

DONNEES RECENTES SUR LA FIXATION LIBRE DE N₂

Par

Y. DOMMERCUES et J. BALANDREAU

Centre de Pédologie biologique du C.N.R.S.

Référence : n° 281

Mai 1972

Document à diffusion restreinte - Centre de Pédologie biologique
du C.N.R.S. - B.P. 5 - 54 - VANDOEUVRE-LES-NANCY

S O M M A I R E

CHAPITRE I - BIOCHIMIE DE LA FIXATION DE N₂ (fixation par les extraits a-cellulaires)

1. La nitrogénase
2. Source d'électrons ; transporteurs d'électrons
3. Source d'énergie : exigence spécifique en ATP
4. Exigences en Fe et Mo
5. Inhibiteurs
6. Km de N₂ et de C₂H₂
7. Mécanisme général

CHAPITRE II - FIXATION DE N₂ PAR LES CELLULES MICROBIENNES ENTIERES

1. Microorganismes fixant librement N₂
2. Caractéristiques physiologiques importantes des microorganismes fixateurs libres

CHAPITRE III - FIXATION LIBRE DE N₂ DANS LES ECOSYSTEMES COMPLEXES

1. Fixation libre de N₂ dans la rhizosphère
2. Fixation libre de N₂ dans la phyllosphère
3. Fixation libre de N₂ dans la litière
4. Signification agronomique de la fixation libre de N₂
5. Avenir des recherches sur la fixation libre de N₂

CHAPITRE IV - ANNEXE : METHODES D'EVALUATION DE L'ACTIVITE FIXATRICE DE N₂

1. Rappel succinct des méthodes employées
 2. Mesure de la vitesse de réduction de C₂H₂ au laboratoire
 3. Mesure de la vitesse de réduction de C₂H₂ in situ.
-

DONNEES RECENTES SUR LA FIXATION LIBRE DE N₂

Par Y. DOMMARGUES

et J. BALANDREAU

Définition :

La fixation biologique de N₂ est le processus qui consiste dans la réduction enzymatique de N₂ (azote moléculaire) en azote ammoniacal ; cette forme de N combiné (NH₃), appelée intermédiaire-clé, représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné. La différence essentielle entre le système biologique fixateur de N₂ et le système chimique réside dans le fait que les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de N₂ et une température de 30-35°C, alors que les conditions de la catalyse chimique sont très sévères : pression de 250-1000 atm de N₂ et température de 450°C (HARDY et KNIGHT, 1968).

CHAPITRE I - BIOCHIMIE DE LA FIXATION DE N₂

Le complexe enzymatique qui catalyse la fixation de N₂ est désigné sous le nom de nitrogénase (N₂ase). Cette réaction consiste d'une part en une activation des électrons fournis par un composé réducteur, d'autre part dans la réduction d'un substrat-accepteur d'électrons, cet accepteur d'électrons étant endogène (H⁺) ou exogène (N₂, C₂H₂ et de nombreux autres substrats dont il sera question ultérieurement) (fig. 1).

A partir d'extraits a-cellulaires de microorganismes fixateurs de N₂ - tels que Azotobacter vinelandii - on peut obtenir expérimentalement la réduction du substrat (réduction de N₂ en NH₃, de C₂H₂ en C₂H₄ .. etc..) lorsque les conditions suivantes sont réunis simultanément (tabl. 1) :

- (1) présence de N₂ase dans l'extrait a-cellulaire
- (2) présence d'une source d'électrons
- (3) présence d'une source d'énergie
- (4) présence de Fe et Mo
- (5) absence d'inhibiteurs.

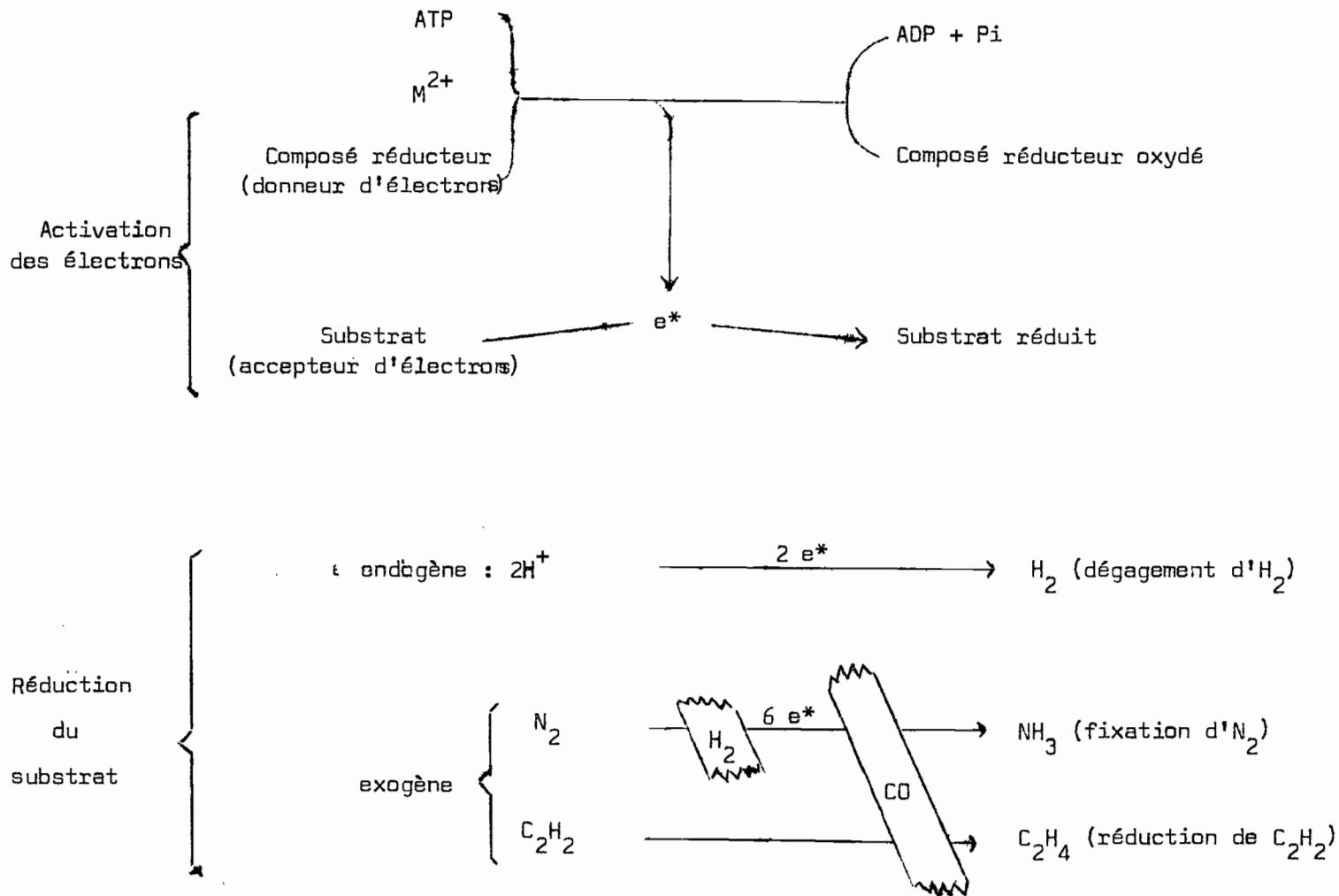


Fig. 1 - Réaction de la nitrogénase
 (d'après HARDY et al., 1972)

Tabl. 1 - Mise en évidence des conditions nécessaires à la réduction de C_2H_2 en C_2H_4 par comparaison de différents systèmes expérimentaux renfermant un extrait a-cellulaire d'Azotobacter vinelandii. (d'après HARDY et al., 1968)

Extrait a-cellulaire d' <u>Azotobacter vinelandii</u>	Source d'électrons ($Na_2 S_2O_4$)	Source d'énergie (système générateur d'ATP ou ATP)	Mg ⁺⁺	Phase gazeuse		Produit de réduction du substrat : C_2H_4 en % incubation de 30 min.
				Substrat (C_2H_2) atm.	Hélium atm.	
contenant N_2 ase (<u>A. vinelandii</u> cultivé sur milieu sans azote combiné)	+	+	+	0,05	0,95	24
	+	+	+	0	1,00	< 0,001
	+	0	+	0,05	0,95	< 0,001
	0	+	+	0,05	0,95	< 0,001
ne contenant pas de N_2 ase (<u>A. vinelandii</u> cultivé sur milieu contenant de l'azote ammoniacal)	+	+	+	0,05	0,95	< 0,001

Pour étudier les mécanismes de fixation de N_2 , on a très largement fait appel aux extraits a-cellulaires de Clostridium pasteurianum, et accessoirement à ceux d'Azotobacter vinelandii et Azotobacter chroococcum. On a également utilisé des extraits a-cellulaires de Rhodospirillum rubrum, Chromatium sp., Bacillus polymyxa, Klebsiella pneumoniae, Mycobacterium flavum (BURRIS, 1971).

1. La nitrogénase

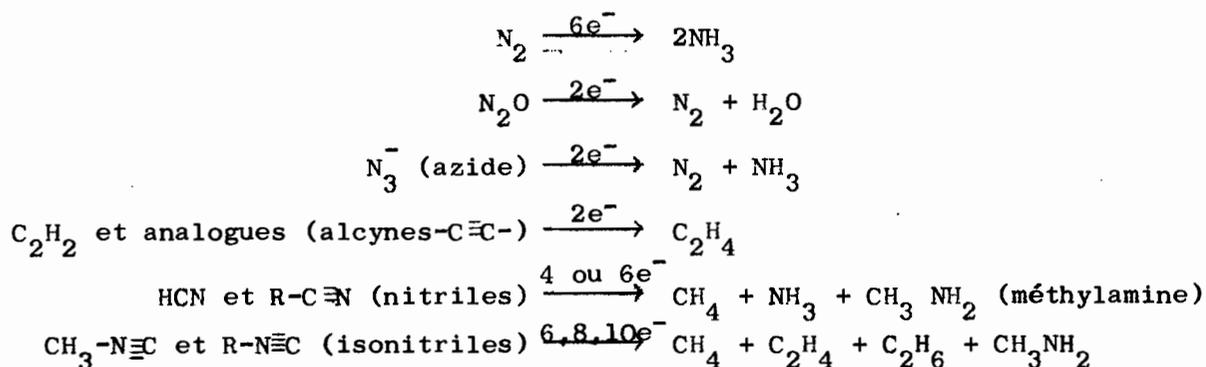
La purification des extraits a-cellulaires de C. pasteurianum et A. vinelandii a révélé l'existence de deux fractions dont les caractéristiques sont reportées au tabl. 2.

Tabl. 2 - Les deux fractions de la nitrogénase
(HARDY et al., 1971)

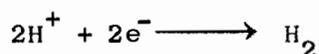
Noms	Fraction 1 Molybdoferrédoxine Fe-Mo protéine Azofermo	Fraction 2 Azoferrédoxine Fe protéine Azofer
Composition	Fe (non hémique), S^{2-} , Mo	Fe (non hémique), S^{2-}
Poids moléculaire	270 000	40 000
Cristallisation	+	non cristallisée
Sensibilité au froid	+	+
Inactivation par O_2	+	+

Chacune des deux fractions considérées isolément est incapable de fixer N_2 . Mais quand elles sont combinées, toutes les propriétés de la N_2 ase se manifestent.

La N_2 ase est certainement une des enzymes de réduction les moins spécifiques que l'on connaisse. On sait, en effet, que la N_2 ase est capable de catalyser non seulement la réduction de N_2 , mais aussi celle de nombreux autres substrats réductibles de structure moléculaire très voisine :



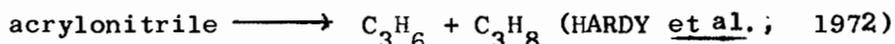
ainsi que :



Plusieurs des composés énumérés ci-dessus avaient initialement été décrits comme inhibiteurs de la fixation de N_2 . Mais tous ces composés sont en fait des substrats, bien qu'ils s'inhibent mutuellement lorsqu'ils sont en présence simultanément (HARDY et BURNS, 1968). C'est ainsi que C_2H_2 inhibe la fixation de N_2 ; cette inhibition compétitive est d'ailleurs si puissante que de petites contaminations des mélanges gazeux avec N_2 ne modifient en rien la réduction de l'acétylène (DILWORTH, 1970). Ajoutons que beaucoup de substrats sont toxiques dès que leur dose dépasse un certain seuil.

C'est la non spécificité de la N_2 ase qui est à l'origine de plusieurs méthodes indirectes d'évaluation de l'activité de cette enzyme, en particulier méthodes fondées sur :

- la réduction de C_2H_2 en C_2H_4 (cf. infra)
- le dégagement de H_2 (HARDY et al., 1972)
- la réduction de l'acrylonitrile :



- la réduction de CN^- en CH_4 (KELLY et LANG, 1970).

2. Source d'électrons ; transporteurs d'électrons

Les électrons nécessaires à la réduction de N_2 doivent posséder un niveau énergétique élevé ; en d'autres termes, le potentiel d'oxydo-réduction^(*) de la source d'électrons (substance donatrice d'électrons) doit être très négatif.

Après avoir évoqué le cas de la source artificielle

(*) voir page suivante.

d'électrons couramment utilisée expérimentalement pour la réalisation de modèles simplifiés, nous examinerons le cas des systèmes physiologiques.

a. Système artificiel : dithionite (= hydrosulfite de sodium : $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

Le dithionite de sodium est très utilisé comme source artificielle d'électrons dans les études enzymologiques ; c'est ainsi que les expériences dont les résultats figurent au tabl. 1 ont été conduites avec ce donateur d'électrons. Le potentiel d'oxydo-réduction du dithionite $E'_0 = -0,420$ V. Contrairement aux composés réducteurs biologiques que nous allons évoquer ci-dessous, le dithionite se couple directement avec la N_2 ase sans nécessiter l'intervention de transporteurs d'électrons. Les produits d'oxydation du dithionite n'ont pas encore été identifiés.

