

FIXATION SYNERGIQUE DE L'AZOTE ATMOSPHERIQUE DANS LES SOLS TROPICAUX

par Y. DOMMERGUES et S. MUTAFTSCHIEV

(avec la collaboration technique de M^{mes} Monique DUSAUSOY
et Pierrette LALLOZ)

(Centre de Pédologie, C.N.R.S., Nancy)

Parmi les micro-organismes qui interviennent dans la fixation de l'azote moléculaire dans les sols tropicaux, on a étudié essentiellement, jusqu'à présent, les *Azotobacter* et les *Beijerinckia*, ces derniers étant plus particulièrement adaptés aux sols ferrallitiques. Ces micro-organismes ont fait l'objet de nombreuses publications, dont nous ne citerons ici que quelques unes des plus récentes : Becking [1, 2], Dobreiner [3, 4], Dommergues [5], Hilger [6], Moore [9].

Mais toutes ces recherches n'ont porté que sur la fixation de l'azote par des *micro-organismes isolés*, alors que, dans le sol, ceux-ci se développent en présence d'autres micro-organismes, d'où l'apparition d'interactions antagonistes, ou, au contraire, d'interactions bénéficiales désignées sous le terme global de *synergie* (Pochon et de Barjac [11]).

On peut présumer l'existence d'interactions de type synergique chez les micro-organismes fixateurs d'azote, lorsque, dans les premiers stades des essais d'isolement sur des milieux dépourvus d'azote, l'on obtient, au lieu de cultures pures, des cultures mixtes de deux ou plusieurs micro-organismes très difficiles à dissocier ; c'est en particulier le cas lorsque l'associé se développe dans la capsule du micro-organisme fixateur (Wang et Luo [13]).

L'association ne présente pas toujours un caractère bénéficiel pour la *croissance* du micro-organisme fixateur d'azote : ainsi Wang et Luo [13] signalent qu'un *Pseudomonas* associé à un *Azotobacter* déprime la croissance de ce dernier micro-organisme. Par contre, Rovira [12] a mis en évidence un micro-organisme appelé 675 B, qui est associé à l'*Azotobacter* et semble en favoriser le développement en éliminant les toxines ou en lui fournissant des facteurs de croissance.

En ce qui concerne la *fixation de l'azote*, on ne possède actuellement que des informations très sommaires sur le rôle du micro-organisme synergique dans l'association ; signalons à ce sujet les

travaux de Marszenwska-Ziemiecka et Maliszewska [8], d'où il ressort qu'en culture mixte les amibes peuvent stimuler parfois la fixation d'azote par les *Azotobacter*. Divers auteurs, dont Petersen et Holm [40], pensent que la fixation d'azote en culture mixte serait plus importante que la fixation en culture pure. Mais aucune expérimentation précise n'a été entreprise pour vérifier cette hypothèse.

Le but de notre communication est de présenter le résultat de nos premières investigations sur une association synergique de deux micro-organismes qui coexistent très fréquemment dans les sols tropicaux où ils présentent sensiblement la même distribution : il s'agit du *Beijerinckia* d'une part, et d'une levure d'autre part.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — MICRO-ORGANISMES.

a) *Beijerinckia*. — Les micro-organismes fixateurs utilisés ont été des *Beijerinckia* appartenant aux deux espèces suivantes :

Beijerinckia indica, souche DSAI, en provenance d'un sol ferrallitique de La Réunion.

Beijerinckia fluminensis, souche BFB, (fig 1), en provenance du Brésil (Dobereiner [4]) et souche BF₃ en provenance d'un sol faiblement ferrallitique sous savane de la vallée du Niari (Congo).

b) *Levure*. — Il s'agit du *Lipomyces starkeyi*, levure acidiphile (fig. 2), oligonitrophile, mais non fixatrice d'azote qui fera l'objet d'une publication ultérieure ici même. Deux souches ont été utilisées :

Souche C 79, en provenance d'un sol faiblement ferrallitique de la vallée du Niari (Congo).

