

N° d'ordre
58

50376
1962
7-1

50.376
1962
7-1

THESES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

(Mention Sciences)

par

J. P. VOETS

Première Thèse :

**Contribution à la Systématique des
Azotobacter
Différenciation Physiologique**



Deuxième Thèse

Propositions données par la Faculté

soutenues le 23 novembre 1962, devant la Commission d'examen

Président : **M. HOCOQUETTE**

Examineurs : **M. MONTREUIL**

M. BOURIQUET

ERRATA

=====

- page 2 : 7° ligne lisez Azotobacteriaceae au lieu de Azobacteriaceae.
- page 6 : 19° ligne lisez disposent au lieu de diposent.
- page 21 : 1° ligne lisez ensemencées au lieu de ensenmencées
- page 32 : dernière ligne lisez Azotobacter chroococcum Beijerinck au lieu de Azotobacter Beijerinck
- page 39 : 29° ligne lisez additionnés au lieu de additionnées
- page 47 : 3° ligne lisez nous nous sommes au lieu de nous sommes
- page 61 : 9° ligne lisez quantites au lieu de quantitis.
- page 84 : 13° ligne lisez remarquons au lieu de remaquons
- page 86 : 32° ligne lisez peuvent au lieu de peuevent
- page 88 : 6° ligne lisez différenciation au lieu de différenciation
- page 88 : 22° ligne lisez aperçu au lieu de apperçu
- page 92 : 1° ligne lisez Azotobacter au lieu de Azotobacters
- page 99 : 31° ligne lisez même au lieu de mme
- page 100: 1° ligne lisez 3,4-dihydroxy-benzoate au lieu de 3,4-dihydroxy-be,zoate.
- page 101: 34° ligne lisez le salicylate au lieu de la salicylate
- page 102: 28° ligne lisez quantité au lieu de quantité
- page 113: 16° ligne lisez 3,5-dihydroxy-benzoate au lieu de 3,4-dihydroxy-benzoate.
- page 164: 17° ligne lisez nutrition au lieu de nutritiion
- page 167: 7° ligne lisez L'étude au lieu de L'etide
- page 168: 6° ligne lisez aromatiques au lieu de organiques

=====

C O N T R I B U T I O N A L A S Y S T E M A T I Q U E

=====

D E S

=====

A Z O T O B A C T E R

=====

D I F F E R E N C I A T I O N P H Y S I O L O G I Q U E

=====

par

J. P. VOETS

A V A N T - P R O P O S

=====

En soumettant cette thèse à l'approbation de la Faculté des Science de l'Université de Lille, je tiens à remercier tout d'abord le Professeur M. HOCQUETTE d'avoir accepté d'être mon promoteur. C'est grâce à ses conseils, à ses critiques constructives et à ses connaissances larges de la biologie générale, que nous avons pu réaliser ce travail.

Je remercie également le Professeur A. VERBELEN, de l'Institut Agronomique Supérieur de Gand. C'est lui qui m'a inspiré le goût pour la Microbiologie. Les années que j'ai su travailler sous sa direction m'ont permis, grâce à sa discipline scientifique et sa force stimulatrice, d'acquérir une connaissance profonde de la Microbiologie agricole.

Cher Dr. J. POCHON, de l'Institut Pasteur de Paris, en vous je salue un grand Maître de la Microbiologie du Sol. Les relations amicales que nous entretenons depuis de nombreuses années me sont très chères. Vous m'avez indiqué le chemin à suivre. Comme tous vos collaborateurs, anciens et présents, je vous dois beaucoup. C'est grâce à vos recherches que nous disposons actuellement de méthodes d'analyses microbiologiques du sol. J'espère pouvoir collaborer encore longtemps avec vous et votre service.

Sincères remerciements également au Dr. Yao-Tseng TCHAN, Professeur de Microbiologie à l'Université de Sidney (Australie). Votre collaboration m'a été très précieuse.

Je tiens aussi à remercier le Professeur P.W. WILSON de l'Université de Wisconsin (U.S.A.). Ses études physiologiques des germes m'ont inspiré à la recherche physiologique des Azotobacter.

=====

INTRODUCTION

LA TAXONOMIE DES AZOTOBACTERIACEAE

La première communication concernant la fixation de l'azote par des germes libres, parut en 1895 sous la plume de Winogradsky (1). Le Clostridium pasteurianum Winogradskyi restera toujours le type des microbes anaérobies, fixateurs d'azote.

Quelques années plus tard, Beijerinck (2, 3) démontra que certains germes aérobies possédaient également un pouvoir fixateur d'azote. Il nommait la souche isolée par lui, d'une terre arable, Azotobacter chroococcum. Ce germe mobile est facilement isolé à partir de toute terre à réaction légèrement acide ou neutre. Peu après Beijerinck (4) annonçait la découverte dans les eaux des canaux de Delft d'un autre germe, fixateur d'azote, l'Azotobacter agilis.

Depuis ces recherches fondamentales, le problème de la fixation de l'azote par ces microbes libres fut étudié par différentes écoles scientifiques. Le fait que des germes aérobies et anaérobies, libres de toute symbiose, peuvent accomplir leur métabolisme hétérotrophique (organotrophique) avec de l'azote atmosphérique comme seule source d'azote, conduisait les chercheurs de considérer seulement les Clostridium et les Azotobacteriaceae comme groupes représentatifs. Les fixateurs anaérobies, appartiennent au genre Clostridium (famille des Bacillaceae), tandis que les aérobies appartiennent aux Azotobacteriaceae, avec un seul genre "Azotobacter".

Un nombre considérable de recherches a été effectué pendant les trois dernières décades sur le problème des Azotobacter (Kyle et Eisenstark (5) en citent 691). Tous les problèmes : leur morphologie, leur taxonomie, leur physiologie, leur présence dans la nature, leur importance dans le cycle biologique de l'azote, leur rôle dans la formation de l'humus et leur importance dans la fertilité du sol ont été l'objet d'un nombre très élevé de publications scientifiques. Nous ne relaterons pas ici toutes ces recherches. Signalons seulement

les bibliographies de Stapp et Ruschman (6) et de Waksman (7) qui résumant tous ces travaux. Plus récentes sont les publications de Kyle et Eisenstark (5) et de Jensen (8).

Le mécanisme de la fixation de l'azote fut amplement discuté dans les articles de Wilson (9) et Wilson et Burris (10).

Dans la classification de Bergey en 1948 (11), révisé par Hofer, les Azobacteriaceae sont décrites comme suit :

- " Cellules sans endospores. Les larges bâtonnets et "
- " même les cocci, présentent une apparence avec les "
- " levures. La mobilité se fait par des cils péritri- "
- " ches. Ils sont gram-négatifs. "
- " La croissance se manifeste par la formation d'un "
- " voile à la surface du milieu de culture liquide. "
- " Strictement aérobies. Ces germes fixent l'azote "
- " atmosphérique sur des milieux pourvus d'un hydrate "
- " de carbone, comme source énergétique. La croissance "
- " se fait le mieux sur milieux déficients en azote. "
- " Ces bactéries sont présentes dans l'eau et le sol. "

Un seul genre est reconnu : Azotobacter. En appendice est mentionné le genre Azotomonas Stapp.

Caractères du Genre AZOTOBACTER

Grandes cellules, en forme de bâtonnets, ovales ou rondes qui manifestent un pléomorphisme fortement prononcé, surtout dans des milieux où l'azote est présent sous forme combiné. Ils produisent des cellules à membranes épaisses qui résistent à la dessiccation. Croissance rapide avec oxydation du substrat en acide carbonique et eau, sans formation d'acides.

D'après la classification de Bergey (11) il n'existe que trois espèces : Azotobacter chroococcum

Azotobacter agilis

Azotobacter indicum

Récemment, Derx (12) et Tchan (13) ont proposé un genre nouveau, celui des Beijerinckia. Ce genre comprend deux espèces : Beijerinckia indica et Beijerinckia lacticogenes.

Cette nouvelle proposition trouve son origine dans l'isolement par Starkey et De (14) à partir d'une terre indienne de l'Azotobacter indicum. Il se différencie non seulement morphologiquement mais aussi en culture et physiologiquement des Azotobacter connus jusqu'ici.

Les Beijerinckia sont des bâtonnets irréguliers qui se gonflent aux extrémités. Ils se caractérisent par des granules lipopéptiques et sphériques. Ils ne forment pas d'endospores. Ils sont mobiles grâce à des cils péritriches. Ils se développent en milieu aérobie et en absence d'azote combiné. Le pH minimum pour leur développement est de 3,5; le pH maximum de 9,0. Ils ne produisent pas de kystes. Pendant leur croissance sur des hydrates de carbone, des acides organiques sont formés. Certaines souches donnent un voile épais, élastique et visqueux. La fixation d'azote se fait en absence d'azote combiné; le rendement atteint 20 mg d'azote par gramme de saccharose (15). D'après Green et Wilson (16) l'ammoniaque et les nitrates ne sont pas utilisés par ces germes. Les nitrates sont transformés en nitrites. Derx (17) a isolé deux Beijerinckia : B. indica var. alba qui ne produit pas de pigment brun et B. mobile qui est très mobile et produit un pigment ambre jaune. Le même chercheur précise qu'il existe une grande ressemblance entre Beijerinckia indica et Rhizobium Frank. Ce dernier produit comme le Beijerinckia indica des acides organiques par fermentation des hydrates de carbone, une formation de voile visqueux et des formes bactéroïdes. La différence physiologique entre ces deux germes réside dans la mobilité et la fixation de l'azote "in vitro" par B. indica. Les formes bactéroïdes de Rhizobium ne manifestent pas de mobilité et ne peuvent pas fixer l'azote en état libre. Malgré tout Derx est persuadé qu'il existe une relation étroite entre le Rhizobium et le B. indica. Il pense que les Rhizobium ont subi

certaines modifications par suite de leur vie symbiotique avec les légumineuses. Il conclut comme suit : "As well as parasitism, symbiosis may be the cause of the loss of several qualities originally present".

Kauffmann et Toussaint (18) décrivaient un autre organisme, fixateur d'azote, Beijerinckia lacticogenes. L'examen de cette espèce par Jensen (19) révéla qu'elle correspond assez bien au Beijerinckia indica. Elle en diffère par l'absence de mobilité et une croissance moins forte sur gélose-dextrose et gélose-saccharose. Jensen a également prouvé que Beijerinckia indica et B. lacticogenes se développent en absence de calcium.

Les différences spécifiques avec les Azotobacter qui ont incité Deryx et Tchan à faire pour B. indica et B. lacticogenes un genre séparé sont :

- 1° petites cellules, dont les dimensions sont comparables avec la plupart des Eubacteriales, mais sans formation de kystes.
- 2° tolérance aux milieux acides très marquée.
- 3° production d'acides par fermentation des hydrates de carbone.

Les caractères des Beijerinckia sont résumés par Deryx et Tchan comme suit :

- a. Mobile; forte croissance sur gélose : Beijerinckia indica
- b. Immobile; aspect visqueux sur gélose : Beijerinckia lacticogenens.

Remarquons tout de suite que les Beijerinckia n'ont été isolés que de sols tropicaux par Starkey et De aux Indes et en Birmanie, par Deryx à Java, par Tchan en Australie du Nord et en Amérique du Sud, par Kauffmann et Toussaint en Afrique.

Dans l'addendum des Azotobacteriaceae (11) nous trouvons également mentionné le genre Azotomonas. Ce nom fut avancé par Orla-Jensen (20).

Stapp (21) isolait de capsules de coton un germe fixateur d'azote qu'il nomma Azotomonas insolita. Il ressort de la description donnée par Orla-Jensen que ce germe diffère largement des Azotobacter et des Beijerinckia. Malheureusement, il paraît être assez rare, puisqu'il n'a plus été isolé depuis 1940.

Hamilton, Magee et Mortenson (22) ont démontré que l'Aerobacter aerogenes pouvait

également fixer l'azote atmosphérique. Bacillus asterosporus de Bredeman (23) et le "bacille gommeux" de Winogradsky (24) sont également pourvus d'un pouvoir fixateur d'azote. Kleczkowska (25) indique que le Bacillus krzemieniewski peut également fixer de l'azote. Plus récemment Anderson (26) annonçait l'isolement d'un Pseudomonas pigmenté, fixateur d'azote. Voets et Debacker (27) ont isolé d'une terre de serre et de terres arables le Pseudomonas azotogensis, se développant en milieu libre d'azote combiné. Ce dernier germe, qui diffère non seulement par sa morphologie, mais également par sa composition en hydrates de carbone des Azotobacter (28), est incolore et ne produit aucun pigment. Ces résultats ont été confirmés par Wilson et Proctor (29) et Paul (30).

Il semble donc qu'il existe dans la nature plusieurs espèces microbiennes qui sont capables de se développer dans des milieux libres de toute source d'azote combiné. Des recherches futures éclairciront nos connaissances dans ce domaine. Jusqu'ici nous pouvons considérer avec certitude les Azotobacter comme le genre le plus représentatif des Azotobacteriaceae. Les Beijerinckia devront probablement être d'ici quelques années considérés comme genre séparé.

1. Caractères de l'Azotobacter chroococcum Beijerinck

Les cellules sont ovales. Les dimensions varient d'après les chercheurs. Pour Yamagata et Itano (31) les dimensions sont 2,3 x 3,4 μ ; Tchan (32) donne les chiffres suivants : 1,5 x 2,3 μ et Jensen et Petersen (33) ont trouvé 2,4 x 5,0 μ .

Les cellules des Azotobacter chroococcum semblent moins arrondies que celles des Azotobacter Beijerinckii. Les cellules âgées sont plus petites que les jeunes. Elles se transforment en coccoides ou en micrococcus enrobés de mucilage. Finalement une membrane épaisse l'entoure et un kyste se constitue.

Les Azotobacter chroococcum sont très mobiles sur des milieux gélosés et à condition que les cultures soient jeunes et n'aient pas plus de 30 heures de séjour à l'étuve. D'après Hofer (34) ils possèdent plusieurs cils péritriches. Par contre Bisset et Hale (35)

ont publié des micrographies électroniques d'Azotobacter chroococ-
cum pourvus de cils polaires.

Le cycle morphologique, complexe, des Azotobacter chroococcum est établi depuis longtemps. Löhnis et Smith (36) ont décrit des phases morphologiques différentes en milieux liquides. D'après ces chercheurs on peut constater sept stades différents et cinq types de reproduction chez les Azotobacter. Une étude critique par Winogradsky (37) a démontré que Löhnis et Smith avaient travaillé avec des cultures mixtes, non purifiées. Winogradsky a décrit lui-même un cycle morphologique des Azotobacter.

Pochon, Tchan et Wang (38) ont constaté que le cycle morphologique des Azotobacter chroococcum et A. Vinelandii était différent de celui des Azotobacter agilis. Ils proposent le cycle suivant pour les Azotobacter chroococcum et Vinelandii :

Les cellules jeunes sont des bâtonnets courts possédant des cils. Les cellules adultes sont plus ovales et immobiles. Les cellules encore plus âgées deviennent plus petites et immobiles.

L'évolution des cellules âgées peut alors se faire suivant deux modes différents selon les matières énergétiques dont elles disposent. Sur des aliments "normaux" (alcools, acides organiques) l'enkystement est très habituel. La cellule diminue en volume et s'entoure d'une membrane kystique à double paroi épaisse. Après ensemencement, la cellule enkystée germe et des bâtonnets jeunes et courts sont à nouveau formés. Sur des aliments "anormaux" (hydrates de carbone et mannitol) il ne se produit pas d'enkystement. Les cellules s'élargissent et s'allongent. Des formes géantes apparaissent qui ressemblent à des levures.

Les Azotobacter agilis sont des grandes cellules ovales et très mobiles sur des aliments "normaux". Les cellules plus âgées gardent leurs aspects morphologiques et ne produisent jamais des kystes. Sur des aliments "anormaux" on constate la présence de cellules géantes comme chez les A. chroococcum et Vinelandii.

Pochon et ses collaborateurs précisent que le cycle morphologique des Azotobacter n'est pas seulement influencé par les aliments présents dans le milieu nutritif, mais également par d'autres facteurs comme la température, la carence en magnésium et en phosphore.

Chaque fois qu'un facteur mécanique ou chimique change l'équilibre métabolique, le cycle morpho-cytologique est également perturbé. Les cellules peuvent reprendre leur forme normale après réensemencement à condition que le facteur perturbant n'ait pas exercé trop longtemps son influence.

Cette étude remarquable a contribué à la différenciation entre les Azotobacter chroococcum et Vinelandii d'une part et les Azotobacter agilis de l'autre. Il nous semble cependant que la description des phases évolutives dans ce cycle morphologique eut été plus précise si les chercheurs avaient donné plus de précisions en ce qui concerne l'âge des cellules au moment des changements morphologiques.

La sensibilité des Azotobacter chroococcum en milieu dépourvu d'azote combiné se situe à pH 5,5 - 6,0. Des résultats concordants ont été obtenus à ce sujet par Gainey et Fowler (39), Stapp et Ruschmann (40) et Krishna (41). Jensen et Petersen (42) ont trouvé que la croissance d'Azotobacter chroococcum était inhibée à pH = 5,4. Burk, Lineweaver et Horner (43) ont trouvé, dans des expériences manométriques, que la croissance des Azotobacter chroococcum et Vinelandii était arrêté à pH = 6,0. En présence de nitrates, d'ammoniaque et d'urée les cellules se multiplient jusqu'au pH 4,0 - 4,5. Par contre Petersen (44) ne pouvait apercevoir une croissance macroscopique à un pH inférieur à 6,0 dans un milieu nutritif enrichi de nitrates.

La respiration endogène des Azotobacter chroococcum atteint d'après Harris et Gainey (45) son optimum à pH = 7,0. Cette respiration est presque nulle à pH 5,5 - 5,8. A ce pH la respiration semble stimulée par la présence des ions Ca.

En milieu alcalin la croissance est inhibée à pH = 9-10. D'après Burk (43) et Yamagata (31) le pH optimum pour Azotobacter chroococcum se situe vers 7,5.

Les Azotobacter appartiennent au groupe des bactéries mésophiles. La température minimum de croissance se situe vers 10° C, la température optimum vers 30°C et la température maximum vers 40-45°C.

D'après Jensen (8) les Azotobacter chroococcum et Vinelandii ne se développent plus à 5 - 7° C.

L'influence des substances organiques utilisées par les Azotobacter chroococcum sera discutée plus loin en même temps que pour les Azotobacter Beijerinckii.

2. Caractères de l'Azotobacter Beijerinckii Lipman

En 1904, Lipman (46) isolait d'une terre arable, un germe fixateur d'azote, qu'il dénomma Azotobacter Beijerinckii. Plus tard (47) ce même chercheur décrivit d'autres souches Azotobacter qu'il nommait A. Woodstonii, A. smyrni, A. Hilgardii. La description de ces souches était tellement incomplète - à l'exception de l'Azotobacter Beijerinckii - que la plupart des microbiologistes ne peuvent accepter ces types comme espèces nouvelles. En effet, Löhris et Smith (48) ont prouvé que les souches de Lipman étaient morphologiquement identiques à l'A. chroococcum Beijerinck, à l'exception d'A. Beijerinckii. Ce dernier germe fut considéré par certains chercheurs comme une nouvelle espèce, Azotobacter Beijerinckii Lipman.

Green (49) a trouvé que la composition chimique des cellules d'Azotobacter chroococcum était identique à celle des cellules d'Azotobacter Beijerinckii, mais différente de celle des A. Vinelandii et agilis. Les études sérologiques effectuées par Aso et Yoshida (50) suggéraient l'identité des Azotobacter chroococcum et Beijerinckii. Plus tard Smith (51) admit que A. Beijerinckii était une souche non-pigmentée d'A. chroococcum.

En raison de ces opinions, Hofer, dans la sixième édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (11) ne tenait plus compte de la différenciation entre A. chroococcum et A. Beijerinckii, faite par certains auteurs. Il considérait A. Beijerinckii comme une variété de l'A. chroococcum.

Sur la demande de Buchanan, Johnstone s'est vu attribué la tâche de reviser la famille des Azotobacteriaceae pour la nouvelle édition de la classification de Bergey en 1957 (52). Johnstone n'admet également pas de différence entre A. Beijerinckii et

A. chroococcum.

Pourtant Jensen (53) maintenait en 1950 la distinction entre A. chroococcum produisant un pigment brun et A. Beijerinckii produisant un pigment jaunâtre.

Dans une étude approfondie, V. Jensen (33) a démontré qu'il y a des différences considérables entre les deux espèces, aussi bien au point de vue morphologique, physiologique que sérologique.

D'après cet auteur ces différences essentielles peuvent être résumées comme suit :

Azotobacter chroococcum Beijerinck.

Les cellules ont une forme de bâtonnet avec des dimensions de 2,4 x 5 μ . Les cellules sont très mobiles. Les cultures deviennent brun foncé après 3-4 semaines. La croissance et la fixation d'azote sont inhibées à pH 5,6. L'amidon est utilisé comme source de carbone. Du sérum agglutinant peut être obtenu en utilisant comme antigènes des cellules mobiles. Sérologiquement toutes les souches forment un groupe homogène, puisqu'elles sont agglutinées pratiquement à la même dilution par un anti-sérum d'une seule souche.

Azotobacter Beijerinckii Lipman.

Bâtonnets de 2,8 x 6,6 μ . Toujours non-mobiles. Les cultures âgées changent de pigmentation : la coloration passe de grisâtre à jaunâtre ou légèrement brunâtre. Le pH-limite pour la croissance et la fixation d'azote se situe vers 5,1. L'amidon n'est pas utilisé comme source de carbone. Les cellules sont des antigènes très faibles. Pour cette raison, un anti-sérum agglutinant n'est jamais obtenu. En général, les A. Beijerinckii n'agglutinent pas avec un sérum agglutinant les A. chroococcum.

Pour Tchan (54) la différence entre les A. Beijerinckii et A. chroococcum réside dans : a) les dimensions des cellules -b) la pigmentation des cultures.

Jensen (8) s'associe aux opinions de V. Jensen et de Tchan, et accepte la différence entre A. chroococcum et A. Beijerinckii.

De toutes ces recherches nous pouvons déduire qu'il existe des différences remarquables entre A. chroococcum et A. Beijerinckii. Pour compléter cet aperçu sur les A. Beijerinckii Lipman nous résumons ici les données publiées par différents chercheurs.

Les dimensions moyennes sont : pour Yamagata et Itano (31) 2,3 x 4,7 μ ; pour Tchan (32) 2 x 3,3 μ ; pour V. Jensen et Petersen (33) 2,8 x 6,6 μ .

Pour tous ces auteurs les cellules sont immobiles.

Concernant la dégradation des sources de carbone, V. Jensen (33) propose les caractéristiques suivantes :

- Sont utilisés par toutes les souches d'A. chroococcum et d'A. Beijerinckii : l'alcool éthylique, le dextrose, le fructose, le saccharose et le maltose.
- Ne sont jamais utilisés ni par A. chroococcum, ni par A. Beijerinckii : le dulcitol, le xylose, le mannose, le lactose, le citrate de soude.
- Sont utilisés par toutes les souches d'A. chroococcum et par quelques souches d'A. Beijerinckii : le galactose et le raffinose.
- Sont utilisés par toutes les souches d'A. chroococcum, mais au contraire par aucune souche d'A. Beijerinckii : l'amidon.
- Ne sont jamais utilisés par A. chroococcum, mais bien par quelques souches A. Beijerinckii : le glycerol, l'arabinose.
- Sont utilisés par une ou plusieurs souches de chaque espèce : le mannitol, le sorbitol, le lactate de soude, l'inositol, le tartrate et le benzoate de soude.

Il ressort de tout ceci qu'il existe des différences nettes entre l'A. chroococcum d'une part et l'A. Beijerinckii d'autre part. Cependant, V. Jensen (33) termine ses études taxonomiques des Azotobacter par la déclaration suivante : "On the other hand, the taxonomy of the genus Azotobacter is not settled definitely".

Une chose est certaine et tous les auteurs sont unanimes là dessus, les A. chroococcum et A. Beijerinckii vivent uniquement dans la terre. On ne peut les isoler qu'à partir de la terre.

3. Caractères de l'Azotobacter agilis Beijerinck et de
l'Azotobacter Vinelandii Lipman.

C'est à partir de l'eau des canaux de Delft que Beijerinck (4) a le premier isolé l'Azotobacter agilis. Durant de longues années on a pensé que seul les eaux des canaux de Delft contenaient ces germes. Puis, des cultures d'Azotobacter agilis ont été obtenues en Angleterre en France et en Amérique.

Tous ces isollements ont été fait à partir d'eaux. Les A. agilis doivent donc être considérés comme des germes spécifiquement aquatiques.

D'après la classification de Bergey (52) il n'existe qu'une seule espèce aquatique d'Azotobacter, l'A. agilis Beijerinck.

En 1903, Lipman isolait d'un sol américain, une souche fixatrice d'azote, qu'il nomma Azotobacter Vinelandii.

Les Azotobacter agilis et Vinelandii semblaient assez rare. Löhnis et Smith (36) les considéraient comme une seule espèce, Azotobacter agilis s. lat. Cette proposition fut retenue dans la classification de Bergey (11,52).

Pourtant Kluyver et van Reenen (55) prétendaient qu'il fallait considérer A. agilis et A. Vinelandii comme deux espèces différentes. Les cellules d'A. agilis sont plus larges, plus rondes et plus transparentes que celles d'A. Vinelandii.

Winogradsky (37) suggérait que les A. Vinelandii sont capables de produire des formes enkystées, ce qui n'a jamais lieu chez les A. agilis. L'étude de Pochon et ses collaborateurs (38) a confirmé cette suggestion et a démontré que le cycle de vie des A. agilis et A. Vinelandii était différent.

Winogradsky (37) précisait également qu'en milieu liquide et avec l'alcool éthylique comme source énergétique l'A. Vinelandii se développe toujours en forme de bâtonnet, tandis que l'A. agilis se présente toujours sous forme sphérique.

Ce savant a pu établir en outre que le benzoate de sodium n'est pas utilisé par les A. agilis, tandis que l'acide benzoïque est très apprécié par les A. Vinelandii.

A la suite de ces recherches, Winogradsky proposait de placer l'A. agilis Beijerinck comme espèce unique dans un nouveau genre "Azomonas". Nous avons déjà mentionné que Orla-Jensen (20) avait proposé un addendum à la famille des Azotobacteriaceae, sous le nom de Azotomonas.

Plus récemment Tchan (54) proposait de faire pour les A. agilis le genre Azotococcus, gen. nov. Tchan, 1953, et d'abandonner le terme Azomonas de Winogradsky puisque "this generic name is not suitable, because azo in French does not mean nitrogen".

Pour Tchan, l'absence de formation de kystes chez les A. agilis est si important qu'il est logique de placer ce germe dans un autre genre, celui des Azotococcus.

Cette proposition est très logique d'après Tchan. En effet, pourquoi classer les fixateurs d'azote aérobies libres dans un seul genre? Les bactéries cellulolytiques aérobies sont bien classées dans des genres différents.

Dans une étude sur l'accumulation spécifique de l'A. agilis et A. Vinelandii, Derx (56) précise que " l'A. agilis est particulièrement résistant vis-à-vis du benzoate de soude; il surpasse même l'A. Vinelandii à cet égard, et cela sans que l' A. agilis soit capable d'attaquer les benzoates".

Pour le même auteur l'A. agilis est un microbe ubiquiste et purement aquatique. Par contre l'A. Vinelandii peut être trouvé fréquemment aussi bien dans l'eau que dans le sol.

Pour Tchan (54) la différence entre A. agilis et A. Vinelandii est très nette. Le tableau suivant, tiré de sa publication, résume ces différences.

	Morphologie	Mobilité	Pigment	Physiologie	Habitat
<u>A. agilis</u> (<u>Azotococcus</u> <u>agilis</u> <u>Tchan</u>)	ovale 3,5 - 2 x 2,5 - 2 μ	+	vert	n'utilise ni le mannitol ni le benzoate, mais 1% de benzoate n'inhibe pas la croissance.	Eau
<u>A. Vinelandii</u>	bâtonnet 2,5 x 1,5 μ	+	idem	utilise le benzoate à 1% ou moins	Eau et terre

D'après Jensen (8) la proposition de Winogradsky et de Tchan est difficile à accepter. En effet, pour cet auteur, il est illogique de créer un autre genre pour les A. agilis en se basant sur l'absence de formation de kystes, là où on accepte que A. chroococcum et A. Beijerinckii restent dans le même genre bien que V. Jensen (33) ait constaté que certaines variétés d'A. Beijerinckii ne produisent pas non plus de kystes.

A côté des Azotobacter cités ici, d'autres souches ont été décrites. Signalons d'abord l'Azotobacter insigne isolé par Derx (57) en 1951. Cette souche fut isolée des eaux de Bogor à Java. C'est une souche typiquement aquatique qui ressemble beaucoup à l'A. agilis. L'A. insigne se développe sur l'alcool éthylique et sur les acides aliphatiques. L'acide benzoïque n'est pas utilisé. Le mannitol et le glucose ne sont pas utilisés par l'A. insigne comme sources énergétiques.

D'après V. Jensen (58) l'A. insigne diffère de l'A. agilis par la position des cils. L'implantation des cils est péritriche chez l'A. agilis, elle semble polaire chez l'A. insigne. D'autre part d'après le même auteur les A. insigne produisent sur des milieux à base d'alcool éthylique un pigment qui varie de bleu grisâtre au violet.

Nous trouvons également dans la littérature des Azotobacter dénommés :

- A. agilis var. atypica décrit par Kluyver et van den Bout (59)
- A. Beijerinckii var. acido-tolerans décrit par Tchan (60)
- A. macrocytogenes n. sp. décrit par Jensen (61)
- A. Beijerinckii var. achromogenes décrit par V. Jensen (42)

Comme nous l'avons indiqué au début de cette introduction, certains auteurs ont proposé un nouveau genre voisin des Azotobacter, groupant tous les germes libres, fixateur d'azote, mobiles ou immobiles, qui produisent des acides sur des milieux contenant des sucres et qui se développent entre pH 3 et 9. Ce nouveau genre est nommé Beijerinckia.

En examinant tous les travaux publiés jusqu'ici sur la Famille des Azotobacteriaceae, nous constatons que quatre classifications principales ont été proposées, notamment celle de Bergey (52) celle de H.L. Jensen (8), celle de Tchan (54) et celle de V. Jensen (58).

1. Classification des Azotobacteriaceae d'après Hofer

(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) (52)

Genre I. Azotobacter

1. Azotobacter chroococcum Beijerinck (1901)

Bâtonnets produisant des pigments qui sont insolubles dans l'eau. Présence de cils péritriches.
Fixent l'azote atmosphérique en présence d'hydrates de carbone et d'autres produits organiques.
Habitent le sol. Produisent un pigment brun ou noir.

2. Azotobacter agilis Beijerinck (1901)

Bâtonnets ou formes sphériques.
Présence de cils péritriches.
Fixent l'azote atmosphérique en présence d'hydrates de carbone. Pas de production de pigment noir, mais d'un pigment fluorescent sur des acides organiques.
Habitent l'eau et le sol.

3. Azotobacter indicus Starkey et De (1939)

Bâtonnets mobiles par des cils péritriches.
Sont tolérants aux acides.
Habitent le sol.

Comme nous pouvons le constater, dans cette classification, le genre Azotomonas, accepté comme addendum dans l'édition précédente, ne figure plus.

2. Classification des Azotobacteriaceae d'après H.L. Jensen (8)

A. Genre Azotobacter.

1. Organismes faiblement mobiles ou non mobiles, produisant des pigments jaunes ou bruns foncés insolubles dans l'eau. Germes qui habitent le sol.
 - a. Mobiles avec pigment brun léger ou foncé.

A. chroococcum
 - b. Non-mobiles avec pigment jaune ou sans pigment.

A. Beijerinckii
2. Organismes très mobiles produisant un pigment jaune-verdâtre ou pourpre. Parfois pas de production de pigment. Germes typiquement aquatiques.
 - a. Cellules en formes de bâtonnets, produisant des kystes.

A. Vinelandii.
 - b. Cellules ovalaires ou sphériques ne produisant pas de kystes.

A. agilis.

B. Genre Beijerinckia.

Petites cellules. Pas de formation de kystes.
Se multiplie en milieux acides. Production d'acides organiques.

- a. Mobiles avec croissance luxuriante sur gélose.

B. indica
- b. Non-mobiles avec une croissance d'aspect pateux sur gélose.

B. lacticogenes

3. Classification des Azotobacteriaceae d'après Tchou (54)

1. Genre Azotobacter Beijerinck (1901)

- a. Azotobacter chroococcum : Cellules ovalaires ou en bâtonnets. Mobiles. Pigments bruns noires. Croissance inhibée par 1% de benzoate de soude. Utilise 0,5% de benzoate. Habite le sol.
- b. Azotobacter Vinelandii : Cellules en bâtonnets. Mobiles. Pigments verts et fluorescents. Utilise 1% de benzoate

ou moins. Habite l'eau et le sol.

c. Azotobacter Beijerinckii : Cellules ovales. Non-mobiles. Pigments jaunes. Utilise le benzoate à 0,5% mais la croissance est inhibée par 1 % de benzoate.

d. Azotobacter Beijerinckii var. acido-tolerans : Cellules ovalaires. Non-mobiles. Pigments jaunes. Caractères physiologiques de l'Azotobacter Beijerinckii, mais tolère un milieu acide. Habite le sol.

2. Genre Azotococcus, gen. nov., Tchan (1953)

a. Azotococcus agilis : Cellules ovalaires. Mobiles. Pigment vert et fluorescent. N'utilise pas le mannitol ou le benzoate. 1% benzoate n'arrête pas la croissance. Habite l'eau.

b. Azotococcus agilis var. atypica : Mêmes caractères que le précédent, mais il n'y a pas de pigment. Le mannitol est un aliment pauvre. Habite l'eau.

c. Azotococcus insigne : Bâtonnets. Mobiles. Les cils sont visibles sous le microscope à champ noir. Pigment bleu grisâtre tournant vers le violet. N'utilise pas le glucose, le mannitol ou le benzoate. Habite l'eau.

3. Genre Beijerinckia Derx (1950)

a. Beijerinckia indica. Pigments jaunes grisâtres. Mobiles. Production de lévane.

b. Beijerinckia indica var. alba. Comme le précédent mais pas de pigmentation.

c. Beijerinckia motile. Pigments bruns. Mobiles. Pas de production de lévane.

d. Beijerinckia lacticogenes. Comme le précédent mais la production de lévane est douteuse.

4. Classification des Azotobacteriaceae d'après V. Jensen (58)

A. Genre Azotobacter Beijerinck, comportant :

1. Azotobacter chroococcum Beijerinck

2. Azotobacter Beijerinckii Lipman

3. Azotobacter Vinelandii Lipman

B. Genre Azomonas Winogradsky, comportant :

1. Azomonas agilis Beijerinck, Winogradsky
2. Azomonas insigne Derx comb. nov.

C. Genre Beijerinckia Derx, comportant :

1. Beijerinckia indica (Starkey & De) Derx
2. Beijerinckia lacticogenes (Kaufmann & Toussaint) Tchan

La comparaison de ces quatre classifications montre une assez grande divergence entre les opinions des auteurs.

Quand nous avons commencer nos recherches en 1955, la nomenclature nous semblait assez simple. Depuis lors beaucoup de changements sont intervenus. Les propositions de H.L. Jensen, de Tchan et de V. Jensen n'ont pas simplifié les choses.

Il est curieux de constater que les représentants d'une famille aussi bien caractérisé - des germes aérobies libres fixateurs d'azote - soit si difficile à classer.

Nous avons pensé que la systématique de ces germes devait être construite sur des bases physiologiques solides. C'est dans ce sens que nous avons engagé notre étude des Azotobacter.

En général, les auteurs mentionnent d'une façon assez vague et rudimentaire les conditions d'isolement des souches décrites. Ensuite, après une étude morphologique, des ensemencements sont faits sur différents milieux de culture pour évaluer la croissance (luxuriante ou déficiente). On déduit de ces essais que des produits utilisés comme source énergétique sont assimilés ou non. Après un contrôle de la pigmentation et de la croissance en fonction de l'acidité du milieu on recherche enfin des analogies avec d'autres germes correspondants. Trop vite alors certains chercheurs se figurent d'avoir découvert un germe nouveau ou pensent que la taxonomie doit être adaptée à leur trouvaille.

Nous admettons volontiers qu'il existe sur la Terre beaucoup de microorganismes qui n'ont pas encore été isolés et décrits - nous en avons fait l'expérience - mais il ne faut pas oublier que les êtres microscopiques sont très sujets de variations.

Tous les germes se trouvent sous l'emprise du milieu. Ce sont

essentiellement les éléments composant le milieu (substances chimiques, conditions physiques, la composition biologique) qui décident si le germe se développera et sous quelle forme. C'est "le milieu extérieur" qui en dernier lieu permet l'existence de l'être" disait déjà Claude Bernard.

L'expression suivante empruntée à Dubos exprime fort bien cette idée :

" The extraordinary plasticity of bacteria, the ease with " " which they adapt themselves to the environment, either by " " reversible modification, or by hereditary variation, has " " not only determined their importance in the economy of na- " " ture; it also makes them ideal objects for the study of " " that organization and integration of independant characters" " which define and characterize life."

(Extrait de "THE BACTERIAL CELL").

C'est dans cet esprit que nous avons entamé nos recherches concernant les Azotobacter. Nous espérons que par les multiples essais que nous avons fait, nous aurons contribué à une connaissance meilleure de ces microorganismes.

C H A P I T R E I

=====

ISOLEMENT ET DESCRIPTION DES AZOTOBACTER

=====

I. ISOLEMENT DES AZOTOBACTER DU SOL.

.Comme tous les chercheurs qui abordent la microbiologie du sol, nous nous sommes inspirés des techniques recommandées par Wincogradsky (62) pour isoler les Azotobacter du sol. Nous avons utilisé la culture des Azotobacter sur plaques de silico-gel. Le silico-gel est un milieu solide et, comme le sol également, un milieu essentiellement minéral. En utilisant le silico-gel on élimine les milieux liquides et les milieux solides à base de gélose ou de gélatine. Le silico-gel n'est donc rien d'autre qu'un support qu'on peut imprégner de sels minéraux, de matières énergétiques, ainsi que de grains de terre. Les germes présents dans la terre peuvent se développer, sur ce rapport minéral, presque comme dans la terre même.

La préparation du silico-gel est fort simple. On mélange à volumes égaux :

Acide chlorhydrique : densité = 1,1 degré Bé 13

Silicate de soude : densité = 1,06 degré Bé 6-8

Le mélange, d'une couleur jaunâtre, est reparti dans des boîtes de Pétri à raison de 30 ml par boîte de 10 cm de diamètre. Le milieu se solidifie à la température ambiante et au bout de 24 heures on obtient un gel qui vibre bien sous le choc. L'excès d'acide chlorhydrique est éliminé par un lavage à l'eau courante pendant 72 heures. Les plaques peuvent être considérées comme suffisamment lavées quand la dernière eau de lavage ne donne plus de précipité avec une solution de nitrate d'argent. Ensuite les plaques sont lavées à l'eau distillée et enfin trempées dans de l'eau distillée bouillante. Les plaques de silico-gel ainsi préparées peuvent être conservées pendant plusieurs semaines avant l'emploi, à l'abri de la dessiccation.

Les plaques sont alors traitées de la façon suivante :

On prépare la solution standard de Winogradsky qui contient :

Phosphate monopotassique	.1 g	Sulfate de manganèse	0,01 g
Sulfate de magnésium	0,5 g	Sulfate ferrique	0,01 g
Chlorure de sodium	0,5 g	Molybdate de sodium	0,005 g (x)
Eau du robinet	200 ml		

La solution est amenée à pH = 7,2 avec une solution de soude. A cette solution nous ajoutons 30 g de carbonate de chaux et 50 g de mannitol. De ce mélange nous prenons 2 ml que nous étalons sur chaque plaque de silico-gel. Ainsi chaque plaque contient 0,5 g de matière énergétique, ici le mannitol. Les plaques, sont alors séchées à l'étuve à environ 60° C, sans couvercle. L'eau s'évapore et on obtient à la surface du silico-gel, une couche lisse de carbonate de chaux mélangé à des sels minéraux (sans azote combiné) et à une substance énergétique.

La stérilisation des plaques se fait par exposition aux rayons ultra-violets. Nous avons employé une lampe à rayons ultra-violets de 2537 Angström à une distance des plaques de 35 cm. Il suffit d'exposer les plaques (sans leur couvercle) pendant 30 minutes pour obtenir une stérilisation complète.

L'ensemencement des plaques imprégnées et stériles s'effectue avec des grains de terre. On prélève des grains avec une baguette en verre étirée et humectée. Des petites particules de terre sont posées sur le silico-gel en rangées, à raison de 50 grains par plaque de 10 cm de diamètre.

Finalement les plaques sont placées sous des cloches en verre. Sur la plaque supérieure on met une boîte de pétri, sans couvercle, contenant de l'eau ordinaire. Ainsi, les plaquesensemencées restent toujours dans un atmosphère pendant leur séjour à l'étuve.

humidifié

(x) Nous avons ajouté du molybdate de sodium à la solution standard de Winogradsky. En effet Mulder (63) a prouvé que le molybdène joue un rôle capital dans la fixation de l'azote par les Azotobacter en absence d'azote combiné.

Les plaques ensemencées sont mises à l'étuve réglée à 28° C.

Au bout de 48 heures au maximum, les colonies apparaissent. Les grains de terre sont entourés d'une goutte de mucus transparent et visqueux. Ces gouttes s'élargissent au fur et à mesure que la culture se poursuit.

Quand on enlève un peu de la masse muqueuse qui entoure les grains et qu'on pratique une coloration, soit une coloration simple à l'érythrosine phéniquée ou à la fuchsine, soit une coloration de Gram, on constate facilement la présence des Azotobacter. Les cellules sont sphériques ou ovalaires (aspect de levures), groupées en diplocoques ou en amas; le protoplasme est granuleux. Les germes sont noyés dans un mucus à peine colorable.

Même au bout de 48 heures de développement seulement, on constate dans les préparations colorées la présence de petits bâtonnets. Ce sont en général des germes organotrophiques, c'est à dire accompagnant les Azotobacter. Les amibes sont parfois également présentes.

Winogradsky recommandait l'emploi du benzoate de soude comme substance énergétique. Cette substance donne des colonies plus limitées, mais provoque un noircissement précoce du milieu. En outre nous savons par la littérature que certaines souches d'Azotobacter ne se développent pas sur le benzoate de sodium. On pratiquerait donc par cette méthode et dès l'isolement une certaine sélection dans les Azotobacter. Nous avons maintefois constaté ce phénomène.

Pochon (64) préconise l'emploi du pyruvate de soude comme source énergétique. Seulement, il n'en donne pas la raison.

Nous savons que le mannitol est une substance énergétique assimilable par tous les Azotobacter habitant normalement le sol. Pour cette raison nous avons utilisé le mannitol pour la fabrication de nos plaques et nous avons constaté plusieurs fois qu'en employant cet alcool nous trouvons toujours plus d'Azotobacter (estimation par le pourcentage de grains entourés d'une masse muqueuse) qu'en utilisant le benzoate ou le pyruvate de soude.

Après l'isolement sur plaques de silico-gel, nous avons purifié les Azotobacter à partir de la masse muqueuse entourant les

grains de terre. Comme milieu de culture nous avons utilisé :

Phosphate dipotassique	1 g	Sulfate ferreux	0,05 g
Sulfate de magnésium	0,5 g	Sulfate de manganèse	0,05 g
Chlorure de calcium	0,5 g	Molybdate de sodium	0,005 g
Sulfate de sodium	0,25 g	Mannitol	10 g
Eau distillée	1000 ml	Gélose	15 g

Le pH du milieu était amené à 7,5 avant la stérilisation. Cette dernière se faisait en fioles d'Erlenmeyer à 115° C pendant 20 minutes.

Nous enlevons un peu de la masse muqueuse qui entoure les grains de terre et nous avons mis le prélèvement en suspension dans 10 ml d'eau du robinet stérilisée et répartie en tubes à essais. A partir de cette première suspension nous avons ensuite pratiqué des dilutions dans ^{de} l'eau du robinet stérile. 1 ml de chaque dilution fut ensuite introduit dans des boîtes de Pétri. Cette quantité était mélangée avec le milieu nutritif stérile, mentionné ci-dessus, à une température de 40-45° C. Après 48 à 72 heures les colonies d'Azotobacter se présentent à la surface du milieu gélosé.

Les colonies sont soumises à un examen microscopique. Les Azotobacter se reconnaissent facilement, en préparation aqueuse, par leurs formes typiques rondes ou ovales et par leur ressemblance avec les levures. Ces colonies sont également mises en suspension, dans de l'eau du robinet stérile. Une deuxième série de dilution est faite à partir de ces colonies. 1 ml de chaque dilution est à nouveau mélangé avec le milieu nutritif, mentionné ci-dessus, en boîtes de Pétri.

En opérant de cette façon il nous a été possible d'obtenir des souches d'Azotobacter du sol absolument pures et exemptes de tout autre microorganisme étranger.

Les souches isolées ont été repiquées sur le milieu nutritif à base de mannitol en tubes à essai tous les mois. Après un séjour de 48 heures dans une étuve à 28° C, les souches sont gardées au frigidaire à 4° C.

Avant de passer à la description des souches isolées d'Azotobacter, nous voulons donner ici les méthodes d'analyse effectuées

sur les différentes terres desquelles les Azotobacter ont été isolés.

