

MÉMOIRES DE L'INSTITUT SCIENTIFIQUE DE MADAGASCAR

Série D — Tome V — 1953

NOTE PRÉCISANT LA BIOLOGIE DE L'« AZOTOBACTER INDICUM » AINSI QUE SA RÉPARTITION A MADAGASCAR

par

Y. DOMMERGUES

SOMMAIRE

Milieux de culture . . . . .	327
Coloration . . . . .	328
Morphologie . . . . .	328
Production d'acide . . . . .	330
pH optimum . . . . .	330
Nutrition carbonée . . . . .	330
Fixation de l'azote atmosphérique . . . . .	331
Interprétation des numérations . . . . .	332
Répartition . . . . .	335
Bibliographie . . . . .	335

L'*Azotobacter indicum* a été décrit pour la première fois par STARKEY (9) dans des sols de rizière aux Indes. Il existe également en Malaisie et a été retrouvé à Java par DERX (2). Nous l'avons isolé l'an dernier des sols de Madagascar où son aire couvre toute la Grande Ile.

Après avoir étudié brièvement les milieux de culture et les caractéristiques morphologiques de ce germe, nous passerons en revue ses caractéristiques physiologiques en insistant plus particulièrement sur sa nutrition carbonée et son pouvoir fixateur d'azote. Nous terminerons par un aperçu de sa répartition dans la Grande Ile, comparée avec celle de l'*Azotobacter chroococcum*.

I. — MILIEUX DE CULTURE

1° MILIEUX SOLIDES AU SILICOGEL

Pour la numération de l'*Azotobacter indicum* sur plaque de silicogel, on peut utiliser l'une ou l'autre des techniques suivantes :

a) Technique classique de WINOGRADSKY : plaques neutres (7 et 10). Ces plaques sont imprégnées de la solution saline de WINOGRADSKY, puis émaillées au calcaire.

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

23 JAN 1966

n° 17087

b) Technique de WINOGRADSKY modifiée : plaque à pH 6 (3). Les plaques sont imprégnées avec une solution saline tamponnée au phosphate au pH de 5,8-6, dite solution saline A, dont nous avons donné la formule dans une publication précédente (4), puis émaillées au kaolin lavé.

Les colonies d'*Azotobacter indicum* apparaissent dans les deux cas au bout de 10 à 20 jours, parfois avant. Nous préférons les plaques acides pour l'étude des sols dont le pH est inférieur à 6, car elles permettent également la mise en évidence d'autres Bactéries fixatrices d'azote qui n'apparaissent pas sur les plaques classiques.

## 2° MILIEUX LIQUIDES

Nous utilisons en général le milieu liquide tamponné suivant :

Glucose . . . . .	5 g.
Solution saline A . . . . .	30 cm <sup>3</sup>
Phosphate disodique . . . . .	2 g.
Phosphate monopotassique . . . . .	10 g.
Eau . . . . .	970 cm <sup>3</sup>

Mais l'*Azotobacter indicum* supporte des concentrations de glucose atteignant 10 pour mille. On peut aussi le cultiver sur milieu classique tamponné au calcaire (7 et 10).

## 3° MILIEUX GÉLOSÉS

Pour la culture ou l'isolement de l'*A. indicum* on peut utiliser indifféremment le milieu gélosé à pH 6 tamponné au phosphate, ou le milieu gélosé neutre tamponné au calcaire.

## II. — COLORATION

Nous avons eu beaucoup de difficultés à trouver une coloration simple et rapide du germe, en raison de l'importance de la production du mucus ; l'érythrosine phéniquée provoque une contraction du mucus et une déformation des corps bactériens ; le violet de gentiane et le bleu de méthylène aqueux sont fixés par le mucus et non par les germes. La technique qui nous a donné les meilleurs résultats est une coloration simple avec de la fuschine basique à 6 % dans l'alcool méthylique pendant une minute (1).

