai 1957).

Les résultats sont interprétés comme dans le cas de la figure 9. Dans la rhizosphère éloignée, l'effet est stimulant au tallage et à l'épiaison; dans la rhizosphère proche, il est maximum au tallage, mais on l'observe aussi à la germination et à l'épiaison.

E. — MICROFLORE CELLULOLYTIQUE AÉROBIE

I. Analyse critique des travaux antérieurs

On connaît peu de faits précis. TRUFFAUT et VLADYKOV (1930), ROKITZKAYA (1932), OBRASTZOVA (1935) et KATZNELSON (1940) ont signalé la présence de Bactéries cellulolytiques aérobies dans la rhizosphère de nombreuses plantes. KRASSILNIKOV et ses collaborateurs (1936) observent un accroissement du nombre des cellulolytiques aérobies dans la rhizosphère du Blé, du Maïs, du Tournesol et du Soja avec les variations suivantes en fonction du temps : accroissement au début, suivi d'une chute, puis d'un nouveau sommet à la fin de la végétation. Ils pensent que ces micro-organismes dégradent les cellules radicellaires exfoliées et que d'autres Bactéries utilisent les métabolites formés. KATZNELSON (1940), dans le cas de la Betterave, observe des variations analogues. TIMONIN (1947) met en évidence une action stimulante dans la rhizosphère de l'Avoine. KATZNELSON, ROUATT et PAYNE (1956) trouvent qu'il y a un effet stimulant net dans la rhizosphère du Blé à maturité.

La plupart des auteurs recherchent la présence des cellulolytiques aérobies dans un milieu liquide (milieu d'OMELIANSKY) préconisé par FRED et WAKSMAN (1928). Or, les milieux liquides ne sont pas favorables, d'après WINOGRADSKY (1929), à ces Bactéries qui sont très aérobies et qui risquent d'être envahies par des pullulations variées; d'autre part les cultures liquides ne présentent aucun caractère qui puisse servir à la différenciation des souches. Il est donc nécessaire d'étudier la cellulolyse en employant du silico-gel.

DASTE (1956), à l'aide de cette technique, note les variations de la teneur en Bactéries cellulolytiques aérobies dans la rhizosphère du Blé var. *Fylgia* en fonction des différents stades de la végétation et observe un cycle caractérisé par une phase stimulante au début, suivie d'une inhibition, puis d'une nouvelle stimulation au moment de la mort du Blé. L'existence d'un facteur diffusant à partir des racines et s'accumulant dans la rhizosphère, stimulant à faible dose et toxique à partir d'une certaine concentration, expliquerait ce phénomène.

## II. Recherches personnelles

### 1° — TECHNIQUE EMPLOYÉE

Elle est conforme à celle décrite par WINOGRADSKY (1929), après modification de la technique d'ensemencement, en rendant possible l'étude de la *rhizosphère proche*; des dénombrements approximatifs permettent même d'établir des rapports R/S.

#### a) Milieu utilisé.

On prépare du silico-gel réparti dans des boîtes de Pétri de 10 centimètres de diamètre.

Après imprégnation, on les stérilise en les soumettant cinq minutes à l'action d'une lampe à ultra-violet (1).

#### b) Ensemencement.

Dix gouttes de la dilution au 1/10 des divers échantillons sont réparties à des intervalles réguliers à la surface d'une boîte, trois boîtes par échantillon. Si la boîte est bien sèche, les gouttes sont absorbées au bout de quelques heures; il est alors possible de retourner les boîtes et de les porter à l'étuve. Il faut utiliser un compte-gouttes donnant XL gouttes au millilitre. L'incubation se fait à 28° C pendant huit jours.

#### c) Dénombrement.

Au bout de trois jours, on voit apparaître dans le témoin de nombreuses petites colonies ayant deux aspects différents :

1° Colonies roses, à bords nets, d'aspect visqueux, non extensives, montrant une attaque assez intense du papier. L'examen microscopique, après coloration à l'érythrosine, montre des formes

(1) Il s'agit de plaques de silico gel imprégné d'une solution minérale (solution saline standard de WINOGRADSKY, additionnée de 1% de nitrate d'ammonium). La cellulose est amenée sous forme d'une feuille de papier filtre DURREUX 111 stérilisée à l'autoclave (20 min à 115° C) dans une boîte de Pétri et déposée à la surface du silico-gel imprégné dont le degré de siccité est convenable (pour faire adhérer la feuille au gel, il faut la frotter doucement avec un agitateur flambé).