Souche C 81, en provenance d'un sol ferrallitique de La Réunion.

B. — MÉTHODE UTILISÉE POUR L'ÉTUDE DE LA FIXATION DE L'AZOTE.

Les micro-organismes ont été cultivés dans les milieux sans azote de pH 5,7, de composition suivante :

| | |
|----------------------------------|------------|
| Solution saline minérale A | 100 ml |
| Hydrate de carbone | 10 ou 20 g |
| Kaolin lavé | 5 g |
| Eau | 1000 ml |

La formule de la solution saline minérale A a été la suivante :

| | | |
|---|-------|---|
| KH_2PO_4 | 10 | g |
| $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}, 2\text{H}_2\text{O}$ | 3 | g |
| $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 1 | g |
| $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ | 1 | g |
| $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ | 0,1 | g |
| $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ | 0,02 | g |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,001 | g |

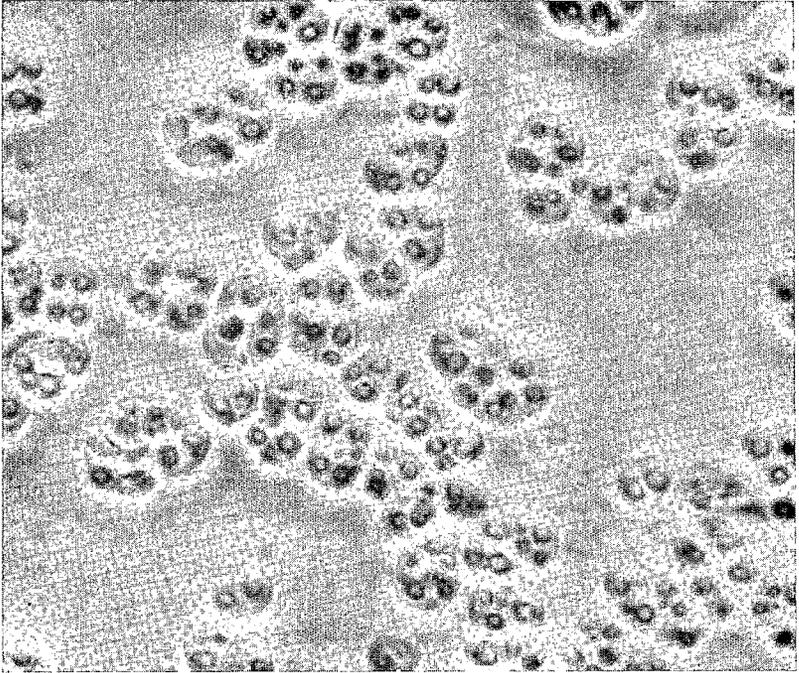


FIG. 1. — *Beijerinckia fluminensis*, souche BFB, culture de vingt et un jours en milieu liquide dépourvu d'azote. Remarquer les capsules caractéristiques. Contraste de phase.

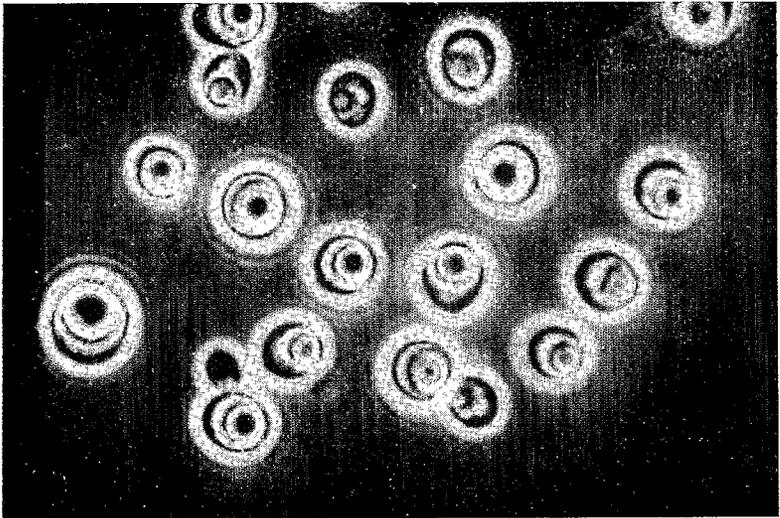


FIG. 2. — *Lipomyces starkeyi*, souche C 79, culture de vingt et un jours en milieu liquide dépourvu d'azote. Contraste de phase.

