

Jacques KAUFFMANN

DOCTEUR ÈS SCIENCES
ANCIEN ÉLÈVE DE L'INSTITUT PASTEUR
CHARGÉ DE RECHERCHES
A L'OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE OUTRE-MER

**CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE
DE QUELQUES GERMES
OLIGONITROPHILES DU SOL**

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

1951

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE
DE QUELQUES GERMES
OLIGONITROPHILES DU SOL

Jacques KAUFFMANN

DOCTEUR ÈS SCIENCES
ANCIEN ÉLÈVE DE L'INSTITUT PASTEUR
CHARGÉ DE RECHERCHES
A L'OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE OUTRE-MER

**CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE
DE QUELQUES GERMES
OLIGONITROPHILES DU SOL**

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

1951

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE DE QUELQUES GERMES OLIGONITROPHILES DU SOL

par M. Jacques KAUFFMANN

RÉSUMÉ

Le but de ce travail a été de rechercher quelques particularités physiologiques de onze germes oligonitrophiles isolés du sol.

Ces germes ne sont pas capables de fixer l'azote atmosphérique mais peuvent proliférer sur des milieux contenant des traces d'azote combiné. Quant à l'utilisation de l'azote nitrique, certaines souches réduisent les nitrates en nitrites. Cette réduction est fonction de l'aération du milieu, de sa teneur en ammoniacque et en substances organiques. L'action du lactate sur cette réduction a pu être précisée grâce à la mise au point d'un dosage biologique des nitrates.

L'étude du pouvoir ammonificateur de ces germes et de leurs actions sur les différentes fonctions physiologiques des Azotobacter (croissance, production de substance noire et rendement de fixation) permet de constater que les germes oligonitrophiles peuvent jouer dans le sol, en association avec d'autres germes, des rôles non négligeables.

INTRODUCTION

Au cours de la quinzaine d'années qui a suivi la découverte des *Azotobacter* par BEIJERINCK (1901) [3], la recherche des microbes fixateurs d'azote dans le sol a attiré un grand nombre de chercheurs. Partout on a isolé de nouveaux germes fixateurs d'azote. Voici la liste de ces germes que l'on trouve dans le traité de WAKSMANN [28].

Bact. lactis viscosum.

— *pneumoniae.*

— *radiobacter.*

- *prodigiosum*.
- *aerogenes*.
- *pyocyaneum*.
- *vulgare*.
- *malabarensis*.
- *danicus*.
- *asterosporus*.
- *azophile*.

Planobacillus nitrofigens.

Cette liste est d'ailleurs loin d'être complète. Tous ces germes prétendus fixateurs d'azote ne donnent qu'un faible gain en azote dans les milieux de culture et les résultats ne sont pas constants. En effet SKINNER [25], étudiant 25 souches de *B. aerogenes*, n'obtint un gain en azote qu'avec trois d'entre elles et ce gain fut minime. Les mêmes résultats inconstants furent observés avec *B. cloacae*.

A la suite de ces données, on fut obligé de distinguer 2 catégories de fixateurs aérobies : les fixateurs spécialisés (*Azotobacter*) et les fixateurs non spécialisés, saprophytes banaux.

La grande différence entre ces deux types de fixateurs réside dans le fait que seuls les *Azotobacter* sont capables de proliférer sur un milieu dépourvu d'azote. De plus, la présence d'aliment azoté dans le milieu de culture inhibe la fixation. Rien de tel dans le deuxième groupe : ces fixateurs non spécialisés présentent, au contraire, une faible croissance atteignant rapidement son maximum, possèdent un taux de fixation faible, instable et indifférent à la présence de substance azotée dans le milieu de culture.

WINOGRADSKY [31a] mit cette deuxième catégorie de germes dans la rubrique des « fixateurs artificiels ». Il les désigna ainsi car il n'a jamais constaté de fixation sans *Azotobacter* dans ses expériences avec la terre et n'a jamais trouvé, dans les milieux naturels, de bactéries capables de pulluler sur un milieu dépourvu d'azote combiné hormis les *Azotobacter*.

HOPKINS [7], MARIE LÖHNIS [16], ALLISON [1], ont fait des recherches sur la quantité d'azote fixé par les *Rhizobium* en culture pure en employant la méthode de KJELDAHL. Ces auteurs ont montré que le gain en azote trouvé provenait d'un manque de perte et non d'un gain. En effet le témoin perd son azote nitrique

au dosage de Kjeldahl tandis qu'il est utilisé par la culture. Quant à NH_3 , Marie LÖHNIS montra qu'il peut s'exhaler spontanément des liquides faiblement alcalins pendant un long séjour à l'étuve. Ici encore, ce ne sont que les milieux stériles qui le libèrent, cet azote étant immédiatement utilisé par les milieux peuplés.

ALLISON [1] a pu ainsi démontrer que les radicicoles des Légumineuses, contrairement à l'opinion généralement admise, étaient incapables de fixer de l'azote en pullulant, hors de la plante, en culture pure.

Existe-t-il, en dehors du groupe *Azotobacter*, des organismes bactériens aérobies capables de fixer l'azote moléculaire ?

D'après WINOGRADSKY [31a], il n'est pas impossible qu'il en existe quelques-uns aptes à une activité fixatrice très réduite, mais seules des expériences avec un milieu strictement dépourvu d'aliment azoté, avec un contrôle chimique précis, peuvent répondre à cette question.

BELJERINCK [3] définit ainsi les germes oligonitrophiles : « Microbes qui, dans la libre concurrence avec les autres microbes, se développent dans un milieu nourricier où l'on n'a pas introduit avec intention des composés azotés, mais d'où l'on n'a pas non plus pris soin d'enlever les dernières traces de ce composé. Ils ont la propriété de fixer, soit seuls, soit en symbiose avec d'autres germes, l'azote atmosphérique libre afin de s'en servir comme nourriture ».

Deux questions essentielles se posent : Ces germes possèdent-ils un pouvoir fixateur ? Si non, quelle est la quantité d'azote combiné nécessaire à leur développement ?

C'est à ces deux questions que nous nous proposons de répondre dans la première partie de ce travail. Nous étudierons ensuite quelques particularités du métabolisme azoté d'un certain nombre de germes oligonitrophiles. La dernière partie de ce travail sera consacrée aux rapports de cette catégorie de microorganismes avec les *Azotobacter*.

Nous avons adopté le plan d'étude suivant :

- INTRODUCTION.
- I : TECHNIQUES GÉNÉRALES.
- II : NUTRITION AZOTÉE MINÉRALE.
- ETUDE DU RAPPORT $\frac{C}{N}$
- III : RECHERCHES SUR LA RÉDUCTION DES NITRATES.
- IV : POUVOIR AMMONIFICATEUR.
- V : RAPPORTS ENTRE GERMES OLIGONITROPHILES ET AZOTOBACTER.
- VI : CONCLUSIONS.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à M. le Professeur J. TREFOUEL, Directeur de l'Institut Pasteur, Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine, qui a bien voulu nous accueillir à l'Institut Pasteur. Nous exprimons notre gratitude envers M. le D^r J. POCHON qui nous a reçu dans son Laboratoire et qui, par ses conseils éclairés, a été un guide constant dans nos recherches.

Nos respectueux sentiments vont à MM. les professeurs R. COMBES, E. AUBEL et A. EICHHORN qui ont bien voulu accepter d'être membres du Jury. Nous remercions amicalement M. Y. T. TCHAN qui a suivi attentivement toutes nos recherches ainsi que M. P. TOUSSAINT pour l'aide qu'il nous a apportée dans la mise au point de ce manuscrit. Nous ne voulons pas oublier Mme J. LAJUDIE, Mlle CHALVIGNAC, MM. J. AUGIER et T. L. WANG dont la cordialité nous a assuré un séjour très agréable au Laboratoire.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES GÉNÉRALES

Nous allons exposer le détail des techniques que nous avons utilisées.

1. — ORIGINE DES SOUCHES

Les souches oligonitrophiles que nous possédons proviennent d'échantillons de terre prélevés en A.O.F., en Beauce et dans les Alpes. Nous les désignerons par les lettres A, B, C... M. Les souches D et M ont été perdues au cours des expériences.

Les souches A et B proviennent de Beauce ; C, E, F, d'A.O.F. ; et G, H... M. des Alpes.

2. — CARACTÉRISATION DES SOUCHES

A) CARACTÈRES COMMUNS A TOUTES LES SOUCHES

Ce sont des germes aérobies stricts, immobiles, capsulés, présentant des granulations internes se colorant facilement par le violet de gentiane ; prenant difficilement le Gram ; utilisant très bien le benzoate de sodium, l'oxalate de sodium, le saccharose et le glucose comme source carbonée.

B) CARACTÈRES DE CHAQUE SOUCHE PERMETTANT DE LES DIFFÉRENCIER

Pour étudier l'utilisation de diverses substances carbonées par les différentes souches, nous avons opéré en milieu liquide, minéral, dans lequel on a ajouté, à la dose de 1 g. p. 100, la substance carbonée que l'on désire étudier. La croissance du germe, plus ou moins active, indique une attaque plus ou moins rapide de cette substance.

Souche A.

Morphologie : Cellules ellipsoïdales de grande taille, tendance à donner des ramifications et parfois même une apparence de mycélium.

Gélose inclinée : Grosses colonies blanches (3-4
(à base de bouillon) mm.).

10 ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE GERMES OLIGONITROPHILES

<i>Bouillon</i>	:	Limpide - Dépôt.
<i>Eau peptonée</i>	:	Floconneuse au fond du tube.
<i>Lait</i>	:	Légère acidification et coagulation.
<i>Substances carbonées</i>	:	N'utilise par les butyrate, pyruvate, citrate, propionate de sodium.

Souche B.

<i>Morphologie</i>	:	Coccobacille se groupant en amas.
<i>Gélose inclinée</i>	:	Colonies muqueuses, petites (1/2 mm.), blanches.
<i>Bouillon</i>	:	Trouble uniforme.
<i>Eau peptonée</i>	:	Trouble uniforme.
<i>Lait</i>	:	Non coagulé.
<i>Substances carbonées</i>	:	Utilise les pyruvate, citrate, tartrate de sodium. N'utilise pas le butyrate et le propionate de sodium.

Souche C.

<i>Morphologie</i>	:	Bâtonnets présentant des granulations très nettes.
<i>Gélose inclinée</i>	:	Colonies bombées, petites (1/2 mm.) pigmentées (jaune orange).
<i>Bouillon</i>	:	Grumeleux.
<i>Eau peptonée</i>	:	Grumeleuse.
<i>Lait</i>	:	Non coagulé, nette alcalinisation.
<i>Substances carbonées</i>	:	Utilise le pyruvate, citrate, propionate de sodium. N'utilise pas le butyrate de sodium.

Souche E.

<i>Morphologie</i>	:	Bâtonnets présentant des granulations très nettes.
<i>Gélose inclinée</i>	:	Colonies isolées, petites (1 mm.) pigmentées (rouge).

- Bouillon* : Trouble avec dépôt.
Eau peptonée : Voile à la surface. Aspect grumeleux.
Lait : Non coagulé. Nette alcalinisation.
Substances carbonées : Utilise les pyruvate, citrate, propionate de sodium. N'utilise pas les butyrate, tartrate de sodium.

Souche F.

- Morphologie* : Bâtonnets. Tendance à donner des ramifications.
Gélose inclinée : Colonies bombées, petites (1 mm.) blanches.
Bouillon : Voile à la surface adhérant aux parois du tube.
Eau peptonée : Trouble uniforme, floconneux à la partie inférieure du tube.
Lait : Non coagulé. Légère acidification.
Substances carbonées : Utilise les pyruvate, citrate, propionate de sodium. N'utilise pas les butyrate et tartrate de sodium.

Souche G.

- Morphologie* : Petit bacille présentant généralement une seule granulation centrale.
Gélose inclinée : Grosses colonies (4-5 mm.), muqueuses, bombées, d'aspect laiteux.
Bouillon : Voile très fin à la surface adhérant au tube. Trouble uniforme.
Eau peptonée : Trouble uniforme.
Lait : Non coagulé, légère alcalinisation.

Substances carbonées : Utilise le pyruvate, propionate, citrate de sodium. Le butyrate de sodium est faiblement attaqué.

Souche H.

Morphologie : Petit bacille.
Gélose inclinée : Colonies petites (1-2 mm.), bombées, d'aspect laiteux.
Bouillon : Agglutination des germes au fond du tube.
Eau peptonée : Aspect grumeleux.
Lait : Non coagulé, nette alcalinisation.
Substances carbonées : Utilise les propionate, pyruvate, butyrate, citrate de sodium. Le tartrate de sodium est faiblement attaqué.

Souche I.

Morphologie : Forme bacillaire présentant des granulations peu visibles.
Gélose inclinée : Très petites colonies d'aspect rugueux, de couleur verdâtre.
Bouillon : Voile très fin à la surface, agglutination des germes au fond du tube.
Lait : Non coagulé.
Substances carbonées : Utilise les butyrate, citrate de sodium. N'utilise pas le propionate de sodium.

Souche J.

Morphologie : Coccobacille s'agglutinant en formant des réseaux sur la lame.
Gélose inclinée : Très petites colonies, aspect rugueux, pigmentées (verdâtre).

<i>Bouillon</i>	:	Pas de voile superficielle. Trouble homogène. Dépôt.
<i>Eau peptonée</i>	:	Trouble uniforme. Dépôt.
<i>Lait</i>	:	Non coagulé.
<i>Substances carbonées</i>	:	Utilise les butyrate, citrate de sodium. N'utilise pas les pyruvate et propionate de sodium.

Souche K.

<i>Morphologie</i>	:	Bacille présentant des granulations peu visibles.
<i>Gélose inclinée</i>	:	Petites colonies (1 mm.) bombées, blanches.
<i>Bouillon</i>	:	Limpide. Dépôt.
<i>Eau peptonée</i>	:	Trouble uniforme. Dépôt.
<i>Lait</i>	:	Non coagulé.
<i>Substances carbonées</i>	:	Utilise le citrate de sodium. N'utilise pas les pyruvate, propionate et butyrate de sodium.

Souche L.

<i>Morphologie</i>	:	Bacille.
<i>Gélose inclinée</i>	:	Colonies de 2 mm., bombées, verdâtres.
<i>Bouillon</i>	:	Trouble homogène. Dépôt.
<i>Eau peptonée</i>	:	Trouble homogène.
<i>Lait</i>	:	Non coagulé.
<i>Substances carbonées</i>	:	Utilise faiblement le propionate de sodium. N'utilise pas les pyruvate et butyrate de sodium.

3. — PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS DE TERRE

L'échantillon de terre est prélevé à une dizaine de centimètres de la surface du sol. L'échantillon est passé ensuite à travers un tamis de 5 mm. puis introduit dans un flacon préalablement lavé à l'eau distillée. On opère le plus stérilement possible.

Il est préférable de ne pas boucher hermétiquement le flacon si l'échantillon n'est étudié que dans un délai assez long (plusieurs semaines). En effet, une atmosphère confinée favorise la pullulation des germes anaérobies au détriment des aérobies; le métabolisme des matières organiques est changé et la microflore de l'échantillon ne se trouve plus dans les conditions initiales. Il y a accumulation de nombreux produits de fermentation pouvant être toxiques pour certains germes et favorables pour d'autres. L'équilibre biologique de l'échantillon est modifié. De nombreux germes, jusqu'alors inactifs, apparaissent et, réciproquement, des germes, qui initialement possédaient une grande activité, ont disparu.

C'est ainsi qu'une étude de la flore totale par la technique des terres moulées qui consiste à remplir entièrement la boîte de Pétri avec la terre humidifiée à saturation, montre, pour un même échantillon réparti dans deux boîtes de Pétri dont l'une avait été additionnée de 0 cc., 1 p. 100 d'alcool éthylique et l'autre de 0 cc., 5 p. 100, un paysage microbien tout à fait différent dans les 2 cas. Ceci indique qu'une faible variation dans la concentration d'un métabolite quelconque au sein du sol peut influencer profondément l'équilibre biologique de ce sol. Il est donc nécessaire, pour la conservation des échantillons de terre, de mettre ceux-ci dans les conditions qui se rapprochent le plus possible de celles où se trouvait la terre avant le prélèvement.

4. — ISOLEMENT ET CULTURE

A) CULTURE SUR SILICO-GEL

(technique de WINOGRADSKY [31b]).

a) Préparation du silico-gel.

On mélange à volumes égaux du ClH $d = 1,10$ ($o=Bé=13$) et du silicate de soude $d = 1,06$ ($o=Bé=6,8$). Le silicate est versé dans l'acide. On agite soigneusement. On répartit le mélange dans des boîtes de Pétri de 10 cm. de diamètre à raison de 30 cc. par boîte. On laisse prendre en masse jusqu'à ce que le gel vibre bien sous le choc, ce qui nécessite environ 24 heures. On lave à l'eau courante pendant 3 jours pour éliminer ClH et ClNa en excès, puis plusieurs fois à l'eau distillée; quand la dernière eau de lavage

ne donne plus de précipité avec NO_3Ag , les plaques peuvent alors être conservées à l'abri de la dessiccation pendant plusieurs mois sans altération. Ce milieu, strictement minéral, n'est qu'un support auquel on ajoute des sels et la matière carbonée nécessaire à la nutrition des germes que l'on désire étudier. L'addition de sels se fera sous la forme de la solution standard de Winogradsky.

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	1	g.
SO_4Mg	0,5	—
ClNa	0,5	—
SO_4Fe	0,01	—
SO_4Mn	0,01	—
H_2O distillée	200	cc.

La solution est amenée à pH : 7,2 avec de la soude ; à cette solution saline standard on ajoute du glucose dans la proportion de 1 p. 100, c'est la substance carbonée que nous avons fournie aux germes oligonitrophiles au cours de nos expériences.

b) *Imprégnation de la plaque de silico-gel.*

On lave les plaques à l'eau distillée bouillante. Dans une fiole on prépare 2 cc. de solution saline standard, 0,5 g. de glucose et 0,5 g. de carbonate de calcium. On porte à l'ébullition pendant quelques minutes et l'on verse cette solution à la surface du gel. Les plaques sont alors mises, sans couvercle, à l'étuve à 55°. On arrête le séchage lorsque la surface devient mate.

c) *Ensemencement.*

On emploie la technique des grains de terre. Elle consiste à prélever avec une baguette de verre effilée dont on humecte l'extrémité, de petites particules de terre du volume d'une demi-tête d'épingle, à les déposer en les alignant régulièrement sur la surface du gel, espacées les unes des autres d'environ 8 mm. On retourne les plaques ainsiensemencées et on les porte à l'étuve à 30°. Les germes oligonitrophiles se développent dans les 24 heures, précédant ainsi les *Azotobacter*.

d) *Isolement.*

Pour obtenir les souches bactériologiquement pures, on se sert de tubes de gélose inclinée dont la préparation se fait comme suit : laver à l'eau du robinet, puis à l'eau distillée, 15 g. de gélose ordinaire ; la dissoudre dans 1000 cc. d'eau, ajouter ensuite 50 cc.

de solution de Winogradsky, 5 g. de CO_3Ca et 10 g. de glucose. Amener à pH : 7,2 et filtrer. Répartir dans les tubes à essais, boucher au coton, stériliser à 115°C pendant 20 minutes et incliner.

A partir d'une colonie située autour d'un grain de terre sur la plaque de silico-gel, on ensemence les tubes de gélose en stries. Dès l'apparition de colonies isolées (généralement après 12 heures) on repique celles-ci sur un autre tube et on vérifie leur pureté au microscope. On obtient ainsi des cultures pures après le deuxième ou le troisième passage.

B) CULTURE EN MILIEU LIQUIDE.

Pour l'étude du métabolisme azoté il est nécessaire de faire les cultures en milieu liquide. Nos germes étant strictement aérobies, nous avons réalisé l'aération des milieux liquides en agissant sur le rapport $\frac{\text{Surface}}{\text{Volume}}$. Pour ce faire, nous avons utilisé au cours de nos expériences les boîtes de Roux et les tubes Legroux qui permettent de réaliser un rapport $\frac{S}{V}$ suffisamment grand.

La préparation de ce milieu liquide se fait en ajoutant 50 cc. de milieu de Winogradsky, 5 g. de CO_3Ca et 10 g. de glucose à 1 litre d'eau distillée.

Le pH est ajusté à 7,2.

5. — CONSERVATION DES SOUCHES

La conservation des souches se fait sur gélose inclinée additionnée des substances nutritives auxquelles on ajoute une source azotée : soit $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ dans la proportion de 0 g. 1 p. 100, soit NO_3K à la même concentration. On capuchonne les tubes une huitaine de jours après l'ensemencement. Les souches sont repiquées tous les deux mois.

6. — NUMÉRATION DES GERMES

La numération des germes se fait indirectement en mesurant l'opacité du milieu de culture à l'aide de l'électrophotomètre (écran bleu pour l'électrophotomètre de Meunier ou une longueur d'onde de 4600 \AA pour l'électrophotomètre de Bonet-Maury à réseau). Nous avons utilisé les deux techniques suivantes :

A) MESURE SANS DILUTION.

On prélève environ 5 cc. de milieu de culture. On acidifie par 3 gouttes de ClH à 10 p. 100 afin de dissoudre les précipités de phosphate et de calcaire pouvant fausser les résultats. Des essais comparatifs montrent que la quantité d'acide ajouté n'influence pas d'une façon notable la densité optique de la solution à mesurer.

B) MESURE AVEC DILUTION.

On prélève environ 1 cc. de milieu de culture à l'aide d'une pipette Pasteur. De cette quantité, on prélève, après agitation, 0,5 cc. On complète à 5 cc. avec de l'eau distillée. On acidifie par une goutte de ClH à 10 p. 100.

L'avantage de cette méthode réside dans la faible quantité prélevée, ce qui n'influence pratiquement pas le volume du milieu de culture; d'autre part, les courbes obtenues sont beaucoup plus régulières : la sensibilité du photomètre étant plus grande pour les faibles opacités.

7. — DOSAGE DE L'AZOTE

A) DOSAGE COLORIMÉTRIQUE.