1° Prélèvement des échantillons :

Avec une spatule métallique flambée, la terre fut prélevée à une profondeur entre 5 et 10 cm. Cette terre fut introduite dans des flacons stériles à large goulot. Environ 10 prélèvements ont été pris par champ de 1 Ha. Au laboratoire ces échantillons sont passés sur deux tamis à mailles de 5 mm et de 2 mm. De cette façon les cailloux et les gros débris organiques sont retenus. Après tamisage, les échantillons sont gardés dans des sacs en matière plastique. Les isolements ont été effectués dans les 3 semaines suivantes:

2° Détermination du taux d'humidité :

Dans une capsule tarée, on pèse exactement un poids de l'ordre de 5 g d'échantillon. Après un séchage à l'étuve à 80° C jusqu'à poids constant on pèse à nouveau et on détermine ainsi le pourcentage d'humidité.

3° Dosage de l'azote total :

Dans un ballon de Kjeldahl de 100 ml on introduit 2 g de terre sèche. Ensuite une petite cuillère de catalyseur comprenant : 10 g de sélénium + 475 g de sulfate de soude + 7,5 g de sulfate de cuivre. Après, on verse dans le ballon 5 ml d'acide sulfurique concentré ($d = 1,84$). On chauffe à ébullition sous hotte jusqu'à obtention de la teinte verte pâle. Ensuite on laisse refroidir. On ajoute ensuite 15 ml d'eau distillée et on laisse à nouveau refroidir. On adapte le ballon à l'appareil de distillation de Parnas et on verse 25 ml d'une solution de soude de 40 %. Le distillat est recueilli dans environ 50 ml d'eau distillée. L'azote est titré avec de l'acide sulfurique N/100 en présence de l'indicateur de Tashiro (0,125 g de rouge de méthyle + 0,0839 g de bleu de méthylène dissout dans 100 ml d'alcool éthylique). Le résultat est exprimé en pourcentage d'azote de terre sèche.

4° Dosage du Carbone Organique.

On pèse exactement 2 grammes de terre sèche qu'on introduit dans un ballon de 250 ml de volume. On y ajoute 10 ml d'une solution de bichromate de potasse à 8 % et 20 ml d'acide sulfurique concentré ($d = 1,84$). Le mélange est chauffé sous reflux dans un bain d'huile pendant 5 minutes à $190 - 200^{\circ}\text{C}$. Le liquide est ensuite tranvasé dans un ballon jaugé de 250 ml et on ajoute de l'eau distillée jusqu'au trait. Ensuite 50 ml de cette solution sont introduits dans un Erlenmeyer de 500 ml. On ajoute 15 ml d'acide phosphorique à 85 % et 200 ml d'eau distillée et 1 ml d'indicateur (0,5 g de diphénylamine + 100 ml d'acide sulfurique concentré + 20 ml d'eau distillée). La titration est faite avec une solution de sel de Mohr N/5. Le virage de titration passe du bleu au vert.

1 ml de la solution de sel de Mohr N/5 correspond à 0,6 mg de carbone. Les résultats sont exprimés en pourcentage de carbone organique.

5° Détermination du pH.

On pèse environ 5 g d'un échantillon tamisé de terre qu'on introduit dans un mortier. On y ajoute 12,5 ml d'eau distillée et on mesure le pH en secouant bien le mélange. Notre appareil était un Radiomètre (danois) avec électrode de verre.

II. DESCRIPTION DES AZOTOBACTER ISOLES DU SOL.

1. Azotobacter chroococcum VT-1.

Cette souche fut isolée d'une terre de culture après une récolte de pommes de terre. L'avoine était la culture précédente.

Données de cette terre :

pH	= 6,2
Humidité	= 7 %
Azote organique	= 0,3 %
Carbone organique	= 2,7 %

2. Azotobacter chroococcum A-1

Isolé d'une terre après une culture de froment.

Données :

pH	= 7,05
Humidité	= 19 %
Azote organique	= 0,5 %
Carbone organique	= 2,1 %

3. Azotobacter chroococcum A-2

Isolé d'une terre après une culture de seigle. Culture précédente pommes de terre. Données :

pH	= 7,2
Humidité	= 15 %
Azote organique	= 0,3 %
Carbone organique	= 1,7 %

4. Azotobacter chroococcum A-3

Isolé d'une terre après une culture de lin.

Données :

pH	= 7,5
Humidité	= 12 %
Azote organique	= 0,25 %
Carbone organique	= 1,5 %

5. Azotobacter chroococcum A-4

Isolé d'une terre après une culture d'avoine. Culture précédente : pommes de terre. Données :

pH	= 7,1
Humidité	= 11 %
Azote organique	= 0,2 %
Carbone organique	= 1,35 %

6. Azotobacter chroococcum A-5

Isolé d'une terre de jardin : rosiers, Bégonia, etc.

Données :	pH	= 6,85
	Humidité	= 20 %
	Azote organique	= 0,15 %
	Carbone organique	= 1,05 %

7. Azotobacter chroococcum A-6

Isolé d'une terre abandonnée depuis des années. Végétation de Festuca pratensis. Données :

	pH	= 7,85
	Humidité	= 13,5 %
	Azote organique	= 0,3 %
	Carbone organique	= 3,2 %

8. Azotobacter chroococcum A-7

Isolé d'un sous-bois. Végétation de Poa pratensis.

Données :	pH	= 7,3
	Humidité	= 9 %
	Azote organique	= 0,25 %
	Carbone organique	= 3 %

9. Azotobacter chroococcum A-8

Isolé d'une prairie permanente.

Données :	pH	= 7,9
	Humidité	= 10,5 %
	Azote organique	= 0,21 %
	Carbone organique	= 1,6 %

10. Azotobacter chroococcum A-9

Isolé d'une terre de potager après une culture de pois.

Fumure organiques très abondante. Données :

	pH	= 8,1
	Humidité	= 12,7 %
	Azote organique	= 0,30 %
	Carbone organique	= 3,1 %

11. Azotobacter chroococcum A-10

Isolé d'une terre de grande culture. Culture de froment.
Cultures précédentes : betteraves, pommes de terre.

Données : pH	= 7,6
Humidité	= 16 %
Azote organique	= 0,1 %
Carbone organique	= 1,2 %

Toutes les souches isolées appartiennent à l'espèce Azotobacter chroococcum (caractères morphologiques et physiologiques).

Les souches une fois isolées, sont étudiées morphologiquement sur les milieux suivants :

- gélose à base de mannitol à 1% après 24h de développement à 28° C.
- gélose à base de dextrose à 1% après 24h de développement à 28° C.
- solution minérale avec 1% de mannitol après 42h " " à 28° C.
- solution minérale avec 1% de saccharose " 42h " " à 28° C.
- solution minérale avec 1% d'alcool éthylique " " " à 28° C.
- solution minérale avec 0,25% de benzoate de soude après
72h de développement à 28° C.

Les milieux liquides et gélosés contiennent tous les composants minéraux mentionnés page 22.

Les ensemencements sont toujours fait à partir d'une suspension de germes dans l'eau, cultivés préalablement pendant 48 h. sur gélose-mannitol à 1%. Les milieux liquides sont répartis en fioles d'Erlenmeyer à raison de 25 ml par Erlenmeyer de 100 ml de volume. Les milieux solides sont répartis en tubes à essais inclinés.

Après une culture de 18 à 24 heures, des germes sont prélevés dans les colonies obtenues sur les milieux gélosés avec un fil de platine et mis en suspension dans une goutte d'eau stérile sur une lame de verre. La mobilité des germes est ainsi contrôlable. Ensuite la préparation est séchée et fixée. Une coloration pendant 3 minutes avec une solution aqueuse de fuchsine basique à 1% est effectuée ensuite. Dans ces préparations colorées, les dimensions de 50 germes sont mesurées.

Pour les germes cultivés en milieu liquide, nous avons enlevé avec un fil en platine un petit morceau de voile à la surface du milieu.

Les germes enlevés sont étudiés au point de vue de leur mobilité et leurs dimensions.

Le tableau I nous donne un aperçu sur la mobilité des souches isolées.

+++ signifie une très forte mobilité

++ signifie une bonne mobilité

+ signifie une faible mobilité

0 signifie pas de mobilité

Le tableau II nous donne les dimensions moyennes de 50 germes de chaque culture en microns.

TABLEAU I

Souches d' <u>Azotobacter</u> <u>chromococcum</u>	Mannitol gélose	Mannitol liquide	Dextrose gélose	Al.c.éthyl. liquide	Sucrose liquide	Benzoate liquide
V.T-1	++	+++	+++	+++	+++	pas de crois- sance.
A-1	++	+++	+++	+++	+++	++
A-2	+	++	++	++	++	+
A-3	++	++	++	+++	++	+
A-4	++	++	++	++	++	pas de crois- sance.
A-5	0	+	+	+	+	+
A-6	++	+++	+++	+++	+++	pas de crois- sance.
A-7	+	++	++	++	++	+
A-8	0	0	0	+	0	0
A-9	++	++	++	+++	++	+
A-10	+	+	+	++	+	+

TABIEAU II.

Souches d'Azotobacter chroococcum	Mannitol gélose	Mannitol liquide	Dextrose gélose	Alc. éthyL. liquide	Sucrose liquide	Benzoate liquide
VP -1	3,2 x 2	3 x 1,9	2,8 x 2	3 x 2	2,4 x 1,9	pas de croissance
A - 1	3,5 x 2	3,2 x 2	3 x 2	3,2 x 2	3 x 2	2,9 x 1,9
A - 2	3,6 x 2,2	3,6 x 2,2	3,5 x 2	3,6 x 2	3,4 x 2	3,4 x 2
A - 3	3 x 2	3 x 2	2,8 x 2	3,2 x 2,2	3 x 2	2,9 x 1,9
A - 4	2,9 x 1,9	3 x 2,1	2,9 x 2	3,2 x 2,2	3,1 x 2	pas de croissance
A - 5	3 x 2	3 x 2	3 x 2	3,2 x 2	2,9 x 2	2,8 x 1,9
A - 6	2,9 x 1,8	3 x 2	2,8 x 1,9	3,1 x 2,2	2,9 x 1,9	pas de croissance
A - 7	3,6 x 2,3	3,5 x 2,1	3,4 x 2	3,7 x 2,5	3,5 x 2,2	3,2 x 2
A - 8	3,2 x 1,9	3 x 2	2,9 x 2	3 x 2	2,9 x 1,9	2,9 x 1,8
A - 9	3,4 x 2,3	3,4 x 2,1	3,3 x 2,2	3,6 x 2,4	2,9 x 1,9	3,2 x 2
A -10	3 x 2	3 x 2	2,9 x 2	3,2 x 2,2	3,1 x 2,1	2,9 x 1,9

Ces observations sur la mobilité des germes, résumées dans le tableau I, montrent tout d'abord que la mobilité est très variable suivant les souches. Sur les onze souches décrites, une seule semble immobile sur cinq milieux de culture utilisés lors des essais. La plus grande mobilité des souches se manifeste sur l'alcool éthylique. Nous pensons donc que l'alcool éthylique est une source énergétique idéale pour déceler la mobilité des Azotobacter chroococcum.

Nous avons constaté que lorsque les cultures dépassent 24 heures de croissance sur milieux gélosés, la mobilité des germes diminue sensiblement. Des cultures très mobiles, comme la souche A-1 par exemple, ont perdu presque totalement leur mobilité après 48 heures de développement.

Nous avons pu observer également que trois souches ne se développent pas du tout sur le benzoate de soude, bien que la concentration de cette substance ne dépasse pas 0,25 %.

La mobilité des autres souches, qui se développent sur l'acide benzoïque est faible. Le benzoate de soude n'est donc pas indiqué pour observer la mobilité des Azotobacter chroococcum.

Nous pouvons conclure de ces observations que les Azotobacter chroococcum sont généralement mobiles à condition que les cultures ne dépassent pas 30 heures de croissance à 28° C sur des milieux gélosés.

Des colorations de cils ont été faites sur des germes très mobiles. Ces colorations sont plutôt décevantes. En effet on constate que les cellules sont entourées de substances muqueuses, qui entravent la vue des cils.

Le microscope optique ne permet pas de détecter d'une façon définitive l'implantation des cils. Il est impossible avec les techniques de coloration de cils, dont nous disposons actuellement, de conclure si les implantations des cils chez les Azotobacter chroococcum sont péritriches ou non. A notre avis, seul le microscope électronique peut trancher cette question.

L'examen des mesures, rassemblées dans le tableau II, nous apprend tout d'abord que les Azotobacter chroococcum sont des cellules en forme de bâtonnets ovales. Pour une même souche, les dimensions

des différentes souches, sur le même milieu nutritif, nous obtenons les chiffres suivants :

Sur mannitol gélosé	: 3,2 x 2,0 μ
Sur mannitol liquide	: 3,15 x 2,0 μ
Sur dextrose gélosé	: 3,0 x 2,0 μ
Sur alcool éthylique liquide	: 3,3 x 2,15 μ
Sur saccharose liquide	: 3,0 x 2,0 μ
Sur benzoate de soude	: 3,0 x 1,95 μ

Ces mesures nous apprennent donc que les dimensions moyennes des Azotobacter chroococcum sont en général : 3,1 x 2,0 μ .

Ces dimensions s'accordent assez bien avec celles proposées par Yamagata et Itano (31). En effet, ces auteurs ont trouvé comme dimensions moyennes : 3,4 x 2,3 μ . Par contre Jensen et Petersen (33) propose comme dimensions pour les Azotobacter chroococcum 5,0 x 2,4 μ . Vu la variabilité qui peut se produire entre les différentes souches, il est possible que sous l'influence de facteurs climatiques différents les races peuvent présenter des dimensions variables.

Après avoir étudié les caractères morphologiques des différentes souches, nous avons recherché leurs caractères physiologiques. Les milieux suivants ont été utilisés :

- 1°-Gélose-mannitol à 1%, mentionné page 22, en tubes à essais inclinés.
- 2°-Nutrient agar (Difco^x) ou gélose nutritive en tubes à essais inclinés.
- 3°-Nutrient gelatine (Difco) ou gélatine nutritive en tubes à essais.
- 4°-Nutrient broth (Difco) en tubes à essais = bouillon nutritif.
- 5°-Litmus milk (Difco) ou lait tournesolé en tubes à essais.
- 6°-Nitrate Agar (Difco) ou gélose nitraté en tubes à essais inclinés.
- 7°-Gélose-amidon à 1%, mentionnée page 22, en tubes à essais inclinés.
- 8°-Trypton broth (Difco) ou bouillon-tryptone en tubes à essais.
- 9°-Milieu liquide à base d'alcool éthylique, mentionné page 22, en fioles d'Erlenmeyer de 100 ml de volume.

(x) Les milieux de culture Difco (USA) sont deshydratés. On dissout la quantité indiquée dans de l'eau distillée et on stérilise. Le pH du milieu correspond avec celui indiqué sur le flacon.

Sur le milieu gélose-mannitol, toutes les souches se développent déjà visiblement après 24 heures à 28° C. D'abord la surface est blanche, après 4 jours une coloration brunâtre se manifeste. Certaines produisent après 8 jours de croissance un pigment endogène presque noir. La gélose n'est pas colorée. La croissance est luxuriante pour toutes les souches sur la gélose-mannitol. Les cellules jeunes cultivées sur ce milieu ne prennent en général pas la coloration de Gram après 72 heures de développement. Pourtant on peut trouver quelques cellules dans les préparations qui prennent bien le Gram.

Sur le milieu liquide à base d'alcool, éthylique toutes les souches montrent après 10 jours une production abondante de kystes. Ces kystes ont des dimensions inférieures à celles des cellules jeunes.

Sur le "nutrient agar" quelques petites colonies sont à peine perceptibles après 4 semaines à 28° C.

Un léger dépôt est formé après 4 semaines dans les tubes à essais contenant le "nutrient broth".

Une légère croissance, à peine perceptible, se manifeste après 4 semaines sur la "nutrient gélatine". Aucun signe de liquéfaction de la gélatine ne se manifeste.

Le tournesol ne subit pas de réduction dans le "litmus milk". Le lait n'est pas coagulé après 4 semaines de développement.

Sur le "nitrate agar" il n'y a pas de réduction de nitrates.

Une très bonne croissance se manifeste sur la gélose-amidon à 1%. Après 5 jours une coloration brunâtre, passant vers le noir, se développe.

Sur le "trypton broth" aucune croissance n'est notée après 15 jours de culture. La production d'indol, contrôlée avec le réactif de Kovacs, est négative.

Nous pouvons donc conclure que toutes les souches isolées se comportent aussi bien morphologiquement, que physiologiquement, comme des Azotobacter Beijerinck.

III. DESCRIPTION DES AZOTOBACTER BEIJERINCKII ISOLES DU SOL.

1. Azotobacter Beijerinckii B-1.

Isolé d'une terre de culture après une culture de pommes de terre.

Données : pH	= 5,8
Humidité	= 7,5 %
Azote organique	= 0,15 %
Carbone organique	= 1,2 %

2. Azotobacter Beijerinckii B-2.

Isolé d'un terrain vague avec végétation éparse de Festuca sp.

Données : pH	= 5,5
Humidité	= 11 %
Azote organique	= 0,20 %
Carbone organique	= 1,5 %

3. Azotobacter Beijerinckii B-3.

Isolé d'une terre de culture sablonneuse après culture de seigle.

Données : pH	= 5,9
Humidité	= 10 %
Azote organique	= 0,25 %
Carbone organique	= 1,35 %

4. Azotobacter Beijerinckii B-4.

Isolé d'une terre de jardin.

Données : pH	= 5,7
Humidité	= 15 %
Azote organique	= 0,12 %
Carbone organique	= 1,05 %

5. Azotobacter Beijerinckii B-5.

Isolé d'une terre de culture après une culture de seigle.

Données : pH	= 5,8
Humidité	= 13 %
Azote organique	= 1,55 %
Carbone organique	= 0,25 %

6. Azotobacter Beijerinckii B-6.

Isolé d'une prairie permanente.

Données : pH	= 5,2
Humidité	= 17 %
Azote organique	= 0,19 %
Carbone organique	= 1,4 %

7. Azotobacter Beijerinckii B-7.

Isolé d'une terre en friche.

Données : pH	= 5,4
Humidité	= 12 %
Azote organique	= 0,20 %
Carbone organique	= 1,1 %

8. Azotobacter Beijerinckii B-8.

Isolé d'un sol de forêt découvert (coupe à blanc d'un peuplement de pin sylvestre).

Données : pH	= 5,1
Humidité	= 15 %
Azote organique	= 0,30 %
Carbone organique	= 2,05 %

9. Azotobacter Beijerinckii B-9

Isolé d'un taillis de chênes et de châtaignes.

Données : pH	= 5,4
Humidité	= 9,0 %
Azote organique	= 0,20 %
Carbone organique	= 2,1 %

10. Azotobacter Beijerinckii B-10.

Isolé d'une prairie naturelle non pâturée.

Données : pH	= 6,5
Humidité	= 12,5 %
Azote organique	= 0,16 %
Carbone organique	= 1,8 %

Les souches isolées ont été étudiées morphologiquement avec les milieux de culture et les méthodes décrits page 27, comme pour les Azotobacter chroococcum.

Le tableau III nous renseigne sur la mobilité des souches isolées. Le tableau IV résume les dimensions moyennes de 50 cellules de chaque culture, exprimées en microns.

TABLEAU III

Souches d' <u>Azotobacter Beijerinckii</u> .	Mannitol gélose	Mannitol liquide	Dextrose gélose	Alcool éthyl. liquide	Sucrose liquide	Benzoate liquide
B-1	0	0	0	0	0	0
B-2	0	0	0	0	0	0
B-3	0	0	0	0	0	0
B-4	0	0	0	0	0	0
B-5	0	0	0	0	0	0
B-6	0	0	0	0	0	0
B-7	0	0	0	0	0	0
B-8	0	0	0	0	0	0
B-9	0	0	0	0	0	0
B-10	0	0	0	0	0	0

TABLEAU IV.

Souches d' <u>Azotobacter</u> Beljerinckii.	Mannitol rélose	Mannitol liquide	Dextrose gélose	Alcool éthyl. liquide	Sucrose liquide	Benzoate liquide
B-1	4, 5x2, 5	4x2, 3	4x2, 1	4x2, 3	4, 5x2, 2	4, 3x2, 1
B-2	4, 8x2, 7	4, 5x2, 5	4, 6x2, 5	4, 5x2, 5	4, 8x2, 7	4, 5x2, 2
B-3	4, 6x2, 6	4, 5x2, 6	4, 6x2, 5	4, 4x2, 5	4, 6x2, 6	4, 4x2, 3
B-4	4, 5x2, 4	4, 4x2, 3	4, 5x2, 3	4, 3x2, 1	4, 6x2, 4	4, 4x2, 3
B-5	4, 8x2, 5	4, 6x2, 5	4, 5x2, 5	4, 5x2, 4	4, 8x2, 5	4, 5x2, 4
B-6	4, 6x2, 4	4, 5x2, 4	4, 5x2, 4	4, 4x2, 3	4, 6x2, 4	4, 4x2, 3
B-7	4, 8x2, 5	4, 6x2, 4	4, 7x2, 5	4, 6x2, 4	4, 4x2, 3	4, 5x2, 4
B-8	4, 7x2, 4	4, 5x2, 2	4, 5x2, 3	5, 0x2, 6	4, 5x2, 3	4, 4x2, 5
B-9	4, 9x2, 5	4, 7x2, 4	4, 8x2, 3	5, 1x2, 7	4, 7x2, 5	4, 5x2, 4
B-10	4, 7x2, 5	4, 6x2, 5	4, 7x2, 5	4, 9x2, 7	4, 6x2, 5	4, 5x2, 4

Les observations sur la mobilité de ces germes nous ont appris que les Azotobacter Beijerinckii sont dépourvus de toute mobilité. On doit donc conclure qu'ils ne possèdent pas de cils.

Remarquons également que toutes les souches se développent bien sur tous les milieux de cultures utilisés, y compris le benzoate de soude.

Les mesures des cellules, données dans le tableau IV, sont celles de bâtonnets arrondis. Les dimensions moyennes sont de 4,6 x 2,4 μ .

Les Azotobacter Beijerinckii sont donc généralement plus grands que les A. chroococcum précédemment décrits.

Les caractères physiologiques des Azotobacter Beijerinckii ont été étudiés sur les milieux décrits page 31.

Sur la "gélose-mannitol", toutes les souches sont observables macroscopiquement après 24 heures de développement à 28° C. Les colonies sont visqueuses et produisent après 4 jours une coloration jaunâtre. Certaines souches produisent un pigment endogène légèrement brunâtre en vieillissant. Les cellules jeunes de 24 heures, prennent parfois le Gram. Les germes plus âgés de 72 heures, ne prennent jamais le Gram.

Sur le milieu liquide d'alcool éthylique, toutes les souches produisent en abondance des kystes, après 10 jours de culture. Comme pour les A. chroococcum, les kystes sont sensiblement plus petits que les cellules jeunes (2,8 x 1,8 μ de moyenne).

Aucune croissance ne se manifeste sur le "nutrient agar" ni sur le "nutrient broth" après 15 jours de développement à 28° C.

La "nutrient gelatine" ne permet pas de croissance de la part de ces germes. Aucune liquéfaction est perceptible après 15 jours.

Le "litmus milk" reste inchangé et il n'y a pas de production d'indole.

Aucune souche ne manifeste de croissance sur la gélose amidon à 1 %.

Nous pouvons donc conclure que toutes les souches isolées se comportent morphologiquement et physiologiquement comme des Azotobacter Beijerinckii Lipman.

IV. CONCLUSIONS GÉNÉRALES SUR LES AZOTOBACTER CHROOCOCCUM ET LES AZOTOBACTER BEIJERINCKII.

En examinant les caractères morphologiques et physiologiques des souches isolées, nous pouvons conclure qu'il existe des différences remarquables entre les deux espèces. Le tableau V résume les caractères distinctifs principaux :

TABLEAU V.

	AZOTOBACTER CHROOCOCCUM	AZOTOBACTER BEIJERINCKII
Dimensions des cellules	3,1 x 2,0 μ	4,6 x 2,4 μ
Mobilité	positive	négative
Formation de kystes	abondante	abondante
Croissance sur amidon à 1 %	positive	négative
Croissance sur benzoate de soude à 0,25 %	inconstante	toujours positive
Pigmentation	brunâtre à noir	jaune à légèrement brunâtre.

V. ISOLEMENT DES AZOTOBACTER DE L'EAU.

Pour l'isolement des Azotobacter de l'eau, nous nous sommes inspirés des prescriptions de Beijerinck (2) et de Winogradsky (62). Le premier savant prétendait avoir obtenu de riches cultures d'Azotobacter aquatiques à l'aide d'alcool éthylique à 2 %.

Winogradsky décrit l'isolement des Azotobacter de l'eau de la manière suivante : "S'il s'agit d'espèces aquatiques, on ajoute à un échantillon d'eau prélevé dans un étang ou rivière, quelques centimètres cubes de la solution de sels pour plaques, une pincée de craie et 0,5 % d'alcool absolu. Le liquide se trouble bientôt. S'il devient jaune ou jaune verdâtre, on est sûr d'y trouver l'un ou l'autre des microbes décrits dans ce mémoire (Azotobacter)".

De son côté Derx (55) prétend qu'on peut effectuer un isolement sélectif d'Azotobacter agilis et d'Azotobacter Vinelandii. Pour faciliter le développement des A. agilis on ajoute à un échantillon d'eau 0,05 % de phosphate biphosphorique, 1 % de benzoate de soude et 1 % d'éthanol. Par contre, pour faciliter le développement des A. Vinelandii il suffit d'ajouter à l'échantillon d'eau 0,05 % de phosphate biphosphorique, 1 % de benzoate de soude et 0,5 % de mannitol. Dans les deux modes opératoires, le benzoate de soude fait fonction de substance inhibitrice, tandis que l'éthanol et le mannitol fournissent l'énergie.

Nous n'avons pas voulu appliquer, dès l'isolement, des milieux de culture sélectifs et nous pensons d'avoir bien fait. Les essais sur la nutrition carbonée des Azotobacter aquatiques, décrits plus loin, confirmeront notre point de vue.

La technique d'isolement que nous avons suivie pour les Azotobacter de l'eau fut la suivante :
Les échantillons d'eau, environ 200 ml, sont additionnés de 0,05 % de phosphate biphosphorique et de 1 % d'alcool éthylique absolu. Ensuite ces 200 ml sont répartis par quantité de 50 ml dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml de volume. Bouchées avec de l'ouate, les fioles d'Erlenmeyer sont ensuite placées à 28° C. Après 4 jours, nous pouvons constater que les milieux se sont troublés et qu'un voile apparaît à la surface.

Une coloration jaune ou verdâtre se produit dans les milieux.

Avec une anse en platine nous prélevons un morceau de ce voile que nous mettons en suspension dans de l'eau du robinet stérilisée, en tubes. Des dilutions croissantes sont pratiquées à partir de cette première suspension. De chaque dilution 1 ml est transvasé dans des boîtes de Pétri. Le milieu nutritif, mentionné page 22, mais dans lequel le mannitol est remplacé par le dextrose, est mélangé avec les germes dilués.

Après 48 heures, parfois plus, des colonies se sont développées. Certaines colonies sont pourvues d'un pigment vert, d'autres d'un pigment jaune ou rosâtre, d'autres encore sont incolores. Les pigments produits diffusent dans le milieu de culture.

Nous avons, de cette façon isolé des Azotobacter aquatiques des eaux de la Lys, de l'Escaut et de différents canaux. Nous avons également pratiqué des isolements à partir d'autres eaux souillées, par exemple d'eaux d'étangs.

VI. DESCRIPTION DES AZOTOBACTER VINELANDII AQUATIQUES.

Les souches A. Vinelandii isolées des eaux, furent mises en culture, par repiquage, sur le milieu mentionné page 22, avec le dextrose comme source énergétique, et stérilisé en tubes. Après 24 à 48 heures de culture à 28° C, les éléments composant toutes les souches isolées manifestaient une mobilité vive, parfois surprenante.

Tous les A. Vinelandii isolés, sont des bâtonnets. Le tableau suivant nous donne leurs dimensions en microns.

<u>Azotobacter Vinelandii</u>	Mesures en microns sur "gélose-dextrose".
C-1	3,5 x 1,5 μ
C-2	3,2 x 1,5 μ
C-3	3,3 x 1,4 μ
C-4	3,5 x 1,6 μ
C-5	3,6 x 1,6 μ

Les dimensions moyennes sont donc sur "gélose-dextrose" : 3,4 x 1,5 μ .

Les caractères physiologiques des A. Vinelandii furent étudiés sur les milieux utilisés pour les A. chroococcum, mentionné page 31. Sur le milieu "gélose-mannitol" toutes les souches se développent déjà très distinctement après 24 heures de séjour dans une étuve à 28° C. La surface de la masse microbienne est généralement blanche. La gélose reste incolore. Après 8 jours de croissance une teinte jaunâtre à brunâtre se laisse apercevoir.

Les cellules ne prennent jamais le Gram, aussi bien les cellules jeunes, que les cellules plus âgées.

Sur le milieu liquide à base d'alcool éthylique toutes les souches produisent des cellules enkystées en abondance, après une dizaine de jours. Le milieu se colore en brun. Sur le "nutrient agar" aucune croissance n'est perceptible après un mois.

Aucune croissance non plus est visible dans le "nutrient broth" après 4 semaines de séjour dans l'étuve à 28° C.

La "nutrient gelatine" n'est pas liquéfiée et aucune croissance ne se manifeste à la température du laboratoire après 4 semaines.

Le "litmusmilk" ne fermente pas.

Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites.

Une bonne croissance se manifeste sur la "gélose-amidon", sans formation de pigments.

La production d'indole est négative sur le "trypton broth".

Nous avons ajouté le test de croissance sur gélose-benzoate de soude à 1 %. Nous avons constaté que sur ce milieu les souches isolées se développent très bien. Au début, après 24 heures, le milieu est coloré d'un pigment verdâtre, fluorescent, qui change rapidement au brun.

De ces constatations, nous pouvons conclure que toutes les souches isolées se comportent morphologiquement et physiologiquement comme des Azotobacter Vinelandii Lipman.

VII. DESCRIPTION DES AZOTOBACTER AGILIS AQUATIQUES.

Comme les souches A. Vinelandii, les A. agilis furent cultivés par repiquage sur la "gélose-dextrose". Les cellules de toutes les

souches manifestent une très grande mobilité après une période de développement de 24-28 heures.

Des colorations de cils ne nous ont pas permis de constater une implantation pérित्रиче. Les substances muqueuses entourantes ne permettent pas de préciser, à l'aide du microscope optique, l'implantation exacte des cils.

Les cellules sont ovales ou cocciques. Le tableau suivant résume les mesures observées sur la "gélосе-dextrose" après un séjour de 48 heures dans l'étuve à 28° C.

Azotobacter agilis	Mesures en microns sur "gélосе-dextrose"
D-1	3,5 x 3,0 μ
D-2	3,0 x 2,5 μ
D-3	3,2 x 2,8 μ
D-4	3,3 x 2,8 μ
D-5	3,5 x 2,8 μ

Les dimensions moyennes sont donc sur la "gélосе-dextrose" : 3,3 x 2,8 μ .

Les caractères physiologiques des A. agilis furent examinés sur les milieux utilisés pour les A. chroococcum, mentionnés page 31.

Sur le milieu "gélосе-mannitol" aucune des souches se développe après un séjour de 4 semaines dans l'étuve à 28° C. Le mannitol est donc une source d'énergie non-utilisable pour les Azotobacter agilis.

Sur le milieu "gélосе-dextrose" une croissance luxuriante se manifeste. La culture est blanche, luisante et grasse. Aucune formation de pigments n'est observable. La gélose n'est pas colorée. Les cellules ne prennent pas le Gram.

Sur le milieu liquide avec l'alcool éthylique, aucune formation

de kystes ne se manifeste, même après 4 semaines. Les cellules ovales, presque rondes s'élargissent. On obtient des cellules géantes. Le milieu devient légèrement jaunâtre.

Sur le "nutrient agar" aucune croissance n'est perceptible après un séjour de 4 semaines dans l'étuve à 28° C.

Un léger dépôt est visible dans le "nutrient broth" après 4 semaines.

La "nutrient gelatine" n'est pas liquéfiée et aucune croissance ne peut être observée à la température du laboratoire après un mois.

Le "litmus-milk" reste inchangé.

Aucune réduction des nitrates en nitrites n'est décelable.

Sur la "gélose-amidon" une légère croissance se manifeste.

La production d'indole est nulle sur la "trypton broth".

Sur la "gélose-benzoate" à 1 % aucune croissance ne se produit.

Les expériences décrites, nous permettent de conclure que toutes les souches isolées se comportent morphologiquement et physiologiquement comme Azotobacter agilis Beijerinck.
=====

VIII. CONCLUSIONS GENERALES SUR LES AZOTOBACTER VINELANDII ET LES AZOTOBACTER AGILIS.

En examinant les caractères morphologiques et physiologiques des souches isolées, nous pouvons conclure qu'il existe des différences remarquables entre les deux espèces. Le tableau suivant résume les caractères distinctifs principaux :

	AZOTOBACTER VINELANDII	AZOTOBACTER AGILIS
Dimensions des cellules	3,4 x 1,5 μ	3,3 x 2,8 μ
Mobilité	positive	positive
Formation de kystes	abondante	absence
Croissance sur mannitol 1 %	positive	négative
Croissance sur benzoate de soude à 1 %	positive	négative
Pigmentation	vert à brun	légèrement jaunâtre.

C H A P I T R E II

=====

ETUDE DE L'INFLUENCE DES MINERAUX SUR LA FIXATION

=====

DE L'AZOTE PAR LES AZOTOBACTER

=====

En examinant la bibliographie relative aux milieux de culture employés par les différents chercheurs pour la croissance des Azotobacter, nous constatons que ces milieux employés diffèrent beaucoup dans leur composition minérale.

Ainsi Winogradsky (62) et plus tard Pochon (64), utilisent surtout, aussi bien pour l'isolement que pour des études de croissance, la solution saline, mise au point par le premier. Cette solution est composée comme suit :

Phosphate monopotassique	.1 g	Sulfate de manganèse	0,01 g
Sulfate de magnésium	0,5 g	Sulfate ferrique	0,01 g
Chlorure de sodium	0,5 g	Eau du robinet	200 ml

Pour l'isolement des Azotobacter, ils ajoutent du carbonate de calcium.

L'école américaine utilise surtout, soit le milieu de Ashby (65), soit celui de Burk (65). Ces milieux sont constitués comme suit :

<u>Milieu de Ashby</u>		<u>Milieu de Burk</u>	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g	KH ₂ PO ₄	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g	K ₂ HPO ₄	0,8 g
NaCl	0,1 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
CaSO ₄ · 2 H ₂ O	0,1 g	CaSO ₄ · 2 H ₂ O	0,1 g
CaCO ₃	5,0 g	Mo, Fe ^(x)	1 ml
Eau distillée	1000 ml	Eau distillée	1000 ml

Par contre Allen (66) prescrit l'emploi du milieu suivant :

K ₂ HPO ₄	0,5 g	MnSO ₄ · 4 H ₂ O	trace
MgSO ₄	0,2 g	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	trace
NaCl	0,2 g	Eau distillée	1000 ml

(x) 1 ml d'une solution qui contient 1 mg Fe et 0,1 mg Mo.

Jensen (19) fait appel à une autre formule, mais dans tous ses travaux sur les Azotobacter on retrouve la même composition au point de vue des éléments. Cette composition est la suivante :

K_2HPO_4	1 g	$FeSO_4 \cdot 2 H_2O$	0,05 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,5 g	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05 g
$CaCl_2$	0,5 g	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0,005 g
$Na_2SO_4 \cdot 10 H_2O$	0,25 g	Eau distillée	1000 ml

Nous pouvons donc constater qu'il y a une assez nette différence dans la composition des milieux de culture utilisés par les chercheurs.

Green (49) a trouvé que les Azotobacter contiennent entre 4 et 8 % de cendres. Nous savons que les minéraux jouent un rôle très important et parfois très spécifique dans la physiologie de la cellule microbienne. Il est donc évident qu'il faut attacher une grande importance à la nutrition inorganique des Azotobacter. La vitesse rapide de multiplication de ces germes et leur intense capacité respiratoire exigent une connaissance approfondie de leur nécessités en éléments inorganiques.

Dans la molécule des enzymes contrôlant les mécanismes respiratoires entrent des minéraux. Le fer fait partie intégrale des cytochromes et cytochromes-oxydases dans la cellule microbienne. Le magnésium est un élément stimulateur pour la respiration cellulaire. Le phosphore est la clef de voûte de la structure, aussi bien pour les acides ribo-nucléiques du cytoplasme, que pour les acides desoxy-ribonucléiques qui constituent la partie essentielle des substances nucléaires.

Il nous semble donc d'un intérêt fondamental, avant d'entamer des études physiologiques compliquées, d'étudier l'influence directe des principaux minéraux sur la croissance des Azotobacter.

Or, la croissance des Azotobacter est facilement contrôlable. En absence d'azote atmosphérique, dans un milieu exempt d'azote combiné, aucune multiplication n'est possible pour ces germes. Dans un milieu nutritif aérobie, où les Azotobacter se sont multipliés, l'azote fixé est en relation directe avec leur vitesse de croissance. Le dosage de l'azote dans les milieux nutritifs exempts

d'azote combiné, ensemencés avec des Azotobacter, est en relation directe avec leur croissance.

Nous sommes donc préoccupé en premier lieu dans ce chapitre, d'étudier l'influence qu'exercerent certains cations sur la fixation de l'azote, donc sur la croissance des Azotobacter. Nous avons examiné plus spécialement, le rôle du phosphore, du calcium, du fer, du magnésium et du manganèse, dans des conditions bien déterminées, sur la fixation de l'azote par les Azotobacter.

INFLUENCE DU MANGANESE ET DU MAGNESIUM SUR LA FIXATION DE
=====

L'AZOTE PAR LES AZOTOBACTER
=====

Nombreux sont les auteurs qui se sont efforcés de préciser le rôle des différents cations, tel que le fer, le calcium, le magnésium, le cobalt, le cuivre, le molybdène, dans la fixation de l'azote par les Azotobacter.

L'étude bibliographique de Jensen (8) rassemble tous ces travaux.

En ce qui concerne plus spécialement le rôle du manganèse, les observations sont assez contradictoires. Nilson, Alm et Burström (67) ont observé, dans des expériences de longue durée (48 à 150 jours), que le magnésium peut être remplacé par le manganèse dans la croissance d'Azotobacter chroococcum. Dans une étude sur la décarboxylase de l'acétate oxalique, présent dans l'Azotobacter Vinelandii, Plaut et Larây (68) mentionnent que ce ferment est activé beaucoup plus par le manganèse, le cobalt et le zinc que par les ions de magnésium. De leur côté, Stone et Wilson (69) notent que le manganèse peut remplacer le magnésium dans l'oxydation du fumarate et du l-malate par des extraits d'Azotobacter Vinelandii. Par contre, Jensen (19) constate que le manganèse ne peut pas remplacer le magnésium dans la fixation de l'azote par Azotobacter chroococcum, même à une concentration de 40 ppm de sulfate de manganèse.

Nous avons étudié, dans des conditions bien déterminées, l'influence du manganèse sur la fixation de l'azote par différentes espèces d'Azotobacter.

1. METHODES ET CULTURES

Nous avons utilisé dans ces recherches les espèces suivantes:

Azotobacter chroococcum
Azotobacter Beijerinckii
Azotobacter Vinelandii
Azotobacter agilis

Les souches différentes ont été conservées par repiquage sur le milieu suivant :

K_2HPO_4	1 g	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,5 g	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0,005 g
$CaCl_2$	0,5 g	Mannitol	10,0 g
$Na_2SO_4 \cdot 10 H_2O$	0,25 g	Gélose	16,0 g
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,05 g	Eau distillée	1000 ml

Le pH du milieu était amené à 7,5. Pour les souches d'A. agilis le mannitol fut remplacé par le dextrose, puisque ces germes ne se développent pas sur le mannitol.

Avant de commencer les essais, toute la verrerie employée fut nettoyée d'abord à l'acide chromique, ensuite à l'acide nitrique bouillant. Après lavage à l'eau bidistillée, la verrerie était séchée et conservée à l'abri de la poussière.

Des solutions ont été préparées à partir de produits pro analyse Merck ou Analar. Les solutions suivantes préparées dans de l'eau bidistillée ont été employées :

$NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$	1 %	$Na_2SO_4 \cdot 10 H_2O$	0,25 %
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,5 %	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,05 %
$CaCl_2$	0,5 %	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0,005 %
KCl	0,5 %	Mannitol ou dextrose	10 %

Ces solutions ont été traitées par le charbon actif. Au moment de la préparation du milieu nutritif, les solutions sont diluées dix fois et mélangées. Ce milieu constitue le milieu liquide.

Des quantités croissantes d'une solution de $MnSO_4 \cdot H_2O$ sont ensuite ajoutées, de telle façon que finalement nous disposons de milieux de culture contenant respectivement: 0, 0,8, 1,6, 2,4, 3,2, 4,8, 6,4, 9,6, 12,8, 24 et 48 μg de Mn par ml.

50 ml de ^{ces} milieux de culture sont introduits dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml de volume et stérilisés à 115° C pendant 20 minutes. Le pH des milieux avant stérilisation fut amené à 7,5.

TABLEAU I.

=====

SOUCHE	mg d'Azote fixés par g de Mannitol					
	Mn en µg/ml					
	0	0,8	1,6	2,4	3,2	4,8
<u>A. chroococcum A-1</u>	11,5	12	12	12,5	12	12,5
<u>A. chroococcum A-2</u>	13,5	13	13,5	14	14	14
<u>A. chroococcum A-4</u>	13	13	13	13,5	13,5	13
<u>A. Beijerinckii B-1</u>	8	8	8	8	7,5	8
<u>A. Beijerinckii B-2</u>	16	16,5	17	17	16,5	16
<u>A. Beijerinckii B-3</u>	15	16	15	16	15,5	16
<u>A. Beijerinckii B-4</u>	14,5	15	14	14	14,5	14
<u>A. Vinelandii C-1</u>	18	18	18	18	18	18
<u>A. Vinelandii C-2</u>	13	13	12,5	13	13	13
<u>A. Vinelandii C-3</u>	12,5	12	12,5	12,5	12	12
<u>A. Vinelandii C-4</u>	15,5	15,5	15,5	16	16	16

	6,4	9,6	12,8	16	24	48
<u>A. chroococcum A-1</u>	11,5	12	12	11	12	12
<u>A. chroococcum A-2</u>	14	13	13,5	14	14	13,5
<u>A. chroococcum A-4</u>	13	13,5	13,5	13,5	14	14
<u>A. Beijerinckii B-1</u>	8	8	8	8	7,5	7,5
<u>A. Beijerinckii B-2</u>	16	15,5	16	16	16	16
<u>A. Beijerinckii B-3</u>	15,5	15,5	16,5	16	16	15,5
<u>A. Vinelandii C-1</u>	18	18	18	17,5	17,5	17,5
<u>A. Vinelandii C-2</u>	12,5	12,5	12,5	12	12,5	12,5
<u>A. Vinelandii C-3</u>	12	12,5	13	13	13	12
<u>A. Vinelandii C-4</u>	16	16	16	15	16	15

=====
 TABLEAU I (Suite)
 =====

SOUCHE	mg d'Azote fixés par g de Dextrose											
	Mn en µg/ml											
	0	0,8	1,6	2,4	3,2	4,8	6,4	9,6	12,8	16	24	40
<u>A. agillis</u> <u>D-1</u>	10,4	10,7	10,2	10	10,5	10,3	10,8	10	10,5	11	10	10
<u>A. agillis</u> <u>D-2</u>	6,7	7,4	7,2	6,5	7	6,3	7,5	6,4	6,8	7	6,4	7
<u>A. agillis</u> <u>D-3</u>	9	8,8	8,5	9	9,2	9,5	8,6	9	9,2	9	8,5	9

2. INFLUENCE DU MANGANESE SUR LA FIXATION TOTALE DE

L'AZOTE PAR LES AZOTOBACTER

Nous avons préparé l'inoculum de la façon suivante. Chaque souche d'Azotobacter était ensemencé dans le milieu liquide. L'analyse spectrophotographique (+) indiquait que le manganèse était totalement absent dans le milieu ainsi constitué. Après une incubation de 48 heures à 28° C, dans un appareil à secousses thermostatisé, la culture obtenue servait d'inoculum pour un deuxième Erlenmeyer. Cette opération était répétée trois fois. L'inoculum final ainsi préparé était dépourvu de toute trace de manganèse. L'analyse spectrographique ne pouvait déceler aucune trace de manganèse dans cette culture. Cinq gouttes de cet inoculum étaient alors introduites dans les fioles d'Erlenmeyer remplies de 50 ml de milieu nutritif liquide contenant les différentes concentrations de manganèse. Après 48 heures de culture, dans l'appareil à secousses thermostatisé à 28° C, la croissance des cultures était mesurée par le dosage de l'azote totale suivant la méthode micro-Kjeldahl de Parnasse.

Le Tableau I nous montre les résultats obtenus. L'azote trouvé est exprimé en mg par gramme de mannitol ou de dextrose.