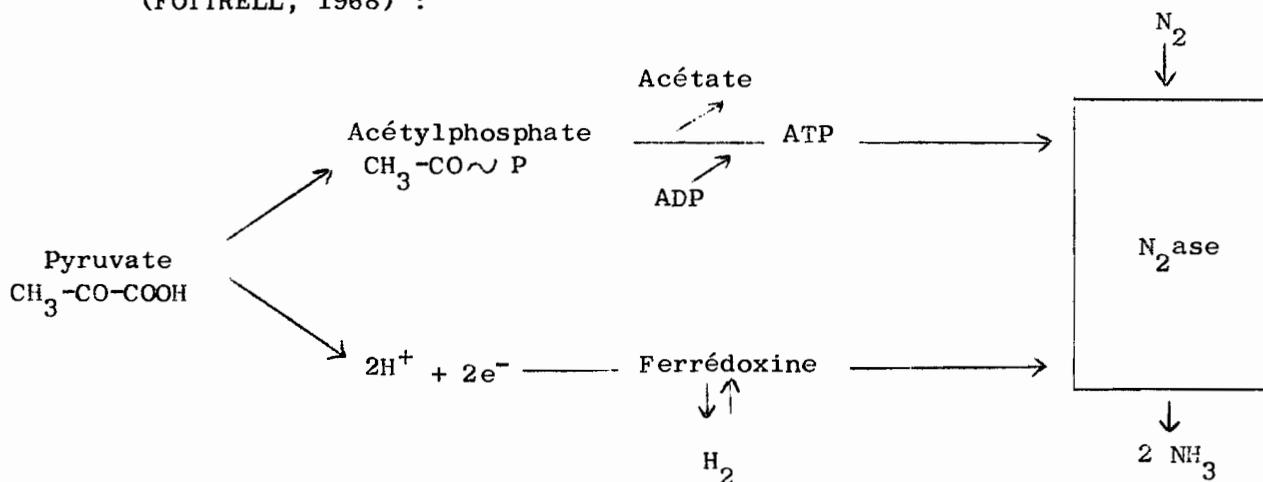
b. Systèmes physiologiques

- Cas de Clostridium pasteurianum

On a pu montrer que des extraits a-cellulaires bruts de Clostridium pasteurianum peuvent métaboliser le pyruvate et réduire la ferrédoxine. C'est la ferrédoxine réduite qui est la source physiologique d'électrons dans la réaction de la N_2 ase. Le potentiel d'oxydo-réduction

(*) "Les propriétés physico-chimiques et physiologiques des systèmes donateurs, transporteurs et accepteurs d'électrons sont définies par leur potentiel standard d'oxydo-réduction (E'_0), c'est-à-dire par la différence de potentiel électrique entre, d'une part, le mélange à parties égales de leurs formes oxydée et réduite et, d'autre part, l'électrode normale d'hydrogène prise, par convention, comme référence. Ce potentiel exprime l'énergie des électrons libérés par l'oxydation du système considéré. Il est d'autant plus électronégatif que cette énergie est plus grande. Un système d'oxydo-réduction ne peut céder ses électrons qu'à un autre système ayant un potentiel standard (E'_0) relativement moins électronégatif ou suffisamment proche pour que le transfert soit énergétiquement possible. Corrélativement, le niveau énergétique des électrons, au cours de leur passage par plusieurs transporteurs successifs, comme c'est le cas par exemple dans la chaîne respiratoire, baisse progressivement d'une étape à l'autre, jusqu'à l'accepteur final". (SENEZ, 1968).

des ferrédoxines varie de $-0,395$ à $-0,490$ V. En fait, le pyruvate fournit à la fois les électrons et l'énergie nécessaire à la réaction sous forme d'ATP. Ce double rôle du pyruvate pouvant être schématisé comme suit : (FOTTRELL, 1968) :

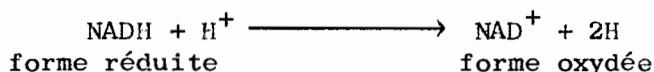


La ferrédoxine se rencontre seulement chez les bactéries anaérobies, fixatrices ou non fixatrices d'azote, mais possédant une hydrogénase. La flavodoxine peut remplacer la ferrédoxine ; elle a été isolée d'extraits a-cellulaires de Clostridium pasteurianum cultivé sur un milieu déficient en fer.

- Cas des Azotobacter

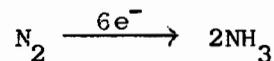
On vient de préciser que les bactéries aérobies ne possèdent pas de ferrédoxine : l'Azotobacter en est donc dépourvu. De nombreux chercheurs ont donc cherché à élucider la nature du donateur d'électrons et le système transporteur d'électrons chez les Azotobacter (ainsi que chez d'autres microorganismes fixateurs de N_2 aérobies). Certains faits expérimentaux suggèrent la possibilité de l'intervention de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), pyridine nucléotide bien connue comme transporteur d'électrons^(*). Comme, en outre, chez les microorganismes aérobies le transport d'électrons entre les pyridines nucléotides et l'oxygène s'opère par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire (cytochrome et cytochrome-oxydase), on a pensé que les cytochromes pourraient être impliqués dans la fixation de l'azote. Mais il s'agit-là d'un point encore obscur et certains auteurs, dont POSTGATE (1971), ne croient pas au rôle de la chaîne respiratoire normale dans la fixation de N_2

(*) C'est la forme réduite (NADH) qui peut servir de donateur primaire d'électrons suivant la réaction :



3. Source d'énergie : exigence spécifique en ATP

La fixation de N_2 consomme de l'énergie biologique. Bien que la réduction de N_2 en NH_3 couplée avec l'oxydation d'un substrat tel que le glucose soit exergonique aux températures et pH ordinaires, les préparations enzymatiques consomment de l'énergie (POSTGATE, 1971). Fait important à souligner, cette énergie doit être fournie exclusivement sous forme d'ATP. D'autres sources d'énergie, telles que les 3 autres ribonucléotides triphosphates monomères de l'ARN (UTP, GTP, CTP) (*) sont inutilisables (HARDY et al., 1968). La consommation est de l'ordre de 4-5 moles d'ATP par paire d'électrons transférés : ainsi 12-15 moles d'ATP sont nécessaires pour réduire chaque molécule de N_2 en $2NH_3$, puisque cette réaction implique le transfert de $6e^-$:



Apparemment, la N_2 ase per se se comporte comme une ATPase pendant le transfert d'électrons, (BURRIS, 1971).

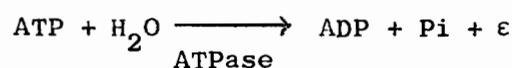
Pour que la N_2 ase fonctionne efficacement, un système générateur convenable doit lui fournir l'ATP à un niveau faible et constant ; l'ADP formé doit se maintenir à un niveau négligeable, sinon la N_2 ase est inhibée par ce dernier composé.

(*)

Rappelons que la nomenclature des différents nucléotides est la suivante :

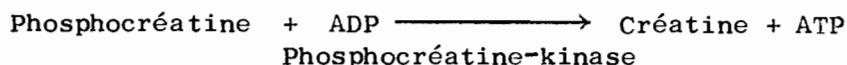
Adénosine monophosphate	AMP
Uridine monophosphate	UMP
Cytidine monophosphate	CMP
Guanosine monophosphate	GMP

et que ces nucléotides à l'état de triphosphate, c'est-à-dire sous les formes ATP, UTP, CTP, GTP, sont des corps thermodynamiquement instables dont l'hydrolyse libère une quantité importante d'énergie (ϵ) utilisable biologiquement :

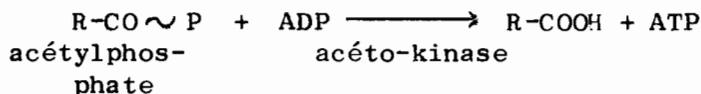


ϵ est de l'ordre de 8 calories par mole d'ATP.

Expérimentalement, on a utilisé, dans les préparations enzymatiques, soit l'ATP apporté à dose modérée, soit de préférence, des systèmes générateurs d'ATP tels que le système phosphocréatine plus créatine-kinase :



ou le système acétylphosphate plus acéto-kinase :



4. Exigences en Fe et Mo

Les exigences en Fe et Mo des microorganismes fixateurs de N_2 sont bien établies. Elles s'expliquent en particulier par le fait que Fe et Mo font partie intégrante du complexe nitrogénasique. On considère parfois que le vanadium peut remplacer le molybdène. Le rôle de certains autres éléments - dont CO - est indirect ; ils interviendraient ^{seulement} dans la croissance et le métabolisme général des microorganismes.

5. Inhibiteurs

a. Inhibiteurs compétitifs spécifiques

Ce sont des inhibiteurs qui se fixent sur le site de complexation du substrat, mais ne sont pas réduits par la N_2 ase. Ce sont essentiellement CO et H_2 , accessoirement NO (d'après BURRIS, 1971); H_2 inhibe seulement la réduction de N_2 , tandis que CO inhibe puissamment à la fois la réduction de N_2 et de C_2H_2 (fig. 1). Ces inhibiteurs n'affectent pas le dégagement de H_2 ni l'activation des électrons ni les phénomènes de transfert.

b. Inhibiteurs servant de substrats

Ce sont des inhibiteurs de la réduction de N_2 , qui se fixent sur le site de la complexation, comme les précédents, mais qui, contrairement aux précédents, sont réduits : ce sont les substrats de remplacement que nous avons énumérés antérieurement : N_2O , N^{3-} , C_2H_2 , etc...

c. Inhibiteurs non spécifiques

Ces inhibiteurs comprennent les agents qui affectent l'activation des électrons et/ou leur transfert ; vraisemblablement, ils n'agissent pas au site de complexation du substrat. Ces inhibiteurs sont nombreux et leurs modes d'action mal définis : certains agents complexant

les métaux (ex. : o-phénanthroline), ATP à dose élevée (l'inhibition est due à l'ADP formé), certains cations divalents dont Zn^{++} , Cu^{++} , électrolytes à dose élevée, inhibiteurs des fonctions thiol (p-chloromercuribenzoate).

d. Cas de l'oxygène

L'activité de la N_2 ase est stable pendant plusieurs semaines quand les préparations sont maintenues à la température du laboratoire, sous une atmosphère dépourvue d' O_2 et à un pH de 7-8. L'inactivation est totale et irréversible après une exposition à l'air de 6 h à 22°C. Toutefois la N_2 ase d'Azotobacter n'est pas affectée par O_2 dans les broyats bruts de cellules ; mais la sensibilité apparaît au cours de la purification et du fractionnement du complexe enzymatique en ses deux composantes (fraction 1 et fraction 2).

e. Cas de l'azote ammoniacal

Il n'y a pas inhibition par feedback de l'activité de la N_2 ase. C'est ainsi qu'en-dessous d'une concentration de 50 mM, NH_4Cl est sans effet sur la réduction de C_2H_2 en C_2H_4 ; ce seuil est identique pour KCl (HARDY et al., . 1972).

6. Km de N_2 et de C_2H_2

Rappelons que la vitesse de toute réaction enzymatique est non seulement fonction de la concentration en enzyme, mais aussi de la concentration en substrat. Pour une température donnée et une concentration en enzyme donnée, la courbe de vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat est un segment d'hyperbole (fig. 2). Cette fonction transformée suivant la méthode de LINEWEAVER-BURK donne une droite (fig. 3) qui permet de déterminer plus facilement la constante de MICHAELIS (Km).

Le tableau ci-dessous indique des valeurs de Km dans le cas où les concentrations de N_2 et C_2H_2 sont exprimées en atmosphères et dans celui - plus logique - où elles sont exprimées en concentration de ces substrats dissous dans la solution aqueuse.

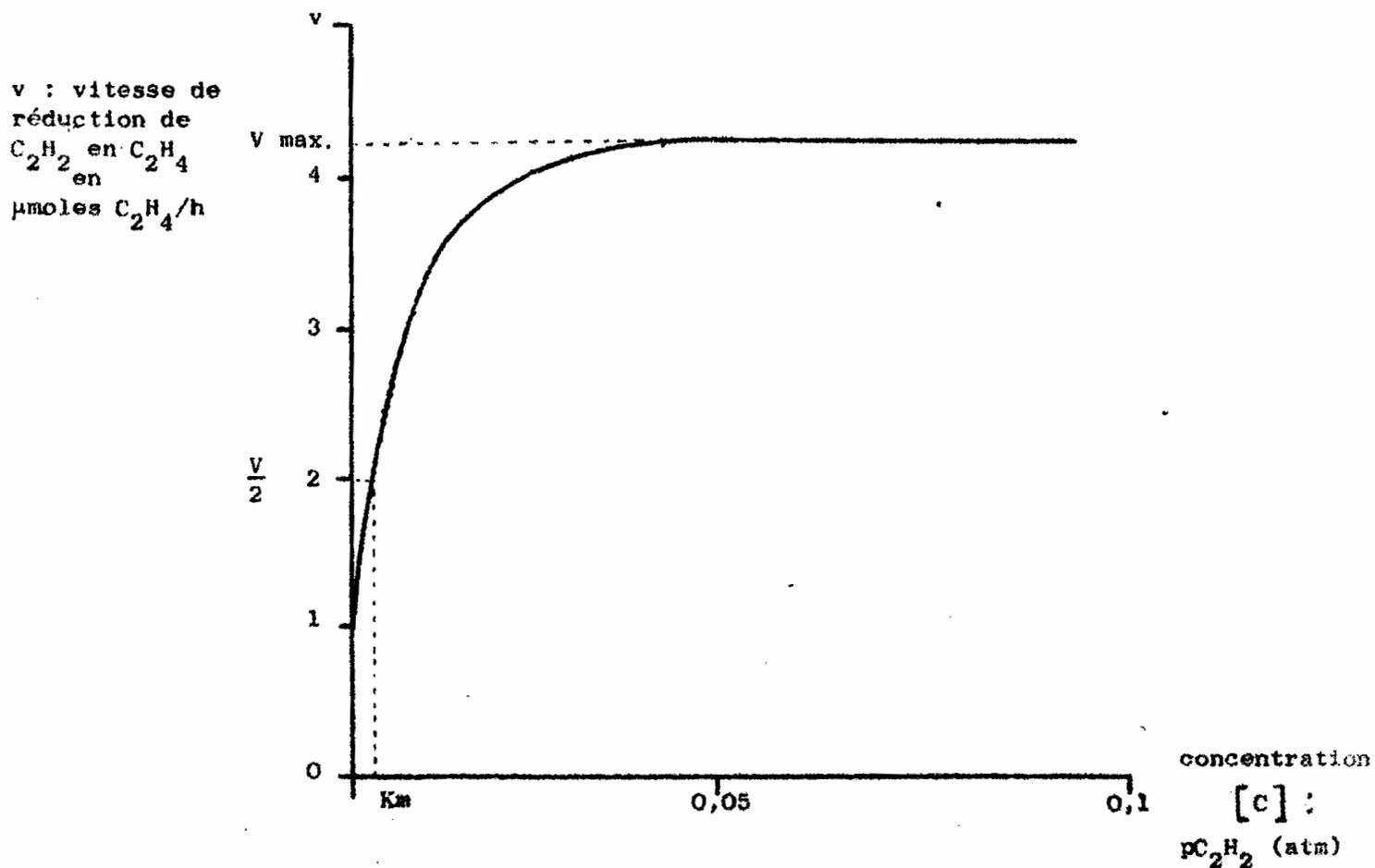


Fig. 2 - Cinétique globale de la réduction de C_2H_2 en C_2H_4 , par la N_2 ase d'Azotobacter. La vitesse de réduction tend vers une limite, ce qui s'explique par la formation d'un complexe (dissociable) enzyme - substrat. La constante K_m , qui caractérise la demi-vitesse maximale, est appelée la constante de Michaelis.