TABLEAU XIX

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHÈRE VIS-A-VIS DES BACTÉRIES CELLULOLYTIQUES AÉROBIES

STADES ESSAIS	Années	GERMINATION		TALLAGE		ÉPIAISON		MATURITÉ	
		Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S	Dénombrement	R/S
Témoin . . . . .	1956	10		4		4		1,6	
	1957	6		4		4		3	
Rhizosphère éloignée . . . . .	1956	9,6	1	4	1	4,2	1	1,5	0,9
	1957	4	0,7	4	1	4	1	3	1
Rhizosphère proche	1956	6	0,6	0	0	0	0	0,2	0,1
	1957	4	0,7	0	0	0	0	1	0,3

Les résultats des dénombrements sont rapportés à 1 gramme de terre en poids sec et exprimés en milliers.  
R/S : rapport des nombres de Bactéries cellulolytiques aérobies dans la rhizosphère (R) et le sol témoin (S).

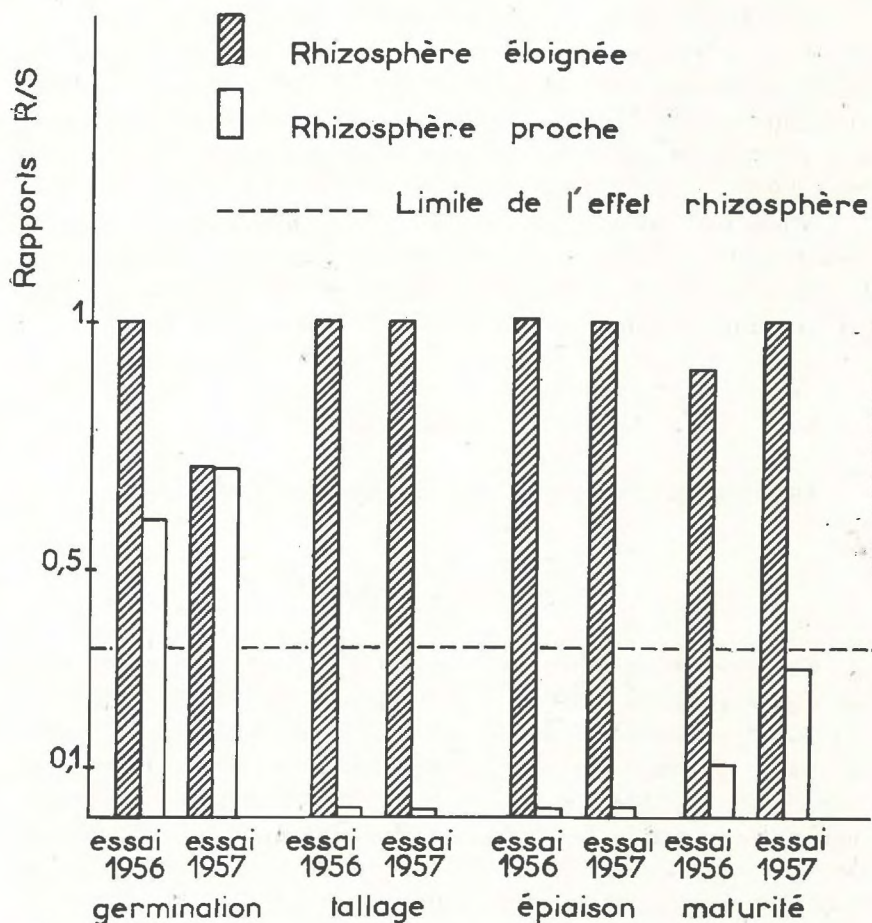


Fig. 11. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGIA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis des Bactéries cellulolytiques aérobies.

Il n'y a rien de net dans la rhizosphère éloignée. L'effet rhizosphère proche (exprimé en rapport R/S) est inhibiteur au tallage, à l'épiaison et à la maturité (à ce stade l'effet n'est que dépressif et beaucoup moins accentué). On ne tient compte que des rapports R/S inférieurs à 0,33 après avoir fait la moyenne des deux essais.

acuminées, droites ou légèrement arquées, d'environ 3 microns de long, caractéristiques de *Cytophaga rubra*.

2° Colonies ocre, d'une coloration pâle, assez extensives, montrant à l'examen microscopique, dans les colonies jeunes, des bâtonnets arqués, petits (1 à 3  $\mu$  sur 0,5 — 1  $\mu$ ), à centre plus épais, à extrémités arrondies, évoluant rapidement vers des formes arrondies, irrégulières, groupées en amas. Cette morphologie et l'aspect des colonies sont caractéristiques de *Cellvibrio ochracea*.

Après huit jours au maximum, on peut déterminer approximativement le nombre total de colonies apparues, ce qui permet d'avoir une idée du nombre de Bactéries cellulolytiques aérobies par gramme d'échantillon et de calculer un rapport R/S.

## 2° — RÉSULTATS

Ils sont donnés dans le tableau XIX et la figure 11.