Il ressort de ces résultats que dans ces milieux où tous les minéraux comme le calcium, le magnésium, le fer et le molybdène sont présents en quantités suffisantes, le manganèse ne joue aucun rôle stimulateur dans la fixation de l'azote par les différentes espèces d'Azotobacter. Aucune des espèces soumises à l'essai n'a besoin de la présence du manganèse pour atteindre une croissance optimale.

3. INFLUENCE DU MANGANESE SUR LA VITESSE DE CROISSANCE

DES AZOTOBACTER

Dans le but de nous rendre compte de l'influence du manganèse sur la vitesse de croissance des Azotobacter, nous avons suivi la

(+) Nous tenons à remercier le Professeur Dr. A. COTTENIE du Laboratoire de Chimie Analytique de l'Institut Agronomique Supérieur de Gand pour les analyses spectrographiques effectuées sur nos milieux de culture.

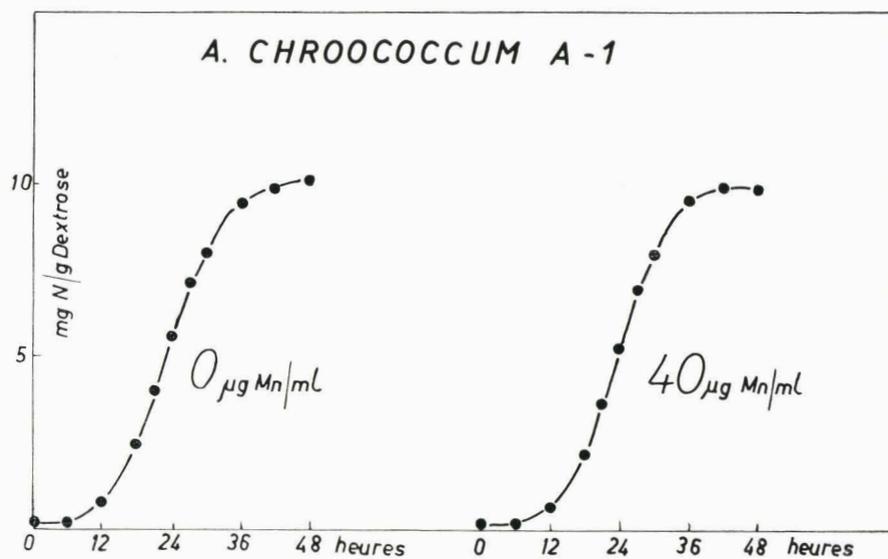


FIGURE 1

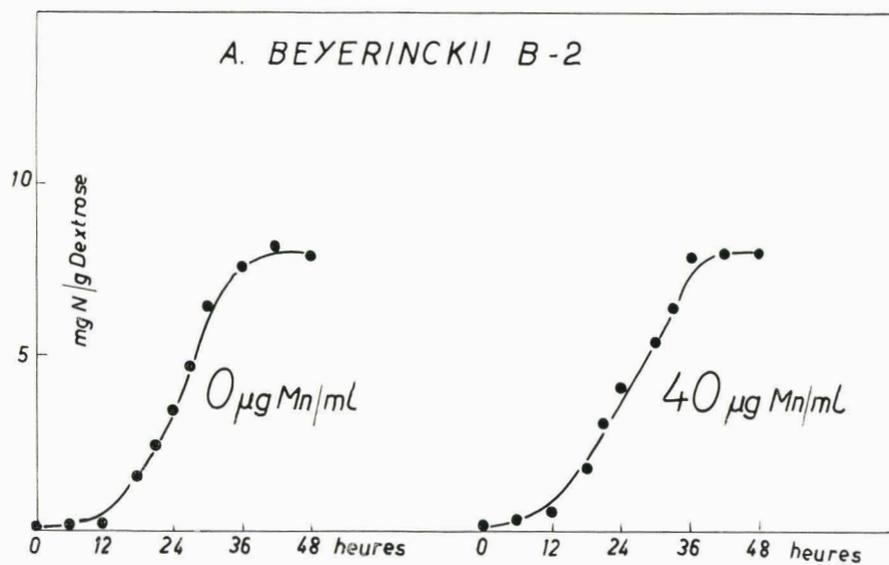


FIGURE 2

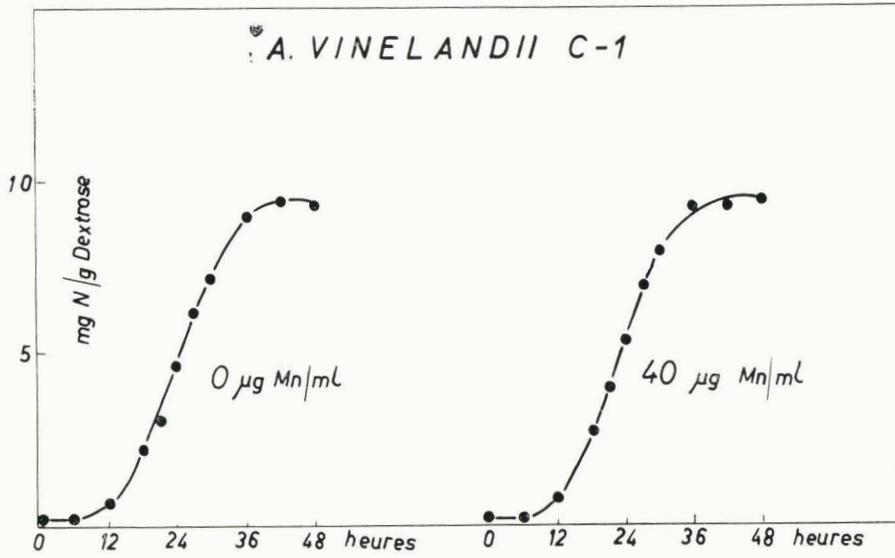


FIGURE 3

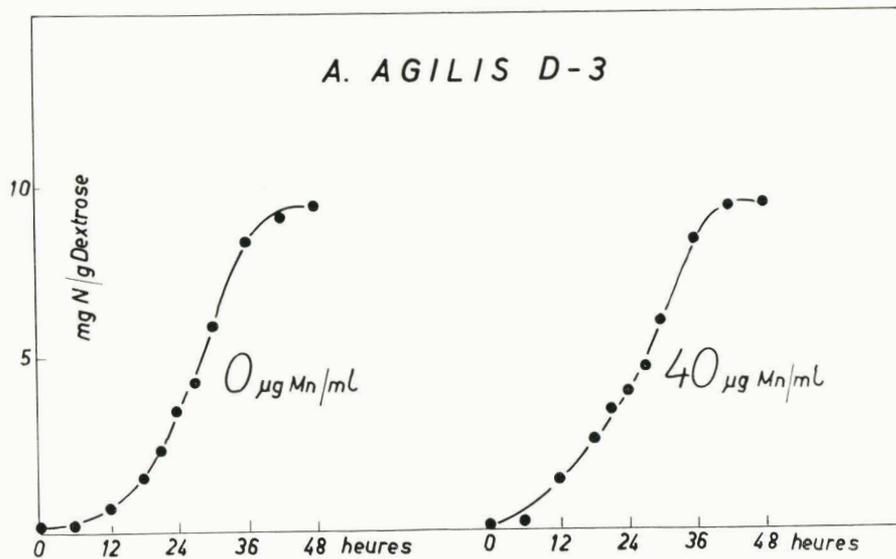


FIGURE 4

fixation d'azote périodiquement toutes les six heures pendant deux jours.

Nous avons utilisé quatre souches: A. chroococcum A-1; A. Beijerinckii B-2; A. Vinelandii C-1 et A. agilis D-3. Nous avons ensémené, comme décrit ci-devant, des milieux liquides contenant 0 ug et 40 ug de manganèse par ml. Les fioles d'Erlenmeyer ont été secouées à 28° C pendant 48 heures. La fixation d'azote est exprimée en mg d'azote par gramme de dextrose. Le dextrose était présent comme source énergétique pour les quatre souches. Les courbes de croissance obtenues sont représentées dans les figures 1, 2, 3 et 4.

Comme nous pouvons le constater, il n'y a pas de différence entre les courbes de croissance obtenues pour l'Azotobacter chroococcum sur les deux milieux contenant respectivement 0 ug et 40 ug de manganèse par ml. Le même phénomène se produit aussi bien pour l'A. Beijerinckii que pour l'A. Vinelandii et A. agilis.

Nous pouvons donc conclure de ces résultats que si le milieu contient suffisamment d'autres minéraux, tel que le calcium, le magnésium, le fer et le molybdène, le manganèse ne joue aucun rôle dans la vitesse de croissance des Azotobacter.

4. LE MANGANESE PEUT-IL REMPLACER LE MAGNESIUM DANS LA

FIXATION DE L'AZOTE PAR LES AZOTOBACTER ?

Avant de pouvoir répondre à cette question, nous avons d'abord examiné l'influence du magnésium sur la fixation d'azote par les Azotobacter.

Les souches examinées ont d'abord été cultivées sur le milieu liquide suivant :

NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	1 g	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g	KCl	0,5 g
CaCl ₂	0,5 g	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,005 g
Na ₂ SO ₄ · 10 H ₂ O	0,25 g	Dextrose	10 g
Eau bidistillée	1000 ml	pH = 7,5	

TABIEAU II.

Souches d'Azotobacter <u>chroococcum.</u>	mg d'Azote fixés par g de Dextrose Mg en μ g/ml.									
	0	5	10	15	20	30	40	50		
VT-1	0,3	1	2,6	8,5	15	16,5	17,2	16		
A-1	0,5	2	4,5	8,5	10	10,6	10,4	10,5		
A-2	0,5	1,4	5	11	12,5	13	13	13		
A-3	0,4	1,8	4	9,5	11,5	12	11,5	11		
A-4	0,5	1,6	7,5	14	15	15	15	15		
A-5	0,4	1,2	1,9	8	11,5	13	12,5	12,5		
A-6	0,6	1,4	6,0	11,5	13	14	14	15		
A-7	0,4	1,6	4,5	8,5	12,5	14	14,5	15		
A-8	0,4	1	1,5	6	14	15	16	16		
A-9	0,4	1	1,8	8	14,5	15,5	16	17		
A-10	0,6	1,2	2,4	9	15	15,5	16	16		

TABIEAU III.

Souches d'Azotobacter Beijerinckii.	mg d'Azote fixés par g de Dextrose Mg en μ g/ml.										
	0	1	2	4	6	8	10	20	30	40	50
B-1	0,6	4,6	6,6	8,2	10	10,8	11	10,8	11,4	11,2	11
B-2	0,2	3	4,5	6	7	7	8	8,5	8	7,8	8
B-3	0,6	4	6	8,5	10	10,5	11	11	10,4	10,8	10,8
B-4	0,6	5	7,6	9,8	10,4	12,5	13	12,6	12,4	12,6	12,8
B-5	0,4	3,6	5,5	7,5	8,7	9,2	9,4	9,3	9	9,2	9,4
B-6	0,6	4,5	6,5	9	10,5	11,5	11,8	12	11,4	11,6	11,8
B-7	0,6	3,6	5	7,3	8,2	8,7	9,2	9,2	8,6	8,8	9
B-8	0,6	4	5,7	8	9,1	9,8	10	9,6	9,8	10	9,8
B-9	0,4	3,5	4,8	6,6	7,7	8,3	8,6	9	8,6	8,4	8
B-10	0,6	3,2	4,5	6,3	7,4	7,9	8,2	7,8	8	8,2	7,8

TABIEAU IV.

Souches d'Azotobacter Vinelandii.	mg d'Azote fixés par g de Dextrose Mg-en μ g/ml.										
	0	0,6	1,25	2,5	3,75	5	7,5	10	15	20	50
C-1	0,4	1	5	7,4	8	8,4	9	9,4	9	9	9
C-2	0,6	0,8	4	8,2	8,3	7,9	8,4	8	8,2	8,4	8,6
C-3	0,4	0,8	3,6	7,2	8,4	8,8	9,6	9,6	10,2	10	10
C-4	0,4	1	4,2	9	10	10,6	11	11	10,8	10,6	10,6
C-5	0,3	-	-	4	-	10,5	-	13,5	13,3	13,6	13,3
KS-4	0,6	0,9	4,6	8,6	9,6	10,1	10,5	10,5	10,6	10,4	11

TABIEAU V.

Souches d'Azotobacter agilis.	mg d'Azote fixés par g de Dextrose Mg en μ g/ml.										
	0	1,25	2,5	3,75	5	7,5	10	20	30	40	50
D-1	0,6	4,8	6	7,2	8	8,2	8,2	9,1	10	10,4	10,7
D-2	0,7	3,5	5	5,2	5,7	5,9	6	6,4	6,7	7,4	7,4
D-3	0,7	4,3	5,8	6,5	7,5	7,5	7,7	9	8,8	9,5	9
D-4	0,6	5,4	6,7	7,2	7,6	8	8	9,3	9	9,6	9,6
D-5	0,6	5,3	6,1	7,5	8,4	8,4	8,4	9,6	9,7	9,8	10
D-6	0,4	5	5,9	6,8	7,6	8	8,4	8,8	8,6	8,4	8,8
D-7	0,6	4	5,6	7	7,9	8,4	8,5	8,8	8,4	9	9
D-8	0,4	5,6	7,8	7,8	9	9,6	9,2	9,8	10	9,6	10,4
D-9	0,5	3,8	5,4	6,6	7,8	8,4	9	8,4	9	8,6	9,6

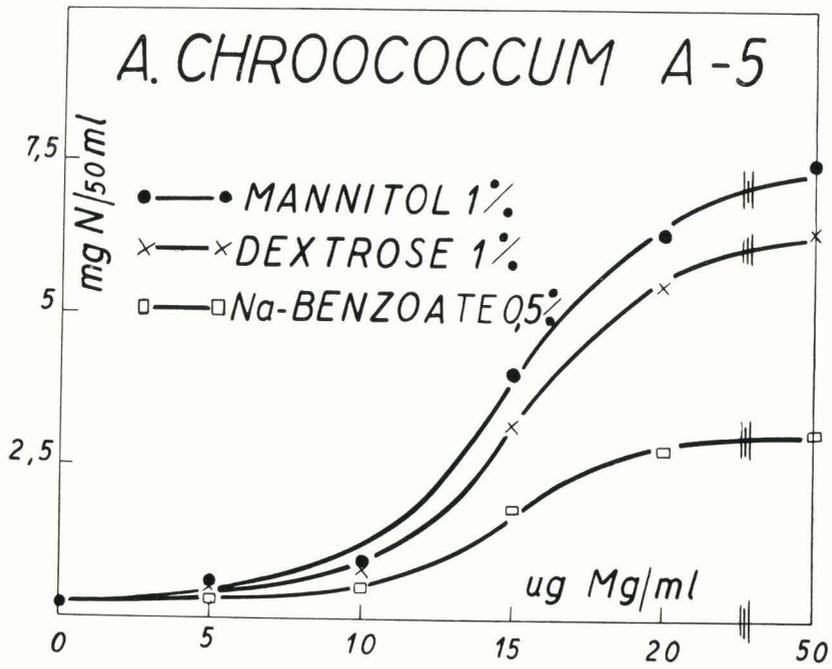


FIGURE 5

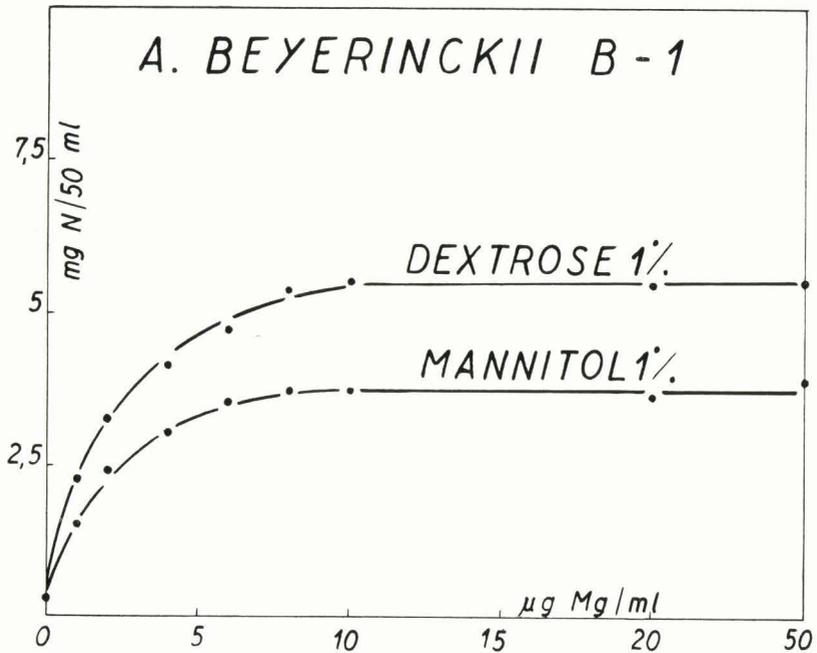


FIGURE 6

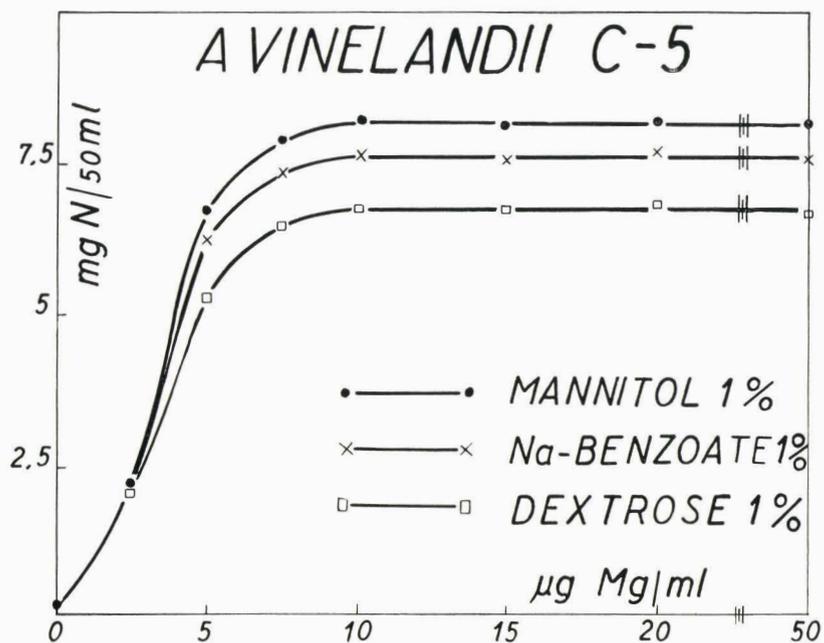


FIGURE 7

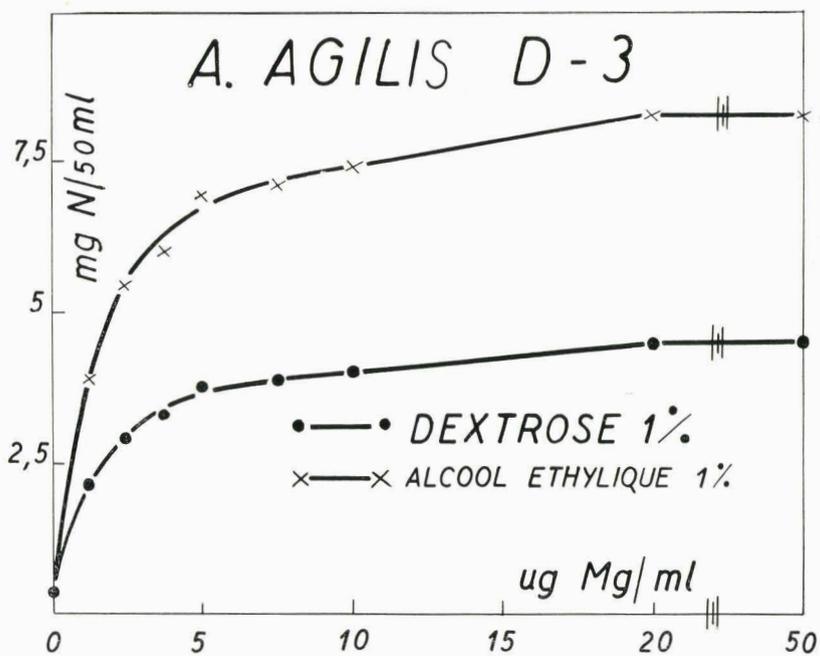


FIGURE 8

Le milieu était reparti dans les fioles d'Erlenmeyer. Après ensemencement et un séjour de 24 heures à 28° C dans un appareil à secousses thermostatisé, les cultures ont été centrifugées pendant 20 minutes à 6000 tours. Les cellules furent ensuite lavées deux fois aseptiquement à l'eau bidistillée et stérile. Finalement les cellules sont dispersées dans de l'eau bidistillée et stérile.

Des fioles d'Erlenmeyer contenant 50 ml du milieu nutritif liquide exempt de magnésium et d'autres fioles contenant le même milieu enrichi de quantités croissantes de sulfate de magnésium furent ensemencées avec 0,5 ml de la suspension microbienne préalablement préparée. Après 8 jours de culture à l'étuve à 28° C la croissance fut déterminée par le dosage de l'azote totale.

Nous avons ainsi examiné onze souches d'A. chroococcum, dix souches d'A. Beijerinckii, six souches d'A. Vinelandii, neuf souches d'A. agilis.

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux II, III, IV et V. La fixation d'azote est exprimée en mg par gramme de dextrose.

Nous donnons les résultats obtenus, avec les souches A. chroococcum A-5, A. Beijerinckii B-1, A. Vinelandii C-5 et A. agilis D-3, respectivement dans les figures 5, 6, 7 et 8.

Nous constatons que pour l'Azotobacter chroococcum, la croissance en fonction de la concentration de magnésium présente dans les milieux, suit une courbe sigmoïdale. Pour toutes les souches d'A. chroococcum examinées, la même forme de courbe fut obtenue. Tous les A. chroococcum exigent la présence dans le milieu nutritif de 20 à 30 µg de magnésium pour atteindre une croissance maximum. Des analyses quantitatives effectuées sur les milieux par la méthode de Luff-Schoorl (70), indiquaient que les cultures avaient épuisé le dextrose dès qu'il y avait 20 µg de magnésium par ml dans le milieu.

L'Azotobacter Beijerinckii ne nécessite que 8 - 10 µg de magnésium par ml dans le milieu pour atteindre sa croissance maximum.

Ces souches, malgré leur ressemblance morphologique avec l'A. chroococcum, exigent donc 2 à 3 fois moins de magnésium que les précédentes. Les dix souches A. Beijerinckii examinées manifestaient les mêmes exigences, c'est à dire entre 8 et 10 µg de magnésium par ml

Les courbes de croissance en fonction de la quantité de magnésium présente dans le milieu ont une forme parabolique en opposition avec celles obtenues pour les A. chroococcum.

Les A. Vinelandii et A. agilis montrent une fixation d'azote maximum en présence de 10 µg de magnésium par ml. Les six souches d'A. Vinelandii qui furent examinées, présentaient les mêmes caractères, ainsi que les neuf souches d'A. agilis.

Nous avons voulu savoir si les quatre espèces manifestaient les mêmes exigences envers le magnésium sur des milieux pourvus d'autres sources de carbone. Pour cela nous avons employé les mêmes techniques et les mêmes milieux de culture décrits ci-devant, mais nous avons remplacé le dextrose par le benzoate de soude et par le mannitol pour les A. chroococcum et A. Vinelandii et par l'alcool éthylique pour les A. agilis.

Les courbes obtenus sont représentées dans les figures 5, 6, 7 et 8. Nous pouvons conclure de ces résultats que la source de carbone ne joue pas de rôle dans les exigences des Azotobacter envers le magnésium. Les Azotobacter manifestent les mêmes nécessités pour le magnésium quelque soit la source d'énergie présente dans leur milieu de culture.

5. CONCLUSIONS

1° Nous avons déterminé dans des conditions strictement contrôlées, l'influence du manganèse sur la fixation de l'azote par les Azotobacter. Il ressort des résultats obtenus que le manganèse ne joue aucun rôle dans la fixation de l'azote par les Azotobacter.

Aucune des espèces étudiées n'est inhibée dans sa fixation d'azote par l'absence totale du manganèse.

2° Le magnésium est un élément d'une nécessité absolue pour les Azotobacter. Cette nécessité varie suivant les espèces. Les A. chroococcum exigent la présence dans leur milieu de 20 à 30 ppm de magnésium minéral, quelque soit la substance énergétique présente. Par contre, les A. Beijerinckii atteignent leur maximum de fixation d'azote avec seulement 8 à 10 ppm de magnésium minéral. Les A. Vinelandii et A. agilis présentent un

maximum de fixation d'azote avec 10 ppm de magnésium minéral dans le milieu nutritif.

3° Le manganèse n'a aucune valeur pour remplacer le magnésium dans la fixation d'azote par les Azotobacter.

Le manganèse peut donc être supprimé entièrement dans les milieux de culture pour les Azotobacter.

=====

INFLUENCE DU FER SUR LA FIXATION DE L'AZOTE PAR LES AZOTOBACTER
=====

De nombreuses recherches ont été effectuées pour déterminer l'influence du fer sur la croissance et le développement des microorganismes. Après le premier isolement des germes nitrificateurs par Winogradsky, lui-même communiquait que l'addition du sulfate ferreux au milieu de culture activait l'oxydation de l'ammoniaque en nitrites et des nitrites en nitrates. Plus tard Steinberg (71) et Roberg (72) trouvaient que l'Aspergillus sp. nécessitait 6 - 10 mg Fe/l pour une croissance optimum. Kingma Boltjes (73) et Hansk et Weintraub (74) prévoyaient 2 mg Fe/l dans leur milieu de culture pour le Nitrosomonas sp. Les études de Waring (75)(76) ont démontré que l'Aerobacter aerogenes, l'Aerobacter indologenes, le Klebsiella pneumoniae et l'Escherichia coli manifestaient une croissance optimum avec seulement 0,02 - 0,03 mg Fe/l. Par contre Young, Begg et Pentz (77) constataient que l'Escherichia coli demandait 0,5 - 1,4 mg Fe/l pour une croissance optimum dans un milieu où le magnésium était présent en quantité suffisante. Des suspensions microbiennes mixtes de la panse nécessitent d'après Mc Naught, Owen et Smith (78) 1 - 2 mg de Fe/l.

Dans une étude remarquable, Meiklejohn (79) constatait que l'oxydation de l'ammoniaque par Nitrosomonas europaea et l'oxydation de nitrites par Nitrobacter Winogradsky continuaient en milieu de culture préalablement traités par le 8-hydroxyquinoline. Ces milieux étaient donc exempt de toute trace de fer. La production de nitrites par Nitrobacter europaea était accélérée en présence de concentrations croissantes de fer. La quantité optimum de fer était de 6 mg Fe/l. La tolérance finale des deux germes se situait à 122 mg Fe/l. Dans un milieu contenant 500 mg Fe/l l'oxydation par Nitrobacter Winogradsky se ralentissait.

Plus spécialement en rapport avec les Azotobacter, nous citons les travaux de Burk, Lineweaver et Horner (80) et de Horner et Burk (81). Ils constataient que le fer présent sous forme de fer-humique était plus facilement assimilable que l'ion ferreux. La quantité de fer nécessaire pour une croissance optimum de l'Azotobacter atteignait 0,0004 - 0,01 millimol (0,02 - 0,5 ppm.)

Bortels (82) et Rippel (83) trouvaient par contre que 20 - 40 ppm de fer sont nécessaire pour une fixation optimum d'azote par Azotobacter.

En examinant ces différents résultats concernant l'influence du fer sur la croissance et la fixation de l'azote par les Azotobacter, on a l'impression que les différences obtenues lors des études mentionnées découlent du fait que les chercheurs ne contrôlaient pas rigoureusement les autres substances nutritives dans les milieux de culture.

Il nous semble nécessaire d'introduire dans les milieux de culture à chaque essai les sels minéraux nécessaires à des concentrations suffisantes en non-inhibitrices. Alors seulement il est possible de déterminer exactement l'influence d'un autre élément, comme le fer par exemple.

Le milieu de culture que nous avons employé contient suffisamment d'hydrate de carbone à côté de phosphore, de soufre, de potasse, de calcium et de magnésium. Les micro éléments comme le molybdène étaient également ajoutés dans leur concentrations optimum.

Nous n'avons pas ajouté de cuivre. En effet, Vulder (84) a démontré que cet élément n'est pas strictement nécessaire pour le développement des Azotobacter. Il signale que le cuivre stimule seulement la production des pigments de ces germes.

Le bore ne fut pas ajouté au milieu de culture. Lewis (85) a prouvé que cet élément n'a aucune influence sur la croissance des Azotobacter. Par contre Gerretsen (86) et plus tard Gerretsen et Hoop (87) ont constaté que le bore stimule la croissance des Azotobacter en milieu liquide à condition que les essais soient fait dans des vases en aluminium. La concentration en bore en milieu liquide serait de 2 mg B/l pour obtenir une multiplication et une fixation d'azote maximum. A 3 ppm le bore exerce une inhibition sur les Azotobacter. Vu la contradiction dans les résultats concernant l'influence du bore nous n'avons pas ajouté cet élément séparément dans notre milieu de culture. Puisque nous travaillons uniquement avec du matériel en verre le bore peut être présent dans le milieu de culture sous forme de traces.

Methodes

Cultures: Nous avons utilisé dans ces recherches:

A. chroococcum V.T.-1 et A. chroococcum A-1; également A. Vinelandii C-1 et A. Vinelandii KS-4. Cette dernière souche nous a été envoyée par P.W. Wilson (Université de Wisconsin, U.S.A)

Ces cultures ont été ensemencées et repiquées sur le milieu suivant:

K_2HPO_4	1,0 g	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,05 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,5 g	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0,005 g
$CaCl_2$	0,5 g	Na_2SO_4	0,25 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05 g	Mannitol	20 g
Eau distillée	1000 ml	pH = 7,5	

Les souches étaient cultivées à 28° C.

Milieu de culture: Toute la verrerie employée dans les expériences fut lavée avec de l'acide chromique chaud, puis bouillie avec de l'acide nitrique et ensuite lavée avec de l'eau bidistillée. Avant l'emploi, la verrerie était traitée à la vapeur d'eau bidistillée, et gardée à l'écart de la poussière.

Les solutions suivantes ont été préparées: dextrose 200 g/l; phosphate monopotassique 10 g/l; sulfate de soude 2,5 g/l; sulfate de magnésium 5 g/l; chlorure 5 g/l; sulfate de manganèse 0,5 g/l; molybdate de soude 0,05 g/l. Ces solutions étaient mélangées avec du charbon actif. Pour la composition des milieux nutritifs ces solutions étaient diluées dix fois et traitées au 8-hydroxyquinoline d'après la prescription de Waring et Werkman (75). Après avoir mélangé les solutions nous avons ajouté des quantités croissantes de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ de telle manière que les différents milieux contenaient respectivement 0, 1, 2, 5, 10, 20 et 50 μg Fe/ml. Les milieux étaient partagés en fioles d'Erlenmeyer de 250 ml de volume. Chaque Erlenmeyer contenait 50 ml de milieu liquide. Après une stérilisation à 120° C pendant 20 minutes chaque Erlenmeyer était ensemencé.

L'inoculum était préparé comme suit. Les cultures sur le milieu gélosé à base de mannitol étaient dispersées dans de l'eau bidistillée. Chaque culture était centrifugée et lavée aseptiquement deux fois dans de l'eau bidistillée et stérile. Finalement les

cellules étaient reprises dans de l'eau bidistillée et stérile. De cet inoculum deux gouttes étaient versées dans les différentes fioles d'Erlenmeyer. L'incubation des milieux se faisait à 28° C. Après 2, 5 et 7 jours de croissance nous avons déterminé dans chaque Erlenmeyer la quantité d'azote fixée par les Azotobacter, la quantité de dextrose utilisée par les germes, la quantité de fer assimilée par les germes.

L'azote total dans les milieux de culture fut déterminé par la méthode micro-Kjeldahl de Parnasse. L'azote était repris lors de la distillation dans de l'eau distillée et titré avec de l'acide sulfurique 0,01 N en présence de l'indicateur de Tashiro.

Le fer fut déterminé par colorimétrie avec de la ortho-phénantroline d'après la méthode de Toth, Prince, Wallace et Mikkelsen (88). Cette méthode peut être résumée comme suit. Nous avons employé le sel de Mohr pour constituer la courbe d'étalonnage. 0,280 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ sont dissout avec 4 ml de H_2SO_4 dans un ballon jaugé, avec de l'eau bidistillée, jusqu'à 200 ml. De cette solution type nous prenons exactement 10 ml et 4 ml d'acide sulfurique que nous diluons jusqu'à 200 ml avec de l'eau bidistillée. Cette dernière solution contient 10 ppm de Fe. Dans des ballons jaugés de 25 ml nous introduisons exactement: 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 2,5 - 3 - 3,5 - 4 - 4,5 et 5 ml de cette solution. Nous ajoutons:

0,5 ml d'une solution de $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ à 5 % dans de l'eau bidistillée + 1 ml d'une solution de O-phénantroline (0,2 % dans l'alcool éthylique à 25 %) + 3 ml d'acétate d'ammonium à 60 % dans de l'eau bidistillée.

Nous ajoutons de l'eau bidistillée jusqu'au trait. Après avoir bien mélangé le contenu des ballons, la coloration rouge est mesuré au spectrophotomètre de Coleman avec filtre jaune à 500 m μ . La courbe d'étalonnage est reproduite dans la figure 9.

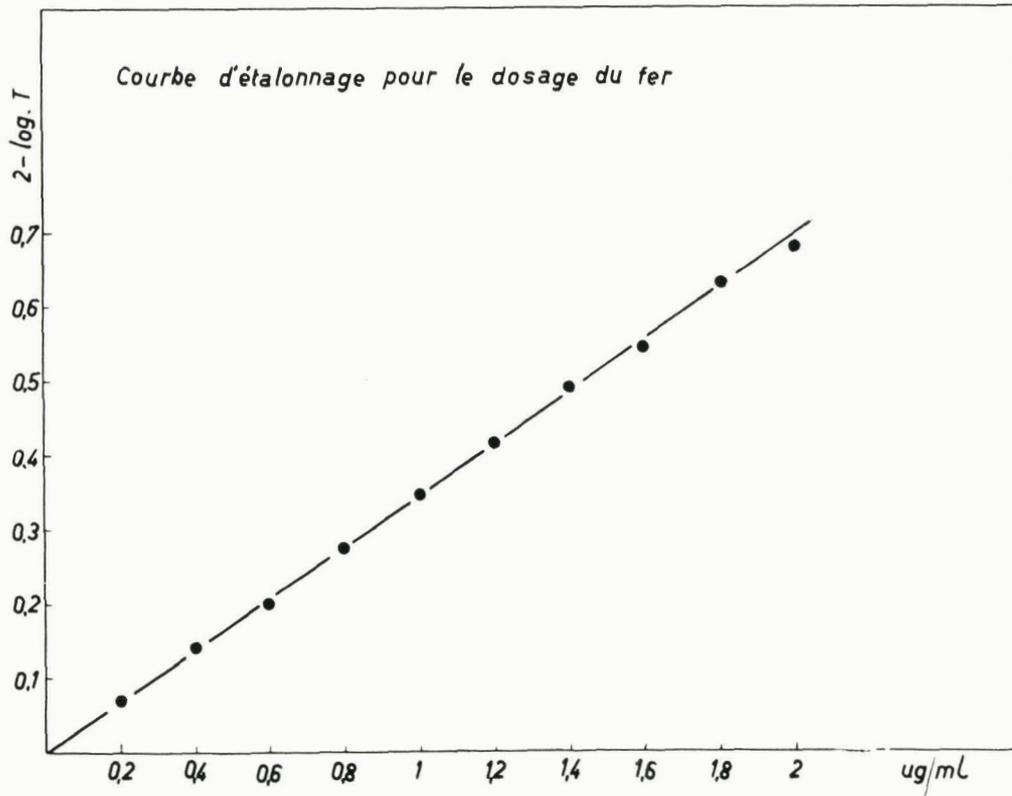


FIGURE 9

Les milieux de culture, avec et sans fer, sont troubles à cause de sels minéraux qui se sont précipités. Nous avons constaté que lorsqu'on soumet ces milieux de cultures à une centrifugation à 6000 tours/minute et qu'on fait un essai de recherche du fer, il n'y a pas moyen de mettre en évidence cet ion dans le "surnageant". Après différents essais avec des acides nous avons trouvé que 1 ml HNO_3 2N, ajouté à 50 ml de milieu, suffisait pour dissoudre complètement les sels minéraux précipités. De cette façon il nous a été possible de faire le dosage du fer dans ces milieux liquides.

Pour déterminer la quantité de fer enlevée par les germes du milieu nutritif, nous avons ajouté aux cultures après leur développement 1 ml HNO_3 2 N. Après dissolution des sels minéraux nous avons centrifugé à 4000 tours/minute pour précipiter les cellules microbiennes. Sur un aliquot du liquide surnageant, le fer encore présent, fut déterminé par voie colorimétrique.

En déterminant ainsi le fer avant et après la croissance des Azotobacter, il nous a été possible de connaître la quantité de cet élément métabolisé par ces germes;

Le dextrose fut dosé par la méthode iodométrique de Luff-Schoorl (70). Pour écarter l'influence que pourrait avoir les protéines des Azotobacter sur le dosage du dextrose, nous avons d'abord pratiqué sur les milieux de culture une défécation avec 20 ml de la solution défécante de Carrez. Après filtration et mise à volume, le dextrose pouvait être dosé quantitativement.

Résultats

Les résultats obtenus sont groupés pour l'Azotobacter chroococcum VT-1 dans le tableau I, pour l'A. chroococcum A-1 dans le tableau II pour l'A. Vinelandii C-1 dans le tableau III, pour l'A. Vinelandii KS-4 dans le tableau IV.

Puisque les solutions nutritives, pourvues des différentes concentrations de fer et de dextrose étaient constituées simultanément pour les trois périodes de culture, ces chiffres ne sont mentionnés qu'une seule fois dans les tableaux.

TABLEAU I

Temps de culture en jours	µg de Fer théoriquement présents 50 ml	µg de Fer dosés dans 50 ml	mg N dans 50 ml	mg Dextrose présents dans 50 ml	mg Dextrose métabolisés dans 50 ml	µg de Fer résorbés dans 50 ml
0	0	7,5	0,20	1005,0	0,0	0,0
	50	50,0	0,20	1043,0	0,0	0,0
	100	113,3	0,22	996,0	0,0	0,0
	250	250,0	0,21	1007,2	0,0	0,0
	500	554,2	0,20	987,7	0,0	0,0
	1000	850,0	0,21	994,8	0,0	0,0
	2500	2300,0	0,20	990,6	0,0	0,0
2			0,72		9,5	0,0
			2,24		229,8	20,1
			2,40		219,8	48,3
			2,64		195,8	50,0
			4,24		174,0	87,5
			4,00		118,4	137,5
			4,10		109,6	150,0
5			1,02		19,8	1,0
			6,20		1033,4	30,6
			8,16		827,0	75,0
			11,00		828,0	145,0
			14,00		808,0	304,0
			13,50		734,0	525,0
			13,60		724,2	550,0
7			1,24		20,9	2,0
			6,50		1043,0	32,0
			8,90		995,5	79,2
			12,75		1006,0	155,0
			16,10		987,0	312,6
			16,00		993,9	550,0
			15,50		990,1	575,0

TABLEAU II

Temps de culture en jours	µg de Fer théoriquement présents dans 50 ml	µg de Fer dosés dans 50 ml	mg N dans 50 ml	mg Dextrose présents dans 50 ml	mg Dextrose métabolisé dans 50 ml	µg de Fer résorbés dans 50 ml
0	0	10	0,13	1030,6	0,0	0,0
	50	56,6	0,15	1008,1	0,0	0,0
	100	100,6	0,14	1013,1	0,0	0,0
	250	249,0	0,16	1021,5	0,0	0,0
	500	487,5	0,12	1012,0	0,0	0,0
	1000	975,0	0,15	999,7	0,0	0,0
	2500	2250,0	0,14	997,4	0,0	0,0
2			0,30		5,7	0,0
			1,30		195,6	15,0
			3,40		190,7	35,0
			4,50		187,3	80,5
			4,70		178,7	145,0
			4,50		157,3	230,5
			4,40		145,2	245,0
5			0,55		21,0	0,0
			5,90		990,2	25,0
			7,30		903,2	62,5
			9,50		867,5	152,5
			9,60		843,2	275,0
			9,80		793,6	450,0
			9,80		774,8	475,0
7			0,70		21,2	1,3
			7,30		1007,5	33,5
			8,50		1013,0	71,5
			10,50		1020,9	189,4
			10,20		1011,2	312,5
			10,90		999,0	500,0
			10,80		997,3	525,0

TABLEAU III

Temps de culture en jours	ug de Fer théorique-ment présents dans 50 ml	ug de Fer dosés dans 50 ml	mg N dans 50 ml	mg Dextrose présents dans 50 ml	mg Dextrose métabolisés dans 50 ml	ug de Fer résorbés dans 50 ml
0	0,0	8,1	0,13	992,4	0,0	0,0
	50,0	50,0	0,15	998,6	0,0	0,0
	100,0	96,0	0,14	1000,5	0,0	0,0
	250,0	230,0	0,15	996,7	0,0	0,0
	500,0	463,0	0,13	993,5	0,0	0,0
	1000,0	928,0	0,15	1005,3	0,0	0,0
	2500,0	2295,0	0,14	1002,0	0,0	0,0
2			0,35		6,3	0,0
			1,60		190,7	8,0
			2,30		191,3	16,0
			3,60		190,1	48,0
			4,00		189,6	80,1
			3,90		188,3	130,0
			2,60		178,6	140,0
5			0,80		19,5	2,0
			3,70		980,4	20,2
			4,80		973,4	35,0
			6,80		970,6	90,4
			7,20		956,8	160,0
			6,80		948,6	260,0
			5,90		940,7	270,0
7			1,30		20,7	3,0
			4,30		998,3	25,2
			5,30		1000,1	50,0
			7,40		996,2	109,4
			8,10		993,1	182,0
			7,80		1004,4	286,0
			6,60		1002,0	296,0

TABLEAU IV

Temps de culture en jours	ug de Fer théoriquement présent dans 50 ml	ug de Fer dosés dans 50 ml	mg N dans 50 ml.	mg Dextrose présents dans 50 ml	mg Dextrose métabolisés dans 50 ml	ug de Fer résorbés dans 50 ml
0	0	9,3	0,20	995,2	0,0	0,0
	50	56,9	0,21	983,5	0,0	0,0
	100	103,0	0,19	1000,9	0,0	0,0
	250	254,8	0,20	1013,7	0,0	0,0
	500	493,8	0,22	1013,4	0,0	0,0
	1000	975,0	0,20	1019,4	0,0	0,0
	2500	2425,0	0,18	968,5	0,0	0,0
2			0,30		5,3	0,0
			1,60		200,5	10,0
			2,40		198,6	20,0
			3,50		197,3	51,0
			3,60		196,4	110,0
			3,40		194,3	150,0
			3,10		183,2	170,0
5			0,40		19,5	0,0
			5,30		970,4	25,0
			7,70		963,7	40,0
			8,30		960,8	120,0
			8,20		955,7	209,5
			8,25		949,2	293,5
			7,90		943,3	310,0
7			0,57		20,8	1,5
			6,90		983,1	25,0
			9,45		1000,7	70,0
			10,15		1012,2	153,8
			10,30		1013,4	284,4
			10,55		1019,4	381,3
			9,80		968,5	400,0

Azotobacter chroococcum

Il ressort des résultats concernant la fixation de l'azote (colonne 4) que la souche VT-1 possède un pouvoir d'utilisation plus prononcé du dextrose que la souche A-1. La quantité maximum d'azote fixée est respectivement 16 et 11 mg N/gramme de dextrose.

Jusqu'à un certain taux, la fixation d'azote est fonction de la quantité de fer présente dans le milieu. La fixation d'azote augmente avec des quantités croissantes de fer et atteint son maximum lorsque 10 - 20 μ g de fer par ml sont présents dans le milieu nutritif. La concentration de 10 μ g de fer par ml, donc par 20 mg de dextrose, représente un minimum pour obtenir une fixation optimum, dans les conditions données. Les concentrations de fer supérieures à 20 μ g par ml n'exercent aucune inhibition sur la fixation de l'azote.

Le dosage du dextrose utilisé (colonne 6) indique que cet hydrate de carbone est assimilé complètement après 7 jours de culture, en présence de 1 μ g de fer par ml, donc par 20 mg de dextrose. Cette concentration est déjà suffisante pour la dégradation complète du dextrose.

La résorption du fer par les cultures, atteint également son maximum après 7 jours de culture. La fixation de l'azote et la résorption du fer suivent le même cours. Remarquons toutefois que l'assimilation du fer atteint son maximum à 20 μ g de Fe/ml. Environ 25 % de la quantité de fer présente sont resorbés par les A. chroococcum après 7 jours de croissance dans un milieu contenant 50 μ g de Fe/ml.

Azotobacter Vinelandii

Dans les conditions créées, les deux souches examinées, présentent une fixation d'azote en fonction de la concentration en fer. La fixation d'azote atteint son maximum avec 10 à 20 μ g de Fe par ml de milieu de culture. Une légère inhibition dans la fixation de l'azote se fait sentir avec des quantités de fer plus grandes dans le milieu. Les A. Vinelandii nous semblent sensible à des concentration trop élevées en fer.

La consommation du dextrose est complète à partir de 1 μ g de Fe/ml de culture. La quantité de fer résorbée par les A. Vinelandii n'atteint que 15 % environ de la totalité présente, après 7 jours

de croissance.

