

Premières données sur l'écologie d'*Azolla africana* en zone sahélienne (Sénégal)

P. A. ROGER et P. A. REYNAUD (*)

RÉSUMÉ

Azolla ne se développe pas spontanément dans les rizières du Sénégal et on ne la rencontre que rarement dans les écosystèmes naturels.

Les hautes intensités lumineuses et les températures élevées ont une action inhibitrice sur la souche étudiée (*A. africana*). Toutefois, cette action est insuffisamment marquée pour justifier l'absence de développement spontané d'*Azolla* qui semble liée principalement à des problèmes de conservation dus à la dessiccation des sols pendant la saison sèche. La souche isolée a un potentiel fixateur d'azote comparable à celui des autres espèces et une forte productivité potentielle en conditions sahéliennes, de l'ordre de 300 à 600 kg d'azote fixé par hectare et par an.

SUMMARY

Azolla do not growth spontaneously in paddy fields in Senegal and was rarely observed in natural ecosystems. High light intensities and high temperatures had an inhibitory effect on the isolated strain (*A. africana*). However this effect was insufficiently marked to explain the lack of spontaneous growth, these was most probably related to a problem of conservation during the long dry period occurring in Senegal (8 month).

The isolated strain had a high N₂-fixing specific activity and a high potential productivity evaluated to 300 to 600 kg nitrogen fixed per hectare and per year.

INTRODUCTION

Azolla est une Hydrofilicale dulçaquicole de petite taille qui, en conditions naturelles, contient *Anabaena azollae*, Cyanobactérie fixatrice d'azote, comme symbionte.

Dans des conditions favorables, l'association peut se développer très rapidement et produire une biomasse importante dont la teneur en azote peut atteindre 5 % du poids sec (BROTONEGORO et ABDULKADIR, 1978) *Azolla* a un potentiel fixateur d'azote particulièrement élevé et les évaluations varient entre 100 et 600 kg d'azote fixé par hectare et par an (SAUBERT, 1949; BECKING, 1975; WATANABE *et al.*, 1977...).

Ces caractéristiques jointes à une bonne compétitivité font d'*Azolla* un matériel végétal idéal pour la fertilisation organique en rizière; *Azolla* est utilisé comme engrais vert en riziculture au Vietnam (MOORE, 1969) en Thaïlande (SAUBERT, 1949) et en Chine (ALAA EL DIN, 1977).

(*) O.R.S.T.O.M., B.P. n° 1386, Dakar, République du Sénégal.



L'intérêt agronomique d'*Azolla* est accru par le fait que l'activité fixatrice de l'association est diminuée mais non annulée par la présence d'azote minéral dans le milieu (PETERS et MAINE, 1974 a).

Au point de vue taxonomique six espèces (*A. filiculoides*, *A. caroliniana*, *A. mexicana*, *A. microphylla*, *A. pinnata* et *A. nilotica*) sont reconnues. D'après LUMPKIN (1977) les autres espèces doivent être considérées comme des variétés.

En particulier, *Azolla africana* qui figure à titre d'espèce dans l'énumération des plantes vasculaires du Sénégal (LEBRUN, 1973); serait une variété d'*A. pinnata*.

En Afrique, deux espèces (*A. pinnata* et *A. nilotica*) ont été signalées. Le quinzième parallèle, qui passe approximativement au niveau de Dakar, semble constituer une limite au nord de laquelle *Azolla pinnata* ne se développe plus (LUMPKIN, 1977) sur ce continent.

Au cours de 8 années de prospections dans les rizières du Sénégal (1970-1978), nous n'avons pu observer qu'une seule fois (1972) un développement d'*Azolla*, dans une parcelle expérimentale de l'Institut Sénégalais de la Recherche Agronomique (Station de Djibélor). Aucune précision n'a pu nous être fournie quant à l'origine de ce développement qui ne s'est plus reproduit les années suivantes.

Nous avons retrouvé *Azolla* en 1977 dans le petit cours d'eau permanent de Bantankoutouye (Casamance) sud du Sénégal, où elle se développe au sein d'une végétation aquatique dominée par les carex.