## 3° — DISCUSSION

On observe un phénomène particulier : il n'y a aucun *effet rhizosphère éloignée*, mais par contre, dans la *rhizosphère proche*, il y a une action inhibitrice totale au tallage et à l'épiaison, coïncidant avec des observations analogues de DASTE (1956). Cependant, à maturité, l'action inhibitrice se maintient, moins importante, mais encore nette. Le phénomène de stimulation signalé par DASTE n'a pas été mis en évidence. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait qu'il est difficile de comparer les deux méthodes de prélèvement de la *rhizosphère proche*, l'une sous forme de dilutions de terre, l'autre, de fragments de racines (comme l'a fait DASTE).

F. — MICROFLORE AMYLOLYTIQUE

I. Analyse critique des travaux antérieurs

L'amylolyse est un phénomène intéressant à suivre dans le sol. En effet, l'amidon est un élément constant des tissus végétaux, en quantités assez importantes. D'après POCHON (1954), il serait métabolisé par une microflore bactérienne polyphage, non spécialisée. Il y a peu de publications ayant trait à l'effet rhizosphère sur l'amylolyse. Les techniques employées se ramènent à deux types :

1° Isoler toutes les souches se développant sur la gélose à l'extrait de terre et déterminer le pourcentage de celles qui hydrolysent l'amidon. C'est ce que font WALLACE et KING (1956) : dans la rhizosphère de l'Avoine, il y a une petite diminution du pourcentage des Bactéries amylolytiques.

2° Ensemencer des dilutions de terre dans un milieu salin à l'amidon et rechercher, en fonction du temps et des dilutions, la disparition de l'amidon. Cette technique est employée par POCHON (1956) pour étudier la rhizosphère du Lin : l'amylolyse est légèrement inhibée.

La mise en évidence de l'amylolyse produite par une souche donnée ou du pouvoir amylolytique d'une terre peut se faire, soit dans un milieu solidifié (gélose à l'amidon), soit dans un milieu liquide.

L'emploi des milieux gélifiés n'est pas à recommander pour déterminer le pouvoir amylolytique d'une souche ou de la terre, car les facteurs contribuant à la formation d'une zone d'hydrolyse sont peu connus, d'après STARK et TETRAULT (1951); de plus, ces auteurs ont montré que la formation des dextrines est le test le plus fidèle pour mettre en évidence la microflore amylolytique. La détermination du pourcentage des souches isolées possédant le pouvoir d'amylolyse est sujette à des critiques identiques à celles faites dans les chapitres précédents. Les différents essais effectués par BARJAC et CHALVIGNAC (1954) permettent de conclure que le pouvoir amylolytique d'une terre est fidèlement représenté par une technique de dilutions en milieu liquide.

## II. Recherches personnelles

### 1° — TECHNIQUE EMPLOYÉE

Elle est conforme à celle décrite par BARJAC et CHAUVIGNAC (1954).

#### a) Milieu utilisé.

Il s'agit d'un milieu salin à l'amidon dont la composition est la suivante :

Amidon soluble . . . . .	2 g
Extrait de terre. . . . .	20 ml
Solution saline standard de WINOGRADSKY (1926) diluée au 1/20 . . . . .	1 000 ml

On le répartit dans des tubes de Kahn à raison de 2 millilitres par tube. On bouche au coton. On stérilise vingt minutes à 112° C.

#### b) Ensemencement.

On ensemence cinq tubes par dilution à raison de 0,5 ml par tube. L'incubation se fait à 28° C et la lecture après un, deux, trois, quatre et cinq jours : on recherche la disparition de l'amidon et l'apparition des dextrines avec le réactif iodo-ioduré (1). On trace une courbe de la disparition de l'amidon en fonction du temps et des dilutions et on compare l'effet rhizosphère au témoin par une méthode analogue aux précédentes (ammonification, dénitrification (p. 86)).

### 2° — RÉSULTATS

Ils sont donnés dans le tableau XX et les figures 12 et 13.

(1) Chaque jour on verse une goutte du réactif iodo-ioduré dans un tube de chaque dilution. Une teinte rouge plus ou moins violacé indique l'apparition des dextrines. Il est nécessaire de faire la comparaison avec un tube témoin non ensemencé. Le réactif se prépare de la façon suivante :