## III. — MORPHOLOGIE

Les souches que nous avons isolées ici présentent les caractères suivants :

- bâtonnet de 2 à 3  $\mu$  de long sur 0,5 à 1  $\mu$  ;
- la mobilité du germe est assez difficile à observer ;
- à chaque extrémité de la Bactérie sont situées deux masses réfrin-

(1) Nous tenons à remercier ici très vivement le Docteur COURDURIER et le Docteur Vétérinaire QUESNEL qui ont bien voulu nous aider de leurs conseils éclairés lors de ces recherches relatives à la coloration.

*gentes* (fig. 1), très faciles à observer sur le germe vivant, non colorables par le bleu de méthylène, le violet de gentiane ou la fuschine basique, mais

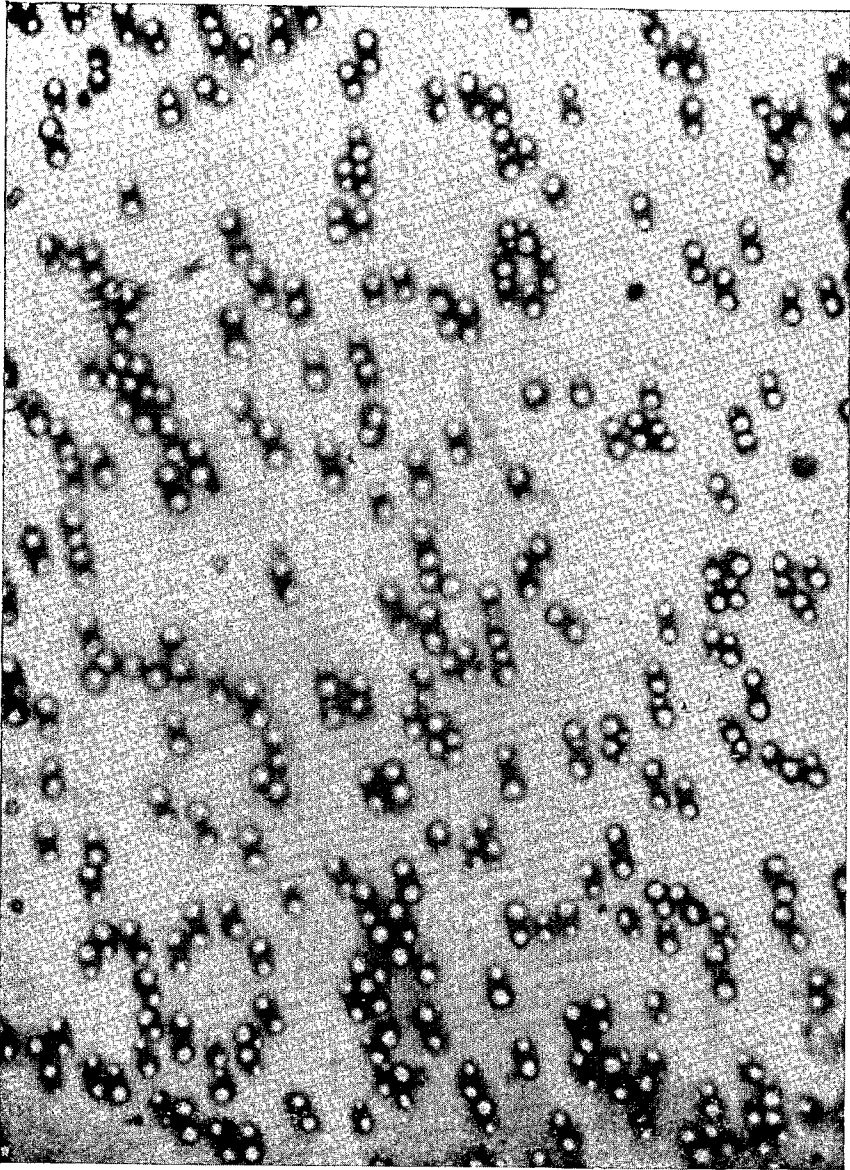


FIG. 1. — Culture d'*Azotobacter indicum* âgée de 10 jours. Souche provenant de la station forestière d'Analamazoatra. Coloration simple à la fuschine basique en solution dans l'alcool méthylique.

colorables en jaune orange par l'écarlate R. Le diamètre de ces sphérules augmente lorsque la culture vieillit ;

— les colonies peuvent atteindre 5 à 10 mm. sur les plaques de gel de silice ; elles sont blanc-laiteux, hémisphériques, à bords lisses parfois plissées, extrêmement muqueuses et très résistantes. Les cultures prennent en vieillissant une coloration brun-rouge.