(d'après HARDY et al., 1968)

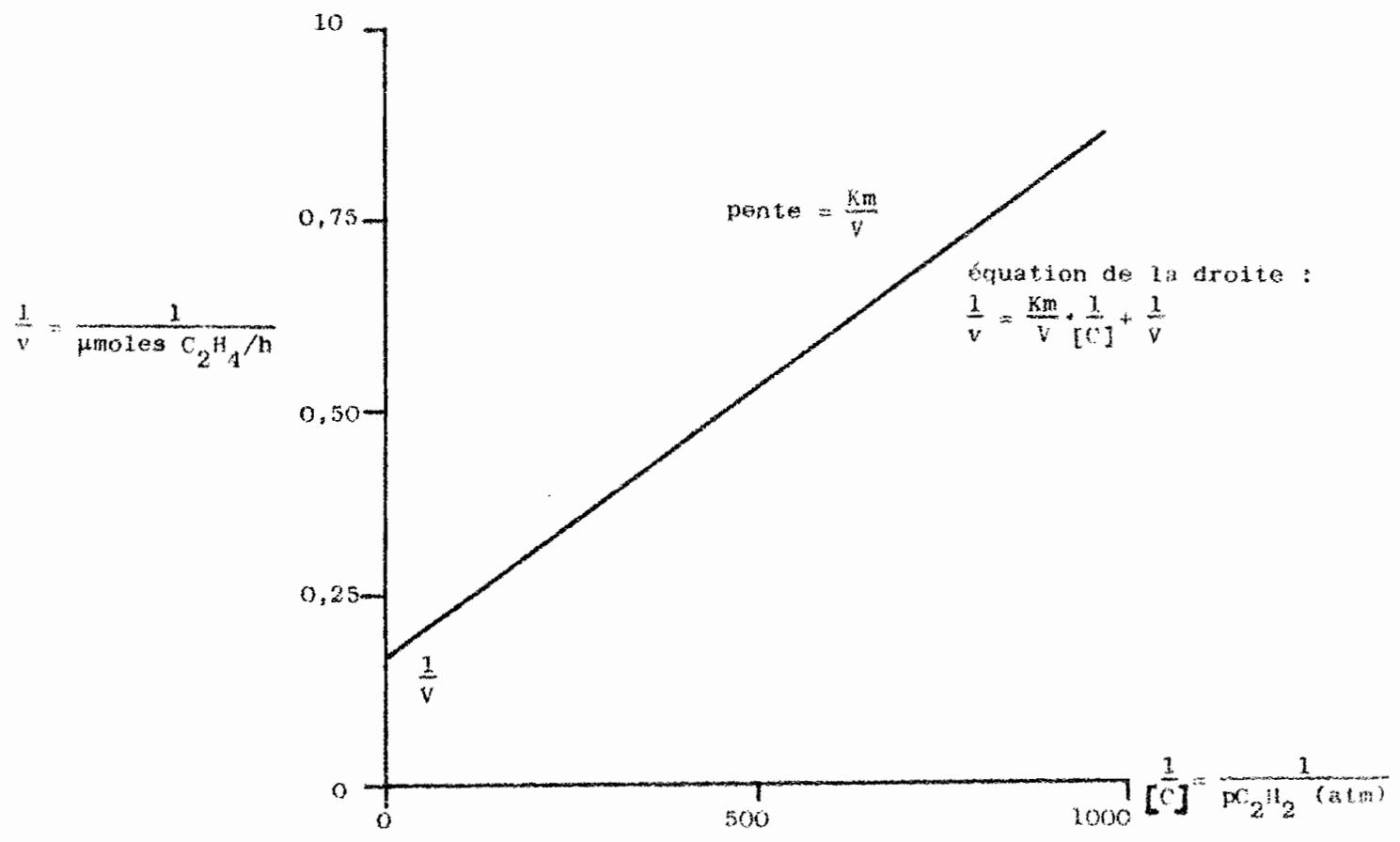


Fig. 3 - Représentation graphique de l'hyperbole de la fig. 2 transformée suivant la méthode de Lineweaver-Burk : on a porté les valeurs $\frac{1}{v}$ en ordonnée et $\frac{1}{[C]}$ en abscisse. Dans ce cas, $K_m = 0,004$ et

(d'après HARDY et al., 1968)

Tabl. 3 - Valeur des Km de N₂ et de C₂H₂ dans le cas
d'extraits a-cellulaires
(d'après HARDY et al., 1972)

	Km exprimés en atmosphères de N ₂ ou C ₂ H ₂	Km exprimés en concentra- tions de N ₂ ou C ₂ H ₂ dans la solution aqueuse
N ₂	0,05 - 0,17 atm	0,1 mM
C ₂ H ₂	0,004 atm	0,4 - 1,2 mM

7. Mécanisme général de la fixation de N₂

Avant de proposer un schéma général synthétisant les hypo-
thèses actuelles concernant les réactions impliquées dans la fixation
de N₂, il convient d'attirer l'attention sur les deux points suivants :

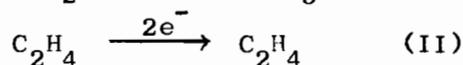
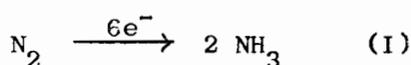
(1) Complexité du métabolisme de l'hydrogène

Tous les organismes fixateurs de N₂ possèdent une hydro-
génase (mais tous les organismes possédant une hydrogénase ne sont pas
fixateurs d'azote). Cette hydrogénase conventionnelle qui catalyse la
réaction : $2 \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2$ est ATP-indépendante et sensible à CO.

D'autre part, la N₂ase peut réduire 2 H⁺ en H₂, cette réaction
étant ATP-dépendante et insensible à CO (fig. 1). Il en résulte que, dans
un système fixateur de N₂, H₂ peut être libéré à la fois par l'hydrogé-
nase conventionnelle et par la N₂ase. En outre, H₂ peut intervenir en qua-
lité d'inhibiteur de la réaction de réduction de N₂ en NH₃ (BURRIS, 1971).

(2) Limitation de la vitesse de fixation de N₂ par la vitesse d'hydrolyse de l'ATP couplée avec le transfert des élec- trons activés

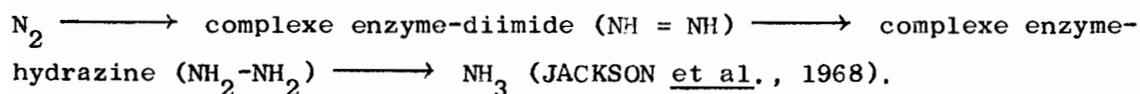
La vitesse de réduction de N₂ (ou de tout autre substrat)
est proportionnelle à la vitesse de transfert des électrons et inversement
proportionnelle au nombre d'électrons nécessaires pour la réduction de
chaque molécule. C'est ainsi que si l'on compare les deux réactions de ré-
duction catalysées par la N₂ase :



on constate que si on mesure la vitesse de réduction en fonction du nombre de molécules de composé réduit formé (NH_3 , C_2H_4) on obtiendra un chiffre 3 fois plus grand en (II) qu'en (I). Quand l'ATP, ou la source d'électrons, est en quantité insuffisante - ce qui se produit quand le niveau des carbohydrates est faible - le transfert d'électrons par la N_2 ase ralentit, d'où une diminution de la vitesse de réduction de N_2 (ou de tout autre substrat).

La fig. 4 schématise les réactions générales impliquées dans la fixation de N_2 dans le cas de Clostridium pasteurianum.

En ce qui concerne les étapes hypothétiques de la réduction de N_2 , signalons seulement ici qu'elles pourraient se succéder comme suit :



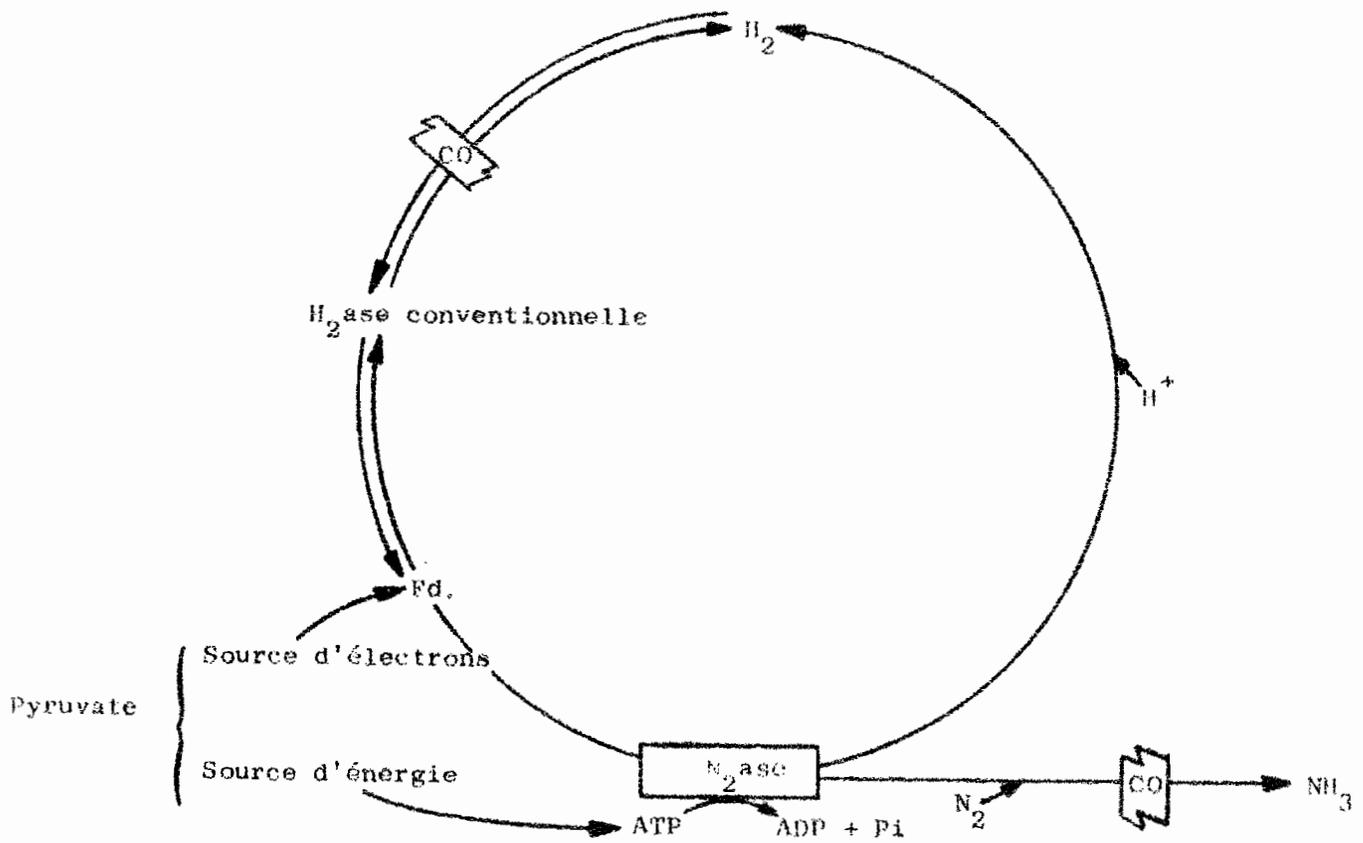


Fig. 4 - Réactions impliquées dans la fixation biologique de N_2 par Clostridium pasteurianum.

(d'après BURRIS, 1971)

Le pyruvate fournit à la fois les électrons (par l'intermédiaire de la ferrédoxine, Fd) et l'énergie nécessaire sous forme d'ATP. H_2 provient soit de l'hydrogénase conventionnelle soit de la réduction de H^+ .

CHAPITRE II - FIXATION DE N₂ PAR LES CELLULES MICROBIENNES ENTIERES

1. Microorganismes fixant librement N₂

Pour tester l'aptitude à fixer N₂ chez les microorganismes, on a longtemps fait appel à la méthode consistant à mesurer la croissance sur des milieux dépourvus d'azote combiné. Cette méthode a conduit souvent à classer parmi les fixateurs de N₂, des microorganismes non fixateurs de N₂ mais ayant de très faibles exigences en azote combiné et capables d'extraire des milieux où ils se trouvent les traces d'azote combiné (POSTGATE, 1971b). Tel est, par exemple, le cas des champignons (Saccharomyces, Rhodoturula, Pullularia) et des Nocardia. Les seules méthodes sûres pour tester l'aptitude à fixer N₂ sont celles qui sont fondées sur l'utilisation de ¹⁵N₂ ou sur l'évaluation indirecte de l'activité nitrégénasique (par ex. : méthode de réduction de C₂H₂ en C₂H₄). La liste qui figure ci-dessous (tabl. 4) a été établie en se basant sur ces méthodes rigoureuses et d'après une publication récente de POSTGATE (1971b). Cette liste est loin d'être définitive, car on découvre constamment de nouvelles espèces ou souches fixatrices.

Tabl. 4 - Liste des microorganismes fixant librement N₂
(d'après POSTGATE, 1971b)

Microorganismes fixateurs	Commentaires
a) <u>Bactéries</u>	
(1) <u>Aérobies obligatoires</u>	
<u>Azotobacter</u>	Toutes les souches fixent
<u>Azotococcus</u>	
<u>Azomonas</u>	
<u>Beijerinckia</u>	
<u>Derxia</u>	
<u>Mycobacterium flavum</u> et divers autres <u>Mycobacterium</u>	Probablement pas des mycobactéries dans la taxonomie des pays occidentaux
<u>Pseudomonas azotogensis</u> , souche V	En fait, ce n'est pas un <u>Pseudomonas</u> , position taxonomique incertaine
<u>Arthrobacter</u> sp.	Souches en cours d'étude à l'INA (Paris) et au C.N.R.S. (Nancy)

(2) <u>Anaérobies facultatives</u>	De nombreuses souches ne fixent pas <u>K. rubiacearum</u> est impliqué dans la symbiose de nodules foliaires Fixe seulement en anaérobiose
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	
<u>Klebsiella rubiacearum</u>	
<u>Bacillus polymyxa</u>	
(3) <u>Anaérobies obligatoires</u>	Toutes les souches ne fixent pas activement Appartient à une association fixatrice stable
<u>Clostridium pasteurianum</u>	
<u>Clostridium butylicum</u>	
<u>Methanobacillus (Methanobacterium orolianskii)</u>	
<u>Desulfovibrio desulfuricans</u> , <u>D. vulgaris</u> , <u>D. gigas</u> , <u>Desulfotomaculum rumicis</u> , <u>D. orientalis</u>	Toutes les souches ne fixent pas
(4) <u>Bactéries phototrophes</u>	
- <u>Athiorhodacées</u> (B. pourprées non sulfureuses)	
<u>Rhodospirillum rubrum</u> <u>Rhodopseudomonas</u> <u>sp.</u> <u>ides</u> , <u>Rhodomicrobium</u>	La fixation N ₂ a été démontrée avec certaines souches ; lumière dépendante et anaérobie (*)
- <u>Thiorhodacées</u> (B. pourprées sulfureuses)	
<u>Chlorobium thiosulfatophilum</u> <u>Chromatium vibrioforme</u> <u>C. minutissimum</u> <u>Chloropseudomonas ethylica</u>	La fixation de N ₂ est rare chez ce groupe (**)
b) <u>Actinomycètes</u>	
<u>Streptomyces</u> <u>sp.</u>	Ces souches, en cours d'étude au laboratoire de l'INA (Paris) et du C.N.R.S. (Nancy) fixent en aérobiose
c) <u>Champignons</u>	
<u>Mycorrhizes</u>	Fixation douteuse
d) <u>Cyanophycées</u>	
(1) <u>Nostocales</u>	
<u>Anabaena</u>	
<u>Anabaenopsis</u>	Hétérocystes
<u>Anabaena</u>	

(*) Rhodospirillum et Rhodopseudomonas sont des anaérobies facultatifs et Rhodomicrobium anaérobie strict.

