

UN NOUVEAU GERME FIXATEUR
DE L'AZOTE ATMOSPHERIQUE :
AZOTOBACTER LACTICOGENES

par MM. J. KAUFFMANN et P. TOUSSAINT.

RÉSUMÉ

Isolement d'un nouvel Azotobacter (A. lacticogenes) se caractérisant par sa morphologie : présence de granulations polaires, et par un certain nombre de particularités physiologiques : pH optimum peu élevé, fermentation lactique, rendement de fixation de l'azote du même ordre que celui de l'A. chroococcum.

Au cours de nos recherches sur une terre acide (pH 5) provenant de Côte d'Ivoire (région d'Abidjan), nous avons isolé un nouveau germe fixateur de l'azote atmosphérique dénommé par A. R. PRÉVOT *Azotobacter lacticogenes*. L'échantillon de terre, à partir duquel nous avons isolé ce germe, fut prélevé sur une parcelle maintenue dénudée depuis 6 mois. Primitivement cette parcelle était recouverte par la forêt.

Nous avons étudié quelques particularités morphologiques et physiologiques de ce nouveau fixateur.

I. MORPHOLOGIE.

Coccus de 1 à 2 μ de diamètre, immobile, présentant des granulations mono- ou pluripolaires visibles à l'état frais. Ces granulations sont nettement mises en évidence par coloration à l'érythrosine (Fig. 1). Cette caractéristique morphologique différencie nettement ce germe des autres *Azotobacter* qui, eux, ne possèdent pas de granulations polaires. Le violet de gentiane et le bleu de méthylène colorent uniformément la cellule donnant

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

Collection de Référence

n° A1899

l'aspect d'une bactérie banale sans structure interne. Le bleu de méthylène se fixe sur le mucus élaboré par ce germe.

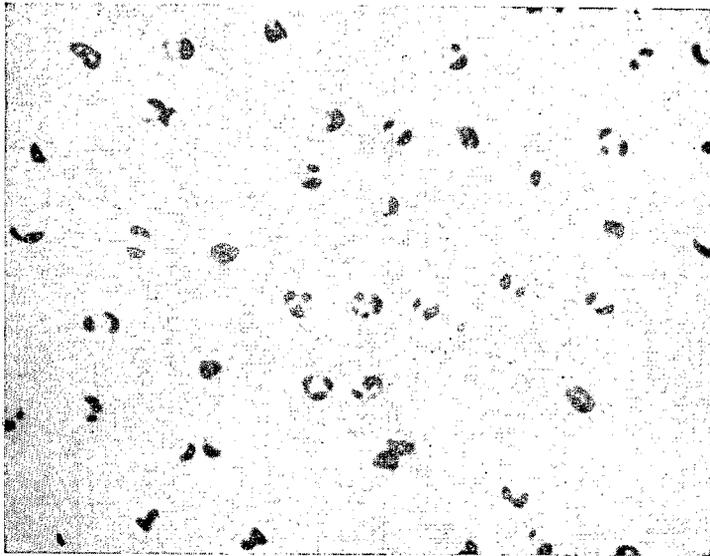


Fig. 1. — *Azotobacter lacticoenes*. Gross. 2000. Coloration par l'érythrosine.

Aspect des colonies.

Sur milieu au silico-gel, imprégné de la solution saline de WINOGRADSKY [1] additionnée de glucose, les colonies sont blanches, dures, plissées. Sur milieu gélosé, additionné du même milieu nutritif, des colonies blanches, bombées, lisses apparaissent après 24 heures à l'étuve à 30°. Les cultures en vieillissant (sur milieu solide ou liquide) prennent une teinte brun-rosé caractéristique.

Cycle morphologique des cellules.

Une lame préparée à partir d'une culture jeune, colorée à l'érythrosine, montre des cellules à différents stades de division. Il semble que le cycle d'évolution de l'*Azotobacter lacticoenes* soit conforme au schéma suivant (Fig. 2).



Fig. 2. — Cycle morphologique de l'*Azotobacter lactificogenes*.

Lorsque la cellule bactérienne a atteint un certain développement, un fin granule semble se détacher de la calotte polaire pour aller se fixer à un endroit quelconque contre la paroi interne de la cellule. Le granule situé contre la paroi grossit ainsi que la cellule. On est alors en présence d'une cellule bipolaire. Une cloison apparaît, puis les 2 cellules se séparent. Avant la séparation, on remarque très souvent que chacune des futures cellules-filles se trouvent déjà en voie de division. Il n'est pas rare de trouver des cellules tripolaires dont la multipolarité semble provenir de plusieurs granules élaborés par la cellule primitive. Le schéma suivant (Fig. 3), que l'on remarque parfois, pourrait être expliqué



Fig. 3. — Cycle morphologique de l'*Azotobacter lactificogenes*.

par une division directe de la calotte. Cette hypothèse n'explique pas les différents stades représentés dans le premier schéma. Aussi, l'hypothèse du granule semble être la seule explication. Dans ce cas, le granule serait resté fixé contre la calotte.

