

SUR LE POUVOIR FIXATEUR DE L'AZOTE ATMOSPHERIQUE DES TERRES DE RÉGIONS TROPICALES

par J. KAUFFMANN, P. TOUSSAINT et M^{lle} G. BOQUEL (*).

*(Office de la Recherche Scientifique Outre-Mer,
Laboratoire de Microbiologie du sol.)*

Plusieurs méthodes ont été décrites pour déterminer le pouvoir fixateur de l'azote libre des terres. La méthode standard consistait à doser, au bout de vingt-cinq à trente jours de culture, l'azote fixé par une solution de terre à 10 p. 100 enrichie de mannite. Winogradsky [4] emploie un milieu nutritif rendu solide par le gel de silice et ensemencé avec un poids connu de terre. L'azote fixé est dosé après quelques jours de culture à l'étuve.

Nous avons recherché l'influence de la quantité de terre ensemencée sur le rendement de fixation de l'azote (azote fixé en milligrammes rapporté à 100 mg de glucose utilisé). Nous avons opéré en milieu liquide. Cette méthode permet, en effet, de mesurer l'activité fixatrice de la microflore totale du sol (germes aérobies et anaérobies). On évalue en quelque sorte l'activité des agents inhibiteurs et activateurs des germes fixateurs de l'azote atmosphérique. Nos recherches ont porté sur des échantillons de terre provenant de Côte d'Ivoire. Ces échantillons ont été prélevés au début du mois de juillet 1951 (pendant la saison des pluies), respectivement dans une terre sous forêt, dans une terre de forêt maintenue dénudée depuis un an, le troisième échantillon provenant d'une terre de forêt dénudée, abandonnée à la végétation (parcelle repousse). Primitivement, ces deux dernières parcelles étaient recouvertes par la forêt.

Les dosages de l'azote total et du carbone organique par la méthode de Anne ont donné les résultats suivants :

ÉCHANTILLONS	N TOTAL en g p. 100	C ORGANIQUE en g p. 100	N NITRIQUE	C/N
Forêt.	0,09	0,95	0	9,69
Parcelle dénudée.	0,05	0,52	0	9,12
Parcelle repousse.	0,06	0,62	0	9,53

(*) *Société française de Microbiologie*, séance du 3 juillet 1952.

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

Collection de Référence

n° 13605

Nous avons recherché dans ces terres la densité des germes fixateurs de l'azote atmosphérique par la méthode au silico-gel de Winogradsky [2] avec ensemencement de grains de terre. Le gel de silice a été enrichi avec les éléments nutritifs suivants :

Solution saline de Winogradsky	5 cm ³ p. 100.
CO ₂ Ca	0,2 g p. 100.
Glucose	1 g p. 100.

Dans ces conditions nous n'avons dénombré aucune colonie d'*Azotobacter* après un séjour de quinze jours à l'étuve à 29°.

En mettant les plaques ensemencées en atmosphère privée d'oxygène (dans un dessiccateur contenant du pyrogallate de sodium) on trouve les résultats suivants :

ÉCHANTILLONS DE TERRE	GRAINS DE TERRE
	positifs p. 100
Forêt	20
Parcelle dénudée	10
Repousse	100

Ces terres sont donc différemment riches en *Clostridium* fixateurs de l'azote libre.

INFLUENCE DE LA QUANTITÉ DE TERRE ENSEMENCÉE SUR LE RENDEMENT DE FIXATION DE L'AZOTE ATMOSPHÉRIQUE.

Pour cette recherche, nous avons utilisé le milieu de culture suivant :

Solution saline de Winogradsky	5 cm ³ p. 100.
CO ₂ Ca	0,2 g p. 100.
Glucose	0,1 g. p. 100.

Ce milieu est réparti dans les Erlenmeyers de différentes capacités (100, 200 et 500 cm³) à raison de 50 cm³ de milieu par flacon). On réalise ainsi des rapports $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ voisins de 1,5 — 1 et 0,5. L'ensemencement a été réalisé comme suit :

On utilise de la terre séchée et broyée au mortier. On opère le plus stérilement possible. On ensemence avec : 2, 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1 et 0,05 g de terre chaque Erlenmeyer. Après un mois de culture à l'étuve à 29°, on caractérise la présence des sucres dans les différents milieux (il suffit de II à III gouttes de liquide) à l'aide de l' α -naphthol.

On dose l'azote total du contenu de chaque Erlenmeyer (milieu liquide + terre) par la méthode de Kjeldahl. Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux I et II.

Les taux en azote indiqués correspondent à l'azote total dosé en fin d'expérience diminué de l'azote apporté par la terre d'ensemencement.

L'examen des tableaux I et II montre que :

TABLEAU I.