Cette souche, identifiée comme *A. africana*, constitue le matériel utilisé dans cette étude; nous avons cherché à déterminer les facteurs limitant le développement d'*Azolla* au Sénégal et à expliquer l'absence de son développement spontané dans une zone rizicole ou l'utilisation de la fixation biologique de l'azote présente un grand intérêt agronomique. D'autre part nous avons essayé de chiffrer la potentialité de productivité d'*Azolla* dans les conditions édaphiques des rizières du Sénégal.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CULTURE DE RÉFÉRENCE

La conservation et la production d'inoculum d'*Azolla africana* sont effectuées dans des bacs en plastique de 20 cm de côté contenant 6 l de milieu de culture sans azote (annexe 1) et 500 g de sol de rizière. Les bacs sont placés dans une serre où l'intensité lumineuse maximale reçue au cours de la journée est de 30 000 lx environ. Le milieu de culture est renouvelé tous les 15 jours.

CULTURE SOUS OMBRIÈRE

Le dispositif expérimental destiné à tester l'influence de la lumière sur *A. africana* est constitué par un bac de 150×75×8 cm placé en plein air sous un châssis métallique permettant de tendre des toiles moustiquaires. Le niveau du milieu de culture dans le bac est maintenu constant par apport d'eau du robinet au moyen d'un dispositif automatique. Le bac est divisé transversalement en cinq zones égales (25×70 cm) par des cloisons flottantes de polystyrène expansé qui permettent une libre circulation du milieu entre les différentes zones.

Le bac est rempli avec une quantité de milieu de culture sans azote suffisante pour obtenir une couche de 4 cm d'épaisseur. On ajoute ensuite 2 kg de sol de rizière uniformément réparti au fond du bac. L'influence de l'intensité lumineuse sur le développement d'*Azolla africana* a été testée en recouvrant les cinq zones du bac avec 0, 1, 2, 3 et 5 toiles moustiquaires qui laissent respectivement passer : 100, 60, 36, 22 et 7 % de l'intensité lumineuse incidente. L'intensité lumineuse incidente maximale au cours de la journée est de 90 000 lx vers 13-14 h. L'inoculum est de 40 g de poids frais par zone. Après 8 et 15 jours de développement on détermine le poids frais d'*Azolla* produit dans chaque zone.

EXTRACTION ET DOSAGE DES PIGMENTS LIPOSOLUBLES

Nous avons comparé la composition pigmentaire des *Azolla* cultivées sous 0, 2 et 5 toiles moustiquaires. Les pigments sont extraits à l'acétone après broyage des plantes au mortier en présence d'un peu de sable siliceux lavé. Après centrifugation, le spectre d'adsorption de l'extrait est déterminé au moyen d'un spectrophotomètre « Beckman model 25 ». Les concentrations en pigments liposolubles sont calculées en utilisant les équations de RICHARDS (1952).

MESURE DE L'ACTIVITÉ RÉDUCTRICE D'ACÉTYLÈNE (A.R.A.)

Les mesures sont effectuées dans des flacons à sérum de 125 ml, contenant 1 g de matériel végétal frais et 20 ml de milieu de culture sans azote, sous un atmosphère air-acétylène, 9/1; v/v. Durant l'incubation en présence d'acétylène, les flacons sont immergés dans un bain d'eau thermostaté et exposés à différentes intensités lumineuses obtenues au moyen de toiles moustiquaires disposées au-dessus du flacon.

L'influence de la température sur l'A.R.A. a été testée sur des échantillons placés en pleine lumière dans des bains à 25, 30, 35, 37,5 et 40°C. Afin d'éliminer les variations liées aux changements d'intensité lumineuse au cours de la journée, les résultats ont été exprimés en pour cent de l'activité mesurée à 25°C dans les mêmes conditions d'éclairage.

L'influence de l'intensité lumineuse a été testée en mesurant les variations journalières de l'A.R.A. sur des échantillons placés sous 0, 1 et 3 toiles moustiquaires à la température d'incubation de 27°C. Parallèlement nous avons mesuré, à la même température, l'A.R.A. d'un échantillon placé sous une intensité lumineuse constante de 1 700 lux produite par des tubes au néon type lumière du jour.