(**) Chlorobium et Chloropseudomonas sont des anaérobies stricts.

Ca	<u>Calothrix</u> <u>Chlorogloea</u> <u>Cylindrospermum</u> <u>Nostoc</u> <u>Scytonema</u> <u>Tolypothrix</u>	Hétérocystes
(2)	<u>Stigonematales</u> <u>Fischerella</u> <u>Hapalosiphon</u> <u>Mostigocladus</u> <u>Stigonema</u> <u>Westiellopsis</u>	Hétérocystes
(3)	<u>Chroococcales</u> <u>Gleocapsa</u>	Pas d'hétérocystes

On remarquera que le caractère de fixation de N_2 est beaucoup plus répandu chez les bactéries anaérobies que chez les aérobies ou les anaérobies facultatives.

2. Caractéristiques physiologiques importantes des microorganismes fixateurs libres

Nous examinerons d'abord les différences dans les conditions de fixation - en ce qui concerne la présence de O_2 et de l'azote combiné - qui se manifestent entre (1) les systèmes simplifiés que constituent les extraits a-cellulaires, (2) les cellules entières. Nous évoquerons ensuite le problème du rendement et de l'efficacité puis celui du $K_m(N_2)$.

a. Protection de la N_2 ase chez les microorganismes aérobies

Etant donné que la N_2 ase est, on l'a vu, inactivée par O_2 , on doit admettre que les fixateurs aérobies de N_2 disposent d'un mécanisme protégeant leur N_2 ase contre l'oxygène. POSTGATE (1971a) a émis l'hypothèse que deux mécanismes peuvent intervenir simultanément :

(1) Protection respiratoire : L'activité respiratoire des Azotobacter est considérable : leur QO_2 (μl d' O_2 consommé par h et par mg de poids sec de cellule) atteint 4 200 ; c'est le plus élevé parmi tous les microorganismes. Cette activité respiratoire considérable correspondrait à un mécanisme de protection de la N_2 ase : l'accès de l'oxygène à la N_2 ase serait bloqué par cette respiration très active.

(2) Protection conformationnelle : On sait que, contrairement à la N_2 ase des extraits bruts de Clostridium pasteurianum, qui est soluble, la N_2 ase des extraits bruts d'Azotobacter est particulière. En outre,

cette N_2 ase particulière est relativement peu sensible à l'oxygène, alors que les extraits solubles de C. pasteurianum sont très sensibles. Mais lorsque les préparations particulières de N_2 ase d'Azotobacter sont scindées par chromatographie en leur deux composants, la fraction 2 montre une très grande sensibilité à l'oxygène. On déduit de ces faits expérimentaux l'hypothèse que la fraction 2 est protégée par une conformation particulière. Cette protection conformationnelle serait moins développée chez Mycobacterium flavum que chez Azotobacter sp.

- Cas des Cyanophycées

A part l'exception du genre Gleocapsa, toutes les Cyanophycées fixatrices d'azote possèdent des hétérocystes, grosses cellules, optiquement vides, échelonnées le long des filaments. Ces hétérocystes seraient dépourvus de toute activité photosynthétique mais, par contre, seraient le siège de la fixation de N_2 . Dans ces conditions, on peut penser que la N_2 ase est protégée par le compartimentage que constituent les hétérocystes.

b. Influence de l'azote combiné sur la fixation de N_2 par les cellules entières de microorganismes fixateurs

On a vu que la fixation de N_2 par les extraits a-cellulaires est relativement insensible à NH_3 ; par contre, elle est inhibée dans les cultures de microorganismes. Cette inhibition est due à la répression de la synthèse de la N_2 ase. Il en résulte que des microorganismes - tels que Azotobacter vinelandii, Clostridium pasteurianum, Klebsiella pneumoniae et Gleocapsa - cultivés sur milieux renfermant de l'azote combiné (NH_3 , NO_3^-) ne possèdent pas de N_2 ase (cf. tabl. 1).

Il est cependant des microorganismes pour lesquels certaines formes d'azote combiné ne répriment pas la synthèse de la N_2 ase : c'est ainsi que chez Klebsiella pneumoniae, le glutamate et les acides aminés et de la caséine ne répriment pas cette synthèse alors que la glutamine NH_3 la réprime (HARDY et al., 1972).

c. Rendement et efficience des microorganismes fixateurs de N_2

Rappelons que par rendement on désigne le rapport :

$$Y_{\text{sub}} = \frac{\text{poids sec des cellules microbiennes (g)}}{\text{mole de substrat consommé}}$$

L'expérience montre que Y_{sub} est plus faible si le microorganisme fixe N_2 que s'il assimile NH_3 , ce qui confirme les résultats des expériences effectuées avec les extraits a-cellulaires, d'où il découle que la fixation de N_2 consomme de l'énergie (sous forme d'ATP). En ce qui concerne

les bactéries aérobies fixatrices de N_2 , l'étude de Y_{sub} est compliquée par le fait qu'une partie du substrat est détournée pour la protection respiratoire.

Sur le plan de l'enrichissement des écosystèmes en azote, on fait souvent appel à la notion d'efficacité de fixation que l'on mesure par le rapport :

$$E = \frac{\text{mg } N_2 \text{ fixé}}{\text{g de C organique consommé}}$$

Pour Azotobacter, E est de l'ordre de 10 à 15 mg N/g C consommé en batch ; en culture continue, E est plus élevé : 20 mg ; lorsque la pO_2 diminue, E peut même atteindre 40 (fig. 5). Cet effet favorable de la baisse de tension de O_2 sur l'efficacité, fait supposer que, dans le sol (où la tension de O_2 est souvent faible, notamment dans certains microhabitats), la fixation de N_2 par les bactéries aérobies est plus importante que ne le laissent supposer les expériences de laboratoire, conduites dans des milieux généralement bien aérés. Notons, en outre, que dans le sol, les microorganismes fixateurs libres sont souvent associés avec d'autres microorganismes (fixateurs ou non) qui améliorent souvent l'efficacité (RUBENCHIK, 1960 ; RUINEN, 1970).

d. Km de N_2

On a donné antérieurement les valeurs des Km de N_2 , dans les extraits a-cellulaires (tabl. 3). Dans le cas de cellules entières, les Km sont nettement plus faibles (0,02 - 0,05 atm).

Etant donné la faible valeur du Km dans l'un et l'autre cas, on peut penser que, dans les écosystèmes naturels (cf. infra), N_2 ne risque pas de constituer un facteur limitant pour la fixation de N_2 .

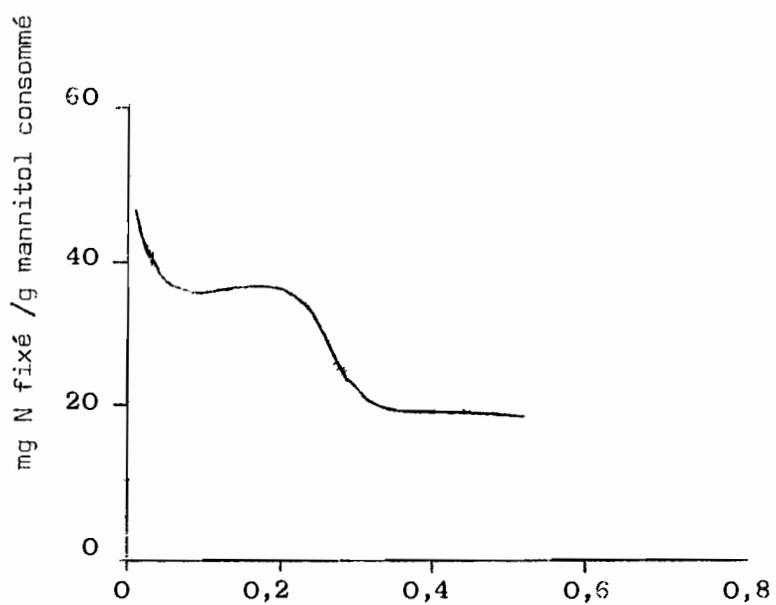


Fig. 5 - Efficiencie de cultures d'Azotobacter chroococcum
à différents pO₂.

(d'après POSTGATE, 1971b)

CHAPITRE III - FIXATION LIBRE DE N₂ DANS LES ECOSYSTEMES SOL - VEGETATION

Les recherches effectuées à l'échelle moléculaire (chap. I) et à l'échelle cellulaire (chap. II) nous renseignent avec précision sur les mécanismes intimes de la fixation de N₂ ; elles permettent, en outre, de prévoir les caractéristiques des habitats qui, in situ, doivent, a priori, être le siège d'une fixation libre de N₂ particulièrement active. C'est ainsi qu'on peut penser que sera favorable à la fixation hétérotrophique tout habitat :

- où la teneur en substrats carbonés utilisables par la microflore fixatrice libre est élevée (ex. : rhizosphère) ;
- où la teneur en O₂ est faible ou nulle (ex. : sols engorgés) ;
- où la teneur en azote combiné est réduite.

L'expérience, on le verra ci-dessous plus en détail, confirme de telles prévisions, puisque parmi les sites les plus favorables à la fixation hétérotrophique libre de N₂, la rhizosphère du riz occupe une place de choix.

Toutefois, sur le plan quantitatif, les prévisions fondées sur les recherches à l'échelle moléculaire et cellulaire, sont très grossières. D'autre part, elles ne renseignent nullement sur le rôle des facteurs influant indirectement mais fortement sur le processus étudié : facteurs biologiques (interactions avec les plantes et les microorganismes), facteurs climatiques, facteurs édaphiques. D'où la nécessité :

(1) d'effectuer des recherches in situ visant à déterminer avec précision non seulement l'intensité de la fixation de N₂ mais aussi les paramètres de l'environnement, notamment les paramètres climatiques et édaphiques ;

(2) d'étudier le fonctionnement de systèmes expérimentaux complexes faisant intervenir à la fois la microflore fixatrice, le sol et la plante.

Si l'on dispose actuellement d'un nombre important de données globales sur la fixation de N₂ in situ (cf. par ex. les revues de MOORE, 1966 ; DOMMERGUES et MANGENOT, 1970), celles-ci ne permettent nullement de dégager les lois générales régissant la fixation de N₂ dans les écosystèmes sol - végétation. En effet, ces données ne sont pas toujours fondées sur l'emploi de méthodes sûres ; bien plus, elles portent sur l'ensemble d'écosystèmes souvent mal définis eux-mêmes en ce qui concerne leurs paramètres édaphiques ou climatiques.

Avant d'exposer nos connaissances actuelles sur la signification agronomique de la fixation libre de N_2 , nous présenterons les grandes lignes des acquisitions récentes dans le domaine de la fixation libre de N_2 au niveau de la rhizosphère, de la litière et de la phyllosphère. Ces acquisitions récentes sont dues essentiellement à l'utilisation de la méthode très sensible d'appréciation de l'activité de la N_2 ase fondée sur la réduction de C_2H_2 en C_2H_4 (cf. Chap. IV). Conformément à la suggestion de HARDY et al., (1972), nous faisons suivre les valeurs de fixation de N_2 ainsi obtenues de la formule de l'acétylène entre crochets [C_2H_2].

1. Fixation libre de N_2 dans la rhizosphère

L'existence d'une fixation libre de N_2 , significative sur le plan écologique, a été découverte en 1970-1971 par différents chercheurs travaillant sur les graminées : riz (RINAUDO, 1970 ; ISHIZAWA et al., 1970 ; YOSHIDA et ANCAJA, 1971), Paspalum sp., Eleusine coracana et diverses graminées tropicales (DÖBEREINER et al., 1972). WEINHARD et al., 1971).

Les recherches se sont ensuite orientées dans deux directions :

- 1) Evaluation de la contribution de la fixation de N_2 rhizosphérique à l'approvisionnement en N_2 des écosystèmes (mesures in situ).
- 2) Mise en évidence du rôle des facteurs principaux régissant la fixation de N_2 rhizosphérique dans les écosystèmes sol - végétation.

a. Observations in situ

Les observations in situ sont encore peu nombreuses à l'exception des rizières pour lesquelles on évalue la fixation par différentes méthodes, à 30-70 kg N_2 /ha/cycle végétatif (voir par ex. fig. 10). Mais, dans les conditions où les observations ont été effectuées, il est difficile de distinguer la fixation par la microflore hétérotrophe de la rhizosphère, de la fixation par la microflore photosynthétique ; les résultats d'expériences conduites au laboratoire par RINAUDO et al. (1971) font supposer que la contribution de la microflore rhizosphérique pourrait représenter grosso-modo 50 % de la fixation totale.

Dans les écosystèmes autres que les rizières qui ont été étudiés jusqu'à présent, la fixation rhizosphérique est beaucoup plus modeste :

- 3,5 kg N_2 [C_2H_2] /ha/cycle végétatif pour un maïs cultivé dans un sol brun calcaire dans l'Est de la France (BALANDREAU et BURGOS-LEON, 1972).

- 5 à 10 kg N_2 [C_2H_2] /ha/an pour une prairie à Hypparhenia sp. et Loudetia de Lamto (Moyenne Côte d'Ivoire) (BALANDREAU et DOMMERGUES, 1912).

b. Etudes expérimentales au laboratoire destinées à élucider le rôle des principaux facteurs régissant la fixation de N_2 dans la rhizosphère

Etant donné que la source d'énergie et d'électrons pour les microorganismes fixateurs libres de la rhizosphère est constituée essentiellement par les exsudats racinaires, on peut s'attendre a priori à ce que la fixation de N_2 dans cet habitat dépende, en partie tout au moins, de l'intensité de l'exsudation de composés carbonés utilisables par la microflore fixatrice.

(1) Facteur plante

L'expérience montre clairement que la vitesse de fixation de N_2 [C_2H_2] varie suivant l'âge de la plante, que cette vitesse soit exprimée en fonction du poids de racines sèches ou en fonction du poids de sol rhizosphérique (fig. 6). Il est certain également que, suivant l'espèce ou la variété végétale utilisée, la fixation d'azote rhizosphérique varie considérablement. C'est en particulier le cas pour les différentes variétés de riz comparées par T. YOSHIDA (communication personnelle). Il s'agit-là d'un problème particulièrement important sur le plan pratique, mais difficile à aborder sur le plan expérimental.

L'influence de la coupe des parties aériennes de la plante sur la fixation de N_2 dans la rhizosphère est spectaculaire (fig. 7) : dans les 24 h qui suivent la coupe, la fixation de N_2 est pratiquement annulée. Cette expérience montre, en outre, que les exsudats utilisables par la microflore fixatrice proviennent d'un transfert très rapide des photosynthétats vers les racines.