On fait une gamme-étalon à partir de l'oxalate d'ammonium pur. On pèse 0,417 g. de $C_2O_4(NH_4)_2, H_2O$ qui correspond à 0,1 g. de NH_3 . On prépare une série de dilutions dans des flacons jaugés de 100 cc. de façon à obtenir une série de concentrations allant de 0,5 à 3,5 γ de NH_3 par cc. Les dilutions sont faites avec de l'eau bidistillée, exempte de NH_3 . Le réactif de Nessler est ajouté à la dose de 2 cc. pour 98 cc. de solution. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant. Les mesures sont faites à l'aide de l'électrophotomètre de Meunier (écran bleu) :

<i>Solutions</i>	<i>Graduations</i>
Témoin.	23
0,5 γ de NH_3 /cc.	37
1,5 —	57
2,5 —	77
3 —	87
3,5 —	90

Courbe représentative :

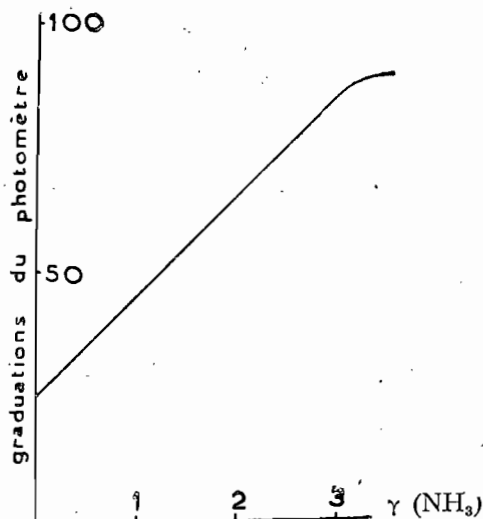


Fig. I. — Dosage colorimétrique de l'ammoniaque : Courbe représentative de l'étalonnage du photomètre de MEUNIER (écran bleu) en fonction de la teneur en NH_3 du milieu.

On remarque que la courbe est une droite pour les concentrations de 0,5 à 3 γ de NH_3 par cc. Pour plus de précision, on se tiendra dans les limites de 0 à 2,5 γ /cc.

B) DOSAGE DE NH_3 LIBRE PAR ALCALIMÉTRIE.

Le milieu est alcalinisé par CO_3Na_2 ou CO_3Mg ; NH_3 libéré est entraîné par la vapeur d'eau puis fixé dans un excès de SO_4H_2 titré. On dose NH_3 fixé par retour avec une solution de NaOH titrée.

C) DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL.

On utilise la méthode de Kjeldahl. Nos milieux de culture sur lesquels on opère ce dosage ne comportant aucune trace d'azote sous forme de nitrate ou de nitrite, on détruit directement la matière organique par SO_4H_2 concentré. Cette destruction est activée par un mélange équimoléculaire de SO_4Cu et de SO_4K_2 . On déplace NH_3 par entraînement à la vapeur d'eau en milieu alcalin. Le dosage se fait comme dans le cas précédent.

D) DOSAGE DES NITRITES.

On utilise la méthode colorimétrique. Le réactif employé est celui de GRIESS qui est un mélange de deux solutions :

Première solution. — On dissout 0,5 g. d'acide sulfanilique dans 150 cc. d'acide acétique étendu.

Deuxième solution. — On dissout 0,2 g. d' α -naphtylamine pure, blanche, dans 50 cc. d'eau, on porte à l'ébullition, on laisse reposer, on décante la liqueur incolore, on ajoute à la liqueur décantée 100 cc. d'acide acétique étendu.

Réaction : à 8 cc. de la solution à doser, on ajoute 1 cc. de la solution d'acide sulfanilique. On chauffe très légèrement, à 70°. On ajoute ensuite 1 cc. de la solution d' α -naphtylamine. On agite et on laisse reposer 5 minutes. Il suffit de traces de NO_2 , de l'ordre du γ par litre, pour provoquer l'apparition d'une coloration rouge.

L'intensité de cette coloration est mesurée à l'aide du photomètre. Nous avons utilisé l'électrophotomètre de Meunier (écran vert) et le photolorimètre à réseau de Bonet-Maury ($\lambda=5200 \text{ \AA}$).

La gamme-étalon se fait dans des tubes à essais jaugés de 10 cc., contenant des doses croissantes de NO_2Na . Les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :

a) Photomètre de Meunier :

		γ de NO_2Na par cc.								
		témoin	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Gra- dua- tions	Ecran bleu	25	34	42,5	48	57	62	67	71	79
	Ecran vert	25	70	109	143	186	207	218	235	

Courbes représentatives (Fig. II) :

On remarque que la courbe obtenue avec l'écran vert est une droite pour les concentrations en NO_2 inférieures à 2γ , cc.

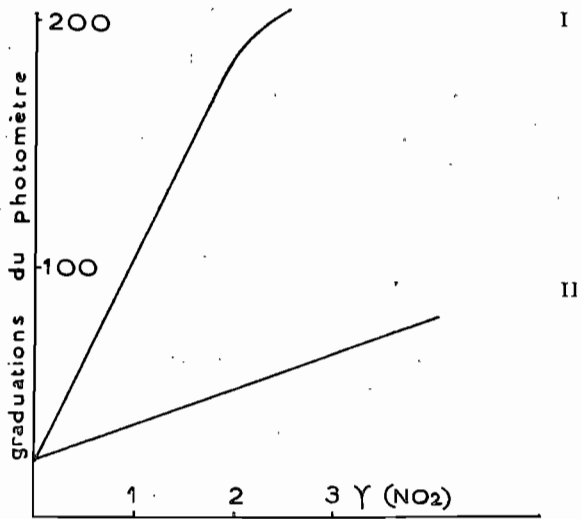


Fig. II. — Dosage colorimétrique des nitrites : Courbes représentatives de l'étalonnage du photomètre de MEUNIER en fonction de la teneur en NO₂ du milieu.

avec écran vert (courbe I).
avec écran bleu (courbe II).

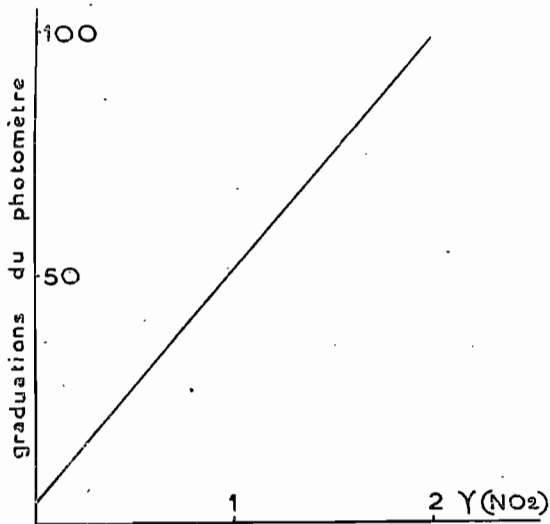


Fig. III. — Dosage colorimétrique des nitrites : courbe représentative de l'étalonnage du photomètre de BONET-MAURY ($\lambda = 5200 \text{ \AA}$) en fonction de la teneur en NO₂ du milieu.

b) Photomètre de Bonet-Maury :

$\lambda = 5200 \text{ \AA}$	γ de $\text{NO}_2\text{Na/cc.}$				
	Témoin	0,5	1	1,5	2
	6,8	27	55	76,1	98,5

Courbe représentative (Fig. III) :

Pour doser les nitrites dans les milieux de culture, on opère de la façon suivante :

On prélève 1 cc. de milieu que l'on dilue à 10 cc. avec de l'eau distillée. On centrifuge 15 minutes à 3600 tours/minute. On décante. S'il y a lieu, on fait de nouvelles dilutions avec la solution de façon que la quantité de NO_2 soit inférieure à 2 γ par cc. Les dilutions sont faites à l'aide d'une burette au 1/20^e. A 8 cc. de la solution finale on ajoute 2 cc. de réactif suivant la technique exposée plus haut. Chaque mesure est faite en double.

Caractérisation des nitrites.

Il est préférable d'employer le réactif de TROMSDORFF :

Amidon soluble.	5 g.
Iodure de cadmium.	3 g.
Chlorure de sodium.	20 g.
Eau q.s.p.	1000 cc.

Ce réactif, en effet, beaucoup moins sensible que le Griess, permet d'affirmer rapidement s'il y a eu ou non production de NO_2 dans le milieu de culture.

Caractérisation des nitrates.

Nous utilisons le réactif à la diphénylamine sulfurique :

Diphénylamine.	1,5 g.
H_2O distillée.	50 g.

Après dissolution ajouter par petites portions 100 cc. de SO_4H_2 pur. Ce réactif donne une coloration bleue avec NO_2 et NO_3 . Si la réaction de Tromsdorff est elle-même positive, on détruit NO_2 par le mélange de SO_4H_2 et d'urée porté à l'ébullition, on recherche alors la présence de NO_3 à la diphénylamine sulfurique.

8. — DOSAGE DU CORPS NOIR

On prélève 1 cc. de milieu de culture que l'on complète à 10 cc. avec de l'eau distillée. On ajoute 1 goutte de NaOH au 1/10^e afin de dissoudre la substance noire. On centrifuge 10 minutes à 4600 tours. On mesure l'intensité d'absorption de la solution surnageante à l'aide du photomètre de Meunier (écran bleu).

La courbe de dosage avec des dilutions successives est une droite.

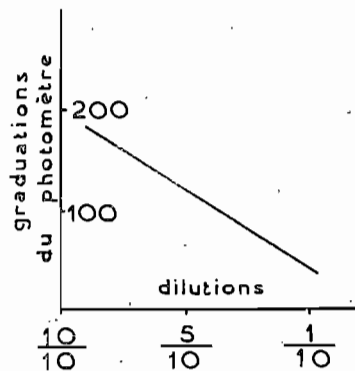


Fig. IV. — Dosage du corps noir : courbe représentative de l'étalonnage du photomètre de MEUNIER (écran bleu) en fonction de la teneur en corps noir du milieu.

9. — DOSAGE DES SUCRES
DANS LES MILIEUX DE CULTURE

On défèque le milieu de culture à l'aide de l'acide phosphotungstique à 13 p. 100 ajouté dans les proportions suivantes :

Acide phosphotungstique.	1 volume.
Milieu de culture.	2 volumes

Attendre quelques heures; centrifuger 20 minutes à 5000 tours/minute et filtrer sur papier. On pratique alors le dosage du sucre sur le filtrat par la méthode classique de G. BERTRAND.

10. — DOSAGE DU CARBONE

Notre technique est une modification de la méthode de NARDO dont le principe est une oxydation de la matière organique par

MnO₄K en milieu sulfurique (le CO₂ est recueilli dans une solution de KOH à 50 p. 100. On pèse le CO₂ fixé). Nous avons remplacé la solution de KOH par des pastilles de potasse. A ce sujet il est bon de noter que les pastilles de KOH ou de NaOH possèdent un pouvoir d'absorption du CO₂ souvent insuffisant si on les place intactes dans un tube. L'absorption devient totale si on a soin, au préalable, de broyer les pastilles dans un mortier. Nous avons obtenu les meilleurs résultats en réalisant le tube d'absorption conforme au graphique ci-dessous (Fig. IV bis : exp. faite avec l'oxalate d'ammonium).

Les pastilles intactes au fond du tube, évitent l'obstruction de l'extrémité du tube A par les pastilles réduites en poudre.

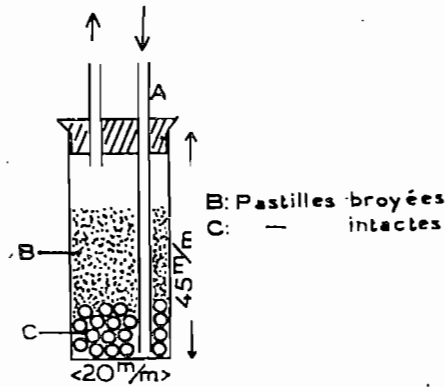


Fig. IV bis. — Dispositif utilisé pour l'absorption du CO₂.

CHAPITRE II

NUTRITION AZOTÉE MINÉRALE
ET RAPPORT $\frac{C}{D}$ DE QUELQUES GERMES
OLIGONTROPHILES DU SOL

1. — NUTRITION AZOTÉE MINÉRALE [9]

A) CES GERMES SONT-ILS DES FIXATEURS D'AZOTE MOLÉCULAIRE ?

Nous avons expérimenté sur les cinq souches A, B, C, E, et F. Les souches A et B ont été isolées à partir de la terre de Beauce, les trois autres à partir d'échantillons de terre provenant de la Côte d'Ivoire. Ces germes, ensemencés sur milieu liquide sans azote, ont la propriété d'augmenter de 50 p. 100 la teneur en azote du milieu dans les conditions ordinaires du laboratoire. Nous avons pensé tout d'abord qu'il s'agissait de fixateurs.

Poussant plus loin nos recherches, nous avons constaté que, par introduction d'air ayant barboté au préalable dans de l'acide sulfurique (donc dépourvu de NH_3) dans les récipients de culture, ces germes ne font plus augmenter la teneur en azote du milieu. Ils sont donc dépourvus de tout pouvoir fixateur d'azote libre contrairement à ce que laisse supposer BEIJERINCK.

Afin de préciser la nature et la quantité d'azote combiné retenu par SO_4H_2 nous avons fait les expériences suivantes :

Une boîte de Petri contenant 25 cc. d'eau acidulée est abandonnée dans le laboratoire. Après 24 heures, l'ammoniaque fixé est décelé par le réactif de Nessler, puis dosé à l'aide du photomètre de Meunier. Nous avons trouvé 25 γ de NH_3 . Nous avons déterminé d'autre part l'ammoniaque contenu dans l'atmosphère du laboratoire par barbotage d'un certain volume d'air dans une solution d'eau acidifiée. Nous avons trouvé 3 γ de NH_3 par litre d'air. L'atmosphère de l'étuve en contient une dose beaucoup plus élevée. De même l'eau bidistillée servant à nos dosages, préparée sans précautions spéciales, peut contenir une quantité non négligeable de l'ordre de 0,1 γ par cc.

B) QUANTITÉ D'AZOTE MINIMA NÉCESSAIRE A LA CROISSANCE DE CES GERMES.

Ces résultats nous ont conduit à la recherche d'un milieu de culture aussi pauvre que possible en azote afin d'apprécier la quantité minima nécessaire au développement de ces germes.

Après de nombreuses expériences, les meilleurs résultats sont obtenus sur milieu liquide en tubes de Legroux. Chacun de ceux-ci contient 25 cc. de milieu de Winogradsky à pH : 7,2. Le glucose à la dose de 1 p. 100 constitue la source carbonée. Si l'on utilise des sels très purs (R. P. Prolabo) ce milieu, à la sortie de l'autoclave, ne contient pratiquement plus d'azote combiné. Les tubes sont immédiatement capuchonnés pour éviter toute entrée d'ammoniaque. En s'entourant de toutes ces précautions, on obtient alors des milieux dans lesquels la prolifération des germes n'a lieu que par addition d'une trace d'azote combiné. Voici les détails des techniques utilisées pour nos recherches :

La source d'azote est fournie par le sulfate d'ammonium ou le nitrate de potassium. On utilise de l'eau distillée faiblement alcalinisée par NaOH et qui a été maintenue à l'ébullition pendant 20 minutes. La quantité de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ajoutée correspond toujours à 0,1 cc. de solution, stérilisée à l'ultraviolet pendant 10 minutes.

S'il s'agit de NO_3K , la stérilisation se fait à l'autoclave sans précautions spéciales. Le témoin est constitué par une fiole dans laquelle on a ajouté 0,1 cc. d'eau ayant servi à faire les différentes dilutions de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Dans notre première expérience, nous avons utilisé une échelle de concentration en NH_3 de 0,1 γ à 1 mg. pour 25 cc. de milieu de culture en passant par 0,2 γ , 0,5 γ , 1 γ , 2 γ , 5 γ et 10 γ .

La croissance est exprimée par le graphique suivant (fig. V).

On remarque que le maximum de croissance est pratiquement atteint pour une concentration en NH_3 de 0,1 γ soit 4 γ par litre. Ceci est valable pour toutes les souches que nous avons étudiées.

Une autre expérience a été réalisée avec des dilutions beaucoup plus grandes : les concentrations de $10^{-4}\gamma$ sont utilisées. Nous avons établi le graphique VI en utilisant la technique de MONOD [18a], c'est-à-dire le maximum de croissance en fonc-

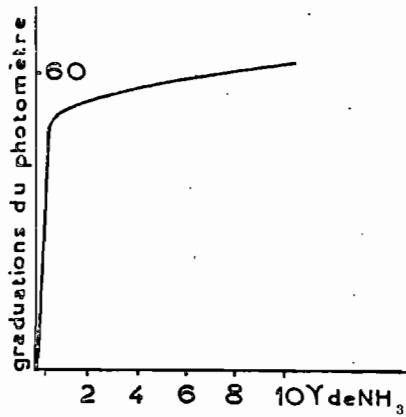


Fig. V. — Courbe représentant les maxima de croissance en fonction de la teneur en NH_3 du milieu.

tion de la concentration du facteur limitant qui est ici $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Par extrapolation des courbes, nous arrivons à déterminer approximativement la dose limite de NH_3 , où la croissance bactérienne devient impossible. Cette dose est de l'ordre de $10^{-4}\gamma$ (en NH_3) ou 0,003 γ de N par litre.

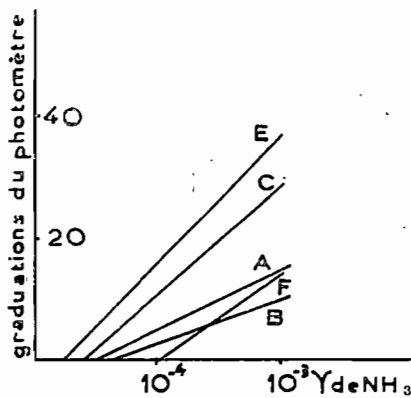


Fig. VI. — Droites permettant de déterminer la dose minima de NH_3 nécessaire à la croissance des germes.

Avec la même technique nous avons essayé d'autres sources d'azote telle que NO_2K , mais celle-ci a dû être abandonnée par suite de son instabilité chimique.

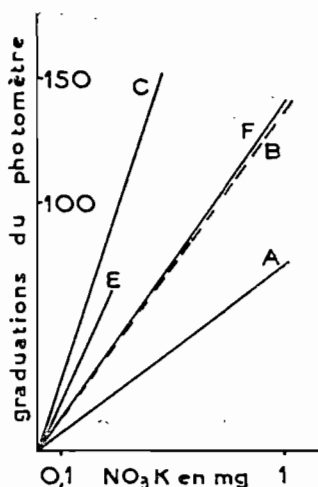


Fig. VII. — Droites permettant de déterminer la dose minima de NO_3K nécessaire à la croissance des germes.

Avec NO_3K , nous avons établi le graphique suivant (Fig. VII) :

Nous remarquons que la dose limite se trouve dans les environs de 50γ , soit $0,0014$ g. de N par litre.

Cette dose, quoique 10^6 fois supérieure (mesurée en azote) à celle de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, est encore très faible si on la compare aux taux habituels des milieux de culture.

De nos résultats on peut conclure que les germes oligonitrophiles méritent bien leur nom, car une dose aussi minime que $0,004\gamma$ de NH_3 par litre est déjà capable d'assurer leur prolifération. On conçoit que de grandes précautions soient à prendre pour éliminer du milieu de culture les dernières traces d'ammoniaque qui amèneraient des causes d'erreurs dans l'interprétation des résultats d'expérience. En effet, aux concentrations de $10^{-4}\gamma$, on ne peut plus déceler la présence d'ammoniaque par les réactifs chimiques (réactif de Nessler par exemple) et l'on pourrait croire avoir réalisé un milieu exempt de toute trace d'ammoniaque. Si dans ces conditions, la culture était positive, il serait naturel de conclure à la présence d'un fixateur, surtout si l'on n'avait pas pris soin d'éliminer l'ammoniaque atmosphérique. En effet, ces germes transforment l'ammoniaque en azote organique. Les dosages avant et après expérience accuseraient donc une augmenta-

tion de la teneur en azote du milieu. Ainsi se trouvent expliquées l'erreur de définition de BEIJERINCK et les réticences de WINOGRADSKY.

2. — ETUDE DU RAPPORT $\frac{C}{N}$ DES GERMES OLIGONITROPHILES

Cette étude nécessite en premier lieu une culture massive de germes :

A) OBTENTION DES GERMES.

Les cultures sont faites en boîtes de Roux à raison de 200 cc. de milieu glucosé par fiole. La source azotée est fournie sous forme de $SO_4(NH_4)_2$ à raison de 0 g. 1 p. 100. On utilise 5 boîtes par souche. On suit chaque jour la croissance au photomètre. Lorsque celle-ci est en voie d'atteindre son maximum (la courbe de croissance commence à fléchir) on centrifuge le milieu de culture 20 minutes à 6000 tours/m. On décante. On lave le dépôt microbien avec de l'eau distillée légèrement acidulée pour éliminer les carbonates. On centrifuge à nouveau. On répète trois fois cette opération. Les germes sont ensuite soumis à la dessiccation à l'étuve à 80° jusqu'à poids constant. Les germes sont alors propres à l'analyse.

B) DOSAGE DU CARBONE.

Le dosage est effectué par gravimétrie suivant la méthode déjà décrite. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

SOUCHES	A		B		C		E		F	
Prises d'essais en mg.	39,5	72	33	45	37	43,5	66	53	82	56
Carbone en mg.	9,66	18	13,6	18,4	15,2	18	29,5	22,5	22,14	14,6
Carbone en %	24,4	25	41,2	40,8	40,8	41,3	44,7	42,4	27	26

C) DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL.

