

Diminution des fontes de semis dues à la sulfato-réduction, par un prétraitement des graines de riz avec des Cyanophycées

Vincent JACQ et Pierre ROGER
O.R.S.T.O.M., B.P. 1386, Dakar, Sénégal

RÉSUMÉ

Une prégermination des graines de riz dans une culture de Cyanophycées permet de diminuer de façon importante les fontes de semis dues à la sulfato-réduction, à condition d'effectuer un semis peu profond dans un sol non submergé. D'une part les produits d'excrétion des Cyanophycées accélèrent la germination et le développement des plantules qui résistent mieux à la sulfato-réduction, d'autre part le développement des Cyanophycées provoque une oxygénation du milieu qui diminue ou retarde l'accumulation de sulfures toxiques.

MOTS CLÉS : Riz — Sulfato-réduction — Cyanophycées — Fontes de semis.

ABSTRACT

Losses, during rice germination, caused by sulphate reducing processes can be reduced significantly by presoaking the seeds in a blue green alga (B.G.A.) culture.

There are two reasons for this : germination rate and plants growth are enhanced by the exudates of B.G.A. and the plants become resistant to sulphide earlier ; oxygen produced by B.G.A. lowers sulphate reducing

Algae — disease.

1. INTRODUCTION

Les sols submergés constituent fréquemment des sulfato-réductrices. Les exigences différentes de ces deux groupes de microorganismes vis-à-vis de la lumière et de l'oxygène leur interdisent un microhabitat commun ; toutefois on constate fréquemment une juxtaposition des zones dans lesquelles ils se développent.

En rizière, la sulfato-réduction peut être intense dans les premiers centimètres du sol alors que l'inter-

face sol-eau et l'eau de submersion constituent des zones habituellement colonisées par les Cyanophycées. L'existence d'actions antagonistes entre ces deux types de microorganismes peut donc être envisagée au niveau de la zone de contact des deux microhabitats.

Le présent travail se propose de mettre en évidence un cas particulier de cette interaction, à savoir : l'effet d'une inoculation algale sur les fontes de semis consécutives à la sulfato-réduction autour de la graine en germination et des racines du jeune plant de riz.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Graines de riz IR 8 décontaminées par trempage pendant vingt minutes dans une solution d'eau oxygénée à 5 volumes.

courte prégermination : seules sont utilisées les semences présentant un début de gonflement au niveau de la gemmule.

2.1.2. Une souche unialgale d'*Anabaena* sp. isolée d'un sol de rizière de Casamance (Sénégal) cette souche

est une culture de vingt et un jours.

2.1.3. Une souche de *Desulfovibrio vulgaris* : Var. Hildenborough (NCIR 8303).

Cette souche est cultivée sur milieu de Starkey et dénombrée suivant la méthode de Abd-el-Malek et Rizk (1958).

L'inoculum utilisé pour les expériences est constitué

par une culture âgée de moins de 7 jours dont la densité en germes est connue *a posteriori*.

2.2. Sols

Deux sols de rizière de Casamance ont été utilisés; leurs caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ont été décrites par ailleurs (Garcia et coll, 1974; Bignona n° 2 et Djibélor n° 11). Des études concernant les risques élevés de sulfato-réduction dans ces sols ainsi que la composition de leur flore algale ont été publiées par ailleurs (respectivement Jacq, 1972; Roger et Reynaud, 1977).

Il a été vérifié que la flore sulfato-réductrice présente dans ces sols est constituée par *Desulfovibrio sp.*

2.3. Dispositifs expérimentaux

2.3.1. VASES DE VÉGÉTATION

Ils sont constitués par des colonnes parallélépipédiques en chlorure de polyvinyle transparent, de 50 × 15 × 200 mm (Dommergues *et al.*, 1969) contenant environ 150 grammes de sol. Les boîtes sont immergées dans de l'eau stérile, en béciers de 4 litres, pour provoquer l'engorgement nécessaire au développement des bactéries sulfato-réductrices; la hauteur de la couche d'eau superficielle où se développent les Cyanophycées est maintenue constante. Chaque colonne de sol reçoit 6 graines prégermées.

2.3.2. TUBES DE CULTURE HYDROPONIQUE

Ce sont des tubes Pyrex de 500 mm de haut et de 50 mm de diamètre (Jacq, 1970). Quatre pointes de Vigreux délimitent un compartiment inférieur contenant 125 ml de milieu dont la composition est donnée en annexe.