La plante n'agit pas seulement sur la microflore rhizosphérique par l'intermédiaire des exsudats carbonés, mais aussi par l'absorption de gaz : O_2 et vraisemblablement aussi N_2 . Certaines plantes, comme le riz, la molinie, le saule, dont la structure anatomique favorise la diffusion des gaz des parties aériennes vers les racines, sont particulièrement intéressantes à ce point de vue ; l'étude de ce problème est en cours.

(2) Facteurs climatiques : facteur lumière

La fixation de N_2 dans la rhizosphère est d'autant plus **active** que l'intensité lumineuse à laquelle la plante est soumise est importante. Lorsqu'une plante est ombragée, la fixation de N_2 dans

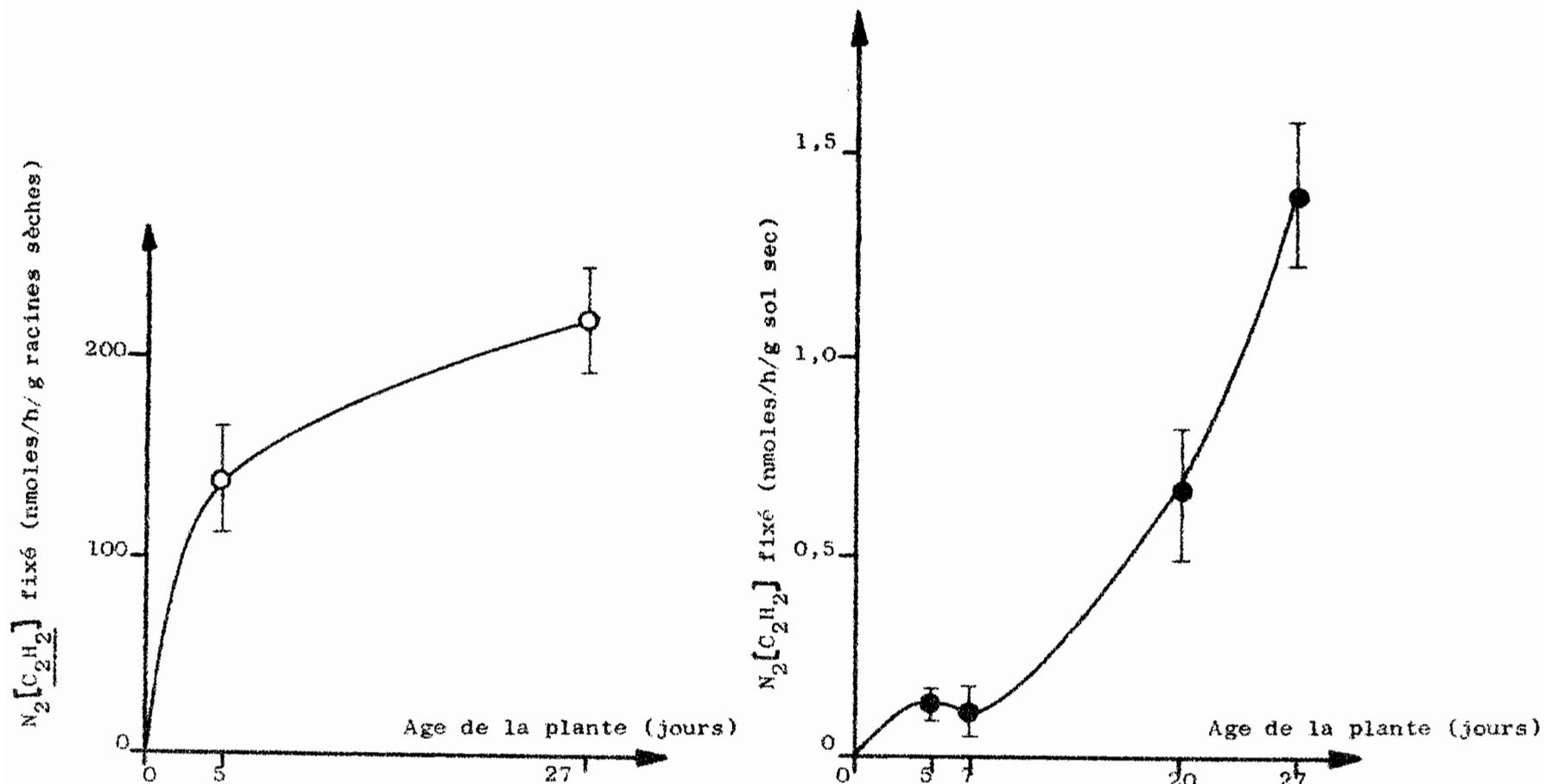


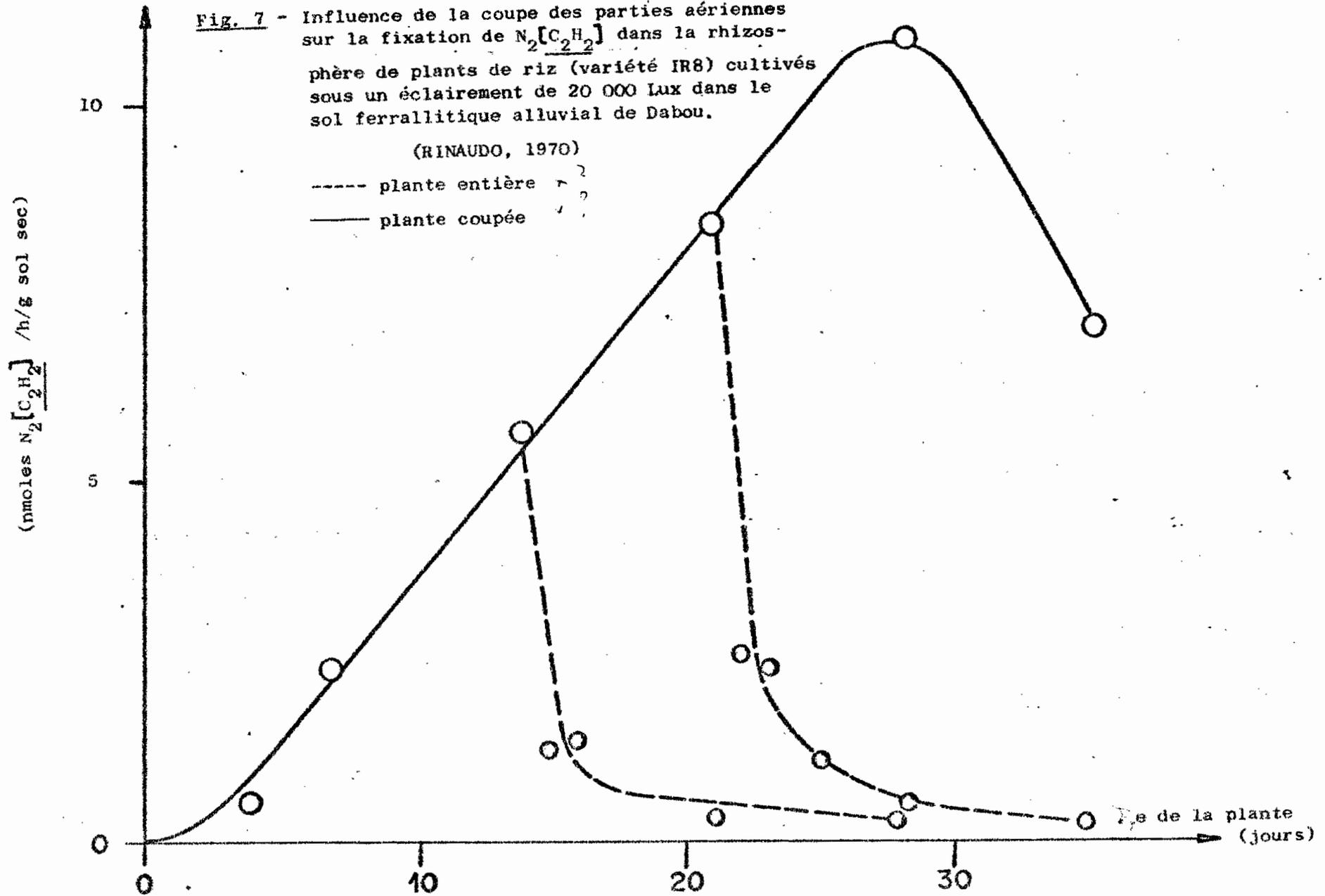
Fig. 6 - Vitesse de fixation de $N_2[C_2H_2]$ dans la rhizosphère de plants de riz (variété IR8). La vitesse est exprimée soit en fonction du poids de racines sèches, soit en fonction du poids de sol rhizosphérique. L'intensité lumineuse est de 30 000 lux ; le sol utilisé est le sol brun calcaire de Pixérécourt (Typic Eucrocept). L'erreur standard des moyennes est représentée par un segment de droite vertical.

(DOMMERMUES et al., 1972)

Fig. 7 - Influence de la coupe des parties aériennes sur la fixation de $N_2[C_2H_2]$ dans la rhizosphère de plants de riz (variété IR8) cultivés sous un éclairage de 20 000 Lux dans le sol ferrallitique alluvial de Dabou.

(RINAUDO, 1970)

----- plante entière
 ———— plante coupée



la rhizosphère tend rapidement vers zéro (fig. 8). Le facteur éclairément de la plante joue certainement un rôle essentiel in situ.

(3) Facteurs édaphiques

La fixation de N_2 dans la rhizosphère varie considérablement en fonction du type pédologique (fig. 9), les variations étant vraisemblablement dues à l'intervention de facteurs physiques (structure) ou chimiques (notamment teneur en P, en composés humiques, etc...).

Le régime hydrique du sol joue un rôle primordial dans la plupart des cas, la fixation de N_2 rhizosphérique n'apparaît pas ou est très discrète si le sol est maintenu à la capacité au champ ; par contre, l'engorgement favorise très nettement le processus (cf. par ex. HAUCKE-PACEWICZOWA et al., 1970 et fig. 10).

Remarque concernant la microflore fixatrice dans la rhizosphère :
 Cette microflore a été peu étudiée jusqu'à présent : elle semble composée essentiellement de Clostridium sp. et de Bacillus polymyxa ; mais d'autres microorganismes encore non isolés pourraient également intervenir.

2. Fixation libre de N_2 dans la phyllosphère

Dans certains écosystèmes tropicaux, la contribution de la microflore phyllosphérique à l'approvisionnement en N_2 est importante.

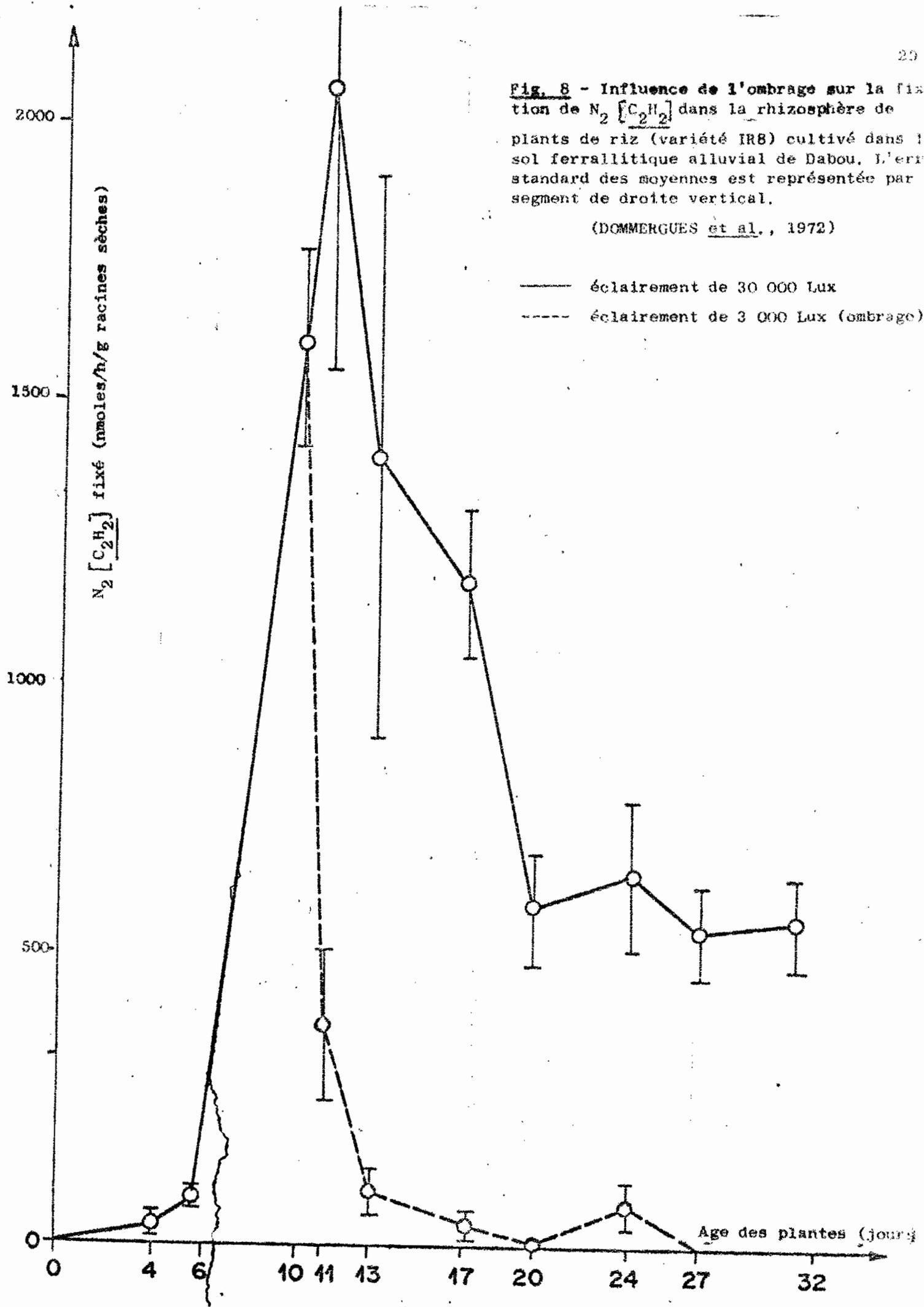
Exemple I : Dans la forêt d'El Verde (Puerto Rico) où EMIDSTEN et HARRELSON (1969) estiment que la fixation de N_2 phyllosphérique in situ atteint de 0,05 à 0,15 kg N_2 [C_2H_2] /ha/jour, soit 5 à 100 kg N_2 [C_2H_2] /ha/an si l'on évalue à 100 j/an la période de fixation effective. Ce sont essentiellement des Cyanophycées épiphytes qui interviendraient dans ce cas. Des chiffres du même ordre de grandeur ont été trouvés par JONES (1970) dans le cas de la phyllosphère d'un conifère de zone tempérée : sapin de Douglas ; mais il s'agit d'une estimation effectuée au laboratoire et son extrapolation au champ doit être faite avec prudence.