Iode . . . . .	1 g
Iodure de potassium. . . . .	25 g
Eau . . . . .	1 000 ml

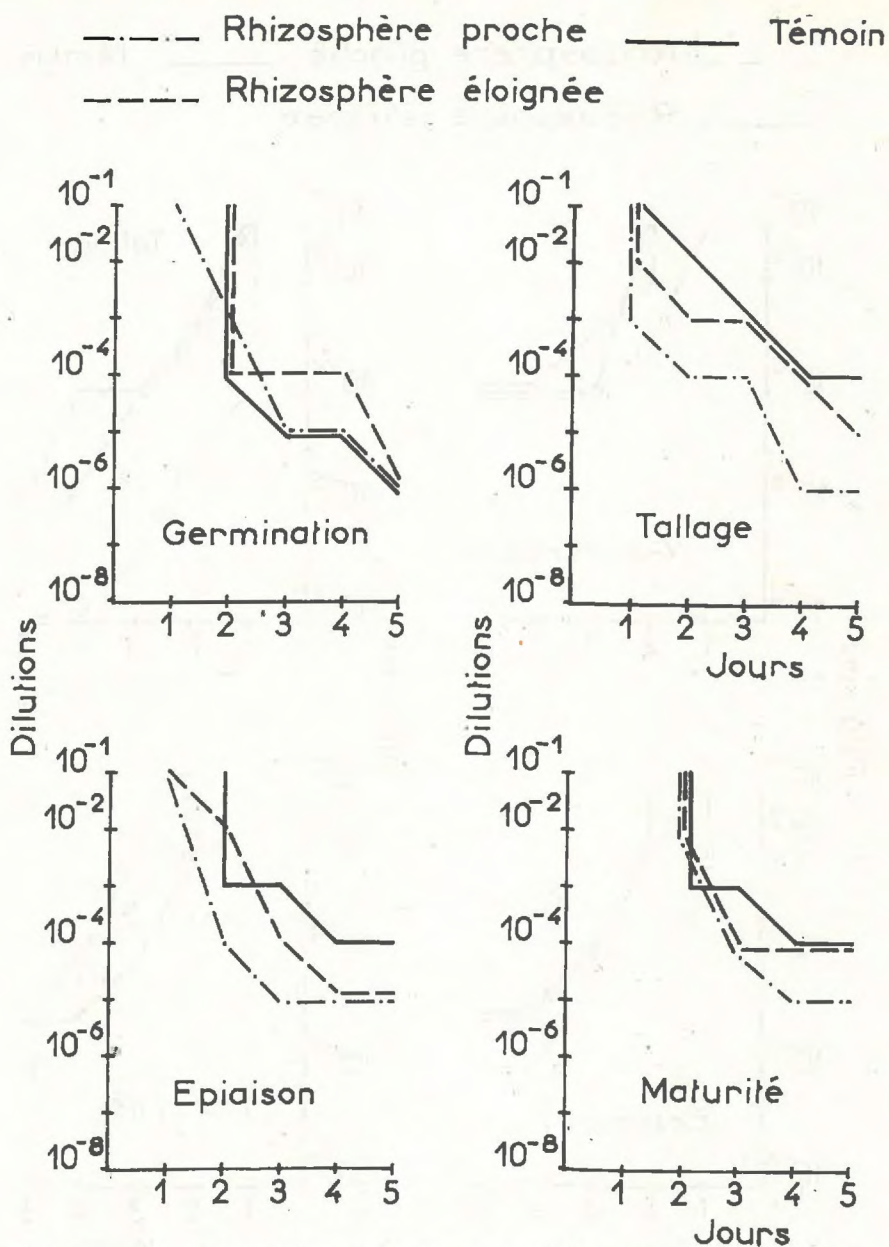


Fig. 12. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGIA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis de la microflore amylolytique (essai 1956).

Les courbes d'amyolyse représentent la disparition de l'amidon en fonction des dilutions et du temps. L'effet rhizosphère, par rapport au témoin, est exprimé par la différence des dilutions limites le 5<sup>e</sup> jour. Dans la rhizosphère éloignée, l'effet est stimulant au tallage et à l'épiaison; dans la rhizosphère proche, il est maximum au tallage, mais on l'observe aussi à l'épiaison et à la maturité.