Par la méthode de Kjeldahl. L'ammoniaque dégagé est titré par une solution de $\text{ClH} \frac{\text{N}}{50}$

Résultats trouvés :

SOUCHES	A		B		C		E		F	
Prises d'essais en mg.	58,5	24,9	20,2	83,5	25,8	28,7	30,5	37,3	44,5	109,5
N en mg.	2,71	1,12	0,084	0,35	1,31	1,54	0,42	0,44	0,30	0,58
N en %	4,6	4,5	0,4	0,4	5,2	5,3	1,3	1,2	0,6	0,5

On obtient pour le rapport $\frac{\text{C}}{\text{N}}$ les valeurs suivantes :

SOUCHES	A	B	C	E	F
$\frac{\text{C}}{\text{N}}$	5,3	102,5	7,8	34,4	48,1

Il est difficile de tirer des conclusions des différents rapports $\frac{\text{C}}{\text{N}}$ obtenus. En effet, afin d'avoir une quantité massive de germes, ce qui est nécessaire pour pratiquer des dosages, nous sommes amené à utiliser des milieux de culture riches en azote. Il est probable que les germes se comportent différemment dans un milieu pauvre en azote. C'est ainsi que le rapport très élevé de la souche B (souche très muqueuse) doit être attribué au mucus élaboré par ce germe, substance pauvre en azote. Par ailleurs, les souches que nous possédons sont d'autant plus muqueuses que le milieu de culture est moins riche en azote.

CHAPITRE III

RECHERCHES SUR LA RÉDUCTION DES NITRATES

1. — HISTORIQUE

La réduction des nitrates peut être le fait de microorganismes qui, physiologiquement, utilisent ceux-ci de façon très différente. Les uns utilisent NO_3 comme source d'azote en présence d'une matière énergétique. D'autres s'en servent comme source d'oxygène. Les premiers n'occasionnent aucune perte d'azote pour le sol, c'est un simple transfert de la forme NO_3 à la forme protéique. La deuxième catégorie de germes, au contraire, entraîne des pertes d'azote sous forme moléculaire.

La réduction de NO_3 en N_2 est un phénomène produit par un nombre assez restreint de bactéries.

La réduction des nitrates, en particulier la réduction $\text{NO}_3 \longrightarrow \text{NO}_2$, est un phénomène très complexe.

BEIJERINCK et MINKMAN (1910) [4] remarquèrent que les bactéries dénitrifiantes exigent la présence d'un composé organique agissant comme donateur d'hydrogène pour la réduction des nitrates. La réduction des nitrates semble nécessiter la présence d'au moins deux systèmes enzymatiques distincts (QUASTEL, STEPHENSON et WETHAN (1925) [23], la nitratase d'*E. coli* que STICKLAND (1931) [26] décrit comme très sensible à l'oxygène et l'enzyme réducteur des bactéries dénitrifiantes peu sensible à l'oxygène.

SEIZER et WALZ en 1925 [24] ont montré que la dénitrification ne s'effectue pas seulement dans des conditions anaérobies. Ils ont remarqué un dégagement d'azote gazeux à partir des nitrates avec *Pseudomonas putida* dans des conditions aérobies. KOROCHKINA [13] nota même que la réduction des nitrates par *Pseudomonas denitrofluorescens* n'est que très faiblement inhibée par un barbotage d'air dans le milieu de culture.

MEIKLEJOHN (1940) [17a], cultivant des *Pseudomonas* sur milieu synthétique dans des conditions bien déterminées, montra que la dénitrification, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose, exige des substances organiques appropriées. A pH 6,9, les nitrites sont toxiques proportionnellement à la concentration, à pH 8 ils sont sans action. Cet auteur pense que dans la nature, la réduction des nitrates est fonction du potentiel d'oxydo-réduction du milieu [17 b].

Le *Methanobacterium Omelianskii* (germe anaérobie) ne peut réduire les nitrates. Selon BARKER (1901) [2], ce germe serait incapable d'activer NO_3 .

LEMOIGNE et GAVARD, en 1947 [14], ont montré que le *B. subtilis* réduit totalement les nitrates en aérobiose. En anaérobiose, le développement insignifiant est vite arrêté malgré la réduction des nitrates en NO_2 et NH_3 . D'après ces auteurs, chez les bactéries aérobies, les mécanismes qui utilisent comme accepteur d'hydrogène, soit NO_3 soit O_2 , sont différents et non interchangeables. Dans un milieu où la seule source d'azote est l'azote nitrique, l'oxygène libre inhibe complètement le développement du *Bacillus megatherium* (bacille aérobie) quand sa tension atteint le triple de celle qu'il possède dans l'air. Cette action inhibitrice résulte d'un arrêt total de l'assimilation de l'azote nitrique.

TAYLOR (1948) [27], constate l'incapacité, pour certaines bactéries, de réduire les nitrates en présence de calcium et leur aptitude à cette réduction dans un milieu ne renfermant pas de calcium. Il montre en outre que l'incapacité du *Bacterium globiforma* de réduire les nitrates en nitrites n'est pas due à la carence en phosphore; elle peut être due à la réaction acide du milieu ou à ce que la réduction a dépassé le stade nitrite.

PREVOT et ENESCU en 1946 [22], remarquèrent que *Welchia perfringens* en présence de glucides, réduit les nitrates en nitrites quand le glucose a été remplacé par du galactose ou du glycérol (qui apporte moins d'hydrogène). En bouillon V.F. glucosé à 2 g. p. 1000 on ne peut observer qu'une destruction totale ou partielle des nitrates, mais à aucun moment on ne peut saisir le stade nitrite. Cela tiendrait à la richesse du milieu en donateur d'hydrogène, tant du côté des acides aminés très abondants dans le milieu V.F., que du côté du glucose qui est un donateur trop généreux; cela tient également au pouvoir exceptionnellement réducteur de *W. perfringens* qui hydrogène violemment la plupart des milieux et pousse les réductions à leur stade ultime en brûlant les étapes.

Le pouvoir de certains anaérobies stricts de réduire les nitrates en nitrites n'est pas confirmé: 7 espèces sur 25 étudiées par PREVOT [21], se sont montrées capables d'attaquer plus ou moins les nitrates mais sans former de nitrites.

2. — RÉDUCTION DES NITRATES EN NITRITES PAR QUELQUES GERMES OLIGONITROPHILES DU SOL

Poursuivant nos recherches sur 11 souches de germes oligonitrophiles nous avons constaté que certaines d'entre elles étaient capables de réduire les nitrates en nitrites dans des conditions définies. Nous avons recherché l'influence de l'aération, de l'ammoniaque, du rH et des substances organiques sur cette réduction.

A) RÉDUCTION DES NITRATES DANS DES CONDITIONS SEMI-AÉROBIES.

Il est à noter que tous les germes oligonitrophiles que nous possédons sont des aérobies stricts. Ensemencés en gélose profonde (milieu de Winogradsky nitraté ou milieu à base de bouillon de viande), ils ne donnent aucune colonie à l'intérieur de la gélose. Le milieu semi-aérobie que nous avons utilisé a été réalisé de la façon suivante :

Le milieu de culture, glucosé, nitraté (0 g. 1%) est réparti dans des tubes de 22 × 220 mm. remplis au 3/4 : On capuchonne les tubes. Après 5 jours à l'étuve à 34° on note les résultats suivants :

Les nitrites sont caractérisés par le réactif de Tromsdorff. On dose NH_3 formé par entraînement à la vapeur d'eau après avoir alcalinisé le milieu avec de la magnésie. La croissance est mesurée au photomètre de Meunier.

Seules les souches E, G et H donnent des réactions positives avec le réactif de Tromsdorff. La souche E donne une coloration indigo noir ce qui correspond environ à 10 mg. de NO_2 par litre. Les souches G et H ne donnent qu'une coloration bleuâtre soit environ 2 mg. par litre.

	TÉMOIN	A	B	C	E	F	G	H	I	J	K	L	M
NO_2	0	0	0	0	+++	0	++	+	0	0	0	0	0
NH_3	0	0	0	0	1,68 mg	0	0	0	0	0	0	0	0
Croissance	35	115	85	155	125	130	95	130	70	80	90	55	95

Une deuxième expérience conduite en décapuchonnant le tube E quelques minutes par jour ne donne alors aucune réduction au stade NH_3 . L'oxygène libre inhibe donc la réduction des nitrates en NH_3 par la souche E.

La réaction avec le réactif de Tromsdorff reste positive pour les souches E, G et H.

B) RÉDUCTION DES NITRATES EN HYPERAÉROBIOSE.
INFLUENCE DE NH_3 .

Le milieu de culture nitraté à 0,1 g. p. 100 est réparti dans des Erlenmeyers à raison de 100 cc. par flacon. Dans trois de ces Erlenmeyers on ajoute $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à raison de 0,1 g. par flacon. On assure un barbotage d'air dans les différents milieux de culture à l'aide de la trompe à vide. Entre chaque Erlenmeyer, on a soin de faire barboter l'air dans des fioles contenant SO_4H_2 à 10 p. 100. Cette précaution est indispensable, car NH_3 entraîné par l'air est suffisant pour inhiber complètement la production de NO_2 dans les milieux nitrates ensemencés avec les souches G et H. On caractérise journellement NO_2 par le réactif de Tromsdorff, NH_3 par le réactif de Nessler, et NO_3 par la diphenylamine sulfurique.

Dans ces conditions, seule la souche E en milieu nitraté et ammoniaco-nitrique et les souches G et H en milieu nitraté donnent des réactions positives au réactif de Tromsdorff. Contrairement à l'expérience précédente, en semi-aérobiose, les souches G et H se montrèrent fortement productrices de NO_2 . La souche E, au contraire, ne donne qu'une réaction bleuâtre au réactif. Il est à noter que, dans ces conditions, la croissance des germes est très rapide et la plupart des milieux de culture, atteignent, dès le 3^e jour, un haut degré de viscosité due à la pullulation massive des germes.

Le tableau suivant résume les résultats observés :

caractérisation des nitrites :	}	+	bleu pâle.
		++	bleu
		+++	bleu noir

TEMPS EN JOURS		1	2	3	4	5	6	7	8	
E	milieu nitraté	NO ₂	0	+	++	+	+	0	0	0
		NH ₃	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO ₃	+	+	+	+	+	0	0	0
	milieu ammoniaco- nitrique	NO ₂	0	++	++	++	+	+	+	+
		NH ₃	+	+	+	+	+	+	+	+
		NO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+
G	milieu nitraté	NO ₂	+	+++	0	0	0	0	0	0
		NH ₃	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO ₃	+	+	0	0	0	0	0	0
	milieu ammoniaco- nitrique	NO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0
		NH ₃	+	+	+	+	+	+	+	+
		NO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+
H	milieu nitraté	NO ₂	0	0	++	0	0	0	0	0
		NH ₃	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO ₃	+	+	+	0	0	0	0	0
	milieu ammoniaco- nitrique	NO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0
		NH ₃	+	+	+	+	+	+	+	+
		NO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+

NH₃ inhibe donc la production de NO₂ par les souches G et H en aérobiose.

C) INFLUENCE DE NH_3 SUR LA RÉDUCTION DES NITRATES EN NITRITES PAR LES SOUCHES E, G ET H EN CONDITIONS SEMI-AÉROBIES.

Le milieu de culture est réparti dans des tubes d'Yvan HALL. Après 6 jours à l'étuve à 34° on note les résultats suivants :

(NO_2 et NO_3 sont caractérisés comme dans l'expérience précédente).

SOUCHES	E		G		H	
	NO_3	$\text{NO}_3 + \text{NH}_3$	NO_3	$\text{NO}_3 + \text{NH}_3$	NO_3	$\text{NO}_3 + \text{NH}_3$
NO_2	++	+++	+	0	+	0
NO_3	+	+	+	+	+	+
NH_3	+	+	0	+	0	+
croissance		90		105		85

On constate que, pour les souches G et H, en conditions pratiquement anaérobies, la production de NO_2 est inhibée par la présence de NH_3 . Il est à noter que la production de NO_2 dans les milieux nitrates « G » et « H » est très faible (coloration bleu pâle avec le réactif de Tromsdorff).

D) INFLUENCE DE NH_3 DANS UN MILIEU NITRATÉ SUR LA CROISSANCE DES SOUCHES G ET H. DOSE MINIMA DE NH_3 NÉCESSAIRE POUR INHIBER LA PRODUCTION DE NO_2 .

On utilise les milieux suivants répartis dans des tubes Legroux à raison de 25 cc. de milieu par tubes :

- 1) 2 tubes avec NO_3K (0 g. 1 p. 100).
- 2) 2 tubes avec NO_3K (0 g. 1 p. 100) + 0,1 cc. d'une solution à 5 g. p. 100 de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

- 3) 2 tubes avec NO_3K (0 g. 1 p. 100) + 0,5 cc. de la solution ammoniacale.
- 4) 2 tubes avec NO_3K (0 g. 1 p. 100) + 1 cc. de la solution ammoniacale.

La solution ammoniacale et le milieu de culture sont stérilisés séparément. La croissance est mesurée chaque jour au photomètre de Meunier sur le milieu de culture dilué au $1/10^e$. On dose NO_2 par la méthode colorimétrique (réactif de GRIESS). Les résultats sont représentés dans les graphiques suivants : fig. IX, X et XI.

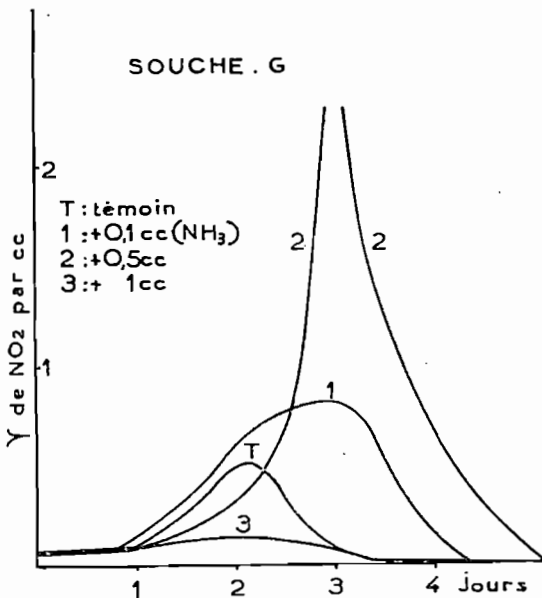


Fig. VIII. — Influence de NH_3 sur la production de NO_2 dans un milieu nitratéensemencé avec la souche G.

On remarque que, pour la souche G, l'addition de 0,1 cc. de la solution ammoniacale dans le milieu nitraté, soit 5 mg. de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ pour 20 cc. de milieu, ne retarde nullement la production de NO_2 par rapport au témoin. Par ailleurs, la production de NO_2 est nettement supérieure le 3^e jour.

L'addition de 0,5 cc. de la solution ammoniacale provoque

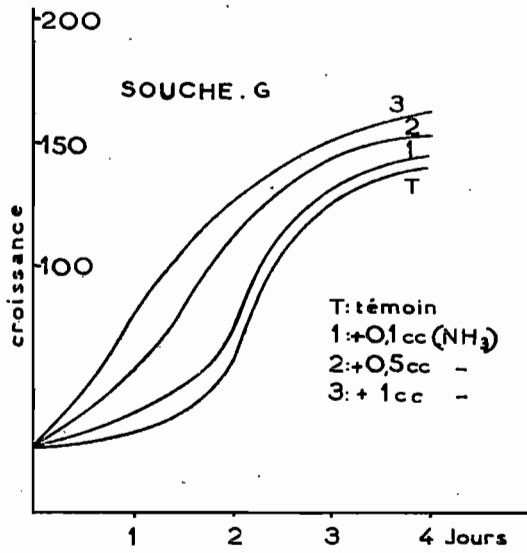


Fig. IX. — Influence de NH₃ sur la croissance de la souche G dans un milieu nitraté.

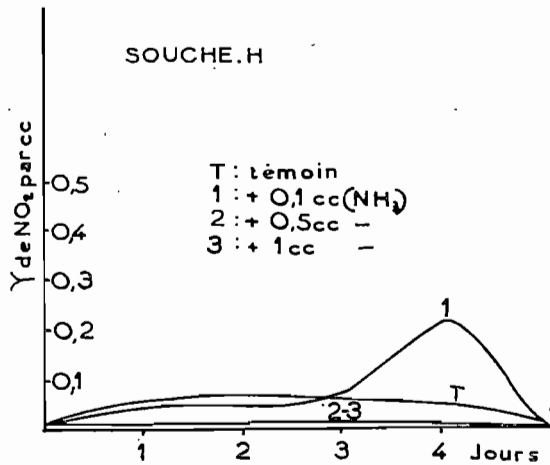


Fig. X. — Influence de NH₃ sur la production de NO₂ dans un milieuensemencé avec la souche H.

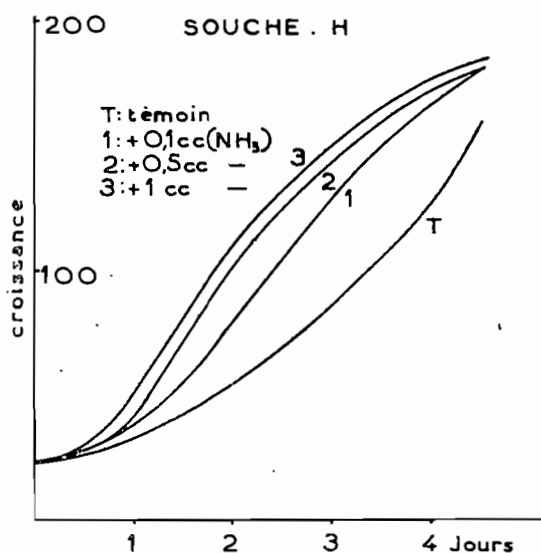


Fig. XI. — Influence de NH_3 sur la croissance de la souche H dans un milieu nitraté.

un retard dans la production de NO_2 mais celui-ci apparaît d'une manière explosive le 3^e jour : 360 γ de NO_2 par cc. ont été dosés.

L'addition de 1 cc. de la solution ammoniacale provoque une inhibition presque complète de la production de NO_2 .

L'inhibition de la production de NO_2 par NH_3 a donc lieu pour des doses de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ comprises entre 25 et 50 mg./20 cc. soit de 0,16 à 0,32 mg. par cc. Quant à la souche H, on remarque qu'il n'y a plus production de NO_2 après addition de 0,5 cc. de la solution ammoniacale. Le pouvoir inhibiteur de NH_3 se situe donc, pour cette souche, entre 0,03 et 0,16 mg./cc.

Avec le tube contenant 0,1 cc. de la solution ammoniacale, nous avons dosé le 4^e jour 12 γ de NO_2 /cc.

L'examen des courbes de croissance montre, dans tous les cas, que la présence de NH_3 fait diminuer le temps de latence. Le facteur limitant de la croissance est la source azotée, le sommet des différentes courbes de croissance correspondant à des réactions négatives avec les réactifs à la diphenylamine sulfurique et iodomercurique.

E) ETUDE DU POUVOIR RÉDUCTEUR DES SOUCHES E, G ET H PAR L'EMPLOI DES COLORANTS D'OXYDO-RÉDUCTION.

1° *En conditions semi-aérobies.*

On répartit le milieu nitraté dans des tubes d'Yvan HALL. Dans chaque tube on ajoute 2 gouttes des différents colorants indicateurs du rH en solution à 2 p. 1000. Les colorants employés, stérilisés à part, sont :

le bleu de méthylène.	rH	14
le bleu de Nil	—	9,2
la phénosafranine.	—	5,8
le rouge neutre	—	3,1

Les tubes sont placés à l'étuve à 34°. On remarque que la souche E possède un pouvoir réducteur très faible : le bleu de méthylène ne se décolore pas. Les souches G et H, par contre, réduisent dans l'espace de quelques jours les 4 colorants. Le bleu de méthylène, bleu de Nil et phénosafranine sont réduits jusqu'à l'étranglement des tubes. Pour le rouge neutre, on note une décoloration jusqu'à la surface du milieu située au-dessus de l'étranglement. La souche G, d'ailleurs, commence à réduire ce colorant à la partie supérieure, celle qui est en contact avec l'air, la fluorescence gagnant peu à peu la profondeur du tube. La souche H, au contraire, commence à réduire le rouge neutre à la partie inférieure du tube d'Yvan HALL pour gagner progressivement la partie supérieure du milieu de culture située au-dessus de l'étranglement.

Le rouge neutre, après réduction par les souches G et H, ne se réoxyde plus au contact de l'air. L'eau oxygénée est également sans effet. Il semble y avoir décomposition de ce colorant ou du moins une transformation irréversible de celui-ci.

2° *En conditions aérobies* [10].

Cette étude ne porte que sur les souches G et H.

Le milieu de culture est réparti dans des boîtes de Roux à raison de 100 cc. de milieu par fiole. On dispose de milieu au nitrate seul (0 g. 1 p. 100), de milieu au NO_3K (0 g. 1 p. 100) et au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0 g. 1 p. 100), et de milieu au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0 g. 1 p. 100) seul.

La croissance est mesurée chaque jour. Pour la mesure du rH on opère de la façon suivante :

Chaque jour on prélève environ 4 cc. de milieu de culture que l'on répartit dans 4 tubes à hémolyse contenant chacun 1 goutte des différents colorants d'oxydo-réduction (bleu de méthylène, bleu de Nil, phénosafranine et rouge neutre en solution à 2 g. p. 1000). La lecture est faite après une heure à la température du laboratoire. Le rH ne varie pas dans les 24 heures qui suivent. En établissant chaque jour la valeur du rH du milieu de culture, en se basant sur la réduction des colorants, on obtient les résultats résumés dans les figures XII et XIII.

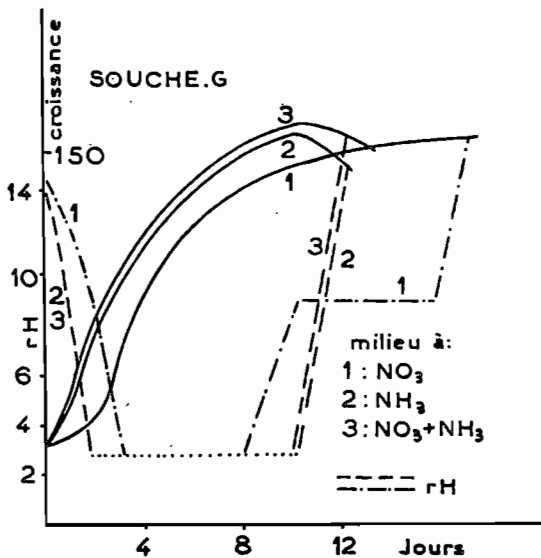


Fig. XII. — Influence de la source azotée sur :
 1° La croissance de la souche G.
 2° Sur le rH du milieuensemencé avec la souche G.