Conclusions

Nous remarquons que les quatres souches examinées exigent un minimum de 10 μ g de fer par ml de culture, donc 500 ug de fer par gramme de dextrose pour atteindre une fixation d'azote maximum. Cette quantité est relativement grande en comparaison avec les exigences d'autres microorganismes. Remarquons toutefois que les A. chroococcum présentent sous des conditions normales de croissance une valeur Q_{O_2} d'environ 2000. Lineweaver (89) signale que cette valeur peut aller jusqu'à 4000 pour les A. Vinelandii. L'intensité respiratoire des microbes est en rapport direct avec la quantité de cytochrome et de cytochrome-oxydase dans la cellule. Il nous paraît logique alors, que les Azotobacter présentent un si grand besoin de fer.

La quantité de fer, nécessaire pour atteindre une fixation d'azote maximum est considérablement plus grande que celle nécessaire pour l'assimilation du dextrose présent dans le milieu. Il nous semble donc que le fer est utilisé par les Azotobacter non seulement pour effectuer leur respiration, mais également pour fixer de l'azote atmosphérique.

=====

INFLUENCE DU CALCIUM SUR LA FIXATION DE L'AZOTE PAR

LES AZOTOBACTER

Les premières recherches concernant les besoins en calcium des Azotobacter ont été effectuées par Krzemieniewska (90) en 1910. Ce chercheur a trouvé que les A. chroococcum nécessitent 0,36 mg de calcium, comme $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, par gramme de glucose en présence d'acides humiques. Ces résultats ont été confirmés par Schröder (91). Plus tard Deposito et ses collaborateurs (92) ont trouvé que le calcium n'était pas nécessaire pour une fixation d'azote normale en présence d'azote combiné sous forme de nitrates ou d'ammoniaque.

Burk et Horner (93)(94) indiquaient, dans leur première publication qu'en présence d'azote combiné, le calcium ne joue aucun rôle dans la fixation de l'azote par les Azotobacter. Dans leur deuxième rapport ils ont dû reviser leur première opinion et ils prétendent que le calcium est un élément essentiel dans toute circonstance de croissance des Azotobacter.

En raison des grandes divergences concernant l'influence des ions calcium, nous avons fait des essais suivants :

Les solutions suivantes ont été préparées: dextrose 200 g/l; phosphate monopotassique 10 g/l; sulfate de soude 2,5 g/l; sulfate de magnésium 5 g/l; sulfate de manganèse 0,5 g/l; molybdate de soude 0,05 g/l; sulfate ferreux 0,5 g/l.

Ces solutions étaient préparées dans de l'eau bidistillée. Les solutions sont mélangées avec du charbon actif. 50 ml de chaque solution sont transvasés dans des ballons jaugés de 500 ml.

Ensuite une quantité exacte de chlorure de calcium anhydre fut ajoutée dans chaque ballon. En opérant ainsi nous avons constitué des milieux nutritifs contenant les concentrations suivantes en μg de calcium par ml: 0,0 - 3,61 - 7,22 - 10,83 - 14,44 - 18,05 - 36,10 - 90,25 et 180,50.

50 ml de chaque milieu sont ensuite stérilisés dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml de volume à 120° C pendant 20 minutes. Chaque Erlenmeyer estensemencé avec deux gouttes d'une suspension d'Azotobacter dans de l'eau bidistillée, préparée à partir d'une

TABLEAU I

Azotobacter chroococcum A-2

$\mu\text{g Ca/ml}$	mg d'azote fixés dans 50 ml	mg de C présents dans 50 ml	mg de C retrouvés dans 50 ml	mg de C métabolisés dans 50 ml	% de C métabolisé
0,00	1,8	401,3	360,0	41,3	10,04
3,61	4,5	401,3	142,5	258,8	64,50
7,22	8,8	405,0	37,5	367,5	90,74
10,83	13,5	401,0	26,3	374,7	93,44
14,44	13,7	405,0	15,8	398,2	96,10
18,05	---	---	---	---	---
36,10	13,8	402,8	24,8	378,0	93,8
90,25	12,7	397,5	28,0	369,5	92,95
180,50	10,9	412,5	50,3	362,2	87,80

Azotobacter Beijerinckii B-2

$\mu\text{g Ca/ml}$	mg d'azote fixés dans 50 ml	mg de C présents dans 50 ml	mg de C retrouvés dans 50 ml	mg de C métabolisés dans 50 ml	% de C métabolisé
0,00	0,8	357,0	348,8	6,2	8,2
3,61	1,0	414,8	219,8	195,0	53,0
7,22	1,7	401,3	59,0	342,3	85,3
10,83	2,6	412,5	6,3	406,2	96,5
14,44	5,5	397,5	5,2	392,3	98,7
18,05	6,5	414,8	5,3	409,5	98,7
36,10	8,8	423,8	5,4	418,4	98,7
90,25	7,0	397,5	16,3	381,2	95,9
180,50	6,5	403,2	20,7	382,5	94,9

Azotobacter Vinelandii C-1

$\mu\text{g Ca/ml}$	mg d'azote fixés dans 50 ml	mg de C présents dans 50 ml	mg de C retrouvés dans 50 ml	mg de C métabolisés dans 50 ml	% de C métabolisé
0,00	8,0	408,3	20,5	37,8	95,0
3,61	9,0	417,0	14,6	402,4	96,5
7,22	9,4	404,5	11,3	393,2	97,2
10,83	9,4	412,2	7,6	404,6	98,2
14,44	9,6	420,0	6,3	413,7	98,5
18,05	9,5	409,0	6,6	402,4	98,4
36,10	9,2	415,5	10,4	405,1	97,5
90,25	9,2	404,0	12,2	391,8	97,0
180,50	8,7	400,5	12,5	388,0	96,9

Azotobacter agilis D-4

$\mu\text{g Ca/ml}$	mg d'azote fixés dans 50 ml	mg de C présents dans 50 ml	mg de C retrouvés dans 50 ml	mg de C métabolisés dans 50 ml	% de C métabolisé
0,00	8,5	402,6	25,1	377,5	93,8
3,61	9,5	400,9	13,8	387,1	96,8
7,22	10,2	402,1	9,7	392,4	97,6
10,83	10,4	401,7	5,3	396,4	98,6
14,44	10,5	401,1	4,8	396,3	98,8
18,05	10,0	402,6	5,0	397,6	98,8
36,10	9,7	398,7	8,9	389,8	97,8
90,25	9,8	402,0	11,1	390,9	97,2
180,50	9,5	400,2	11,5	388,7	97,1

culture inclinée sur gélose-mannitol.

Après 9 jours de culture à 28° C, les dosages d'azote dans les cultures sont effectués comme il est décrit précédemment. Les dosages de carbone dans les milieux ont été faits, après centrifugation des cultures à 6000 tours/minute, sur un aliquot de 10 ml.

Les tableaux I et II nous montrent les résultats obtenus avec A. chroococcum A-2, A. Beijerinckii B-2, A. Vinelandii C-1 et A. agilis D-4.

Nous constatons que les A. chroococcum ont absolument besoin de la présence du calcium pour atteindre leur maximum de fixation d'azote. La concentration en calcium nécessaire à cet effet est de 15 µg de calcium par gramme de dextrose.

Pour les A. Beijerinckii la concentration en calcium nécessaire pour une fixation d'azote maximum est de 36 µg de calcium par gramme de dextrose.

Les A. Vinelandii et A. agilis ne sont pas aussi sensibles à la présence du calcium. D'après nos essais leur besoins se chiffrent à environ 7 µg de Ca par gramme de dextrose.

L'évolution du carbone métabolisé suit de très près la fixation de l'azote en fonction des quantités de calcium présentes dans les milieux.

Pendant cette étude sur les besoins en calcium des Azotobacter nous avons eu connaissance des publications de Norris et Jensen (95)(96). Ces auteurs ont constaté, qu'en absence d'azote combiné le calcium est un élément essentiel pour les A. Vinelandii, A. chroococcum et A. Beijerinckii. Le calcium n'est pas essentiel pour les A. agilis. Pour ce germe la présence du calcium exerce un effet stimulateur.

Il nous semble que nos résultats s'accordent assez bien avec ceux publiés par Norris et Jensen.

Nous pouvons donc conclure:

- 1° - Le calcium est un élément essentiel pour les quatre espèces d'Azotobacter examinés.
- 2° - La concentration minimum pour obtenir une fixation d'azote maximum pour les quatre espèces s'élève à 36 µg de Ca par gramme de dextrose ou 100 µg de CaCl₂ par gramme de dextrose.

INFLUENCE DU PHOSPHORE SUR LA FIXATION DE L'AZOTE PAR

LES AZOTOBACTER

De nombreuses recherches sur la composition chimique des bactéries témoignent de la présence de quantités relativement élevées de phosphore dans la cellule microbienne. Ainsi, Wade (97) signale qu'il existe de grandes fluctuations dans la teneur de phosphore d'Escherichia coli pendant le cycle de croissance. D'après cet auteur, la concentration de phosphore cellulaire augmente très vite pendant le phase de latence jusqu'à un point qui correspond à la moitié de la première génération. La concentration en phosphore diminue jusqu'à la fin de cette génération et augmente à nouveau après. Toujours d'après Wade, les différentes concentrations en acide ribonucléique seraient à la base de ces fluctuations.

Une recherche très approfondie sur le métabolisme du phosphore fut effectuée par Mitchell et ses collaborateurs (98) à l'aide de phosphore radioactif. D'après Mitchell on peut considérer quatre substances cellulaires dans lesquelles le phosphore est intégré: les phospho-lipides, les acides desoxyribonucléiques, les acides ribonucléiques et les complexes phospho-glycéro-protéines. Elles ont également été trouvées par Katchman et Fetty (99) dans Saccharomyces cerevisiae.

Pochon (100) signale qu'on a pu calculer que pour fixer 5 mg d'azote les Azotobacter métaboliseraient 1 mg de phosphore. Jensen (8) relate que d'après Kremieniewska, en présence d'acide humique les A. chroococcum exigent 2,46 mg de P par gramme de glucose. Dans ses propres recherches, Jensen (19) a établi que 4,45 mg de phosphore sont nécessaires pour une fixation optimum d'azote par l'A. chroococcum.

Nous avons voulu connaître les besoins en phosphore des quatres espèces Azotobacter.

Les essais ont été entrepris de la façon suivante. Des solutions ont été préparées avec de l'eau bidistillée: dextrose 10 % ; sulfate de magnésium 0,5 % ; chlorure de calcium 0,5 % ; sulfate de sodium 0,25 % ; sulfate ferreux 0,05 % ; sulfate de manganèse 0,05 % ; molybdate de sodium 0,005 %. 50 ml de chaque solution sont transvasés dans des ballons jaugés de 500 ml. Ensuite des concentrations croissantes d'une solution de phosphate bipotassique ont été ajoutées. Les concentrations finales en phosphate bipotassique dans les milieux nutritifs étaient de 10 - 50 - 100 - 200 - 300 - 500 - 800 et 1000 μg de $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{ml}$. Avant de remplir jusqu'au trait avec de l'eau bidistillée, le pH de chaque milieu était amené à 7,5. Des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml de volume garnies de 50 ml des différentes solutions nutritives. Après stérilisation à 120° C pendant 15 minutes on passe à l'ensemencement. Des cultures jeunes de 48 heures sur "gélose-mannitol" étaient mises en suspension dans de l'eau stérile et bidistillée. Après une période de croissance de 9 jours à 28° C, la fixation de l'azote fut déterminée quantitativement par la méthode de micro-Kjeldahl, précédemment décrite.

Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau suivant.

Souches	mg d'azote fixés par gramme de dextrose μg $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{ml}$							
	10	50	100	200	300	500	800	1000
<u>A. chroococcum</u> A-7	0,1	3,4	7,2	11,3	13,0	13,5	13,8	14,0
<u>A. Beijerinckii</u> B-3	0,1	3,0	6,8	9,6	10,0	10,0	10,4	10,4
<u>A. Vinelandii</u> KS-4	0,7	2,1	6,1	9,5	10,5	10,8	10,8	11,0
<u>A. agilis</u> D-4	0,6	3,4	7,0	8,5	9,4	10,0	10,0	9,8

Nous pouvons donc conclure de ces résultats que les quatre espèces soumises à l'essai nécessitent la présence dans leur milieu de culture, en absence d'azote combiné, d'un minimum de 30 mg de K_2HPO_4 par gramme de dextrose ou de 4,5 mg de P par gramme de dextrose.

RESUME DU CHAPITRE II

=====

En raison des résultats obtenus lors des essais sur les besoins en élément minéraux des Azotobacter, nous pouvons donner les conclusions générales suivantes:

- 1° - Dans un milieu nutritif, exempt d'azote combiné, les Azotobacter exigent, pour fixer un maximum d'azote atmosphérique, 4,5 mg de phosphore ou 30 mg de K_2HPO_4 par gramme de dextrose métabolisé.
- 2° - Dans un milieu nutritif, exempt d'azote combiné, les Azotobacter exigent, pour fixer un maximum d'azote atmosphérique, 0,3 mg de magnésium ou 3,1 mg de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ par gramme de dextrose métabolisé.
- 3° - Dans un milieu nutritif, exempt d'azote combiné, les Azotobacter exigent, pour fixer un maximum d'azote atmosphérique, 0,5 mg de fer ou 1,6_{mg} de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ par gramme de dextrose métabolisé.
- 4° - Dans un milieu nutritif, exempt d'azote combiné, les Azotobacter exigent, pour fixer un maximum d'azote atmosphérique, 0,036 mg de calcium ou 0,10 mg de $CaCl_2$ par gramme de dextrose métabolisé.
- 5° - Dans un milieu nutritif, exempt d'azote combiné, les Azotobacter n'exigent pas la présence de la moindre trace de manganèse et cet élément est incapable de remplacer le magnésium dans la fixation d'azote.

=====

ADDENDUM AU CHAPITRE II

=====

Après avoir déterminé les quantités minimum des différents minéraux, nécessaires à une fixation optimum de l'azote par les Azotobacter, nous avons constitué des milieux de culture contenant différentes concentrations de chaque élément minéral.

Les milieux suivants ont été constitués:

	Grammes par litre				
	1	2	3	4	5
K ₂ HPO ₄	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
CaCl ₂	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2	0,05	0,1	0,2	0,2
Na ₂ SO ₄ · 10 H ₂ O	0,05	0,05	0,1	0,05	0,2
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Dextrose	10	10	10	10	10

Le pH de tous les milieux était amené à 7,5.

50 ml furent stérilisés en fioles d'Erlenmeyer de 250 ml. L'ensemencement fut effectué avec deux gouttes d'une suspension microbienne dans de l'eau stérile. Après une culture de 8 jours à 28° C l'azote total fixé dans 50 ml était déterminé par la méthode du micro-Kjeldahl. Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

	mg d'azote fixés dans 50 ml				
	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3	Milieu 4	Milieu 5
<u>A. chroococcum</u> V.T.-1	5,3	2,6	6,7	2,8	8,4
<u>A. Beijerinckii</u> B-2	2,8	1,3	3,2	1,5	4,2
<u>A. Vinelandii</u> C-1	2,2	1,2	2,9	1,5	4,5
<u>A. agilis</u> D-3	2,5	1,8	3,4	2,2	4,7

Nous pouvons donc constater que le milieu qui permet la plus grande fixation d'azote est le milieu n° 5. Il comprend:

K_2HPO_4	0,3 g.	par litre
$CaCl_2$	0,1 g	"
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g	"
$Na_2SO_4 \cdot 10 H_2O$	0,2 g	"
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,02 g	"
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0,005 g	"

Les quantités d'azote fixées par les différentes souches correspondent exactement à celles trouvées avec le milieu utilisé primitivement. Ces quantités sont les maxima possibles avec ces souches.

En examinant les constituants de ce milieu nous remarquons qu'il contient 0,3 g de phosphate dipotassique. Cette quantité correspond avec celle qui constitue la quantité minimum. La quantité de 0,1 g de chlorure de calcium égale aussi la quantité minimum. Par contre 0,2 g de sulfate de magnésium sont nécessaires au lieu de 0,031 g, déterminés comme quantité minimum. Les autres concentrations en sulfate ferreux, sulfate de soude et molybdate de soude correspondent au besoins minimum.

Cette différence dans les besoins de magnésium est bien caractéristique. Dans les expériences décrites dans le chapitre II, nous avons toujours déterminé l'influence d'un élément en présence d'un excès d'autres minéraux, entr'autre en présence de 1 gramme de phosphate dipotassique. Nous pouvons donc déduire que ces excès d'autres minéraux influencent la détermination exacte de la concentration minimum d'un élément dans un milieu composé. Ceci serait plus spécialement le cas pour le magnésium.

Il existe donc une interaction déterminante entre les concentrations des différents éléments. Cette interaction n'est pas exactement décelable dans les expériences séparées. Après avoir déterminé les concentrations minimum, il faut examiner l'influence qu'exercent ces quantités minimum entre elles.

Le milieu mentionné ci-dessus fut utilisé dans toutes les expériences qui suivent.

=====

C H A P I T R E III

=====

ETUDE DE LA NUTRITION CARBONÉE DES AZOTOBACTER

=====

Après avoir étudié l'influence des principaux minéraux sur la fixation de l'azote par les Azotobacter, il nous semble logique de nous occuper maintenant de la nutrition carbonée de ces micro-organismes.

Nous savons que les Azotobacter sont capables d'utiliser un grand nombre de produits organiques comme sources d'énergie. D'après Pochon (101) il est possible, avec la technique des cultures spontanées sur terre, de classer les aliments carbonés en trois catégories : les substances organiques peuvent exercer une influence très favorable, peu favorable ou négative sur la croissance des colonies d'Azotobacter. Cette classification des aliments peut se faire comme suit:

<u>Très favorables</u>	<u>Peu favorables</u>	<u>Inutilisables</u>
Hexoses	Pentoses	Acide formique
Ethanol	Lactose	Acide acétique
Mannitol	Butanol	Acide propionique
Acide benzoïque		Acide butyrique
Acide pyruvique		Acide tartrique
Acide litrique		Acide succinique
		Acide lactique
		Acide salicylique
		Phénol

Par contre quand on fait une étude en utilisant les plaques de silico-gel, imprégnées d'une seule substance énergétique, ensemencées avec des grains de terre, on obtient les résultats suivants donnés par ordre de préférence:

Sucres: Hexoses: glucose, galactose, lévulose

Pentoses: xylose, arabinose

Bioses: maltose, saccharose, lactose

Polyoses: inuline, amidon, dextrine

Alcools: méthylique (non utilisable), éthylique, butylique, glycérine, dulcité, mannite

Sels d'acides volatils: formique, acétique, propionique, butyrique, valérianique (non utilisable), caproïque

Sels d'acides fixes: lactique, malique, succinique, malonique, mucique, citrique, fumarique, glycolique, benzoïque, tartrique, oxalique, pyruvique

Phénols: Acide salicylique, phénol (non utilisable)

Substances humiques: résultats variables suivant le mode de préparation.

Cellulose; Oxycellulose: elles ne sont pas utilisables directement par les Azotobacter, mais seulement après action des bactéries cellulolytiques.

D'après Pochon, la différence dans l'utilisation des substances énergétiques par les Azotobacter, suivant les deux méthodes, est un fait curieux et paradoxal. La terre aurait un véritable pouvoir inhibiteur sur l'utilisation des acides par les Azotobacter, tout au moins en présence des autres germes du sol.

Nous devons en effet nous rendre compte que dans toute terre, les Azotobacter sont entourés d'une flore microbienne hétérotrophe (organotrophique). En présence de résidus végétaux contenant de petites quantités d'azote les germes organotrophiques offrent une forte prolifération. Les composés organiques sont dégradés avec formation d'hexosanes, alcools, acides et gaz.

C'est pour cette raison que Winogradsky et Pochon pensent que les Azotobacter ne sont jamais en présence dans le sol, de substances telles que les hexoses, les pentoses, les bioses. Ces substances sont métabolisées par les germes organotrophiques aussi longtemps qu'ils peuvent disposer d'une certaine quantité d'azote combiné, indispensable à leur action et métabolisme. Lorsque l'azote combiné commence à manquer autour des germes organotrophiques, leur croissance s'arrête. Alors les Azotobacter peuvent entrer en action et se développer grâce aux substances laissées par les germes organotrophiques telle que l'alcool éthylique, l'acide benzoïque et d'autres.

Voilà pourquoi il est raisonnable de considérer que certains aliments sont "normaux" et d'autres "anormaux" pour les Azotobacter.

Comme normaux on doit considérer les produits de dégradation abandonnés par les germes organotrophiques. Comme anormaux on doit considérer les produits dont les Azotobacter ne pourront jamais se servir dans le sol, par suite de la concurrence des autres germes.

Il nous semble pourtant, que si on veut mieux connaître le métabolisme des Azotobacter, en vue de leur différenciation, il est indispensable d'utiliser dans les essais aussi bien des aliments anormaux que des normaux.

Nous sommes persuadés qu'il n'y a pas de comparaison possible entre une croissance d'Azotobacter dans une fiole remplie d'une solution nutritive, et celle dans une terre ordinaire. Les conditions de développement sont tout autres. Mais, par contre, il faut considérer également le fait que, par suite de la présence constante de germes hétérotrophiques, les Azotobacter restent pour la plupart au stade enkysté dans le sol. Alors, en introduisant dans une terre, une matière énergétique, sans azote combiné, on stimule la germination des kystes, ce qui déclenche une prolifération intense de jeunes Azotobacter. Dans la pratique on n'applique pas une fumure des terres avec une seule source d'énergie, spécifique pour l'un ou l'autre groupe de germes. On introduit dans le sol une masse de matière organique, dont on ne connaît même pas encore actuellement la composition chimique exacte.

Il nous semble donc qu'en effectuant des essais au laboratoire, dans des fioles - ce qui entre parenthèses est inconcevable pour les microbiologistes du sol et les agrobiologistes - nous ne faisons qu'imiter les techniques nouvelles de la microbiologie du sol. Seulement, en opérant ainsi, nous nous trouvons dans des conditions bien déterminées, qui nous permettent de suivre rigoureusement la physiologie des germes en question.

Notre étude sur la nutrition carbonée peut, dans ce sens, être résumée comme suit:

- 1° - en travaillant avec des souches pures, en utilisant des tests de croissance et de fixation d'azote employant différentes substances énergétiques, peut-on arriver à une plus grande différenciation entre les Azotobacter?
- 2° - par quelle voie, certaines substances, spécifiques et utiles pour la différenciation, sont elles métabolisées par les Azotobacter?

Nous essayerons de répondre à la première question dans ce chapitre et à la deuxième question dans les chapitres suivants.

I. CROISSANCE DES AZOTOBACTER SUR LES GLUCIDES.

=====

Comme il est indiqué dans le premier chapitre les souches d'Azotobacter chroococcum, A. Beijerinckii et A. Vinelandii ont toujours été repiquées sur la gélose-mannitol, tandis que les A. agilis sont toujours repiquées sur gélose-dextrose (voir composition page 21).

Pour tous les essais qui vont suivre, des cultures jeunes d'Azotobacter âgées de 48 heures, ont été mises en suspension dans de l'eau stérile. Deux à trois gouttes de ces suspensions ont servi comme inoculum à 50 ml de milieu nutritif, stérilisé dans des fioles d'Erlenmeyer. Ces milieux étaient constitués comme il est dit page 84. Chaque milieu contenait 1 % de substance énergétique. La culture se faisait à 28° C. Le Tableau I donne un aperçu des résultats obtenus avec des glucides comme matières énergétiques. Le dosage de l'azote a été effectué sur 20 ml de culture, avec la méthode de micro-Kjeldahl décrite page 23.

Souches	mg d'Azote fixés par gramme de								
	Arabinose	Xylose	Dextrose	Fructose	Sucrose	Maltose	Lactose	Raffinose	Amidon
<u>A. chroococcum</u>									
A-1	0,1	0,1	10,0	7,0	11,4	12,0	0,2	0,5	5,0
A-2	0,2	0,2	13,0	8,2	12,2	9,0	0,2	8,6	6,4
A-3	0,2	0,2	12,0	7,5	14,0	15,0	0,1	7,3	6,1
A-4	0,5	0,1	13,5	9,7	14,0	14,4	0,1	5,4	5,0
A-5	0,1	0,2	15,0	11,4	15,5	16,0	0,2	6,5	6,1
A-6	0,2	0,2	14,7	10,8	14,3	15,1	0,1	4,8	4,3
A-7	0,5	0,2	14,4	9,5	15,0	15,8	0,2	7,5	7,8
A-8	0,1	0,1	15,3	10,6	15,5	16,2	0,1	8,0	6,7
A-9	0,2	0,1	15,7	11,0	14,5	14,9	0,2	6,4	6,1
A-10	0,2	0,2	15,5	10,2	15,0	15,3	0,1	5,8	5,3
<u>A. Beijerinckii</u>									
B-1	0,2	0,2	11,2	9,3	9,5	10,7	0,2	7,5	0,2
B-2	0,1	0,1	8,3	7,8	7,3	8,0	0,1	6,4	0,1
B-3	0,2	0,1	10,8	9,0	8,2	9,9	0,2	8,2	0,2
B-4	0,1	0,2	12,7	10,2	9,4	12,2	0,2	8,7	0,1
B-5	0,2	0,2	9,2	8,7	8,2	9,2	0,1	7,5	0,2

Souches	mg d'Azote fixés par gramme de									
	Arabinose	Xylose	Dextrose	Fructose	Sucrose	Maltose	Lactose	Raffinose	Amidon	Rhamnose
<u>A. Vinelandii</u>										
C-1	0,2	0,2	9,2	8,7	8,3	9,0	0,2	0,2	4,5	8,5
C-2	0,3	0,2	8,5	7,8	7,2	8,2	0,3	0,2	5,3	8,2
C-3	0,2	0,1	9,8	9,1	8,7	9,3	0,2	0,1	5,8	9,3
C-4	0,2	0,2	11,0	10,2	9,3	10,2	0,2	0,2	6,2	10,5
C-5	0,3	0,3	13,3	12,6	11,5	13,0	0,2	0,2	0,2	12,7
<u>A. agilis</u>										
D-1	0,2	0,1	10,5	9,5	8,7	9,3	0,3	0,2	0,2	0,5
D-2	0,2	0,2	7,5	6,4	7,3	8,7	0,2	0,2	0,3	0,4
D-3	0,2	0,3	9,2	7,3	6,8	7,6	0,2	0,3	0,3	0,3
D-4	0,2	0,2	9,6	6,5	7,0	8,2	0,1	0,2	0,2	0,4
D-5	0,2	0,2	10,2	8,7	8,5	9,3	0,4	0,2	0,3	0,4

Résultats:

En examinant les résultats obtenus avec les A. chroococcum, nous pouvons conclure que les glucides suivants ne peuvent être utilisés par ces germes comme source énergétique: Arabinose, Xylose et Lactose.

Par importance de la fixation d'azote montrée par les différentes souches, nous pouvons classer les glucides utilisables comme suit: Dextrose \gg Maltose \gg Sucrose $>$ Fructose $>$ Amidon $>$ Raffinose. L'amidon est une bonne substance énergétique pour les A. chroococcum.

Les A. Beijerinckii sont incapables d'utiliser les glucides suivants: Arabinose, Xylose, Lactose et Amidon. Les glucides métabolisables peuvent être classés par ordre d'importance: Dextrose \gg Maltose \gg Fructose \gg Sucrose $>$ Raffinose.

L'utilisation de l'amidon comme substance utilisable par les A. chroococcum est un point physiologique capital pour différencier les A. chroococcum des A. Beijerinckii.

Les A. Vinelandii sont incapables d'utiliser : Arabinose, Lactose, Raffinose et Xylose. Les autres glucides assimilables se classent comme suit: Dextrose \gg Maltose \gg Rhamnose \gg Fructose \gg Sucrose.

Nous avons examiné, en complément, le comportement avec le rhamnose. En effet, à la fin de 1961, nous avons reçu une publication de V. Jensen (102) concernant l'utilisation de ce pentose par les Azotobacter. Jensen déclare que seul les A. Vinelandii sont capables de montrer une bonne croissance sur le rhamnose. Ce caractère semble un moyen permettant l'isolement spécifique de cette espèce.

Toutes les souches A. Vinelandii présentent, en effet une bonne croissance et une impressionnante fixation d'azote sur ce glucide. Les A. agilis ne peuvent utiliser le rhamnose comme source énergétique.

L'utilisation de l'amidon et du rhamnose comme substances énergétiques par les A. Vinelandii est un point physiologique capital pour différencier les A. Vinelandii des A. agilis.

En outre la croissance sur le rhamnose est un caractère différentiel entre les A. Vinelandii d'une part et les A. chroococcum et A. Beijerinckii d'autre part.

Souches	mg d'Azote fixes par gramme de					
	Ethanol	Méthanol	Butanol	Glycérol	Mannitol	Sorbitol
<u>A. agilis</u>
D-1	17,0	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
D-2	15,9	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3
D-3	18,8	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2
D-4	15,5	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2
D-5	20,5	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2

Les tableaux suivants résumant les résultats obtenus.

Résultats:

Nous constatons que pour les A. chroococcum et A. Beijerinckii la concentration optimum en alcool éthylique pour obtenir un maximum de fixation d'azote, varie suivant la souche. Au-dessus de 2 % une certaine inhibition de la croissance se manifeste. A 3 % d'alcool éthylique la croissance est presque totalement arrêtée.

Par contre les A. Vinelandii offrent un comportement assez uniforme vis-à-vis de la concentration en alcool éthylique présent dans le milieu de culture.

La concentration de 2,50 % est l'optimum pour atteindre une fixation maximum d'azote.

Les A. agilis peuvent utiliser 3,00 % d'alcool éthylique. Leur croissance maximum se situe à 3 % d'éthanol, et même à 3,50 % une bonne fixation d'azote est possible de la part de ces germes.

On peut donc conclure que les Azotobacter aquatiques sont plus résistants à l'action de l'alcool éthylique et que d'autre part ils peuvent utiliser de plus grandes concentrations de cet aliment pour fixer l'azote atmosphérique.

L'ALCOOL ÉTHYLIQUE COMME SOURCE DE CARBONE
POUR LES AZOTOBACTER CHROOCCUM

mg d'azote fixés après 8 jours de croissance dans 50 ml de milieu de culture

Souches	% Alcool éthylique (vol/vol)										
	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	2,50	3,00	3,50
V.P.-1	2,10	4,45	6,30	8,30	9,20	11,25	12,90	15,90	13,65	1,05	0,20
A-1	2,30	4,40	5,95	6,65	8,10	10,50	11,30	12,85	6,00	0,95	0,30
A-2	2,30	5,25	7,60	9,40	12,15	12,70	12,90	8,20	7,15	1,40	0,30
A-3	2,20	3,00	3,00	2,50	2,20	1,90	1,60	1,20	1,00	0,85	0,20
A-4	2,10	4,50	5,60	8,50	9,70	11,20	11,60	11,50	7,00	4,50	1,20
A-5	2,30	4,70	6,20	8,30	6,10	5,30	4,20	3,80	2,50	0,90	0,20
A-6	2,10	4,40	6,80	8,20	10,00	11,50	13,70	14,20	11,70	1,90	0,30
A-7	1,80	4,00	5,90	7,30	5,70	5,20	3,70	2,10	1,00	0,40	0,20
A-8	2,40	4,50	7,20	9,20	11,70	14,00	16,30	16,90	13,70	2,10	0,20
A-9	2,20	4,40	6,00	9,20	10,80	12,70	15,00	16,50	12,70	1,40	0,20
A-10	1,90	3,50	5,20	7,00	9,00	9,80	10,20	7,80	4,50	1,20	0,20

L'ALCOOL ETHYLIQUE COMME SOURCE DE CARBONE

POUR LES AZOTOBACTER BELJERINCKII

Souche	mg d'azote fixés après 8 jours de croissance dans 50 ml de milieu de culture										
	% Alcool éthylique (vol/vol)										
	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	2,50	3,00	3,50
B-1	2,50	4,70	7,50	9,20	11,30	13,10	14,30	15,20	9,30	2,10	0,30
B-2	2,20	4,60	6,80	10,20	12,70	14,20	15,00	14,00	8,20	2,30	0,20
B-3	2,00	2,80	2,20	0,90	0,45	0,20	0,30	0,30	0,20	0,20	0,20
B-4	2,05	4,00	3,95	2,80	1,05	0,70	0,40	0,20	0,20	0,20	0,20
B-5	2,10	4,40	6,70	10,20	7,20	4,30	1,90	0,20	0,30	0,20	0,30
B-6	2,00	3,90	5,80	8,20	11,20	12,70	8,20	4,30	1,80	0,30	0,30

L'ALCOOL ETHYLIQUE COMME SOURCE DE CARBONE

POUR LES AZOTOBACTER VINELANDII

Souche	mg d'azote fixés après 8 jours de croissance dans 50 ml de milieu de culture										
	% Alcool éthylique (vol/vol)										
	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	2,50	3,00	3,50
C-1	1,65	3,60	6,10	8,75	9,70	12,20	13,30	14,30	14,70	7,00	0,50
C-2	2,35	4,95	7,20	9,25	11,45	13,10	14,90	16,80	17,50	8,45	0,50
C-3	1,80	3,40	6,00	8,00	9,50	11,20	12,10	13,00	13,20	6,20	0,50
C-4	2,10	3,80	6,50	8,70	10,40	13,00	14,10	15,60	16,30	7,80	0,70
C-5	2,00	4,20	6,80	9,20	12,10	14,10	16,20	17,10	18,70	10,30	0,80
KS-4	2,40	5,10	7,90	10,00	13,20	14,90	17,05	18,60	21,00	14,05	0,80

L'ALCOOL ETHYLIQUE COMME SOURCE DE CARBONE
POUR LES AZOTOBACTER AGILIS

mg d'azote fixés après 8 jours de croissance dans 50 ml de milieu de culture											
Souche	% alcool éthylique (vol/vol)										
	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	2,50	3,00	3,50
D-1	1,80	3,70	5,60	8,50	11,40	14,10	16,30	18,30	19,70	20,50	12,30
D-2	2,00	4,40	6,20	7,90	9,80	11,20	13,50	15,90	17,00	18,30	10,50
D-3	1,95	4,20	7,20	9,30	12,10	14,80	16,80	17,70	19,45	20,15	12,00
D-4	1,65	3,45	5,40	7,65	9,90	10,90	11,85	13,70	15,05	16,00	7,80
D-5	2,50	4,90	7,75	10,10	12,75	14,25	14,95	16,00	17,50	17,75	8,90

III. CROISSANCE DES AZOTOBACTER SUR DES ACIDES AROMATIQUES.
=====

L'importance de l'utilisation des composés aromatiques par les fixateurs d'azote fut envisagée par Winogradsky (103) en 1932. Ce savant avait déjà démontré que les benzoates se relèvent comme d'excellentes substances énergétiques pour les Azotobacter.

Depuis lors, en parcourant la bibliographie, nous trouvons seulement quatre publications à ce sujet par Guittoneau et Chevalier (104)(105)(106)(107) (1936 et 1939). Ces chercheurs ont constaté en premier lieu, que le salicylate de soude, apporté à des terres, comme seule substance énergétique, permet le développement de nombreux Azotobacter. Une souche d'Azotobacter purifiée, mais non déterminée, était capable d'utiliser directement le salicylate de soude en solution nutritive. Plus tard, ils ont trouvé que seul l'ortho- et le para-oxybenzoate étaient utilisables par les Azotobacter du sol qui par contre n'utilisaient pas le meta-oxybenzoate. En plus, ils prétendent que le phénol à 0,05 % peut être attaqué par les Azotobacter.

Malheureusement, Guittoneau et Chevalier n'ont jamais donné de précisions sur la nature des Azotobacter qui peuvent se développer sur ces produits aromatiques. Nous ne savons donc pas quelles espèces d'Azotobacter présentent ces caractères.

Winogradsky (62) précise la question de l'utilisation des composés aromatiques par les Azotobacter, de la façon suivante:

"Les Azotobacter, en général, se caractérisent par la faculté rare"
"d'assimiler le carbone des produits aromatiques. Outre l'acide "
"benzoïque, ces organismes, d'après les recherches de Guittoneau "
"utilisent l'acide salicylique et les acides oxybenzoïques ortho et"
"para, mais non méta, ainsi que le phénol. Mais, d'après le même "
"auteur, la valeur alimentaire de ces produits est différente chez"
"différentes souches, les uns actives, les autres inactives aux dé- "
"pens du même composé. Cette affinité inégale pour les composés "
"benzéniques pourrait servir à différencier les souches et à les "
"isoler. Il y là une étude à faire".

SOUCHES	2,5-dihydroxy-benzoate	Méta-hydroxy-bezoate	Catéchol	Para-hydroxybenzoate	2,4-dihydroxy-benzoate	3,5-dihydroxy-benzoate	3,4-dihydroxy-be,zoate	Ortho-hydroxy-benzoate	Phénol
<u>A. chroococcum</u>									
A-1			+	+			+		
A-2			+	+			+		
A-3			+	+			+		
A-4				+			+		
A-5			+	+			+		
<u>A. Beijerinckii</u>									
B-1			+	+			+	+	
B-2			+	+			+	+	
B-3			+	+			+	+	
B-4			+	+			+	+	
B-5			+	+			+	+	
<u>A. Vinelandii</u>									
C-1			+	+			+		
C-2			+	+			+		
C-3			+	+			+		
C-4			+	+			+		
<u>A. agilis</u>									
D-1									
D-2									
D-3									
D-4									

Nous nous sommes inspiré de cette déclaration, pour entamer notre étude sur l'utilisation des acides aromatiques par les Azotobacter. La croissance des souches isolées a d'abord été contrôlée dans des milieux de culture renfermant des acides aromatiques comme seule substances énergétiques.

Les sels minéraux mentionnés page 84, additionnés de 0,1 % de sels de soude de différents acides aromatiques et de 1,5 % de gélose, stérilisés en tubes, ont étéensemencés avec les différentes souches. Le tableau suivant nous donne les résultats obtenus.

Résultats:

Les résultats obtenus indiquent:

- 1° Le méta-hydroxy-benzoate n'est utilisable par aucune espèce d'Azotobacter.
- 2° Le para-hydroxy-benzoate se présente comme une substance énergétique permettant la croissance des A. chroococcum, A. Beijerinckii et A. Vinelandii. Seul les A. agilis sont incapables d'utiliser cette source de carbone.
- 3° L'ortho-hydroxy-benzoate ou le salicylate est utilisable uniquement par les A. Beijerinckii. Les autres espèces ne peuvent assimiler cet acide aromatique.
- 4° Des quatre di-hydroxy-benzoates, seul le 3,4-dihydroxy-benzoate se présente comme une source de carbone pour les A. chroococcum, les A. Beijerinckii et les A. Vinelandii. Les A. agilis sont incapables d'assimiler les 3,4-dihydroxy-benzoate.
- 5° Le catéchol est utilisable par les A. chroococcum qui se développent aussi sur le benzoate de soude; également par les A. Beijerinckii et les A. Vinelandii. Aucune souche d'A. agilis ne peut utiliser ce di-phénol.

En examinant la croissance des cultures, nous remarquons que sur le para-hydroxy-benzoate les colonies de toutes les souches sont noirâtres. Le milieu de culture lui-même reste incolore; les souches ne produisent donc pas de pigment exogène sur cet acide.

Sur la salicylate, les A. Beijerinckii se développent en masses légèrement brunâtres. Un pigment exogène colore le milieu en jaune-brun. Les souches d'A. Beijerinckii produisent des colonies

brillantes, légèrement brunâtres sur le 3,4-dihydroxy-benzoate. La gélose reste inchangée. Par contre les A. chroococcum ont une couleur noirâtre et leur pigments exogènes sont bruns. Les A. Vinelandii se comportent comme les A. Beijerinckii sur le 3,4-dihydroxy-benzoate.

Sur le catéchol toutes les souches qui peuvent se développer le font avec production de cellules d'un aspect gris-noirâtre et d'un pigment noir-foncé.

Dans le but de nous rendre compte de la valeur énergétique des différents acides aromatiques pour les Azotobacter, nous avons fait les expériences suivantes.

Dans des fioles d'Erlenmeyer contenant 50 ml de la solution minérale et différentes concentrations d'acides aromatiques, nous avonsensemencé trois gouttes d'une suspension aqueuse des différentes souches, cultivées toujours sur la gélose mannitol. Après 8 jours de culture nous avons déterminé la quantité d'azote fixée dans les cultures. Le tableau suivant nous donne les résultats obtenus.

Les résultats indiquent que le para-hydroxybenzoate et le 3,4-dihydroxybenzoate sont de très bonnes sources d'énergie pour les A. chroococcum, A. Beijerinckii et A. Vinelandii, tandis que l'ortho-hydroxybenzoate est uniquement métabolisable par l'A. Beijerinckii.

En effet, en prenant une moyenne de 1,25 mg d'azote dosé dans 50 ml de solution nutritive, contenant 125 mg (0,25 %) de produit énergétique, nous pouvons calculer que 1 gramme de ce produit permettra aux Azotobacter de fixer 10 mg d'azote. Ce chiffre correspond à peu près de la quantité d'azote fixée par gramme de dextrose ou de mannitol. Ce qui nous permet d'avancer que ces trois acides ont une valeur énergétique aussi importante que les glucides.

Le catéchol se présente également comme une bonne source de carbone de valeur énergétique presque égale à celle des acides aromatiques soumis à l'essai.

Produits Aromatiques	<u>A. chroococcum</u> A-1	<u>A. Beijerinckii</u> B-5	<u>A. Vinelandii</u> C-4
Ortho-hydroxy benzoate 0,05 % 0,10 % 0,25 % 0,50 % 0,75 %	0,20 0,40 0,20 0,30 0,20	0,30 0,44 1,04 1,26 0,58	0,30 0,20 0,40 0,20 0,30
Para-hydroxy benzoate 0,05 % 0,10 % 0,25 % 0,50 % 0,75 %	0,35 0,52 1,20 1,05 0,72	0,35 0,68 1,20 1,52 1,05	0,40 0,62 1,30 1,62 1,10
Catéchol 0,05 % 0,10 % 0,25 % 0,50 % 0,75 %	0,25 0,50 1,20 1,05 0,35	0,35 0,73 1,45 1,62 0,70	0,30 0,70 1,25 1,55 0,95
3,4-Dihydroxy- benzoate 0,05 % 0,10 % 0,25 % 0,50 % 0,75 %	0,20 0,60 1,05 0,80 0,20	0,20 0,70 1,15 0,75 0,20	0,20 0,65 1,20 0,75 0,20

Finalement, nous avons étudié la valeur énergétique du benzoate de soude pour les Azotobacter.

Dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml, nous avons introduit 50 ml de solution minérale et des concentrations croissantes de benzoate de soude. Le pH des milieux était amené à 7,5. Après ensemencement, les milieux étaient placés à l'étuve à 28° C pendant 8 jours. Le dosage de l'azote fixé fut effectué sur 20 ml de culture. Les tableaux suivants résument les résultats obtenus.

Résultats:

Des onze souches d'A. chroococcum soumises à l'essai, trois souches étaient incapables d'utiliser le benzoate de soude. L'acide benzoïque n'est donc pas assimilable par tous les A. chroococcum. La fixation d'azote atteint en général son maximum à 0,50 % de benzoate de soude. A partir de 1% de benzoate, la fixation d'azote semble complètement inhibée.

Toutes les souches A. Beijerinckii peuvent métaboliser le benzoate de soude. La concentration optimum pour obtenir une fixation d'azote maximum avec des souches, semble se situer entre 0,25 et 0,50% de benzoate. Au dessus de 1 % le benzoate de soude entrave parfois complètement la fixation de l'azote.

Pour les A. Vinelandii la concentration optimum de benzoate de soude se situe entre 0,75 et 1,50 % pour une fixation maximum d'azote. La concentration de 2% est presque totalement inhibitrice.

Les A. agilis sont incapables d'assimiler la moindre trace de benzoate de soude. Ce caractère différencie totalement les A. agilis des autres Azotobacter. Le benzoate de soude doit donc être considéré à première vue comme une substance inhibitrice ou peut-être toxique pour les A. agilis.

En prenant la moyenne de la fixation d'azote des A. chroococcum à une concentration de 0,50 % de benzoate de soude, nous arrivons à un chiffre de 3,35 mg N/0,25 g. de benzoate de soude. Ceci correspond à une valeur énergétique de 13,40 mg N/gramme de benzoate. Pour les A. Beijerinckii on arrive à environ 12,60 mg N/gramme de benzoate. On peut conclure de ces chiffres que le benzoate de soude représente pour les A. chroococcum et les A. Beijerinckii une valeur énergétique plus importante que les glucides.