L'hydrate de carbone a été du glucose apporté à la dose de 20 p. 1 000 (expérience 1), ou du mannitol à 10 p. 1 000 (expériences 2 et 3). Le kaolin a été apporté à la dose de 5 p. 1 000 (expérience 1) ou 16 p. 1 000 (expériences 2 et 3).

Les milieux ont été répartis à raison de 60 ml dans des fioles de Roux de 500 ml (expériences 1 et 2), ou des fioles coniques d'Erlenmeyer de 300 ml (expérience 3).

Le glucose stérilisé par filtration sur membrane Millipore a été ajouté stérilement. Le mannitol a été stérilisé à la chaleur en même temps que le milieu.

A partir de ces milieux, on a réalisé deux séries d'expériences : une première série portant sur l'étude de la fixation de l'azote par des cultures mixtes (expériences 1 et 2), une deuxième série portant sur l'étude de la fixation de l'azote par une culture pure de *Beijerinckia* en présence ou en l'absence d'un filtrat de culture de levure (expérience 3).

1° FIXATION DE L'AZOTE PAR DES CULTURES MIXTES. — On a adopté deux techniques d'inoculation :

a) *Inoculation en deux temps* (expérience 1). Une première inoculation a eu lieu avec la levure de façon à obtenir, après une semaine d'incubation (incubation préalable), 10 à 30 millions de cellules par fiole de Roux. Une deuxième inoculation a été faite alors avec quelques dizaines de millions de cellules bactériennes de *Beijerinckia*.

b) *Inoculation simultanée* (expérience 2). On a apporté simultanément l'inoculum des deux micro-organismes : levure et *Beijerinckia*, les inoculum étant, dans ce cas, de quelques millions de cellules pour l'un et l'autre micro-organisme.

Au cours de l'incubation, on a agité manuellement les fioles de Roux pendant une demi-minute tous les deux jours ; cette incubation à $30 \pm 1^\circ \text{C}$ a duré une semaine pour les cultures de *Beijerinckia indica* (en plus de l'incubation préalable de sept jours de la levure, dans le cas de l'inoculation en deux temps) et trois semaines pour les cultures de *Beijerinckia fluminensis*.

2° FIXATION DE L'AZOTE PAR UNE CULTURE PURE DE *Beijerinckia* EN PRÉSENCE OU EN L'ABSENCE D'UN FILTRAT DE CULTURE DE LEVURE (expérience 3). — Deux types de filtrats ont été employés :

a) *Un filtrat non concentré* obtenu directement par filtration d'une culture de levure de quatorze jours.

b) *Le filtrat précédent concentré dix fois* sous vide à 45°C .

Les filtrats stérilisés par filtration sur membrane Millipore ont été ajoutés stérilement au milieu de culture à la dose de 10 p. 100.

Les cultures se sont développées en fioles coniques d'Erlenmeyer, où l'aération a été obtenue par agitation magnétique.

L'incubation a été de sept jours à $30 \pm 1^\circ \text{C}$.

Dans les deux types d'expérience, les dosages de l'azote par la méthode Kjeldahl ont porté à la fois sur des milieux ensemencés et sur des milieux témoins non ensemencés. Les résultats figurant ci-dessous tiennent compte de ces témoins. Ils sont la moyenne de 2 ou 3 répétitions.

C. — MÉTHODE UTILISÉE
POUR L'ÉTUDE DE LA CROISSANCE DE *Beijerinckia*
EN PRÉSENCE OU EN L'ABSENCE DE FILTRATS DE CULTURE DE LEVURE.