Pour ces deux expériences l'inoculum est constitué par une culture d'*Azolla* se développant en serre (culture de référence) et prélevée à 8 h du matin. Chaque résultat est la moyenne de 3 mesures.

ÉTUDE DE LA FLORE ALGALE ASSOCIÉE

Quatre plans d'*Azolla* (0,48 g poids humide) provenant du prélèvement *in situ* sont soigneusement rincés à l'eau déminéralisée stérile afin de ne conserver que les Algues adhérentes à la plante. Le matériel végétal est ensuite broyé (broyeur de Potter) jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène dans 5 ml d'eau distillée. Cette suspension est considérée comme étant la dilution 10⁻¹. Les dilutions successives sont étalées sur milieux gélosés de Gorham avec et sans azote (ALLEN et STANIER, 1968).

Les dénombrements des différentes espèces sont faits sous microscope stéréoscopique (Wild, M 5) après 21 jours d'incubation en étuve lumineuse (30°C-1 200 lx).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

DÉVELOPPEMENT D'*Azolla* EN FONCTION DE L'INTENSITÉ LUMINEUSE

1 semaine après l'inoculation, les résultats (tableau I) montrent une action inhibitrice des hautes intensités lumineuses qui se traduit à la fois sur le rendement pondéral de la culture et sur l'aspect des plantes qui présentent une coloration rouge et un système racinaire peu développé.

Une inhibition par les hautes intensités lumineuses (< 60 000 lx) a également été signalée par ASHTON et WALMSLEY (1976). La coloration rouge orangé des frondes est due à la présence d'une anthocyanine identifiée comme étant la lutéolinidine-5-glucoside chez *A. mexicana* (HOLST, 1977); cet auteur indique qu'une telle coloration se manifeste plus particulièrement chez les plantes exposées directement à la lumière solaire en eau chaude (22-25°C).

Les plantes cultivées sous faible intensité lumineuse ($I_{\max} = 6\ 300$ lx) ont un aspect satisfaisant, mais une productivité faible.

TABLEAU I

Productivité et caractéristiques morphologiques et pigmentaires d'Azolla cultivée sous différentes densités d'ombrage

	0	1	2	3	5
Nombre de moustiquaires..	0	1	2	3	5
Pourcentage de l'intensité lumineuse incidente transmise	100	60	36	22	7
Intensité lumineuse maximale revue au cours de la journée (lx)	90 000	54 000	32 400	19 800	6 300
Poids frais en gramme obtenu en 8 jours à partir d'une inoculum de 40 g.....	115	126	125	148	91
Coloration des frondes....	Vert bordé de rouge	Vert bordé de rouge	Vert bordé de jaune	Vert clair	Vert vif
Développement des racines.	Très faible	Moyen	Moyen	Important	Important
Chlorophylle A du poids sec (‰)	2,71	-	3,65	-	6,57
Poids frais en gramme obtenu en 15 jours à partir d'un inoculum de 40 g.....	264	250	189	215	132
Coloration des frondes....	Rose	Rose	Vert clair	Vert clair	Vert vif
Développement des racines.	Moyen	Moyen	Important	Important	Important
Chlorophylle A du poids sec (‰)	5,83	-	7,1	-	7,8

TABLEAU II

Influence de l'intensité lumineuse sur la composition pigmentaire d'A. africana après 7 et 14 jours de culture. Les teneurs en pigments ont exprimées en pour mille du poids sec.

		0	3	5
Nombre de toiles de moustiquaires		0	3	5
Intensité lumineuse incidente transmise (%).....		100	36	7
Intensité lumineuse maximale reçue au cours de la journée (lx)		90 000	32 400	6 300
7 jours après inoculation	Chlorophylle A	2,71	3,65	6,57
	Chlorophylle B	0,31	0,38	1,07
	ΣChlorophylles	3,02	4,03	7,64
	Caroténoïdes	1,14	1,35	1,87
	Chlorophylles/Caroténoïdes ...	2,65	2,98	4,08
14 jours après inoculation	Chlorophylle A	5,83	7,1	7,8
	Chlorophylle B	0,15	0,75	1,45
	ΣChlorophylles	5,98	7,85	9,25
	Caroténoïdes	1,95	2,3	2,56
	Chlorophylles/Caroténoïdes ...	3,06	3,41	3,61

L'analyse pigmentaire (tableau II) est en accord avec ces résultats et l'on constate que la teneur en chlorophylle, et le rapport chlorophylles/caroténoïdes diminuent quand augmente l'intensité lumineuse à laquelle est soumise la culture.

