

INDUCTION DE L'ENKYSTEMENT CHEZ *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* (*)

par M. MOURARET (**)

(avec la collaboration technique de M^{me} L. SUAVIN)

(Centre O. R. S. T. O. M. de Bondy
et Centre O. R. S. T. O. M. d'Adiopodoumé)

SUMMARY

Cells of *Azotobacter chroococcum* grown in a liquid glucose medium are transferred into buffered solutions of pH between 4.5 and 9.5. The cysts are counted after a night at 30° C.

When the solutions contain the buffer components alone, their saline concentration is 0.2 M. The cyst formation increases as the pH moves away from neutrality and the proportion of cysts reaches 80 % to 100 % at the extreme pH values.

The addition of NaCl (in molar concentration) at neutral pH results in an increased rate of cyst formation. This increase does not take place when the cells are deficient in phosphorus or iron.

The addition of peptone at a 10 % concentration to the buffered solutions induces almost all the cells to encyst throughout the pH range examined.

The presence of n-butanol in 2 % concentration promotes the cyst formation in acid and slightly basic media.

This behaviour of the cells shows that the formation of cysts can be induced by some alteration in the media other than those brought about by the mere development of the cultures. The proportion of the cells concerned varies according to the treatment used. Another feature is that the ability of the cells to encyst, which is shown under treatment, is influenced by the initial growth conditions.

INTRODUCTION

Les recherches de Winogradsky [8] sur l'écologie des *Azotobacter* ont mis en évidence le rôle déterminant que peut jouer la nutrition carbonée dans l'enkystement. En milieu liquide, *Azotobacter vinelandii* s'enkystait massivement en présence de n-butanol ou d'éthanol, et très faiblement en présence de glucose ou de mannitol. Les deux derniers substrats étaient en outre responsables de l'apparition de formes anormales. Ce comportement d'*Azoto-*

(*) Manuscrit reçu le 27 octobre 1969.

(**) Adresse actuelle: Centre O.R.S.T.O.M., de Dakar-Hann, boîte postale n° 1386, Dakar (Rép. du Sénégal).

bacter vinelandii amena l'auteur à conclure que dans les conditions naturelles ce microorganisme utilise les produits de fermentation dits « mauvais aliments » : alcools et acides organiques.

L'influence favorable du n-butanol a été confirmée récemment. Socolofsky et Wyss [4] ont obtenu des cultures enkystées d'*Azobacter vinelandii* (souche 12837) en remplaçant le saccharose par le n-butanol dans le milieu solide de Burk. Tchan et coll. [6] observent, après deux ou trois semaines de culture, l'enkystement complet d'*Azotobacter chroococcum* sur milieu solide renfermant du n-butanol et du saccharose. L'enkystement de 95 p. 100 des cellules d'une culture d'*Azotobacter vinelandii* (souche O), dans les conditions de culture sur milieu solide préconisées par Socolofsky et Wyss [4], est rapporté par Layne et Johnson [2]. En milieu liquide, par contre, la production de kystes était aussi réduite avec n-butanol qu'avec saccharose.

Ultérieurement, il a été montré que la supériorité du n-butanol sur les sucres pour la formation des kystes n'était pas aussi absolue. D'autres facteurs tels que la souche utilisée et la concentration en substrat interviennent également. Stevenson et Socolofsky [5] ont obtenu un enkystement presque complet de cultures d'*Azotobacter vinelandii* (souche ATCC 12837) âgées de 6 jours sur milieu solide de Burk renfermant 0,3 p. 100 de glucose, 0,2 p. 100 de n-butanol ou 0,5 p. 100 de saccharose. Deux autres souches d'*Azotobacter vinelandii* (O et ATCC 9104) cultivées sur les deux derniers milieux ne s'enkystaient que faiblement. Sur milieu au glucose, l'enkystement de la souche ATCC 12837 diminuait rapidement de part et d'autre de la concentration 0,3 p. 100 en substrat carboné. Il se produisait parallèlement pour les concentrations supérieures à 0,3 p. 100, un important abaissement du pH.