Les *Beijerinckia indica* ont été cultivés sur un milieu identique à celui qui a été décrit au paragraphe précédent, mais ne comportant pas de kaolin ; ce milieu a été, en outre, filtré afin d'obtenir un liquide parfaitement limpide.

L'hydrate de carbone utilisé a été le mannitol à la dose de 10 p. 1 000. Les filtrats de culture de levure, préparés comme il a été indiqué ci-dessus ont été ajoutés au milieu à la dose de 10 p. 1 000.

L'expérience a comporté trois traitements :

- a) Culture en présence du filtrat non concentré.
- b) Culture en présence du filtrat concentré.
- c) Culture sans filtrat.

Les courbes de croissance du *Beijerinckia* ont été enregistrées automatiquement sur biophotomètre Bonet-Maury.

RÉSULTATS

RÉSULTATS CONCERNANT LA FIXATION DE L'AZOTE.

1° EXPÉRIENCE 1. — Rappelons que cette expérience a porté sur l'association synergique de *Beijerinckia indica* (souche DSAI) avec deux souches de levure (C 79 et C 81), qu'elle a été conduite sur un milieu au glucose à 20 p. 1 000 en fioles de Roux et que l'inoculation a été faite en deux temps.

Il ressort du tableau I que l'une et l'autre souche de levure exercent un effet synergique très favorable sur la fixation d'azote par le *Beijerinckia indica* puisque celle-ci est multipliée par 5 et 8.

TABLEAU I. — Fixation d'azote par une souche de *Beijerinckia indica* (DSAI) avec deux souches de levure (*Lipomyces starkeyi*) : C 79 et C 81 (inoculation en deux temps).

| | CULTURE PURE DE LEVURE | CULTURE PURE DE <i>Beijerinckia indica</i> | CULTURE MIXTE DE <i>Beijerinckia indica</i> ET DE LEVURE |
|-----------------|---------------------------|--|---|
| Souche C 79 ... | 0,3 | 2,3 | 12,5 |
| Souche C 81 ... | 0,5 | 1,5 | 12,3 |

Les résultats sont exprimés en mg d'azote fixé par fiole de Roux contenant 60 ml de milieu

2° EXPÉRIENCE 2. — Rappelons que cette expérience a porté sur l'association synergique de *Beijerinckia fluminensis* (souches BFB et BF3) avec une souche de levure (C 79), qu'elle a été conduite sur un milieu au mannitol à 10 p. 1 000 en fioles de Roux, et que l'inoculation a été faite simultanément avec les deux micro-organismes.

TABLEAU II. — Fixation d'azote par deux souches de *Beijerinckia fluminensis* (BFB et BF3) en culture pure ou en présence de la levure : *Lipomyces starkeyi* C 79 (inoculation simultanée).

| | CULTURE PURE DE LEVURE | CULTURE PURE DE <i>Beijerinckia fluminensis</i> | CULTURE MIXTE DE LEVURE C 79 ET <i>Beijerinckia fluminensis</i> |
|----------------|---------------------------|--|--|
| Souche BFB ... | 0,1 | 5,1 | 7,4 |
| Souche BF3.... | 0,1 | 1,6 | 4,3 |

Les résultats sont exprimés en mg d'azote fixé par fiole de Roux contenant 60 ml de milieu.

Il ressort du tableau II que la levure exerce un effet synergique moins marqué que dans le cas précédent mais encore favorable, puisque la fixation d'azote par *Beijerinckia fluminensis* est multipliée par 1,4 et 2,7.

L'effet de synergie moins accentué dans l'expérience 2 comparativement à l'expérience 1 pourrait être attribué soit à une baisse de l'efficacité de l'association où l'on a remplacé *Beijerinckia indica* par *Beijerinckia fluminensis* soit à la modification de la technique d'ensemencement, puisque l'on a substitué l'ensemencement simultané à l'ensemencement en deux temps. Il ne s'agit là, d'ailleurs, que d'hypothèses qui seront contrôlées ultérieurement.