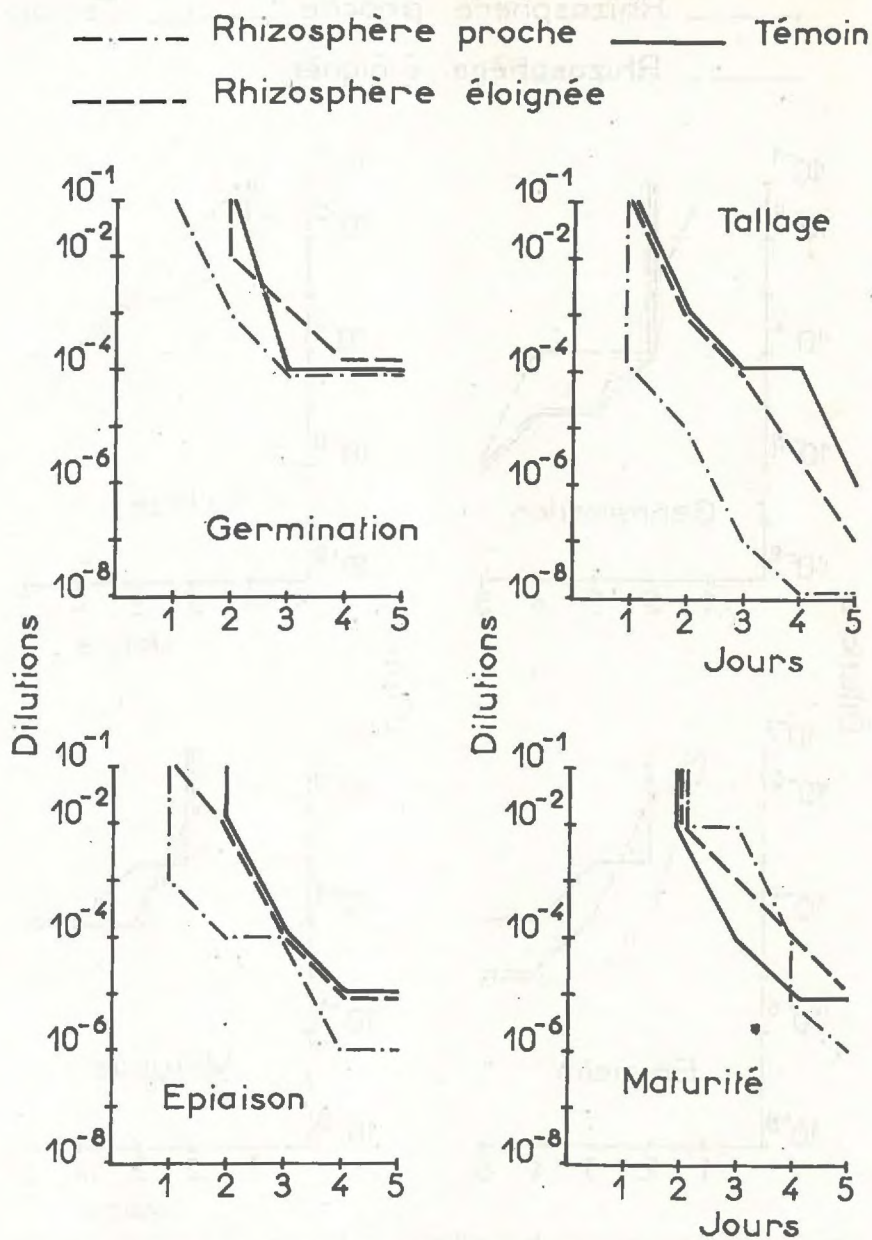


Fig. 13. — Influence du stade de la croissance du Blé (var. FYLGIA cultivée dans un limon argileux) sur l'effet rhizosphère vis-à-vis de la microflore amylolytique (essai 1957).

Les résultats sont interprétés comme dans le cas de la figure 12.

Dans la rhizosphère éloignée, l'effet est stimulant au tallage; dans la rhizosphère proche, il est maximum à ce stade, mais on l'observe aussi à l'épiaison et à la maturité.

TABLEAU XX

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHERE  
VIS-A-VIS DE LA MICROFLORE AMYLOLYTIQUE  
(amylolyse)

STADES  ESSAIS	Années	GERMINA- TION	TALLAGE	ÉPIAISON	MATURITÉ
		Différence des exposants	Différence des exposants	Différence des exposants	Différence des exposants
Rhizosphère éloignée.	1956	0	1	1	0
	1957	0	1	0	0
Rhizosphère proche.	1956	0	2	1	1
	1957	0	2	1	1

Les valeurs indiquées correspondent à la différence, changée de signe, des exposants des puissances de 10 des dilutions les plus fortes où l'amidon a disparu le cinquième jour dans l'essai et le témoin.

### 3° — DISCUSSION

Bien que les deux publications précédemment citées aient mentionné une légère inhibition de l'amylolyse dans la rhizosphère de l'Orge, de l'Avoine et du Lin, il apparaît, dans le cas du Blé, que l'effet rhizosphère, quand il existe, est toujours stimulant.

Dans la *rhizosphère éloignée*, on ne l'observe qu'au tallage alors que, dans la *rhizosphère proche*, il est maximum au tallage et se maintient jusqu'à la maturité.

