

## FIXATION MICROBIENNE DE L'AZOTE DANS UN SOL SALIN TUNISIEN

THERESA HAUKE-PACEWICZOWA

Zaklad Mikrobiologii I.U.N.G., Pulawy, Pologne

et

J. BALANDREAU et Y. DOMMERGUES

Centre de Pédologie du C.N.R.S., Vandoeuvre-les-Nancy, France

(Accepted 11 November 1969)

**Résumé**—La fixation d'azote moléculaire a été étudiée sur un sol salin tunisien, soumis aux quatre traitements suivants:

- (1) Sol non ensemencé en maïs, maintenu à la capacité au champ (sol non rhizosphérique non engorgé).
- (2) Sol ensemencé en maïs, maintenu à la capacité au champ (sol rhizosphérique non engorgé).
- (3) Sol non ensemencé en maïs, submergé 10 jours après la mise en route de l'expérience (sol non rhizosphérique engorgé).
- (4) Sol ensemencé en maïs submergé 10 jours après la mise en route de l'expérience (sol rhizosphérique engorgé).

La fixation d'azote moléculaire, mesurée par la méthode de réduction de l'acétylène en éthylène, n'apparaît que dans le cas du sol rhizosphérique engorgé (traitement 4). Les racines de maïs ne fixant pas, par elles-mêmes, l'azote atmosphérique, ce processus est strictement d'origine microbienne et ne se manifeste qu'à proximité des racines de maïs. Les microorganismes responsables appartiennent essentiellement au genre *Clostridium*. L'activité fixatrice d'azote ne devient significative que lorsque la densité des *Clostridium* dépasse le seuil de  $10^6$  cellules/g de sol.

**Summary**—Nitrogen fixation was studied in a Tunisian saline soil submitted to four treatments:

- (1) Bare soil, maintained at field capacity (moist non-rhizosphere soil).
- (2) Soil planted with maize, maintained at field capacity (moist rhizosphere soil).
- (3) Bare soil, waterlogged 10 days after the beginning of the experiment (waterlogged non-rhizosphere soil).
- (4) Soil planted with maize, waterlogged 10 days after the beginning of the experiment (waterlogged rhizosphere soil).

Nitrogen fixation, measured by the acetylene reduction method, occurred only in the waterlogged rhizosphere soil (treatment 4). The maize plants did not fix atmospheric nitrogen. This process was strictly microbial and it was intense in the vicinity of the maize roots. The predominant microorganisms involved were *Clostridium* sp. Nitrogen fixation was significant only when the density of *Clostridium* was more than  $10^6$  cells/g of soil.

### INTRODUCTION

Nos connaissances sur l'autécologie des bactéries fixatrices d'azote sont actuellement assez développées, tout au moins en ce qui concerne certaines espèces ou souches, appartenant aux genres *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*. Par contre on est très mal renseigné sur la synécologie de ces microorganismes, c'est-à-dire sur leur comportement, et notamment leur activité fixatrice, à partir des seuls substrats existant spontanément dans le sol et en présence des autres éléments constitutifs de la microflore tellurique. Le retard dans ce domaine est, en partie, d'origine méthodologique, la seule technique permettant, jusqu'à ces dernières années, d'évaluer la fixation brute d'azote dans le sol étant la technique isotopique qui, on le sait, se prête difficilement aux analyses de série. Mais la découverte du

phénomène de réduction de l'acétylène en éthylène par le complexe enzymatique fixateur d'azote (Schollhorn et Burris, 1966; Dilworth, 1966) a ouvert la voie à une technique sensible et rapide d'appréciation de l'activité fixatrice d'azote par des micropopulations complexes (Stewart, Fitzgerald et Burris, 1967; 1968).

C'est en faisant appel à cette technique que nous avons abordé le problème de l'écologie de la fixation d'azote dans un sol salin tunisien, dans lequel la densité parfois élevée ( $10^6$ ) d'*Azotobacter* (Dommergues, Combremont, Beck et Ollat, 1969b) suggérait une fixation microbienne active. Nous nous sommes limités à l'étude de deux facteurs de l'environnement, le facteur rhizosphère et le facteur engorgement. L'importance de ce dernier facteur a été soulignée dans une note récente (Hauke-Pacewiczowa, Balandreau et Dommergues, 1969).