3° EXPÉRIENCE 3. — Cette expérience avait pour but de rechercher si les filtrats de cultures de levure pouvaient favoriser la fixation de l'azote par le *Beijerinckia indica*.

Les résultats obtenus (tableau III) montrent qu'il existe effectivement une *tendance* à l'accroissement de la fixation en présence de filtrat. Nos recherches ne sont pas encore assez avancées pour donner, dès maintenant, une explication satisfaisante de la faiblesse de cet accroissement.

TABEAU III. — Fixation d'azote par une souche de *Beijerinckia indica* (DSAI) en présence ou non de filtrats de culture de la levure : *Lipomyces starkeyi* C 79.

| | TÉMOIN (sans filtrat) | FILTRAT NON CONCENTRÉ | FILTRAT CONCENTRÉ |
|--|--------------------------|--------------------------|----------------------|
| Fixation d'azote .. | 7,2 | 7,9 | 8,8 |
| Les résultats sont exprimés en mg d'azote fixé par fiole d'Erlenmeyer contenant 60 ml de milieu. | | | |

RÉSULTATS CONCERNANT LA CROISSANCE.

Les courbes représentées sur la figure 3 mettent parfaitement en évidence le rôle favorable des filtrats de culture *non concentrés* sur la croissance de *Beijerinckia indica* ; l'influence est un peu plus favorable dans le cas de l'incorporation de filtrat *concentré*.

CONCLUSION

L'étude *préliminaire* présentée ici met en lumière l'existence d'une association synergique entre une levure oligonitrophile (*Lipomyces starkeyi*) d'une part et *Beijerinckia indica* ou *Beijerinckia fluminensis* d'autre part.

Dans cette association, le *Beijerinckia* apparaît être largement bénéficiaire, puisque sa croissance et son taux de fixation de l'azote moléculaire sont fortement accrus par des substances synthétisées par la levure. Les avantages que tirerait la levure de l'association n'apparaissent pas dans les expériences effectuées ici.

Becking [1] a observé, dans les sols tropicaux, la présence d'une levure (*Lipomyces*) qui pourrait être la même que celle que nous avons utilisée ici ; il note également qu'en dépit de son caractère oligonitrophile, elle ne fixe pas l'azote atmosphérique, mais il n'a pas précisé son rôle éventuel dans le sol.

Des expériences en cours, qui seront publiées ultérieurement, indiquent que *l'écologie de cette association synergique est complexe*. Son efficacité serait fonction de différents facteurs en cours d'étude : densité relative des deux microorganismes, pH, aération, teneur du milieu en argile et humus, nature du substrat énergétique. La nature et le mode d'action des substances synthétisées par la levure seront également déterminés ultérieurement.

Sur le plan de la *fixation de l'azote dans les sols tropicaux*, la découverte d'associations synergiques de ce type ou portant sur d'autres microorganismes, semble intéressante, car elle contribue à expliquer les processus de fixation dans des sols tropicaux dont l'importance a déjà été soulignée par différents auteurs (Moore [9], Jaiyebo et Moore [7]).

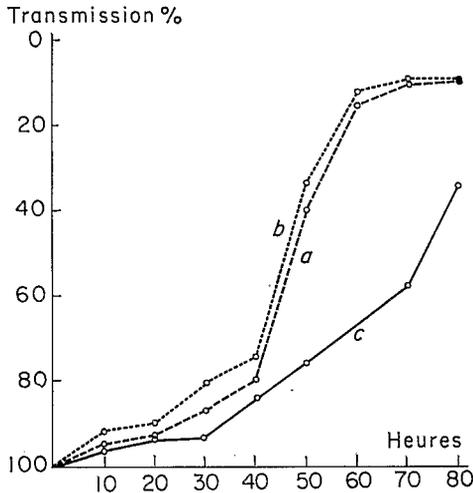


FIG. 3. — Courbes de croissance de *Beijerinckia indica* en présence de filtrats de culture de *Lipomyces starkeyi*. a) Filtrat non concentré; b) Filtrat concentré; c) Témoin sans filtrat.