Quantités de terre ensemencées en g. par flacon	Terre de la parcelle dénudée ensemencée dans des Erlenmeyers de								
	100cm ³			200cm ³			500cm ³		
	α	N	R%	α	N	R%	α	N	R%
Témoin	+	0,1			0,1			0,1	
0,05	+	0,13	0,06	+	0,14	0,08	+	0,13	0,06
0,1	+	0,13	0,06	+	0,14	0,08	+	0,14	0,08
0,2	o	0,84	1,48	+	0,14	0,08	+	0,14	0,08
0,4	o	0,75	1,30	o	0,75	1,30	+	0,14	0,08
0,6	o	0,67	1,14	o	0,67	1,14	+	0,14	0,08
0,8	o	0,64	1,08	o	0,68	1,08	+	0,42	0,64
1	o	0,72	1,24	o	0,58	0,96	o	0,61	1,02
2	o	0,56	0,92	o	0,58	0,96	o	0,64	1,08

Abréviation: α = réaction du milieu à l'α-naphtol

1° Il faut une quantité de terre minimum pour provoquer un démarrage de la flore microbienne fixatrice de l'azote libre. Ce « seuil de démarrage » est fonction de l'échantillon de terre et de l'aération du milieu.

Pour la forêt et la parcelle dénudée, il faut d'autant plus de terre pour atteindre le seuil de démarrage que le milieu est plus aéré.

Le « seuil de démarrage » de la terre « repousse » n'est pratiquement pas influencé par l'aération.

Les milieux de culture montrant, après un mois de culture, une réaction positive à l'α-naphtol (cas des flacons ensemencés avec de petites quantités de terre) se sont montrés également positifs après deux mois de culture à l'étuve. Nous avons constaté que, si la croissance n'a pas eu lieu pendant les huit premiers jours après l'ensemencement, la croissance bactérienne est définitivement arrêtée. Le microscope ne révèle alors que quelques germes plus ou moins lysés par champ microscopique.

TABLEAU II.

Quantités de terre ensemencées en g. par flacon	Terre de "repousse" ensemencée dans des Erlenmeyers de :								
	100cm ³			200cm ³			500cm ³		
	α	N	R%	α	N	R%	α	N	R%
Témoin	+	0,1		+	0,1		+	0,1	
0,05	+	0,15	0,1	+	0,1	0,0	+	0,13	0,06
0,1	+	0,14	0,08	+	0,25	0,3	+	0,25	0,3
0,2	o	0,67	1,14	o	0,58	0,96	o	0,70	1,2
0,4	o	0,81	1,42	o	0,81	1,42	o	0,78	1,36
0,6	o	0,56	0,92	o	0,64	1,08	o	0,61	1,02
0,8	o	0,58	0,96	o	0,58	0,96	o	0,56	0,92
1	o	0,64	1,08	o	0,58	0,96	o	0,53	0,86
2	o	0,56	0,92	o	0,44	0,68	o	0,50	0,8

Abréviations: α = réaction du milieu à 1' α-naphtol.

2° Le rendement de fixation de l'azote libre passe par un maximum voisin de 1,4 (rendement voisin de celui de l'*Azotobacter chroococcum*). Ce rendement maximum est de même fonction de l'échantillon de terre et de l'aération du milieu. La forêt possède le plus faible rendement maximum. L'aération affecte la terre sous forêt et la parcelle dénudée en provoquant une baisse du rendement. La parcelle dénudée abandonnée à la végétation ne semble pas être affectée par l'aération.

La quantité de terre ensemencée nécessaire pour atteindre ce rendement maximum est aussi fonction de l'échantillon et de l'aération du milieu. Sauf pour la terre « repousse », il faut d'autant plus de terre pour atteindre ce rendement maximum que le milieu est plus aéré.

L'examen microscopique des milieux de culture riches en azote révèle une forte croissance de *Clostridium* et d'*Azotobacter lactigenes*.

Par suite d'une erreur, dont nous nous excusons, le tableau relatif au pouvoir fixateur de la terre de « Forêt » n'a pas été publié. (Note de l'auteur.)

L'azote et le carbone organiques contenus dans la terre ne semblent pas jouer un rôle important sur le rendement et sur le « seuil de démarrage ». En effet, le rendement dans les Erlenmeyer de 100 cm³ ensemencés avec 2 g de terre est le même pour les 3 échantillons de terre. Quant au « seuil de démarrage », celui-ci dépend surtout du $\frac{S}{V}$ des milieux de culture. La densité des *Clostridium* fixateurs dans les différents échantillons de terre déterminée par la méthode au silicogel n'explique pas davantage le phénomène.