#### MATERIEL ET METHODES

##### *Sol*

Le sol utilisé pour l'expérimentation provient de la station agronomique de Nakta, Tunisie, station installée en 1962 par le Centre de Recherche pour l'Utilisation de l'Eau Salée en Irrigation (C.R.U.E.S.I.) (Van Hoorn, 1966). C'est un sol salin typique formé sur alluvions; son pH est de 7,8; sa teneur en argile de l'ordre de 20 pour cent; sa conductivité électrique mesurée en  $\text{mmho.cm}^{-1}$  est de l'ordre de 13. Pour plus de détails concernant les caractéristiques chimiques de ce sol, on se reportera à la note publiée récemment (Dommergues *et al.*, 1969b).

Le sol est réparti dans des colonnes plates en chlorure de polyvinyle de  $50 \times 10$  mm de section et de 100 mm de hauteur, à raison de 150 g par colonne; ces colonnes, fermées à la base, s'ouvrent latéralement, ce qui permet d'extraire facilement les racines et le sol rhizosphérique en fin d'expérience. Comme le sol étudié est favorable à la prolifération, dans la rhizosphère, de bactéries sulfato-réductrices, certaines zones (notamment le bas des colonnes) s'enrichissent en sulfures; il a semblé intéressant d'analyser séparément les échantillons de sol rhizosphérique pauvres en sulfures ( $\text{S}^{2-} < 1 \times 10^{-6}$ ) et les échantillons riches en sulfures ( $\text{S}^{2-} > 1 \times 10^{-6}$ ).

##### *Préparation du sol rhizosphérique*

Les graines de maïs hybride (variété I.N.R.A. 420) sont stérilisées 30 min dans une solution à 7 pour cent d'eau oxygénée à 110 volumes additionnée de 2 gouttes de Teepol, puis mises à germer en boîte de Petri sur une mince couche de gélose à 3 pour cent, à raison d'une graine par boîte de Petri; les plantules contaminées sont éliminées.

Les graines germées sont placées dans le sol, à raison de 3 par colonne, les graines *affleurant* à la surface; cette précaution évite le dépérissement des plantules qui se produit souvent, à la suite du développement excessif des bactéries sulfato-réductrices dans la spermosphère, lorsque les graines sont enfoncées trop profondément dans ce sol dont la structure est défectueuse.

On laisse les plantules se développer pendant une dizaine de jours dans le sol maintenu par arrosage quotidien à une humidité voisine de la capacité au champ. Lorsque les plants de maïs atteignent 10 cm de hauteur environ, une moitié des colonnes de sol est immergée dans l'eau distillée (traitement: *sol rhizosphérique engorgé*) et l'autre moitié est maintenue à la capacité au champ (traitement: *sol rhizosphérique non engorgé*). Tous les 4 jours on apporte à chaque colonne 5 ml de la solution nutritive de Börner et Rodemacher (Dommergues *et al.*, 1969b).

Par sol de la *rhizosphère éloignée*, nous entendons le sol récolté avec une fine spatule dans un rayon de 2 à 3 mm autour des racines. Par sol de la *rhizosphère proche*, nous entendons

le sol qui adhère aux racines. Dans le premier cas, l'échantillon est constitué uniquement par du sol; dans le deuxième cas, il est constitué par du sol *et* des racines.

Pendant toute la durée de l'expérience, la température est maintenue à 26°C; l'éclairage est obtenu par lumière naturelle (2000 lx, photopériode de 16 h) avec un appoint de lumière artificielle de 1000 lx supplémentaires pendant 8 h par jour.

#### *Préparation du sol non rhizosphérique*

Le sol non rhizosphérique est extrait de colonnes de sol traités de la même façon que le sol où est cultivé le maïs; d'où les deux autres traitements: *sol non rhizosphérique engorgé*, *sol non rhizosphérique non engorgé*.