En ce qui concerne la conception et la *préparation des engrais microbiens*, les résultats présentés ici indiquent qu'il est nécessaire d'abandonner l'emploi des cultures pures pour s'orienter vers l'utilisation d'associations synergiques de microorganismes.

RÉSUMÉ

La fixation d'azote moléculaire par *Beijerinckia indica* ou *Beijerinckia fluminensis* est très fortement accrue lorsque ce microorganisme est cultivé en présence d'une levure oligonitrophile très répandue dans les sols tropicaux (*Lipomyces starkeyi*). La découverte de cette synergie contribue non seulement à expliquer les processus de fixation de l'azote dans ces sols, mais est susceptible d'applications dans le domaine des engrais microbiens.

SUMMARY

SYNERGISTIC FIXATION OF ATMOSPHERIC NITROGEN IN TROPICAL SOILS.

Molecular nitrogen fixation by *Beijerinckia indica* and *Beijerinckia fluminensis* is very markedly increased when the microorganism is cultivated in presence of an oligonitrophil yeast (*Lipomyces starkeyi*) which is very often found in tropical soils. This synergism might explain the processes of nitrogen fixation in these soils and be used in the routine practice of microbial fertilizers.

*
**

Nous tenons à remercier tout particulièrement M^l^h W. Sloof du Centralal bureau voor Schimmelcultures, Delft, qui a bien voulu accepter de déterminer les différentes souches de levure utilisées dans ce travail. Nos remerciements vont également à M. le D^r Drouhet, qui a bien voulu faire une étude des caractéristiques biochimiques de cette levure. Nous sommes en outre reconnaissants à M. Hilger, de Gembloux, de nous avoir fourni une culture de la souche originale de *Beijerinckia fluminensis*, appelée ici BFB, isolée au Brésil par Dobereiner, ainsi que MM. de Boissezon et Didier de Saint-Amand qui nous ont fourni des échantillons de sol où nous avons trouvé la souche *Beijerinckia fluminensis* BF₃ et les 3 souches de *Lipomyces*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BECKING (J. H.). *Plant and Soil*, 1959, **11**, 193-206.
- [2] BECKING (J. H.). *Plant and Soil*, 1962, **16**, 171-201.
- [3] DOBEREINER (J.) y RUSCHEL (A. P.). *Rev. Biol.*, 1958, **1**, 261-272.
- [4] DOBEREINER (J.). *Rev. Brasil. Biol.*, 1959, **19**, 151-160.
- [5] DOMMERCUES (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1963, **105**, 179-187.
- [6] HILGER (F.). *Thèse Inst. Agron. Etat*, Gembloux, 1963.
- [7] JAIYEBO (E. O.) and MOORE (A. W.). *Nature*, 1963, **197**, 317-318.
- [8] MARSZEWSKA-ZIEMIECKA (J.) i MALISZEWSKA (W.). *Pam. Pulawski*, 1963, **2**, 35-48.
- [9] MOORE (A. W.). *Plant and Soil*, 1963, **19**, 385-395.
- [10] PETERSEN (E. J.). *Royal Veterinary and Agricultural College Year-book*, Copenhagen, 1964, 209-226.
- [11] POCHON (J.) et BARJAC (H. de). *Traité de microbiologie des sols*, Dunod, édit., Paris, 1958.
- [12] ROVIRA (A. D.). *Plant and Soil*, 1963, **19**, 304-314.
- [13] WANG (Y. Ch.) et LUO (G. W.). *Acta pedol. sinica*, 1963, **2**, 405-410.

Bibliothèque des sols

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Supplément, Septembre 1965, Tome 109.)

**FIXATION SYNERGIQUE
DE L'AZOTE ATMOSPHERIQUE
DANS LES SOLS TROPICAUX**
PAR
Y. DOMMERMUES et S. MUTAFTSCHIEV
(avec la collaboration technique de
M^{me} Monique DUSAUSOY et Pierrette LALLOZ.)

MASSON ET C^{IE}, EDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS

10404

CR 604