Inoculations et prélèvements sont réalisés stérilement, à la seringue, à travers deux ajutages latéraux fermés par des bouchons en « Versilic ». Le compartiment inférieur est protégé de la lumière par une feuille d'aluminium.

Huit graines prégermées sont déposées stérilement sur un coussin de laine de verre soutenu par les pointes de Vigreux et baignant dans le milieu.

2.3.3. DISPOSITIF DE GERMINATION

Le dispositif, destiné à étudier l'effet des Cyanophycées sur la germination du riz, est constitué par un bécier contenant 300 ml de milieu, sur lequel flotte

un tamis circulaire de 50 mm entouré d'un anneau de polystyrène expansé. Les graines, déposées sur le tamis restent ainsi en contact permanent avec le milieu.

Germination et croissance du riz s'effectuent, quel que soit le dispositif utilisé, dans une serre où la température varie entre 18 et 30 °C et où l'intensité lumineuse maximale est de 15 000 lux.

2.4. Analyses physico chimiques

L'Hydrogène sulfuré et les sulfures, sont dosés suivant la méthode de Chaudhry et Cornfield (1966) en distinguant deux cas :

— sulfures totaux (dans les sols) : le dosage est précédé d'une attaque de l'échantillon par HCl 4N à 60 °C qui déplace les ions S = de FeS;

— sulfures dissous (dans les milieux de culture hydroponique) : le dosage est fait à froid sans attaque préalable.

Les pressions partielles d'oxygène dissous, exprimées en mm de mercure sont mesurées au microanalyseur « BMS 3 Radiometer » à 30 °C, après stabilisation d'une demi-heure. A cette température la pression saturante d'oxygène exprimée en mm de mercure est de 152,4; exprimée en ppm elle est de 7,7.

3. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX ET RÉSULTATS

Des essais sur sol ont permis d'étudier l'influence globale des Cyanophycées sur la sulfato-réduction ayant lieu dans la rhizosphère et la spermosphère (respectivement autour des racines et autour des graines en cours de germination).

Ces essais se faisant dans un ensemble complexe comprenant les microorganismes inoculés et l'ensemble de la microflore tellurique, nous avons cherché à préciser les résultats obtenus par des expériences en modèles simplifiés (cultures hydroponiques).

3.1. Expériences sur sol

3.1.1. INOCULATION DU SOL EN BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES ET CYANOBACTÉRIES

Protocole

Les traitements correspondent aux 16 combinaisons des facteurs suivants :

sol : a. Djibélor; b. Bignona;

semis : a. en surface (0-2 cm); b. profondeur (4-5 cm);
régime hydrique : a. sol engorgé : l'épaisseur de la lame d'eau au-dessus du sol ne dépasse pas 0,5 cm;
 b. sol submergé sous 5 cm d'eau.

inoculation : a. sol non inoculé (témoin); b. sol inoculé en bactéries sulfato-réductrices, par introduction à 5 cm de profondeur, dans chaque colonne, de 10 ml d'une culture de *D. vulgaris* contenant $4,8 \times 10^5$ germes par ml; c. sol inoculé en Cyanophycées par apport de 10 ml de culture à la surface du sol; d. sol inoculé à la fois en bactéries sulfato-réductrices et en Cyanophycées.

Sept jours après le semis on dénombre les plants développés.

Résultats (tabl. I)

On constate que le pourcentage de germination varie suivant :

- Le sol considéré;
- La profondeur du semis : la survie des graines semées entre 4 et 5 cm est très faible ($\leq 2,5\%$);
- Le régime hydrique : la survie est meilleure quand le sol est simplement engorgé mais non submergé.

Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus (Jacq, 1972).

Les inoculations réalisées influent sur le taux de germination qui croit avec l'ordre suivant : inoculation avec des bactéries sulfato-réductrices < inoculation double < témoin < inoculation avec des Cyanophycées.

Les Cyanophycées manifestent une action positive qui est cependant faible par rapport à celle des facteurs cultureux. Nous avons donc cherché à augmenter leur action en les concentrant au voisinage direct de la graine.

3.1.2. INFLUENCE D'UNE PRÉGERMINATION DES GRAINES EN PRÉSENCE DE CYANOPHYCÉES

Protocole

Deux séries de graines ont été mises à prégermer pendant 48 h sur milieu gélosé, la première série étant recouverte de 3 à 4 mm d'une culture très dense de Cyanophycées, la seconde étant recouverte du même volume d'eau stérile. Quatre vingt seize graines de chaque série ont été plantées à 2 cm de profondeur dans seize colonnes de sol de Djibélor.