A noter que nous n'avons jamais mis en évidence de kystes dans nos milieux de culture.

II. SOURCES CARBONÉES UTILISÉES.

Pour cette étude, nous avons opéré de la façon suivante :

Le milieu salin de Winogradsky additionné de carbonate de calcium (0,2 %) est réparti dans des tubes à essais à raison de 5 cc. de milieu par tube. On ajoute dans ces milieux les différentes substances carbonées que l'on désire étudier à la dose de 1 g. p. 100 (ces substances étant les seules sources carbonées mises à la

disposition de la bactérie). On stérilise et on ensemence. Après 8 jours à l'étuve à 30° on observe l'opacité des milieux. Une croissance plus ou moins active indique une attaque plus ou moins rapide de la substance carbonée.

1) *Substances carbonées utilisées par l'Azotobacter lactico-genus.*

a) *Sucres.*

Glucose, mannite, maltose, xylose, arabinose, galactose, saccharose, lactose, amidon soluble.

b) *Substances carbonées diverses.*

Glycérine (très favorable), alcool éthylique (peu favorable).

2) *Substances carbonées non utilisées.*

Benzoate, citrate, lactate, propionate, acétate, pyruvate (sous forme de sels de sodium) et acétone.

III. ACTION DE LA TEMPÉRATURE.

Cet *Azotobacter* est tué par une température de 56° maintenue pendant cinq minutes.

Nous avons recherché l'influence de la température sur la croissance :

Le milieu de Winogradsky au carbonate de calcium (0,2 g. p. 100) et glucosé à 1 g p. 100 est réparti dans des boîtes de Roux à raison de 100 cc. par boîte. On dispose d'étuves réglées à 20°, 26°, 29°, 31° et 33°. On mesure tous les 2 jours l'opacité des milieux de culture à l'aide d'un électrophotomètre. La mesure est faite sur 0,5 cc. de milieu acidifié et dilué à 5 cc. avec de l'eau distillée. On remarque que la croissance est pratiquement nulle pour les températures de 20° et 33°. Pour les fioles soumises aux autres températures (26°, 29° et 31°), les croissances sont identiques (Voir Fig. 4).

IV. ACTION DU PH.

On utilise le milieu de Winogradsky glucosé additionné de chlorure de calcium (0,2 p. 100). On réalise des milieux à diffé-

rents pH par addition de NaOH ou de SO_4H_2 . Un milieu tamponné à $\text{pH} = 7,5$ est réalisé en remplaçant Cl_2Ca par CO_3Ca à 0,2 p. 100. (Le pH est mesuré à l'aide d'un potentiopH-mètre). On tient compte des pH mesurés sur les milieux au sortir de l'autoclave. On note, en effet, des variations sensibles du pH des milieux de culture avant et après stérilisation. On ensemence et on porte à l'étuve à 29° en atmosphère privée de NH_3 (réalisée par l'emploi d'une étuve relativement étanche, contenant de grandes boîtes de Pétri remplies d'acide sulfurique à 5 p. 100).

On prélève tous les 2 jours, environ 5 cc. de milieu de culture. De ce prélèvement, 0,5 cc. acidifié par 2 gouttes de ClH à 10 p. 100 et complété à 5 cc. avec de l'eau distillée, sert à la mesure