LE BENZOATE DE SOUDE COMME SOURCE DE CARBONE
POUR LES AZOTOBACTER CHROOCCOCUM

Souche	mg d'azote fixés après 8 jours de croissance dans 50 ml de milieu de culture									
	% Benzoate de Soude (gr/vol.)									
	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00		
V.T.1	0,20	0,15	0,15	0,20	0,15	0,20	0,20	0,15	0,20	2,00
A-1	0,50	0,95	2,20	4,60	1,95	0,65	0,40	0,25	0,40	0,25
A-2	0,50	1,00	1,90	3,80	1,90	0,70	0,35	0,20	0,35	0,20
A-3	0,80	1,00	1,00	1,15	0,70	0,45	0,25	0,20	0,25	0,20
A-4	0,20	0,15	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,15	0,20	0,15
A-5	0,40	0,70	2,20	3,30	1,40	0,60	0,30	0,20	0,30	0,20
A-6	0,15	0,15	0,20	0,15	0,20	0,15	0,20	0,15	0,20	0,15
A-7	0,40	0,95	2,00	4,80	2,00	0,90	0,20	0,20	0,20	0,20
A-8	0,30	0,70	1,90	3,60	1,70	0,80	0,20	0,20	0,20	0,20
A-9	0,30	0,80	2,40	4,50	1,80	0,50	0,20	0,20	0,20	0,20
A-10	0,50	1,00	1,50	1,20	0,60	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

LE BENZOATE DE SOUDE COMME SOURCE DE CARBONE

POUR LES AZOTOBACTER BEIJERINCKII

mg d'azote fixés après 8 jours de croissance dans 50 ml de milieu de culture								
Souche	% Benzoate de Soude (gr/vol.)							
	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00
B-1	0,55	1,00	2,20	3,95	4,75	1,70	0,35	0,10
B-2	0,60	1,00	1,70	1,10	0,60	0,40	0,20	0,10
B-3	0,70	1,10	1,20	0,90	0,60	0,25	0,20	0,20
B-4	0,65	1,10	2,05	1,20	0,60	0,30	0,20	0,20
B-5	0,50	1,20	2,70	3,20	2,30	1,10	0,50	0,50
B-6	0,50	1,00	2,10	4,20	4,60	3,10	0,80	0,20
B-7	0,60	1,20	1,80	0,95	0,50	0,25	0,15	0,15
B-8	0,50	0,90	2,20	2,80	1,90	0,50	0,20	0,20
B-9	0,60	1,00	1,80	2,50	1,60	0,30	0,15	0,15
B-10	0,50	0,95	2,50	3,05	2,10	1,05	0,30	0,15

LE BENZOATE DE SOUDE COMME SOURCE DE CARBONE

POUR LES AZOTOBACTER VINELANDII

Souche	mg d'azote fixés après 8 jours de croissance dans 50 ml de milieu de culture							
	% Benzoate de Soude (gr/vol.)							
	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00
C-1	0,40	0,70	1,80	3,60	4,60	5,20	5,60	0,70
C-2	0,50	0,80	1,90	3,90	5,40	7,00	10,45	2,50
C-3	0,80	1,40	2,30	3,70	4,10	3,45	1,00	0,20
C-4	0,95	1,70	2,70	4,50	4,90	4,55	0,85	0,30
C-5	0,45	1,00	2,40	4,10	6,50	7,90	3,65	0,50

LE BENZOATE DE SOUDE COMME SOURCE DE CARBONE

POUR LES AZOTOBACTER AGILIS

Souche	mg d'azote fixés après 8 jours de croissance dans 50 ml de milieu de culture							
	% de Benzoate de Soude (gr/vol.)							
	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00
D-1	0,15	0,15	-	0,20	0,30	0,15	0,20	0,15
D-2	0,20	0,20	-	0,20	-	0,20	-	0,20
D-3	0,15	0,15	-	0,15	-	0,20	-	0,15
D-4	0,15	0,15	-	0,20	-	0,15	-	0,20
D-5	0,15	-	0,20	0,20	-	0,20	-	0,20
D-6	0,15	-	0,15	0,20	-	0,15	-	0,15
D-7	0,20	-	-	0,20	-	0,15	-	-
D-8	0,15	-	-	0,15	-	0,15	-	-
D-9	0,15	-	0,20	0,15	-	0,20	-	0,15

Pour les A. Vinelandii la valeur énergétique du benzoate de soude se situe entre 10 et 12 mg N/gramme de benzoate.

Dery (56) signale "... que l'A. agilis est particulièrement résistant vis-à-vis du benzoate de soude; il surpasse même l'A. Vinelandii à cet égard, et cela sans que l'A. agilis soit capable d'attaquer le benzoate". Il prétend également qu'on peut isoler l'A. agilis d'une eau, contenant 2 % de benzoate de soude et 1 % d'éthanol.

Il nous a semblé utile de faire avec des souches pures, des expériences sur l'influence que peut exercer le benzoate de soude sur la fixation de l'azote par les Azotobacter Vinelandii et A. agilis en présence d'alcool éthylique. Pour cela nous avons ajouté à la solution minérale des quantités croissantes de benzoate de soude entre 0 et 2 %. Ces solutions nutritives furent partagées en fioles d'Erlenmeyer à raison de 50 ml. Après stérilisation et refroidissement nous avons ajouté à chaque Erlenmeyer 0,5 ml d'éthanol absolu. L'ensemencement était fait avec une suspension, dans de l'eau stérile, de cellules cultivées sur gélose-mannitol (dextrose pour les A. agilis). Après 8 jours de culture nous avons dosé l'azote fixé dans les milieux de culture. Nous avons également contrôlé la croissance des mêmes souches sur des milieux minéraux contenant des quantités croissantes de benzoate de soude, comme décrit précédemment.

De cette façon, il nous a été possible de connaître l'influence directe du benzoate de soude sur la fixation d'azote en présence d'une source d'énergie comme l'éthanol.

Le tableau suivant résume les résultats des expériences avec différentes quantités de benzoate en présence de 1 % d'éthanol dans les milieux de culture. Dans les figures 1, 2, 3 et 4 nous avons reproduit les résultats obtenus avec les A. Vinelandii C-1 et C-2 et les A. agilis D-4 et D-5. Les courbes de croissance en fonction de la concentration de benzoate de soude, les quantités d'azote fixées en présence de 1 % d'éthanol (ligne interrompue) et les quantités d'azote fixées en milieux contenant 1 % d'éthanol et des concentrations croissantes de benzoate sont représentées.

Souches	mg d'azote fixés dans 50 ml 1 % d'alcool éthylique + Benzoate de soude en %						
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00
<u>A. Vinelandii</u>							
C-1	7,63	9,10	10,60	11,50	12,10	12,60	0,74
C-2	9,35	11,20	13,15	14,40	15,90	19,10	4,72
C-3	8,63	11,50	14,10	15,63	12,76	1,70	0,32
C-4	8,50	10,30	12,80	14,25	15,10	16,20	2,75
C-5	9,40	11,45	12,85	13,95	14,60	15,80	3,30
<u>A. agilis</u>							
D-1	8,20	8,50	8,60	6,95	4,25	1,30	0,50
D-2	7,70	8,00	8,20	6,50	3,80	0,95	0,20
D-3	9,80	10,0	9,50	6,90	5,50	2,20	0,70
D-4	7,95	8,40	8,90	8,45	8,00	6,10	3,70
D-5	10,30	8,40	6,30	4,55	2,80	0,70	0,20

En examinant les résultats obtenus avec les A. Vinelandii, nous pouvons constater que le benzoate de soude, présent dans un milieu nutritif en même temps que l'alcool éthylique, permet à ces germes de métaboliser les deux sources d'énergie et ceci jusqu'à une concentration de 1,50 %. L'azote fixé par les A. Vinelandii sur 1 % d'alcool éthylique + 1 % de benzoate de soude, égale la somme de l'azote fixé sur ces deux substances séparément. Il ^{se} présente donc un effet cumulatif pour ces deux sources de carbone. Nous pouvons donc en déduire que lors des isolements à partir de l'eau, un milieu enrichi de 1 % de benzoate + 1 % l'alcool éthylique permettre une forte croissance de la part des A. Vinelandii présents.

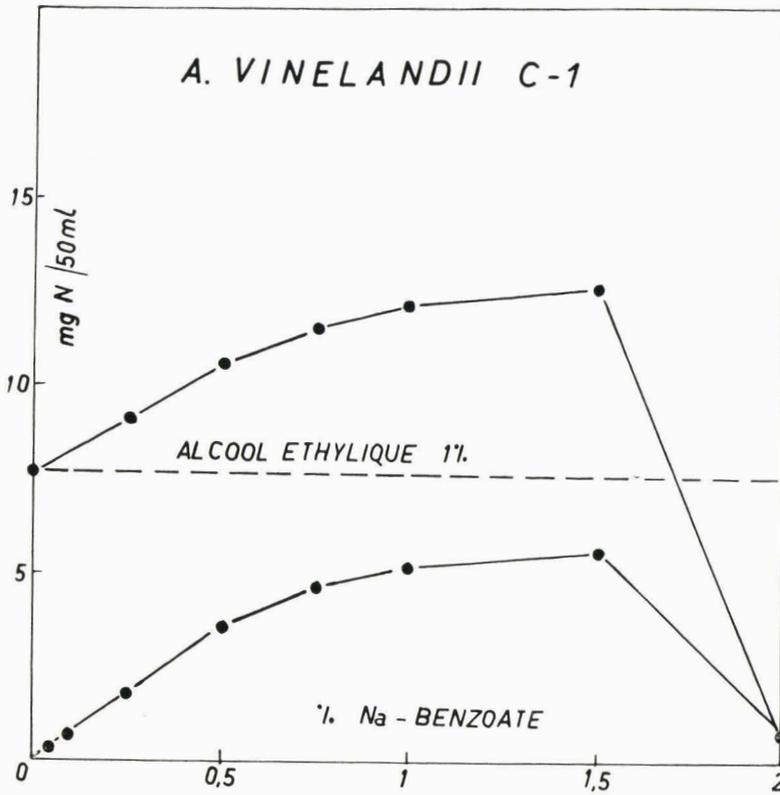


FIGURE 1

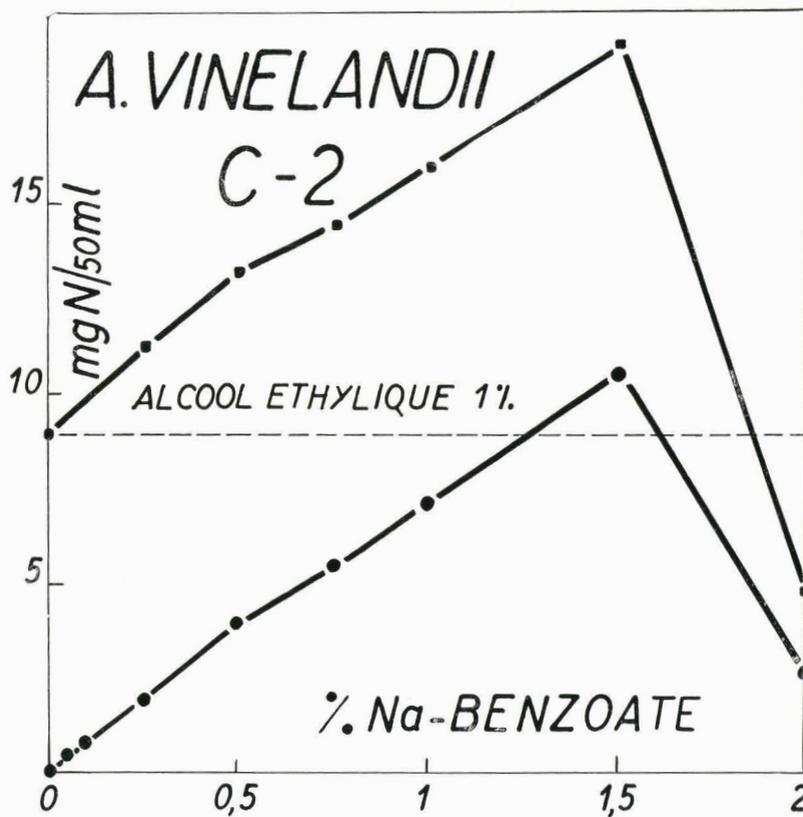


FIGURE 2

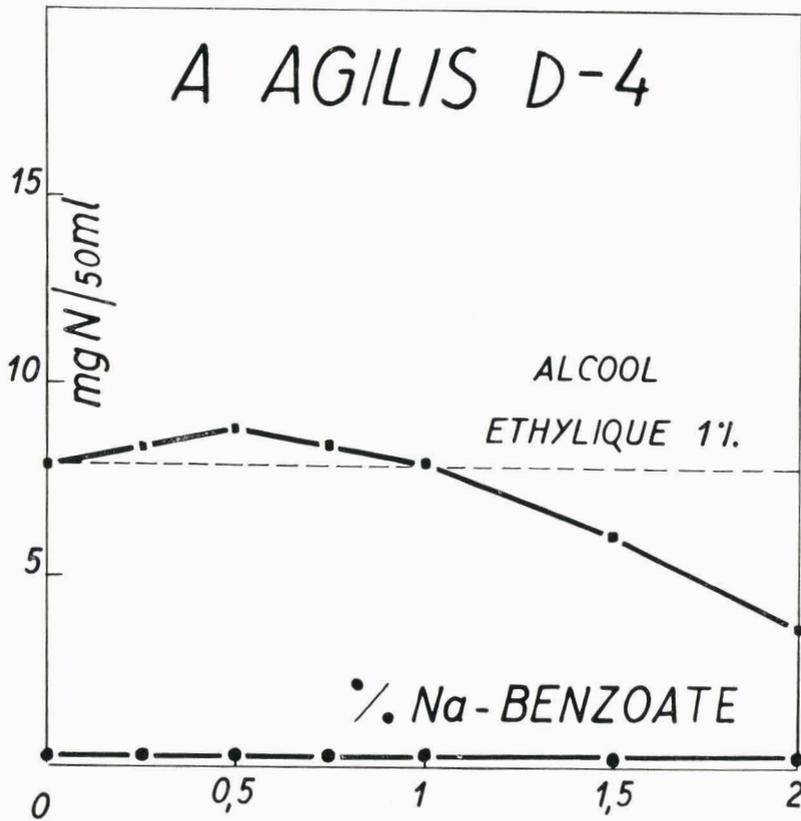


FIGURE 3

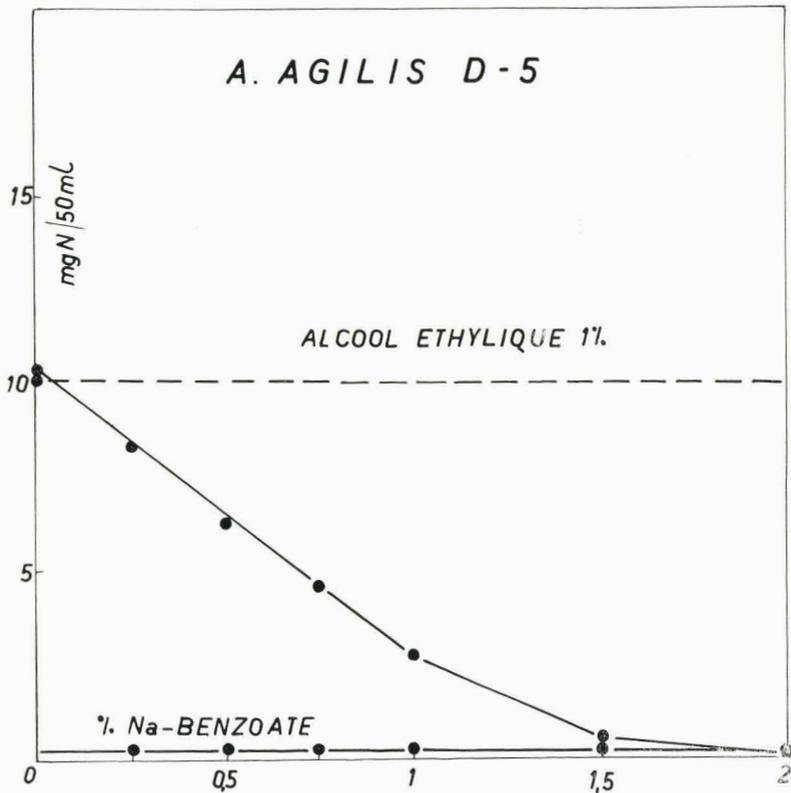


FIGURE 4

Par contre en examinant les expériences faites avec les A. agilis, on remarque que certaines souches (D-1, D-2, D-5) sont inhibées dans leur croissance dans des milieux pourvus de 1 % d'éthanol et de quantités croissantes de benzoate de soude. La figure 4 nous montre bien cette action. Pour cette souche le benzoate de soude se présente vraiment comme une substance toxique. D'autres, comme la souche D-4, sont plus résistantes au benzoate.

Nous pouvons donc conclure de ces expériences que les A. Vinelandii sont capables de métaboliser l'alcool éthylique (1 %) et le benzoate de soude (jusqu'à 1,50 %) simultanément dans les milieux nutritifs.

Les A. agilis sont assez hétérogènes dans leur comportement. Certaines souches présentent une certaine résistance envers le benzoate dans les milieux à base d'alcool éthylique, d'autres sont très sensibles à l'acide benzoïque qui inhibe leur croissance.

Il nous semble donc que l'affirmation de Derx n'est pas basée sur des expériences exactes. Certaines souches présentent une certaine résistance envers le benzoate de soude, seulement on ne peut pas considérer ce phénomène comme un caractère général pour toutes les souches d'A. agilis. L'isolement des A. agilis à partir d'une eau enrichie de 2 % de benzoate de soude et 1 % d'éthanol est impossible. Nous ne sommes jamais arrivés à pratiquer des isollements de cette façon dans des eaux où les A. agilis étaient présents.

Dans le chapitre I, page 39, nous mentionnons que pour l'isolement des A. agilis il suffit d'introduire dans une eau 1 % d'éthanol comme substance énergétique.

Les expériences citées ici, indiquent l'intérêt de cette technique. Nous ne savons pas d'avance quelles souches d'A. agilis sont présentes dans une eau. L'enrichissement avec du benzoate en présence d'éthanol doit en éliminer une bonne partie. De ce fait on isole en général des souches qui possèdent une forte résistance au benzoate, caractère qui n'est pas commun à tous les A. agilis.

RESUME DU CHAPITRE III

=====

En examinant les expériences effectuées sur la nutrition carbonée des Azotobacter, nous pouvons avancer les conclusions générales suivantes:

1° Pour les A. chroococcum nous constatons que:

- le dextrose, le maltose, le sucrose, le fructose, le raffinose et l'amidon sont assimilables.
- le xylose, l'arabinose et le lactose ne sont pas utilisables.
- le mannitol, le sorbitol et l'éthanol sont des sources d'énergie.
- l'utilisation du benzoate de soude est facultative.
- le salicylate de soude n'est pas utilisable.
- le para-hydroxybenzoate, le catéchol et le 3,4-dihydroxybenzoate sont de bonnes sources d'énergie.
- le 2,5-dihydroxy-, le 2,4-dihydroxy- et le 3,4-dihydroxybenzoate ne sont pas utilisables.

2° Pour les A. Beijerinckii nous avons trouvé que:

- le dextrose, le maltose, le fructose, le sucrose et le raffinose sont utilisables.
- le xylose, l'arabinose, le lactose et l'amidon ne sont pas utilisables.
- le mannitol, le sorbitol et l'éthanol sont de bonnes sources d'énergie.
- le benzoate de soude est toujours assimilé.
- le salicylate de soude est toujours assimilé.
- le para-hydroxybenzoate, le catéchol et le 3,4-dihydroxybenzoate sont des sources d'énergie.
- le 2,5-dihydroxy-, le 2,4-dihydroxy- et le 3,5-dihydroxybenzoate ne sont pas utilisables.

3° Pour les A. Vinelandii nous constatons que:

- le dextrose, le maltose, le fructose, le sucrose et le rhamnose sont utilisables.
- le lactose, l'arabinose, le xylose et le raffinose ne le sont pas.
- l'éthanol et le mannitol sont utilisables; le sorbitol n'est pas utilisable.
- le benzoate de soude est toujours utilisé, ainsi que le para-hydroxy-benzoate, le catéchol et le 3,4-dihydroxy-benzoate.
- le 2,4-dihydroxy-, le 2,5-dihydroxy- et le 3,5-dihydroxy-benzoate ne sont jamais utilisables.
- le salicylate de soude n'est jamais utilisable.

4° Pour les A. agilis nous avons trouvé que:

- le dextrose, le maltose, le sucrose, le fructose sont utilisables.
- l'amidon, l'arabinose, le xylose, le lactose, le raffinose et le rhamnose ne sont pas utilisables.
- l'éthanol seul, de tous les alcools essayés est assimilable.
- aucune substance aromatique n'est utilisable, ni le benzoate, ni le salicylate, ni le catéchol, ni le para-hydroxy-benzoate, ni le 2,4-dihydroxy-, ni le 3,4-dihydroxy-, ni le 2,5-dihydroxy-, ni le 3,5-dihydroxy-benzoate.

=====

C H A P I T R E IV

=====

SUR LES PHENOMENES DE DIAUXIE CHEZ LES AZOTOBACTER

=====

Dans ses "Recherches sur la croissance des cultures bactériennes" Monod (108) introduit pour la première fois en microbiologie le terme "diauxie" (croissance double). Par "diauxie", Monod entend qu'un germe cultivé sur un milieu nutritif, contenant deux hydrates de carbone, présente deux croissances successives.

En examinant la croissance d'une culture en fonction du temps dans un milieu nutritif, contenant un seul hydrate de carbone, nous obtenons une courbe sigmoïdale. Quand on met deux hydrates de carbone à la disposition de ce germe, deux phénomènes peuvent se présenter. Dans certains cas on constate dans la courbe de croissance deux poussées séparées par un phase de ralentissement ou même de décroissance plus au moins accentuée. Dans d'autres cas on ne peut pas constater cette phase de décroissance et la courbe de croissance garde sa forme sigmoïdale entièrement. Dans ces derniers cas le phénomène de diauxie ne se manifeste donc pas.

Par des dosages de glucides présents dans les milieux de culture, Monod constata que dans le cas de diauxie, l'un des sucres est d'abord assimilé complètement et seulement après les germes commencent le métabolisme du deuxième.

Si le phénomène de diauxie ne se présente pas les deux glucides sont métabolisés simultanément.

Ces recherches permettaient à Monod de partager les glucides en deux groupes, A et B. Deux glucides appartenant au groupe A, ne produisent pas de phénomène de diauxie; deux représentants du groupe B, non plus. Par contre, un mélange de glucides appartenant réciproquement aux groupes A et B, produisent une courbe de croissance avec phase de décroissance. On est ainsi conduit à classer les sucres utilisables par chaque souche bactérienne en deux catégories.

Monod a appelé sucres A, ceux qui, associés au glucose, ne donne pas lieu au phénomène de diauxie; sucres B ceux qui, dans les mêmes conditions, le provoquent.

Il conclue que les microbes possèdent deux sortes d'enzymes. Des enzymes qui sont toujours présent et qui font partie de la constitution des germes. Ce sont les enzymes constitutifs. D'autres enzymes sont formés ou activés par la présence d'un substrat pendant la croissance, même si celle-ci est faible. Ce sont les enzymes adaptatifs.

Nous avons recherché si le phénomène de diauxie se manifestait aussi chez les Azotobacter. Pour cela nous avons étudié le comportement de différentes souches dans des milieux de cultures contenant des mélanges de différentes sources carbone à des concentrations variables.

En premier lieu nous avons introduit dans des fioles d'Erlenmeyer 50 ml de la solution minérale (page 34) enrichis de 1 % de mannitol ou 1 % de dextrose ou un mélange de 1 % de mannitol + 1 % de dextrose. Après stérilisation, les fioles d'Erlenmeyer sontensemencées avec 1 ml d'une suspension microbienne d'une culture sur gélose-dextrose. La croissance des bactéries fut déterminée par le dosage de l'azote total dans les cultures. Le tableau I nous donne un aperçu des résultats obtenus avec l'Azotobacter Vinelandii C-1.

TABLEAU I.

Jours de culture	mg d'azote dans 50 ml avec 1 % de mannitol	mg d'azote dans 50 ml avec 1 % de dextrose	mg d'azote dans 50 ml avec 1 % de dextrose + 1 % de mannitol
1	1,40	0,95	2,45
2	4,70	2,70	8,00
3	8,20	4,20	12,60
4	9,00	4,60	13,80
5	9,20	4,50	14,00
6	8,90	4,30	13,50
7	9,00	4,60	13,70
8	9,20	4,55	13,90

Les mêmes essais ont été effectués mais avec le mannitol à 1 % et le benzoate de soude à 0,5 %. Le tableau II resume les résultats obtenus avec l'Azotobacter Vinelandii C-1.

TABLEAU II

Jours de culture	mg d'azote dans 50 ml avec 0,5 % de benzoate	mg d'azote dans 50 ml avec 1 % de mannitol	mg d'azote dans 50 ml avec 1 % de mannitol + 0,5 % de benzoate
1	0,65	1,45	0,70
2	2,80	4,40	2,60
3	3,40	8,00	3,70
4	3,70	9,00	9,20
5	3,80	9,20	12,50
6	3,60	9,50	13,30
7	3,70	9,10	13,00
8	3,60	9,20	13,20

Nous avons également répété les expériences avec la même souche A. Vinelandii C-1, mais comme sources énergétiques nous avons utilisé le dextrose 1 %; le benzoate à 0,5 % et le mélange dextrose 1 % + benzoate 0,5 %. Le tableau III nous donne les résultats.

TABLEAU III

Jours de culture	mg d'azote dans 50 ml avec 0,5 % de benzoate	mg d'azote dans 50 ml avec 1 % de dextrose	mg d'azote dans 50 ml avec 1 % de dextrose + 0,5 % de benzoate
1	0,80	0,90	0,75
2	3,05	2,80	2,90
3	3,70	4,10	3,60
4	3,50	4,50	5,95
5	3,80	4,70	8,20
6	3,60	4,65	8,50
7	3,70	4,85	8,30
8	3,80	4,60	8,60

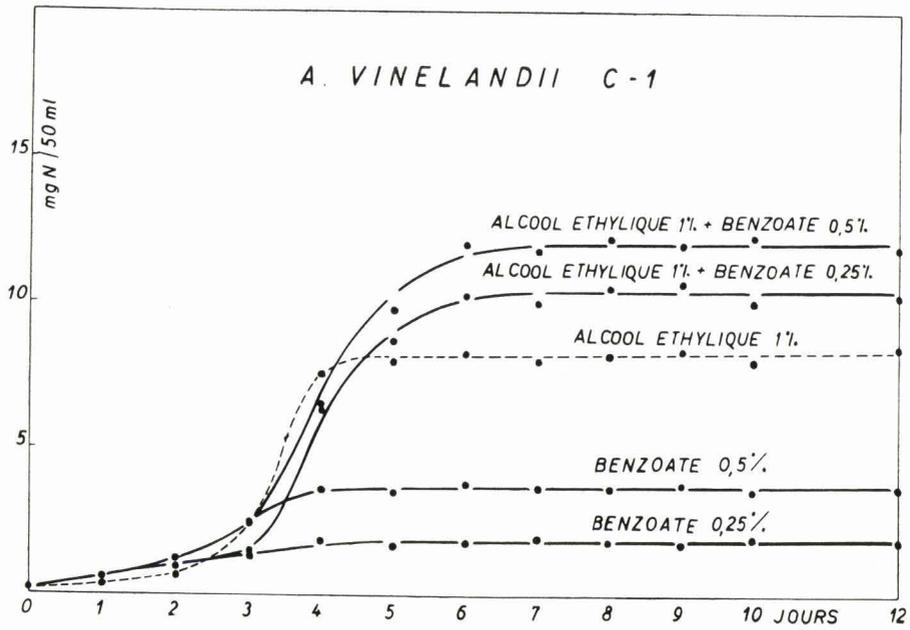


FIGURE 1

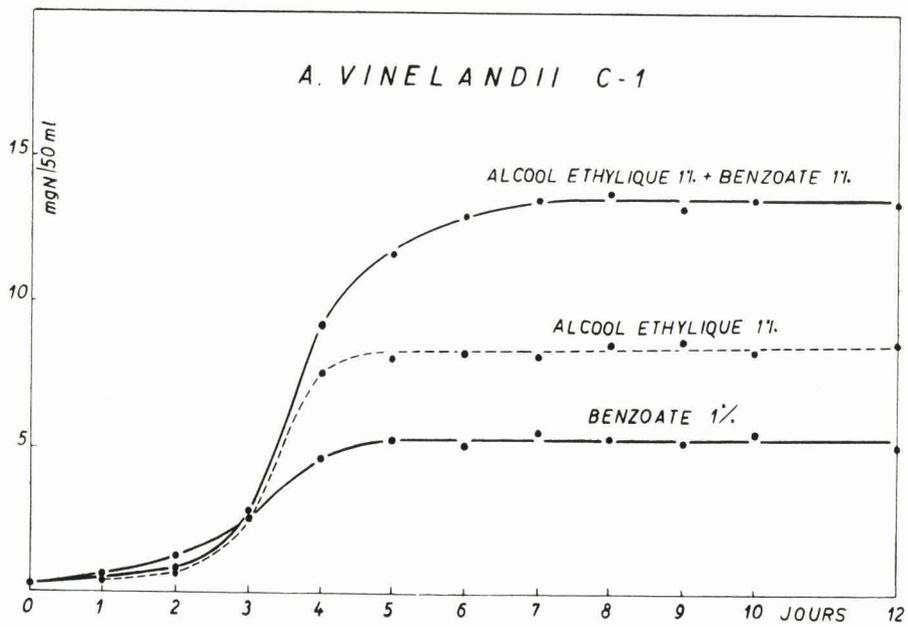


FIGURE 2

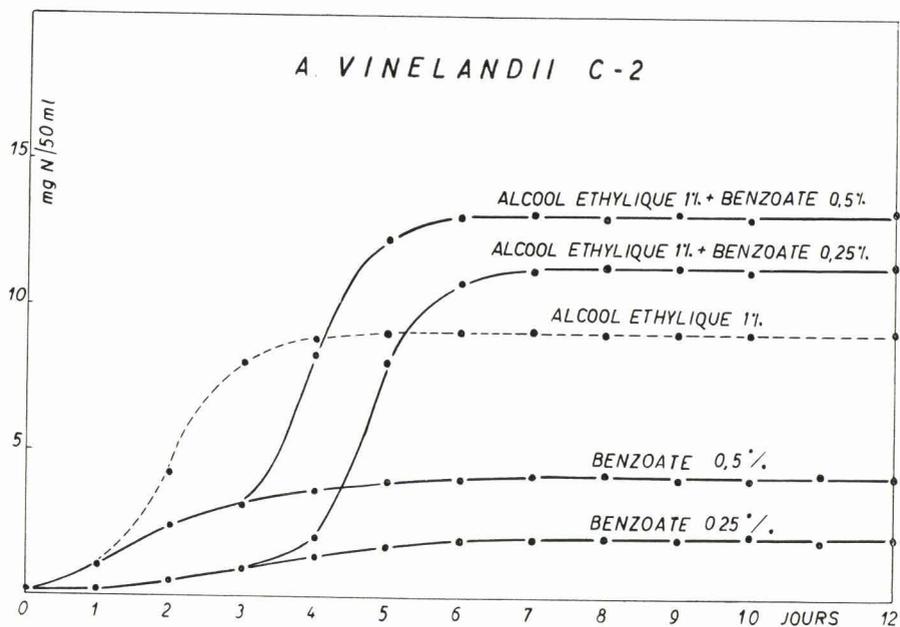


FIGURE 3

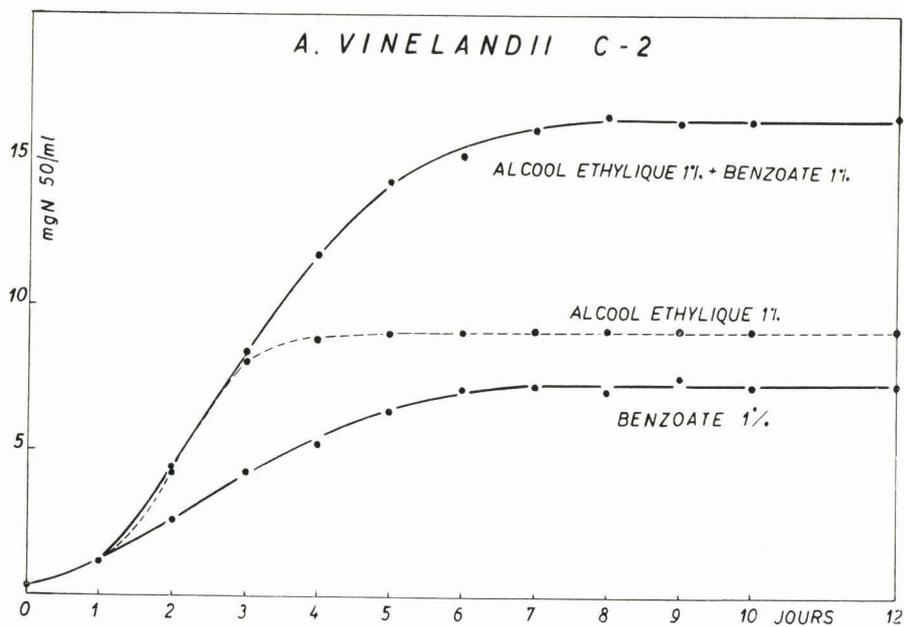


FIGURE 4

Les résultats obtenus nous indiquent que l'Azotobacter Vine-
landii peut métaboliser simultanément des glucides, des polyols
et des acides aromatiques. La présence de deux de ces substances
dans le même milieu nutritif permet à ce germe d'utiliser ces
deux sources d'énergie en même temps et de fixer une quantité d'
azote qui est la somme de ce qu'elle est sur chaque substance
séparément.

Avec ces résultats il nous est impossible de déceler le phéno-
mène de diauxie dans les cultures, malgré la différence chimique
des substances soumises à l'essai.

Nous nous sommes occupé ensuite de la croissance des A. Vine-
landii sur l'alcool éthylique et le benzoate.
Les expériences ont été menées de la même façon que précédemment.
Les milieux de culture contenaient toujours 1 % d'éthanol et
0,25 ou 0,50 ou 1 % de benzoate de soude.

Les résultats sont représentés dans les figures 1, 2, 3 et 4.
En examinant la figure 3 nous observons que la courbe de crois-
sance sur le milieu contenant 1 % d'éthanol se différencie forte-
ment de celles obtenus avec 0,25 et 0,50 % de benzoate de soude
dans le milieu.

Le même phénomène se manifeste avec 1 % d'éthanol et 1 % de ben-
zoate présents séparément dans le milieu nutritif. La différence
dans la vitesse de croissance du même germe sur ces deux substan-
ces nutritives en fonction du temps, est très remarquable. Le ben-
zoate est assimilé plus lentement que l'alcool éthylique.

En constituant maintenant un milieu contenant 1 % d'éthanol
et 0,25 ou 0,50 % de benzoate la courbe de croissance suit d'
abord celles du benzoate à 0,25 ou 0,50 % seuls présents dans le
milieu, pour évoluer ensuite de la même façon que celle de l'
éthanol.

Ceci nous démontre que ce germe, en présence de 0,25 % ou de
0,50 % de benzoate, assimile en premier lieu toujours l'acide
benzoïque avant de s'attaquer à l'éthanol. Les enzymes oxydatifs
régulant le métabolisme du benzoate sont donc constitutifs. Les
enzymes intervenant dans le métabolisme de l'éthanol le sont
également.

Lorsque l'éthanol à 1 % et le benzoate à 1 % sont simultanément présents dans le milieu nutritif, la courbe de croissance est similaire à celle obtenue avec l'éthanol à 1 % seul dans le milieu (figure 4). Pourtant l'effet cumulatif reste en ce qui concerne la fixation d'azote.

Le benzoate, dans ces conditions est oxydé en dernier lieu. La figure 4 exprime fort bien ce phénomène.

Ces processus sont très intéressants au point de vue enzymatique. En utilisant d'abord de faibles concentrations (0,25 à 0,50 %) de benzoate dans un mélange d'éthanol et de benzoate, les germes révèlent une inhibition de leurs enzymes nécessaires à l'oxydation de l'éthanol. Par contre avec un mélange de 1 % d'éthanol et de 1 % de benzoate se sont les enzymes provoquant l'oxydation du benzoate qui sont inhibés.

La préférence des enzymes dans un microorganisme n'est donc non seulement liée à la structure moléculaire du substrat, mais également à la concentration de la substance.

Ces expériences montrent également que la grandeur de la molécule de la substance nutritive ne joue pas un rôle prédominant. Les courbes de croissance représentés dans les figures 1 et 2 le prouvent. Aussi bien l'éthanol que le benzoate sont assimilés par les cellules d'Azotobacter, dans les mêmes proportions. Une fois que les substances ont traversé la membrane cellulaire se sont les enzymes qui règlent l'assimilation. Et cette assimilation est assujettie à un équilibre qui s'établit entre l'enzyme ou les enzymes d'une part et le substrat d'autre part.

C H A P I T R E V

ETUDE DU METABOLISME DU MANNITOL, DU BENZOATE DE SOUDE

ET DU SALICYLATE DE SOUDE PAR LES AZOTOBACTER.

En 1947, Stanier (109) développait pour la première fois sa nouvelle théorie sur l'adaptation simultanée, conséquence d'une technique qu'il utilisa plus tard pour déterminer la voie métabolique de certaines substances par des microbes, plus spécialement par le Pseudomonas fluorescens.

Cette théorie est basée en premier lieu sur l'axiome de Kluyver (110). D'après Kluyver, l'assimilation d'une substance par des bactéries est le résultat d'une série de réactions chimiques simples, mais bien ordonnées. Il s'en suit que l'oxydation complète, même d'une molécule organique, relativement petite, comprendra la formation d'un grand nombre de produits intermédiaires. Dans le cas des microorganismes, la probabilité existe, qu'au moins plusieurs de ces produits intermédiaires soient attaqués par des enzymes adaptatifs.

D'après la théorie sur l'adaptabilité enzymatique de Karström (111), les cellules adaptées à attaquer un substrat primaire, sont adaptées simultanément pour attaquer tous les produits intermédiaires formés pendant l'oxydation du premier substrat. Par contre les cellules adaptées sont incapables d'attaquer d'autres substances dont la dégradation est catalysée par d'autres enzymes adaptatifs. Donc, en cultivent des cellules sur une substance précise, ou sur des produits intermédiaires supposés, il doit être possible d'obtenir des évidences concernant les différentes étapes de la chaîne métabolique.

Stanier a basé sa théorie sur les trois postulats suivants :
1° Si la dégradation d'une substance A se fait par une série de produits intermédiaires B, C, D, E, F, G et que chaque étape individuelle de cette chaîne de réactions est sous le contrôle d'enzymes adaptatifs, alors la croissance sur un milieu con-

tenant le produit A produira des cellules qui sont simultanément adaptées aux substances B,C,D,E,F,G.....

2° Si la croissance sur la substance A, n'adapte pas les cellules à un produit supposé, X par exemple, alors X ne fait pas partie de la chaîne de réaction.

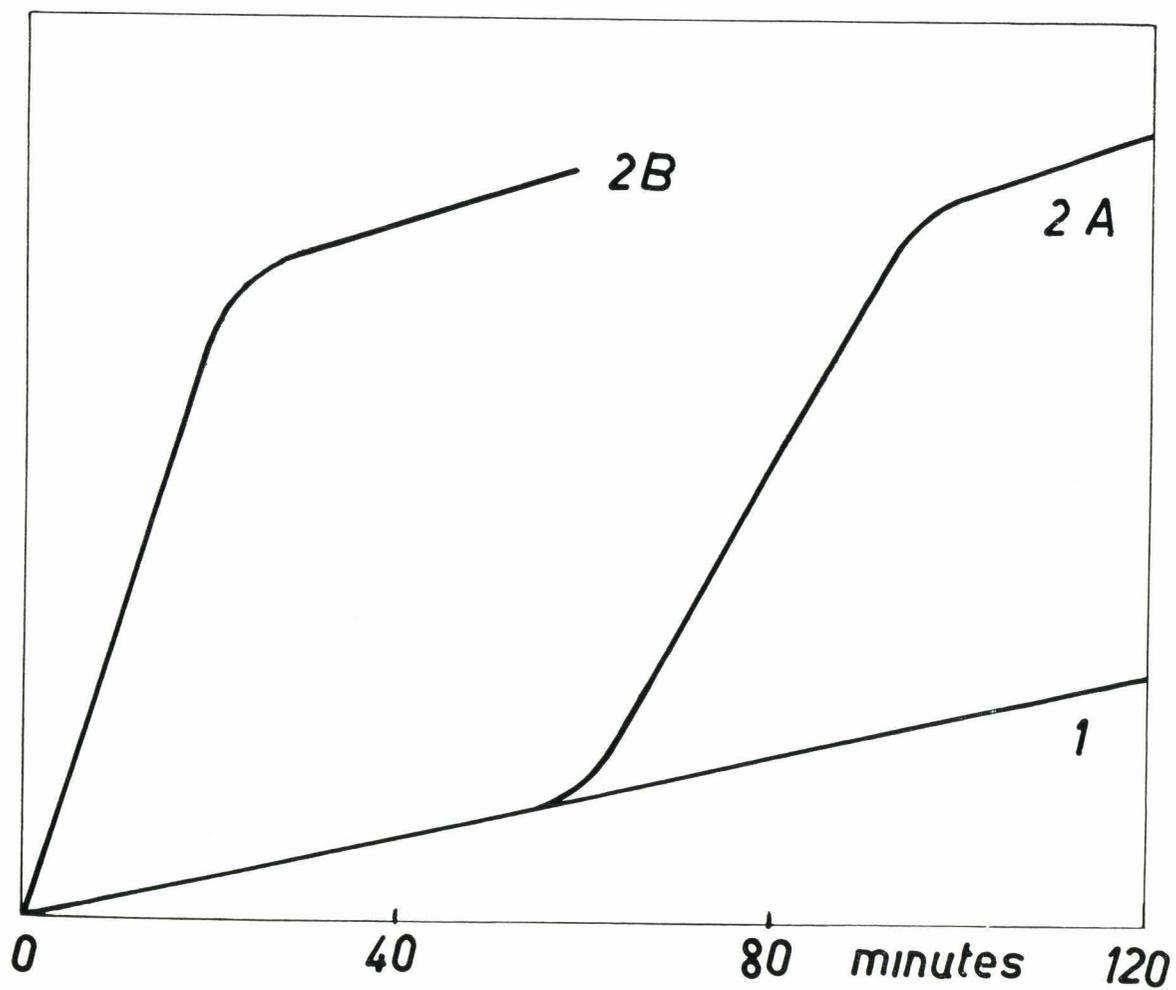
3° La croissance sur le produit E adapte les cellules aux substances F, G.... mais pas nécessairement à A, B, C et D. La probabilité que la croissance sur E adaptera les cellules aux précurseurs de E, diminuera avec le nombre des étapes. Une adaptation à D est plus probable qu'une adaptation à A.

Nous savons maintenant que lorsque les microbes sont cultivés sur une substance énergétique, cette même substance est oxydée en milieu aérobie suivant une ligne droite. C'est à dire, quand on expose, en fonction du temps, les quantités d'oxygène consommé par les germes, on obtient une ligne droite, sans phase d'adaptation. Par contre, quand on donne à des germes, cultivés sur une substance A, un produit à respirer, p r exemple X, ne faisant pas partie de la chaîne d'assimilation, la consommation d'oxygène suit pendant 40 à 70 minutes l'auto-respiration (respiration endogène) des cellules et après cette période seulement augmente exponentiellement jusqu'à l'épuisement du substrat.

L'exemple donné par Stanier est celui de cellules de Pseudomonas fluorescens cultivées sur une gélose-extrait de levures et de cellules cultivées sur gélose-minérale-benzoate. Dans la figure qui suit on remarque la courbe 1 qui exprime l'auto-respiration (respiration endogère) des cellules de ce germe sur les deux milieux. La courbe 2 A représente la consommation en oxygène sur le benzoate de cellules cultivées sur la gélose-extrait de levures. La courbe 2 B représente la consommation en oxygène sur le benzoate de cellules cultivées sur la gélose-minérale-benzoate.

On remarque donc cette longue phase (60 à 70 minutes) d'adaptation des cellules cultivées sans benzoate.

Nous pensons que la technique de l'adaptation simultanée peut nous aider à obtenir une meilleure vue d'ensemble sur l'assimilation de produits qui nous permettrait de mieux différencier les espèces d'Azotobacter. En même temps nous entrevoyons la possibilité de connaître les différents stades du métabolisme oxydatif de ces substances par les Azotobacter.



I. METABOLISME DU MANNITOL

=====

Nous avons déjà mentionné que le mannitol est une source de carbone qui nous permet de différencier les A. Vinelandii des A. agilis.

Nous avons donc en premier lieu étudié le métabolisme de cet alcool par les A. Vinelandii. Pour cela, nous avons utilisé la technique de l'adaptation simultanée préconisée par Stanier.

Avant d'entamer les expériences sur le mannitol, nous avons voulu nous rendre compte de la valeur de la technique en essayant le dextrose comme substance énergétique pour les cellules.

Stone et Wilson (112, 113) ont d'abord constaté, utilisant la technique respiratoire, que les cellules de leur souche d'A. Vinelandii "Original", cultivées sur un milieu avec sucrose n'étaient pas capables d'oxyder l'acide citrique et qu'elles présentaient une période d'adaptation assez variable pour l'oxydation des acides succinique, fumarique, malique et α -céto-glutarique. Par contre, les cellules peuvent oxyder immédiatement (en ligne presque droite) les acides acétique et pyruvique. En essayant des extraits cellulaires de ces germes (après broyage des cellules) ils constatent que tous les acides du cycle "acide citrique" sont oxydés sans phase d'adaptation. Même l'acide citrique était oxydé immédiatement. Les auteurs prétendent donc, que puisque l'oxydation des acides du cycle "acide citrique" s'effectue sans phase d'adaptation par l'extrait cellulaire, l'oxydation des glucides passe par le cycle tricarboxylique.