Quatre jours avant le semis, le sol avait été progressivement réhumecté; après le semis il est engorgé mais non submergé. Les conditions sont celles qui dans l'expérience précédente limitaient le plus les pertes par

TABLEAU I
 POURCENTAGE DE GRAINES GERMEES SEPT JOURS APRES LE SEMIS,
 EN FONCTION DES FACTEURS CULTURAUX ET MICROBIOLOGIQUES.

Profondeur du semis	Régime hydrique	Sol	INOCULUM			
			BSR	BSR + Cyanophycées	Témoin	Cyanophycées
0 - 2 cm	Engorgement (a)	Djibélor	11,46	14,58	14,58	16,66
		Bignona	17,50	13,33	17,50	18,33
	Submersion sous 5 cm eau (b)	Djibélor	0,00	6,25	6,25	7,33
		Bignona	14,16	15,83	15,00	17,50
- 4 à - 5 cm	Engorgement (c)	Djibélor	0,00	0,00	0,00	1,05
		Bignona	0,83	0,00	2,50	2,50
	Submersion sous 5 cm eau (d)	Djibélor	0,00	0,00	0,00	1,05
		Bignona	0,00	0,00	0,00	0,83
Valeurs absolues			43,95	49,99	55,83	65,25
Valeurs relatives en % du témoin non inoculé			79,36	90,27	100,00	117,82

sulfato-réduction, qui restaient cependant élevées (cf. tabl. I, conditions a).

Sept jours après le semis nous avons dénombré les plants développés.

Résultats

Les graines prétraitées donnent des plantules qui apparaissent à la surface du sol en moyenne deux jours plus tôt que les graines témoin. La survie dans le cas des témoins est de 27 % des graines semées; elle est de 72 % dans le cas des graines prétraitées soit un gain de 167 %.

Le taux de survie supérieur des graines prétraitées peut s'expliquer, *pro parte*, par un développement accéléré de la plantule. Celle-ci, plus vigoureuse et exsudant plus rapidement de l'oxygène, résiste mieux à la sulfato-réduction. Nous avons montré que la sulfato-réduction est d'autant plus marquée que la plante est jeune (Jacq, 1977).

Les expériences sur sol montrent que l'inoculation algale est pratiquement sans effet si les conditions culturales sont défavorables.

Par contre dans le cas d'un semis à faible profondeur, en sol non engorgé, on peut obtenir une diminution importante des fontes de semis imputables à la sulfato-réduction. Le prétrempage des graines dans une culture de Cyanophycées qui cumule les effets d'une préger-

en pourcentage des graines dans le témoin au 14^e jour. Les résultats (tabl. II) montrent que la vitesse de germination est nettement accrue en présence de Cyanophycées (gain moyen supérieur à un jour).

b. Influence sur la croissance

Quatre lots de soixante graines sont mis à germer sur tamis flottant; les quatre traitements différent par la composition du milieu de germination :

- témoin I : 300 ml d'eau stérile;
- témoin II : 240 ml d'eau stérile plus 60 ml de milieu BG 11, stérile, sans azote;
- traitement Cyanophycées : 240 ml d'eau stérile plus 60 ml de culture d'*Anabaena*;
- traitement filtrat : 240 ml d'eau stérile plus 60 ml d'un filtrat obtenu par passage de la culture précédente sur filtre « Millipore » 0,45 μ .

Au quatorzième jour de croissance nous avons mesuré la taille moyenne des plantules et la longueur moyenne de la racine principale. Les résultats sont rapportés au tableau III.

La différence entre les témoins I et II n'est pas significative. Par contre l'action des Cyanophycées et du filtrat de culture est particulièrement nette. La faible différence observée entre les effets de la culture et du filtrat indique que les substances actives sont excrétées. Les résultats confirment ceux obtenus sur sol, à savoir

3.2. Expérience en milieu hydroponique

3.2.1. EFFET DES CYANOPHYCÉES SUR LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DU RIZ

a. Influence sur la vitesse de germination

Deux séries de deux cent graines sont mises à germer sur sable humidifié, soit avec de l'eau stérile soit avec le même volume d'une culture d'*Anabaena* sp. (0,12 mg d'algues, poids sec/graine). Le taux de germination est mesuré quotidiennement; il est exprimé

3.2.2. EFFETS D'UNE INOCULATION DOUBLE EN BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES ET EN CYANOPHYCÉES

a. Etude de la cinétique du phénomène

Protocole

Deux traitements à quatre répétitions sont réalisés :
— témoin : tubes inoculés par *Desulfovibrio vulgaris*. Après inoculation la densité des germes dans le milieu est de $2,9 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$;

— essai : inoculation par *Desulfovibrio* v. identique à celle du témoin et addition de 5 ml de culture dense d'*Anabaena* (12 mg poids sec).