Exemple II : Prairie à Tripsacum laxum (Côte d'Ivoire), BALANDREAU et DOMMERGUES, 1972) ont confirmé l'hypothèse de RUINEN (1970) selon laquelle la microflore se développant dans les gaines de Tripsacum laxum : cette fixation in situ serait de l'ordre de 1000 nanomoles N_2 [C_2H_2] /h/touffe.

Fig. 8 - Influence de l'ombrage sur la fixation de N_2 [C_2H_2] dans la rhizosphère de plants de riz (variété IR8) cultivé dans le sol ferrallitique alluvial de Dabou. L'erreur standard des moyennes est représentée par un segment de droite vertical.

(DOMMERMUES et al., 1972)

— éclairement de 30 000 Lux
- - - éclairement de 3 000 Lux (ombrage)



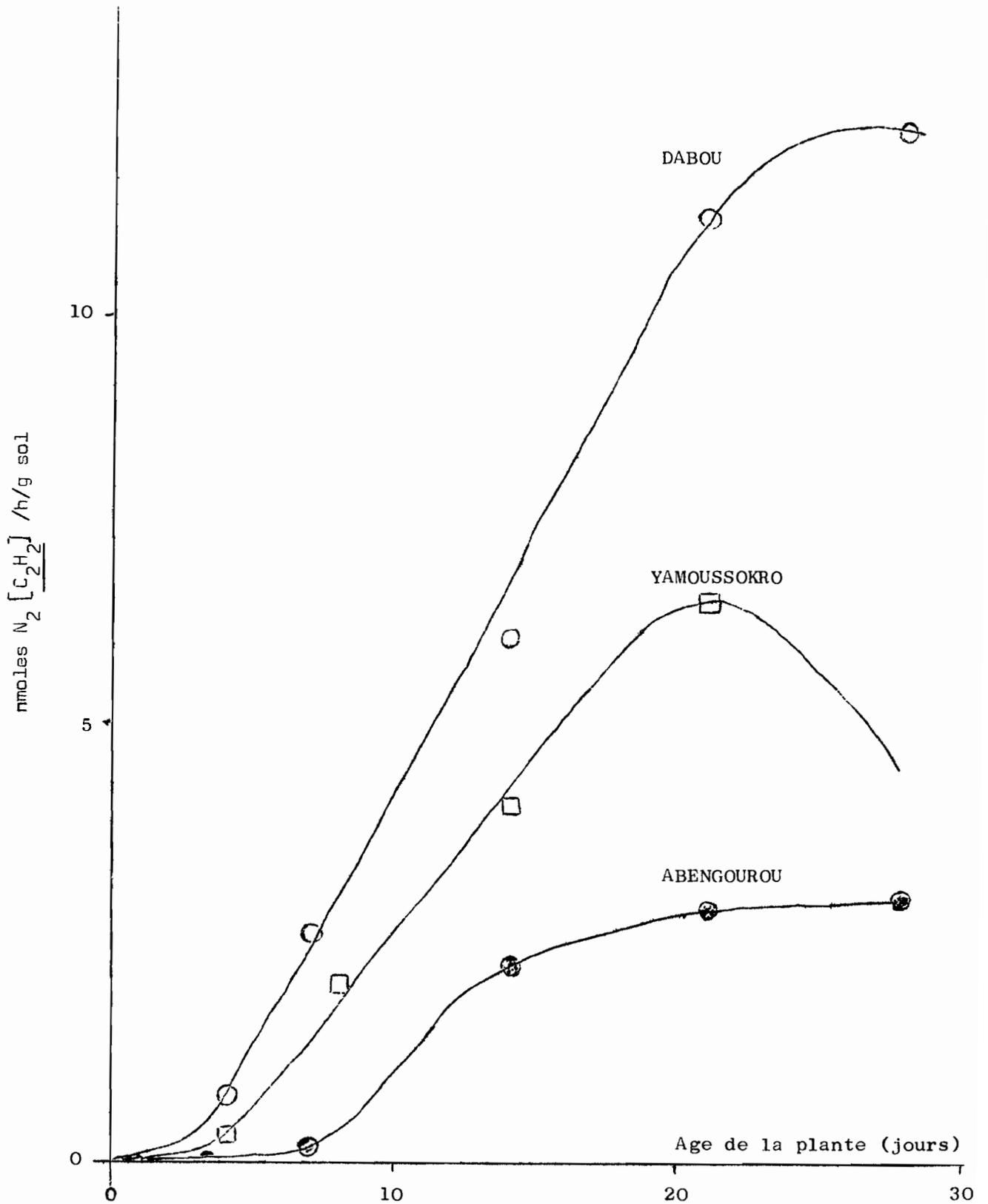


Fig. 9 - Influence du type pédologique sur la fixation de N₂ dans la rhizosphère de plants de riz (variété IR 8) cultivé sous un éclaircissement de 20 000 Lux. Les trois sols comparés sont des sols ferrallitiques alluviaux de Côte d'Ivoire.

(RINAUDO *et al.*, 1971)

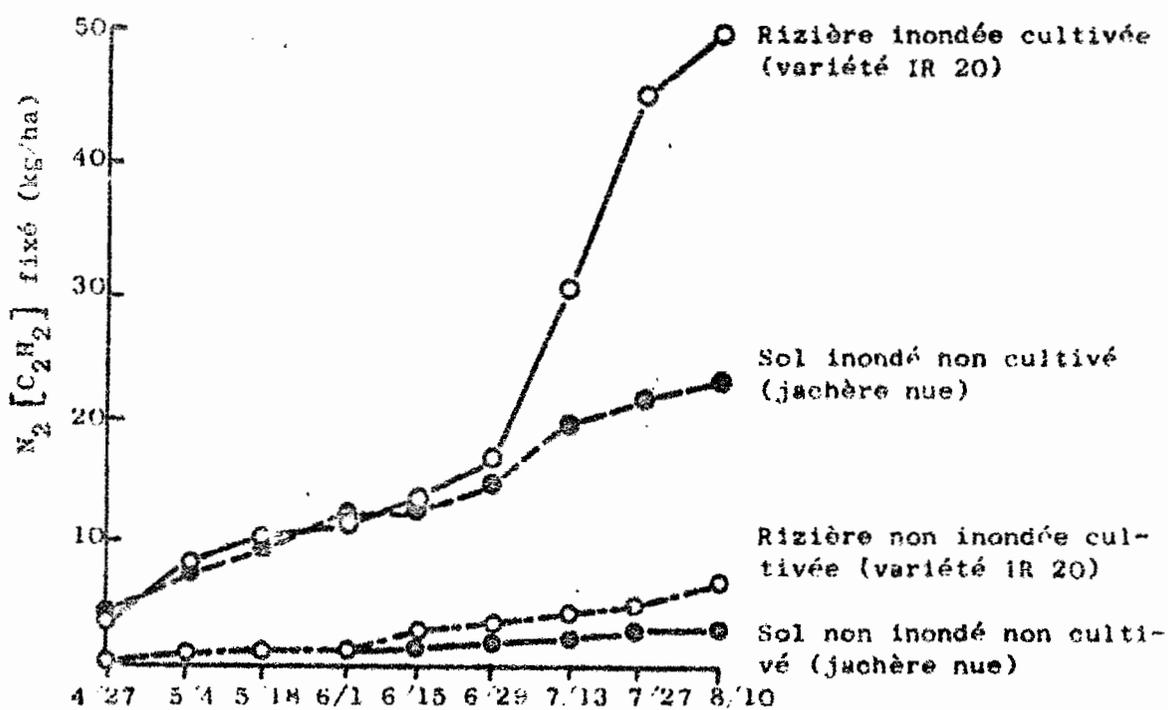


Fig. 10 - Fixation d'azote dans une rizière basse (inondée) et dans une rizière non irriguée pendant un cycle cultural.

(YOSHIDA T., 1970)

c. Comparaison des systèmes fixateurs non symbiotiques de la rhizosphère et des systèmes fixateurs symbiotiques

De cette comparaison (tabl. 5), il ressort que le système fixateur non symbiotique de la rhizosphère se classe nettement en-dessous des systèmes fixateurs symbiotiques. Mais étant donné que, pour une même surface de sol, le poids de racines graminéennes capables d'héberger une activité nitrogénasique notable serait, dans certaines conditions tout au moins (engorgement, forte luminosité notamment), beaucoup plus élevée que le poids de nodules de légumineuses, on peut penser que la fixation non symbiotique pourrait alors être du même ordre de grandeur que la fixation symbiotique.

Tabl. 5 - Vitesse de fixation de N_2 dans des systèmes non symbiotiques (rhizosphères de graminées) et dans des systèmes symbiotiques (nodules de légumineuses et de non-légumineuses) (WEINHARD et al., 1971)

	Espèce	Vitesse de fixation exprimée en nmole N_2 $[C_2H_2]$ /h./g de racines ou de nodules secs
Systèmes non-symbiotiques fixateurs d'azote	Riz	300 - 800
	<u>Eleusine coracana</u>	0 - 100
	<u>Paspalum virgatum</u>	200 - 300
	<u>Paspalum notatum</u>	0 - 40
Systèmes* symbiotiques fixateurs d'azote (souches effectives)	<u>Glycine max</u>	7 000 - 27 000
		20 000 - 27 000
	<u>Pisum sativum</u>	9 000 - 11 000
	<u>Trifolium pratense</u>	19 000 - 22 000
	<u>Medicago sativa</u>	28 000
	<u>Myrica gale</u>	8 000 - 19 000
	<u>Alnus glutinosa</u>	3 000 - 8 000

* Pour transformer les données de la littérature exprimées en fonction des poids frais de nodules en données exprimées en fonction des poids secs, on a admis que le rapport "matière sèche : matière fraîche" est en moyenne de 0,25.

3. Fixation libre de N_2 dans les litières forestières

Il s'agit-là d'un sujet fort controversé (cf. MANGENOT et DOMMERGUES, 1970) ; mais les mesures les plus récentes effectuées in situ tendent à montrer que cette fixation est en général faible aussi bien en zone tropicale qu'en zone tempérée. D'après BALANDREAU et al. (1972) dans les forêts feuillues de l'Est de la France, la vitesse de fixation serait

de l'ordre de 1 à 5 kg N_2 [C_2H_2] /ha/an. Dans la forêt ombrophile de Basse Côte d'Ivoire, elle attendrait seulement 5 kg N_2 [C_2H_2] /ha/an. Les faibles valeurs observées dans les litières forestières pourraient s'expliquer d'une part par la présence dans les litières forestières de composés inhibiteurs des microorganismes fixateurs (composés phénoliques par exemple), d'autre part par la présence de doses élevées d'azote combiné - notamment NH_3 - qui réprime la synthèse de la N_2 ase chez les microorganismes.

4. Signification agronomique de la fixation libre de N_2

Les données dont nous disposons actuellement permettent d'affirmer que la fixation libre de N_2 peut être du même ordre de grandeur que la fixation symbiotique (légumineuses) dans la plupart des rizières irriguées (fig. 10). En ce qui concerne les autres écosystèmes naturels ou artificiels (cultures), les résultats de mesures effectuées la plupart du temps au laboratoire permettent de penser que la fixation libre pourrait atteindre des valeurs de l'ordre de la dizaine ou de plusieurs dizaines de kg de N_2 /ha, en d'autres termes, revêtir une signification écologique certaine. Ces écosystèmes peuvent être classés en deux groupes :

(1) Ecosystèmes correspondant à des sols hydromorphes

Il s'agirait, en particulier, de prairies en région tropicale où la fixation de N_2 serait due aux bactéries rhizosphériques et, éventuellement, aux Cyanophycées.

(2) Ecosystèmes correspondant à des sols bien drainés

La fixation libre de N_2 pourrait être le fait des Cyanophycées épiphyllées telles que celles qui interviendraient dans des formations tropicales humides (cf. p. 28) ou de Cyanophycées vivant à la surface du sol (SHTINA *et al.*, 1968). La fixation de N_2 pourrait aussi être le fait de bactéries phyllosphériques (cf. p. 28) ou rhizosphériques. Dans ce dernier cas, seraient particulièrement favorables les prairies à Paspalum (variétés polyploïdes), les cultures de canne à sucre (DÖBEREINER *et al.*, 1972).

Remarque importante : Des mesures *in situ* seront nécessaires pour confirmer les résultats préliminaires concernant les écosystèmes (1) et (2).

5. Avenir des recherches sur la fixation libre de N_2 dans les écosystèmes

a. Intérêt économique et technique de la fixation biologique de N_2

L'apport de N_2 au sol par voie biologique - qu'il s'agisse de la fixation libre ou symbiotique - est un apport gratuit. La fixation biologique de N_2 est donc un processus particulièrement intéressant sur le plan économique. L'agronome doit chercher à en bénéficier.

au maximum ; c'est ce qu'il fait, en particulier, lorsqu'il introduit des légumineuses dans une rotation ou dans des cultures associées. Mais il est des cas où les légumineuses se développent mal, sols hydromorphes par exemple ; dans de telles conditions, il est nécessaire de rechercher l'amélioration de la fixation libre, suivant les principes que nous exposons au paragr. b ci-dessous. Sur le plan de la technique agronomique, on sait que les engrais azotés présentent deux graves inconvénients : (1) ils provoquent, lors d'applications élevées, la pollution des sols par les nitrates, qui à leur tour, par lessivage, polluent les eaux et les eutrophisent, (2) ils accélèrent la minéralisation du stock de matière organique des sols tropicaux, d'où dégradation de la structure et, à long terme, baisse de la fertilité. La fixation biologique de N_2 ne présente pas ces inconvénients.

b. Objectif des recherches appliquées concernant la fixation libre de N_2

Les recherches sur la fixation libre de N_2 dans la rhizosphère - seules recherches dont il sera question dans ce paragraphe - devraient avoir pour but d'accroître l'intensité du processus. Cet accroissement peut être, a priori, obtenu en agissant soit sur la composition de la microflore fixatrice elle-même (méthodes directes), soit sur certains facteurs régissant le processus (méthodes indirectes).

(1) Action sur la composition de la microflore fixatrice (méthodes directes)

Dans une première étape, il faut chercher à obtenir des souches de microorganismes fixateurs présentant un certain nombre de qualités parmi lesquelles figurent en première place :

- l'aptitude à coloniser la rhizosphère d'une plante donnée dans des conditions climatiques et édaphiques données ;
- l'aptitude compétitive vis-à-vis des autres microorganismes rhizosphériques ;
- l'insensibilité à l'oxygène (il faut donc faire appel à des microorganismes aérobies) ;
- la non-répression de la synthèse de la N_2 ase par l'azote combiné.

Dans une deuxième étape, il s'agira de mettre au point les techniques d'installation de cette microflore dans la rhizosphère. Ce programme est ambitieux et pose nombre de problèmes de nature théorique

qu'il importe de résoudre avant de passer à l'application proprement dite. C'est pourquoi un programme de recherches à court terme devrait plutôt être axé sur les méthodes indirectes que nous évoquons ci-après.