Les études qui viennent d'être rapportées concernent la recherche des conditions de milieu conduisant directement à l'enkystement. D'autres travaux diffèrent de ce schéma par l'utilisation successive de deux milieux de culture. Les cellules récoltées sur le premier milieu sont transférées massivement dans le deuxième. Layne et Johnson [2] font passer une culture d'*Azotobacter vinelandii* (souche O), obtenue sur milieu gélosé de Burk en tubes, dans 50 ml de milieu liquide. Ce dernier est carencé en un ou deux éléments (Fe, Mg, Ca, Mo). Après 18 h d'agitation, la production de cellules enkystées est de 55 à 75 p. 100 en l'absence d'un seul élément et de 85 à 95 p. 100 en l'absence de deux éléments. En milieu non carencé, un abaissement de la concentration en saccharose entraîne également une intensification de l'enkystement. Ces observations ont conduit les auteurs à considérer que, dans les conditions naturelles, les kystes seraient formés en réponse à divers changements défavorables de l'environnement plutôt qu'à la présence de composés tels que le butanol.

Lin et Sadoff [3] utilisent, pour la première étape de culture, le milieu liquide de Burk renfermant 1 p. 100 de glucose. Les cellules d'*Azotobacter vinelandii* (souche ATCC 12837) y sont récoltées à la fin de la phase exponentielle, après 20 à 22 h, et transférées dans un deuxième milieu liquide dont la composition en éléments minéraux est identique, mais où le glucose a été remplacé par un autre substrat carboné. L'enkystement a lieu en 4 ou 5 jours. Il affecte 62 p. 100 des cellules avec le n-butanol et respectivement 90 à 93 p. 100 avec le crotonate et le β -hydroxybutyrate, deux dérivés du

n-butanol. La production de kystes est seulement de 8 p. 100 lorsque les cellules sont transférées dans un milieu renfermant du glucose à la concentration 0,1 p. 100. La présence simultanée de glucose et de β -hydroxybutyrate dans le deuxième milieu entraîne la perturbation du processus d'enkystement et la libération d'une glycoprotéide.

La comparaison des résultats rapportés dans ces différentes études montre clairement qu'il n'est pas encore possible de tirer une conclusion définitive en ce qui concerne l'influence de la nutrition carbonée sur l'enkystement. Pour cela, d'autres facteurs impliqués dans le processus d'enkystement devront être élucidés.

Azotobacter chroococcum, n'ayant pas encore donné lieu à des recherches sur l'enkystement, a été retenu dans la présente étude. La méthode utilisée comporte deux étapes, comme dans les dernières études rapportées. Cependant, des deux milieux successifs, seul le premier est un milieu de culture; le deuxième est un milieu de traitement ayant pour but d'exprimer l'aptitude à l'enkystement acquise dans la culture initiale.

Dans les conditions naturelles, de multiples interactions entre les activités microbiennes ont lieu, si bien que les microorganismes sont soumis à des facteurs autres que ceux qui résultent de leur propre activité. Il paraît donc restrictif de rechercher les conditions d'enkystement dans la simple évolution de la culture sur un milieu donné. Il est en outre vraisemblable que c'est en fin de développement, lorsqu'une nouvelle activité microbienne fait suite à la sienne, qu'un microorganisme subit le plus intensément les facteurs extérieurs. C'est aussi à ce moment que l'*Azotobacter* doit produire les formes de résistance qui permettent sa survie. Ces considérations conduisent logiquement à examiner l'influence de divers facteurs sur l'enkystement de cellules provenant de cultures ayant atteint un stade de développement suffisamment avancé.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1° MICROORGANISME ET CONDITIONS DE CULTURE.

La souche d'*Azotobacter chroococcum* utilisée a été isolée d'un sol de Côte d'Ivoire. Elle produit un mucus abondant et consistant à surface granuleuse et dans lequel la pigmentation commence à apparaître au deuxième jour sur milieu minéral M additionné de 5 p. 1 000 de glucose, 20 p. 1 000 de gélose et 10 p. 1 000 de calcaire. Le milieu M renferme, par litre, 0,05 ml de solution d'oligo-éléments de Augier [4] et les sels suivants (en fractions de molécule-gramme): KH_2PO_4 (1/600), MgSO_4 (1/2 000), NaCl (1/86), $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (1/160 000), MnSO_4 (1/70 000). Le milieu M et le calcaire, d'une part, la gélose, d'autre part, sont stérilisés 20 mn à 120°. Le glucose est stérilisé par filtration. La composition minérale de ce milieu est voisine de celle qu'utilisait Winogradsky [7], à l'exception des oligo-éléments et de la concentration en chlorure. Cette dernière, plus élevée que dans les milieux usuels, a pour effet l'activation de la croissance et l'apparition, plus rapide de la pigmentation.