TABLEAU II
INFLUENCE DES CYANOPHYCÉES SUR LA VITESSE DE GERMINATION DU RIZ

Nombre de jours après le semis		7	8	9	11	12	13	14
Pourcentage de graines germées (en % du témoin)	témoin	13,7	52,0	76,7	94,5	94,5	100	100
	inoculé	57,5	79,5	96,0	105,5	105,5	105,5	105,5

TABLEAU III
INFLUENCE DES CYANOPHYCEES SUR LE DEVELOPPEMENT DES PLANTULES DE RIZ

Traitement	Témoin I	Témoin II	Cyano.	Filtrat
Hauteur moyenné des plantules (en mm)	50,6	51,8	84,1	79,2
Longueur moyenne de la racine principale (en mm)	101,0	114,4	138,0	149,0

L'évolution de la concentration en sulfures et du nombre de Bactéries sulfato-réductrices est suivie pendant treize jours.

Résultats (fig. 1)

En l'absence de Cyanophycées (C_0B_5) la population sulfato-réductrice augmente régulièrement à partir du deuxième jour suivant l'inoculation; la diminution initiale est vraisemblablement due à la teneur élevée en oxygène du milieu dans lequel est faite l'inoculation.

En présence de Cyanophycées (C_5B_5) la population sulfato-réductrice diminue très nettement pendant les quatre premiers jours et ne retrouve son niveau initial que vers le dixième jour; les courbes d'évolution de la densité microbienne deviennent alors sensiblement parallèles avec un décalage d'environ une semaine.

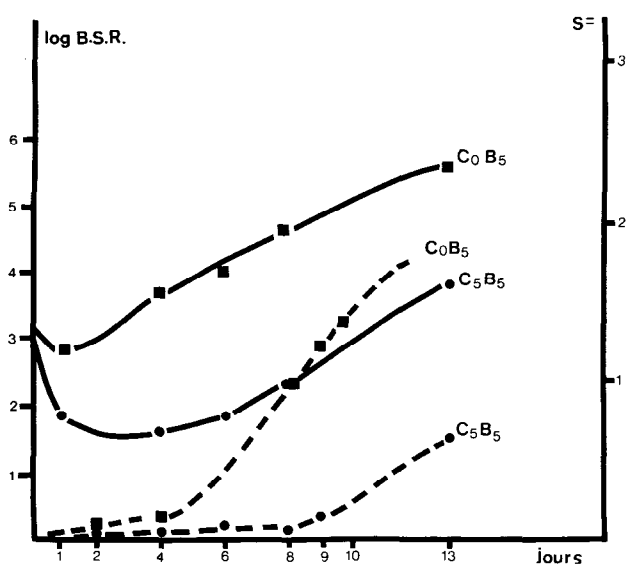


Fig. 1. — Evolution de la population sulfato-réductrice (trait plein) et de la concentration des sulfures dissous (pointillés) dans une culture hydroponique de riz inoculée en bactéries sulfato-réductrices seules (C_0B_5) ou en bactéries sulfato-réductrices et en Cyanophycées (C_5B_5).

TABLEAU IV
DESIGNATION DES TRAITEMENTS DE LA SECONDE EXPERIENCE EN MILIEU HYDROPONIQUE

Cyanophycées mg poids sec par tube		volume de l'inoculum en ml.		Nombre BSR par ml après inoculation			
				0	1,2 ·10 ³	2,9 ·10 ³	5,7 ·10 ³
CODE		0	2	5	10		
0	0	C ₀	C ₀ B ₀	C ₀ B ₂	C ₀ B ₅	C ₀ B ₁₀	
2,4	1	C ₁	C ₁ B ₀	C ₁ B ₂	-	-	
4,8	2	C ₂	C ₂ B ₀	-	C ₂ B ₅	C ₂ B ₁₀	
12,0	5	C ₅	C ₅ B ₀	-	C ₅ B ₅	C ₅ B ₁₀	

Les mesures de sulfures dissous confirment ce résultat : en présence de Cyanophycées l'accumulation de sulfures commence avec un décalage d'environ 7 jours par rapport au témoin.

b. Influence de l'importance relative des inoculums

Protocole

Quatre volumes d'inoculum ont été utilisés pour chaque organisme. Parmi les seize combinaisons possibles, douze traitements à quatre répétitions ont été choisis comme indiqué au tabl. II.