(2) Action sur certains facteurs régissant la fixation de N_2 dans la rhizosphère (méthodes indirectes)

Parmi les facteurs sur lesquels on peut envisager une intervention, signalons les deux suivants :

- Facteur exsudat : pour augmenter la fourniture de substrats énergétiques à la microflore hétérotrophe fixatrice libre, on envisagera la sélection d'espèces ou de variétés végétales à forte exsudation.

- Facteur engrais azoté : pour éviter la répression de la N_2 ase par l'azote combiné apporté par les engrais azotés, on testera des engrais que HARDY et al., (1972) désignent sous le nom d'engrais compatibles avec la fixation biologique de N_2 , ces engrais ne réprimant pas la synthèse de la N_2 ase (tabl. 6). On pourra également imaginer le placement localisé de l'engrais azoté dans le sol. Bien que l'application foliaire de certains composés, comme l'urée, ait un effet dépressif très marqué sur la fixation de N_2 dans la rhizosphère (tabl. 6), il convient de poursuivre les recherches fondées sur l'utilisation de cette technique.

Tabl. 6 - Influence de la nature des engrais azotés sur la fixation de $N_2[C_2H_2]$ et sur les rendements.

(d'après HARDY et al., 1972)

Forme*	Application		Fixation de $N_2[C_2H_2]$	Rendement
	Localisation**	Jours	% du témoin	
NO_3^-	S	0	43	98
NH_4^+	S	0	51	104
Urée	S	0	48	109
Protéine***	S	0	112	123
NO_3^-	S	40-50	50	106
NH_4^+	S	40-50	37	106
Urée	S	40-50	44	97
Urée	F	50-71	29	100
Urée	F	78-99	53	100

* 122 kg N/ha

** S, sol ; F, application foliaire

*** L'engrais désigné sous le nom de protéine est en fait une farine de soja.

CHAPITRE IV - METHODES D'EVALUATION DE L'ACTIVITE FIXATRICE DE N₂ DANS
LES ECOSYSTEMES SOL - PLANTE

1. Rappel succinct des méthodes employées

a) La détection de faibles augmentations de la teneur en azote de systèmes complexes (sols, écosystèmes sol - végétation, eaux) a été difficile, aussi longtemps qu'on n'a disposé que des méthodes Dumas ou Kjeldahl, bien que des modifications récentes (ROUQUEROL, 1964 ; RINAUDO, 1970) aient amélioré considérablement la précision et la sensibilité de la méthode.

b) L'utilisation de l'azote ¹⁵N₂ - isotope stable de l'azote - a accru considérablement la sensibilité des mesures (la sensibilité est multipliée par 1000 environ par rapport aux méthodes précédentes). Il s'agit, en outre, d'une méthode très sûre : en effet, l'enrichissement en ¹⁵N d'un système mis en contact avec ¹⁵N₂ (moléculaire) prouve qu'on a affaire à un système fixateur de N₂ moléculaire, alors que les méthodes Dumas ou Kjeldahl ne permettent pas de distinguer N₂ moléculaire et N ayant une autre origine que l'atmosphère (N endogène du sol, par exemple). Mais cette méthode isotopique présente un inconvénient majeur : son prix revient élevé, à la fois dans le domaine du fonctionnement et dans celui de l'équipement qu'il s'agisse de spectromètre de masse ou de spectroscopie optique d'émission.

c) Une autre méthode très sensible pour évaluer la fixation d'azote est fondée sur l'utilisation de ¹³N₂ - isotope radioactif de l'azote - Mais, en fait, cette méthode est impraticable pour deux raisons : elle nécessite la proximité d'un cyclotron ; la demi-vie de ¹³N est très courte (10 mn).

d) Une autre méthode intéressante consiste à déterminer, par spectrométrie de masse, les rapports N₂:A_r dans l'atmosphère : cette méthode a été utilisée avec succès par divers auteurs dont SISLER et ZOBELL (1951) et FAY et FOGG (1962).

e) Méthodes indirectes. Ces méthodes, fondées sur la non-spécificité de N₂ase vis-à-vis de différents substrats consistent à évaluer la vitesse de réduction des substrats de remplacement mis à la disposition des systèmes fixateurs à étudier. Le substrat de remplacement le plus utilisé actuellement est incontestablement C₂H₂, le dosage du produit de réduction (C₂H₄) étant effectué par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme.

Les avantages de la méthode de mesure de vitesse de réduction de C_2H_2 sont les suivants :

- 1) très grande sensibilité (10^2 fois la sensibilité de la méthode isotopique et 10^5 à 10^6 fois la sensibilité de la méthode Kjeldahl) ;
- 2) simplicité ;
- 3) économie ;
- 4) rapidité ;
- 5) faible bruit de fond ;
- 6) non métabolisation de C_2H_4 ;

Les principaux inconvénients sont les suivants :

1) Il s'agit d'une réaction indirecte, d'où possibilité d'une réduction de C_2H_2 par un autre catalyseur que la N_2 ase ; il y a aussi possibilité de production de C_2H_4 par certains systèmes biologiques (cf. par ex. ILAG et CURTIS, 1968). Pour pallier cet inconvénient, il suffit de faire parallèlement quelques déterminations de fixation avec $^{15}N_2$.

2) Plus grave est le problème soulevé par le facteur de conversion C_2H_2 réduit : N_2 fixé. On a vu, au chap. I que ce facteur est théoriquement de 3. Toutefois, certains systèmes fixateurs complexes sont caractérisés par un facteur de conversion anormalement élevé (PAUL *et al.*, 1971) ou bas (BERGERSEN, 1970). Ces anomalies peuvent s'expliquer par l'une et/ou l'autre des considérations suivantes :

- C_2H_2 est 65 fois plus soluble dans l'eau que N_2 (à 1 atm et à $25^\circ C$, la teneur de l'eau en C_2H_2 est de 42 mM alors que celle de N_2 est seulement de 0,64 mM) ;
- dans les cellules, l'azote s'intègre dans le pool azoté et contribue à la production de NH_3 (d'où répression possible de la synthèse de la N_2 ase) et à la synthèse des protéines, tandis que C_2H_4 n'intervient pas dans le métabolisme des cellules ;
- l'aptitude à pénétrer à travers les membranes lipoprotéiniques pourrait différer suivant les substrats ;
- les conditions dans lesquelles le test de réduction de C_2H_2 est conduit, peuvent différer des conditions dans lesquelles la fixation d'azote a lieu dans la nature.

En conséquence, il apparaît nécessaire de vérifier la valeur du rapport molaire de chaque système considéré et de se placer dans des

conditions expérimentales telles que le facteur de conversion soit voisin de la valeur théorique (3) ; il faut en particulier limiter la durée d'incubation sous C_2H_2 des systèmes fixateurs étudiés, (la durée ne doit pas dépasser 1 à 2 h).

3) Comme la méthode de réduction de C_2H_2 est une méthode d'évaluation d'une vitesse (fondée, on vient de le voir, sur des incubations de courte durée) et comme cette vitesse varie au cours du temps dans la plupart des systèmes biologiques fixateurs, il est nécessaire de répéter les mesures lorsqu'on l'on désire évaluer la fixation de N_2 au cours d'une période longue (de une journée à une saison de végétation).

2. Mesure de la vitesse de réduction de C_2H_2 en laboratoire

Le système fixateur à étudier (vase de végétation comprenant sol et plante, racine excisée et sol rhizosphérique, carotte de sol, feuille, etc...) est placé dans une enceinte étanche dans laquelle l'air est (1) soit enrichi directement en C_2H_2 (0,1 atm), (2) soit remplacé par une atmosphère artificielle aérobie (0,8 atm Ar ou He ; 0,2 atm O_2 ; 0,04 atm CO_2) ou anaérobie (1,0 atm Ar ou He) enrichie ensuite en C_2H_2 (0,1 atm). Après une incubation de 1/2 à 1 h et 2 h au maximum, on prélève un échantillon de gaz de l'atmosphère de l'enceinte et on procède au dosage, par CPG, du C_2H_4 provenant de la réduction de C_2H_2 par la N_2 ase du système, de C_2H_2 qui joue le rôle de gaz marqueur ; on peut également introduire dans l'enceinte, en même temps que C_2H_4 , un gaz marqueur tel que C_3H_8 qui est dosé à la fin de l'incubation en même temps que C_2H_4 . Les systèmes sol-plante sont incubés à la lumière, sauf si l'on veut éviter l'intervention des algues ; dans ce cas, l'incubation doit se faire à l'obscurité. Les résultats sont exprimés en fonction du poids de sol ou du poids de tissus végétaux (racines, feuilles), soit en moles de C_2H_2 réduit en C_2H_4 , soit en moles de N_2 fixé, en se fondant sur le facteur de conversion théorique de 3. La fig. 11 représente un dispositif d'incubation sous C_2H_2 pour vase de végétation.

3. Mesure de la vitesse de réduction de C_2H_2 in situ

Trois types de méthodes ont été proposées, la première apportant des perturbations importantes, la 3ème apportant le minimum de perturbation.

Première méthode : On prélève un élément de l'écosystème à étudier (par ex., racine et sol rhizosphérique, feuille...) que l'on introduit dans une enceinte étanche (par ex. flacon, seringue...) où l'on injecte C_2H_2 ; on introduit ensuite cette enceinte au site même du prélèvement.

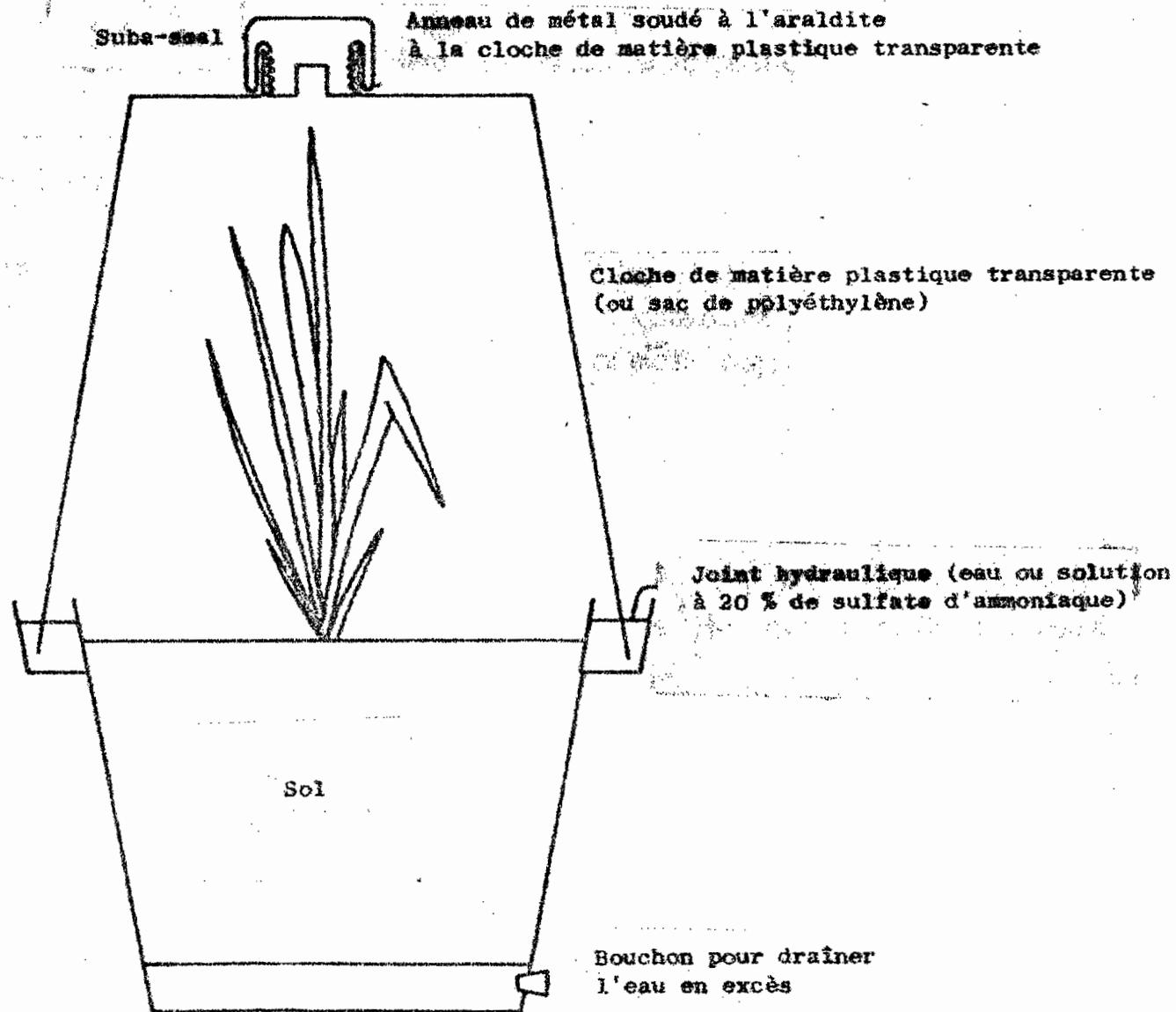


Fig. 11 - Dispositif d'incubation sous C_2H_2 pour plantes cultivées en vase de végétation.