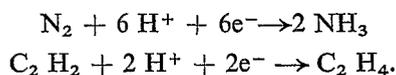
#### *Culture hydroponique axénique de maïs*

Parallèlement à la culture en sol non stérile, on cultive du maïs stérilement conformément à la technique décrite par ailleurs (Dommergues *et al.*, 1969b).

#### *Mesure de l'activité fixatrice d'azote*

Nous adoptons, pour cette mesure, la technique proposée par Stewart *et al.* (1967, 1968) et adaptée au sol par Balandreau (en préparation). Sans entrer dans les détails techniques publiés récemment par ce dernier auteur, rappelons ci-dessous le principe de la méthode et les principales opérations effectuées.

L'acétylène, analogue stérique et électronique de l'azote, est substitué à celui-ci dans l'atmosphère fournie à l'échantillon à étudier: il est hydrogéné par la nitrogénase comme le serait l'azote dans les mêmes conditions et on dose l'éthylène formé pendant le temps d'exposition à l'acétylène.



Il se forme théoriquement trois molécules d'éthylène là où une molécule d'azote aurait été fixée.

L'échantillon de 1 à 3 g (sol, sol *et* racines excisées ou racines excisées seules) est introduit dans un flacon de 12 ml fermé par un disque étanche de caoutchouc; une aiguille hypodermique traversant ce dernier permet de faire un vide poussé dans la fiole, de façon à éliminer l'azote; on introduit ensuite par cette aiguille un mélange d'hélium et d'acétylène, à la pression atmosphérique. L'échantillon est incubé à 28°C pendant 24 h.

Le dosage de l'éthylène formé est effectué à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Varian Aerograph 1520. Ethylène et acétylène sont séparés à 50°C sur colonne de Porapak R (diamètre 1/4 de pouce; longueur 5 pieds). La détection se fait par ionisation de flamme d'hydrogène. La forme des pics du chromatogramme est telle que leur hauteur est proportionnelle à la quantité d'éthylène à mesurer.

L'incubation simultanée des racines excisées *et* du sol adhérent, qui est utilisée pour la mesure de la fixation d'azote dans la rhizosphère proche, présente *a priori* deux inconvénients: (i) les racines du végétal pourraient fixer l'azote en dehors de toute intervention microbienne (ii) les racines pourraient, après excision, libérer des exsudats différant qualitativement et quantitativement des exsudats de la plante vivante. La première objection est à rejeter puisque l'on a vérifié que les racines, par elles-mêmes, sont dépourvues d'activité fixatrice (cf. fin du paragraphe 'Résultats'). La deuxième objection est plus sérieuse; mais nous pensons que la durée de l'incubation est assez réduite (24 h) pour que les modifications

dans la composition des exsudats soient relativement peu importantes. Toutefois, il s'agit là d'un problème qui nous préoccupe et nous avons entrepris une expérience destinée à déceler des variations éventuelles de l'intensité de fixation de l'azote atmosphérique, suivant que les racines sont excisées ou non.

#### *Numérations bactériennes*

Les numérations d'*Azotobacter* sont faites sur le milieu gélosé à la mannite décrit par Pochon et Tardieux (1962), l'ensemencement étant effectué par des dilutions de suspensions de sol s'échelonnant entre  $10^{-1}$  et  $10^{-4}$ .

Les numérations de *Clostridium* sont faites sur le milieu décrit par Pochon et Tardieux (1962), mais modifié par adjonction d'extrait de levure Difco à 2 pour mille (Dommergues et Villemin, en préparation).

#### *Analyse statistique des résultats*

Les résultats des dispositifs expérimentaux adoptés, qui sont du type factoriel  $2 \times 2$ , ont été analysés suivant la méthode simple préconisée par Beck, Dommergues et Van Den Driessche (1969).

### RESULTATS

#### *Influence de l'engorgement sur l'activité fixatrice d'azote et la densité des Clostridium et Azotobacter dans la rhizosphère proche*

L'activité fixatrice d'azote—mesurée par la réduction de l'acétylène en éthylène—est nulle dans le sol non rhizosphérique. L'activité fixatrice d'azote dans la rhizosphère proche est insignifiante ( $0,12 \times 10^{-9}$  M éthylène/h/g de sol sec) lorsque le sol est maintenu à la capacité au champ (sol non engorgé), mais elle est importante (4,61) dans le sol engorgé où la sulfato-réduction se manifeste ( $S^{2-} > 1 \times 10^{-6}$ ). L'analyse statistique dont les résultats sont résumés dans le Tableau 1 montre l'existence d'une interaction significative ( $P = 0,01$ ) 'effet rhizosphère proche  $\times$  engorgement'.