#### G. — CONCLUSIONS DE L'ÉTUDE DE L'EFFET RHIZOSPHERE SUR LES GROUPES MORPHOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DE MICRO-ORGANISMES DU SOL

Cette étude expérimentale a porté sur l'effet *rhizosphère proche et éloignée* d'une variété bien définie de Blé de printemps, *Fylgia*, semée dans un limon argileux tenu en jachère depuis plusieurs années. Les cultures ont été faites dans des pots et, en dehors d'une

période de courte durée, soumises aux conditions atmosphériques. Ainsi, en tenant compte du fait qu'ils ne sont valables que pour la variété de Blé et le type de sol utilisés, il est possible de résumer les résultats concernant l'effet rhizosphère proche et éloignée du Blé, à divers stades de sa croissance, vis-à-vis des groupes morphologiques et physiologiques de micro-organismes du sol, et de dégager un certain nombre de conclusions.

Il est nécessaire, au préalable, d'apprécier la valeur des diverses techniques employées. Il est évident que, comparé à une culture en pleine terre, le pot réalise un effet rhizosphère élevé par suite d'une quantité importante de racines par rapport à un assez faible volume de terre, ce qui permet de séparer les effets rhizosphère des variations dues à l'hétérogénéité du sol lui-même.

Dans les cultures en pleine terre, l'étude quantitative de la rhizosphère est rendue impossible actuellement pour deux raisons : d'une part les racines vont à une profondeur telle qu'un prélèvement correct présente des difficultés insurmontables dans le cas d'un essai microbiologique, d'autre part, l'étude statistique n'ayant jamais été faite, on ignore les écarts entre les nombres moyens probables qui sont certainement beaucoup plus élevés que certains rapports R/S cités dans la littérature.

Dans l'analyse microbiologique d'un sol, le problème du prélèvement est extrêmement complexe et les variations d'un point à un autre sont beaucoup plus importantes que les variations des nombres moyens probables d'échantillons provenant de terres différentes : une communication de SAPPÀ au VI<sup>e</sup> Congrès de la Science du sol (1956) ayant trait à la mycoflore du sol montre les difficultés auxquelles se heurtent les méthodes statistiques lors de l'échantillonnage. Dans le cas des diverses techniques de dénombrement utilisées dans l'étude de la rhizosphère, on n'a jamais déterminé de nombres moyens probables et on peut penser que c'est la principale critique qui s'applique aux travaux antérieurs sur la rhizosphère, en ce qui concerne la valeur des rapports R/S cités. En plus de la nécessité de faire la culture dans des pots, il est indispensable d'employer une terre tenue en jachère nue depuis plusieurs années, afin d'éviter les débris de végétaux plus ou moins métabolisés, les particules d'engrais ou de fumier, autour desquels se développent des micro-

colonies pratiquement impossibles à dissocier et donnant des variations considérables dans les résultats obtenus : cette terre doit être, après ressuyage, tamisée finement et soigneusement mélangée avant la répartition dans les pots. Lors des analyses, il faut homogénéiser le contenu de chaque essai et faire de nombreux prélèvements au hasard (au moins une vingtaine) à partir desquels une quantité déterminée sera pesée et ensuite diluée. Dans ces conditions, on peut estimer que les micro-organismes sont distribués au hasard dans les divers échantillons et appliquer les tables de COCHRAN citées dans l'excellente mise au point de STEARMAN (1955) sur l'emploi des méthodes statistiques en microbiologie : les limites entre lesquelles varient les nombres moyens probables sont de 0,33 et 3,30, c'est-à-dire qu'un rapport R/S n'est significatif que s'il est supérieur à 3,30 ou inférieur à 0,33. Les effets rhizosphère sont alors appréciés dans l'ordre suivant :

- R/S = 0 : effet inhibiteur total.
- R/S < 0,33 : effet inhibiteur faible.
- 3,3 < R/S < 10 : effet stimulant faible.
- 10 < R/S < 33 : effet stimulant moyen.
- 33 < R/S < 100 : effet stimulant fort.
- R/S > 100 : effet stimulant très important.

Dans le cas des techniques où l'on définit l'intensité des différentes fonctions métaboliques en fonction du temps et des dilutions de terre, on estime qu'une différence d'un exposant de dix des dilutions limites de l'essai, par rapport au témoin, indique un effet faible, de deux un effet moyen, de trois un effet fort. La lecture des tableaux XXI et XXII qui résument les résultats, permet de dégager les conclusions suivantes :

1° L'effet rhizosphère éloignée ne se manifeste qu'au tallage. Il est toujours stimulant, tous les groupes de micro-organismes étudiés subissent son action, sauf les microflore anaérobie fixatrice d'azote, nitrifique et cellulolytique aérobie, mais il est faible et disparaît rapidement; il n'y en a plus trace à l'épiaison.