On remarque que la chute du rH a lieu dès le début de la croissance. La phase de croissance ne devient exponentielle qu'après réduction du rouge neutre.

Le rH du milieu de la souche G ne remonte qu'après la chute des courbes de croissance, soit après 14 jours de culture dans les conditions d'expérience.

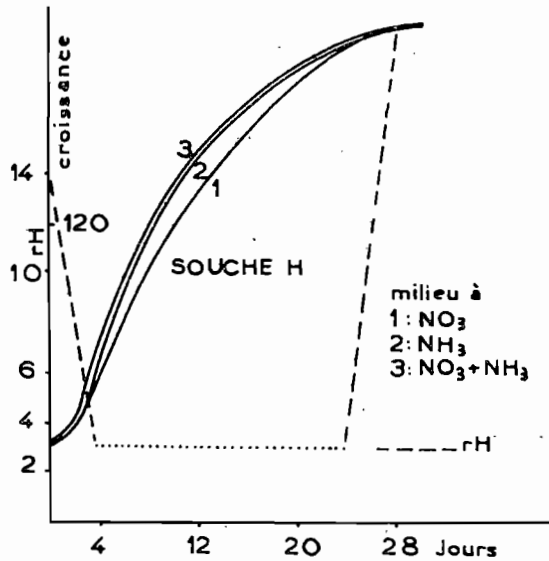


Fig. XIII. — Influence de la source azotée sur :
 1° La croissance de la souche H.
 2° Sur le rH du milieu ensemencé avec la souche H.

Quant au rH du milieu de la souche H, celui-ci ne remonte qu'après 28 jours de culture. Il est à noter, par l'examen des courbes de croissance, que cette souche se lyse beaucoup plus lentement que la souche G.

La réduction des nitrates en nitrites par les souches G et H, dans les conditions indiquées, nécessite un milieu aéré et du nitrate comme seule source azotée, la production de NO₂ étant d'autant plus rapide et plus intense que $\frac{S}{V}$ augmente (le barbotage d'air dans le milieu de culture correspond à un $\frac{S}{V}$ pratiquement infini). On peut donc conclure que la production de NO₂ est d'autant plus intense que le milieu est plus riche en oxygène, du moins pour les concentrations n'excédant pas celle de l'air.

L'action de l'oxygène n'a pas pour effet d'augmenter le rH du milieu de culture comme on pourrait s'y attendre. En effet, nous avons constaté que la croissance des germes est d'autant

plus rapide que le milieu est plus aéré. Par ailleurs, le début de la croissance correspond à la chute du rH.

Ce rH bas (<3,1) est-il nécessaire à la croissance des germes ?

Par l'examen des courbes établies en mesurant le rH du milieu par la méthode des colorants, il semble que ce rH bas, s'il n'est pas nécessaire à la croissance du germe, ne semble pas le gêner outre mesure : la phase exponentielle se trouve en effet dans la zone où le milieu a atteint son minimum de potentiel d'oxydo-réduction.

En conclusion, pour les souches G et H, il n'y a accumulation de NO_2 dans les milieux nitrates, glucosés, qu'en conditions aérobies, ce qui correspond à un milieu très réducteur.

La souche E, par contre, provoque l'accumulation de NO_2 à partir de NO_3 dans tous les milieux que nous avons réalisés. D'autre part, cette souche possède un pouvoir réducteur très faible (rH > 14).

Un milieu très réducteur n'est donc pas indispensable pour la réduction des nitrates en nitrites. (Dans tous les milieux de culture, le pH s'est maintenu voisin de 7,2 au cours de la croissance).

F) INFLUENCE DE L'AZOTE AMMONIACAL, NITREUX ET NITRIQUE, SUR LA CROISSANCE DE LA SOUCHE E [10].

La croissance est mesurée journallement au photomètre de Meunier. Les nitrates sont caractérisés par le réactif à la diphenylamine sulfurique après destruction des nitrites par SO_4H_2 en présence d'urée. On dose NO_2 par la méthode colorimétrique.

Les courbes de croissance sont traduites en échelles logarithmiques, la production de NO_2 en échelles normales. Les cultures sont faites sur milieu de Winogradsky glucosé, réparties en boîtes de Roux et portées à l'étuve à 34°. Ces techniques ont donné les résultats suivants :

1° En présence de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ seul comme source azotée à la dose de 0 g. 2 p. 100, nous obtenons une courbe de croissance normale (courbe en S).

(Expérience faite avec 100 cc. de milieu de culture par boîte de Roux).

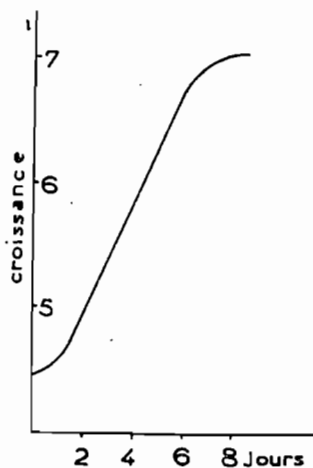


Fig. XIV. — Courbe de croissance de la souche E sur milieu au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

2° Avec NO_2Na (0 g. 1 p. 100) nous obtenons les courbes suivantes :

(Expérience faite avec 100 cc. de milieu par boîte de Roux).

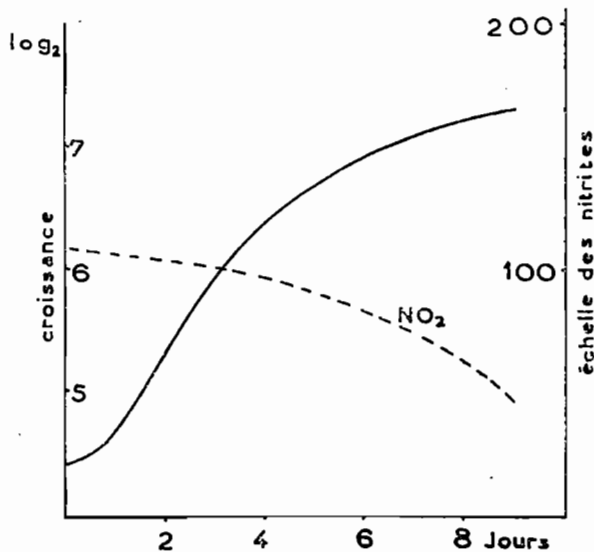


Fig. XV. — Cas d'un milieu à NO_2Na ensemencé avec la souche E. Représentation graphique :

- 1° De la croissance;
- 2° De la teneur en NO_2 du milieu en fonction de l'âge de la culture.

3° En présence de NO_3K à la dose de 0 g. 1 p. 100, nous obtenons une courbe de croissance présentant un palier intermédiaire C D :

C D :

(Expérience faite avec 250 cc. de milieu par boîte de Roux).

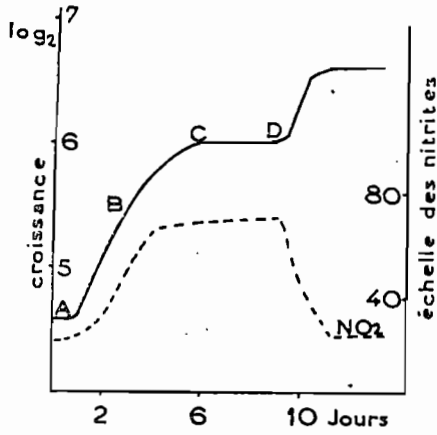


Fig. XVI. — Cas d'un milieu à NO_3K ensemencé avec la souche E. Représentation graphique :

- 1° De la croissance.
- 2° De la teneur en NO_2 du milieu en fonction de l'âge de la culture.

4° En présence de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0 g. 1 p. 100) et de NO_2Na (0 g. 1 p. 100) nous obtenons une courbe de croissance en S :

(Expérience faite avec 100 cc. de milieu par boîte de Roux).

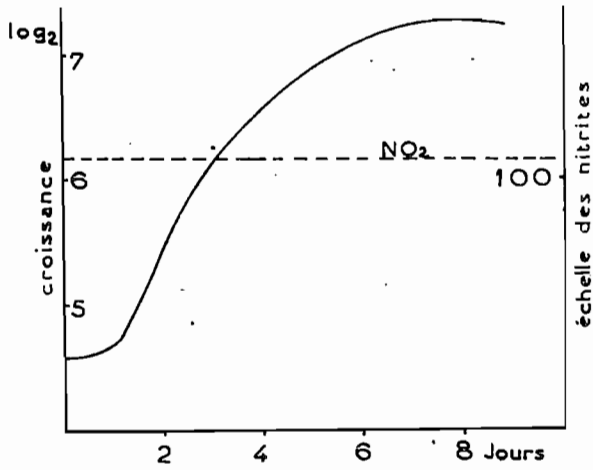


Fig. XVII. — Cas d'un milieu à $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2 + \text{NO}_2\text{Na}$. Représentation graphique :

- 1° De la croissance ;
- 2° De la teneur en NO_2 du milieu en fonction de l'âge de la culture.

5° Avec NO_3K (0 g. 1 p. 100) et $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0 g. 05 p. 100) nous obtenons une courbe à 3 paliers :

(Expérience faite avec 250 cc. de milieu par boîte de Roux).

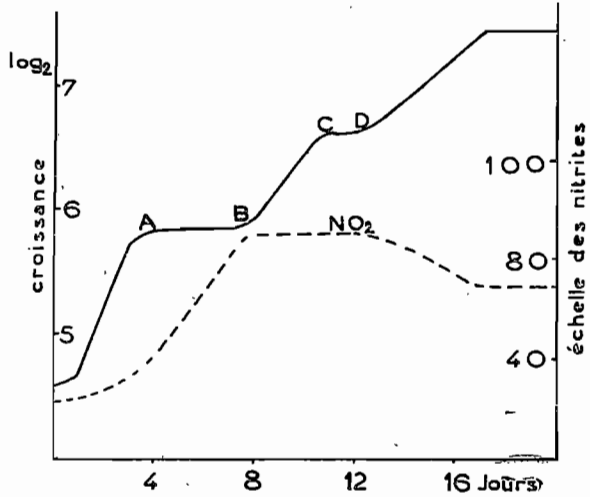


Fig. XVIII. — Cas d'un milieu à $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2 + \text{NO}_3\text{K}$. Représentation graphique :

- 1° De la croissance ;
- 2° De la teneur en NO_2 du milieu en fonction de l'âge de la culture.

6° NO_3K (0 g. 1 p. 100) et NO_2Na (0 g. 1 p. 100) donnent une courbe de croissance à un palier :

(Expérience faite avec 100 cc. de milieu par boîte de Roux).

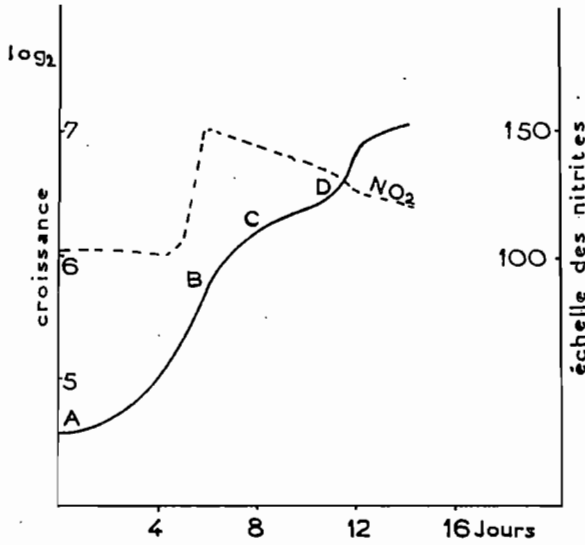


Fig. XIX. — Cas d'un milieu à $\text{NO}_3\text{K} + \text{NO}_2\text{Na}$. Représentation graphique :
 1° De la croissance.
 2° De la teneur en NO_2 du milieu en fonction de l'âge de la culture.

7° Nous avons réalisé également le milieu suivant :

NO_3K (0 g. 1 p. 100) et $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0 g. 2 p. 100). Au 6^e jour de culture, lorsque la quantité de nitrite a atteint son maximum dans le milieu de culture, on ajoute 1 cc. d'une solution stérile de NO_3K à 10 p. 100. On obtient la courbe suivante :

(Expérience faite avec 100 c. de milieu par boîte de Roux).

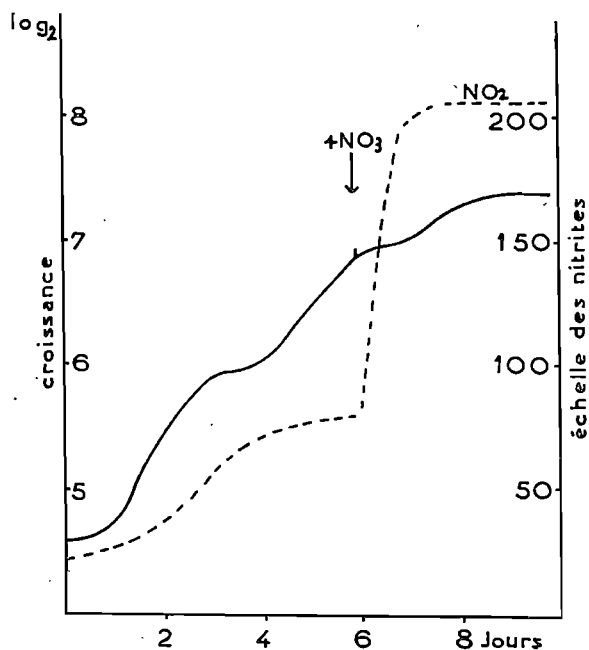


Fig. XX. — Cas d'un milieu à $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2 + \text{NO}_3\text{K}$ enrichi de NO_3K en cours d'expérience. Représentation graphique :

1° De la croissance.

2° De la teneur en NO_2 du milieu de culture au cours de l'expérience.

La fig. XVI montre que le taux de croissance diminue à partir de B pour s'annuler en C. La croissance reprend lorsque tout NO_3 a été réduit en NO_2 (point D). Même phénomène pour le milieu avec NO_3K et NO_2Na (fig. XIX). En présence de NO_3K et de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (fig. XVIII), nous remarquons également un arrêt de la croissance, A B correspondant à une forte production de NO_2 . En B il n'y a plus de NO_3 et la quantité de NO_2 formé correspond, aux erreurs d'expérience près, à la réduction totale du NO_3 ajouté dans le milieu de culture. Cette quantité maxima de NO_2 se maintient jusqu'au point E. Le germe n'utilise donc pour ses synthèses que $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ jusqu'au point C. A ce moment, la réaction avec le réactif de Nessler devient négative. En D la croissance reprend et le taux de NO_2 diminue. Il est à noter que le pH du milieu de culture, au cours de la croissance, est resté voisin de 7,2.

Tout se passe comme si l'hydrogène nécessaire aux synthèses microbiennes était provisoirement détourné pour réduire quantitativement les nitrates en nitrites.

Le palier CD (fig. XVIII) peut s'expliquer par un phénomène de diauxie. MONOD, en 1945 [18b], a en effet montré que l'inhibition diauxique possède le caractère essentiel d'un phénomène de compétition et qu'elle paraît bien dépendre de l'affinité relative des 2 constituants d'un mélange A,B, pour une même surface. D'après l'auteur, il existerait un précurseur (préenzyme) commun à différents enzymes. La transformation du précurseur en enzyme adapté se produirait sous l'influence directe du substrat. Mis en présence de 2 ou plusieurs substrats, le précurseur acquerrait une activité polyvalente, sauf, cependant dans le cas où sa « préaffinité » vis-à-vis de l'un des substrats serait très sensiblement plus élevée. Dans cette circonstance, le corps en question accaparerait entièrement le précurseur, interdisant ainsi son adaptation aux autres corps. Tel serait le mécanisme de l'inhibition qui est à l'origine du phénomène de diauxie.

On peut conclure que l'action perturbatrice, causée sur la croissance par la réduction des nitrates en nitrites, est un phénomène très complexe et très probablement d'origine enzymatique. Ce n'est qu'une étude biochimique très approfondie qui permettrait d'éclaircir les différents phénomènes observés.

G) INFLUENCE DU LACTATE SUR LA PRODUCTION DE NO_2 PAR LES SOUCHES E, G ET H.

1° EN MILIEU SYNTHÉTIQUE.

a) Sur le milieu de culture.

Le milieu Winogradsky, glucosé, est réparti dans des tubes à essais à raison de 5 cc. de milieu par tube. La source azotée est fournie sous forme de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 0 g. 1 p. 100.

Après 4 jours à l'étuve à 34° on ajoute stérilement, dans chacun des tubes, 0,5 cc. d'une solution de lactate de chaux à 10 g. p. 100 et 0,2 cc. d'une solution de NO_3K à 10 g. p. 100. On réserve des tubes témoins. On porte à l'étuve. Après 12 heures, on dose les nitrites par le réactif de Griess dans les différents milieux. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

SOUCHES	E			G			H		
	T.	+ NO ₃ K	+ NO ₃ K + lact.	T	+ NO ₃ K	+ NO ₃ K + lact.	T	+ NO ₃ K	+ NO ₃ K + lact.
NO ₂ en γ /cc.	0	180	200	0	0	132	0	0	204

Dans les mêmes conditions, avec un milieu nitraté à 0 g. 1 p. 100 comme milieu de base, nous obtenons les résultats suivants :

SOUCHES	E		G		H	
	T	+ lactate	T	+ lactate	T	+ lactate
NO ₂ en γ /cc.	105	95	15	134	10	135

Si l'on ajoute le lactate dès le début de la culture, nous n'obtenons aucune production de NO₂ dans les milieux ammoniacotriches pour les souches G et H et pas de modification dans la production de NO₂, pour ces mêmes souches, dans les milieux nitrés par rapport au témoin.

b) *Action du lactate sur le filtrat.*

Le milieu de culture au sulfate d'ammonium est réparti dans des fioles Fourneau à raison de 100 cc. de milieu par fiole. Après 5 jours de culture à l'étuve à 34°, on centrifuge les milieux de culture (6000 tours/minute) pendant 30 minutes. On décante et on filtre sur bougie L3 suivant la technique schématisée par la fig. XX bis :

Avant leur emploi, les bougies sont éprouvées avec soin.

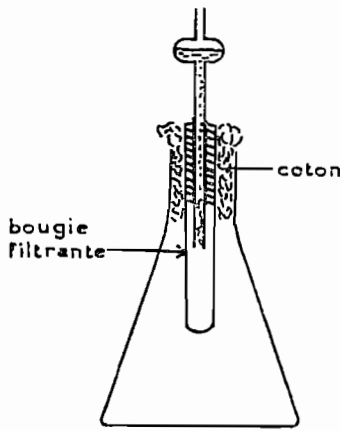


Fig. XX^{bis}. — Filtration du milieu de culture au sulfate d'ammonium.

Le filtrat est réparti stérilement dans des tubes à essais à raison de 5 cc. par tube. On ajoute 0,5 cc. d'une solution de NO_3K à 10 p. 100 et 0,5 cc. d'une solution de lactate de calcium à 10 p.100 stériles dans chaque tube. On réserve des tubes témoins. Après 12 heures à l'étuve à 34° , on obtient les résultats suivants :

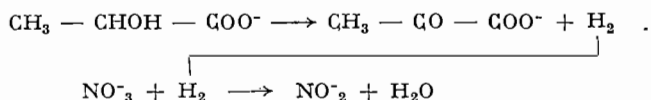
SOUCHES	E			G			H		
	T	+ NO_3K	+ NO_3K +lact.	T	+ NO_3K	+ NO_3K +lact.	T	+ NO_3K	+ NO_3K +lact.
NO_2 en γ/cc	0,6	16,8	21	0,07	0,3	228	0,01	3,6	180

Résultats obtenus avec le filtrat du milieu de culture de la souche E, âgé de 2 et 4 jours :

1° Filtrat préparé à partir du milieu de culture âgé de 2 jours :
 sans lactate + NO_3K 0,5 γ de NO_2/cc .
 avec lactate + NO_3K 7,2 γ —

2° Filtrat préparé à partir du milieu de culture âgé de 4 jours :
 sans lactate + NO_3K 6,9 γ/cc
 avec lactate + NO_3K 7 γ —

Dans ces conditions, le lactate semble jouer le rôle de donateur d'hydrogène pour les nitrates suivant le couplage d'oxydo-réduction bien connu :



Nous n'avons pu mettre le pyruvate en évidence dans le filtrat par le réactif au nitroprussiate de soude.

L'enzyme responsable de la réduction des nitrates en nitrites est un exoenzyme constitutif. En effet, l'addition de nitrate dans le filtrat provenant de milieu de culture avec du $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ comme seule source azotée provoque une production intense de nitrites dans les 10 heures qui suivent. Cette expérience a été positive pour la souche E ; le filtrat des souches G et H nécessite, en outre, la présence d'un donateur d'hydrogène, comme le lactate, pour provoquer la réduction des nitrates en nitrites.

La première phase exponentielle de croissance correspondant à une faible production de NO_2 (fig. XVIII) proviendrait du fait que le facteur limitant pour la réduction des nitrates en nitrites serait le donateur d'hydrogène. En effet, l'addition de lactate sur le filtrat d'un milieu âgé de 2 jours provoque une production de NO_2 égale à $7,2\gamma/\text{cc.}$ alors que le témoin, n'ayant reçu que NO_3 , ne donne aucune production de NO_2 .

L'expérience faite sur un milieu âgé de 4 jours provoque une accumulation de NO_2 identique dans les 2 lots (avec et sans lactate).

2° INFLUENCE DU LACTATE EN MILIEU ORGANIQUE.

Cette expérience nécessite un dosage de NO_3 dans les différents milieux de culture. A cet effet, on réalise un dosage biologique du NO_3 à l'aide de la souche E qui réduit quantitativement NO_3 en NO_2 comme le prouve l'expérience suivante :

(On dose NO_2 provenant de la réduction de NO_3 par le réactif de Griess).