— en milieu liquide, il n'y a pas de formation de voile, mais le milieu prend une consistance visqueuse due à la production du mucus abondant ; on observe une sédimentation peu importante ;

— nous n'avons jamais remarqué dans nos cultures la présence de kystes.

Ces caractères sont bien ceux signalés par STARKEY (9) et DERX (2).

#### IV. — PRODUCTION D'ACIDE

L'*Azotobacter indicum* acidifie fortement le milieu de culture. A l'aide du réactif au gaïacol (6), nous avons pu mettre en évidence la production d'acide lactique.

#### V. — pH OPTIMUM

Nous avons étudié dans une publication antérieure le pH optimum d'une souche d'*Azotobacter indicum* isolée d'un sol de la station forestière d'Analamazoatra (3) : il se situe aux environs de 6,2. Une autre souche isolée à la station forestière de Manjakatempo présente un optimum au pH 5,6-5,8.

En culture pure, le germe se développe bien sur des milieux ayant un pH compris entre 4 et 8 ; nous n'avons d'ailleurs pas essayé de le cultiver en dehors de ces limites.

L'*Azotobacter indicum* est fréquent dans les sols ayant un pH voisin de 6, ce qui confirme les résultats de l'étude du pH optimum en milieu liquide ; nous ne l'avons jamais retrouvé dans des sols dont le pH est inférieur à 4,6 ou supérieur à 7.

#### VI. — NUTRITION CARBONÉE

Pour étudier la nutrition carbonée de l'*Azotobacter indicum* nous avons utilisé 3 techniques :

##### 1° Etude de la nutrition carbonée en culture pure sur milieu liquide à pH 6

Nous avons mesuré à l'aide de l'électrophotomètre MEUNIER l'opacité des cultures d'*A. indicum* après une incubation de 5 et 10 jours, à 30° C. Les différentes substances carbonées essayées à la concentration de 5 % se classent comme suit :

a. substances carbonées très favorables :

glucose ; saccharose ; mannite ; glycérine ; alcool éthylique ;

- b. substance carbonée assez favorable :  
lactose ;
- c. substances carbonées inutilisables :  
benzoate de sodium ; tartrate de sodium ; citrate de sodium ; oxalate de sodium ; acétate de sodium.

2° *Etude de la nutrition carbonée sur plaque au silicogelensemencée avec des grains de terre*

Nous avons ensemencé avec des grains de terre riche en *A. indicum* des plaques de gel de silice imprégnées du milieu salin convenable à pH 7 et à pH 6 et nous avons observé le développement des colonies :

- a. substances carbonées très favorables :  
glucose ; saccharose ; mannite ; amidon soluble ; lactose ;
- b. substances carbonées moins favorables :  
alcool éthylique ; glycérine ;
- c. substances carbonées inutilisables :  
alcool méthylique ; benzoate de sodium ; tartrate de sodium ; tartrate de potassium ; citrate de sodium ; oxalate de sodium ; acétate de sodium.

Ces résultats confirment ceux obtenus avec les cultures pures : toutefois le classement des substances carbonées utilisables est légèrement modifié.

3° *Etude de la nutrition carbonée par la technique de la terre moulée*

Nous avons enfin utilisé la technique de la terre moulée (enrichissement d'un échantillon de sol avec une matière énergétique) (7) pour la saccharose, le glucose et le benzoate de sodium : les résultats ont confirmé, pour ces substances, ceux qui avaient été obtenus avec la technique des plaques de silico-gel.