D'après ces auteurs, il semble que les cellules, cultivées sur un milieu à base de sucrose, sont pourvues des enzymes nécessaires pour oxyder les acides du cycle tricarboxylique et que la phase d'adaptation manifestée par le malate, le succinate ou le citrate s'explique par des phénomènes de perméabilité cellulaire.

Schutter et Wilson (114) ont ensuite étudié le comportement de différentes souches d'A. Vinelandii et d'A. agilis, cultivées sur le sucrose, vis-à-vis des produits intermédiaires

du cycle tricarboxylique. Nous constatons dans leur résultats que les cellules intactes de ces deux espèces produisent une oxydation des acides du cycle tricarboxylique avec une certaine phase d'adaptation qui ne dépasse jamais 60 minutes. L'oxydation du succinate par les A. Vinelandii évolue en présentant une phase d'adaptation plus longue que pour les A. agilis.

Dans leur publications, Karlsson et Barker (115)(116) prétendent que la dégradation des glucides par les A. Vinelandii ne s'effectue pas en passant par le cycle tricarboxylique. Ils déduisent cette affirmation de la constatation que l'acétate est oxydé avec une vitesse plus grande que tout autre produit.

De leur côté, Repaske et Wilson (117) dans des recherches très approfondies, ont trouvé tout d'abord que des cellules intactes d'A. agilis nécessitent une période d'adaptation parfois de 50 minutes avant de pouvoir oxyder les produits intermédiaires du cycle tricarboxylique, excepté pour l'acétate et le citrate. L'acétate est oxydé immédiatement; le citrate n'est pas oxydé, même après une heure. Les extraits cellulaires par contre peuvent oxyder ces acides immédiatement.

Ensuite, ils ont constaté que les extraits dialysés des A. agilis nécessitent des coenzymes similaires à ceux des enzymes correspondants qui règlent l'évolution du cycle tricarboxylique trouvé dans les tissus animaux. Ceux-ci comportent; la tri-phosphopyridine nucléotide (T.P.N.) pour l'oxydation du citrate;

le coenzyme A, la di-phospho-pyridine nucléotide (D.P.N.) et les ions de Mg pour l'oxydation de l' α -cétoglutarate; les ions de Mg, le coenzyme A et l'adénosine-tri-phosphate (A.T.P.) pour l'oxydation de l'acétate.

De toutes ces expériences ils concluent que la dégradation des glucides se déroule chez les Azotobacter agilis suivant le cycle tricarboxylique.

Il est généralement reconnu, actuellement, que la dégradation du sucrose par les Azotobacter Vinelandii et A. agilis se fait suivant le schéma tricarboxylique.

Nous avons d'abord examiné la respiration par la technique de Warburg (118), de cellules d'Azotobacter Vinelandii C-4, cultivées sur le dextrose, sur les produits intermédiaires du cycle tricarboxylique, donc sur le dextrose, l'acétate, le pyruvate, le succinate, le malate, le fumarate et le citrate.

Nous avons procédé de la façon suivante:

Azotobacter Vinelandii C-4

Cultivé sur Dextrose 1 %

Consommation d'oxygène en μ l.

Temps en minutes	Dextrose	Acétate	Pyruvate	Mannitol	Endogène
10	56	40	38	7	6
20	114	77	74	17	14
30	167	121	112	23	20
40	223	162	150	34	26
50	278	178	172	44	32
60	332	189	182	53	39
70	386	199	188	64	46

Temps en minutes	Succinate	Malate	Fumurate	Citrate	Benzoate
10	11	13	8	7	5
20	26	25	24	16	13
30	56	50	46	24	21
40	96	82	72	33	26
50	147	117	102	42	33
60	205	145	136	50	40
70	264	176	166	58	45

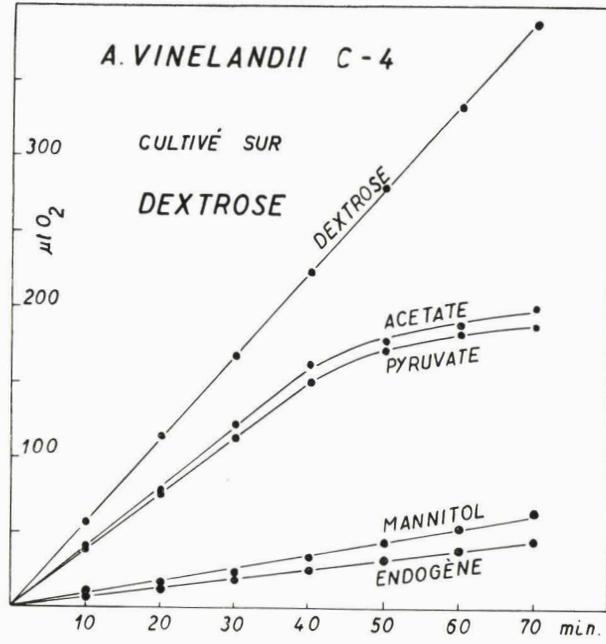


FIGURE 1

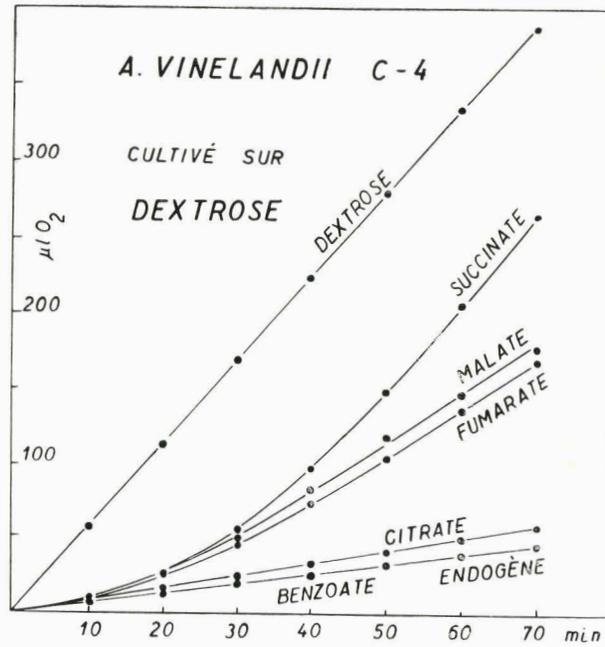


FIGURE 2

Les A. Vinelandii C-4 sont cultivés dans des fioles d'Erlenmeyer contenant 50 ml du milieu minéral, décrit page 84, enrichi de 1 % de dextrose. Après une culture de 24 heures à 28° C dans un appareil à secousses thermostatisé, 5 ml de la culture servaient comme inoculum à un deuxième Erlenmeyer contenant le même milieu nutritif. Après une culture similaire à 28° C, une centrifugation à 6000 tours/minute pendant 20 minutes rassemble les cellules. Celles-ci sont lavées deux fois avec une solution de KCl 0,02 M. Finalement elles sont mises en suspension dans une solution de KCl 0,02 M.

Les cuvettes de Warburg sont remplies de:

- 0,1 ml de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ M/50
- 0,4 ml de solution tamponnée phosphatée 0,067 M de pH = 7,0
- 0,5 ml de suspension microbienne
- 0,2 ml d'une solution de soude caustique à 20 %
- 0,5 ml d'une solution aqueuse de substance énergétique à M/10.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

Les figures 1 et 2 représentent les courbes respiratoires.

Nous pouvons constater que le dextrose, l'acétate et le pyruvate sont utilisés exponentiellement, suivant une ligne droite. Par contre, le succinate, le malate et le fumarate sont utilisés après une phase d'adaptation qui dans tous les cas ne dépasse pas 30 minutes. Le citrate n'est pas utilisé pendant les 70 premières minutes.

Des résultats analogues ont été obtenus avec les autres souches d'Azotobacter Vinelandii.

En plus nous avons examiné le mannitol et le benzoate et nous remarquons que ces deux sources de carbone présentent une longue phase d'adaptation (au delà de 70 minutes) pour les cellules cultivées sur le dextrose.

Ces premières expériences nous ont permis de nous familiariser avec la technique et nous ont convaincu de deux choses:

- 1° - le contrôle de la respiration de cellules d'Azotobacter, cultivées sur le dextrose, avec les différentes substances faisant partie du cycle tricarboxylique est possible avec la technique préconisée par Stanier.
- =====

2° - les substances, comme le mannitol et le benzoate, qui ne font pas partie de la chaîne de dégradation du dextrose ne sont pas utilisées. Il est donc facile de déceler avec cette technique si une substance quelconque se trouve sur la voie métabolique d'un produit.

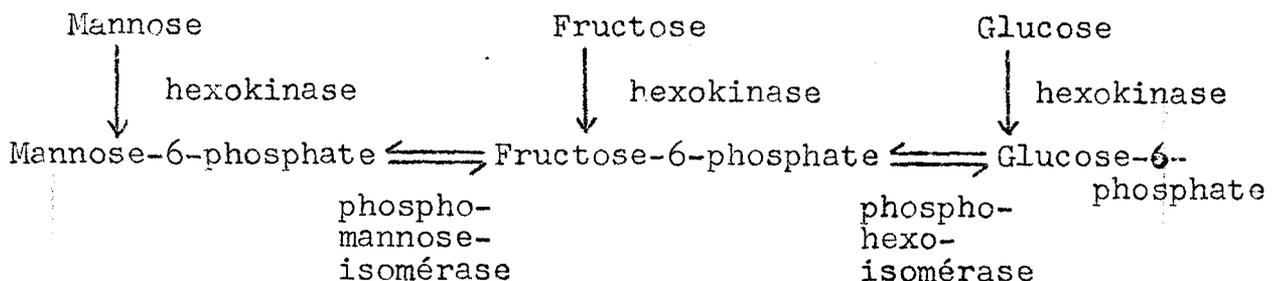
Après ces premières expériences nous nous sommes occupés de la dégradation du mannitol par les A. Vinelandii.

Concernant le métabolisme du mannitol par des microorganismes et des tissus animaux, des recherches ont déjà été effectuées par différents chercheurs.

Kunitz et ses collaborateurs (119) ont pu isolé et cristallisé dans la même année que Berger et ses collaborateurs (120) une hexokinase de levure. Ce ferment est activé par des ions de magnésium à environ 10^{-3} M et catalyse la phosphorylation du glucose, fructose, mannose et glucosamine par l'adénosine-tri-phosphate. Les vitesses de réaction pour le glucose, le fructose et le mannose sont respectivement 1,0, 1,4 et 0,3, bien que l'affinité pour le fructose de la part de l'enzyme soit moins pronocée que pour les autres aldoses.

Plus tard Slein (121) a isolé de muscles de lapin la phosphomannoisomérase. Cet enzyme catalyse la conversion du mannose-6-phosphate en un mélange de glucose-6-phosphate et fructose-6-phosphate.

Se basant sur ces recherches, Baldwin (122) accepte que le mannose peut être phosphorylé par la hexokinase et produit le mannose-6-phosphate. Qui, à son tour, donne, en présence de la phospho-mannose-isomérase et la phospho-hexo-isomérase, un mélange équilibré de 6-phosphates de glucose et de fructose. Baldwin présente alors le schéma suivant :



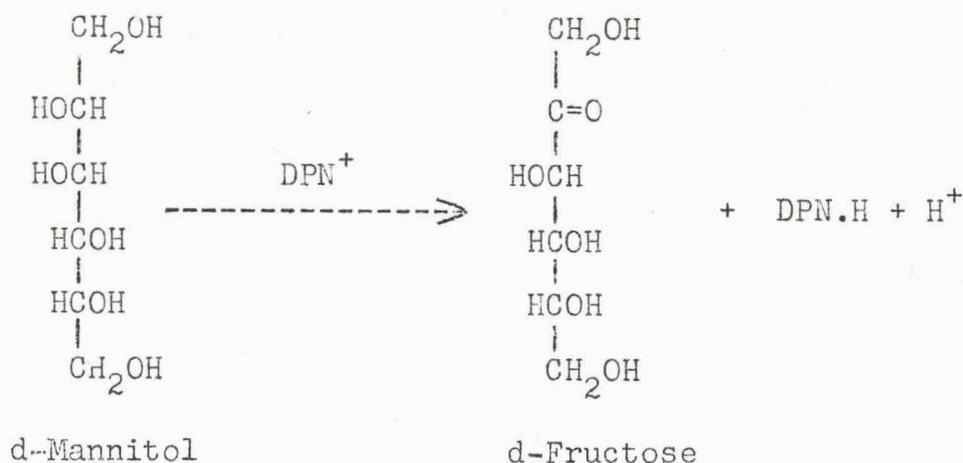
A partir du glucose-6-phosphate le métabolisme prend la voie du cycle tricarboxylique.

La conversion du mannitol en mannose ou d'autres substances fut également étudiée. Ainsi nous connaissons les recherches effectuées par Mc Corkindale (123) sur les polyol-déshydrogénases. Ce chercheur a trouvé que le mannitol est une substance nutritive typique pour les Acetobacter suboxydans. Il a trouvé également que le mannitol est oxydé par les Acetobacter suboxydans en fructose. D'après la règle de Bertrand-Hudson, les polyols acycliques sont oxydés en cétooses par l'A. suboxydans quand ils possèdent les configurations suivantes :



L'oxydation s'effectuerait au deuxième atome de carbone.

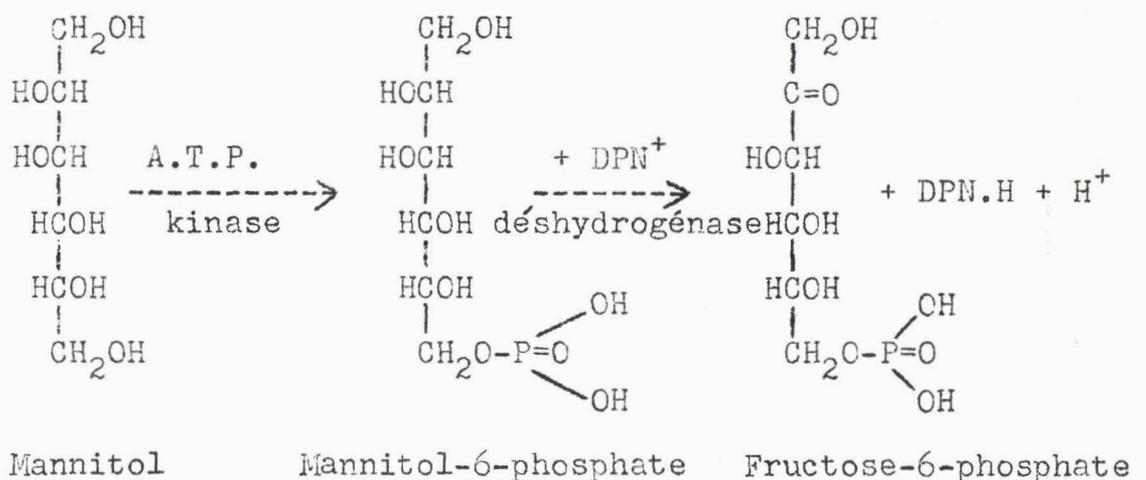
Mc Corkindale a constaté que cette oxydation typique se présente chez les A. suboxydans et il donne le nom de d-mannitol-déshydrogénase à l'enzyme responsable de cette oxydation. Cet enzyme est soluble et contient le diphospho-pyridine-nucléotide. Ce coenzyme peut être extrait des cellules d'A. suboxydans. Le polyol-déshydrogénase isolée du foie de rats serait incapable de catalyser cette oxydation. D'après cet auteur on peut donc présenter l'oxydation du mannitol par des A. suboxydans suivant le schéma :



Les recherches effectuées par Marmur et ses collaborateurs (124) doivent également attirer notre attention. Ces auteurs ont travaillé avec des Diplococcus pneumoniae, utilisant le mannitol comme source énergétique et des mutants n'utilisant pas ce polyol. Ils ont réussi à transmettre de l'acide désoxy-ribonucléique des souches originales aux souches mutantes et ces dernières étaient capables après ce transfert de métaboliser également le mannitol. Partant de ces nouvelles souches ils ont constaté :

- 1° - que les cellules mutantes, transformées, se développent très bien sur le mannitol et métabolisent cet alcool sans phase d'adaptation.
- 2° - que le mannitol n'est pas métabolisé par des extraits cellulaires de ces germes, cultivés sur le mannitol. L'oxydation du mannitol par ces extraits cellulaires n'était pas décelable dans les expériences respiratoires. La réduction de la diphospho-pyridine-nucléotide ou de la tri-phospho-pyridine-nucléotide n'était pas mesurable non plus.
- 3° - le mannitol serait donc phosphorylé avant d'être oxydé. En effet les extraits cellulaires sont capables d'oxyder le mannitol-phosphate en présence de la diphospho-pyridine-nucléotide. Le produit d'oxydation fut déterminé. Il s'agit du fructose-6-phosphate et non du mannose-6-phosphate. L'enzyme responsable de cette oxydation fut dénommé la mannitol-phospho-déshydrogénase.

Nous pouvons donc d'après les recherches de Marmur construire le schéma suivant :



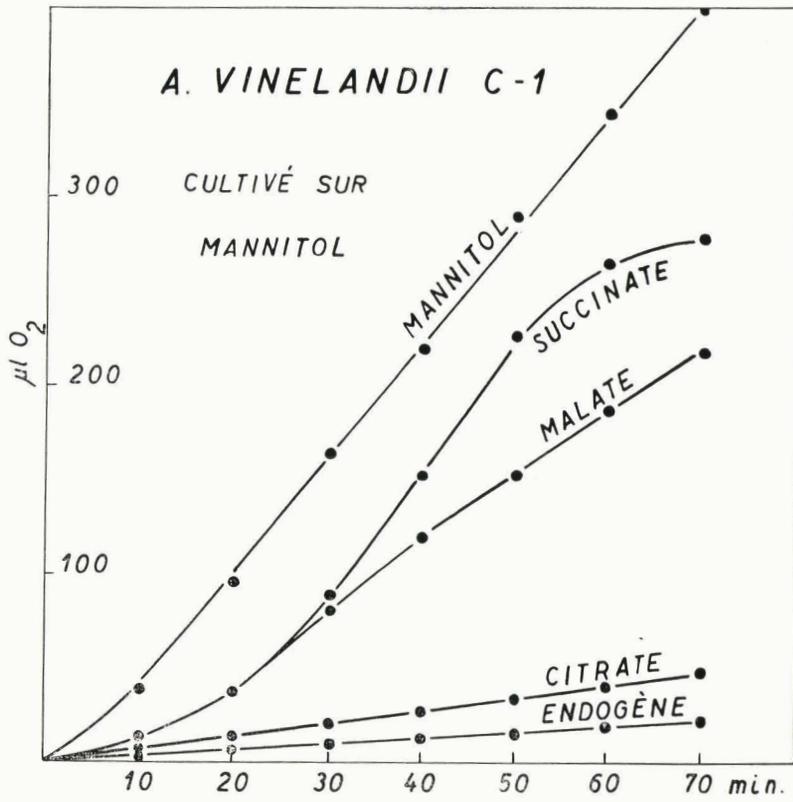


FIGURE 3

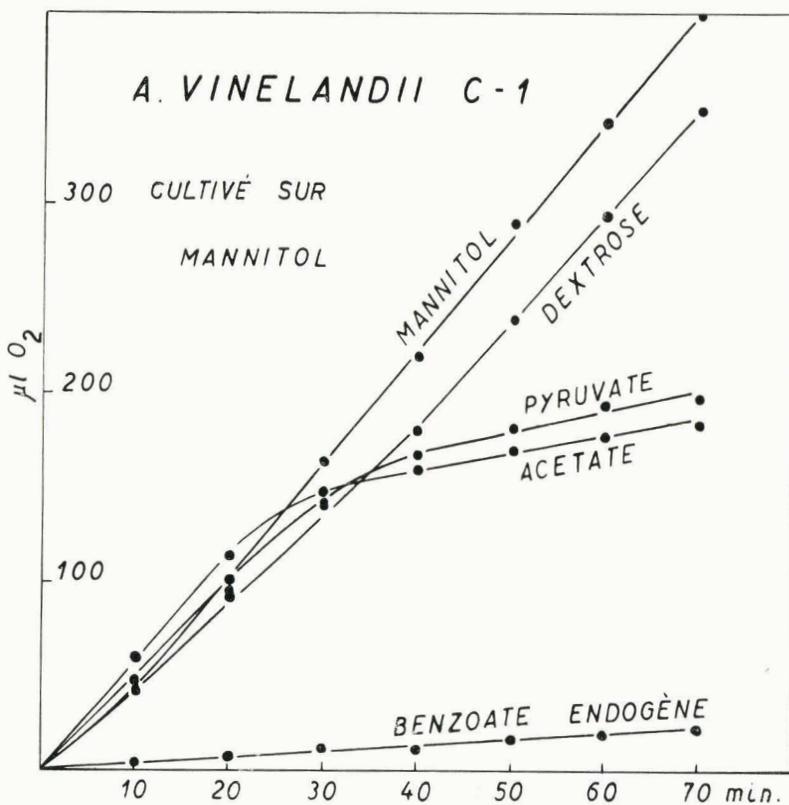


FIGURE 4

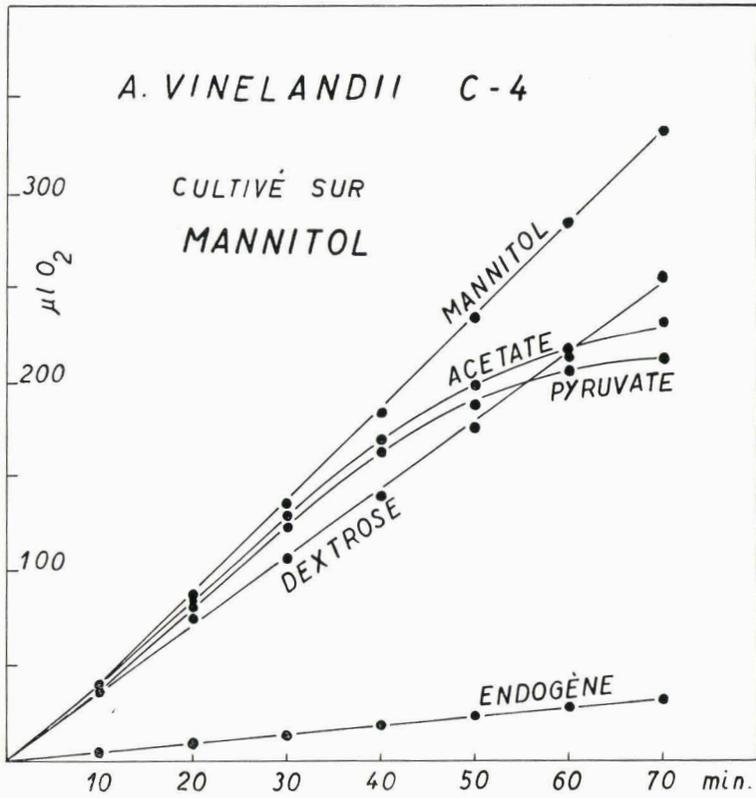


FIGURE 5

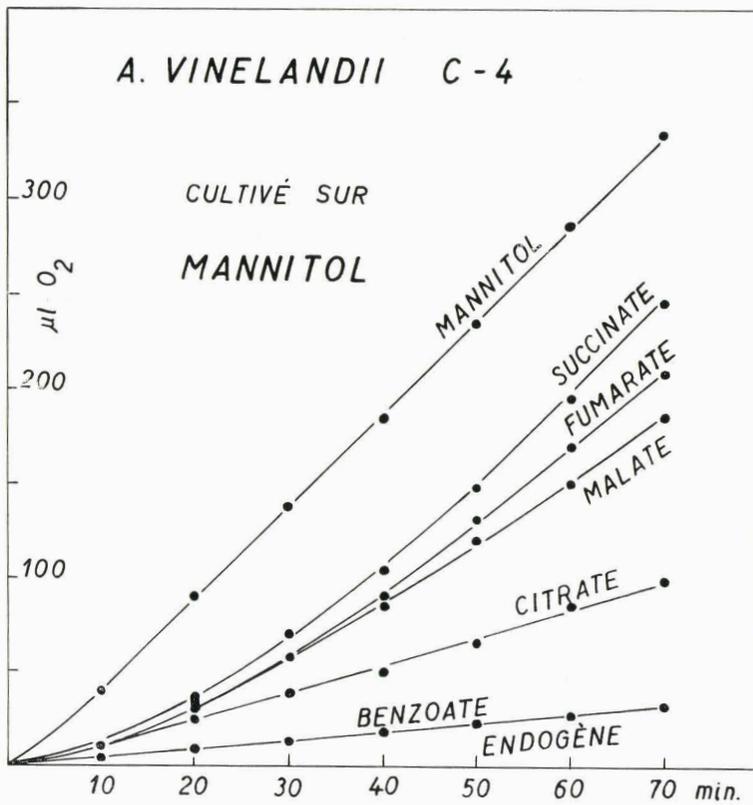


FIGURE 6

Nous nous trouvons donc à première vue devant deux schémas contradictoires. Remarquons toutefois que les deux auteurs ont travaillé avec deux microorganismes tout à fait différents.

Pour l'examen de la dégradation du mannitol par les A. Vinelandii nous avons utilisé deux souches : A. Vinelandii C-1 et C-4.

Les techniques de culture et de respiration étaient les mêmes comme pour le dextrose.

Les figures 3, 4, 5 et 6 nous présentent les résultats obtenus.

Nous constatons tout d'abord que le dextrose est dégradé par les cellules d'A. Vinelandii, cultivées sur le mannitol, avec une consommation d'oxygène qui s'écoule exponentiellement en fonction du temps. On peut donc admettre à première vue que le dextrose est un produit intermédiaire dans le métabolisme du mannitol. D'autre part, le pyruvate, l'acétate, le succinate, le malate et le fumarate sont utilisés sans ou avec une légère phase d'adaptation. Cette phase d'adaptation est moins longue pour les cellules cultivées sur le mannitol que sur le dextrose.

Il nous semble donc qu'on peut déduire de ces expériences que les cellules d'A. Vinelandii cultivées sur le mannitol métabolisent le mannitol en passant par le dextrose et le cycle tricarboxylique.

En tenant compte des observations des chercheurs mentionnés et en examinant les résultats que nous avons obtenu, nous pensons que le métabolisme du mannitol par les Azotobacter se fait de la façon suivante :

Comme il est généralement admis que le premier stade dans le métabolisme de glucides ou de produits analogues consiste dans une phosphorylation du produit en question, nous pouvons considérer que le mannitol, une fois la membrane cellulaire passé, est phosphorylé par une kinase et avec l'intervention de l'adénosine-triphosphate en mannitol-6-phosphate. Ensuite, sous l'action d'une déshydrogénase et de la diphospho-pyridine-nucléotide, il se formerait du fructose-6-phosphate. Les cellules d'Azotobacter cultivées sur le mannitol possèdent donc deux enzymes initiaux : une kinase puis une déshydrogénase.

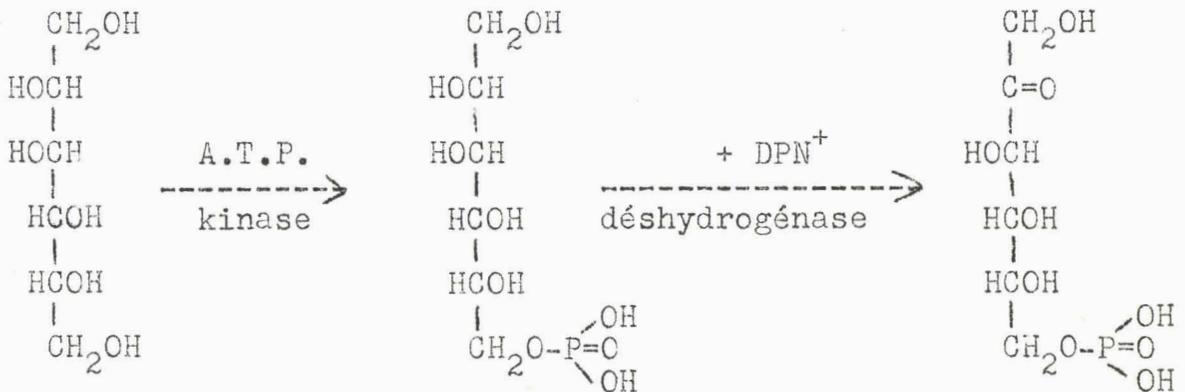
Examinons maintenant le phénomène du métabolisme du dextrose par les cellules d'Azotobacter, cultivées sur le mannitol. Pour ces cellules, une fois le dextrose en contact avec les enzymes du

cytoplasme, il serait phosphorylé par une kinase et avec l'aide de l'adénosine-tri-phosphate. On obtient ainsi le glucose-6-phosphate. Par l'action de la phospho-hexo-isomérase, le fructose-6-phosphate est formé. Il existe donc un équilibre entre le glucose-6-phosphate et le fructose-6-phosphate.

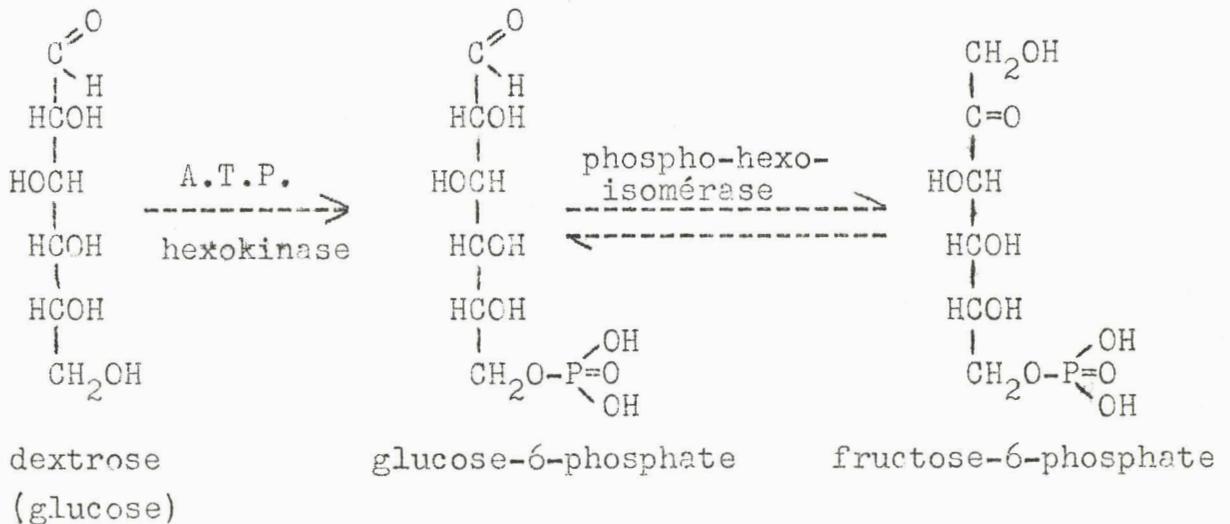
Nous pouvons donc admettre le schéma suivant :

Cellules cultivées sur le mannitol.

Premiers stades du métabolisme du mannitol :



Premiers stades du métabolisme du dextrose :



Les Azotobacter cultivés sur le mannitol possèderaient donc une phospho-hexo-isomérase qui leur permettrait de métaboliser le glucose-6-phosphate. Quand on donne à ces cellules le glucose, celui-ci serait phosphorylé en premier lieu et entrerait en équilibre sous l'action de la phospho-hexo-kinase avec le fructose-6-phosphate.

De cette manière la respiration exponentielle du dextrose par des cellules d'Azotobacter, cultivées sur le mannitol, est explicable

Le cas des A. agilis, ne se développant pas sur le mannitol, doit donc être interprété par une absence totale chez cette espèce de la déshydrogénase catalysant le passage du mannitol-6-phosphate au fructose-6-phosphate.

L'absence de cette déshydrogénase est un caractère physiologique essentiel des A. agilis. Ce caractère les différencie des A. Vinelandii.

II. METABOLISME DU BENZOATE.

=====

Déjà en 1932, Winogradsky (103) avait prouvé que l'acide benzoïque est oxydable par les Azotobacter. Plus tard, Tchan (125) a montré que le terme final de l'oxydation de l'acide benzoïque par les Azotobacter, serait un "corps noir", apparenté à l'humus du sol. En outre, Tchan (126) pensait que les Azotobacter sécrétaient des exoenzymes capables d'oxyder l'acide benzoïque en un corps analogue à l'humus. L'acide salicylique, formé sous l'influence d'une oxydase (la benzoatase), serait un terme intermédiaire de cette oxydation. Mais Tchan ne précise pas avec quelle souche il a expérimenté.

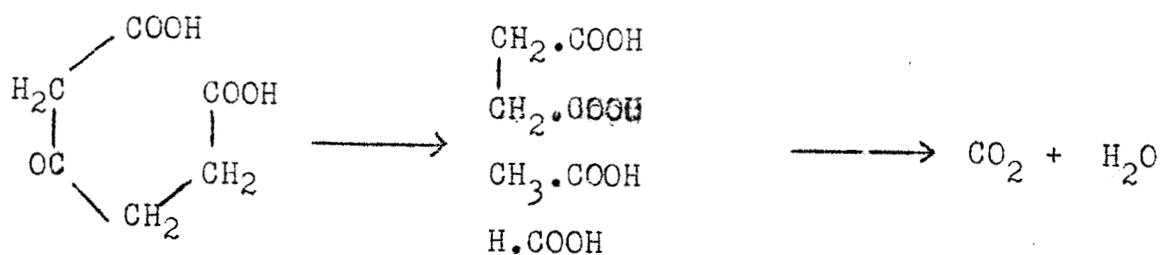
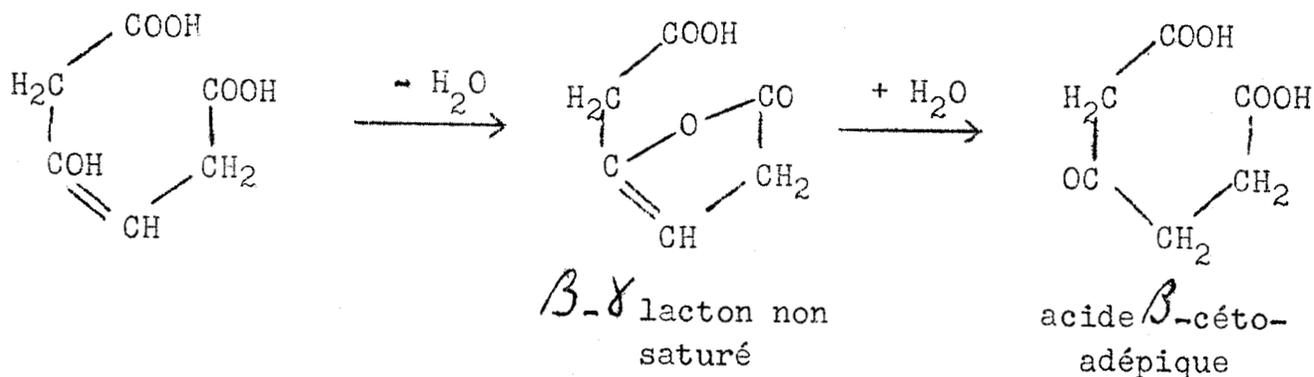
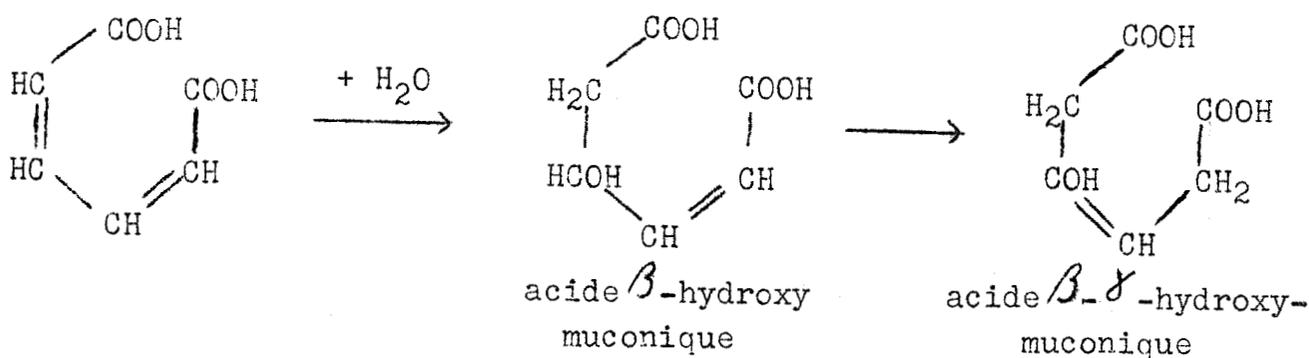
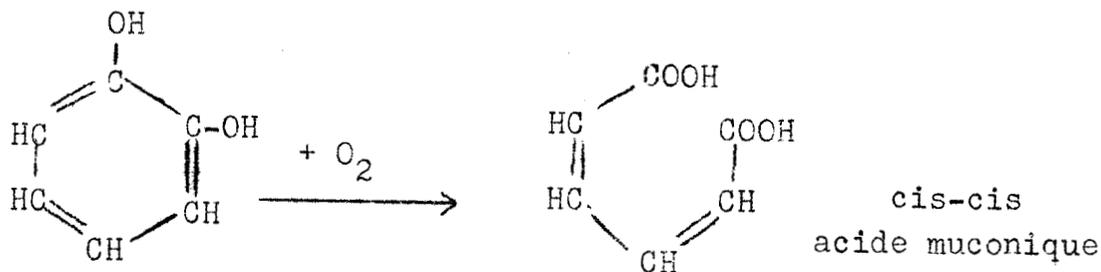
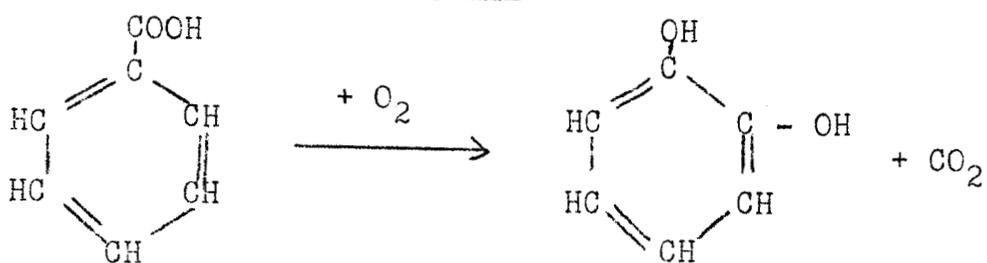
D'autres recherches ont été effectuées avec différentes bactéries. Signalons les travaux de Stanier (127)(128)(129)(130), de Evans (131)(132)(133)(134) de Happold (135) et de Kilby (136). Tous ces chercheurs ont travaillé soit avec des Vibrio, soit avec des Pseudomonas. La plupart de ces recherches ont été résumées et critiquées par Happold (135) et Evans (134).

Il ressort de ces travaux qu'on peut trouver dans le sol, des bactéries organotrophiques qui sont capables de métaboliser des produits aromatiques, comme le phénol, l'acide benzoïque, l'acide parahydroxy-benzoïque, le para-crésol et même le naphthalène.

En ce qui concerne l'acide benzoïque, on reconnaît actuellement que les germes organotrophiques, utilisant l'azote sous forme ammoniacale, métabolisent cet acide organique suivant le schéma mentionné ci-joint.

En examinant ce schéma, nous remarquons d'abord que l'acide benzoïque est oxydé en premier lieu en catéchol. Ce dernier produit subirait ensuite une oxydation et on obtiendrait l'acide cis-cis

SCHEMA



muconique. Cette dernière molécule passerait par une série de produits intermédiaires à l'acide β -céto-adépique. A partir de ce produit l'oxydation continuerait en passant par l'acide succinique vers finalement le CO_2 et H_2O .

Nous n'avons pas trouvé dans la bibliographie, à part les recherches effectuées par Tchan, de travaux sur le métabolisme de l'acide benzoïque par les Azotobacter.

Il nous a semblé important étant donnée la différenciation qui existe entre les A. Vinelandii et les A. agilis dans le comportement vis-à-vis de l'acide benzoïque, de nous rendre compte des stades métabolitiques de la dégradation de cet acide aromatique par les Azotobacter. L'emploi des Azotobacter comme matériel biologique pour l'étude de la dégradation du benzoate nous semble logique pour les raisons suivantes :

- 1° - Ces germes sont entièrement oxydatifs, ce qui élimine la présence simultanée de système fermentatif.
- 2° - Les Azotobacter peuvent oxyder un grand nombre de produits organiques.
- 3° - Les oxydations sont complètes.
- 4° - Les Azotobacter n'ont pas besoin de la présence d'azote combiné, ni de facteurs de croissance, pour accomplir ces oxydations. Un milieu minéral simple leur permet de métaboliser des produits organiques présents.

Nous avons d'abord examiné le métabolisme des A. chroococcum et des A. Beijerinckii cultivés sur le benzoate.