Les milieux de culture suivants contenant 0,1 g p. 100 de NO_3K sont répartis dans des tubes à essais à raison de 10 cc. de milieu

par tube : (On marque d'un trait de lime, sur les tubes, le niveau des milieux de culture).

- 1° Milieu Winogradsky glucosé.
- 2° Bouillon de viande + 0,1 p. 100 de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$
- 3° Eau peptonée simple + 0,1 p. 100 de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$
- 4° Milieu V.F. + 0,1 p. 100 de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$

Les tubes à essais sont stérilisés puis ensemencés avec la souche E. On porte à l'étuve à 34°, en chambre humide, de façon à éviter l'évaporation des milieux de culture. Dans une première série de tubes, on dose tous les 2 jours la quantité de NO_2 formé. Après chaque opération, on marque d'un trait de lime, sur le tube à essai, le niveau du milieu de culture. On s'assure ainsi que l'évaporation au cours de la culture est nulle. En cas de variation de volume, on ramène au volume initial avec de l'eau distillée stérile. Après 15 jours à l'étuve, on remarque que la quantité de NO_2 dans les différents milieux de culture a atteint son maximum et que cette valeur reste constante pendant 11 jours. Par ailleurs, la réaction à la diphénylamine sulfurique est négative après destruction du NO par l'urée et l'acide sulfurique.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

MILIEU DE CULTURE		MILIEU WINO-GRADSKY	BOUILLON	EAU PEPTONÉE	V. F.
NO ₃ K ajouté en mg.		10	10	10	10
NO ₂ en mg correspondant à la réduction totale du NO ₃ ajouté		4,5	4,5	4,5	4,5
NO ₂ en mg. dosé dans le milieu de culture	1 ^{er} dosage après 15 jours	4,25	4,6	4,55	4,48
	2 ^e dosage après 26 jours	4,6	4,45	4,55	4,50

La 2^e série de tubes (qui est restée intacte) permet de faire un contrôle plus précis en pratiquant le dosage sur la totalité du milieu de culture.

Les résultats obtenus sont les suivants :

MILIEU DE CULTURE		MILIEU WINO-GRADSKY	BOUILLON	EAU PEPTONÉE	V. F.
NO ₃ K ajouté en mg.		10	10	10	10
NO ₂ en mg. correspondant à la réduction totale du NO ₃		4,5	4,5	4,5	4,5
NO ₂ en mg. dosé dans le milieu de culture	1 ^{er} dosage	4,55	4,40	4,50	4,60
	2 ^e dosage	4,50	4,62	4,50	4,55

L'étude comparative de la production de NO₂ et de la courbe de croissance de la souche E en milieu ammoniaco-nitrique (Fig. XVIII) permet de conclure que ce germe utilise exclusivement l'azote ammoniacal pour sa croissance. Afin de préciser si l'azote aminé est utilisé dans les mêmes conditions, de préférence à l'azote nitrique pour les synthèses de ce germe, nous avons fait l'expérience suivante :

Les milieux de culture contenant 0,1 g. p. 100 de NO₃K sont répartis dans des tubes à essais à raison de 10 cc. de milieu par tube. On dispose des milieux suivants :

- 1° 1 tube de Bouillon
- 2° — — + SO₄ (NH₄)₂ à 0,1 g. p. 100
- 3° 1 tube d'eau peptonée
- 4° — — + SO₄ (NH₄)₂ à 0,1 g. p. 100
- 5° 1 tube de milieu V.F.
- 6° — — + SO₄ (NH₄)₂ à 0,1 g. p. 100

On porte à l'étuve, en chambre humide, comme dans l'expérience précédente. On dose tous les deux jours la quantité de NO₂ formé, celle-ci atteint un maximum le 14^e jour de culture. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

MILIEU DE CULTURE		BOUILLON		E. PEPTONÉE		V. F.	
			+NH ₃		+NH ₃		+NH ₃
NO ₃ K en mg. ajouté dans le milieu		10	10	10	10	10	10
NO ₂ en mg. correspondant à la réduction totale du NO ₃		4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
NO ₂ en mg. dosé dans le milieu de culture	le 14 ^e jour de culture	4,6	4,5	4,4	4,6	4,5	4,5
	le 24 ^e jour de culture	4,5	4,6	4,4	4,6	4,5	4,6

On remarque que la souche E utilise de préférence l'azote aminé à l'azote nitreux pour ses synthèses.

Le dosage biologique des nitrates étant au point, nous avons recherché l'influence du lactate sur la réduction des nitrates par les souches G et H dans les différents milieux de culture organiques. Dans ce but nous avons fait l'expérience suivante :

Le milieu de Winogradsky, glucosé, contenant 0,1 g. p. 100 de NO₃K, est réparti dans des tubes à essais à raison de 9 cc. de milieu par tube. On complète à 10 cc. en ajoutant 1 cc. des différents milieux organiques suivants : milieu à l'eau peptonée, au bouillon, V.F. et asparagine (solution à 3 p. 100). On prépare ainsi deux lots. Dans un lot on ajoute 2 gouttes d'une solution de lactate de calcium à 10 p. 100 stérilisée à part. Onensemence et on porte à l'étuve à 34° en chambre humide. Les nitrites sont dosés tous les jours.

Au cours de cette expérience, aucune production de NO₂ n'a été observée dans les cas suivants :

Souche H en milieu V.F.

— — + lactate

Faible production de NO₂ (environ 2γ/cc.) pour la souche G sur milieu à l'asparagine (avec et sans addition de lactate), aucune trace à partir du 6^e jour de culture.

Production de 3 à 5 γ de NO₂ par cc. de milieu, seulement le

3^e et 4^e jour de culture, pour la souche G sur milieu V.F. (avec et sans lactate).

Pour les autres cas, les résultats sont résumés dans les graphiques suivants :

a) Souche G sur milieu au bouillon et eau peptonée.

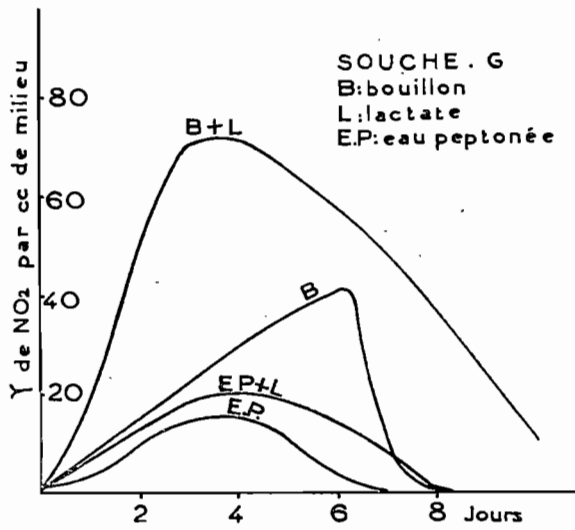


Fig. XXI. — Action du lactate sur la production de NO₂ dans les milieux au bouillon et eau peptonée ensemencés avec la souche G.

b) Souche H sur milieu au bouillon et eau peptonée :

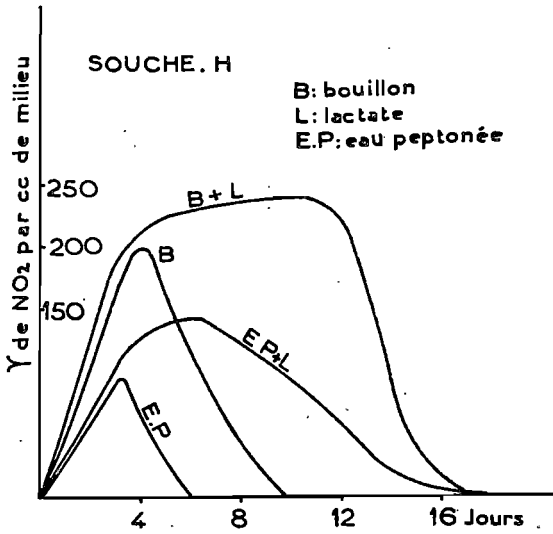


Fig. XXII. — Action du lactate sur la production de NO₂ dans les milieux au bouillon et eau peptonéeensemencés avec la souche H.

c) Souche H sur milieu à l'asparagine :

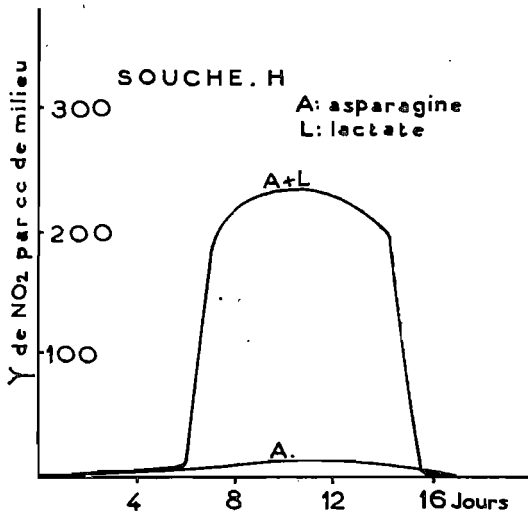


Fig. XXIII. — Action du lactate sur la production de NO₂ dans un milieu à l'asparagineensemencé avec la souche H.

Le 17^e jour de culture on caractérise NO_3 dans les différents milieux à l'aide de la diphénylamine sulfurique après destruction du NO_2 . Les résultats obtenus sont les suivants :

MILIEUX DE CULTURE		BOUILLON		E. PEPTONÉE		V. F.		ASPARAGINE	
			+ lact.		+ lact.		+ lact.		+ lact.
Souche G	NO_3	++	++	++	++	++	++	0	+++
Souche H	NO_3	0	0	0	0	0	0	++	++
NO ₂ en mg par c.c. de milieu	souche G	0	0,02	0	0	0,013	0	0	0
	souche H	0	0	0	0	0	0	0	0

Afin de connaître la quantité de NO_3 restant dans les différents milieux de culture présentant une réaction positive à la diphénylamine sulfurique, nous avons pratiqué le dosage biologique à l'aide de la souche E qui, comme on vient de le constater, possède une réelle fonction de réduire quantitativement NO_3 en NO_2 .

Dans ce but, on marque d'un trait de lime, sur les tubes, le niveau des milieux de culture. On ajoute, dans chaque tube, 3 gouttes d'une solution de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 3,6 g. p. 100. On stérilise 30 minutes à 115°. S'il y a diminution de volume au cours de la stérilisation, on ramène au volume initial (indiqué par le trait de lime) avec de l'eau distillée stérile. On enseme avec la souche E et on porte à l'étuve à 34° en chambre humide. On dose les nitrites formés tous les 2 jours. Après 8 jours, on obtient une quantité maximum de nitrites qui se maintient constante pendant plusieurs jours. La réaction à la diphénylamine est négative (après destruction des nitrites). Cette quantité maxima de nitrites correspond donc à la totalité du NO_3 réduit en NO_2 . Cette quantité est variable suivant les milieux de culture comme l'indique le tableau suivant :

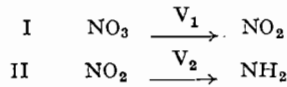
MILIEUX DE CULTURE		E. P.		BOULLON		V. F.		ASPARAGINE	
			+ lactate		+ lactate		+ lactate		+ lactate
Milieu de la souche G ensemencé avec la souche E	NO ₂ en mg par cc. de milieu	0,042	0,168	0,048	0,108	0,132	0,180		0,144
	Soit en NO ₃ K	0,092	0,369	0,105	0,237	0,29	0,396		0,316
	NO ₃ K utilisé par cc. de milieu	0,91	0,63	0,90	0,76	0,71	0,61		0,684
Milieu de la souche H ensemencé avec la souche E	NO ₂ en mg par cc. de milieu							0,048	0,228
	Soit en NO ₃ K							0,105	0,501
	NO ₃ K utilisé par cc. de milieu							0,89	0,499

Nous avons fait la même expérience avec le milieu de Winogradsky glucosé dont la source azotée est fournie sous forme de NO₃K à 0,1 g. p. 100 et de SO₄(NH₄)₂ à 0,1 g. p. 100. On dispose de milieux avec et sans addition de lactate (celui-ci est ajouté sous forme de lactate de calcium à la même dose que dans l'expérience précédente). Dans ces conditions, on ne constate aucune production de NO₂ dans les 2 lots. Le 14^e jour, on dose les nitrates restant par la méthode biologique. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

		MILIEU DE WINOGRADSKY	
		sans lactate	avec lactate
Milieu de la souche Gensemencé avec la souche E.	NO ₂ en mg par cc. de milieu	0,144	0,396
	Soit en NO ₃ K	0,316	0,87
	NO ₃ K utilisé par cc. de milieu	0,684	0,13
Milieu de la souche Hensemencé avec la souche E	NO ₂ en mg par cc. de milieu	0,192	0,240
	Soit en NO ₃ K	0,422	0,528
	NO ₃ K utilisé par cc. de milieu	0,578	0,472

Que peut-on conclure de ces résultats ? Il nous paraît tout d'abord utile de préciser les conditions indispensables pour la production de nitrites à partir de nitrates dans un milieu de culture.

On peut schématiser la réduction des nitrates comme suit :



La réaction I comprend l'ensemble des réactions qui conduisent du stade NO₃ au stade NO₂. Soit V₁ la vitesse de cette réaction : plus exactement ce sera la vitesse de la dernière réaction qui conduit au stade NO₂.

La réaction II comprend l'ensemble des réactions qui conduisent du stade NO₂ au stade NH₂. Soit V₂ la vitesse de cette réaction : dans ce cas, ce sera la vitesse de la première réaction de réduction de NO₂.

Il y aura accumulation de NO₂ dans le milieu de culture lorsque l'on aura :

$$V_1 > V_2$$

Examinons le cas de la réduction de NO₃ en NO₂ par la souche E.

En milieu synthétique nitraté, il y a forte production de NO₂.

Dans ce cas nous avons $V_1 > V_2$. V_2 n'est évidemment pas nul du fait que la croissance du germe est positive. En milieu ammoniacotritrique, on constate une réduction quantitative de NO_3 en NO_2 . Dans ce cas $V_2 = 0$. Seul V_1 est positif et la réaction correspondante ne se fait que dans le cas $\text{NO}_3 \longrightarrow \text{NO}_2$.

Examinons l'influence du lactate sur la réduction des nitrates.

L'addition de lactate, dès le début de la culture, dans les milieuxensemencés avec les souches G et H (milieu ammoniacotritrique) ne donne aucune production de NO_2 . Le dosage biologique des nitrates restant dans le milieu de culture révèle que la quantité de NO_3 utilisée dans le milieu au lactate est nettement inférieure à celle du milieu témoin sans lactate. Dans ces conditions, le lactate ne semble pas jouer le rôle de donateur d'hydrogène pour les nitrates. Il y a même effet contraire : V_1 a diminué par rapport au témoin.

Le lactate favorise la production de NO_2 dans les milieux au bouillon et eau peptonéeensemencés avec les souches G et H et sur le milieu à l'asparagineensemencé avec la souche H.

Le dosage biologique des nitrates non utilisés, ainsi que l'examen des courbes, permet d'expliquer la cause de cette augmentation de NO_2 due au lactate.

On remarque en effet que la souche G en eau peptonée et au bouillon et la souche H sur milieu à l'asparagine utilisent moins de nitrates en présence de lactate. On peut donc écrire :

$$V_1 \text{ " lactate " } < V_1 \text{ " témoin "}$$

(On suppose qu'il n'y a pas accumulation de corps intermédiaires entre NO_3 et NO_2).

L'augmentation de NO_2 dans le milieu ne peut donc provenir que d'une diminution de V_2 :

$$V_2 \text{ " lactate " } < V_2 \text{ " témoin "}$$

L'examen des courbes relatives à la souche Hensemencée sur milieu au bouillon et eau peptonée permet également de conclure que l'augmentation de NO_2 produite par le lactate est due à une diminution de V_2 par rapport au témoin. Le lactate, ici encore, ne joue pas le rôle de donateur d'hydrogène pour les nitrates. L'accumulation de NO_2 dans le milieu de culture est due, au contraire, à un freinage de la réaction $\text{NO}_2 \longrightarrow \text{NH}_2$.

H) INFLUENCE DES MILIEUX ORGANIQUES SUR LA RÉDUCTION DES NITRATES EN NITRITES

La production de NO_2 est variable suivant les milieux employés.

Il y a forte production de NO_2 dans les milieux au bouillon, eau peptonée, V.F. et asparagineensemencés avec la souche H. On constate une faible production avec la souche Gensemencée sur eau peptonée et bouillon. Production pratiquement nulle dans les milieux à l'asparagine et V.F.ensemencés avec G.

La souche E semble peu sensible aux différents milieux : il y a forte production de NO_2 dans tous les milieux utilisés. La réduction des nitrates en nitrites est même quantitative lorsque le germe possède de l'azote ammoniacal ou aminé à sa disposition.

3. — ACTION INHIBITRICE DE LA dl SÉRINE SUR L'UTILISATION DE L'AZOTE NITRIQUE ET AMMONIACAL PAR LA SOUCHE A.

Nous avons recherché l'influence de certains acides aminés sur la nutrition azotée minérale des 11 germes oligonitrophiles que nous possédons. Nous avons fait l'expérience suivante :

Le milieu de culture de Winogradsky, glucosé, nitraté à 0,1 g. p. 100 est réparti dans des tubes à hémolyse de dimensions 10×60 mm. à raison de 2 cc. de milieu par tube. Les différents acides aminés suivants sont ajoutés à la dose de 0,01 g. p. 100 :

dl méthionine
l alanine
dl phénylalanine
dl valine
l hydroxyproline
dl sérine
d acide glutamique
l leucine
d arginine
glutathion
glycocolle
l cystine
cystéine
tyrosine

l histidine
 d lysine
 tryptophane
 acide l aspartique
 l proline

Le milieu de Winogradsky, milieu tamponné, ne subit pas de variations notables de pH par additions des différents acides aminés à la dose employée.

Après 5 jours de culture à l'étuve à 34°, on mesure la croissance dans les différents tubes à l'aide du photomètre de Meunier. Seule, la croissance de la souche A est inhibée en présence de dl sérine. Afin de préciser la cause de cette inhibition sur la croissance, nous avons fait l'expérience suivante :

Le milieu de Winogradsky, glucosé dans la proportion de 1 g. p. 100, est réparti dans des tubes Legroux à raison de 25 cc. de milieu par tube. On dispose de milieux :

- 1° à azote nitrique (NO_3K à 0,1 g. p. 100)
- 2° à azote ammoniacal ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 0,1 g. p. 100)
- 3° à azote aminé (asparagine à 1,5 g. p. 100).

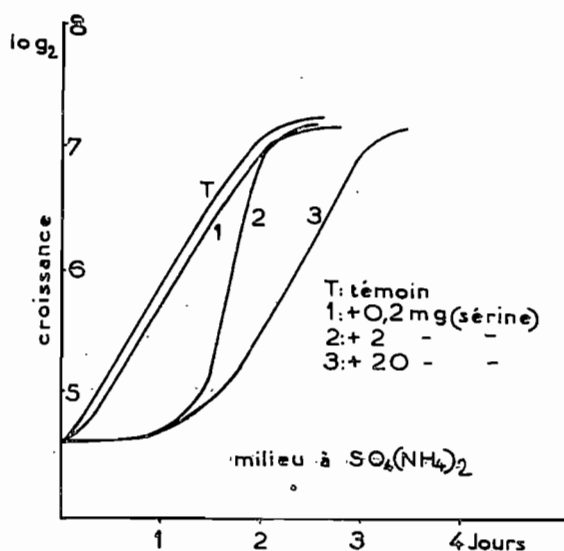


Fig. XXIV. — Action de la sérine sur la croissance de la souche A ensemencée dans un milieu à $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

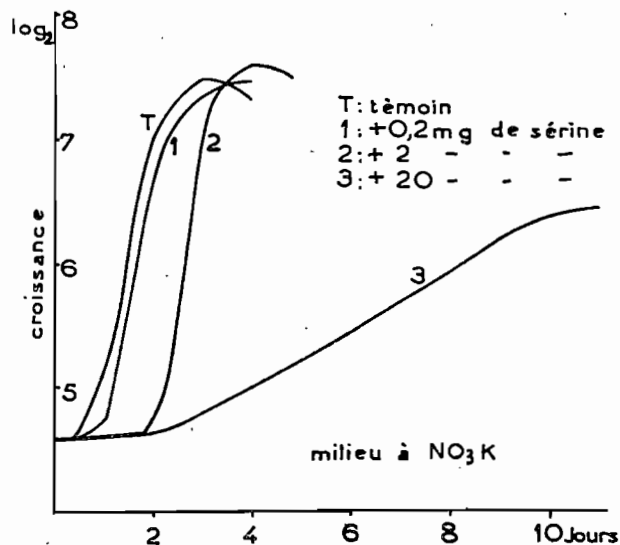


Fig. XXV. — Action de la sérine sur la croissance de la souche A ensemencée dans un milieu à NO₃K.

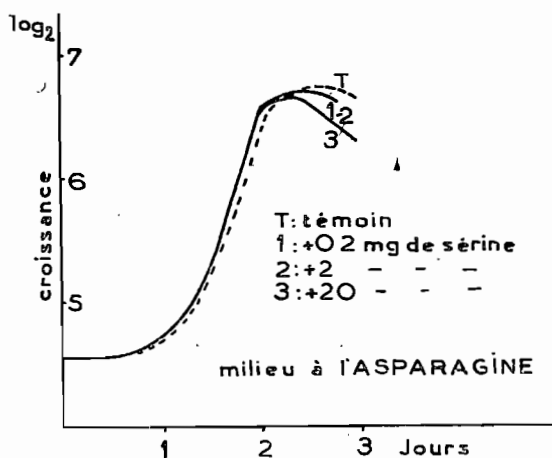


Fig. XXVI. — Action de la sérine sur la croissance de la souche A ensemencée dans un milieu à l'asparagine.

On prépare ainsi deux lots. Dans un lot, on ajoute de la dl sérine aux concentrations suivantes :

1° à 0,0002 g. p. 100.

2° à 0,002 g. p. 100.

3° à 0,02 g. p. 100.

On porte à l'étuve et on mesure la croissance 2 fois par jour (matin et soir). Les résultats sont résumés dans les figures XXIV, XXV, XXVI.