VII. — FIXATION DE L'AZOTE ATMOSPHERIQUE

1° *Influence du rapport  $\frac{\text{surface (S)}}{\text{volume (V)}}$  du milieu de culture sur la quantité d'azote fixée par l'*Azotobacter indicum**

Le tableau I ci-dessous indique, pour différents rapports  $\frac{S}{V}$ , les quantités d'azote fixées par 100 cm<sup>3</sup> d'une culture sur milieu liquide d'*Azotobacter indicum* (souche provenant de Manjakatempo) au bout d'un séjour de 10 jours à l'étuve à 30° C.

TABLEAU I

Influence du rapport  $\frac{S}{V}$  sur la quantité d'azote fixée par l'*Azotobacter indicum*

Rapport $\frac{S}{V}$	mg N fixé par 100 cm <sup>3</sup> de culture
0,25	0,26
0,5	0,74
1	1,52
2	2,09
4	3,49

La quantité d'azote fixée est sensiblement proportionnelle à la valeur du rapport  $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$  du milieu de culture.

### 2° Rendement de fixation de l'*Azotobacter indicum*

Pour étudier le rendement de fixation nous avons utilisé des milieux liquides tamponnés au pH 6 ou 5, glucosés à 5 ou 1 pour mille et ayant des rapports S/V de 0,6 ou 2,5. Les cultures (souche provenant d'Analama-zoatra) ont été mises à l'étuve pendant 14 jours à 30° C.

Le tableau II donne les résultats obtenus dans ces différentes conditions expérimentales.

TABLEAU II

Rendement de fixation de l'*Azotobacter indicum*

Concentration du milieu en mg de glucose pour 100 cm <sup>3</sup>	Rapport $\frac{S}{V}$	pH du milieu	Quantité d'azote fixée en mg par 100 cm <sup>3</sup> de culture	Quantité de glu- cose consommée en mg par 100 cm <sup>3</sup> de culture	Rendement pour cent
500	0,6	6	0,945	90	1,05
500	0,6	5	0,910	80	1,14
500	2,5	6	4,900	422	1,15
100	2,5	6	0,940	70	1,34

### VIII. — INTERPRÉTATION DES NUMÉRATIONS D'AZOTOBACTER INDICUM

Lorsque l'*Azotobacter indicum* atteint une densité de 500 à 1.000 colonies par gramme il caractérise un sol à pouvoir fixateur d'azote élevé.

Si ce pouvoir fixateur élevé s'accompagne d'un pouvoir nitrificateur élevé, on peut affirmer qu'il s'agit d'un très bon sol agricole, telles les alluvions récentes du Lac Alaotra (*Baiboho*), certains sols volcaniques de l'Itasy ou certains sols alluviaux de l'Ankaizinana dont nous donnons ci-dessous quelques caractéristiques biologiques.

TABLEAU III

Caractéristiques biologiques de 3 types de sols agricoles fertiles

Type de sol	Numéro de l'échantillon	Date du prélèvement	Densité des Bactéries		pH
			Densité des <i>Azotobacter indicum</i>	fixatrices d'azote en aérobiose autres que l' <i>Azotobacter indicum</i> (2)	
Alluvion récente du Lac Alaotra	ALT-f-B24	Février 1952	500	30	5.100 6,3
Sol volcanique de l'Itasy	SVD - 11	Février 1952	1.000	460	4.300 6,1
Alluvion récente de l'Ankaizina	AKZ - 2	Mai 1952	730	1.930	1.100 6,4

Par contre, si le pouvoir nitrificateur d'un sol est insuffisant, même si son pouvoir fixateur est élevé, on doit conclure que ce sol est *présentement* improductif.

Nous avons donné un exemple de ce phénomène dans une publication précédente (5) ; il s'agissait d'une alluvion micacée récente type *baiboho* qui, bien qu'ayant un pouvoir fixateur élevé, portait une culture de Canne à sucre malvenante alors qu'un sol humifère voisin, à pouvoir fixateur bien inférieur, mais à pouvoir nitrificateur supérieur, fournissait une assez belle récolte.