Après 15 jours de culture les symptômes de carence s'atténuent dans les cultures de haute lumière et l'on constate une corrélation positive entre la productivité et la quantité de lumière reçue; d'autre part la teneur en chlorophylles augmente dans les plantes exposées directement à la lumière solaire et le rapport chlorophylles/caroténoïdes a tendance à s'uniformiser dans les trois lots.

Les teneurs en chlorophylle sont comparables à celle trouvée par JOHNSON *et al.* (1966) sur *Azolla filiculoides* cultivée sur milieu sans azote (chl *a* = 0,27 % du poids frais, soit pour un poids sec égal à 5 % du poids frais, 5,4 % du poids sec).

ACTIVITÉ RÉDUCTRICE D'ACÉTYLÈNE

Influence de la température

Les températures supérieures à 35°C ont un effet inhibiteur qui suit une augmentation transitoire de l'activité en début d'incubation (tableau III).

TABLEAU III

Activité nitrogénasique (A.R.A.) d'*Azolla africana* en fonction du temps d'exposition à différentes températures. Les résultats sont exprimés en pour cent d'un témoin placé à 25°C

Température (°C) Temps d'incubation	30	35	37,5	40
30 min	100	100	112	227
1 h 30 min	100	98	86	115
2 h 30 min	88	100	86	51
5 h	103	103	44	20
6 h	95	86	34	10
7 h	85	-	23	8

Influence de l'intensité lumineuse (fig. 1)

L'activité réductrice d'acétylène maximale est obtenue sous une moustiquaire ($E_{\max} = 60\ 000$ lx). Cette observation jointe au fait que le maximum de l'intensité lumineuse est postérieur au maximum journalier de l'A.R.A. indique une influence inhibitrice des hautes intensités lumineuses.

Une intensité maximale journalière de 17 000 lx est insuffisante pour développer la totalité de la potentialité fixatrice de la symbiose. Sous une intensité lumineuse constante de 1 700 lx on constate une diminution rapide de l'A.R.A.

EXTRAPOLATION DES RÉSULTATS OBTENUS

Productivité

L'extrapolation du taux de productivité maximum trouvé sous ombrière à savoir 224 g de matériel végétal frais en 15 jours sur une surface utile de 1 750 cm² indique une potentialité de production de 311 tonnes par hectare et par an.