Les germes, cultivés sur gélose-mannitol inclinée, sont mis en suspension dans de l'eau stérile. Des fioles d'Erlenmeyer contenant 50 ml de la solution minérale pourvue de 0,25 % de benzoate de soude, sontensemencées, après stérilisation, avec 1 ml de la suspension microbienne. Les cultures sont placées dans un appareil à secousses thermostatisé à 28° C pendant 48 heures. Ensuite elles sont centrifugées à 6000 tours/minute pendant 20 minutes. Les cellules rassemblées sont lavées deux fois avec une solution stérile de KCL 0,02 M. Finalement elles sont mises en suspension dans une solution stérile de KCL 0,02 M. Les cuvettes de Warburg sont remplies de la façon suivante :

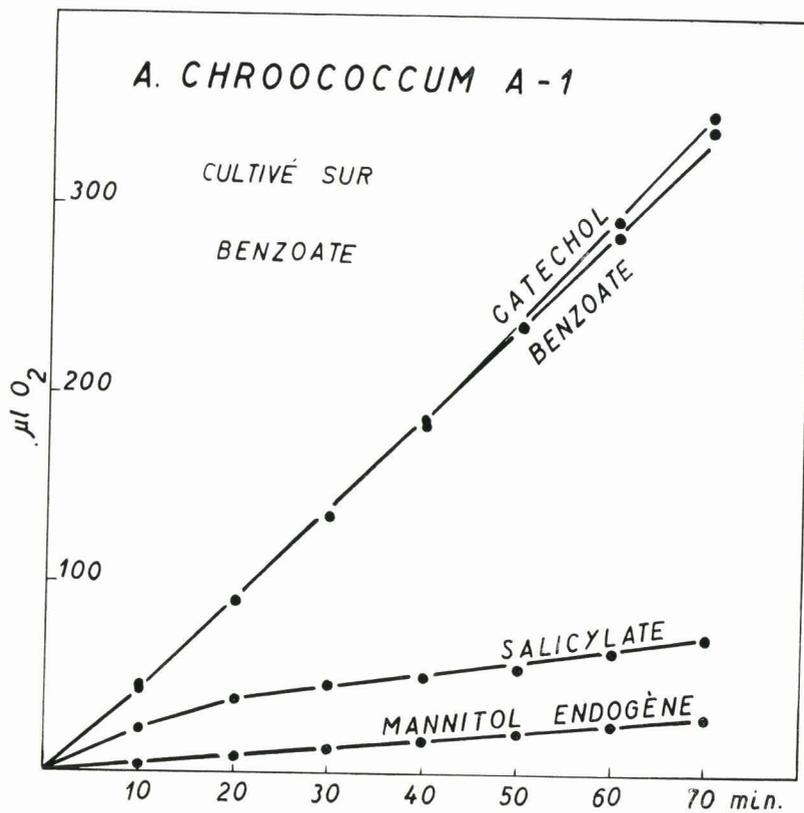


FIGURE 7

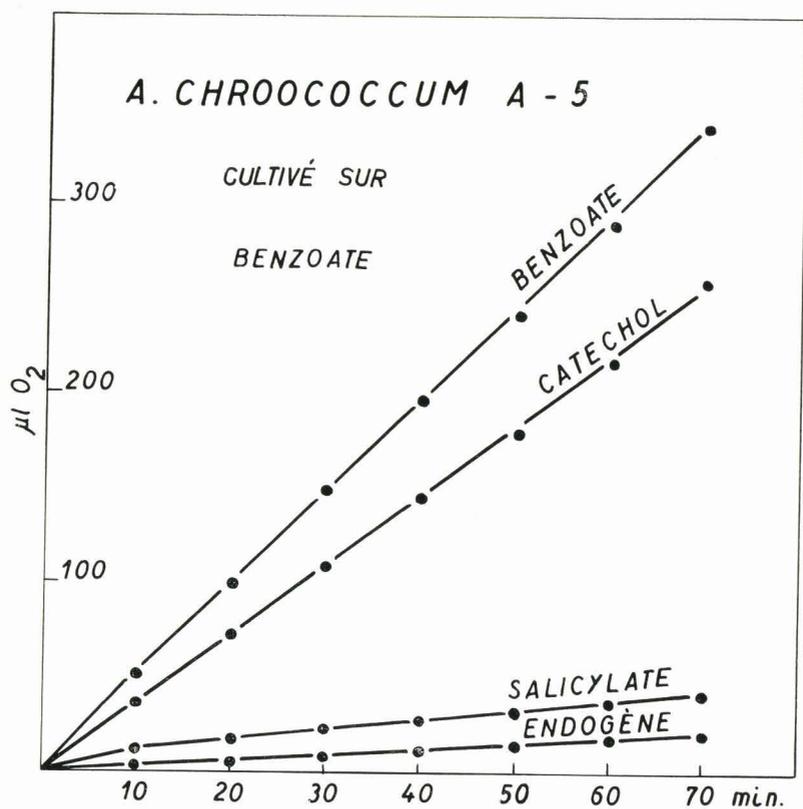


FIGURE 8

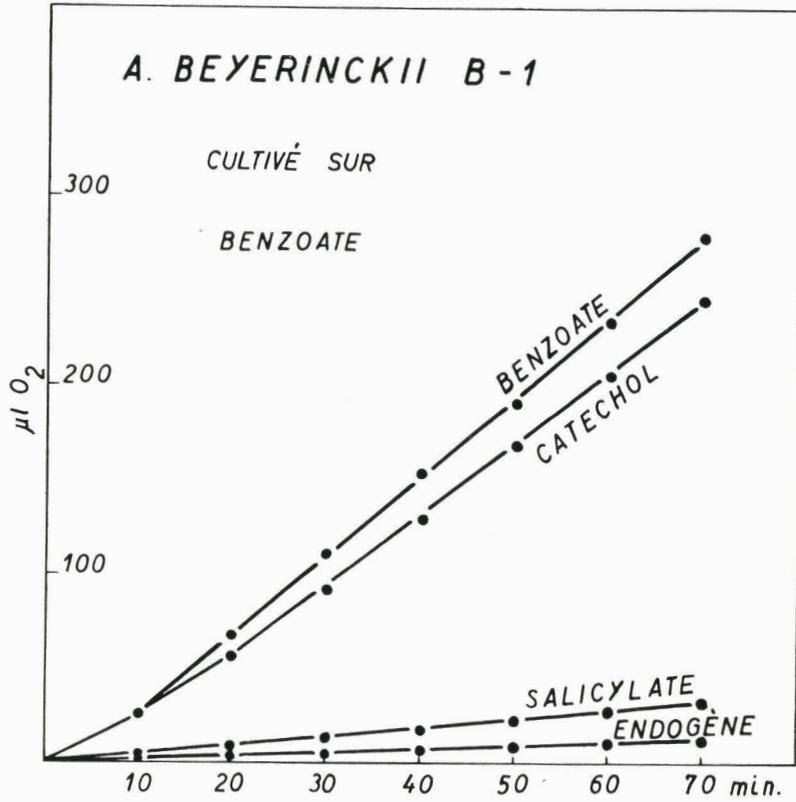


FIGURE 9

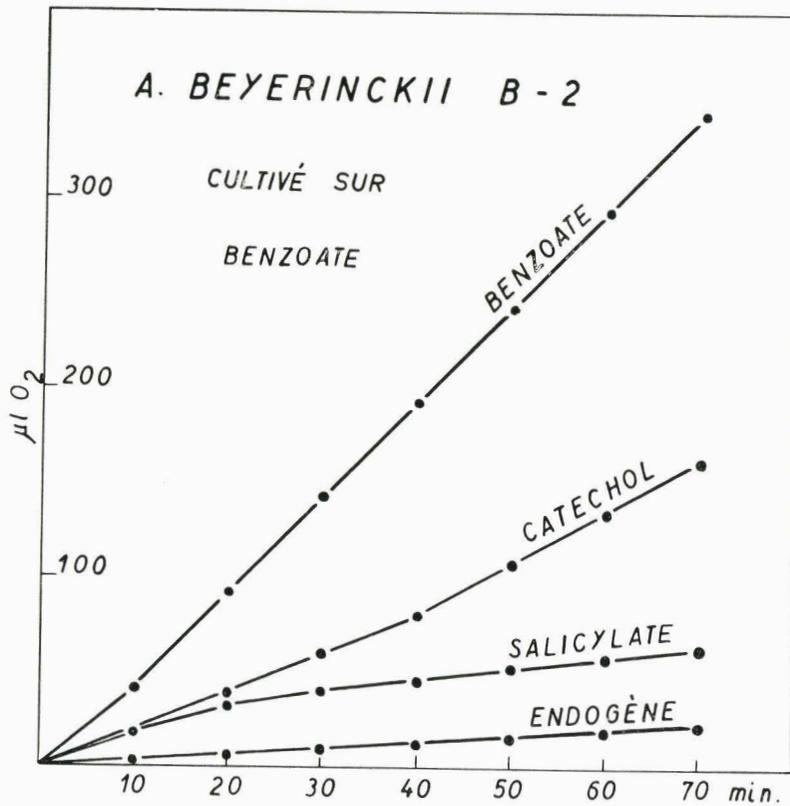


FIGURE 10

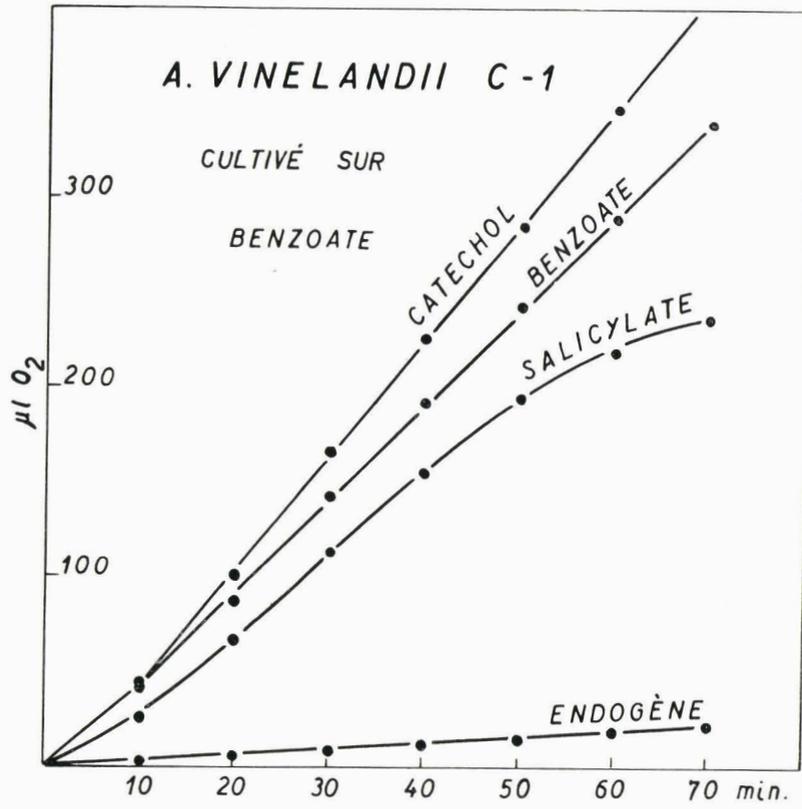


FIGURE 11

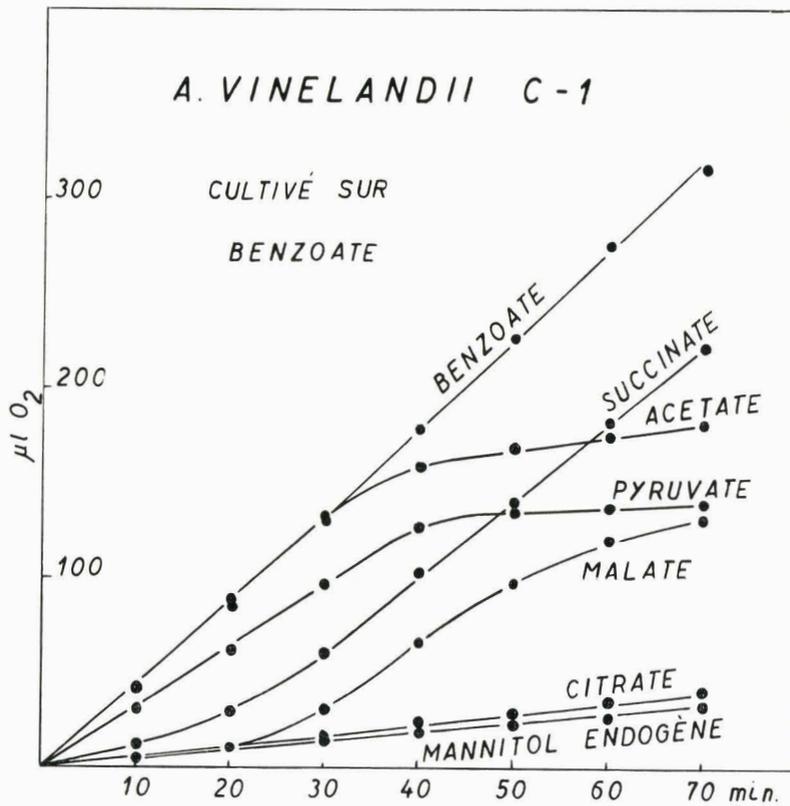


FIGURE 12

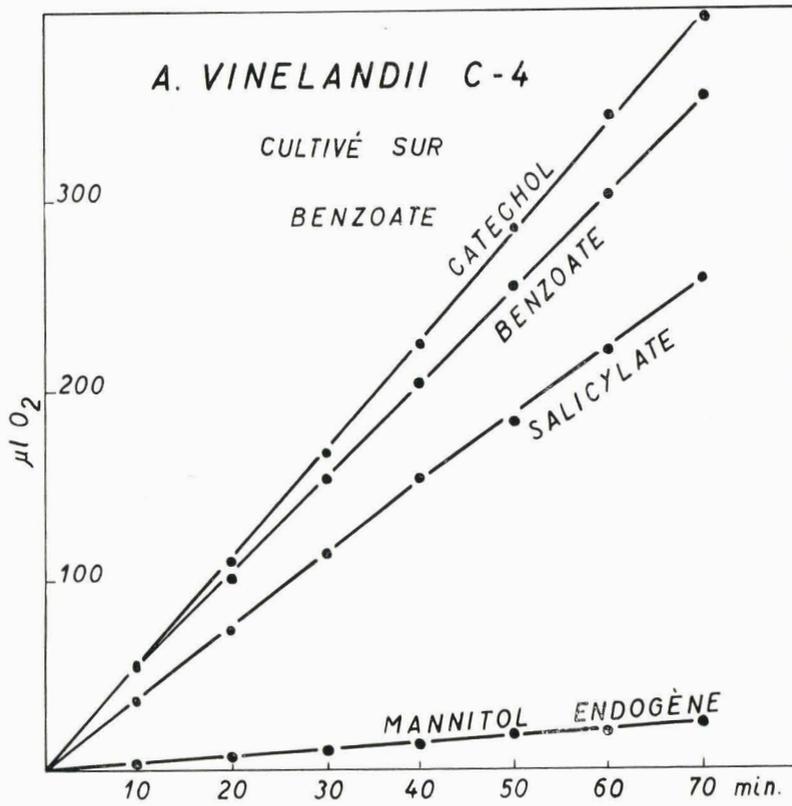


FIGURE 13

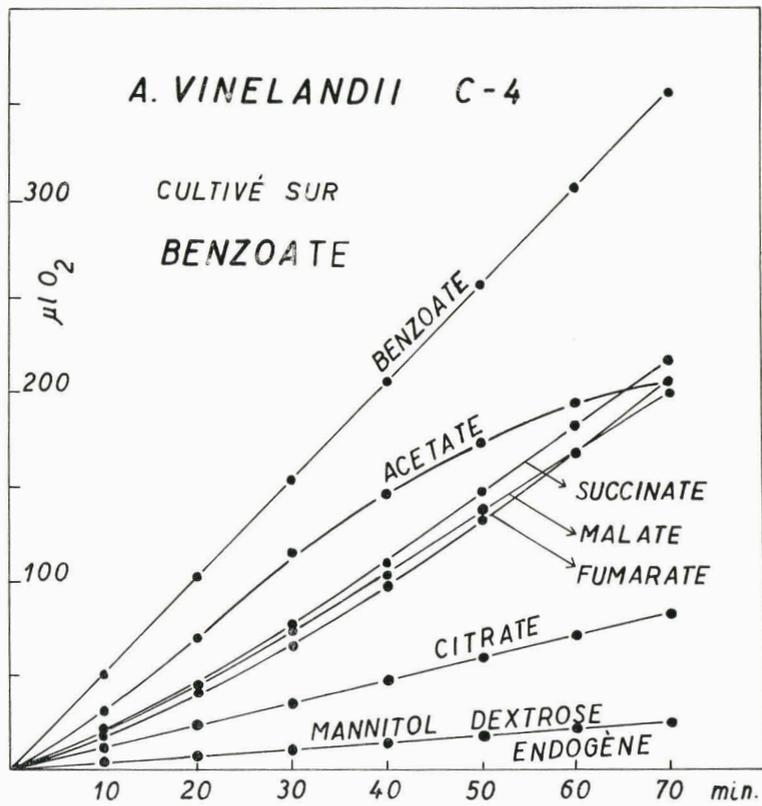


FIGURE 14

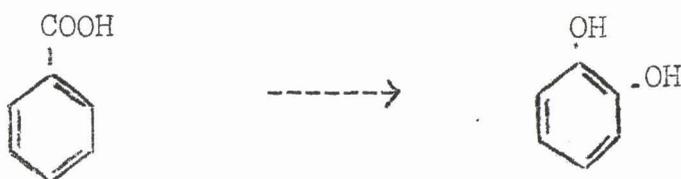
- 0,1 ml de solution $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,02 M
- 0,4 ml de solution tampon phosphatée 0,067 M (pH = 7,0)
- 0,2 ml de solution de KOH 20 %
- 0,5 ml de suspension microbienne
- 0,5 ml de solution de substance énergétique 0,05 M

La consommation d'oxygène est contrôlée toutes les 10 minutes, à une température de 28° C.

Les figures 7, 8, 9 et 10 présentent les résultats obtenus.

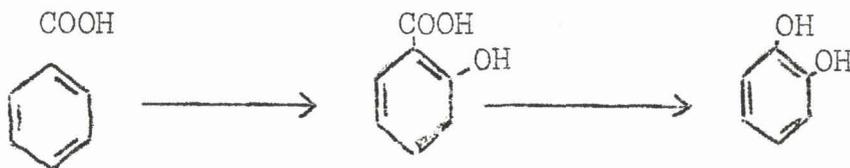
Nous pouvons constater que le benzoate de soude est utilisé suivant une ligne droite, en fonction du temps. Ceci est également le cas pour le catéchol. Par contre le salicylate n'est pas consommé, ni le mannitol.

Ces résultats nous permettent de proposer que le catéchol, est un produit intermédiaire dans le métabolisme du benzoate par les A. chroococcum et les A. Beijerinckii. Nous pouvons donc prévoir que le stade suivant peut se réaliser dans ce métabolisme :



Le salicylate ne figure pas à première vue sur la voie métabolique du benzoate par ces Azotobacter.

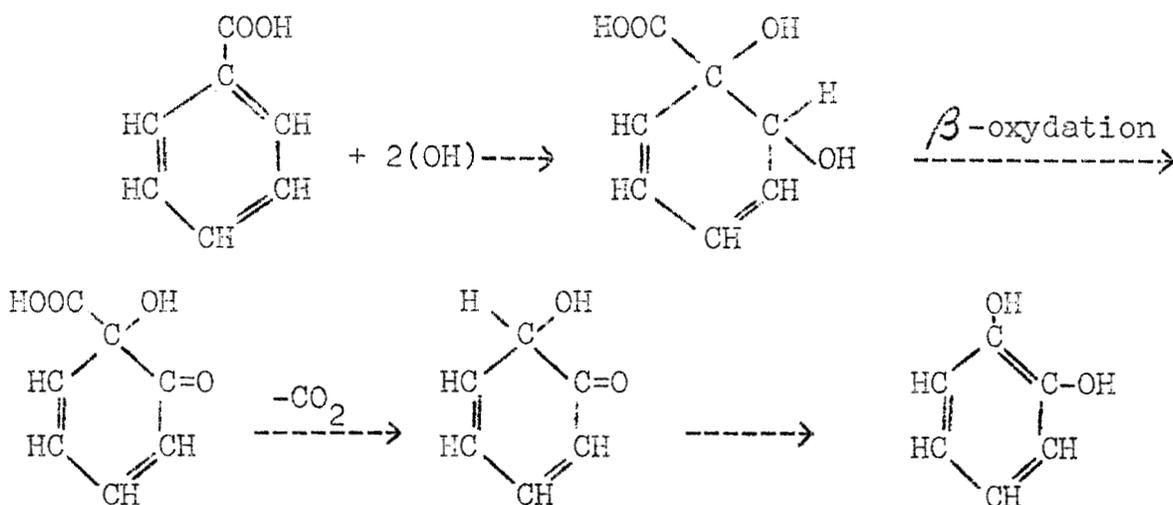
L'examen du métabolisme du benzoate par les A. Vinelandii C-1 et C-4 fut effectué de la même façon que pour les A. chroococcum et A. Beijerinckii. Les figures 11, 12, 13 et 14 présentent les résultats obtenus. Pour ces deux germes nous avons trouvé que le benzoate, le catéchol et le salicylate sont métabolisés avec une consommation en oxygène qui se déroule d'une façon exponentielle. On peut donc déduire de ces expériences que pour les A. Vinelandii, le catéchol et le salicylate sont des produits intermédiaires dans le métabolisme du benzoate. Ceci nous permet de proposer que les stades suivants se présentent dans ce métabolisme.



Nous pouvons donc conclure que le métabolisme du benzoate par les A. chroococcum et A. Beijerinckii d'une part et des A. Vinelandii d'autre part diffère profondément.

En effet, l'oxydation du benzoate par les A. chroococcum et A. Beijerinckii paraît aboutir directement à la formation du catéchol.

Cette réaction implique l'introduction simultanée de deux groupes hydroxyles. Théoriquement cette conversion directe de benzoate en catéchol peut se faire en deux stades : une hydroxylation suivi d'une décarboxylation oxydative. Les réactions suivantes expliquent cette possibilité :



Par contre les A. Vinelandii présentent un aspect nouveau dans la conversion du benzoate en catéchol. Ici on assiste à une introduction successive des groupes hydroxyles dans la molécule benzénique. Il reste naturellement à voir si la décarboxylation de l'acide salicylique s'accomplit en une ou deux étapes.

Pour les trois espèces, le catéchol est un produit "clef" dans le métabolisme du benzoate. C'est à partir du catéchol que le métabolisme continue et nous observons (figure 14) que les produits du cycle tricarboxylique sont utilisés exponentiellement par les cellules cultivées sur le benzoate. On peut donc prévoir qu'à partir du catéchol la molécule aromatique doit être scindée pour donner naissance à un produit aliphatique, par exemple l'acide β -céto-adipique. Ce dernier acide est le point de départ pour l'accomplissement du cycle tricarboxylique par ces germes.

Les courbes respiratoires du succinate, acétate, pyruvate et malate nous prouvent indiscutablement que ces produits font partie du métabolisme du benzoate. Comme pour le cycle tricarboxylique des cellules cultivées sur le dextrose ou le mannitol, nous constatons qu'ici aussi le citrate n'est pas utilisé suivant une ligne droite.

A la suite de ces expériences manométriques, nous avons voulu nous rendre compte de la présence des substances intermédiaires par voie chimique. Pour cela, nous avons cultivé des A. Vinelandii C-1 en grandes quantités sur du benzoate et nous avons essayé d'identifier par la chromatographie de partage sur papier, la présence de ces produits dans le milieu de culture.

Dans un grand ballon de 6 litres nous avons stérilisé 4 litres de la solution minérale additionnée de 0,5 % de benzoate de soude. Le milieu futensemencé avec 200 ml d'une culture A. Vinelandii C-1 cultivée sur le même milieu pendant 48 heures en fioles d'Erlenmeyer secouées. L'aération du milieu fut effectuée par de l'air stérilisé sur mélange coton-charbon actif. Après une culture à 28° C pendant 48 heures, le milieu est acidifié avec de l'acide sulfurique à pH=3 et ensuite centrifugé à 6000 tours/minute. Le liquide surnageant est ensuite extrait avec de l'éther sulfurique dans un extracteur liquide-liquide.

Nous avons ainsi obtenu une poudre blanche (I). Nous avons constaté que cette poudre contenait encore de l'acide benzoïque. Pour écarter cet acide, nous avons dissout cette poudre dans du tétrachlorure de carbone. Ensuite cette solution fut extraite par de l'eau distillée. L'extrait aqueux fut ensuite évaporé sous vide. Il nous restait une deuxième poudre blanche (II). Cette poudre fut dissoute dans de l'alcool éthylique.

Nous avons établi la détection des acides organiques par la chromatographie de partage sur papier. Les techniques suivantes, décrites par Block (137), Lederer (138) et Linskens (139), ont été employées. Des cylindres en verre de 18 cm de diamètre et 25 cm de hauteur servaient à contenir le papier filtre.

Comme papier nous avons utilisé le Whatmann N° 1.

Deux solvants furent essayés :

- a) le mélange benzène + acide propionique + eau ^{dans} des proportions
2 : 2 : 1. Après séparation des deux couches, la phase su-

périeure (organique) est utilisée.

b) le mélange iso-propanol + ammoniacque + eau dans des proportions 8 : 1 : 1. Ce mélange est utilisé intégralement.

Le révélateur consiste du mélange suivant : para-nitroaniline 0,3 % dans de l'HCl 8 % 25 parties + nitrite de soude 5 % dans de l'eau 1,5 parties.

Les solutions d'acide benzoïque, acide salicylique, catéchol, acide malique, acide citrique, acide succinique et acide fumarique ont été préparées en dissolvant 100 mg de chaque acide dans 25 ml d'éthanol.

Les gouttes furent déposées sur le papier filtre à raison de 50 μ l de chaque solution acide. Le papier fut enroulé et mis en contact avec les solvants se trouvant sur le fond des cylindres en verre. Une chromatographie ascendante fut donc appliquée. Après 16 heures d'essai, le papier est séché. On pulvérise ensuite une solution du révélateur. Après séchage, on imbibe le chromatogramme d'une solution de carbonate de soude à 20 % dans de l'eau distillée. On peut alors instantanément observé l'emplacement des taches.

Des essais préliminaires nous ont indiqué que le meilleur solvant pour ces acides, celui qui permet donc la plus nette séparation sur le papier filtre, est le mélange isopropanol-ammoniacque-eau. Le catéchol est facilement détectable; il forme des taches gris-noirâtres, entourées d'une auréole jaune. La couleur de l'acide salicylique est orange sur le chromatogramme. Les autres acides sont légèrement rougeâtres. Le fond de teinte du papier est jaune.

Le tableau suivant nous donne un aperçu des valeurs $R_f^{(x)}$ obtenues avec les produits employés.

<u>Produits</u>	<u>Valeur R_f</u>
Acide salicylique	0,80
Acide malique	0,11
Acide citrique	0,14
Acide fumarique	0,20
Acide succinique	0,26
Acide benzoïque	non décelable
Catéchol	0,90

(x) R_f est l'abréviation de "relate to front" ou "Running factor".
La valeur $R_f = \frac{\text{distance du point de départ jusqu'au centre de la tache}}{\text{distance du point de départ jusqu'à la ligne de front du solvant.}}$

En appliquant la technique de chromatographie sur une solution de la poudre blanche (II) dans l'alcool éthylique nous avons obtenus des taches possédant les valeurs R_f suivantes :

<u>Valeur R_f</u>	<u>Produits correspondants</u>
0,90	Catéchol
0,83	Acide salicylique
0,70	?
0,45	?
0,28	Acide succinique
0,22	Acide fumarique
0,14	Acide citrique
0,10	Acide malique

Pour être sûr de l'emplacement exact des taches obtenus sur les chromatogrammes nous avons répété plusieurs fois les expériences et sur chaque chromatogramme nous avons appliqué en même temps que la substance inconnue (poudre II) la série des produits organiques mentionnée.

Ces expériences nous ont permis de déceler facilement la présence dans la poudre extraite de la culture de l'Azotobacter Vinelandii C-1, des produits suivants :

Catéchol - acide salicylique - acide succinique - acide malique - acide fumarique - acide citrique.

Les résultats obtenus par la voie chromatographique pour l'A. Vinelandii C-1 confirment ceux obtenus avec la technique de l'adaptation simultanée.

Nous pouvons donc établir que l'oxydation du benzoate de soude par les A. chroococcum et A. Beijerinckii aboutit en premier lieu à la formation du catéchol. Pour les A. Vinelandii cette oxydation passe d'abord par l'intermédiaire de l'acide salicylique avant d'atteindre le catéchol. A partir du catéchol le métabolisme continue suivant le cycle tricarboxylique, après un scindage de l'anneau aromatique.

En utilisant la technique de l'adaptation simultanée, Stanier (109) formulait sa théorie sur l'oxydation microbienne de l'acide benzoïque en considérant le catéchol comme le premier produit dans la chaîne métabolique. Il trouvait que les dérivés mono-hydroxy

de l'acide benzoïque n'étaient pas des produits intermédiaires dans l'oxydation microbienne de l'acide benzoïque.

Nos résultats sont donc en contradiction avec ceux de Stanier. Remarquons toutefois que nous avons à faire à des Azotobacter dont la physiologie est totalement différente de celle des Pseudomonas.

Nous terminions nos recherches sur le métabolisme de l'acide benzoïque par les Azotobacter, quand nous avons reçu une publication de Bhat et de ses collaborateurs (140). Ces chercheurs ont constaté que des cellules Pseudomonas convexa var. hippuricum, cultivées sur un milieu à base d'hippurate, sont capables d'oxyder l'hippurate, le benzoate, le salicylate et le catéchol. Ils suggèrent que le salicylate est un produit intermédiaire dans le dégradation du benzoate. Le catéchol serait formé après le salicylate.

Nos résultats sont donc en concordance parfaite avec ceux de Bhat et de ses collaborateurs.

Ceci prouve encore que les microbes sont spécifiques dans leur mode métabolique et qu'il est parfois dangereux de généraliser certains aspects métaboliques dans le monde microbien.

III. METABOLISME DU SALICYLATE.

Il est évident que nous sommes passés ensuite aux expériences devant déceler la voie métabolique du salicylate utilisable uniquement par les Azotobacter Beijerinckii.

Les cultures obtenues sur la gélose-mannitol, ont étéensemencées sur le milieu minéral enrichi avec 0,25 % de salicylate. La préparation des cellules, ainsi obtenues, fut effectuée de la même façon comme pour celles cultivées sur le benzoate.

Nous avons appliqué les techniques de l'adaptation simultanée. Les cuvettes de Warburg furent remplies également de la même façon.

Les tableaux 15 et 16 représentent les résultats obtenus.

Nous remarquons que la consommation en oxygène sur le salicylate suit une ligne droite. Ceci est également le cas pour le catéchol. Par contre, le benzoate n'est pas utilisé. Les deux souches d'Azotobacter Beijerinckii examinées réagissent exactement de la

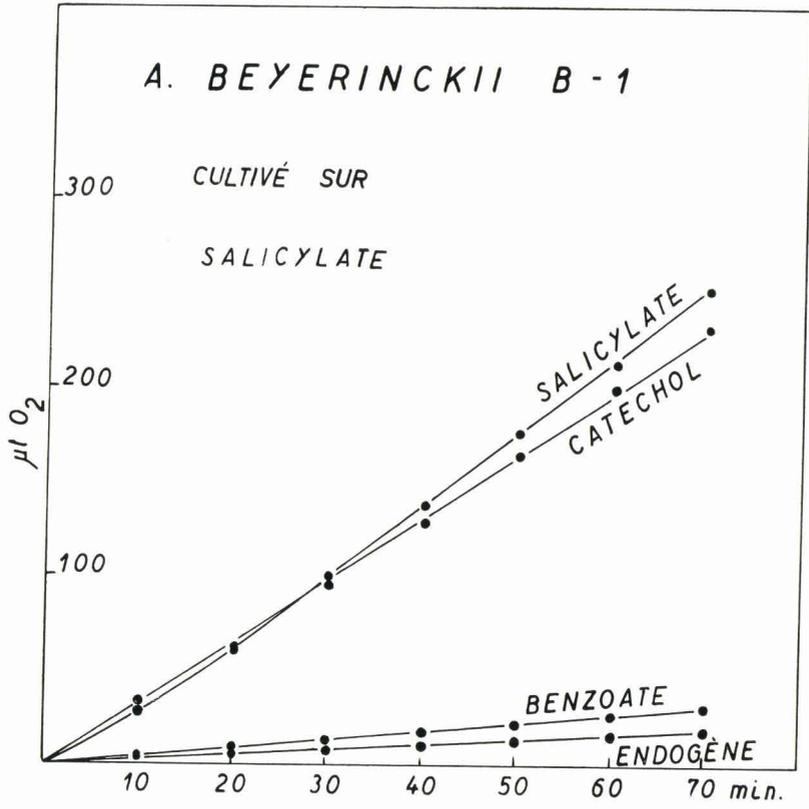


FIGURE 15

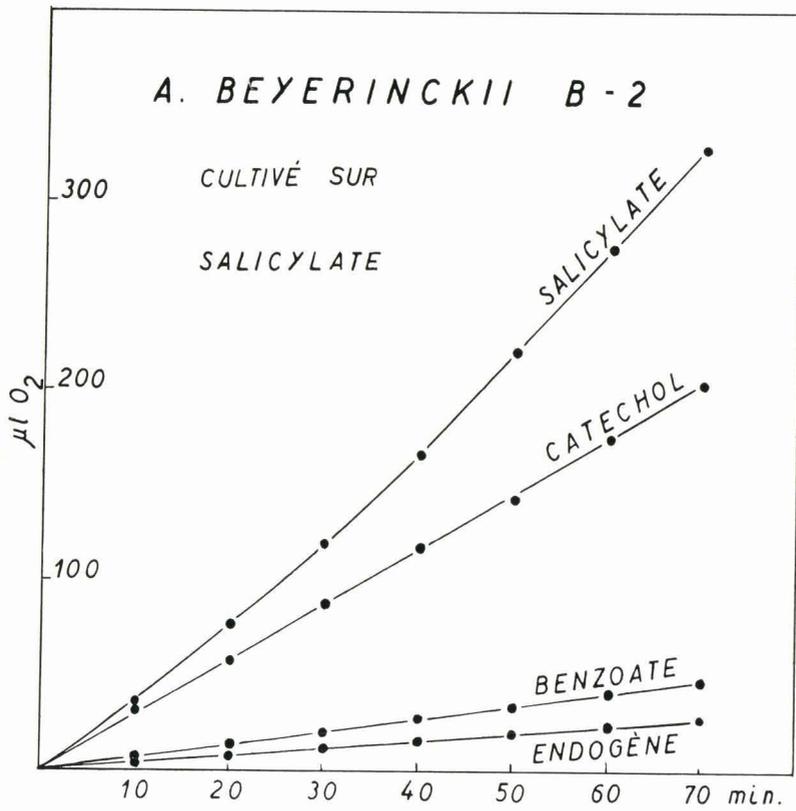
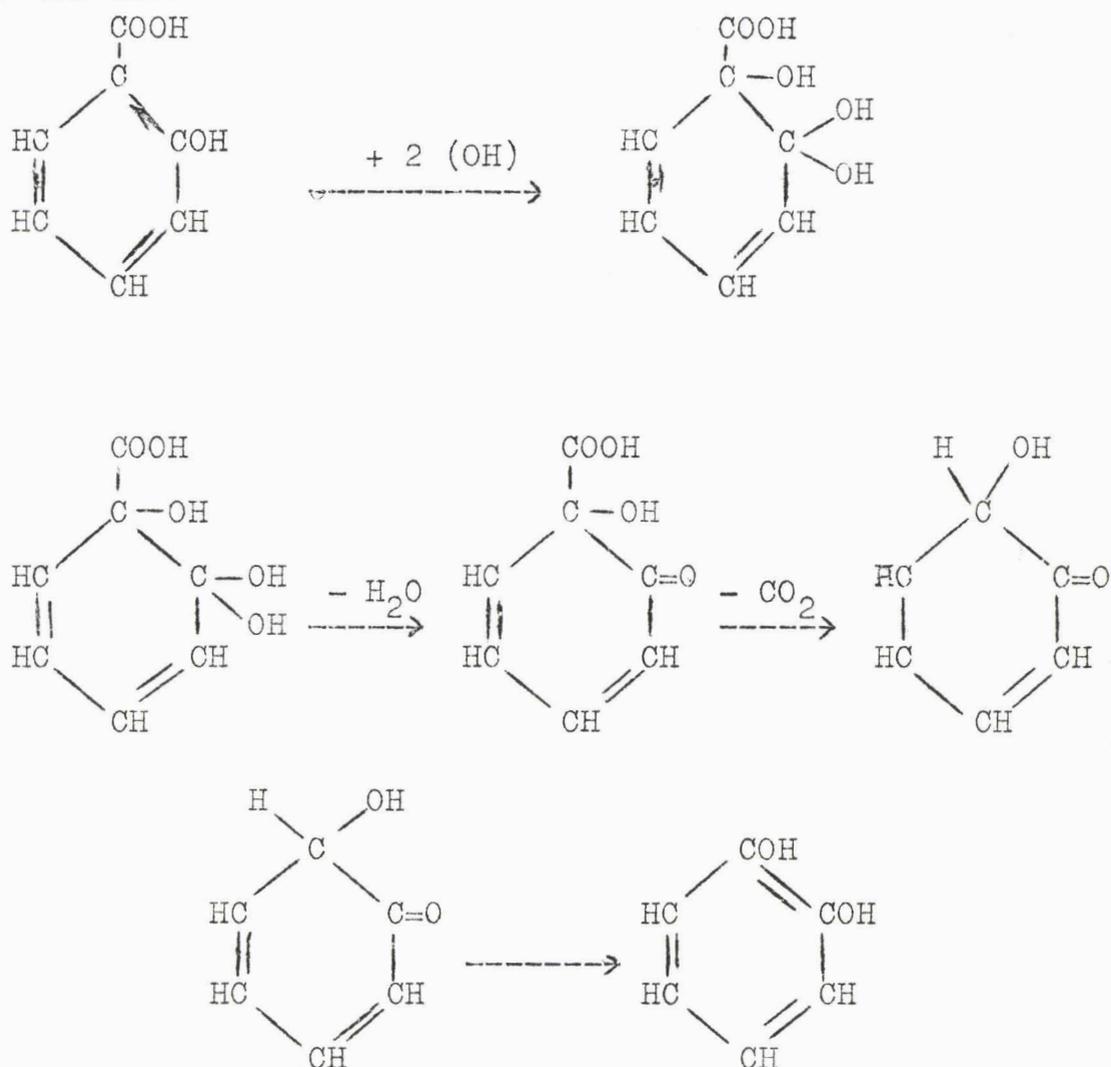


FIGURE 16

même façon.

Nous pouvons donc conclure que les Azotobacter Beijerinckii, cultivés sur le salicylate, sont capables d'oxyder le salicylate en catéchol. Le benzoate n'est pas du tout un produit intermédiaire de ce cycle oxydatif.

Ces expériences nous permettent donc de proposer le schéma suivant pour le premier stade de l'oxydation du salicylate par les A. Beijerinckii.



RESUME DU CHAPITRE V

=====

Les expériences relatées dans ce chapitre nous ont procuré des renseignements complémentaires dans les différences physiologiques des Azotobacter.

Les expériences sur le métabolisme du mannitol par les Azotobacter nous révèlent que ce polyol est métabolisé suivant le cycle tricarboxylique. La respiration exponentielle du glucose, par les Azotobacter, cultivés sur le mannitol, s'explique par la présence d'une kinase, d'une deshydrogénase et d'une phospho-hexokinase. Après la phosphorylation du mannitol avec l'aide de l'adénosine-tri-phosphate et une déshydrogénation qui se déroule en présence de la diphospho-pyridine-nucléotide, le fructose-6-phosphate est formé. Cette substance intermédiaire est en équilibre sous l'action de la phospho-hexo-isomérase avec le glucose-6-phosphate. La respiration du dextrose ne serait qu'un "artefact". En fait, c'est le glucose-6-phosphate qui est utilisé et non le glucose. Le glucose n'est pas un produit intermédiaire du métabolisme du mannitol pour les Azotobacter.

Le métabolisme du benzoate par les Azotobacter nous a permis de faire les constatations suivantes :

Pour les A. chroococcum l'oxydation du benzoate aboutit directement au catéchol. Nous observons une implantation simultanée de deux groupes hydroxyles sur le noyau benzénique, suivi d'une décarboxylation oxydative. Les expériences effectuées avec la technique de l'adaptation simultanée nous indiquent cette voie métabolique.

Par contre nous constatons que les A. Beijerinckii se développent très bien sur le salicylate de soude.

Le métabolisme des A. Beijerinckii sur le benzoate et sur le salicylate présente donc à première vue une certaine contradiction. En effet, les A. Beijerinckii, cultivées sur le benzoate, vont oxyder l'acide benzoïque directement en catéchol. Le salicylate n'apparaît pas comme substance intermédiaire. Par contre les mêmes germes peuvent se multiplier sur le salicylate et oxyder l'acide

salicylique en catéchol.

Cultivés sur le benzoate ces germes ne seraient pas adaptés simultanément au salicylate.

Il nous semble donc que la détection de la respiration du salicylate par les A. Beijerinckii, cultivés sur le benzoate, fait défaut avec la technique de l'adaptation simultanée.

Le fait que les mêmes souches, peuvent se développer sur le salicylate est une preuve quasi certaine qu'elles peuvent utiliser le salicylate et nos expériences l'ont prouvé.

Comme nous avons pu le constater, avec l'acide citrique, plaque tournante du cycle tricarboxylique des cellules cultivées sur le dextrose, nous pensons qu'il faut expliquer ce phénomène par la faculté d'absorption des molécules par les cellules.

Les expériences avec les A. Beijerinckii, concernant le métabolisme du benzoate, indiqueraient que les cellules qui ont commencé leur genèse sur l'acide benzoïque sont impénétrables pour l'acide salicylique. Par contre les cellules cultivées sur le salicylate sont parfaitement pénétrables par cet acide aromatique. Le passé de la cellule, le milieu de culture sur lequel elle a effectué son développement, est un facteur déterminant dans sa structure cellulaire. Et cette structure détermine sa capacité d'absorption et d'assimilation.

Ces expériences nous prouvent que la technique de l'adaptation simultanée, malgré sa grande valeur pour l'étude physiologique des microorganismes, n'est pas tout à fait satisfaisante.

En opérant avec cette technique nous pouvons obtenir des renseignements préliminaires dans le métabolisme des microorganismes. Des analyses chimiques complémentaires, sont pourtant nécessaires pour tracer définitivement une voie métabolique.

L'absence totale de capacité de croissance sur le salicylate des Azotobacter chroococcum, et l'oxydation directe du benzoate en catéchol, différencie complètement ces souches des Azotobacter Beijerinckii.

L'oxydation du benzoate par les A. Vinelandii n'aboutit pas dans son premier stade, à la formation du catéchol. Au contraire, nous avons constaté que la première modification que subit le

benzoate consiste dans une transformation en acide salicylique. Répétons ici, que les expériences manométriques à ce sujet ont été confirmées par l'analyse chimique (chromatographie) sur les milieux de culture. Le benzoate subirait une implantation d'un seul groupe hydroxyle. Le deuxième stade de ce métabolisme présente la formation du catéchol. Ceci implique donc une deuxième implantation d'un groupe hydroxyle, suivi d'une décarboxylation oxydative.

Cette différence dans les premiers stades de la dégradation de l'acide benzoïque entre les Azotobacter chroococcum d'une part et les Azotobacter Beijerinckii et A. Vinelandii d'autre part, correspond pour nous à un aspect physiologique essentiel dans la différenciation des Azotobacter.

La présence des produits intermédiaires du cycle tricarboxylique dans les cultures d'Azotobacter, cultivés sur le benzoate prouve que ce métabolisme aboutit par cette voie à l'oxydation complète.

=====

C H A P I T R E VI
=====

INFLUENCE DES ANTIBIOTIQUES SUR LES AZOTOBACTER
=====

Dans le but de nous rendre compte de la susceptibilité des quatres espèces d'Azotobacter, vis-à-vis des antibiotiques, nous avons utilisé la technique suivante :

Les souches ont été cultivées sur la gélose-dextrose inclinée en tubes, pendant 48 heures à 28° C. Puis, les cellules sont mises en suspension et mélangées à 10 ml de gélose-dextrose tenue à l'état liquide à 45° C.

Environ 10 ml de gélose-dextrose stérile sont coulés en boîtes de Pétri. Après solidification, 4 ml de la suspension microbienne dans la gélose-dextrose sont coulés au dessus de la gélose-dextrose solidifiée dans les boîtes de Pétri. Ainsi nous avons deux couches de gélose; la première qui est stérile et qui est couverte par une deuxième contenant des cellules Azotobacter en masse.

Les boîtes de Pétri sont ensuite mises au frigidaire pendant 4 heures. On met ensuite sur chaque boîte 6 disques contenant des concentrations différentes d'antibiotiques. Nous avons utilisé les "Bacto-Sensitivity Disks" des Difco Laboratories (U.S.A.).

Chaque disque possède un diamètre de 0,6 cm. Après une culture de 48 heures à 28° C on mesure le diamètre de la zone d'inhibition.

Nous avons utilisé les antibiotiques suivants :

Pénicilline (disques verts) : 2, 5 et 10 Unités Internationales

Polymyxine B (disques bleus foncé) : 50, 100 et 300 U.I.

Chloromycétine (disques bleus pâle) : 5, 10 et 30 mcg

Auréomycine (disques jaunes pâle) : 5, 10 et 30 mcg

Terramycine (disques jaunes brunâtre) : 5, 10 et 30 mcg

Di-hydro-streptomycine (disques roses) : 2, 10 et 100 mcg

Erythromycine (disques rouges) : 2, 5 et 15 mcg

Tétracycline (disques jaunes foncé) : 5, 10 et 30 mcg

Les disques contenant les concentrations les plus faibles ne portent pas d'inscription. Les disques contenant les concentrations moyennes sont pourvus de petits points noirs. Les disques contenant les plus

hautes concentrations portent des lignes noires.

D'après Difco la susceptibilité doit être interprétée comme l'indique le schéma suivant :

	Concentration de l'antibiotique		
	Faible	Intermédiaire	Forte
Très sensible	zone	zone	zone
Sensible	pas de zone	zone	zone
Légèrement sensible	pas de zone	pas de zone	zone
Résistant	pas de zone	pas de zone	pas de zone

Les résultats obtenus avec quatre souches de chaque espèce sont représentés dans les tableaux qui suivent.

Il ressort de ces résultats :

- 1°) Que les quatre espèces sont entièrement résistantes à la pénicilline et à la chloromycétine.
- 2°) Les quatre espèces sont sensibles à la polymyxine.
- 3°) Tous les Azotobacter sont très sensibles à l'auréomycine, la terramycine, la tétracycline, la dihydro-streptomycine et l'érythromycine.

Leur résistance simultanée envers la pénicilline et la chloromycétine est assez surprenante. En effet, la pénicilline est un antibiotique exerçant son action envers les cocci Gram-positifs, tandis que la chloromycétine est plutôt active envers les bâtonnets Gram-négatifs.

L'utilisation de ces deux antibiotiques, séparément, dans un milieu de culture peut être prise en considération comme moyen sélectif, dans l'isolement et la purification des souches d'Azotobacter.

Nous constatons qu'il n'y a pas de différenciation possible entre les quatre espèces en se basant sur leur sensibilité envers les antibiotiques couramment employés.

ANTIBIOTIQUE	A. chroococcum						A. Beijerinckii			
	VT-1	A-1	A-4	A-5	B-1	B-2	B-3	B-4		
Pénicilline en U.I.	2	0	0	0	0	0	0	0		
	5	0	0	0	0	0	0	0		
	10	1,4	0	0	0	0	0	0		
Polymyxine en U.I.	50	0,7	0	0	0,6	0,5	0,6	0		
	100	0,8	0,9	0,6	0,7	0,7	0,7	0,6		
	300	1,0	1,0	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0		
Chloromycétine en mcg	5	0	0	0	0	0	0	0		
	10	0	0	0	0	0,6	0	0		
	30	0	0	0	0	0,7	0	0		
Auréomycine en mcg	5	2,5	2,2	2,5	2,7	2,6	2,6	2,8		
	10	3,2	2,3	2,8	2,9	2,8	2,8	3,0		
	30	3,5	2,9	3,0	3,2	3,2	3,4	3,5		
Terramycine en mcg	5	1,9	1,2	2,5	-	1,0	1,2	1,4		
	10	2,5	1,6	3,0	-	1,3	1,8	1,9		
	30	3,4	3,4	3,3	-	2,6	2,7	3,2		

ANTIBIOTIQUE	A. chroococcum					A. Beijerinckii			
	VT-1	A-1	A-4	A-5	B-1	B-2	B-3	B-4	
Dihydro	2	1,1	1,2	1,2	1,6	1,5	1,8	1,6	
Streptomycine	10	2,0	2,2	2,1	2,3	2,2	2,3	2,5	
en mcg	100	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,5	3,4	
Erythromycine	2	1,7	1,6	1,4	-	0,8	0,8	1,0	
en mcg	5	2,0	2,0	2,0	1,5	1,1	1,1	1,3	
	15	2,7	2,9	2,8	2,2	2,0	1,9	2,1	
Tétracycline	5	2,8	3,0	-	2,7	2,2	2,4	2,1	
en mcg	10	3,3	3,6	-	3,2	3,0	3,2	3,3	
	30	3,4	3,6	-	3,2	3,0	3,2	3,3	

ANTIBIOTIQUE	A. Vinelandii					A. agilis				
	C-1	C-2	C-3	C-5	D-1	D-2	D-4	D-5		

Pénicilline en U.I.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Polymyxine B en U.I.	50	0	0,7	0	0	0	0	0	0	0
	100	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7	0,7	0,8	0,7	0,8
	300	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	0,7	1,0	0,7	1,0
Chloromycétine en mcg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Auréomycine en mcg	5	2,7	2,8	2,7	2,7	2,2	2,0	2,2	2,3	2,1
	10	2,8	3,0	3,0	2,9	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
	30	3,0	3,2	3,2	3,1	2,8	2,8	2,9	2,9	2,8
Terramycine en mcg	5	1,7	1,6	1,8	1,7	1,1	1,0	1,1	1,1	1,0
	10	2,1	2,1	2,2	2,2	1,4	1,3	1,3	1,3	1,3
	30	3,0	3,0	3,2	3,1	2,2	2,3	2,1	2,1	2,2

ANTIBIOTIQUE	A. Vinelandii					A. agilis				
	C-1	C-2	C-3	C-5	D-1	D-2	D-4	D-5		
Dihydro Streptomycine en mcg	2	1,9	1,4	1,8	1,8	1,6	1,3	1,5	1,4	
	10	2,4	1,9	2,3	2,4	2,2	2,4	2,2	2,3	
	100	3,3	3,1	3,1	3,2	3,0	3,5	3,2	3,4	
Erythromycine en mcg	2	1,5	1,4	1,5	1,5	0,8	0,8	0,9	0,8	
	5	2,1	1,9	2,0	2,0	1,3	1,3	1,5	1,4	
	15	2,8	2,6	2,8	2,7	2,3	2,4	2,4	2,3	
Tetracycline en mcg	5	2,8	2,6	2,7	2,8	1,9	1,7	1,9	1,9	
	10	3,2	3,2	3,2	3,2	2,3	2,2	2,3	2,3	
	30	3,5	3,5	3,6	3,6	2,6	2,5	2,4	2,5	

C H A P I T R E VII

=====

ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE SUR LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES

=====

DES AZOTOBACTER

=====

La synthèse protéinique des Azotobacter se fait à partir de l'azote atmosphérique et de produits de dégradation de substances organiques. A ce point de vue les Azotobacter sont des microorganismes exceptionnels.