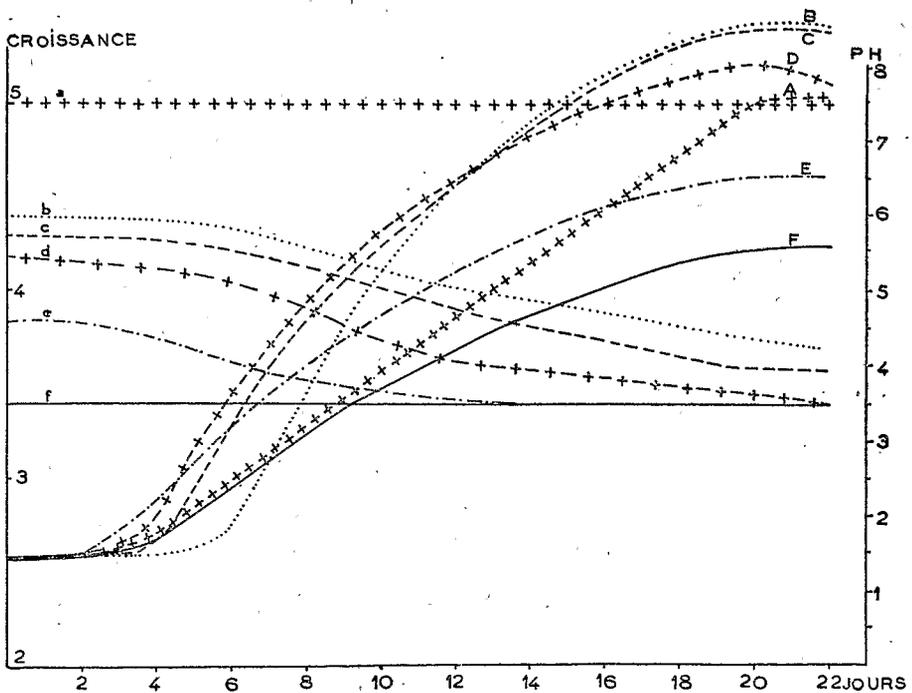


Fig. 4. — A, B, C, D, E, et F courbes de croissance de l'*Azotobacter lactigenes* dans les milieux aux pH respectifs de 7,5-6-5,7-5,45-4,6-3,5.

Le milieu au pH 7,5 a été tamponné par du CO_3Ca .

a, b, c, d, e et f courbes correspondantes indiquant les variations de pH des milieux en fonction de l'âge de la culture,

de l'opacité. Le reste du prélèvement, soit environ 4 cc., est utilisé pour la mesure du pH. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 4.

Par l'examen des courbes, on peut conclure que cet *Azotobacter* est capable de proliférer dans des milieux à pH très différents. On observe en effet une forte croissance pour des pH compris entre 4,5 et 7,5. Ces courbes permettent également de déterminer le pH optimum qui se trouve voisin de 5,5. En effet, les taux maximum de croissance correspondent à un pH voisin de cette valeur. A noter que le taux de croissance demeure constant dans le milieu tamponné à pH 7,5 par du carbonate de calcium ; ce germe a le pouvoir d'acidifier les milieux au Cl_2Ca jusqu'à un pH voisin de 3,5. Au cours de la culture, on n'observe aucune variation de pH lorsque le pH initial du milieu est de 3,5.

V. PRODUITS DE FERMENTATION.

Nous avons recherché les produits de fermentation dans des cultures âgées de 2 mois. Ces recherches ont été faites dans les milieux à pH 7,5 (milieu au CO_3Ca) et dans les milieux dont le pH en fin de culture était de 3,5 (milieu au Cl_2Ca). Ces milieux étaient additionnés de glucose à la dose de 1 g. p. 100. Dans aucun de ces deux milieux nous n'avons pu mettre en évidence des amines, alcools, aldéhydes, phénols, acétone, crésols et acides volatils (par la méthode de Duclaux). Seul de l'acide lactique a pu être caractérisé dans les 2 milieux (acide et alcalin) par le réactif au gaïacol.

VI. RENDEMENT DE FIXATION DE L'AZOTE.

Nous avons recherché le rendement de fixation de l'azote sur un milieu riche en glucose (milieu glucosé à 1 g. p. 100) et sur un milieu où le glucose est le facteur limitant de la croissance de l'*Azotobacter* (milieu glucosé à 0,1 g. p. 100).

1° *Rendement de fixation de l'azote en présence d'un excès de glucose (milieu glucosé à 1 g. p. 100).*

Le milieu de Winogradsky glucosé à 1 g. p. 100 est réparti dans des fioles de Roux et dans des Erlenmeyers de contenance

de 500 cc. à raison de 100 cc. de milieu par flacon. On dispose de milieu au CO_3Ca (0,2 g. p. 100) de $\text{pH} = 7,5$ et de milieu au Cl_2Ca (0,2 g. p. 100) de pH initial = 5. Après stérilisation, on ensemence et on porte à l'étuve à 29° en atmosphère privée de NH_3 .

Après 20 jours de culture, temps nécessaire pour atteindre le maximum de croissance, l'azote fixé est dosé par la méthode de Kjeldahl et le glucose non utilisé par la méthode de G. Bertrand dans les milieux de culture contenus dans les boîtes de Roux. Avant les dosages, on a soin de compléter à 100 cc. avec de l'eau distillée le contenu de chaque fiole.

Dans le cas des milieux de culture répartis dans les Erlenmeyers, les dosages ont été effectués après 35 jours de culture.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

	BOITES DE ROUX		ERLEN.
	$\text{pH}=7,5$	$\text{pH}=5$	$\text{pH}=7,5$
Azote fixé en mg. dans 10 cc de milieu.....	0,28	0,38	0,46
Glucose en mg. utilisé dans 10 cc de milieu.	56,13	72,25	73
Rendement de fixation rapporté à 100 mg. de glucose.....	0,49	0,52	0,63

2° Rendement de fixation de l'azote dans un milieu où le glucose est le facteur limitant de la croissance (milieu glucosé à 0,1 g. p. 100).