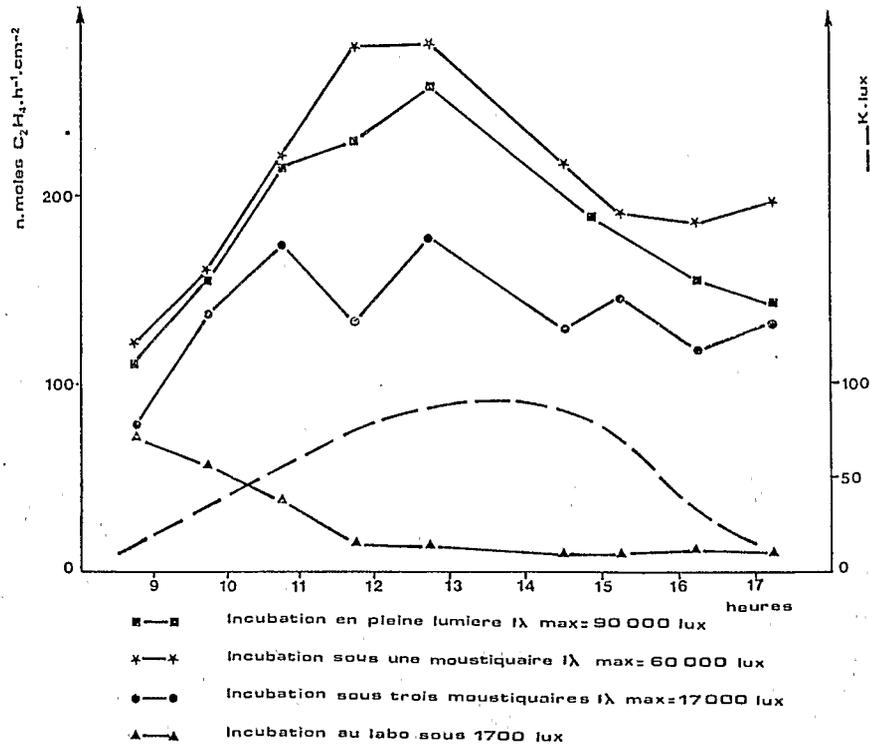


FIG. 1. — Variations journalières de l'activité réductrice d'acétylène d'*A. africana* en fonction de l'intensité lumineuse. Les cultures sont thermostatées à 27°C

Pour un poids sec égal à 5 % du poids frais (moyenne de cinq mesures) et une teneur en azote de 3,5 % la quantité d'azote correspondante est de 544 kg. ha⁻¹. an⁻¹.

Potentiel fixateur

Les conditions expérimentales de la mesure de l'A.R.A. correspondent à une biomasse de 6 t par hectare. En supposant une fixation nocturne nulle et un rapport éthylène azote égal à 3, l'extrapolation de la courbe journalière d'A.R.A. optimale, observée sous une moustiquaire conduit à une fixation d'azote d'environ 1,8 kg d'azote par hectare et par jour soit 675 kg N. ha⁻¹. an⁻¹.

Cette valeur de l'ordre de grandeur de celles observées chez les légumineuses les plus efficaces (600 à 800 kg N₂. ha⁻¹. an⁻¹; STEWART, 1977) diffère peu du résultat obtenu par extrapolation de la productivité. L'activité spécifique (≈ 1 100 nanomoles d'acétylène par minute et par gramme sec) est en accord avec les valeurs relevées dans la littérature (tableau IV).

FLORE ALGALE ASSOCIÉE

On constate (tableau V) une nette dominance des Chlorophycées et plus particulièrement de *Scenedesmus* sp. Les Cyanophycées sont représentées par cinq genres dont deux seulement sont des formes fixatrices d'azote, correspondent à moins de 1 % de la flore totale.

TABLEAU IV
Valeurs maximales de l'A.R.A. spécifique chez différentes espèces d'*Azolla*

Espèces	Auteurs	A.R.A. rapportée par les auteurs	Facteur de conversion	Uniformisation des données A.R.A. (nmoles. gps ⁻¹ . min ⁻¹)
<i>Filiculoides</i> ..	ASHTON, 1976-1974	1,4—3,7 nmoles.gpf ⁻¹ .h ⁻¹	P. s. = 5 % p. f.	300—800
<i>Pinnata</i>	BECKING, 1975	6,9—10,6 nmoles.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹	Prot. = 20 % p. s.	1500—2700
<i>Sp</i>	NEWTON, 1975	500 nmoles.gpf ⁻¹ .h ⁻¹	P. s. = 5 % p. f.	167
<i>Caroliniana</i> ..	PETERS et MAYNE, 1974 b	60 nmoles.mg chl ⁻¹ .min ⁻¹	Chl = 1 à 2 % p. s. (indiqué par les auteurs)	600 à 1220
<i>Africana</i>	ROGER et REYNAUD, 1978	—	—	1100
<i>Mexicana</i>	TALLEY et TALLEY, 1977	—	—	> 1000
<i>Filiculoides</i> ..	TALLEY et TALLEY, 1977	—	—	773
<i>Pinnata</i>	WATANABE et al., 1977	1 000 nmoles.gpf ⁻¹ .h ⁻¹	P. s. = 5 % p. f.	333

TABLEAU V
Composition de la flore algale associée à *Azolla africana*
(Les valeurs correspondent à un nombre de cellules, de colonies ou de filaments pour quatre frondes)