2° L'effet rhizosphère proche est soit stimulant, en général, soit inhibiteur dans le cas de la microflore cellulolytique aérobie, ce qui n'avait jamais été bien signalé auparavant. D'autre part, son maxi-

mum se situe toujours au moment du tallage (1) qui paraît représenter un stade tout particulièrement intéressant pour l'effet rhizosphère, contrairement aux travaux antérieurs qui avaient situé l'action maximum lors de l'épiaison, ce qui s'explique par le fait que les divers auteurs n'avaient étudié que trois stades : germination, floraison, maturité. Il n'y a presque rien à la germination. Cet effet disparaît rapidement, car à maturité il est limité à quelques groupes seulement.

3° L'effet rhizosphère éloignée varie parallèlement à l'effet rhizosphère proche, mais d'une façon très atténuée, ce qui prouve l'étroitesse de la zone d'action des racines dans le sol, car les conditions expérimentales réalisaient une forte densité de racines par rapport à la terre.

4° Avec des cultures en pleine terre, les connaissances actuelles de l'application des méthodes statistiques en microbiologie du sol ne permettent pas d'évaluer la valeur significative des rapports R/S.

(1) En fait, il s'agit de la fin du tallage (p. 50).

TABLEAU XXI

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHERE VIS-A-VIS DES GROUPES MORPHOLOGIQUES  
DE MICRO-ORGANISMES DU SOL  
(var. *Fylgia* cultivée dans un limon argileux)

STADES  GROUPES MORPHOLOGIQUES		GERMINATION			TALLAGE			ÉPIAISON			MATURITÉ		
		RAPPORT R/S		EFFET RHIZOSPHERE MOYEN	RAPPORT R/S		EFFET RHIZOSPHERE MOYEN	RAPPORT R/S		EFFET RHIZOSPHERE MOYEN	RAPPORT R/S		EFFET RHIZOSPHERE MOYEN
		Essai 1956	Essai 1957		Essai 1956	Essai 1957		Essai 1956	Essai 1957		Essai 1956	Essai 1957	
Microflore totale. (Bactéries) . . .	RE	1,8	1	0	4,3	2,9	+	0,8	0,9	0	1,5	1	0
	RP	3,1	1,8	0	27,7	14,3	++	16,8	6,6	++	5,4	6	+
Actinomycètes. . .	RE	1,9	0,8	0	11,5	2,1	+	0,7	1,8	0	0,6	1,1	0
	RP	1,9	1	0	35,1	26,3	++	16,7	3,5	++	1,5	1,7	0
Champignons . . .	RE	1	0,8	0	11,2	2,9	+	1,4	0,8	0	0,9	1,3	0
	RP	1	1,1	0	274	150	++++	8,9	11,2	++	10,7	22,4	++

RE : rhizosphère éloignée.

RP : rhizosphère proche.

R/S : rapport des nombres de micro-organismes dans la rhizosphère (R) et le sol témoin (S).

0 : effet rhizosphère nul —  $0,33 < R/S < 3,3$ .

+

++ : effet rhizosphère stimulant faible —  $3,3 < R/S < 10$ .

+++ : effet rhizosphère stimulant fort —  $33 < R/S < 100$ .

++++ : effet rhizosphère stimulant très important —  $R/S > 100$ .

TABLEAU XXII

INFLUENCE DU STADE DE LA CROISSANCE DU BLÉ SUR L'EFFET RHIZOSPHÈRE VIS-A-VIS DES GROUPES PHYSIOLOGIQUES  
DE MICRO-ORGANISMES DU SOL  
(var. *Fylgia* cultivée dans un limon argileux)

STADES  GROUPES PHYSIOLOGIQUES		GERMINATION			TALLAGE			ÉPIAISON			MATURITÉ		
		RAPPORT R/S		EFFET RHIZO- SPHÈRE MOYEN	RAPPORT R/S		EFFET RHIZO- SPHÈRE MOYEN	RAPPORT R/S		EFFET RHIZO- SPHÈRE MOYEN	RAPPORT R/S		EFFET RHIZO- SPHÈRE MOYEN
		Essai 1956	Essai 1957		Essai 1956	Essai 1957		Essai 1956	Essai 1957		Essai 1956	Essai 1957	
Microflore aéro- bie fixatrice d'azote	RE	1	0,6	0	6,5	2	+	1	0,6	0	2,5	1	0
	RP	1,8	3,6	0	40	20	++	3,1	2	0	2,5	0,8	0
Anaérobie. . . .	RE	0,7	0,7	0	1,1	1,1	0	0,	0,8	0	1	1	0
Microflore ammonifiante	RE	0	0	0	1	1	+	0	0	0	0	0	0
	RP	1	0	0	2	2	++	1	1	+	1	1	+
Microflore nitreuse	RE	0,3	2	0	5,6	10	+	1,6	1	0	0,5	1	0
	RP	1	1,7	0	56	100	+++	5,6	2,4	+	1	1,4	0
Microflore nitrique	RE	1	1	0	1	1,7	0	5,6	1	0	0,4	1	0
	RP	4,6	2	0	160	32,5	+++	28	10	++	1	1	0
Microflore dénitrifiante	RE	0	0	0	1	1	+	0	1	0	0	0	0
	RP	1	1	+	2	2	++	1	1	+	0	0	0
Microflore cellulolytique aérobie	RE	1	0,7	0	1	1	0	1	1	0	0,9	1	0
	RP	0,5	0,7	0	0	0	---	0	0	---	0,1	0,3	---
Microflore amylolytique	RE	0	0	0	1	1	+	1	0	0	0	0	0
	RP	0	0	0	2	2	++	1	1	+	1	1	+