TABLEAU 1. INTERACTION 'EFFET RHIZOSPHERE PROCHE  $\times$  ENGORGEMENT' SUR LA RÉDUCTION DE L'ACÉTYLÈNE EN ÉTHYLÈNE ( $\times 10^{-9}$  M ÉTHYLÈNE/h/g DE SOL SEC) ( $P = 0,01$ )

	Sol non engorgé	Sol engorgé ( $S^{2-} > 1 \times 10^{-6}$ )
Sol non rhizosphérique	0	0
Sol de la rhizosphère proche	0,12	4,61

N.B. Les chiffres de la première ligne correspondent aux moyennes de 5 répétitions. Les chiffres de la deuxième ligne correspondent aux moyennes de 10 répétitions.

En ce qui concerne la densité des *Clostridium* fixateurs d'azote, on observe effectivement l'existence d'une interaction significative ( $P = 0,01$ ) du même type (Tableau 2); mais, alors que l'activité fixatrice est insignifiante dans la rhizosphère non engorgée, les *Clostridium* prolifèrent déjà de façon importante dans cet habitat; il ne semble pas y avoir un parallélisme étroit entre l'activité fixatrice d'azote et la densité des *Clostridium*.

Dans le sol utilisé pour notre expérience, la densité des *Azotobacter* présente une variabilité si élevée qu'il n'est pas possible de mettre en évidence une différence significative entre

TABLEAU 2. INTERACTION 'EFFET RHIZOSPHERE PROCHE  $\times$  ENGORGEMENT' SUR LA DENSITÉ DES *Clostridium* FIXATEURS D'AZOTE ( $\log_{10}$  DU NOMBRE DE BACTÉRIES/g DE SOL SEC) ( $P = 0,01$ )

	Sol non engorgé	Sol engorgé
Sol non rhizosphérique	4,26	4,72
Sol de la rhizosphère proche	6,27	8,95

N.B. Les chiffres correspondent aux moyennes de 4 répétitions.

les traitements. Aussi indiquons-nous seulement les tendances suivantes qui ressortent des résultats: dans le sol rhizosphérique, la densité des *Azotobacter* est de l'ordre de  $10^2$ /g de sol sec; dans le sol de la rhizosphère proche, engorgé ou non, cette densité est comprise entre  $10^3$  et  $10^5$ ; quel que soit le traitement, la densité des *Azotobacter* n'atteint jamais celle des *Clostridium*.

*Influence de la distance des racines et de la teneur du sol en sulfures sur l'activité fixatrice d'azote*

Le Tableau 3 montre que l'activité fixatrice d'azote—mesurée par la réduction de l'acétylène en éthylène—est plus importante (i) dans la rhizosphère proche que dans la rhizosphère éloignée (ii) dans le sol rhizosphérique dont la teneur en sulfures est supérieure à  $1 \times 10^{-6}$  que dans celui dont la teneur est inférieure à  $1 \times 10^{-6}$ . L'analyse statistique des résultats (Tableau 3) met, en outre, en évidence, l'existence d'une interaction significative ( $P = 0,01$ ) 'distance des racines  $\times$  teneur du sol en sulfures'. En ce qui concerne la relation entre la fixation d'azote et la teneur du sol en sulfures, elle n'est pas de nature linéaire; la fixation présente un maximum d'activité lorsque la teneur du sol en sulfures est de l'ordre de  $20 \times 10^{-6}$ ; puis cette activité diminue progressivement au fur et à mesure que cette teneur augmente.