Le milieu de Winogradsky, glucosé ou non, dont la seule source azotée est la dl sérine (0,1 g. p. 100), est incapable d'assurer la croissance de la souche A.

On remarque ainsi que la sérine n'a aucune action inhibitrice dans un milieu comprenant de l'azote aminé (asparagine). En milieu ammoniacal, dans les limites des doses utilisées, son action se manifeste par une augmentation du temps de latence. Cette augmentation est proportionnelle à la quantité de sérine ajoutée dans le milieu de culture.

En milieu nitraté, la souche est plus sensible à la sérine : à la dose de 0,2 g. p. 100, on constate, en plus d'une période de latence considérablement augmentée, une inhibition partielle de la croissance.

La sérine agit donc sur la nutrition azotée minérale de la souche A. Son action est d'autant plus manifeste que l'azote minéral se trouve sous forme plus oxydée.

Ne possédant la sérine que sous la forme racémique, nous ignorons si l'action inhibitrice de cet acide aminé est due à sa forme lévogyre ou dextrogyre ou, si elle est indépendante de sa configuration stéréochimique.

4. — DOSAGE BIOLOGIQUE DES NITRATES

Cette méthode permet de faire des dosages de nitrates dans des milieux complexes contenant de l'azote aminé, ammoniacal et nitreux avec une précision de l'ordre de 0,01 γ de NO_3 par cc. de milieu, ce qui permet de pratiquer des dosages sur des prises d'essais très réduites.

Le dosage s'opère de la façon suivante : On sait que la souche E, dans un milieu ammoniaco-nitrique, réduit quantitativement NO_3 en NO_2 . Le dosage des nitrates revient donc à un dosage des nitrites : celui-ci se fait par la méthode colorimétrique (réactif de Griess).

Soit un milieu de culture dont on veut doser NO_3 . Les différentes prises d'essais, mesurées exactement, sont réparties dans des tubes à essais. On ajoute $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (environ 0,1 g. p. 100). Le volume constitué par la prise d'essai pourra être augmenté en ajoutant un volume connu de milieu Winogradsky glucosé additionné de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0,1 g. p. 100). On prépare ainsi deux lots. On stérilise. A la sortie de l'autoclave on fait un premier dosage de NO_2 dans un des lots de façon à connaître la quantité de NO_2 au départ. On ensemece les 2 lots avec la souche E. On porte à l'étuve à 34° en chambre humide. Avec le lot ayant déjà servi à faire un premier dosage, on suit journellement la production de NO_2 . Lorsque la quantité de NO_2 se maintient à une valeur constante, on pratique le dosage du 2^e lot demeuré intact. On obtient ainsi une quantité de NO_2 correspondant à la réduction totale du NO_3 en NO_2 . En multipliant cette teneur en NO_2 par le coefficient 1,3, on obtiendra la quantité de NO_3 présente dans le milieu.

CHAPITRE IV

POUVOIR AMMONIFICATEUR DE QUELQUES GERMES OLIGONITROPHILES DU SOL

Bien que d'une très grande importance, le phénomène de l'ammonification n'a suscité qu'un petit nombre de recherches.

Les méthodes anciennes consistaient à isoler du sol un grand nombre d'espèces et, parmi celles-ci, celles qui se montraient capables de libérer de l'ammoniaque à partir des protéines du bouillon étaient cataloguées ammonifiantes et supposées jouer un rôle dans l'ammonification du sol.

Récemment, POCHON et TCHAN [20], ont tenté d'élaborer un ensemble de techniques à la fois bactériologiques et chimiques qui permettent d'apporter plus de précision dans cette étude.

Le principe de la méthode est le suivant : on mesure la quantité de NH_3 libérée par la terre additionnée de diverses substances azotées.

On opère comme suit : Dans des boîtes de Pétri on étale la terre enrichie de la substance azotée dont on veut étudier l'ammonification. On amène à 20-25 p. 100 d'humidité. Cette boîte de Pétri, sans couvercle, est placée dans une autre boîte de Pétri de plus grand diamètre contenant 10 cc. de $\text{SO}_4\text{H}_2 \cdot \frac{\text{N}}{50}$. On recouvre le tout avec le couvercle de la grande boîte de Petri et on porte à l'étuve à 34°. On suit chaque jour :

- a) L'évolution de la flore par impression sur lame.
- b) Le dégagement de NH_3 en titrant chaque jour la solution de SO_4H_2 par $\text{NaOH} \cdot \frac{\text{N}}{50}$.

Nous étudierons successivement le pouvoir ammonificateur des germes oligonitrophiles sur milieux artificiels et dans la terre.

1. — POUVOIR AMMONIFICATEUR SUR MILIEUX ARTIFICIELS

Le pouvoir ammonificateur a été étudié sur les milieux suivants :

- 1° Bouillon
- 2° Eau peptonée
- 3° Milieu de Winogradsky + asparagine (1%)
- 4° — + — + glucose (1%)
- 5° Milieu de Winogradsky + urée (4‰)
- 6° — + — + glucose (1%)

Les différents milieux de culture sont répartis dans des tubes à hémolyse de 70×10 mm à raison de 2 cc. de milieu par tube. Ceux-ci sont placés dans des tubes à essais de 18 mm de diamètre contenant 3 cc. de $\text{SO}_4\text{H}_2 \frac{\text{N}}{10}$.

Les tubes sont bouchés au coton, stérilisés puis ensemencés. On porte à l'étuve à 34° dans une conserve cylindrique de dimension adéquate à tubulure basale et recouverte d'une plaque de verre. On fait arriver par la tubulure un courant d'air sous pression, débarrassé de NH_3 par un barbotage dans SO_4H_2 et humidifié par un second barbotage dans l'eau. On met un peu d'eau au fond de la

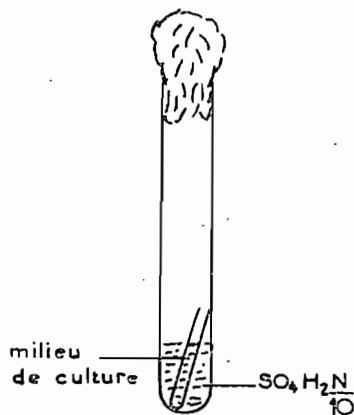


Fig. XXVI^{bis}. — Technique de la mesure du pouvoir ammonificateur.

		T	A	B	C	E	F	G	H	I	J	K	L
Bouillon	NH ₃	0	0	0	0	0	0	0,34	0	0,34	0	0	0
	croi.	12	60	86,5	37,4	62,6	93	59	115	22	34	51,7	60
E.P.	NH ₃	0	0	0	0	0	0	0,34	0,51	0	0	0	0
	croi.	11,2	39	50	25,5	38,7	77,3	53,4	87,4	34	30	39	45
Wino. Aspa.	NH ₃	0	0	0	0	0	0,34	0,30	0,34	0	0	0	0
	croi.	4,8	5,7	20	24,2	19	47,2	45	12,5	6,8	9,7	7	8,9
Wino. Aspa. glucose	NH ₃	0	0	1,36	0	0	0	0,34	0,85	0	0,17	0	0
	croi.	4,7	90,1	60	62	43,3	105	53,5	87,5	21	20,3	16,9	15,2
Wino. urée glucosé	NH ₃	0	0	0	0	0	0,51	1,36	1,36	0	0	0	0,51
	croi.	4,9	23,8	18,7	33,5	45,7	66	57,8	17,9	25,2	19,5	15,1	13
Wino. urée	NH ₃	0	0	0	0	0	0,51	0,68	1,02	0	0	0	0
	croi.	4,9	14,3	11,4	33,5	45,7	66	12,2	7,5	9,1	10	9,6	17,3

conserve. L'évaporation des milieux de culture est pratiquement annulée et il n'y a pas de fixation de NH_3 atmosphérique dans le tube témoin. Après 7 jours à l'étuve on dose NH_3 dégagé et fixé par l'acide et on mesure la croissance des germes dans les différents milieux de culture. La croissance est mesurée avec le photocolorimètre de Bonet-Maury à réseau pour une longueur d'onde de 4600 Å.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant : (NH_3 dégagé est mesuré en mg. Les chiffres relatifs à la croissance correspondent à 2 cc. de milieu complétés à 5 cc. avec de l'eau distillée).

On remarque que seules les souches G et H ont un pouvoir ammonificateur dans presque tous les milieux de culture utilisés. La souche B ne donne un dégagement de NH_3 qu'en milieu à l'asparagine glucosé.

Le glucose active le phénomène de l'ammonification dans les milieux à l'asparagine et à l'urée. Il y a un certain rapport entre l'augmentation de dégagement de NH_3 et l'augmentation de la croissance produite par addition de glucose dans le milieu.

2. — POUVOIR AMMONIFICATEUR DANS LA TERRE

Nous avons utilisé une terre de la région parisienne de pH 7,2. Le dosage du carbone et de l'azote de cette terre nous ont donné les résultats suivants :

Carbone minéral.....	0,7%
Carbone organique.....	2 %
Azote total.....	0,04%

La terre est répartie dans de petites boîtes de Pétri de 45 mm de diamètre et dans des tubes à hémolyse de 70 × 10 mm, à raison de 5 g. de terre par tube et par boîte. On ajoute, sur chaque échantillon, 0,2 cc. d'une solution d'urée à 10 p. 100 et 0,5 cc. de la suspension du germe oligonitrophile dont on veut étudier le pouvoir ammonificateur. La suspension bactérienne est préparée comme suit :

Les cultures sont faites en boîtes de Roux à raison de 100 cc. de milieu par boîte. On utilise le milieu Winogradsky glucosé dont la source azotée est fournie sous forme de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 0,1 p. 100.

Après 15 jours de culture à l'étuve à 34°, on centrifuge les milieux pendant 20 minutes à 5000 trs/minute. On décante, on lave le dépôt microbien à l'eau distillée et on centrifuge à nouveau. On répète trois fois cette opération. Après la dernière décantation on complète le dépôt bactérien à 10 cc. avec de l'eau distillée. Cette suspension de germes servira aux ensemencements. On humidifie de façon identique les différents échantillons de terre. Les boîtes de Pétri de 45 mm de diamètre, sans couvercle, sont placées dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre contenant 10 cc. de $\text{SO}_4\text{H}_2 \frac{\text{N}}{50}$.

Quant aux tubes à hémolyse, ils sont placés dans des tubes à essais de 18 mm de diamètre contenant 3 cc de $\text{SO}_4\text{H}_2 \frac{\text{N}}{50}$. On bouche les tubes à essais à l'aide de bouchons de liège. Dans ce cas comme dans le précédent, on suit chaque jour le dégagement de NH_3 fixé par SO_4H_2 . Les cultures sont portées à l'étuve à 34°.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Nombre de jours de culture			1	2	3	4	5	6	7	8
Terre témoin non ensemencée	NH ₃	b.p.	0	0	0	0	0	0	0	0
		t.h.	0	0	0	0	0	0	0	0
A	NH ₃	b.p.	0,17	0,54	1,53	3,19	0,54	0,1	0	
		t.h.	0	0	0	0,06	0	0		
C	NH ₃	b.p.	0,17	0,68	3,74	1,29	0,06	0		
		t.h.	0	0	0	0	0	0		
E	NH ₃	b.p.	1,19	2,38	0,57	0,40	0	0		
		t.h.	0,20	0	0	0	0	0		
F	NH ₃	b.p.	1,19	1,70	2,78	0,78	0,27	0,1	0	
		t.h.	0,34	0	0	0	0	0		
G	NH ₃	b.p.	0,34	1,70	4,08	1,15	0,34	0		
		t.h.	0	0,06	0,06	0	0	0		
H	NH ₃	b.p.	4,08	1,29	0,68	2,82	0,50	0		
		t.h.	0,10	0,34	0,27	0,17	0,06	0,02	0	
I	NH ₃	b.p.	0,34	0,61	1,53	3,74	0,40	0,10	0	
		t.h.	0	0	0	0	0	0		
J	NH ₃	b.p.	0,34	0,44	3,19	1,90	0,55	0,15	0	
		t.h.	0	0	0,06	0,17	0,05	0		
K	NH ₃	b.p.	0	0,34	1,12	2,72	0,44	0,20	0	
		t.h.	0	0	0,06	0,17	0,06	0		
L	NH ₃	b.p.	0,136	0,34	3,06	0,40	0			
		t.h.	0	0	0	0	0			
Terre + urée non ensemencée	NH ₃	b.p.	0,612	1,25	2,10	3,25	1,02	0		
		t.h.	0	0	0,06	0,71	0,51	0,34	0	

Abbréviations : A NH₃ b.p. = NH₃ en mg fixé par SO₄H₂ dans le cas des boîtes de Pétri ensemencées avec la souche A.

A NH₃ t.h. = idem mais en tube à hémolyse.

Courbes représentatives : (cas des boîtes de Pétri)

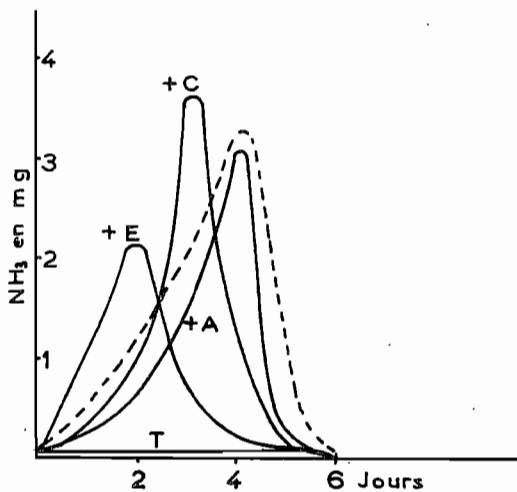


Fig. XXVII. — Courbes d'ammonification d'une terre additionnée d'urée puis ensemencée avec les souches A, C ou E.

— — — : Terre additionnée d'urée non ensemencée.
 T : Terre sans urée et non ensemencée.

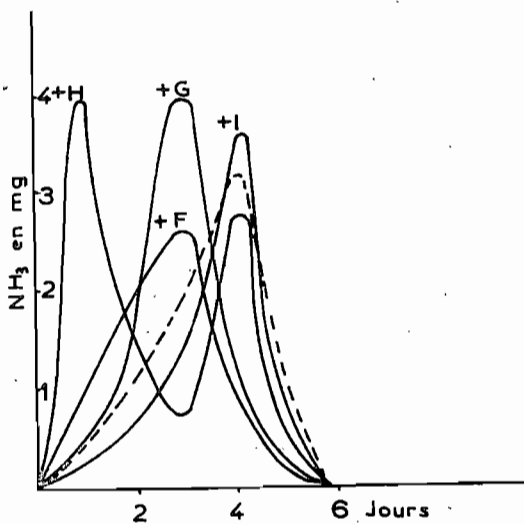


Fig. XXVIII. — Courbes d'ammonification d'une terre additionnée d'urée puis ensemencée avec les souches F, G, H ou I.

— — — : Terre additionnée d'urée non ensemencée.

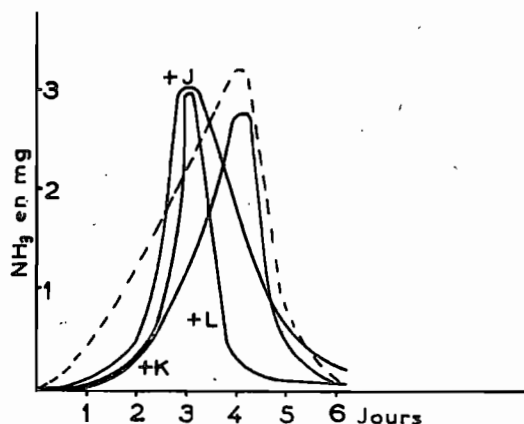


Fig. XXIX. — Courbes d'ammonification d'une terre additionnée d'urée puis ensemencée avec les souches J, K ou L.
 - - - - : Terre additionnée d'urée non ensemencée.

Nous avons vérifié que la technique des « boîtes de Pétri » ne comportait pas de perte de NH_3 . Dans ce but nous avons fait l'expérience suivante [12] :

La terre est répartie d'une part dans des fioles Fourneau de diamètre de base de 75 mm et d'autre part dans des boîtes de Pétri de même diamètre. Le poids de terre ajoutée dans chaque fiole et dans chaque boîte est de 20 g. Le rapport $\frac{\text{Surface}}{\text{Volume}}$ est ainsi conservé. On ajoute l'urée à raison de 0,4 p. 100. On humidifie. On place le tout à l'étuve à 34°.

NH_3 dégagé dans les boîtes de Pétri est dosé suivant la technique habituelle. NH_3 dégagé dans les fioles Fourneau est entraîné par un courant d'air barbotant dans $\text{SO}_4\text{H}_2 \frac{\text{N}}{50}$. On dose NH_3 fixé dans l'acide par $\text{NaOH} \frac{\text{N}}{50}$. Les résultats obtenus sont les suivants :

Nombre de jours de culture	1	2	3	4	5	6	7	8
NH ₃ dégagé en mg par b.p.	0,7	1,42	3,05	5,57	3,9	2,38	1,15	0,88
NH ₃ dégagé par entraînement en mg.	0,4	1,02	3	5,44	4,9	4,08	2,7	1,7
NH ₃ dégagé dans le témoin sans urée	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0,1

Courbe représentative :

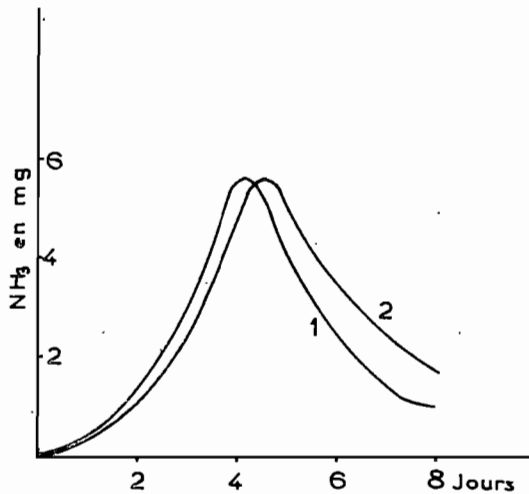


Fig. XXX. — Courbes d'ammonification d'une terre enrichie d'urée :
 1. : en boîte de Pétri.
 2. : en fioles Fourneau.

On constate que la perte de NH₃ par la technique POCHON est pratiquement nulle. D'autre part l'aération n'affecte sensiblement pas le dégagement de NH₃. Les champignons apparaissent plus tardivement en condition aérée, ce qui pourrait expliquer la chute moins brutale de la courbe.

L'examen des courbes d'ammonification par la méthode Po-

CHON et TCHAN, nous montre clairement les perturbations causées dans le processus d'ammonification par ensemencement massif dans le sol de germes oligonitrophiles.

La souche F, possédant un certain pouvoir ammonificateur *in vitro*, est pratiquement sans action dans le sol.

Les souches E et K provoquent une diminution du dégagement de NH_3 . Les souches G et H augmentent le dégagement par rapport à la terre enrichie en urée, mais non ensemencée.

Ces résultats ne sont valables que dans les conditions d'expérience. Un sol, en effet, sans changement de conditions de milieu, ne se trouve pas subitement envahi par une certaine catégorie de germes. L'ensemencement dans la terre, en petite quantité, de germes oligonitrophiles, est pratiquement sans action sur le phénomène de l'ammonification. Ce qui fait pulluler un germe dans le sol, ce n'est pas sa présence en plus ou moins grande quantité, mais ce sont les conditions mêmes du milieu. A chaque condition de milieu, correspond pour le sol un certain équilibre biologique. Cet équilibre sera ou non en faveur de la prolifération du germe dont on veut étudier l'activité dans le sol.

CHAPITRE V

RAPPORTS ENTRE GERMES OLIGONITROPHILES ET AZOTOBACTER

1. — FACTEURS INFLUENÇANT LA FIXATION DE L'AZOTE PAR LES AZOTOBACTER. HISTORIQUE

L'association, voire même la symbiose, des *Azotobacter* avec d'autres germes du sol est un fait qui a été observé par de nombreux auteurs.

LIND et WILSON (1942) [15], mesurent l'azote fixé par des cultures pures et mixtes d'*Az. Vinelandii*, en l'absence ou en présence d'un agent contaminant non identifié, dont l'effet stimulant dépend de la nature et de la teneur en Fe du milieu.

JONES et GREAVES (1943) [8], ont remarqué l'influence de nombreux facteurs de croissance : biotine, ergostérol, acide nicotinique, riboflavine, etc. sur la fixation de l'azote par l'*Az. chroococcum*.

FEDOROV (1945) [6], montra qu'il existe une corrélation entre l'intensité de fixation de l'azote et la structure du composé organique utilisé par l'*Azotobacter*; en règle générale, il est fixé d'autant plus d'azote que la source de carbone contient plus d'hydrogène et moins d'oxygène.

BLINKOV (1947) [5], signala que les cellules vivantes d'*Azotobacter* sont capables de mettre en liberté NH_3 en raison de leur degré d'épuisement. L'acidification du milieu arrête l'accumulation de NH_3 et son alcalinisation la stimule dans les cultures d'*Azotobacter*. L'ammoniaque, mis en liberté par de vieilles cultures épuisées, provient de la dégradation des substances azotées des *Azotobacter*.

NICKELL (L.G.), BURCKOLDER (P.R.) (1947) [19], ont remarqué le pouvoir inhibiteur des Actinomycètes sur les *Azotobacter*. Ceux-ci sont tués ou bien leur nombre est très réduit.

2. — ASSOCIATION DES AZOTOBACTER AVEC DES GERMES OLIGONITROPHILES

Lors de l'isolement de fixateurs d'azote atmosphérique par la technique des grains de terre sur plaque de silico-gel, nous avons remarqué très souvent la présence de germes oligonitrophiles au sein des colonies d'*Azotobacter*. Nous nous sommes demandé s'il ne s'agissait pas d'une association naturelle amenant des modifications dans les fonctions physiologiques des *Azotobacter*. Les études ont porté sur la croissance, la production de substance noire et le rendement de fixation [11].

A) INFLUENCE DE L'ASSOCIATION AZOTOBACTER - OLIGONITROPHILES SUR LA SYNTHÈSE DE SUBSTANCE MICROBIENNE.