La souche est repiquée tous les 2 à 3 jours. Un peu de mucus est prélevé sur un tube âgé de 2 à 4 jours pour l'ensemencement de milieux liquides dont la composition et le mode de préparation seront chaque fois indiqués. La stérilisa-

tion de ces milieux est conduite comme ci-dessus. Ils sont répartis en fiole d'Er-lenmeyer de 250 ml à raison de 75 ml par fiole. Les cultures sont agitées pendant 4 jours à 30° dans un bain-marie à agitation alternative.

2° INDUCTION DE L'ENKYSTEMENT.

Les cellules sont récoltées et lavées stérilement par centrifugation en tubes Corex bouchés à vis dans un centrifugeur SS₁ Sorvall. Le culot bactérien obtenu par une très brève centrifugation de la culture est aisément séparé du dépôt minéral, lors de sa mise en suspension dans la première solution de lavage (L₁). Celle-ci a un pH de 7,8 et renferme du phosphate de sodium à la concentration 0,02 M. La suspension est centrifugée et le culot est repris par une deuxième solution (L₂), identique à la précédente, sauf en ce qui concerne la concentration qui est de 0,05 M. On centrifuge à nouveau.

Le passage successif des cellules dans les solutions de concentration saline croissante, L₁ et L₂, provoque le tassement du dernier culot bactérien. A partir de 25 ml de culture on obtient un culot de très faible volume qui est repris par 4 ml de solution L₁. La suspension est distribuée stérilement dans des tubes à hémolyse renfermant 2 ml de milieu d'enkystement, à raison de 0,1 ml par tube. Après une nuit à 30° les cellules sont centrifugées, puis examinées à l'état frais entre lame et lamelle, en contraste de phase.

Les milieux d'enkystement sont des solutions tampons dont le pH sont échelonnés de 0,5 en 0,5 unités. De pH 4,5 à pH 7,0, ce sont des tampons phosphate citrate (C), de concentration 0,1 M pour chacun des deux composants. Ils sont obtenus par mélange d'acide citrique, de phosphate monosodique et de phosphate disodique. De pH 7,0 à pH 9,5 ce sont des tampons phosphate-borate (B). Les composants sont également à la concentration 0,1 M. Ils sont obtenus par mélange d'acide borique, de phosphate monosodique et de phosphate disodique. D'autres gammes de solutions tampons renferment en outre 2 p. 100 de n-butanol (CB et BB), ou du chlorure de sodium à la concentration M (CCl et BCl) ou de la peptone Difco à la concentration 10 p. 100 (CP et BP). L'addition de chlorure de sodium ou de peptone ayant une grande influence sur le pH des solutions, les rapports entre les sels ont été modifiés de façon à conserver les mêmes valeurs pH sans que soit changée la molarité. Ceci a nécessité l'addition de soude pour les deux derniers tampons de la gamme BP. Dans les solutions tampons peptonées, il se produit une floculation d'autant plus importante que le pH est plus éloigné de la valeur 7; on les clarifie par centrifugation. Toutes les solutions tampons ont été stérilisées par filtration.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Un séjour des cellules pendant une nuit dans les solutions de faible concentration saline (tampons C et B, fig. 1), entraîne leur enkystement dans une proportion qui croît de part et d'autre de la neutralité pour atteindre 80 à 100 p. 100 aux valeurs pH extrêmes. Les pH des cultures étant compris entre les valeurs 7,1 et 7,6 suivant la quantité de calcaire utilisé, c'est donc un abaissement ou une élévation du pH du milieu dans lequel baignent les cellules qui provoque leur enkystement.