Nous avons recherché l'influence de l'azote ammoniacal et nitrique, de l'extrait stérile et non stérile de la terre sous forêt sur l'azote fixé par la terre de la parcelle dénudée. Nous avons utilisé le même milieu de culture que pour l'expérience précédente. Seuls, les Erlenmeyers de 100 cm³ ont été utilisés. Nous avons opéré comme suit :

- 1° Erlenmeyer ensemencé avec la terre de la parcelle dénudée.
- 2° — — — — — + SO₄ (NH₄)₂
- 3° — — — — — + NO₃K.
- 4° — — — — — + extrait non stérile.
- 5° — — — — — + extrait stérile.

L'azote ammoniacal et nitrique ajouté dans chaque Erlenmeyer correspond à la quantité d'azote total contenu dans 0,5 g de terre sous forêt. De même les extraits stériles et non stériles (dépourvus d'azote ammoniacal et nitrique) correspondent à 0,5 g de terre sous forêt. Les extraits ont été réalisés à froid pour éviter toute hydrolyse. L'extrait stérile a été obtenu par filtration sur bougie L3. Les quantités de terre de la parcelle dénudée ense-

TABLEAU III.

Poids de terre (parcelle dénudée) ensemencée en g.		Terre seule	Terre + NH ₃	Terre + NO ₃ K	Terre + extrait stérile	Terre + extrait non stérile
0,1	N total	0,2	0,75	0,82	0,2	0,2
	N fixé	0,14	0,22	0,28	0,14	0,14
0,2	N total	0,95	0,87	0,92	0,95	0,95
	N fixé	0,84	0,28	0,34	0,84	0,84
0,4	N total	0,92	1,06	0,92	0,92	0,92
	N fixé	0,7	0,36	0,22	0,7	0,7
0,6	N total	1,04	1,04	1,04	1,04	1
	N fixé	0,61	0,22	0,22	0,59	0,59
1	N total	1,29	1,32	1,37	1,29	1,29
	N fixé	0,67	0,22	0,28	0,67	0,67

mencées ont été respectivement de 1, 0,6, 0,4, 0,2 et 0,1 g par Erlenmeyer.

Après un mois de culture à l'étuve à 29°, nous avons obtenu les résultats résumés dans le tableau III (à noter que, en fin d'expérience, il n'y avait plus trace de NO_3 ou de NH_3 dans les milieux de culture).

De ces résultats, on peut conclure que :

1° L'azote organique dosé dans les milieuxensemencés avec de fortes quantités de terre (0,4, 0,6 et 1 g) est indépendant de l'azote combiné, ou de l'extrait de terre additionné au milieu de culture. Le rendement en azote organique est donc pratiquement le même, que la source de l'azote soit sous forme libre ou combinée.

2° Dans les milieuxensemencés avec de faibles quantités de terre (0,2 et 0,1 g), NH_3 et NO_3 favorisent le démarrage et permettent d'atteindre le maximum de rendement en azote organique en complétant l'azote combiné ajouté dans le milieu de culture par de l'azote gazeux.

CONCLUSIONS.

Il faut ensemencer une quantité minimum de terre dans le milieu de culture pour provoquer le démarrage de la flore microbienne fixatrice de l'azote libre. Cette quantité minimum de terre, que nous avons appelée « seuil de démarrage », est fonction de la nature de la terre et de l'aération du milieu de culture.

Le rendement de fixation de l'azote libre par la microflore totale d'un sol est fonction de la quantité et de la nature de la terreensemencée, ainsi que de l'aération du milieu de culture. Pour la terre sous forêt et surtout pour la terre « nue », il faut ensemencer d'autant plus de terre pour atteindre le « seuil de démarrage » et le rendement maximum que le milieu de culture est plus aéré. Le « seuil » et le rendement de la terre nue abandonnée à la végétation ne sont pratiquement pas influencés par l'aération. L'azote et le carbone organiques contenus dans la terre ainsi que la densité des germes fixateurs de celle-ci ne semblent pas jouer un rôle important sur le rendement et sur le « seuil de démarrage ».

Un faible apport en azote ammoniacal ou nitrique dans une terre pauvre en bactéries actives diminue le « seuil de démarrage » et provoque une fixation de l'azote libre par la microflore fixatrice qui, sans cet apport en azote combiné, demeurerait inactive et sans action dans le sol.

BIBLIOGRAPHIE

[1] S. WINOGRADSKY. *Ces Annales*, 1926, 40, 445.

[2] S. WINOGRADSKY. *Ces Annales*, 1932, 48, 89.

Bis. Sub

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Novembre 1952. — Tome 83.)

SUR LE POUVOIR FIXATEUR
DE L'AZOTE ATMOSPHERIQUE DES TERRES
DE RÉGIONS TROPICALES
PAR
J. KAUFFMANN, P. TOUSSAINT et M^{lle} G. BOQUEL



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

136φ5