Diatomées	3,7.10 ⁴
Chlorophycées filamenteuses	7 .10 ²
Chlorophycées unicellulaires	2,1.10 ⁵
(dont <i>Scenedesmus</i> sp.)	1,9.10 ⁵
<i>Pseudanabaena</i> sp.	2,3.10 ⁴
<i>Microcystis</i> sp.	1,7.10 ⁴
<i>Gloeocapsa</i> sp.	8,3.10 ³
<i>Anabaena</i> sp.	3,0.10 ³
<i>Tolypothrix</i> sp.	8,3.10 ²

Il est impossible de préciser si la souche d'*Anabaena* isolée correspond au symbionte dont la difficulté d'isolement a été signalée par plusieurs auteurs; HILL (1975) considère comme douteux tout isolement obtenu autrement que par micromanipulation, d'autant plus que la recombinaison *Azolla-Anabaena* n'a pas encore pu être réalisée (ASTON et WALMSLEY, 1976).

CONCLUSION

Les résultats des mesures d'A.R.A. et de la composition pigmentaire confirment un effet inhibiteur des hautes intensités lumineuses sur *Azolla*. Toutefois l'influence inhibitrice très marquée que l'on observe après la première semaine de culture semble résulter en grande partie de la variation brutale de l'intensité lumineuse à laquelle sont exposées les plantes lorsque l'inoculum cultivé en serre ($I_{\max}=30\ 000\ \text{lx}$) est exposé directement à la lumière solaire ($I_{\max}=90\ 000\ \text{lx}$).

L'effet inhibiteur des hautes intensités lumineuses est cependant insuffisamment marqué pour pouvoir justifier l'absence de développement spontané d'*A. africana* dans les rizières du Sénégal. Les températures supérieures à 35°C ont un effet inhibiteur net, toutefois de telles températures sont rarement atteintes dans l'eau de la rizière.

De plus les sols de rizière du Sénégal ont un pH bas, voisin de 5,5 après 1 semaine de submersion (GARCIA *et al.*, 1973) qui est favorable à la croissance d'*Azolla*.

Il semble donc que la rareté d'*A. africana* dans ces rizières soit plus liée à un problème de conservation et de dissémination qu'à des conditions limitant son développement : la durée de la saison sèche (8 mois) et l'absence de points d'eau permanents sont incompatibles avec la conservation d'une plante qui ne supporte absolument pas la dessiccation.

La souche étudiée a un potentiel fixateur comparable à celui des autres espèces. Sa forte productivité potentielle en conditions sahélicennes ($550\ \text{kg N}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) confirme l'intérêt agronomique de la symbiose *Azolla-Anabaena* en riziculture en général et indique qu'une inoculation des rizières du Sénégal a *a priori* de fortes chances de réussite.

ANNEXE 1

Milieu de culture pour *A. pinnata*

Solutions concentrées	
1 : KCl	29,6 g.l ⁻¹
2 : CaCl ₂	88,2 g.l ⁻¹
3 : KH ₂ PO ₄	27,2 g.l ⁻¹
4 : MgSO ₄	98,4 g.l ⁻¹
5 : — citrate de fer III	1,2 g
— acide citrique	1,2 g
— eau q. s. p.	1 l
6 : H ₃ BO ₃	2,84 g
— ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,202 g
— Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0,387 g
— CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,075 g
— CoCl ₂ , 6 H ₂ O	1,19 g
— MnSO ₄ , H ₂ O	0,845 g
— eau q. s. p.	1 l
7 : Ca (NO ₃) ₂	147,6 g.l ⁻¹

Le milieu pour la croissance en l'absence d'azote minéral est obtenu en versant 5 ml des solutions 1 à 5 et 1 ml de la solution 6 dans 800 ml d'eau distillée. Le volume total est ensuite ajusté à 1 l. Le milieu pour croissance sur azote minéral est obtenu en remplaçant la solution 2 par solution 7. Le pH du milieu est de 5,4.

Les concentrations des différents éléments ont été calculées pour permettre une croissance sans renouvellement du milieu pendant une période d'environ 2 semaines.