Le milieu de Winogradsky au CO_3Ca (0,2 g. p. 100), glucosé à 0,1 g p. 100 est réparti dans des Erlenmeyers de contenance de 500 cc. à raison de 100 cc. de milieu par flacon. Les milieux ensemencés sont portés à l'étuve à 29° en atmosphère privée de NH_3 . On caractérise le glucose à l'aide de l' α naphтол : réaction très sensible permettant de limiter le volume des prélèvements à quelques gouttes de milieu de culture. On dose l'azote fixé dans le volume total du milieu de culture contenu dans chaque Erlenmeyer lorsque la réaction de l' α naphтол devient négative sur un prélèvement de 5 gouttes de milieu de culture (la réaction, dans les conditions d'expérience, devient négative généralement après un mois de culture).

Les dosages ont été faits sur 5 Erlenmeyers. Les rendements de fixation de l'azote rapportés à 100 mg. de glucose ont été les suivants :

1,40 — 1,37 — 1,45 — 1,40 — 1,44.

On constate que, par cette méthode, on obtient un rendement de fixation plus constant et nettement plus élevé que par la méthode précédente utilisant des milieux riches en glucose. Ceci peut s'expliquer par une utilisation plus rationnelle de la substance carbonée par le germe dans les milieux pauvres en glucose.

En conclusion, un nouveau germe fixateur de l'azote atmosphérique a été isolé à partir d'un échantillon de terre provenant de Côte d'Ivoire (région d'Abidjan). Nous avons dénommé ce germe *Azotobacter lacticogenes*.

Ce germe se présente sous la forme d'un coccus mono- ou pluripolaire de 1 à 2 μ de diamètre. Cette caractéristique morphologique le différencie nettement des autres *Azotobacter* qui eux ne possèdent pas de granulations polaires.

Cette nouvelle espèce se distingue par ses colonies blanches, dures et plissées sur milieu au silico-gel ; blanches, bombées et lisses sur gélose. Les vieilles cultures prennent une teinte brun rosé caractéristique.

Le tableau suivant montre quelques caractéristiques physiologiques de l'*Azotobacter lacticogenes* comparativement aux *A. chroococcum* et *Vinelandii* [2] :

AZOTOBACTER	CHROOCO.	VINELAN.	LACTICO.
pH	optimum. ... 7,4 — 7,6 limite inf ^r ... 5,8	7,5 — 7,7 5,9	5 — 5,5 3,5
Température	optimum. ... 27° — 29° limites 9° — 33° de létalité ... 50° pendant 30'	27° — 29° 9° — 33° 50° pendant 30'	26° — 30° 20° — 33° 56° pendant 5'
Produits de fermentation.....	CO ₂	CO ₂	acide lactique
Utilisation du	benzoate + acétate. + propionate... + citrate + lactate. +	+ + + + +	0 0 0 0 0
Formation de kystes.....	+	+	0
Pigments élaborés sur milieu glu- cosé.	brun	vert	brun rosé

L'*Azotobacter lactigenes* est peu sensible aux variations de pH comprises entre 5 et 7,5; par contre, comme le montre le tableau, il est beaucoup plus exigeant pour l'utilisation des substances carbonées que les *A. chroo.* et *Vinel.*

Quant au rendement de fixation de l'*A. lactigenes* dans un milieu riche en glucose, il est de l'ordre de celui que nous avons obtenu avec l'*A. chroococcum* dans les mêmes conditions.

Office de la Recherche Scientifique d'Outre-mer.
(Laboratoire de microbiologie du sol).

BIBLIOGRAPHIE

1. Analyse microbiologique du Sol. Principes d'une nouvelle méthode. *Ann. Inst. Past.* 1932, 48, 89.
2. POCHON (J.) et TCHAN (Y. T.). — *Précis de Microbiologie du Sol*, 1948, Masson et C^{ie}.
3. KAUFFMANN (J.). — *Revue générale de Botanique.* 58, 1951.

Biol. Sol.

REVUE GÉNÉRALE
DE
BOTANIQUE

FONDÉE PAR GASTON BONNIER

PUBLICATION MENSUELLE

(Publiée avec le concours du Centre National de la Recherche scientifique).

COMITÉ DE RÉDACTION :

MM. Blaringhem, Combes, de Cugnac, Eichhorn, Feldmann, Gautheret,
Mangenot, Plantefol.

SECRÉTAIRE DE LA RÉDACTION : M. Ad. Davy de Virville.

Extrait de la Revue générale de Botanique
Tome 59 - 1952

J. KAUFFMANN et P. TOUSSAINT

UN NOUVEAU GERME FIXATEUR
DE L'AZOTE ATMOSPHERIQUE :
AZOTOBACTER LACTICOGENES

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

1952

11899