TABLEAU 3. INTERACTION 'DISTANCE DES RACINES  $\times$  TENEUR DU SOL EN SULFURES' SUR LA RÉDUCTION DE L'ACÉTYLÈNE EN ÉTHYLÈNE ( $\times 10^{-9}$  M ÉTHYLÈNE/h/g DE SOL SEC) ( $P = 0,01$ )

	$S^{2-} < 1 \times 10^{-6}$	$S^{2-} > 1 \times 10^{-6}$
Sol de la rhizosphère éloignée	0,12	2,29
Sol de la rhizosphère proche	1,29	4,61

N.B. Les chiffres correspondent aux moyennes de 10 répétitions.

*Activité fixatrice d'azote des racines*

Ainsi qu'on l'a déjà signalé au paragraphe 'Matériel et méthodes', les échantillons correspondant à la rhizosphère proche sont constitués par les racines et le sol y adhérent; dans ces conditions, on pourrait supposer que la fixation d'azote est, non seulement d'origine microbienne, mais aussi d'origine végétale. C'est pourquoi nous avons comparé (i) l'activité fixatrice de racines stériles provenant d'une culture axénique de maïs (ii) l'activité fixatrice de racines non stériles provenant de plants de maïs cultivés dans le sol salin et lavées très soigneusement après leur extraction. Le Tableau 4 montre que les racines stériles ne fixent

pas l'azote, contrairement aux racines non stériles, qui en fixent des quantités relativement importantes. La fixation d'azote dans ce deuxième cas est certainement due aux micro-organismes vivant à la surface des racines non éliminés par le lavage.

TABLEAU 4. RÉDUCTION DE L'ACÉTYLÈNE PAR LES RACINES DE MAÏS LAVÉES STÉRILES ET NON STÉRILES ( $\times 10^{-9}$  MÉTHYLÈNE/h/g DE RACINE SÉCHÉE À 60°C) ( $P = 0,01$ )

Racines stériles provenant d'une culture axénique	Racines non stériles provenant d'un sol engorgé
0	0,97

N.B. Le chiffre à gauche correspond à la moyenne de 4 répétitions, l'autre chiffre correspond à la moyenne de 9 répétitions.

### CONCLUSION

Dans le sol salin étudié, l'azote atmosphérique n'est fixé par la microflore hétérotrophe\* que dans l'habitat particulier constitué par la *rhizosphère proche engorgée*; cet habitat est caractérisé (i) par la présence de substrats énergétiques en quantité suffisante (ii) par une anaérobiose assez stricte, résultant du blocage de la diffusion de l'oxygène par l'engorgement. La nécessité d'une source d'énergie pour le processus de fixation microbienne explique parfaitement le fait que ce processus soit localisé à la rhizosphère proche. Quant à l'engorgement, divers auteurs, dont Barrow et Jenkinson (1962), ont signalé son effet favorable sur le processus de fixation microbienne. Nos expériences montrent qu'il n'est pas seulement favorable: il est indispensable (Tableau 1); nous avons précisé, en outre, que la fixation est plus intense quand la teneur du sol en sulfures est supérieure à  $1 \times 10^{-6}$  (Tableau 3), c'est-à-dire quand le potentiel d'oxydo-réduction devient négatif. Mais, lorsque la teneur en sulfures dépasse  $20 \times 10^{-6}$ , l'activité fixatrice décroît. La fixation microbienne exige donc un certain niveau d'anaérobiose; mais cette anaérobiose ne doit pas être excessive.

Les résultats obtenus mettent en évidence l'existence d'une interaction hautement significative 'effet rhizosphère proche  $\times$  humidité', en ce qui concerne l'activité fixatrice d'azote; une interaction du même type a déjà été constatée par l'un de nous, dans le cas de la sulfato-réduction (Dommergues, Jacq et Beck, 1969a). Jusqu'à présent, les recherches sur l'effet rhizosphère ont été conduites en négligeant l'intervention du facteur humidité; les conclusions auxquelles nous parvenons ici montrent, au contraire, qu'il est indispensable d'analyser très attentivement les interactions de ce type.

Contrairement aux hypothèses émises par certains auteurs, dont Stevenson (1959), Gelt'ser (1965) ou Turchin *et al.* cités par Moore (1966), la plante ne peut fixer l'azote par elle-même. La fixation dans la rhizosphère est donc exclusivement d'origine microbienne.