BIBLIOGRAPHIE

- ALAA EL DIN, 1977. — In *The fifth International Conference on the Global Impacts of Applied Microbiology*. Abstracts, 32-33.
- ALLEN M. M. et STANIER R. Y., 1968. — Selective isolation of blue-green algae from water and soil. *J. Gen. Microbiol.*, 51, 203-209.
- ASHTON P. J., 1974. — In *The Orange River, Progress Report*, E.M.V. Zinderen-Bakkar, Bloemfontein, 123-138.
- ASHTON P. J. et WALMSLEY R. D., 1976. — The aquatic fern *Azolla* and its *Anabaena* symbiont. *Endeavour*, 35, (124), 39-43.
- BECKING J. H., 1975. — Nitrogen fixation in some natural ecosystems in Indonesia, in *Symbiotic nitrogen fixation in plants*, NUTMAN P. S., éd., I.B.P., 7, 539-552.
- BROTONEGORO S. et ABDULKADIR S., 1976. — Growth and nitrogen-fixing activity of *Azolla pinnata*. *Annales Bogorienses*, 6, (2), 68-77.
- GARCIA J.-L., RAIMBAULT M., JACQ V., RINAUDO G. et ROGER P., 1973. — Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal, relations avec les caractères physicochimiques et influence de la rhizosphère. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 11, n° 2, 169-185.
- HILL D. J., 1975. — The pattern of development of *Anabaena* in the *Azolla*-*Anabaena* symbiosis. *Planta (Berl.)*, 122, 179-184.
- HOLST R. W., 1977. — Anthocyanins of *Azolla*. *Am. Fern. J.*, 67, (4), 99-100.
- JOHNSON G. V., MAYEUX P. A. et EVANS H. J., 1966. — A cobalt requirement for symbiotic growth of *Azolla filiculoides* in the absence of combined nitrogen. *Plant. Physiol.*, 41, 852-855.
- LEBRUN J. P., 1973. — Énumération des plantes vasculaires du Sénégal. I.E.M.V.T. (Maisons-Alfort, France) étude botanique n° 2, 209 p., multigraphié.
- LUMPKIN T. A., 1977. — *Azolla*: morphology of the symbiosis. *I.R.R.I. Saturday seminar*, September, 3, 1977.
- MOORE A. W., 1969. — *Azolla*: Biology and agronomic significance. *Bot. Rev.*, 35, 17-34.
- NEWTON J. W. et CAVINS J. F., 1976. — Altered nitrogenous pools induced by the *Azolla*-*Anabaena* *Azolla* symbiosis. *Plant physiol.*, 58, 798-799.
- PETERS G. A. et MAYNE B. C., 1974 a. — The *Azolla*, *Anabaena azollae* relationship. I. Initial characterisation of the association. *Plant physiol.* 53, 813-819.
- PETERS G. A. et MAYNE B. C., 1974 b. — The *Azolla*, *Anabaena azollae* relationship. II. Localisation of nitrogenase activity as arranged by acetylene reduction. *Plant physiol.*, 53, 820-824.
- RICHARDS F. A. et THOMPSON T. G., 1952. — The estimation and characterisation of plankton populations by pigment analyses; part II. *Jour. Marine Res.*, 11, (2), 156-172.
- SAUBERT G. G. P., 1949. — Provisional communication on the fixation of elementary nitrogen by a floating fern. *Ann. of Roy. Bot. Garden Buitenzorg.*, 51, 177.
- STEWART W. D. P., 1977. — Present day nitrogen-fixing plants. *Ambio.*, 6, (2-3), 166-173.
- TALLEY S. N. et TALLEY B. J., 1977. — Nitrogen fixation by *Azolla* in rice fields. In *Genetic engineering for N₂ fixation*, Hollaender, 259-281.
- WATANABE I., ESPINAS C. R., BERJA N. S. et ALIMAGNO B. V., 1977. — Utilization of the *Azolla*-*Anabaena* complex as a nitrogen fertilizer for rice. *I.R.R.I. research paper series*, n° 11, novembre 1977, 15 p.