La morphologie des kystes est fortement influencée par le pH auquel ils ont été obtenus. Les observations microscopiques ont montré d'une manière très générale les relations suivantes: A pH 4,5 le corps central est très contracté et à contours irréguliers. Les granules provenant des cellules végé-

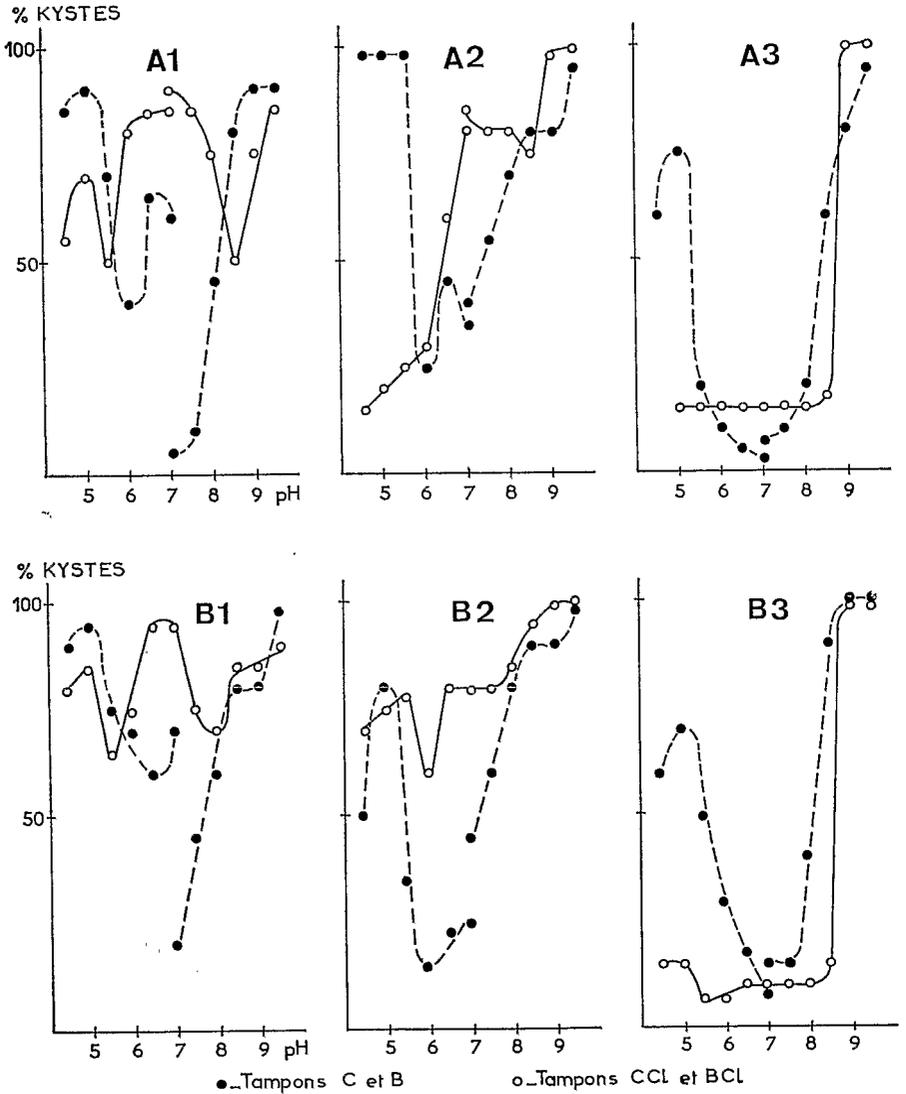


FIG. 1. — Influence de la quantité de calcaire dans le milieu de culture, sur l'aptitude à l'enkystement des cellules.