Les inoculations en Cyanophycées ont été faites le lendemain du jour du semis, au moment où apparaît la racine principale. Les inoculations en bactéries sul-

fato-réductrices ont été faites deux jours plus tard (Temps zéro de l'expérience).

Le dosage des sulfures et la mesure des pressions partielles en oxygène dans le milieu ont été effectués au septième jour de l'expérience et le dénombrement des plants sains au quatorzième jour.

Résultats (tabl. V)

Dans les tubes inoculés uniquement par des bactéries sulfato-réductrices (série C₀), les populations et les teneurs en sulfures dissous sont d'autant plus élevées que l'inoculum est important. Inversement les teneurs en oxygène dissous diminuent lorsque le volume de l'inoculum augmente, par suite, vraisemblablement, d'une consommation par oxydation spontanée des sulfures.

Dans les tubes inoculés uniquement par des Cyanophycées (série B₀) la concentration en oxygène dissous est supérieure à celle du témoin C₀B₀.

TABLEAU V

A : NOMBRE DE BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES PAR ML DE MILIEU AU 7^e JOUR DE L'EXPERIENCE. B : P.P.M. DE SULFURES DANS LE MILIEU AU 7^e JOUR DE L'EXPERIENCE. C : PRESSIONS PARTIELLES D'OXYGENE DANS LE MILIEU AU 7^e JOUR DE L'EXPERIENCE (MM DE MERCURE). D : NOMBRE DE PLANTS SAINS AU 14^e JOUR DE L'EXPERIENCE. — = NON DETERMINE

	B ₀	B ₂	B ₅	B ₁₀
C ₀	—	2.10 ⁴	4.10 ⁴	6.10 ⁶
C ₁	—	1.10 ³	—	—
C ₂	—	—	9.10 ³	2.10 ⁶
C ₅	—	—	3.10 ²	3.10 ⁶

A

	B ₀	B ₂	B ₅	B ₁₀
C ₀	—	0.44	0.89	1.37
C ₁	—	0.06	—	—
C ₂	—	—	0.42	0.51
C ₅	—	—	0.28	0.99

B

	B ₀	B ₂	B ₅	B ₁₀
C ₀	157	118	57	30
C ₁	162	140	—	—
C ₂	188	—	78	48
C ₅	179	—	75	57

C

	B ₀	B ₂	B ₅	B ₁₀
C ₀	21	20	21	17
C ₁	22	21	—	—
C ₂	21	—	22	21
C ₅	22	—	23	20

D

Dans les tubes à double inoculation, la série C₀ étant prise comme référence, on constate que la présence de Cyanophycées se traduit par une diminution du nombre de bactéries sulfato-réductrices et de la teneur du milieu en sulfures, ainsi que par une augmentation de l'oxygène dissous.

Il semble donc que les Cyanophycées contrarient les effets des bactéries sulfato-réductrices sans toutefois les annuler. Il en résulte un effet bénéfique sur les plantes.

Dans tous les cas l'inoculation en Cyanophycées se traduit par un nombre de plants sains supérieur à celui du traitement C₀ correspondant et l'on remarque notamment que l'action néfaste des bactéries sulfato-réductrices observée dans le cas de l'inoculum le plus élevé (C₀B₁₀) est annulée par la présence de Cyanophycées (C₂B₁₀ et C₅B₁₀).

L'action des Cyanophycées peut être mise en relation avec la production de l'oxygène qui, d'une part, limite la croissance des BSR et, d'autre part, peut oxyder les sulfures dissous. Cette action concourt à retarder l'accumulation des sulfures toxiques dans le milieu; comme la résistance des plantules augmente avec l'âge, il en résulte une diminution des fontes de semis.

4. CONCLUSION

Les expériences sur sol ont montré que le semis de graines de riz prégermées dans une culture de Cyanophycées diminue notablement les pertes imputables à la sulfato-réduction.

Toutefois cette action ne se manifeste que pour des conditions culturales optimales, à savoir: un semis peu profond et un sol non submergé.

Des expériences en culture hydroponique ont permis de préciser les modalités d'action de cette technique qui cumule les avantages d'une prégermination en présence de produits accélérant le développement de la plantule et d'une inoculation du sol en Cyanophycées.