Les cultures sont faites sur milieu de Winogradsky, glucosé dans la proportion de 1 g. p. 100, en tubes Legroux, à raison de 25 cc. de milieu par tube. Chacune des 11 souches d'oligonitrophiles que nous possédons est cultivée avec l'*Azotobacter chroococcum*. Des cultures séparées d'oligonitrophiles et d'*Azotobacter* servent de témoins. Le même plan d'expérience est réalisé sur un milieu où le glucose est remplacé par du benzoate de sodium dans la proportion de 1 g. p. 100.

Les fioles sont placées dans une conserve cylindrique et soumises aux mêmes conditions que les tubes à essais ayant servi à l'étude de l'ammonification (Voir paragraphe IV).

L'évaporation des milieux de culture est ainsi annulée (après un mois à l'étuve, le volume du milieu de culture d'une fiole témoin correspond au volume initial).

La croissance des germes est mesurée chaque jour au photomètre de Meunier. On constate, qu'il n'y a pratiquement aucune croissance dans les tubes où les oligonitrophiles ont été ensemencés seuls et, corrélativement, qu'il n'y a pas eu d'azote fixé (dosage par la méthode de Kjeldahl).

Quant aux cultures mixtes, les croissances sont représentées dans les graphiques suivants :

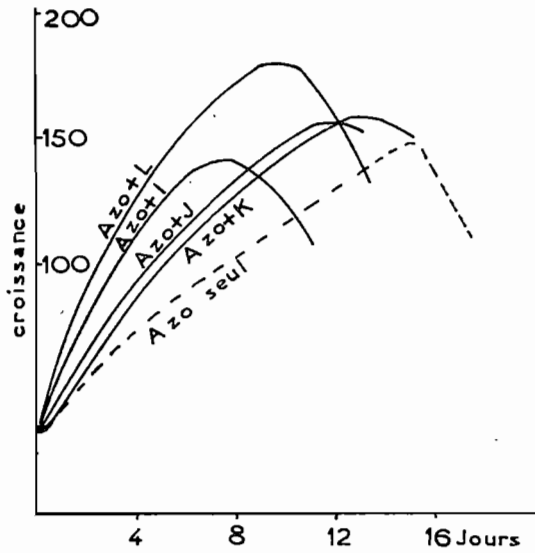


Fig. XXXI. — Courbes de croissance de l'*Azotobacter chroococcum* seul ou associé avec les souches A, B ou C.

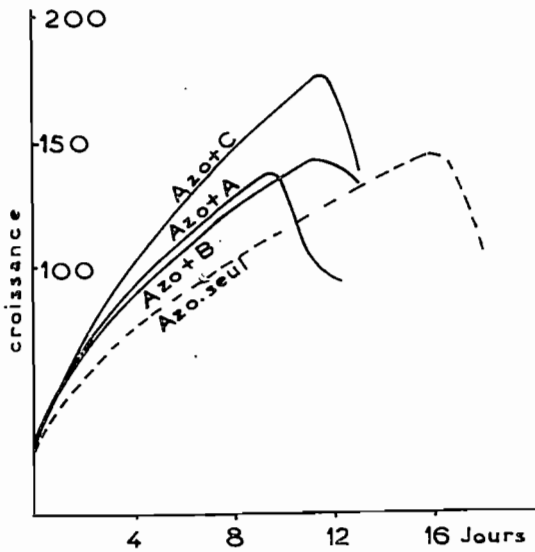


Fig. XXXII. — Courbes de croissance de l'*Azotobacter c.* seul ou associé avec les souches E, F, G ou H.

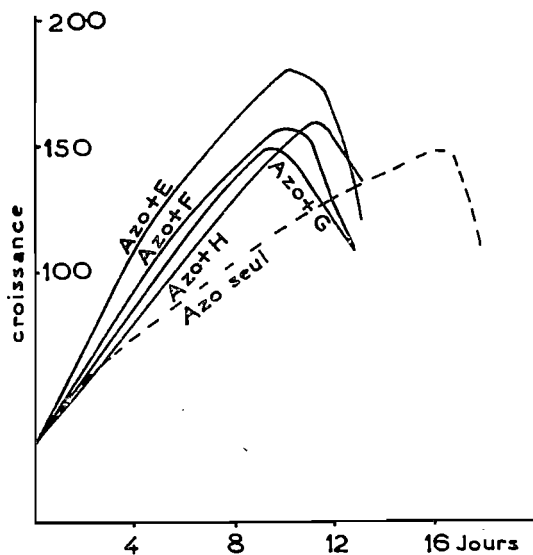


Fig. XXXIII. — Courbes de croissance de l'*Azotobacter c.* seul ou associé avec les souches I, J, K ou L.

On constate, par l'examen des courbes de croissance, une activation de la synthèse de substance microbienne dans les cultures mixtes par rapport à l'*Azotobacter* ensemencé seul.

Dès le 3^e jour de culture, l'examen microscopique révèle une prolifération des oligonitrophiles représentant environ le tiers des *Azotobacter*. Ce pourcentage diminue progressivement et, en fin de culture, les oligonitrophiles ont presque complètement disparu.

B) ELABORATION DE SUBSTANCE NOIRE

1^o Elaboration chez les germes oligonitrophiles ensemencés seuls.

WANG et TCHAN (1946) [30], montrèrent que le noircissement d'un milieu de culture au benzoate par l'*Azotobacter chroococcum* est dû à une action diastasique, et que le corps noir ainsi formé a certaines propriétés de l'humus.

Nous avons remarqué que certaines de nos souches oligonitrophiles étaient capables, ensemencées isolément, de produire

le corps noir à partir du benzoate dans un milieu azoté. Nous avons recherché comparativement l'élaboration de cette substance chez les germes oligonitrophiles et chez l'*Azotobacter c.*

Nous avons fait l'expérience suivante :

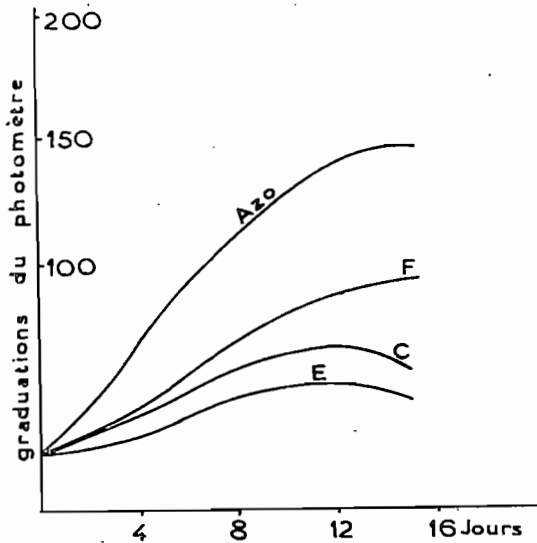


Fig. XXXIV. — Courbes de production de substance noire de l'*Azotobacter c.* et des souches C, E, et F.

Le milieu de Winogradsky est réparti dans des boîtes de Roux à raison de 100 cc. de milieu par boîte. La substance carbonée est fournie sous forme de benzoate de sodium dans la proportion de 1 gr. p. 100 ; la substance azotée est $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ dans la proportion de 0 g. 1 p. 100. Les boîtes sont mises à l'étuve, en chambre humide. Seules les souches C, E, et F se sont montrées capables de produire la substance noire. Les résultats sont résumés dans la figure XXXIV.

2° Etude de la substance noire produite par les souches C, E et F.

a) Extraction.

Les cultures sont faites en boîtes de Roux contenant chacune 100 cc. de milieu au benzoate. Après 15 jours à l'étuve, on centri-

fuge les milieux (30 minutes à 5000 tours/minute) pour éliminer les corps bactériens. On décante. On précipite le corps noir en acidifiant par une solution de ClH à 10 p. 100. On centrifuge à nouveau (15 minutes à 5000 tours/minute). On décante. On lave le dépôt à l'eau distillée, on centrifuge à nouveau. On répète 3 fois cette opération. La substance noire est soumise ensuite à la dialyse contre de l'eau distillée pendant 24 heures.

b) *Floculation.*

On recherche le pouvoir floculant de certains électrolytes sur le corps noir mis en solution dans l'eau distillée. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

ACIDE ET SELS UTILISÉS	PRÉCIPITATION DU CORPS NOIR
ClH	Précipitation complète à partir de concentration en HCl à 2 p. 100 pour les souches C et F. Aucune floculation pour la substance noire de E même pour de fortes concentrations en HCl .
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Précipitation complète pour les souches C et F. Pas de précipitation pour E.
CO_3Ca	Idem.
Cl_2Ca	Les 3 substances noires (C, E et F) précipitent.
ClNa , NO_3Na KCl	A saturation, ne floculent aucune des 3 substances noires.

c) *Floculation de la substance noire produite par l'Azotobacter c. (WANG) [29].*

ClH : Floculation complète
 NaCl — NO_3Na — KCl : A saturation : floculation incomplète.
 $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ \ Floculation presque
 CO_3Ca / complète
 CaCl_2

On constate ainsi l'analogie qui existe entre la substance noire produite par certains germes oligonitrophiles et celle produite par l'*Azotobacter chroococcum*.

3° *Elaboration de substance noire dans les cultures mixtes (Azotobacter - oligonitrophiles).*

Pour étudier l'influence de cette association sur la production de substance noire à partir du benzoate comme source carbonée, nous avons opéré de la façon suivante :

Le milieu de culture est réparti dans des tubes Legroux à raison de 25 cc. de milieu par tube. On porte à l'étuve, en atmosphère humide débarrassée de NH_3 (voir § IV). Chaque jour on dose la substance noire formée. Les résultats sont résumés dans les figures XXXV, XXXVI et XXXVII.

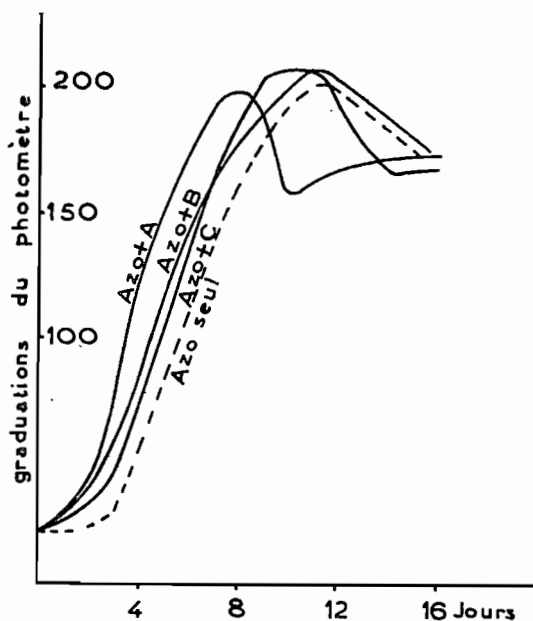


Fig. XXXV. — Courbes de production de substance noire de l'*Azotobacter c.* seul ou associé avec les souches A, B ou C.

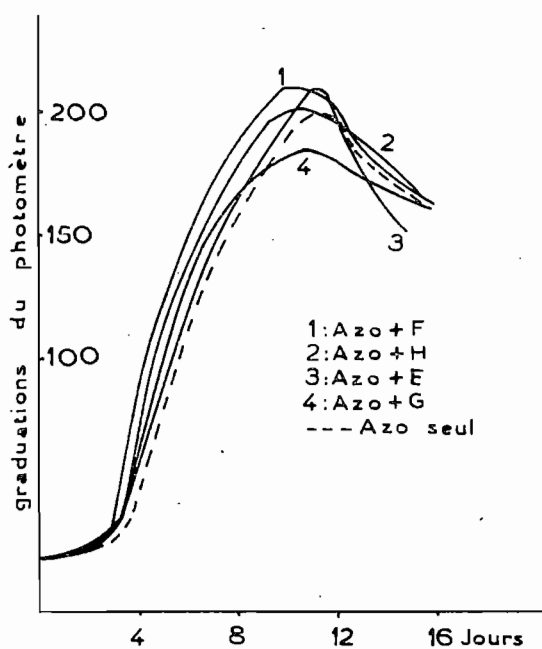


Fig. XXXVI. — Courbes de production de substance noire de l'*Azotobacter c.* seul ou associé avec les souches E, F, G ou H.

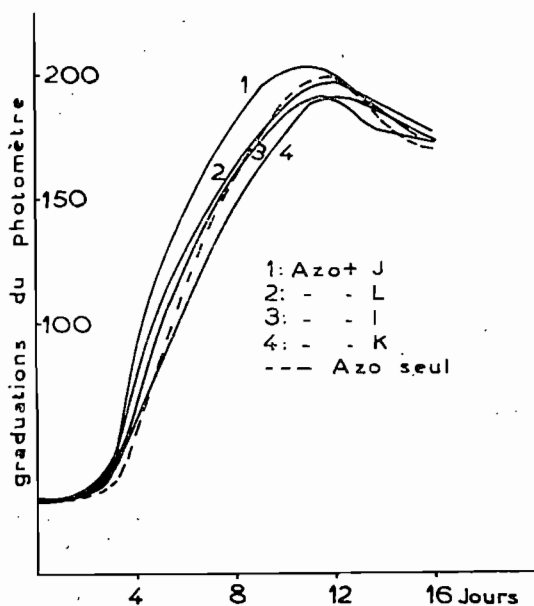


Fig. XXXVII. — Courbes de production de substance noire de l'*Azotobacter c.* seul ou associé avec les souches I, J, K ou L.

On constate, sauf pour les souches I, K et L, une activation de la production de substance noire.

L'examen microscopique des milieux au benzoate révèle le même phénomène que dans le milieu au glucose : au début de la culture, les oligonitrophiles représentent environ la moitié des germes, ce pourcentage diminuant progressivement au cours de la culture.

C) RENDEMENT DE FIXATION

1° *En conditions hyperaérobies.*

Le milieu de Winogradsky, glucosé à 1 g. p. 100, sans source azotée, est réparti dans des boîtes de Roux contenant chacune 200 cc. de milieu. Les flacons sont maintenus droits. On assure un barbotage d'air dans les différents milieux de culture à l'aide de la trompe à vide. Cet air est débarrassé de NH_3 par un barbotage préalable dans une solution de SO_4H_2 à 10 p. 100. Entre chaque boîte de Roux, le courant d'air passe également dans des flacons contenant SO_4H_2 à 10 p. 100 qui fixe NH_3 libéré dans les différents milieux de culture. Onensemence et on porte à l'étuve à 34°.

Dans une première expérience, nous avons utilisé les associations suivantes :

Azotobacter c. seul.

—	+	souche A
—	+	— B
—	+	— C
—	+	— E

Après 10 jours de culture à l'étuve, on dose la quantité de sucre restant et l'azote fixé après avoir complété le volume des différents milieux de culture à 200 cc. avec de l'eau distillée. On dose le glucose suivant la méthode de G. BERTRAND et l'azote total par la méthode de Kjeldahl.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

SOUCHES UTILISÉES	AZOTE FIXÉ EN mg. DANS :		GLUCOSE UTILISÉ EN mg. DANS 10 cc. DE MILIEU	R% DE FI- XATION RAP- PORTÉ A 100 mg. DE GLUCOSE	% D'AUG- MENTATION OU DE DIMINUTION
	LES FIOLES A SO_4H_2	10 cc. DE MILIEU			
Azotobacter	0	0,56	100	0,56	0
— + A	0,23	0,57	100	0,57	± 0
— + B	0,70	0,63	100	0,63	+ 12,5
— + C	1,40	0,51	70,6	0,72	+ 28,5
— + E	0	0,63	100	0,63	+ 12,5

Le dosage du sucre d'une fiole témoin avant et après stérilisation (20 minutes à 115°) a révélé une diminution de la quantité de glucose dans le milieu de culture de l'ordre de 0,5 p. 100. Nous rappelons que le milieu de culture utilisé est à pH 7,25.

Dans une seconde expérience nous avons opéré sur les associations suivantes :

Azotobacter c. seul.

— + souche F
 — + — G
 — + — H
 — + — I
 — + — J
 — + — K
 — + — L

Après 8 jours à l'étuve, dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente, nous avons dosé le sucre restant et l'azote fixé dans les différents milieux de culture. Les résultats ont été les suivants :

SOUCHES UTILISÉES	AZOTE FIXÉ EN mg. DANS :		GLUCOSE UTILISÉ EN mg. DANS 10 cc. DE MILIEU	R % DE FI- XATION RAP- PORTÉ A 100 mg. DE GLUCOSE	% D'AUG- MENTATION OU DE DIMINUTION
	LES FIOLES A SO_4H_2	10 cc. DE MILIEU			
Azotobacter	0	0,33	50	0,66	0
— + F	0	0,26	36,5	0,71	+ 7,5
— + G	0	0,32	53	0,60	— 9
— + H	0	0,35	39,5	0,88	+ 33,5
— + I	0,14	0,40	48	0,83	+ 25,7
— + J	0	0,40	46	0,86	+ 30,3
— + K	0	0,39	58,5	0,66	0
— + L	0	0,40	58,5	0,68	+ 3

En fin de culture, le pH de tous les milieux est de 7,1 et l'examen microscopique révèle une culture pure d'*Azotobacter* sans trace d'oligonitrophiles pour les associations suivantes :

<i>Azotobacter</i>	+	souche H
—	+	— I
—	+	— J
—	+	— K
—	+	— L

Les germes oligonitrophiles sont très rares (1 par champ microscopique environ, soit le 1/100^e des *Azotobacter*) pour les associations suivantes :

<i>Azotobacter</i>	+ A
—	+ B (pratiquement inexistant).
—	+ C
—	+ E

Les oligonitrophiles sont un peu plus nombreux (1/20^e des *Azotobacter* environ) pour les associations :

<i>Azotobacter</i>	+ F
—	+ G

Il est à noter que les *Azotobacter* en associations avec les germes C et F sont de taille nettement plus grande qu'en culture pure.

2^e En conditions semi-aérobies.

Le milieu de culture, glucosé à 1 g. p. 100, est réparti dans des Erlenmeyers contenant chacun 100 cc. de milieu. Ceux-ci sont placés dans une conserve cylindrique et soumis aux mêmes conditions que les tubes Legroux cités plus haut. Après 20 jours de culture à l'étuve à 34° on dose l'azote fixé et le glucose non utilisé.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

SOUCHES UTILISÉES	AZOTE FIXÉ EN mg. DANS 10 cc. DE MILIEU	GLUCOSE UTILISÉ DANS 10 cc. DE MILIEU	R% DE FIXATION RAPPORTÉ A 100 mg. DE GLUCOSE	% D'AUGMENTATION OU DE DIMINUTION
Azotobacter	0,308	33,25	0,924	0
— + A	0,364	56,5	0,644	— 30,4
— + B	0,266	29,5	0,901	— 2,1
— + C	0,252	22	1,184	+ 28,2
— + E	0,341	25	1,366	+ 47,8
— + F	0,294	21,25	1,383	+ 49,6
— + G	0,322	30,25	1,064	+ 15,1
— + H	0,392	25	1,568	+ 69,6
— + I	0,616	100	0,616	— 33,3
— + J	0,420	28	1,498	+ 62
— + K	0,168	25	0,672	— 27,2
— + L	0,336	38,5	0,870	— 5,8

L'examen microscopique en fin de culture révèle une lyse plus ou moins complète des *Azotobacter*. Les oligonitrophiles sont pratiquement inexistantes sauf pour les souches C et E où l'on rencontre quelques unités par champ microscopique.

L'étude comparative des courbes et des rendements de fixation montre qu'il n'y a aucun parallélisme entre variation de croissance, variation de production de substance noire et quantité d'azote fixé par grammes de glucose utilisé. Le rendement est d'ailleurs indépendant du nombre des *Azotobacter*. L'association *Azotobacter* + souche L par exemple, présente un maximum de croissance au 11^e jour de culture, supérieur au maximum de l'association *Azotobacter* + souche H qui a lieu au même moment. L'examen microscopique montre, dans les deux cas, le même pourcentage d'oligonitrophiles qui est égal environ au 1/10^e des *Azotobacter*. Or, comme l'indique le tableau, les rendements de fixation sont très différents dans les deux cas. De même, la quantité d'azote fixé est plus grande dans l'association *Azotobacter* + H que dans l'association *Azotobacter* + L.

Certaines cultures mixtes provoquent un dégagement de NH_3 entraînable par l'air. C'est le cas pour les souches A, B, C et I.

Il semble qu'une substance produite par certains germes oligonitrophiles modifie certaines fonctions physiologiques des *Azotobacter*.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

BEIJERINCK définit ainsi les germes oligonitrophiles : « Microbes qui, dans la libre concurrence avec les autres microbes, se développent dans un milieu nourricier où l'on n'a pas introduit avec intention des composés azotés, mais d'où l'on n'a pas non plus pris soin d'enlever les dernières traces de ce composé. Ils ont la propriété de fixer, soit seuls, soit en symbiose avec d'autres germes, l'azote atmosphérique libre afin de s'en servir comme nourriture ».

D'après WINOGRADSKY, il n'est pas impossible qu'il existe quelques germes aptes à une activité fixatrice très réduite, mais seules des expériences poursuivies à l'aide d'un milieu strictement dépourvu d'aliment azoté et comportant un contrôle chimique précis peuvent permettre de résoudre ce problème.

Une question essentielle se posait donc : Ces germes ont-ils la propriété de fixer l'azote moléculaire ? Nous avons essayé d'y répondre et, en outre, de préciser quelques particularités du métabolisme azoté d'un certain nombre de germes oligonitrophiles isolés par nous et leurs rapports avec les *Azotobacter*.

1. — NUTRITION AZOTÉE MINÉRALE

A) LES GERMES OLIGONITROPHILES DU SOL SONT-ILS DES FIXATEURS D'AZOTE MOLÉCULAIRE ?

Nous avons constaté que, par introduction d'air ayant barboté au préalable dans de l'acide sulfurique (donc dépourvu de NH_3) dans les récipients de culture, ces germes ne font plus augmenter la teneur en azote du milieu; sans cette précaution, on note un gain en azote, ce qui aurait pu, par erreur, être interprété comme un phénomène de fixation d'azote moléculaire. Ces germes sont donc dépourvus de tout pouvoir fixateur d'azote libre contrairement à ce que laisse supposer BEIJERINCK.