Nous nous contenterons ici de donner un second exemple :

TABLEAU IV

Comparaison de 2 types de sols du parc de Tsimbazaza-Tananarive

Type de sol	Numéro de l'échantillon	Date du prélèvement	Densité des Bactéries		pH
			Densité des <i>Azotobacter indicum</i>	fixatrices d'azote autres que l' <i>Azotobacter indicum</i>	
Argile latéritique partiellement remaniée (pente)	TBZ-II-R 1	Mars 1952	750	780	469 6
Alluvion micacée récente (bas-fond)	TBZ-II-G 72	Mars 1952	530	80	7.100 6,5

Le premier type de sol (TBZ-II-R 1) est peu fertile bien que son pouvoir fixateur soit élevé, alors que le 2<sup>e</sup> type de sol est très fertile : son pouvoir nitrificateur est 15 fois plus élevé.

En résumé la numération des *Azotobacter indicum* dans les sols tropicaux est insuffisante pour se faire une idée exacte de la *fertilité présente* de ces sols.

(2) Il s'agit soit de l'*Azobacter chroococcum*, soit de Bactéries fixatrices d'azote non encore décrites et caractérisées par une croissance optimum à un pH acide.

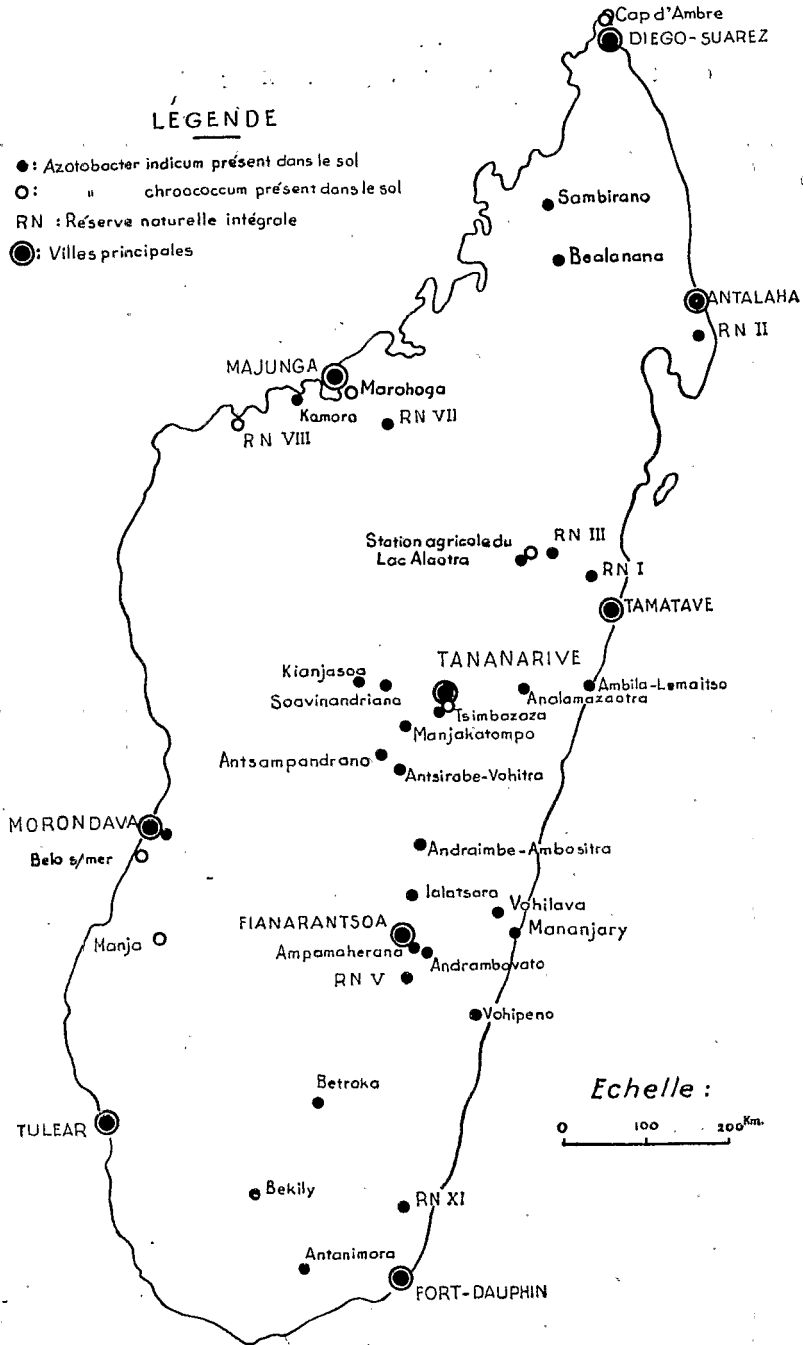


FIG. 2. — Carte de répartition de l'*Azotobacter indicum*, et de l'*Azotobacter chroococcum* à Madagascar.



Cependant l'abondance de ce germe indique un pouvoir fixateur intense et, de deux sols ayant un pouvoir nitrificateur voisin, il y a lieu de préférer celui qui est le plus riche en *Azotobacter indicum*.

#### IX. — RÉPARTITION DE L'AZOTOBACTER INDICUM A MADAGASCAR

La carte ci-jointe (fig. 2) montre que l'*Azotobacter indicum* se retrouve dans toutes les régions de Madagascar ; mais, ainsi que nous l'avons déjà noté, ce germe n'existe que dans les sols ayant un pH inférieur ou au plus égal à 7. Dans les sols calcaires il est remplacé par l'*Azotobacter chroococcum*. Nous avons cependant constaté la présence simultanée de ces 2 germes dans les sols ayant un pH de 6,3 ou 6,8, tels que les alluvions récentes du Lac Alaotra ou des alluvions micacées récentes de bas-fond de Tsimbazaza-Tananarive ; ainsi dans un échantillon d'alluvion récente micacée du Lac Alaotra (ALT B22) récolté au mois de décembre 1951, nous avons dénombré par gramme :