La vitesse de développement accrue se traduit par une augmentation plus rapide de la résistance de la plantule à la sulfato-réduction.

Parallèlement le développement des Cyanophycées provoque une oxygénation du milieu qui retarde les phénomènes de sulfato-réduction.

Sur le plan pratique, le prétrempage des graines dans une culture de Cyanophycées est facilement réalisable. La préparation d'un volume de Cyanophycées suffisant pour permettre le trempage des sacs peut se faire dans un angle de la rizière suivant la technique précé-

nisée par Venkataraman (1972). Les semences seront alors traitées suivant la technique du semis en « pré-germé » qui consiste à tremper les sacs de semences dans la rizière puis à les replacer pendant 24 à 48 h hors de l'eau avant le semis.

REMERCIEMENTS

Les Auteurs expriment leurs remerciement au Dr M. Moutaret pour les conseils qu'il leur a prodigués.

Manuscrit reçu au Service des Publication, 12 juillet 1977.

BIBLIOGRAPHIE

- ABD-EL-MALEK (Y.), RIZK (S. C.), 1958. — Counting of sulphate reducing bacteria in mixed bacterial populations. *Nature* (London), 182 : 538-539.
- ALLEN (M. M.), STANIER (R. Y.), 1968. — Selective isolation of blue-green Algae from water and soil. *J. Gen. Microbiol.*, 51 : 203-209.
- CHAUDHRY (I.A.), CORNFIELD (A.H.), 1966. — Determination of sulphide in waterlogged soils. *Pl. Soil.*, 25 : 474-479.
- DOMMERCUES (Y.), JACQ (V.), BECK (G.), 1969. — Influence de l'engorgement sur la sulfato-réduction rhizosphérique dans un sol salin. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 268 : 605-608.
- GARCIA (J. L.), RAIMBAULT (M.), JACQ (V.), RINAUDO (G.), ROGER (P.), 1973. — Activités microbiennes dans les sols de rizière du Sénégal; relations avec les caractéristiques physico-chimiques et influence de la rhizosphère. *Rev. Ecol. Biol. du Sol*, 11 : 169-185.
- JACQ (V.), 1970. — Recherches préliminaires concernant la sulfato-réduction rhizosphérique et la sulfato-réduction spermosphérique. Thèse Doct. Spe. Fac. Sci. Nancy (France) : 137 p.
- JACQ (V. A.), 1972. — Biological sulphate-reduction in the spermosphere and the rhizosphere of rice in some acid sulphate soils of Senegal. *Proc. Int. Symp. Acid Sulphate Soils. Wageningen. 1972-8* : 82-96.

JACQ (V.), 1977. — Sensibilité du riz aux sulfures d'origine microbienne. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, vol. XII, n° 2 : 97-99.

ROGER (P. A.), REYNAUD (P. A.), 1977. — La biomasse algale dans les rizières du Sénégal; importance relative des Cyanophycées fixatrices de N₂. *Rev. Ecol. Biol. du Sol*, sous presse.

VENKATARAMAN (G. S.), 1972. — Algal biofertilizers and rice cultivation, 71 p. Today and Tomorrow's printers and Publishers. 22 B15 original Road, Karol Bagh, New Delhi-5.

ANNEXE

Milieu Jacquinet pour riz

KNO ₃	101 mg
KH ₂ PO ₄	291 mg
K ₂ HPO ₄	217 mg
NaCl	14 mg
CaCl ₂	129 mg
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	574 mg
Ca(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	348 mg
Mg(NO ₃) ₂ , 6 H ₂ O	254 mg
NH ₄ H ₂ PO ₄	80 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	177 mg
NH ₄ Cl	35 mg
Solution d'oligo-éléments	1 ml
Solution de fer	1 ml
Eau distillée q.s.p.	1 litre

Solution d'oligo-éléments

Acide borique	2 857 mg
Sulfate de manganèse	2 238 mg
Sulfate de cuivre	218 mg
Molybdate d'ammonium	258 mg
Eau distillée q.s.p.	1 litre

Solution de fer

Ajouter à 600 ml d'eau distillée :

EDTA disodique	33,31 g
SO ₄ Fe, 7 H ₂ O	21,88 g

Ajuster le pH à 5,5 avec KOH normal. Amener à 1 litre. Aérer pendant une nuit. Conserver au frais.

Le milieu complet est amené à pH 6,0 par addition de NaOH N/10. Il est stérilisé à 110 °C pendant 20 minutes.