Milieux : glucose 10 p. 1 000 ; calcaire 2 p. 1 000 : A1 et B1 ; calcaire 4 p. 1 000 : A2 et B2 ; calcaire 10 p. 1 000 : A3 et B3 ; milieu minéral M : A1, A2 et A3 ; milieu M modifié renfermant seulement 1/600 molécule-gramme de NaCl/l : B1, B2 et B3.

ratives ne sont pas toujours parfaitement résorbés. A pH 5,0 le corps central est légèrement moins contracté, mais les granules ont complètement disparu. De pH 5,0 à pH 7,0 le corps central est progressivement plus arrondi, son volume croît et il a un aspect moins dense. Parfois, quelques granules incom-

plètement résorbés sont présents. Dans ce cas leur nombre a tendance à s'élever avec le pH. De pH 7,0 à pH 8,5 le corps central est toujours arrondi, assez volumineux, plus ou moins dense. La présence de granules est plus générale qu'en milieu acide, leur nombre croît de pH 7,0 à pH 8,5. Aux pH 9,0 et 9,5 les granules sont toujours présents. Leur dimension parfois très grande confère aux cellules un aspect intermédiaire entre le kyste et la cellule végétative. La morphologie des kystes en fonction du pH est analogue en milieu salin concentré (tampons CCl et BCl). On observe cependant une condensation du corps central moins importante en milieu acide et plus accusée en milieu basique, surtout aux pH 9,0 et 9,5 où le volume du corps central est nettement réduit et où les granules, toujours présents sont de très petite taille.

L'effet du pH sur l'enkystement des cellules est modifié par la présence d'une concentration élevée en chlorure de sodium (tampons CCl et BCl, fig. 1). Aux pH 9,0 et 9,5 la production de kystes demeure élevée; elle est même très généralement supérieure à ce qui a été observé avec les tampons B. En revanche, elle est très faible ou presque nulle en milieu acide. Mais c'est dans la zone pH voisine de la neutralité que le comportement des cellules est le plus intéressant. Il est en effet fonction des conditions initiales de culture: les cellules récoltées sur milieu renfermant seulement 2 p. 1 000 de calcaire s'enkystent dans une proportion au moins égale à 75 p. 100, tandis que les cellules provenant de milieux renfermant 10 p. 100 de calcaire ne s'enkystent que dans une très faible proportion. Pour une quantité intermédiaire de calcaire (4 p. 1 000) la proportion de kystes est au maximum de 60 p. 100.

La variabilité du taux d'enkystement met en évidence une propriété des cellules végétatives d'*Azotobacter chroococcum*, acquise au cours de la culture, qui est leur aptitude plus ou moins grande à l'enkystement. Le traitement ultérieur a seulement pour effet d'exprimer cette propriété. Le rôle de la teneur en calcaire dans le milieu de culture réside vraisemblablement dans son effet sur le pH et par suite, indirectement, sur la solubilisation d'un ou plusieurs éléments, donc sur la nutrition des cellules. On peut présumer une action du pH sur le phosphate de calcium dont la solubilité est la plus grande dans le milieu le moins basique. La présence de phosphate de calcium est en effet très probable; elle résulterait d'une réaction entre le phosphate monopotassique du milieu M et le calcaire.

Cette hypothèse qui implique l'influence favorable d'une bonne nutrition phosphorée sur l'enkystement des cellules est testée dans l'expérience suivante dont les résultats sont rapportés dans la figure 2. Avant d'examiner ces résultats on doit noter qu'une quantité de calcaire encore plus faible (1 p. 1 000) n'améliore plus l'aptitude à l'enkystement, bien que le pH soit encore moins élevé (pH 6,8) [résultats non rapportés]. On remarque, par ailleurs, que la différence de concentration en chlorure de sodium entre, d'une part, les milieux A et, d'autre part, les milieux B ne se traduit pas notablement dans le comportement des cellules.

L'influence favorable d'une diminution de la quantité de calcaire dans le milieu de culture, sur l'aptitude à l'enkystement des cellules, est confirmée