Les *Clostridium* semblent jouer un rôle prépondérant pour les deux raisons suivantes: (i) leur densité est beaucoup plus élevée que celle des *Azotobacter* (elle atteint le chiffre considérable de  $10^8$  à  $10^9$  unités/g de sol sec) (ii) les *Clostridium* sont mieux adaptés que les *Azotobacter* à l'habitat réducteur que constitue la rhizosphère engorgée. La possibilité de l'intervention des *Azotobacter* ne doit cependant pas être totalement éliminée, car on sait que ces bactéries peuvent se développer dans des conditions où les bactéries sulfato-réductrices prolifèrent (Le Gall, Senez et Pichinoty, 1959). La comparaison des Tableaux 1 et 2 révèle enfin que l'activité fixatrice d'azote ne devient significative que lorsque la densité des

\* Il n'est pas question ici de la fixation par les Cyanophycées car elles ne jouent vraisemblablement aucun rôle dans la rhizosphère.

*Clostridium* dépasse le seuil de  $10^6$ , seuil beaucoup plus élevé que le seuil habituellement admis.

## BIBLIOGRAPHIE

- BALANDREAU J. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* En préparation.
- BARROW N. J. et JENKINSON D. S. (1962) The effect of waterlogging on fixation of nitrogen by soil incubated with straw. *Pl. Soil* **16**, 258-262.
- BECK G., DOMMARGUES Y. et VAN DEN DRIESSCHE R. (1969) L'effet-litière II. Etude expérimentale du pouvoir inhibiteur des composés hydrosolubles des feuilles et des litières forestières vis-à-vis de la microflore tellurique. *Oecologia plantarum*.
- DILWORTH M. J. (1966) Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. biophys. Acta* **127**, 285-294.
- DOMMARGUES Y. et VILLEMIN G. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* En préparation.
- DOMMARGUES Y., JACQ V. et BECK G. (1969a) Influence de l'engorgement sur la sulfato-réduction rhizosphérique dans un sol salin. *C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris* **268**, 605-608.
- DOMMARGUES Y., COMBREMONT R., BECK G. et OLLAT C. (1969b) Note préliminaire concernant la sulfato-réduction rhizosphérique dans un sol salin tunisien. *Rev. Ecol. Biol. Sol* **6**, 115-129.
- GEL'TSER F. Y. (1965) The significance of symbiotrophic microorganisms (endophytes) for the productivity of plants. In *Plant-microbes Relationships* (J. Macura and V. Vancura, Eds), pp. 291-295, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.
- HAUKE-PACEWICZOWA T., BALANDREAU J. et DOMMARGUES Y. (1969) Influence de l'engorgement sur la fixation microbienne de l'azote moléculaire dans la rhizosphère d'un maïs. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris* **269**, 1356-1358.
- LE GALL J., SENEZ J. C. et PICHINOTY F. (1959) Fixation de l'azote par les bactéries sulfato-réductrices. Isolement et caractérisation de souches actives. *Anns. Inst. Pasteur, Paris* **96**, 223-230.
- MOORE, A. W. (1966) Non-symbiotic nitrogen fixation in soil and soil-plant systems. *Soils Fertil.* **29**, 113-128.
- POCHON J. et TARDIEUX P. (1962) *Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol*, Editions de la Tourelle, Saint-Mandé.
- SCHÖLLHORN R. et BURRIS H. R. (1966) Study of intermediates in nitrogen fixation. *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.* **25**, 710.
- STEVENSON G. (1959) Fixation of nitrogen by non-nodulated seed plants. *Ann. Botany N.S.* **23**, 622-635.
- STEWART W. D. P., FITZGERALD G. P. et BURRIS R. H. (1967) *In situ* studies on  $N_2$  fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **58**, 2071-2078.
- STEWART W. D. P., FITZGERALD G. P. et BURRIS R. H. (1968) Acetylene reduction by nitrogen-fixing blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* **62**, 336-348.
- VAN HOORN J. W. (1966) Recherches sur l'utilisation de l'eau salée en irrigation en Tunisie. *Nature et Ressources* **2**, 3-7.