180 colonies d'*Azotobacter indicum*

50 colonies d'*Azotobacter chroococcum*

L'*Azotobacter indicum* est moins fréquent dans les sols forestiers de Madagascar, sans doute à cause de l'acidité plus grande de ces sols et à cause de la présence d'antibiotiques ou de certains produits de décomposition de la couverture morte.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. BERGEY (D. H.), 1948. — Manual of determinative bacteriology. — Londres, Baillière, Tindall.
2. DERX (H. G.), 1950. — Beijerinckia, a new genus of nitrogen-fixing Bacteria occurring in tropical soils. — *Proc. Kon. Ned. Akad.*, V Wet. 53, 2, p. 140-6.
3. DOMMERGUES (Y.), 1952. — L'analyse microbiologique des sols tropicaux acides. — *Mém. Inst. sci. Madag.*, D, IV, 2.
4. DOMMERGUES (Y.), 1952. — Influence du défrichement de forêt suivi d'incendie sur l'activité biologique du sol. — *Mém. Inst. sci. Madag.*, D, IV, 2.
5. DOMMERGUES (Y.), 1953. — Influence de la fumure des plants d'*Eucalyptus robusta* sur la croissance de cette essence et sur l'activité biologique du sol ; interprétation de l'analyse bactériologique des sols. — *Mém. Inst. sci. Madag.*, D, V.
6. LEBERT (F.), 1949. — Technique actuelle d'isolement et de détermination des Bactéries anaérobies. — Paris, Pacomhy.
7. POCHON (J.) et TCHAN (Y. T.), 1948. — Précis de microbiologie du sol. — Paris, Masson.
8. RUSSEL (E. J.), 1950. — Soil conditions and plant growth. — Londres, Longmans, Green and Co.
9. STARKEY (R. L.), et DE (P. K.), 1939. — A new species of *Azotobacter*. — *Soil Sci.*, 47, p. 329-343.
10. WINOGRADSKY (S.), 1949. — Microbiologie du Sol. — Paris, Masson.