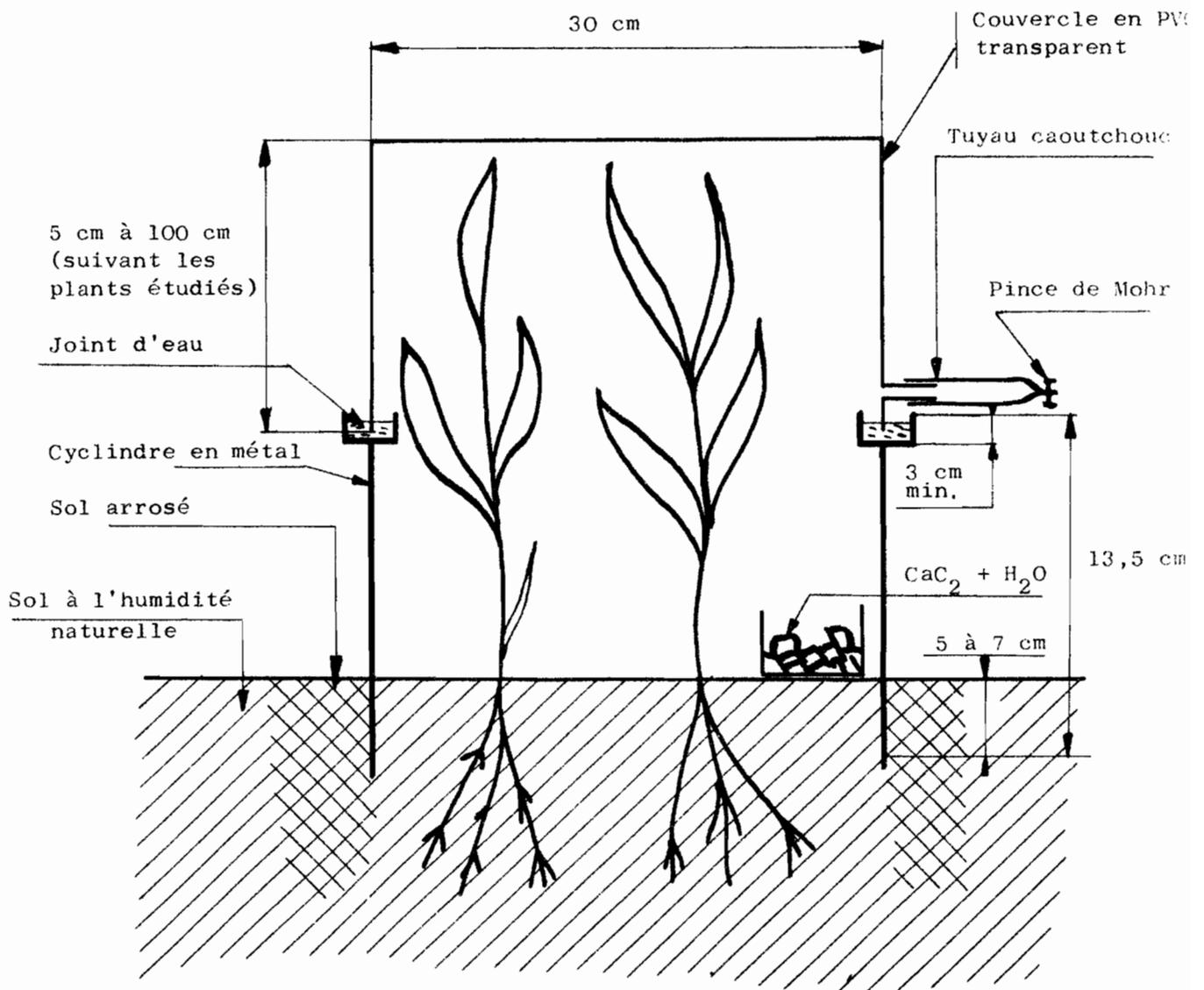
(DART et al., 1972)

et après 1/2, 1 ou 2 h, on effectue le prélèvement gazeux dans l'atmosphère de l'enceinte ^{pour le} dosage de C_2H_4 . Cette méthode a été adoptée par HARDY et al. (1968).

Deuxième méthode : On enveloppe l'élément de l'écosystème à étudier (rameau, racine dégagée du sol) d'un sac étanche de polyéthylène dans lequel on injecte C_2H_2 , après 1/2, 1 ou 2 h, on effectue le prélèvement gazeux. Cette méthode a été utilisée par EDMISTEN et HARRELSON (1969) et AKKERMANS (1971).

Troisième méthode : La plante entière in situ est coiffée d'un dispositif constitué par un cylindre enfoncé dans le sol et une cloche ou un sac étanche de polyéthylène dans lequel on injecte C_2H_2 ainsi qu'un gaz marqueur (C_3H_8). Cette méthode, mise au point par BALANDREAU (BALANDREAU et DOMMARGUES, 1971) est utilisée au Centre de Pédologie du C.N.R.S. de Nancy pour toutes les mesures de routine sur le terrain. Ce dispositif (fig. 12) comporte (1) un cylindre métallique de 30 cm de diamètre et 15 cm de hauteur dont le bord supérieur présente une gorge, (2) une cloche en chlorure de polyvinyle translucide munie d'un ajutage latéral où s'adapte un tuyau de caoutchouc (fermé par une pince de Mohr), à travers lequel on peut prélever par piqûre des échantillons de l'atmosphère interne à l'aide d'une seringue. Le cylindre métallique est enfoncé de quelques centimètres dans le sol. Le sol, autour du cylindre, est arrosé afin d'assurer une meilleure étanchéité. A l'intérieur du dispositif, une coupelle posée sur le sol reçoit 15 g de carbure de calcium et environ 10 ml d'eau ; la base de la cloche est aussitôt insérée dans la gorge remplie préalablement d'eau pour assurer l'étanchéité de l'ensemble. Il se dégage environ 5 litres d'acétylène. On ajoute alors, par piqûre à l'aide d'une seringue, 10 ml de propane pur pour servir au calcul du taux de dilution. Après 1 h, on prélève un échantillon de l'atmosphère interne puis un autre, une heure plus tard, afin de mesurer la vitesse de production de C_2H_4 . Les échantillons de gaz sont transportés au laboratoire dans des fioles du type "pénicilline" de 10 ml, vides d'air (pression résiduelle : 0,25 atm) et serties. Les gaz sont analysés par chromatographie en phase gazeuse. Nous admettons que le volume X d'éthylène formé par la N_2 ase diffuse de la même façon que le propane pour occuper, dans le sol et la cloche, le même volume total V ; le taux de dilution du propane dans ce volume est $10/V$; il est le même dans le volume v de la prise d'essai où l'analyse

FIG. 12 - Coupe schématique du dispositif de mesure in situ
de l'activité fixatrice de N_2



met en évidence les volumes a et a' d'éthylène et de propane, soit $(10/V) = (a'/v)$; de même, pour l'éthylène : $(X/V) = (a/v)$; d'où $X = 10 (a/a')$. Si l'on désire rapporter les résultats au poids de nodules ou de racines, il est évidemment nécessaire de déterrer très soigneusement ces organes après la mesure.

BIBLIOGRAPHIE

- AKKERMANS (A.D.L.) - 1971 - Nitrogen fixation and nodulation of Alnus and Hippophae under natural conditions. Thèse de Doct. Sci. Nat., Université de Leiden, 85 p.
- BALANDREAU (J.) et BURGOS-LEON (W.) - 1972 - Fixation d'azote moléculaire dans la rhizosphère de quelques plantes des régions tempérées. Bull. E.N.S.A.N., Nancy (sous presse).
- BALANDREAU (J.) et DOMMARGUES (Y.) - 1971 - Mesure in situ de l'activité nitrogénasique. C.R. Acad. Sci., Paris, 273 D, 2020-2023.
- BALANDREAU (J.) et DOMMARGUES (Y.) - 1972 - In situ evaluation of N₂ fixation. Proc. Symposium "Modern Methods in the Study of Microbial Ecology", Uppsala (sous presse).
- BALANDREAU (J.), TOUTAIN (F.), HUTEL (C.) et REVERSAT (France) - 1972 - Mesure de la fixation de l'azote moléculaire en forêt. Rev. Ecol. Biol. Sol (sous presse).
- BERGERSEN (F.J.) - 1970 - The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene-reduction assay. Aust. J. Biol. Sci., 23, 1015-1026.
- BURRIS (R.H.) - 1971 - Fixation by free-living micro-organisms : enzymology. In "The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation" (J.R. POSTGATE, ed.), 105-160.
- DART (P.J.), DAY (J.M.) et HARRIS (D.) - 1972 - Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. Technical Booklet on Grain Legume Production. F.A.O. International Atomic Energy Agency, 1-7.
- DILWORTH (M.J.) - 1970 - The acetylene reduction method for measuring biological nitrogen fixation. Rhizob. Newsletter, 15, 7-15.
- DÖBEREINER (Johanna) - 1968 - Non-symbiotic nitrogen fixation in tropical soils. Pesq. agropec. bras., 3, 1-6.
- DÖBEREINER (J.), DAY (J.M.) et DART (P.J.) - 1972 - Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the Paspalum notatum - Azotobacter paspali association. J. Gen. Microbiol. (sous presse)
- DOMMARGUES (Y.) et MANGENOT (F.) - 1970 - Ecologie microbienne du sol. Masson, Paris.
- DOMMARGUES (Y.), BALANDREAU (J.), RINAUDO (G.) et WEINHARD (Pierrette) - 1972 - Non symbiotic nitrogen fixation in the rhizospheres of rice, maize and different tropical grasses. Soil Biol. Biochem. (sous presse).
- EDMISTEN (J.A.) et HARRELSON (M.A.) - 1969 - Nitrogen fixation by epiphyllae at El Verde. Rep. PRNC-129, 131-141. (Puerto Rico Nuclear Center).

- FAY (P.) et FOGG (G.E.) - 1962 - Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. III. Growth and nitrogen fixation in Chlorogloea fritschii Mitra. Archiv. Mikrobiol., 42, 310-321.
- FOTTRELL (P.F.) - 1968 - Recent advances in biological nitrogen fixation. Sci. Prog., Oxford, 56, 541-555.
- HARDY (R.W.F.) et BURNS (R.C.) - 1968 - Biological nitrogen fixation. Annual Rev. Biochemistry, 37, 331-358.
- HARDY (R.W.F.), HOLSTEN (R.D.), JACKSON (E.K.) et BURNS (R.C.) - 1968 - The acetylene - ethylene assay for N₂ fixation : laboratory and field evaluation. Pl. Physiol., 43, 1185-1207.
- HARDY (R.W.F.) et KNIGHT (E. Jr.) - 1968 - Biochemistry and postulated mechanisms of nitrogen fixation. Progress. Phytochem., 1 (L. REINHOLD et Y. LIWSCHITZ, ed.).
- HARDY (R.W.F.), BURNS (R.C.), HEBERT (R.R.), HOLSTEN (R.D.) et JACKSON (E.K.) - 1971 - Biological nitrogen fixation : a key to world protein. Plant and Soil (volume spécial), 561-590.
- HARDY (R.W.F.), BURNS (R.C.) et HOLSTEN (R.D.) - 1972 - Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biochem. Biol. (sous presse)
- HAUKE-PACEWICZOWA (Theresa), BALANDREAU (J.) et DOMMERGUES (Y.) - 1970 - Fixation microbienne de l'azote dans un sol salin tunisien. Soil Biol. Biochem., 2, 47-53.
- ILAG (L.) et CURTIS (R.W.) - 1968 - Production of ethylene by fungi. Science, 159, 1357-1358.
- ISHIZAWA (S.), SUZUKI (T.) et ARARAGI (M.) - 1970 - Trend of free-living nitrogen fixers in paddy soil. Proc. Second Symp. N₂ Fixation and Nitrogen Cycle, (H. TAKAHASHI, ed.), 28-40.
- JACKSON (E.K.), PARSHALL (G.W.) et HARDY (R.W.F.) - 1968 - Hydrogen reactions of nitrogenase. Formation of the molecule HD by nitrogenase and by an inorganic model. J. biol. Chem., 243, 4952-4959.
- JONES (K.) - 1970 - Nitrogen fixation in the phyllosphere of the Douglas fir, Pseudotsuga douglasii. Ann. bot., 34, 239-244.
- KELLY (M.) et LANG (G.) - 1970 - Evidence from Mossbauer spectroscopy for the role of iron in nitrogen fixation. Biochim. Biophys. Acta, 223, 86-104.
- MOORE (A.W.) - 1966 - Non symbiotic nitrogen fixation in soil and soil-plant systems. Soils Fertil., 29, 113-128.
- POSTGATE (J.) - 1971a - Fixation by free-living microbes : physiology. In "The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation" (J.R. POSTGATE, ed.), 161-190.

- POSTGATE (J.) - 1971b- Relevant aspects of the physiological chemistry of nitrogen fixation. In "Microbes and Biological Productivity" (D.E. HUGHES, A.H. ROSE, ed.), 21 st Symp. Soc. gen. Microbiol., Cambridge Univ. Press, 287-307.
- PAUL (E.A.), MYERS (R.J.K.) et RICE (W.A.) - 1971 - Nitrogen fixation in grassland and associated cultivated ecosystems. Plant and Soil, (vol. sp.) 495-507.
- RINAUDO (G.) - 1970 - Fixation biologique de l'azote dans trois types de sols de rizières de Côte d'Ivoire. Thèse Doct. Ing., Fac. Sci., Montpellier.
- RINAUDO (G.), BALANDREAU (J.) et DOMMERGUES (Y.) - 1971 - Algal and bacterial non-symbiotic fixation in paddy soils. Plant and Soil (volume spécial), 471-479.
- ROUQUEROL (Thérèse) - 1964 - Sur l'activité des fixateurs d'azote dans les sols du delta de Camargue. Application d'une technique de mesure de capacité potentielle de fixation. Ann. agron., 15, 599-617.
- RUBENCHIK (L.I.) - 1960 - Azotobacter and its use in agriculture. (Traduction en anglais 1963, Israel programm for scientific translations).
- RUINEN (J.) - 1970 - The phyllosphere. V. The grass sheath, a habitat for nitrogen fixing micro-organisms. Plant and Soil, 33, 661-671.
- SENEZ (J.C.) - 1968 - Microbiologie générale. Doin, Paris.
- SHTINA (E.A.), PANKRATOVA (E.M.) et PERMINOVA (G.N.) - 1968 - The distribution and the role of nitrogen-fixing blue-green algae in the soils of the temperate zone of the U.S.S.R. 9ème Congrès Internat. Science du Sol, Adélaïde, 2, 151-158.
- SISLER (F.D.) et ZOBELL (C.E.) - 1951 - Nitrogen fixation by sulfate-reducing bacteria indicated by nitrogen : argon, ratios. Science, 113, 511-512.
- WEINHARD (Pierrette), BALANDREAU (J.), RINAUDO (G.) et DOMMERGUES (Y.) - 1971 - Fixation non symbiotique de l'azote dans la rhizosphère de quelques non-légumineuses tropicales. Rev. Ecol. Biol. Sol, 3, 367-373.
- YOSHIDA (T.) - 1970 - Annual Report. The International Rice Research Institute, Manila.
- YOSHIDA (T.) et ANCAJAS (R.R.) - 1971 - Nitrogen fixation by bacteria in the root zone of rice. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 156-157.

E R R A T U M

- P. 5 - Tableau 2, après "sensible au froid", ajouter : "(problème controversé)".
- P. 9 - 2ème ligne, supprimer "biologique"
- P. 12 - 3ème ligne du texte, supprimer "ce qui s'explique.... substrat".
- P. 25 - 20ème ligne, ajouter "et pour les variétés de Paspalum notatum étudiées par DÖBEREINER et al. (1972)".
- P. 28 - 15ème ligne, après "essentiellement", ajouter : "Azotobacter (cf. par ex. DÖBEREINER et al., 1972)".
- P. 32 - 7ème ligne, reporter à la fin de la phrase : "dans certaines conditions tout au moins (engorgement, forte luminosité notamment)".
- P. 33 - 10ème ligne, remplacer "que la fixation..... (fig. 10)" par "que la fixation libre de N₂ observée dans la plupart des rizières irriguées (fig. 10) peut être du même ordre de grandeur que la fixation symbiotique de N₂ observée chez les légumineuses".
- 16ème - 17ème lignes, remplacer "certaines ... deux groupes" par "dans certains cas favorables que l'on peut classer en deux groupes :".
- P. 38 - 12ème ligne, remplacer le paragr. 1 par le suivant : "il y a possibilité de production de C₂H₄ par certains systèmes biologiques (cf. par ex. ILAG et CURTIS, 1968). Pour pallier cet inconvénient, il suffit de faire des témoins sous C₂H₂".
- Dernière ligne, après "considéré", ajouter "en faisant appel à ¹⁵N".
- P. 39 - 20ème ligne, remplacer la virgule en fin de ligne par "et".
-