Il nous a semblé utile d'examiner, la constitution en acides aminés des protéines des différentes espèces d'Azotobacter. Nous avons utilisé à cette fin les techniques de chromatographie de partage sur papier, décrites par Block (137) Lederer (138) et Linskens (139).

Description des Techniques:

- Une armoire pour chromatographie "Shandon", munie d'un réservoir en verre fut utilisée. Les dimensions étaient de 68 cm, sur 68 cm sur 24 cm. Puisque le réservoir se trouve en haut de l'armoire la chromatographie descendante fut employée.
- Le papier filtre était le Whatmann N° 4.
- Deux solvants sont préparés de la façon suivante:
 - a. Mélange Butanol - Acide acétique - Eau distillée dans les proportions: 125 : 30 : 125. Après séparation, des deux couches, la phase organique supérieure est utilisée comme solvant de séparation des acides aminés.
 - b. Phénol: 500 g de phénol dissouts dans 225 ml d'eau. Seulement la couche inférieure est utilisée.
- Le révélateur comportait: 0,1 % de solution de ninydrine dans du chloroforme additionnée de 0,1 % de collidine.
- Les acides aminés: des solutions contenant 25 mg d'un acide aminé dissouts dans 25 ml d'éthanol sont employées. Nous avons utilisé comme solutions "types" les acides aminés suivants:
 - Alanine - Acide aspartique - Acide glutaminique - Acide δ -amino-butérique - Arginine - Cystine - Glycine - Histidine - Leucine - Lysine - Méthionine - Proline - Sérine - Thréonine - Tyrosine et la Glucosamine.

Avec une micropipette de 0,1 ml, graduée, nous déposons les gouttes sur le filtre Whatmann N° 4. 20 µl de chaque acide aminé sont ainsi appliqués sur le papier.

Nous avons d'abord étudié le comportement des acides aminés en présence d'un seul solvant. Ensuite des chromatogrammes bi-dimensionnels ont été préparés. Sur ces derniers nous avons appliqué dans la première direction le mélange butanol-acétique-eau pendant 16 heures. Après séchage à la température du laboratoire, le papier était soumis dans la deuxième direction à l'action du deuxième solvant, le phénol, pendant 8 heures. La température pendant les essais chromatographiques était de 21° C.

Les valeurs R_f obtenues, pour les acides aminés examinés, avec des chromatogrammes à une seule dimension, sont groupées dans le tableau suivant:

Acides aminés	Valeurs R_f trouvées	
	Butanol-acide acétique-eau	Phénol
Alanine	0,42	0,58
Acide aspartique	0,36	0,26
Acide glutamique	0,39	0,35
Acide γ -amino- butyrique	0,58	0,89
Arginine	0,31	0,59
Cystine	0,17	0,27
Glycine	0,37	0,40
Histidine	0,28	0,67
Leucine	0,76	0,87
Lysine	0,25	0,53
Méthionine	0,63	0,80
Proline	0,48	0,93
Sérine	0,36	0,37
Thréonine	0,39	0,50
Tyrosine	0,58	0,60
Glucosamine	0,33	0,20

Le diapositif qui accompagne ce chapitre représente l'emplacement sur le chromatogramme des différents acides aminés.

Acides aminés des Azotobacter.

Les Azotobacter ont été cultivés sur 50 ml de milieu minéral enrichis avec 1 % de mannitol ou 1 % de dextrose (pour les A. agilis). Après 48 heures de culture dans un appareil à secousses thermostaté, les cultures sont centrifugées à 6000 tours/minute. Après deux lavages successifs avec de l'eau stérile, les cellules sont finalement mises en suspension dans de l'eau stérile. Cette suspension cellulaire est soumise à un dosage d'azote par la méthode micro-Kjeldahl.

Un aliquot de cette suspension, contenant 1,6 mg d'azote est mélangé à 10 ml de HCl 6 N et chauffé sous reflux pendant 20 heures. Le liquide est ensuite évaporé sous vide. Dans le ballon, le résidu contenant les acides aminés, est mis en solution dans 10 ml d'eau distillée. La solution est jaunâtre. Elle est soumise à une centrifugation et le liquide surnageant est à nouveau évaporé sous vide. Le résidu restant est dissout dans 1 ml d'eau distillée.

Certains auteurs prétendent qu'il faut mieux de reprendre le résidu d'acides aminés avec 1 ml d'isopropanol à 10 %. Nous avons constaté que l'isopropanol provoque des taches gênantes sur les chromatogrammes. Nous avons préféré utiliser l'eau distillée pour la mise en solution des acides aminés.

Environ 200 μ l de cette solution sont appliqués au même point sur le papier filtre. Le papier filtre est ensuite soumis à la chromatographie bidimensionnelle et révélé ensuite.

Les chromatogrammes ont été photographiés et les photos en couleur accompagnent ce chapitre.

Résultats.

Nous pouvons constater sur les chromatogrammes que les Azotobacter contiennent dans leur masse cellulaire les 15 acides aminés suivants: Alanine - Acide aspartique - Acide glutamique - Arginine - Cystine - Glycine - Histidine - Leucine - Lysine - Méthionine - Proline - Sérine - Thréonine - Tyrosine - Glucosamine.

Ces acides sont présents dans toutes les espèces, aussi bien dans les A. chroococcum, A. Beijerinckii, A. Vinelandii que A. agilis. La constitution qualitative en acides aminés ne permet pas de différencier les quatre espèces d'Azotobacter.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

=====

Dans le but d'élaborer une meilleure différenciation entre les divers Azotobacter, nous avons entamé une série d'expériences sur des germes isolés de la terre et de cours d'eau.

L'isolement des souches, effectué avec les méthodes préconisées par Winogradsky, Beijerinck et Pochon nous a permis de grouper d'abord en suivant H.L. Jensen, et provisoirement, les Azotobacter en quatre espèces. Il fallait évidemment se baser sur un certain nombre de caractères pour caractériser les souches. Et nous avons utilisé pour cela les caractères suivants:

- dimensions des cellules
- mobilité
- formation de kystes
- croissance sur le benzoate de soude 0,25 %
- pigmentation

Vu la divergence dans les résultats obtenus par les différents chercheurs sur la nutrition minérale des Azotobacter, nous avons d'abord voulu établir les quantités minimum de chaque minéral pour obtenir le maximum de la fixation d'azote par les Azotobacter. Nous avons pu déterminer ainsi, que dans les circonstances créées, les Azotobacter ont besoin de:

- 4,5 mg de phosphore ou 30 mg de K_2HPO_4 par gramme de dextrose
- 0,3 mg de magnésium ou 3,1 mg de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ par gramme de dextrose
- 0,5 mg de fer ou 1,6 mg de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ par gramme de dextrose
- 0,036 mg de calcium ou 0,1 mg de $CaCl_2$ par gramme de dextrose

Le manganèse n'est pas nécessaire dans le milieu de culture pour obtenir un maximum de fixation d'azote.

Les quantités minimum ont toujours été déterminée en présence d'excès d'autres éléments minéraux, soit le phosphore, soit le magnésium, soit le calcium ou le fer.

En constituant un milieu, contenant les quantités minimum de chaque minéral, nous n'obtenons pas une fixation d'azote maximum. Nous avons pu établir ainsi qu'il faut au moins 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ au lieu de 3,1 mg. Les quantités minimum des autres éléments sont suffisantes.

Nous avons abouti à la constitution d'un milieu qui permet aux Azotobacter une fixation maximum d'azote:

K_2HPO_4	0,3 g.	par litre
$CaCl_2$	0,1 g	"
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g	"
Na_2SO_4	0,2 g	"
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,02 g	"
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0,005 g	"

Dans toutes les expériences suivantes, c'est ce mélange d'éléments minéraux qui fut toujours utilisé.

L'étude de la nutrition carbonée des Azotobacter nous a permis d'observer les différences suivantes:

	<u>A. chroococcum</u>	<u>A. Beijerinckii</u>
Amidon	assimilable	non assimilable
Salicylate de soude	non assimilable	assimilable
Para-hydroxybenzoate	assimilable	assimilable
Catéchol	assimilable	assimilable
3,4-dihydroxybenzoate	assimilable	assimilable
2,5-dihydroxybenzoate	non assimilable	non assimilable
2,4-dihydroxybenzoate	non assimilable	non assimilable
3,5-dihydroxybenzoate	non assimilable	non assimilable
	<u>A. Vinelandii</u>	<u>A. agilis</u>
Rhamnose	assimilable	non assimilable
Mannitol	assimilable	non assimilable
Benzoate de soude	assimilable	non assimilable
Para-hydroxybenzoate	assimilable	non assimilable
3,4-dihydroxybenzoate	assimilable	non assimilable
2,5-dihydroxybenzoate	non assimilable	non assimilable
2,4-dihydroxybenzoate	non assimilable	non assimilable
3,5-dihydroxybenzoate	non assimilable	non assimilable

La recherche des phénomènes de diauxie chez les Azotobacter nous a amené à la conclusion que deux substances nutritives, par exemple l'alcool éthylique et le benzoate de soude, sont métabolisées simultanément par les A. Vinelandii. La fixation d'azote dans un tel milieu est la somme de l'azote fixé séparément sur chacune des substances.

Par la technique de l'adaptation simultanée, nous avons étudié le métabolisme des substances qui se révèlent comme étant des sources d'énergies différentielles entre les Azotobacter, c'est-à-dire la mannitol, le benzoate et le salicylate.

Bien que les techniques d'évaluation des échanges respiratoires nous incitent à considérer le dextrose comme produit intermédiaire dans le métabolisme du mannitol chez les Azotobacter, nous avons plutôt envisagé que le dextrose absorbé par la cellule subit d'abord une phosphorylation et que c'est en fait le glucose-6-phosphate qui est utilisé exponentiellement par les Azotobacter cultivés sur le mannitol. Le métabolisme du mannitol par les Azotobacter se poursuit ensuite à partir du fructose-6-phosphate, suivant le cycle tricarboxylique. Comme pour le glucose, les Azotobacter cultivés sur le mannitol ne présentent pas une oxydation directe de l'acide citrique.

Les essais d'évolution de la respiration au Warburg nous ont révélé que le catéchol est un produit intermédiaire dans l'oxydation du benzoate par les A. Vinelandii, A. chroococcum et A. Beijerinckii. Pour les A. Vinelandii ces essais, complétés par l'analyse chimique des milieux de culture à base de benzoate, nous apprennent que cette oxydation s'effectue en passant par l'acide salicylique. L'oxydation du benzoate se présente donc en deux phases: d'abord une hydroxylation suivi d'une autre hydroxylation et d'une décarboxylation. La découverte de l'acide salicylique comme premier produit intermédiaire dans l'oxydation du benzoate par des microorganismes (141) a été confirmée par d'autres chercheurs.

Chez les A. chroococcum nous observons une oxydation directe du benzoate en catéchol. Ceci n'est pas le cas pour les A. Beijerinckii pour lesquels le salicylate constitue la première étape dans la dégradation du benzoate. La différence dans le mécanisme d'oxydation du benzoate peut servir comme caractère différentiel

entre les A. chroococcum et A. Beijerinckii.

A partir du catéchol, il nous semble que tous les Azotobacter; pouvant se développer sur le benzoate, suivent le cycle tricarboxylique jusqu'à l'oxydation complète. L'analyse chimique des milieux de culture à base de benzoate nous a révélé la présence des produits essentiels du cycle tricarboxylique.

L'étude de l'inhibition des Azotobacter par les antibiotiques nous a montré que les différentes espèces présentent une sensibilité (ou résistance) égale envers les mêmes antibiotiques. Une différenciation des Azotobacter sur cette base n'est pas possible.

Des expériences qualitatives pour déceler la présence des acides aminés dans la masse cellulaire des différentes espèces d'Azotobacter nous ont permis de constater la présence de 15 acides aminés (y compris la glucosamine). Toutes les souches examinées présentent la même composition qualitative.

Avec les résultats obtenus dans ces différentes expériences nous pensons pouvoir différencier les Azotobacter d'une manière plus précise qu'auparavant.

La classification de Hofer (voir page 14) nous semble inacceptable. Premièrement, la présence des Azotobacter indicus dans le genre Azotobacter constitue une grave erreur. En effet, ces germes sont des producteurs d'acides organiques. Leur métabolisme des glucides n'aboutit pas à une oxydation complète avec production de CO₂ et H₂O. Leur physiologie est donc entièrement différente des autres Azotobacter. En plus, leur présence seulement dans des sols tropicaux constitue un caractère géographique qui, s'ajoutant aux caractères morphologiques et physiologiques, permet d'en faire un genre à part. Nous pouvons facilement accepter l'opinion de H.L. Jensen, de V. Jensen et de Tchan et établir pour les Azotobacter indicus un genre particulier, celui des Beijerinckia.

Deuxièmement, la suppression des espèces A. Beijerinckii et A. Vinelandii constitue une seconde erreur. Ces deux germes se différencient fortement des A. chroococcum et des A. agilis aussi bien au point de vue morphologique que physiologique.

La classification d'après H.L. Jensen (voir page 15) nous semblait à première vue acceptable. La différenciation entre les A. chroococcum et les A. Beijerinckii paraît logique. Par contre la présence des souches A. agilis dans le même genre ne nous semble pas correcte. En effet, l'absence totale de croissance sur des acides organiques les différencie des autres Azotobacter et surtout des A. Vinelandii. En outre, l'absence de formation de kystes présente un caractère obsolu.

Ces observations nous amènent à proposer une classification des Azotobacter qui s'appuie sur celle de Tchan mais avec quelques variantes.

Nous proposons deux genres; Azotobacter et Azotococcus.

Genre AZOTOBACTER Beijerinck

Cellule ovale ou en forme de bâtonnet. Mobile ou immobile. Dans des milieux avec l'éthanol et des acides organiques, comme sources d'énergie, des kystes sont formés. Des acides ne sont pas produits sur des milieux à base de glucides. L'azote atmosphérique est fixé en milieux ^{concentrés} d'azote combiné. Typiquement aérobies.

1. Azotobacter chroococcum Beijerinck

Organisme mobile ou légèrement mobile, produisant des pigments endogènes bruns ou noirâtres, insolubles dans l'eau. Habite le sol. Utilise l'amidon; également le para-hydroxybenzoate, le catéchol et le 3,4-dihydroxybenzoate. L'utilisation du benzoate 0,5 % est facultative. L'oxydation du benzoate aboutit directement au catéchol. Pas de métabolisme du salicylate.

2. Azotobacter Beijerinckii Lipman

Organisme non-mobile, produisant des pigments endogènes insolubles dans l'eau. Les pigments quand ils sont produits sont jaunâtres. Habite le sol. Utilise le salicylate, le para-hydroxybenzoate, le catéchol et le 3,4-dihydroxybenzoate. Utilise toujours 0,5 % de benzoate. L'oxydation du benzoate passe par l'acide salicylique au catéchol. Métabolise le salicylate.

3. Azotobacter Vinelandii Lipman

Organisme mobile, produisant des pigments jaunes verdâtres et fluorescents. Habite le sol et l'eau. Utilise le rhamnose, le parahydroxybenzoate, le catéchol et le 3,4-dihydroxybenzoate. Utilise 1 % de benzoate. L'oxydation du benzoate se fait par l'acide salicylique et le catéchol.

Genre AZOTOCOCCUS Tchan

Cellule ovale et mobile. Des kystes ne sont pas formés. Pas de production d'acides sur milieux à base de glucides. L'azote atmosphérique est fixé en milieux exempts d'azote combiné. Typiquement aérobies.

1. Azotococcus agilis Tchan

N'utilise pas le mannitol, ni le benzoate ni aucun acide aromatique. L'inhibition de 1 % de benzoate est facultative. Habite l'eau.

Les Azotococcus agilis var. atypica et Azotococcus insigne, espèces créées par Tchan nous semblent des souches analogues à l'Azotococcus agilis type.

L'appellation Azomonas Winogradsky, proposé par V. Jensen comme genre séparé à côté des Azotobacter (voir page 16) nous semble sans fondement. Winogradsky en proposant le nom Azomonas devait ignorer que "azo" ne signifie pas "azote" en français (Tchan (54)), mais nous adoptons donc, sans restriction, "Azotococcus" proposé par Tchan.

Nous espérons que cette étude sur les caractères morphologiques et surtout physiologiques des Azotobacter a éclairci un certain nombre de points litigieux de la physiologie de ces germes, et que la classification des Azotobacter que nous proposons est simple, logique et fondée sur des caractères spécifiques nets.

B I B L I O G R A P H I E

=====

1. WINOGRADSKY, S. 1895 Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes. Arch. Sci. Biol. (St. Petersburg), 2, 295
2. BEIJERINCK, M. W. 1901 Ueber oligonitrophile Mikroben. Zentr. Bakt. Parasitenk. Abt II, 7, 561
3. BEIJERINCK, M. W. und van DELDEN, A. 1902 Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien. Zentr. Bakt. Parasitenk. Abt II, 9, 3.
4. BEIJERINCK, M. W. 1908 Fixation of free atmospheric nitrogen by Azotobacter in pure cultures. Konink. Akad. v. Wet. Amsterdam. 11, 67.
5. KYLE, T. S. and EISENSTARK, A. 1951 The Genus Azotobacter. Bull. Oklahoma Agric. Mech. Coll. 48, N° 16.
6. STAPP, C. und RUSCHMANN, G. 1924 Zur Biologie von Azotobacter. Arb. Biol. Reichsanstalt Land- u. Forstwirtsch., Berlin-Dahlem, 13, 305.
7. WAKSMAN S. A. 1932 PRINCIPLES OF SOIL MICROBIOLOGY. 2° ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
8. JENSEN, H. L. 1954 The Azotobacteriaceae. Bact. Rev. 18, 195.
9. WILSON, P. W. 1952 The comparative biochemistry of nitrogen fixation. Advances in Enzymol., 13, 345.
10. WILSON, P. W., and BURRIS, R. H. 1947 The mechanism of biological nitrogen fixation. Bacteriol. Revs., 11. 41.
11. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 1948 6th ed. Edited by BREED, R. S., MURRAY, E.G.D., and HITCHENS, A. P. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
12. DERX, H. G. 1950 Beijerinckia, a new genus of nitrogen-fixing bacteria occurring in tropical soils. Koninkl. Ned. Akad. Wetensch. Proc. Ser. C, 53, 140.

13. TCHAN, Y. T. 1953 Presence of Beijerinckia in Northern Australia and geographic distribution of non symbiotic nitrogen-fixing bacteria. Proc. Linnean Soc. N.S. Wales, 78, 171.
14. STARKEY, R. L., and DE, P. K. 1939 A new species of Azotobacter. Soil Sc., 47, 329.
15. JENSEN, H. L. 1948 The influence of molybdenum, calcium and agar on nitrogen fixation by Azotobacter indicum. Proc. Linnean Soc. N.S. Wales, 72, 299.
16. GREEN, M. and WILSON, P. W. 1953 The utilization of nitrate nitrogen by the Azotobacter. J. Gen. Microbiol., 9, 89.
17. DERX, H. G. 1950 Further Researches on Beijerinckia. Ann. Borgoriensis, 1, 11.
18. KAUFFMANN, J., et TOUSSAINT, P. 1951 Un nouveau germe fixateur de l'azote atmosphérique: Azotobacter lacticogenes. Rev. gén. botan., 58, 553.
19. JENSEN, H. L. 1954 The magnesium requirements of Azotobacter and Beijerinckia. Acta Agr. Scand., 4, 224.
20. ORLA-JENSEN, S. 1909 Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems. Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II, 22, 305.
21. STAPP, C. 1940 Azotomonas insolita, ein neuer aerober stickstoffbindender Mikro-organismus. Zentr. Bakt. Parasitenk. Abt. II, 102, 1.
22. HAMILTON, P. B., MAGEE, W. E., and MORTENSON, L. E. 1953 Nitrogen fixation by Aerobacter aerogenes and cell-free extracts of the Azotobacter vinelandii. Bacteriol. Proc. p. 82.
23. BRELEMAN, G. 1908 Untersuchungen über die Variation und das Stickstoffbindungsvermögen des Bacillus asterosporus A.M. Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II, 22, 44.
24. WINOGRADSKY, S. 1938 Etudes sur la microbiologie du sol et des eaux. Sur la morphologie et l'oecologie des Azotobacter. Ann. Inst. Pasteur, 60, 351.
25. KLECZKOWSKA, J., NORMAN, A. G., and SNIESZKO, S. F. 1940 Bacteriological studies on a new capsulated bacillus, Bacillus Krzemieniewski. Soil. Sc. 49, 185.

26. ANDERSON, G. R. 1955 Nitrogen fixation by Pseudomonas-like bacteria. J. Bacteriol. 70, 129.
27. VOETS, J. P. and DEBACKER, J. 1956 Pseudomonas azotogensis nov. sp. a new free living nitrogen fixing bacterium. Naturwissenschaften, 43, 40.
28. VOETS, J. P. 1957 De Koolhydraatsamenstelling van Azotobacter en Pseudomonas azotogensis nov. sp. Meded. Landbouwhogeschool Gent, 22, 271
29. WILSON, P. W., and PROCTOR, M. H. 1958 Nitrogen fixation by Gramnegative bacteria. Nature, 182, 891.
30. PAUL, E. A., and NEWTON, J. D. 1961 Studies of aerobic non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria. Can. J. Microbiol. 7, 8.
31. YAMAGATA, U., and ITANO, A. 1923 Physiological study of Azotobacter chroococcum, beijerinckii and vinelandii types. J. Bacteriol. 8, 521.
32. TCHAN, Y. T. 1953 Studies of N-fixing bacteria. III. Azotobacter beijerinckii var. acido-tolerans. Proc. Linnean Soc. N.S. Wales, 78, 83.
33. JENSEN, V., and PETERSEN, E. J. 1955 Taxonomic studies on Azotobacter chroococcum Beij. and Azotobacter Beijerinckii Lipman. Royal Vet. and Agric. College. Yearbook, p. 107
34. HOFER, A. W. 1944 Flagellation of Azotobacter. J. Bacteriol. 48, 697.
35. BISSET, K. A., and HALE, C. M. 1953 The cytology and life cycle of Azotobacter chroococcum. J. Gen. Microbiol., 8, 442.
36. LOHNIS, F., and Smith, N.R. 1923 Studies upon the life cycles of the bacteria. J. Agric. Research, 23, 401.
37. WINOGRADSKY, S. 1925 Etudes sur la microbiologie du sol. I. Sur la méthode. Ann. Inst. Pasteur, 39, 299.
38. POCHON, J., TCHAN, Y. T., et WANG, T. L. 1948 Recherches sur le cycle morphologique et l'appareil nucléaire des Azotobacter. Ann. Inst. Pasteur, 74, 182.

39. GAINEY, P. L., and FOWLER, E. 1945 Growth curves of Azotobacter at different pH levels. J. Agric. Research. 70, 219.
40. STAPP, C., und RUSCHMANN, G. 1924 Zur Biologie von Azotobakter. Arb. Biol. Reichsanstalt Land- u. Forstwirtsch. 13, 305.
41. KRISHNA, P.G. 1928 The course of dextrose metabolism and nitrogen fixation by Azotobacter. Zentralbl. Bakt. Parasitenk. Abt II, 76, 228.
42. JENSEN, V., and PETERSEN, E. J. 1954 Studies on the occurrence of Azotobacter in Danish forest soils. Royal Vet. and Agric. College, Yearbook, p. 95.
43. BURK, D., LINEWEAVER, H., and HORNER, C. K. 1934 The specific influence of acidity on the mechanism of nitrogen fixation by Azotobacter. J. Bacteriol. 27, 325.
44. PETERSEN, E. J. 1925 Studies on the Azotobacter test and the reaction condition of the soil. Tidsskr. Planteavl, 31, 246
45. HARRIS, J.O., and GAINEY, P. L. 1944 Respiration of resting Azotobacter cells as affected by the respiration medium. J. Bacteriol., 48, 689.
46. LIPMAN, J. G. 1904 Soil bacteriological studies. New Jersey State Agr. Exp. Sta., Ann. Rept. 25, 237.
47. LIPMAN, C. B., and MC LEES, E. 1940 Dissociation of Azotobacter chroococcum (Beijerinck). Soil Sci., 50, 401.
48. LOHNIS, F., and SMITH, N. R. 1923 Studies upon the life cycles of the bacteria. II. Life history of Azotobacter. J. Agric. Research, 23, 401.
49. GREEN, R. A. 1935 Studies on protein synthesis by the genus Azotobacter. 39, 327.
50. ASO, K., and Yoshida, R. 1928 Application of the serum reaction in the classification of Azotobacter. Proc. First Intern. Congr. Soil Sci. (Washington), Comm. III, 1, 150.
51. SMITH, N. R. 1935 The occurrence of a strain of Azotobacter chroococcum which does not ferment mannitol. J. Bacteriol., 30, 323.

52. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. Reed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith N.R. 7° Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1957.
53. JENSEN, H. L. 1950 The occurrence of Azotobacter in cultivated soils of Denmark. Tidskr. Planteavl, 53, 622.
54. TCHAN, Y. T. 1953 Taxonomy of genus Azotobacter. Proc. Linnean Soc. N.S. Wales, 78, 85.
55. KLUYVER, A. J. and van REENEN, W. J. 1933 Ueber Azotobacter agilis Beijerinck. Arch. Mikrobiol. 4, 280.
56. DERX, H. G. 1951 L'accumulation spécifique de l'Azotobacter agile Beijerinck et de l'Azotobacter Vinelandii Lipman. Proc. Kon. Nederl. Akad. v. Wetensch. Amsterdam. C. 54, 624.
57. DERX, H. G. 1951 Azotobacter insigne spec. nov., fixateur d'azote à flagellation polaire. Proc. Kon. Nederl. Akad. v. Wetensch. Amsterdam, C 54, 342.
58. JENSEN, V. 1955 The Azotobacter-flora of some Danish water-courses Botanisk Tidsskrift, 52, 143.
59. KLUYVER, A. J., und van den BOUT, M. T. 1936 Notiz über Azotobacter agilis Beijerinck. Arch. Mikrobiol. 7, 261.
60. TCHAN, Y. T. 1953 Azotobacter beijerinckii (Lipman 1903) var. acido-tolerans (Tchan 1952). Proc. Linnean Soc. N.S. Wales, 78, 83.
61. JENSEN, H. L. 1955 Azotobacter macrocytogenes n. sp., a Nitrogen-fixing Bacterium resistant to acid reaction. Acta Agric. Scand. V, 278.
62. WINOGRADSKY, S. 1949 MICROBIOLOGIE DU SOL - Problèmes et Méthodes - Cinquante ans de Recherches. Masson, Paris.
63. MULDER, E. G. 1948 Importance of molybdenum in the nitrogen metabolism of microorganisms and higher plants. Plant and Soil, 1, 94.

64. POCHON, J. 1954 MANUEL TECHNIQUE D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DU SOL. Masson, Paris.
65. WILSON, P. W. 1952 EXPERIMENTS IN BACTERIAL PHYSIOLOGY. Burgess Publ. Co. Minneapolis USA
66. ALLEN, O. 1950 EXPERIMENTS IN SOIL BACTERIOLOGY. Burgess Publ. Co. Minneapolis, USA.
67. NILSSON, R., ALM, F., and BURSTROM, D. 1942 Mangan als Vetreter für Magnesium im Betriebsstoffwechsel und im Baustoffwechsel der Zelle. Arch. Mikrobiol., 12, 353.
68. PLAUT, G.W.E., and LARDY, H. A. 1949 The oxalacetate decarboxylase of Azotobacter vinelandii. J. Biol. Chem., 180, 13.
69. STONE, R. W. and WILSON, P. W. 1952 Respiratory activity of cell-free extracts from Azotobacter. J. Bacteriol. 63, 605.
70. LUFF-SCHOORL. 1929 Zeitschrift Unters. Lebensmitteln, 57, 566.
71. STEINBERG, R. A. 1919 A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of Aspergillus niger. Amer. J. Botany. 6, 330.
72. ROBERG, M. 1928 Ueber die Wirkung von Eisen-, Zink- und Kupfersalzen auf Aspergillen. Zentralbl. Bakt. und Parasitenkunde. Abt. II, 74, 333.
73. KINGMA BOLTJES, T. Y. 1935 Untersuchungen über die nitrifizierenden Bakterien. Arch. Mikrobiol. 6, 79.
74. HANKS, J. H. and WEINTRAUB, R. L. 1936 The pure culture Isolation of amonia-oxidising bacteria. J. Bact. 32, 653.
75. WARING, W. S., and WERKMAN, C. H. 1942 a Growth of bacteria in an iron-free medium. Arch. Biochem. 1, 303.
76. WARING, W.S., and WERKMAN, C. H. 1942 b Iron requirements of heterotrophic bacteria. Arch. Biochem. 1, 425.
77. YOUNG, E. G., BEGG, R. W., and PENTZ, E. I. 1944 The inorganic nutrient requirements of Escherichia coli. Arch. Biochem. 5, 121.

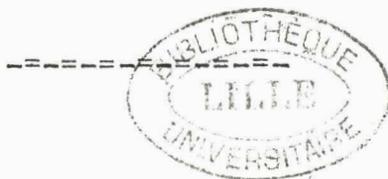
78. MC NAUGHT, M. L., OWEN, E. C., and SMITH, J.A.B. 1950 The utilisation on non-protein nitrogen in the bovine rumen. 6. The effect of metals on the activity of the rumen bacteria. *Biochem. J.* 46, 36.
79. MEIKLEJOHN, J. 1953 Iron and the Nitrifying Bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 8, 58.
80. BURK, D., LINEWEAVER, H. and HORNER, C.K. 1932 The physiological nature of humic acid stimulation of Azotobacter growth. *Soil Science*, 33, 455.
81. HORNER, C.K., and BURK, D. 1934 Magnesium, calcium and iron requirements for growth of Azotobacter in free and fixed nitrogen. *J. Agr. Research*, 48, 981.
82. BORTELS, H. 1939 Ueber die Wirkung von Agar sowie Eisen, Molybdän, Mangan und anderen Spurenelementen in stickstofffreier Nährlösung auf Azotobacter. *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, 100, 373.
83. RIPPEL, A. 1936 Eisen-, Agar- und Humuswirkung bei Azotobacter. *Arch. Mikrobiol.*, 7, 590.
84. MULDER, E. G. 1939 Ueber die Bedeutung des Kupfers für das Wachstum von Mikroorganismen und über eine mikrobiologische Methode zur Bestimmung des pflanzenverfügbaren Bodenkupfers. *Arch. Mikrobiol.*, 10, 72.
85. LEWIS, J. C. 1942 The influence of copper and iodine on the growth of Azotobacter agile. *Am. J. Botany*, 29, 207.
86. GERRETSEN, F. C. 1953 The influence of boron on the growth of Azotobacter chroococcum. *Riass, Comm. VI Congr. Intern. Microbiol.(Rome)*, 3, 120.
87. GERRETSEN, F. C. and de HOOP, H. 1954 Boron, an essential microelement for Azotobacter chroococcum. *Plant and Soil*, V, 349.
88. TOTH, S. J., PRINCE, A. L., WALLACE, A., and MIKHELSEN, D.S. 1948 Rapid Quantitative Determination of Eight Mineral Elements in Plant Tissue by a systematic Procedure involving use of a Flame Photometer. *Soil Science*, 66, 459.
89. LINEWEAVER, H. 1933 Characteristics of oxidation by Azotobacter. *J. Biol. Chem.* 99, 575.

90. KRZEMIENIEWSKA, H. 1910 Der Einfluss der Mineralbestandteile der Nährlösung auf die Entwicklung des Azotobacters. Bull. inter. acad. sci. Cracovie; Classe sci. math. nat. B, 1910, 376.
91. SCHROEDER, M. 1932 Die Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien. Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II, 85, 177.
92. EPOSITO, G., and WILSON, P. W. 1956 Trace Metal Requirements of Azotobacter. Proc. Soc. Biol. Med. 93, 564.
93. BURK, D., and LINEWEAVER, H. 1931 The influence of calcium and strontium upon the catalysis of nitrogen fixation by Azotobacter. Arch. Mikrobiol., 2, 155.
94. BURK, D., and HORNER, C.K. 1940 Molybdenum and calcium in Azotobacter Nutrition. Proc. Third Intern. Congr. Microbiol. (New York), 489.
95. NORRIS, J. R., and JENSEN, H. L. 1957 Calcium Requirements of Azotobacter. Nature, 180, 1493.
96. NORRIS, J.R., and JENSEN, H.L. 1958 Calcium Requirements of Azotobacter. Arch. Mikrobiologie, 31, 198.
97. WADE, H. E. 1952 Variation of Phosphorus Content of Escherichia coli during Cultivation. J. Gen. Microb. 7, 24.
98. MITCHELL, P. 1954 Transport of Phosphate across the Osmotic Barrier of Micrococcus pyogenes: Specificity of Kinetics. J. Gen. Microb., 11, 73.
99. KATCHMAN, B. J. and FETTY, O. W. 1955 Phosphorus metabolism in growing cultures of Saccharomyces cerevisiae. J. Bact. 69, 607.
100. POCHON, J. et DE BARJAC, H. 1958 Traité de microbiologie des Sols. Dunod, Paris.
101. POCHON, J. 1948 PRECIS DE MICROBIOLOGIE DU SOL. Masson, Paris.
102. JENSEN, V. 1961 Rhamnose for Detection and Isolation of Azotobacter vinelandii Lipman. Nature, 190, 832.
103. WINOGRADSKY, S. 1932 Ann. Inst. Pasteur, 48, 116. Cité par GUITTONEAU, G. et CHEVALIER, R., dans Compt. Rend. Acad. Sc. 1936, 203, 211.

104. GUITTONNEAU, G. et CHEVALIER, R. 1936 Sur l'utilisation de l'acide salicylique comme aliment énergétique par les Azotobacter du sol. Compt. Rend. Acad. Sc. 203, 211.
105. GUITTONNEAU, G. et CHEVALIER, R. 1936 Sur la sensibilité des Azotobacter du sol à la structure moléculaire des acides mono-oxybenzoïques. Compt. Rend. Acad. Sc. 203, 1400.
106. GUITTONNEAU, G. et CHEVALIER, R. 1939 Sur l'attaque des noyaux benzéniques et l'utilisation alimentaire du phénol par les Azotobacter du sol. Compt. Rend. Acad. Sc. 206, 863.
107. GUITTONNEAU, G. et CHEVALIER, R. 1939 Sur l'utilisation des composés phénoliques comme aliment énergétique par les Azotobacter du sol. Transactions of the Third Comm. Int. Soc. Soil Science, A, 161.
108. MONOD, J. 1958 RECHERCHES SUR LA CROISSANCE DES CULTURES BACTERIENNES, Ed. Hermann, Paris.
109. STANIER, R.Y. 1947 Simultaneous adaptation. A new technique for the study of metabolic pathways. J. Bacteriol. 54, 339.
110. KLUYVER, A. J. 1931 THE CHEMICAL ACTIVITIES OF MICRO-ORGANISMS. Univ. London Press. London.
111. KARSTROM, H. 1937 Enzymatische Adaptation bei Mikroorganismen. Erg. Enzymforsch. 7, 350.
112. STONE, R.W. and WILSON, P. W. 1952 Respiratory activity of cell-free extracts from Azotobacter. J. Bacteriol. 63, 605.
113. STONE, R.W. and WILSON, P. W. 1952 The incorporation of acetate in acids of the citric acid cycle by Azotobacter extracts. J. Biol. Chem. 196, 221.
114. SCHUTTER, J., and WILSON, P. W. 1955 Patterns of Enzymic Adaptation in Species of the Genus Azotobacter, J. Gen. Microb. 12, 446.
115. KARLSSON, J. L., and BARKER, H. A. 1948 Evidence against the occurrence of a tricarboxylic acid cycle in Azotobacter agilis. J. Biol. Chem. 175, 913.
116. KARLSSON, J. L., and BARKER, H. A. 1948 Induced Biochemical Mutants of Azotobacter agilis. J. Bacteriol. 56, 671.
117. REPASKE, R. and WILSON, P. W. 1953 Oxidation of intermediates of the tricarboxylic acid cycle by extracts of Azotobacter agilis. Proc. Nat. Acad. Sci. 39, 225.

118. UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., and STAUFFER, J. F. 1951
MANOMETRIC TECHNIQUES AND TISSUE METABOLISM. Burgess. Publ.Co.
119. KUNITZ, M., and MAC DONALD, M. 1946 J. Gen. Phys. 29, 393.
Cité dans GENERAL BIOCHEMISTRY de FRUTON, J.S., and SIMMONDS,
S. 1958, John Wiley & Sons, New York. p. 459.
120. BERGER, L. et al., 1946. J. Gen. Phys. 29, 379.
Cité dans GENERAL BIOCHEMISTRY de FRUTON, J.S., and SIMMONDS,
S. 1958 John Wiley & Sons, New York. p. 459.
121. SLEIN, M. W. et al., 1950. J. Biol. Chem. 186, 763.
Cité dans GENERAL BIOCHEMISTRY de FRUTON, J.S., and SIMMONDS,
S. 1958, John Wiley & Sons, New York. p. 460.
122. BALDWIN, E. 1957 DYNAMIC ASPECTS OF BIOCHEMISTRY. Cambridge
University Press. 3° Ed.
123. MC CORKINDALE, J. and EDSON, J.L. 1954 Polyol Dehydroge-
nases. 1. The specificity of rat-liver polyol dehydrogenase.
Biochem. J. 52, 518.
124. MARMUR, J., and HOTCHKISS, R.D. 1955 Mannitol Metabolism,
a transferable property of Pneumococcus. J. Biol. Chem.
214, 383.
125. TCHAN, Y. T. 1946 L'oxydation de l'acide benzoïque et la
formation du "corps noir" dans le sol. Ann. Inst. Pasteur,
72, 699.
126. TCHAN, Y. T. 1946 La benzoatase des Azotobacter. L'acide
salicylique terme intermédiaire de l'oxydation de l'acide
benzoïque. Ann. Inst. Pasteur, 72, 826.
127. STANIER, R. Y. 1948 The oxidation of aromatic compounds by
fluorescent Pseudomonads. J. Bacteriol. 55, 477
128. STANIER, R. Y. 1950 The Bacterial Oxidation of Aromatic
Compounds. I. Adaptive Patterns with respect to Polyphenolic
Compounds. J. Bacteriol. 59, 117.
129. STANIER, R. Y. 1950 The Bacterial Oxidation of Aromatic
Compounds. III. The enzymatic oxidation of catechol and
protocatechuic acids to β -keto adipic acid. J. Bacteriol.
59, 137. J. 52, 118.
130. MARMUR, J., and HOTCHKISS, R.D. 1955 Mannitol Metabolism,
a transferable property of Pneumococcus. J. Biol. Chem.
214, 383.
131. TCHAN, Y. T. 1946 L'oxydation de l'acide benzoïque et la

130. STANIER, R.Y. 1950 The Bacterial Oxidation of Aromatic Compounds. IV. Studies on the mechanism of Enzymatic degradation of Protocatechuic Acid. J. Bacteriol. 59, 527.
131. EVANS, W. C. 1947 Oxidation of phenol and benzoic acid by some soil bacteria. Biochem. J. 41, 373.
132. EVANS, W.C., PARR, W.H. and EVANS, R.A. 1949 The bacterial Oxidation of Aromatic Compounds. Biochem. J. 44, viii.
133. EVANS, W. C. and SMITH, B.S.W. 1951 The oxidation of Aromatic Compounds by Soil Bacteria. Biochem. J. 49, x-xi.
134. EVANS, W.C. and SMITH, B.S.W. 1951 Chemistry of the oxidative metabolism of certain aromatic compounds by microorganisms. Nature, 168, 772.
135. HAPPOLD, F.C. 1950 The oxidation of aromatic rings by microorganisms in metabolism. Biological Oxidation of Aromatic Rings. Biochem. Soc. Symp. N° 5, 85. Cambridge University Press.
136. KILBY, B.A. 1951 The formation of β -keto adipic acid by bacterial fission of aromatic rings. Biochem. J. 49, 671.
137. BLOCK; R.J., LE STRANGE, R., and ZWEIG, G. 1952 PAPER CHROMATOGRAPHY. Academic Press. New York.
138. LEDERER, E., and LEDERER, H. 1957 CHROMATOGRAPHIE. Elsevier, Amsterdam.
139. LINSKENS, H. F. 1955 PAPIERCHROMATOGRAPHIE IN DER BOTANIK. Springer. Berlin.
140. BHAT, M.G. RAMAKRSHNAN, T., and BHAT, J.V. 1959 Salicylate as intermediate in the breakdown of aromatic ring by Pseudomonas convexa var. hippuricum. Can. J. Microbiol. 5, 109.
141. VOETS, J. P. 1958 The Oxidation of Benzoic Acid by Azotobacter. Naturwissenschaften, 45, 386.



FACULTE DES SCIENCES DE LILLE

Doyen Honoraire : M.P. PRUVOST

Professeurs honoraires : MM. ARNOULT, BEGHIN, BROCHARD
CAU, CHAPELON, CHAUDRON,
CORDONNIER, DEHORNE, DOLLE,
FLEURY, P.GERMAIN, KOURGANOFF,
LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG,
MM. MAZET, A.MICHEL, NORMANT,
PARISELLE, PASCAL, PAUTENIER,
ROUBINE, WIEMANN, ZAMANSKY.

DOYEN: M. PARREAU, Professeur de Mathématiques

Assesseur: M. ROUELLE, Professeur de Physique et
Electricité Industrielles

Professeurs : MM. BONNEMIAN-BEMIA, chimie et physico-
chimie industrielles
BONTE, Géologie appliquée
Mlle CHAMFY, Mathématiques
MM. CORSIN, Paléobotanique
DECUYPER, Mathématiques
DEFRETIN, Biologie maritime
N.... Analyse supérieure et calcul des
probabilités
DEHORS, Physique industrielle
DELATRE, Géologie
N.... Chimie minérale
DESCOMBES, Calcul différentiel et
intégral
DURCHON, Zoologie
GABILLARD, Radioélectricité et Electronique
GERMAIN, Chimie générale et chimie organique.
GLACET, Chimie
HEIM DE BALSAC, Zoologie
HEUBEL, Chimie
HOCQUETTE, Botanique générale et appliquée
KAMPE DE FERIET, Mécanique des fluides
LEBEGUE, Botanique
LEBRUN, Radioélectricité et électronique
LUCQUIN, Chimie minérale

MARION, Chimie
Mlle MARQUET, Mathématiques
MM. MARTINOT-LAGARDE, Mécanique des fluides
MONTREUIL, Chimie biologique
PEREZ, Physique
POITOU, Algèbre supérieure
N.... Physique générale
N.... Mécanique rationnelle et expérimentale
SAVARD, Chimie générale
TILIEU, Physique
TRIDOT, Chimie appliquée
VIVIER, Zoologie
WATERLOT, Géologie et minéralogie
WERTHEIMER, Physique

Maîtres de conférences

MM. BACCHUS, Astronomie
BECART, Physique
BOURIQUET, Physique
BOUISSET, Physiologie animale
CELET, Géologie
GONTIER, Mécanique des fluides
HERZ, Mathématiques
HUARD de LA MARRE, Calcul Numérique
LACOMBE, Mathématiques
Mlle LENOBLE, Physique
MM. LINDER, Botanique
LURCAT, Physique
MAUREL, Chimie
MENNESSIER, Géologie
MONTARIOL, Chimie
Mlle NAZE, Mathématiques
MM. POLVECHE, Géologie
PROUVOST, Géologie
SCHALLER, Zoologie
Chargés d'enseignement: Mlle GOUSSELAND, Physique
MM. LIEBAERT, Radioélectricité
SCHILTZ, Physique

Secrétaire, Mme BOUCHEZ