B) QUANTITÉ D'AZOTE MINIMA NÉCESSAIRE A LA CROISSANCE DE CES GERMES.

En utilisant des milieux de culture ne contenant pratiquement aucune trace d'azote combiné, nous avons recherché la quantité minima d'azote ammoniacal ou nitrique nécessaire à la prolifération des germes. Cette quantité a été déterminée pour cinq de nos souches. Elle a été de l'ordre de 0,003 γ /litre pour l'azote ammoniacal, et de 0,0014 g. / litre pour l'azote nitrique. Le maximum de croissance pour ces cinq souches, était pratiquement atteint pour une concentration en azote égale à 2,8 γ par litre pour $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

De ces résultats, on peut conclure que les germes oligonitrophiles méritent bien leur nom, car une concentration en azote aussi faible que 0,003 γ /litre est déjà capable d'assurer leur prolifération.

2. — ÉTUDE DU RAPPORT $\frac{C}{N}$
DES GERMES OLIGONITROPHILES

Cette étude a montré des rapports très différents pour les cinq souches étudiées (rapports variant de 5 à 100). Cette variation provient probablement de l'élaboration en plus ou moins grande quantité du mucus, substance pauvre en azote, par les germes oligonitrophiles.

3. — RÉDUCTION DES NITRATES EN NITRITES

Poursuivant nos recherches sur onze souches de germes oligonitrophiles, nous avons constaté que certaines d'entre elles étaient capables de réduire les nitrates en nitrites dans des conditions définies. Nous avons examiné successivement l'influence de l'oxygène, de l'ammoniaque et des substances organiques sur cette réduction.

A) INFLUENCE DE L'OXYGÈNE.

Les germes oligonitrophiles que nous possédons sont des aérobies stricts. Ensemencés en gélose profonde (milieu de Winograd-

ky nitraté ou milieu à base de bouillon de viande), ces germes ne donnent aucune colonie à l'intérieur de la gélose.

Nous avons constaté que la réduction des nitrates en nitrites par deux de nos souches (souches G et H) en milieu synthétique (milieu de Winogradsky), nécessite un milieu aéré. En milieu semi-aérobie ($\frac{\text{Surface}}{\text{Volume}}$ du milieu de l'ordre de 0,1) la croissance de ces germes est très lente et il n'y a pas production de NO_2 ou de NH_3 . Dans ces conditions, l'accumulation de NO_2 ne se produit que pour un $\frac{S}{V}$ au moins égal à 1. La production de NO_2 est d'autant plus rapide et plus intense que le rapport $\frac{S}{V}$ augmente (expérience poursuivie en faisant barboter un courant d'air dans les milieux de culture, réalisant ainsi un $\frac{S}{V}$ pratiquement infini).

L'oxygène n'a pas pour effet d'augmenter le rH du milieu de culture. Des mesures simultanées de la croissance et du potentiel d'oxydo-réduction (méthode colorimétrique) ont montré, pour ces 2 souches, que la phase exponentielle de croissance se trouve dans la zone où le milieu a atteint son minimum de potentiel d'oxydo-réduction (rH < 3,1). Par ailleurs, nous avons constaté que la croissance est d'autant plus rapide et plus intense que le milieu est plus aéré.

Il n'y a donc production de nitrites dans les milieux synthétiques nitrates, glucosés (par les souches G et H) qu'en conditions aérobies, ce qui correspond d'après les résultats observés à un milieu très réducteur.

En milieu organique, la production de NO_2 est par contre peu sensible au rapport $\frac{S}{V}$. On a constaté, en effet, une forte accumulation de nitrites pour un $\frac{S}{V}$ égal à 0,1 dans les milieux au bouillon, eau peptonée, V. F. et asparagineensemencés avec la souche H.

Avec la souche E, cependant, nous avons constaté une forte accumulation de NO_2 dans tous les milieux (synthétiques ou non) que nous avons réalisés. Cette souche possède un pouvoir réduc-

teur très faible ($rH > 14$). Les souches isolées diffèrent donc beaucoup entre elles à ce point de vue.

B) INFLUENCE DE NH_3 .

L'addition de NH_3 (sous forme de $SO_4(NH_4)_2$) dans le milieu synthétique nitraté, en aérobiose, à raison de 100 γ par cc. de milieu, inhibe complètement la production de NO_2 par les souches G et H. Quant à la souche E, la réduction de NO_3 en NO_2 n'est nullement affectée par NH_3 . A noter que NH_3 fait diminuer la phase de latence des courbes de croissance de ces germes.

C) INFLUENCE DE L'AZOTE AMMONIACAL, NITREUX ET NITRIQUE SUR LA CROISSANCE DE LA SOUCHE E.

Des mesures simultanées de la croissance et de la production de NO_2 dans un milieu synthétique ammoniac-nitrique, montrent qu'à une forte production de NO_2 correspond une diminution du taux de croissance. Tout se passe comme si l'hydrogène nécessaire aux synthèses microbiennes était provisoirement détourné pour réduire NO_3 en NO_2 . La croissance ne reprend que lorsque tout le NO_3 , présent dans le milieu de culture, a été réduit en NO_2 .

Un phénomène de diauxie a été constaté entre l'utilisation de l'azote ammoniacal et nitreux. L'enzyme $NO_2 \rightarrow NH_3$ serait donc, d'après la théorie de MONOD, un enzyme adaptatif. Cette hypothèse explique difficilement l'arrêt de croissance constaté sur un milieu nitraté : arrêt précédé d'une première phase exponentielle et correspondant à une forte production de NO_2 .

L'addition de NO_3 , dans un milieu de culture ammoniac-nitrique en voie de croissance, provoque un arrêt momentané de celle-ci.

Les courbes de croissance normales (en S) ont été observées en milieu ammoniacal, nitreux et nitreux + NH_3 .

L'action perturbatrice, causée sur la croissance par la réduction des nitrates en nitrites, est donc un phénomène très complexe et probablement d'origine enzymatique. Seule une étude biochimique très approfondie permettrait peut-être d'expliquer les phénomènes observés.

D) INFLUENCE DU LACTATE.

a) *en milieu synthétique.*

L'addition de lactate (lactate de calcium) dans un milieu nitraté ou ammoniaco-nitrique,ensemencé depuis plusieurs jours, provoque une production intense de NO_2 dans les 12 heures qui suivent (souches G et H). Les mêmes résultats sont obtenus en ajoutant le lactate sur le filtrat des souches E, G et H (les cultures ont été faites en milieu ammoniacal, le nitrate et le lactate ayant été ajoutés dans le filtrat). Dans ces conditions, le lactate active la réaction $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$. L'enzyme responsable de cette réaction est un exoenzyme constitutif.

b) *En milieu organique.*

Le lactate, ajouté dès le début de la culture, favorise la production de NO_2 dans les milieux au bouillon et eau peptonée (souches G et H) et sur le milieu à l'asparagine (souche H). Dans ces conditions, nous avons constaté, par un dosage biologique des nitrates restant dans les milieux de culture et par l'examen des courbes de production de NO_2 , que l'accumulation de NO_2 produite par le lactate était due à un freinage de la réaction $\text{NO}_2 \rightarrow \text{NH}_2$.

Le lactate, ajouté dans le milieu dès le début de la culture, est sans action sur la production de NO_2 dans les milieux à l'asparagine, V. F. (souche G) et synthétiques ammoniaco-nitriques (souches G et H).

Le lactate ne semble jouer le rôle de donateur d'hydrogène pour les nitrates que dans le cas où il est ajouté à une culture âgée de quelques jours.

E) INFLUENCE DE L'AZOTE ORGANIQUE.

La production de NO_2 est très variable suivant les micro-organismes et les milieux employés. Il y a forte production de NO_2 dans les milieux au bouillon, eau peptonée, V.F. et asparagine ensemencés avec la souche H. On constate une faible production sur eau peptonée et bouillon (souche G). Production pratiquement nulle dans les milieux à l'asparagine et V.F. (souche G).

La souche E est peu sensible aux variations de composition

des milieux : il y a forte production de NO_2 dans tous les milieux utilisés.

F) ROLE DES AGENTS INHIBITEURS.

Certaines substances peuvent inhiber l'utilisation des nitrates. Nous avons constaté ce fait avec une de nos souches (souche A) qui ne peut se développer sur milieu synthétique nitraté en présence de dl-sérine, alors que la croissance est active en présence d'asparagine. L'action inhibitrice de la sérine sur l'utilisation de l'azote minéral par cette souche est d'autant plus manifeste que cet azote se trouve sous forme plus oxydée.

On peut en conclure que la réduction des nitrates en nitrites est un phénomène très complexe qui dépend de nombreux facteurs.

Tel germe ne produisant pas de NO_2 à partir de NO_3 dans un milieu de culture en présence d'une certaine matière organique, sera capable, au contraire, d'accumuler des nitrites en présence d'une autre matière organique. Ce métabolite indispensable peut s'accumuler ou non dans le milieu, suivant que le métabolisme du germe, variable avec les conditions de culture, sera ou non favorable à cette accumulation. C'est ainsi que le lactate ajouté au milieu synthétique ammoniac-nitrique dès le début de la culture, céderait son hydrogène à un accepteur présentant plus d'« affinité » pour le lactate que NO_3 ; cet accepteur se serait accumulé dans le milieu par suite du changement de métabolisme provoqué par l'addition de lactate. Si le lactate est ajouté dans un milieu de culture en voie de croissance, le métabolite inhibiteur n'est pas présent dans le milieu et le lactate céderait son hydrogène au nitrate.

Il est difficile, sinon impossible, d'affirmer qu'un germe est ou n'est pas capable de réduire les nitrates. Un germe ensemencé dans un milieu à base de bouillon de viande, nitraté, pourra utiliser l'azote aminé de préférence à l'azote nitrique. Il pourra également se produire une réduction quantitative des nitrates en nitrites; dans ce cas, on ne peut pas conclure, sur ce simple fait, que ce germe n'est pas capable d'utiliser les nitrites.

Pour résoudre ces problèmes, il est indispensable de cultiver le germe sur milieu synthétique dans lequel on connaît exactement la source azotée mise à la disposition de la bactérie que l'on désire

étudier. Malheureusement, un grand nombre de germes exigent un milieu complexe et le problème de la réduction des nitrates en nitrites reste insoluble dans la plupart des cas.

G) DOSAGE BIOLOGIQUE DES NITRATES.

Il nous a été possible, à partir de ces constatations, d'établir une méthode de dosage de NO_3 . En effet, ce dosage est basé sur le fait que la réduction de NO_3 en NO_2 est quantitative dans un milieu ammoniacal-nitriqueensemencé avec la souche E. Le dosage des nitrates dans le milieu de culture revient donc à un dosage de nitrites qui est beaucoup plus précis que celui des nitrates par une méthode chimique. On dose NO_2 par la méthode colorimétrique (réactif de Griess) à l'aide d'un photocolorimètre. Cette méthode permet de faire des dosages de nitrates dans les milieux les plus complexes contenant de l'azote nitreux, ammoniacal et aminé avec une sensibilité de l'ordre du 0,01 γ de NO_3 par cc. de milieu.

4. — POUVOIR AMMONIFICATEUR

Certaines souches (souches G et H) manifestent un pouvoir ammonificateur dans presque tous les milieux utilisés : bouillon, eau peptonée, asparagine, urée. Ce pouvoir ammonificateur est activé par addition de glucose dans le milieu de culture (expérience faite pour les milieux à l'asparagine et à l'urée).

L'étude de l'ammonification sur une terre enrichie en urée etensemencée en masse avec des germes oligonitrophiles, a donné des résultats différents suivant les souches utilisées.

Certaines souches (G et H) activent le phénomène de l'ammonification par rapport à la terre enrichie en urée mais nonensemencée. Par contre, d'autres souches (E et K) provoquent le phénomène inverse, c'est-à-dire une diminution du dégagement de NH_3 par rapport à la terre-témoin.

Quant au pouvoir ammonificateur, on constate que les germes oligonitrophiles ne forment pas un groupe homogène.

Ces résultats ne sont valables que dans les conditions d'expé-

rience. Une terre, en effet, sans changement de conditions de milieu, ne se trouve pas subitement envahie, dans les conditions naturelles, par une certaine catégorie de germes. L'ensemencement dans la terre, en petite quantité, de germes oligonitrophiles est pratiquement sans action sur le phénomène de l'ammonification. Ce qui fait pulluler un germe dans le sol, ce n'est pas sa présence en plus ou moins grande quantité, mais ce sont les conditions mêmes du milieu dans lesquelles il se trouve. A chaque condition de milieu, correspond, pour le sol, un certain équilibre biologique. Cet équilibre sera ou non en faveur de la prolifération du germe dont on veut étudier l'activité dans le sol.

5. — RAPPORTS ENTRE GERMES OLIGONITROPHILES ET AZOTOBACTER

Les germes oligonitrophiles provoquent des variations dans les différentes fonctions physiologiques des *Azotobacter*.

Des mesures comparatives de croissance faites sur des milieux ensemencés, d'une part avec l'*Azotobacter chroococcum* et des germes oligonitrophiles, et d'autre part avec l'*Azotobacter* seul, ont montré que les cultures mixtes favorisent la synthèse de substance microbienne, ce qui correspond à une augmentation de matière protéique. Il en résulte un enrichissement du milieu en azote non soluble.

Nous avons de même constaté, par des dosages d'azote et de sucre au début et en fin de culture, que certains germes oligonitrophiles favorisent la fixation de l'azote moléculaire par l'*Azotobacter c.*; d'autres germes provoquent le phénomène inverse. Cette augmentation ou cette diminution de fixation de l'azote, provoquée par les cultures mixtes, est elle-même sous la dépendance de l'aération (expérience faite en faisant barboter un courant d'air dans les milieux de culture).

Il semble qu'une substance produite par certains germes oligonitrophiles modifie le pouvoir fixateur de l'azote moléculaire par l'*Azotobacter c.* D'une manière générale, le rendement de fixation d'une terre n'est donc pas fonction uniquement des *Azotobacter*. Telle terre, pauvre ou riche en ces germes, possédera ou non un bon rendement de fixation, suivant que la résultante de tous

les phénomènes d'associations microbiennes au sein du sol sera ou non en faveur d'une amélioration du rendement de fixation des germes fixateurs d'azote atmosphérique.

Certaines souches (A, B, C et I), en culture avec l'*Azotobacter c.*, provoquent un dégagement de NH_3 entraînable par l'air.

L'action des germes oligonitrophiles sur les *Azotobacter* se manifeste également sur la production de substance noire à partir du benzoate. Trois souches (C, E et F) sont capables, ensemencées isolément, de produire le corps noir dans un milieu azoté. Cette fonction ne serait donc pas exclusive de *Azotobacter c.*

L'association oligonitrophiles + *Azotobacter c.* active la production de substance noire. Seules deux souches (K et L) se sont montrées sans effet. Certains germes oligonitrophiles interviendraient donc, soit seuls, soit en association avec les *Azotobacter*, dans la formation de l'humus.

L'étude de l'association oligonitrophiles + *Azotobacter* est un exemple de la complexité du milieu « sol » dans lequel des milliers de germes différents vivent côte à côte. L'emploi des milieux électifs classiques nous donne certainement de précieux renseignements sur l'activité d'un sol au point de vue de la fixation de l'azote moléculaire, de la nitrification, etc.; mais un germe isolé, ayant telle propriété *in vitro*, ne conserve pas obligatoirement cette propriété dans le sol. L'addition d'une certaine substance dans le sol suffira pour rompre l'équilibre biologique et déterminer la pullulation de germes qui activeront ou inhiberont les différentes fonctions des *Azotobacter*, des nitrificateurs ou d'autres germes jouant des rôles prépondérants dans la désintégration des matières végétales et animales enfouies dans le sol.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ALLISON (F. C.). — Can nodule Bacteria of leguminous plants fix atmospheric nitrogen in the absence of the host. *J. of Agr. Research*, 1930, **39**, 37.
2. BARKER (H. A.). — Studies on the methane fermentation. Biochemical activities of *Methanobacterium Omelianskii*. *J. Biol. Chem.*, 1941, **137**, 153.
3. BEIJERINCK (M. W.). — Ueber oligonitrophile Mikroben. *Zentralbl. Bakt.*, 1901, II, **7**, 561.
4. BEIJERINCK (M. W.) und MINKMAN (D.C.J.). — Bildung und Verbrauch von stickoxydul durch Bakterien. *Zentralbl. Bakt.*, 1910, II, **25**, 30.
5. BLINKOV (G. N.). — Sur la mise en liberté de l'ammoniaque par *Azotobacter*. (en russe). *Mikrobiologija*, S.S.S.R., (1947), **16**, n° 2, 113.
6. FEDOROV (M. V.). — Intensité de la fixation de l'azote atmosphérique par l'*Azotobacter* suivant les sources de carbone utilisées par ce microorganisme (en russe). *C. R. Ac. Sc. U.R.S.S.* (1945), **48**, n° 8, 603.
7. HOPKINS (E. W.). — Studies of nitrogen fixation by the root Bacteria of the Leguminosae. *Soil Sci.*, 1929, **16**, 433.
8. JONES (L. W.) and GREAVES (J. E.). — *Azotobacter chroococcum* and its relations hip to accessory growth factors. *Soil Sci.* (mai 1943), **55**, 393.
9. KAUFFMANN (J.), POCHON (J.) et TCHAN (Y.T.). — Recherches sur la microflore oligonitrophile du sol. Nutrition azotée minérale. *Ann. Inst. Pasteur*, (juillet 1948), **75**, 83.
10. KAUFFMANN (J.). — Recherches sur la réduction des nitrates en nitrites, en aérobiose, par quelques germes oligonitrophiles du sol. *Ann. Inst. Pasteur*, (juillet 1949), **77**, 93.
11. KAUFFMANN (J.). — Recherches sur la physiologie des *Azotobacter* en association avec certains germes oligonitrophiles du sol. *Ann. Inst. Pasteur*. (mai 1950), **78**, 670.
12. KAUFFMANN (J) et CHALVIGNAC (M. A.). — Recherches sur les méthodes de mesure du pouvoir ammonificateur d'une terre. *Ann. Inst. Pasteur* (août 1950), **79**, 228.
13. KOROCHKINA (O. I.). — (en russe). The oxidation-reduction regime of denitrification. *Microbiology*, 1936, **5**, 645.
14. LEMOIGNE (M.) et GAVARD (R.). — Réduction des nitrates par les microbes du groupe *Bacillus subtilis* en aérobiose et en anaérobiose. *C.R. Ac. Sc. Fr.* (10 févr. 1947), **224**, 419.

15. LIND (C. J.) and WILSON (P. W.). — Nitrogen fixation by *Azotobacter* in association with other bacteria. *Soil Sci.* (août 1942), **54**, 105.
16. LÖHNIS (M. P.). — Can *Bacterium radicolica* assimilate nitrogen in the absence of the host plant. *Soil Sci.*, 1930, **29**, 37.
17. MEIKLEJOHN (J.). — a) Aerobic denitrification. *Ann. appl. Biol. G. B.* (nov. 1940), **27**, 558.
b) Réduction des nitrates et anaérobiose. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 389.
18. MONOD (J.). — a) Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann et C^{ie}, 1942.
b) Sur la non additivité d'action de certains enzymes bactériens. *Ann. Inst. Pasteur*, 1944, **70**, 57.
c) Remarques sur le problème de la spécificité des enzymes bactériens. *Ann. Inst. Pasteur*, 1944, **70**, 60.
19. NICKELL (L. G.) and BURCKHOLDER (P. R.). — Inhibition of *Azotobacter* by soil Actinomycetes. *J. amer. Soc. Agr.* (sept. 1947), **39**, 771.
20. POCHON (J.) et TCHAN (Y. T.). — Recherches sur les phénomènes biologiques d'ammonification dans le sol. *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 696.
21. PRÉVOT (A. R.). — Recherches sur l'action de quelques bactéries anaérobies strictes sur les nitrates. *C.R. Soc. Biol.*, 1940, **134**, 350.
22. PRÉVOT (A. R.) et ENESCU (M.). — Etude de la réduction des nitrates en nitrites par *W. perfringens*. *C. R. Soc. Biol. Fr.*, (fév. 46.) **140**, 76.
23. QUASTEL (J. H.), STEPHENSON (M.) and WHETHAM (M. D.). — Some reactions of resting Bacteria in relation to anaerobic growth. *Biochem. J.*, 1925, **19**, 304.
24. SEIZER (A.) und WALZ (L.). — Stickstoffumsatz bei der denitrification. *Arch. Hyg.*, 1925, **95**, 189.
25. SKINNER (C. E.). — The fixation of nitrogen by *Bacterium aerogenes* and related species. *Soil Sci.*, 1928, **15**, 195.
26. STICKLAND (L. H.). — The reduction of nitrates by *Bact. coli*. *Biochem J.*, 1931, **25**, II, 1543.
27. TAYLOR (C.B.). — Phosphorus deficiency in relation to the nitrate reduction test. *Canad. J. Res. Sect. C.* (août 1948), **26**, 455.
28. WAKSMAN. — Principles of Soil Microbiology, 1927, Williams et Wilkins C^o.
29. WANG (T. L.). — Contribution à l'étude du rôle des *Azotobacter* dans la formation de l'humus du sol. *Thèse doc. Université, Paris*, 1949.

30. WANG (T. L.) et TCHAN (Y. T.). — Recherches sur la benzoatase de l'*Azotobacter*. Influence des facteurs physiques. *Ann. Inst. Pasteur*, (mai 1948), 74, 423.
31. WINOGRADSKY (S.). — a) Microbiologie du sol. Problèmes et méthodes, 1949, Masson et C^{ie}.
b) Analyse microbiologique du sol. Principes d'une nouvelle méthode. *Ann. Inst. Pasteur*, 1932, 48, 89.
-

ERRATUM

Lire page 25 dans le titre du Chapitre II :

ET RAPPORT $\frac{C}{N}$

au lieu de :

ET RAPPORT $\frac{C}{D}$

Nemours. Imprimerie André Lesot 30.10.51 Dépôt légal 51.4.231