R/S : rapport des nombres de micro-organismes ou différence des exposants des dilutions limites dans la rhizosphère (R) et le sol témoin (S).

RE : rhizosphère éloignée.

RP : rhizosphère proche.

0 : effet rhizosphère nul —  $0,33 < R/S < 3,3$ .

+: effet rhizosphère stimulant faible —  $3,3 < R/S < 10$  — différence des exposants = 1.

++ : effet rhizosphère stimulant moyen —  $10 < R/S < 33$  — différence des exposants = 2.

+++ : effet rhizosphère stimulant fort —  $33 < R/S < 100$  — différence des exposants = 3.

++++ : effet rhizosphère stimulant très important —  $R/S > 100$ .

— : effet rhizosphère inhibiteur faible —  $R/S < 0,33$ .

--- : effet rhizosphère inhibiteur total —  $R/S = 0$ .

## Chapitre V

### ACTION DE QUELQUES FACTEURS SUR L'EFFET RHIZOSPHERE

#### A. — CROISSANCE DU BLÉ: DÉFINITION ET CARACTÉRISATION DU TALLAGE

D'après JONARD (1951), la vie d'un Blé peut se scinder un peu arbitrairement en trois grandes *périodes* jalonnées par des repères faciles à observer; elles vont :

1° De la germination à la montée correspondant à la partie végétative du cycle de la plante.

2° De la montée à la fécondation, période de reproduction.

3° De la fécondation à la maturité ou période de maturation, chacune d'elles pouvant se subdiviser en *phases* de croissance, chaque phase étant limitée de son début au début de la phase suivante; ceux-ci sont caractérisés par un aspect particulier du végétal ou *stade*, ne correspondant pas toujours au moment précis du changement de métabolisme de la plante. Par exemple, le début de la montée, marquant le commencement de la période de reproduction, est indiqué par une élongation du quatrième ou cinquième entre-nœud; or cet allongement, qui est un phénomène de croissance, est postérieur au changement interne qui provoque cette montée. Dans la période végétative, on distingue trois phases, avec les stades repères suivants :

- semis-levée,
- levée-tallage,
- tallage-montée.

L'étude de l'influence du stade de la croissance du Blé sur l'effet rhizosphère vis-à-vis des divers groupes de micro-organismes du sol montre qu'il y a un maximum au moment du tallage. On peut se demander dans quelle phase il se produit, au début ou à la fin du tallage, s'il y a des différences suivant le type de sol ou la variété

de la plante et si, avec une même variété, le fait de la faire taller plus ou moins produit des modifications dans l'effet rhizosphère. Ce chapitre est consacré à l'action de ces facteurs qui seront étudiés dans l'ordre indiqué.

## B. — STADE DU TALLAGE

### I. Introduction

Il est bon de préciser quelques notions essentielles sur le système radicellaire du Blé et le phénomène du tallage qui sont particulièrement bien décrits par PERCIVAL (1921) et JONARD (1949-1951) et représentés dans la planche I.

### 1° — SYSTÈME RADICELLAIRE

Les racines du Blé peuvent être divisées en deux groupes : les racines séminales, au nombre de huit, qui apparaissent au début, à partir ou près de l'hypocotyle, et les racines adventices qui, plus tard, partent des nœuds.

#### a) *Racines séminales.*

L'extrémité de chaque racine est pointue, lisse et plus ou moins mucilagineuse. Le méristème terminal est protégé par la coiffe dont l'extérieur est continuellement exfolié quand la racine pénètre dans le sol, la coiffe étant renouvelée à l'intérieur par l'activité de son méristème. A quelque distance de son extrémité, la surface de chaque radicelle est recouverte d'un fin chevelu radicellaire; quand elle augmente de longueur et pénètre dans de nouvelles parties du sol, il y a formation de poils radicellaires, alors que ceux des plus vieilles parties dégèrent et meurent. Ces racines séminales ne forment qu'une petite proportion du système radicellaire total du Blé, leur fonction paraissant liée à l'absorption nécessaire à la croissance de