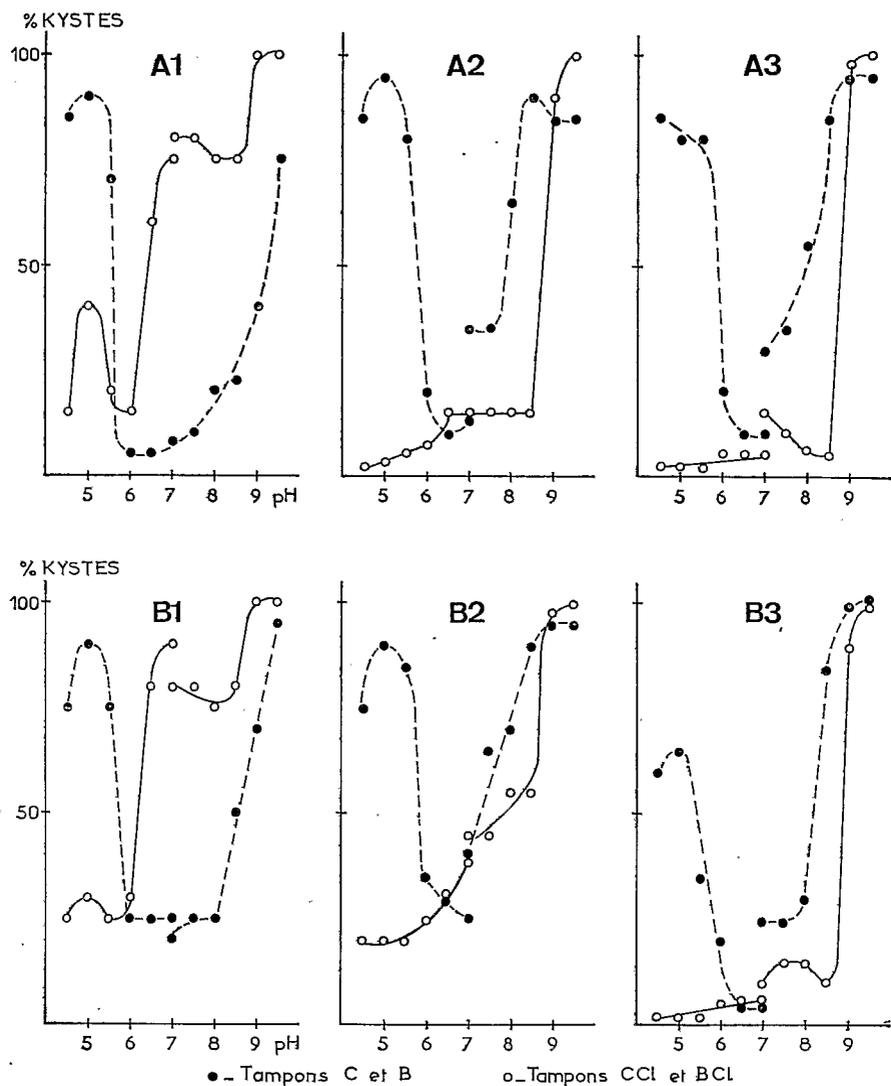


FIG. 2. — Influence des quantités de calcaire et de phosphate dans le milieu de culture, sur l'aptitude à Venkystement des cellules.

Milieux : glucose 10 p. 1 000 ; calcaire 2 p. 1 000 : A1 et B1 ; calcaire 4 p. 1 000 : A2 et B2 ; calcaire 10 p. 1 000 : A3 et B3 ; milieu minéral M modifié renfermant 1/300 molécule-gramme de phosphate/l : A1, A2 et A3 ; milieu minéral M modifié renfermant 1/200 molécule-gramme de phosphate/l : B1, B2 et B3.

Les quantités de phosphate au-dessus de 1/600 molécule-gramme/l ont été ajoutées après stérilisation, sous forme d'une solution stérilisée à froid et renfermant 1/3 de KH_2PO_4 et 2/3 de Na_2HPO_4 .

par les résultats rapportés figure 2. On retrouve en particulier une importante production de kystes au voisinage de la neutralité, dans les solutions tampons renfermant du chlorure de sodium à la concentration M, lorsque les cellules proviennent de milieux renfermant 2 p. 1 000 de calcaire et une production très réduite lorsqu'elles proviennent de milieux à 10 p. 1 000 de calcaire. On observe en outre, dans le premier cas, un enkystement très important en milieu acide, dans les solutions salines concentrées, et un réhaussement de la courbe correspondant aux traitements par les tampons C à proximité de la neutralité. L'aptitude à l'enkystement est donc encore plus marquée ici que dans les cultures de la première expérience. Or, les milieux de culture diffèrent des précédents par une teneur en phosphate plus élevée. L'hypothèse de l'influence favorable d'une bonne nutrition phosphorée sur l'enkystement est ainsi corroborée, de même que le rôle insolubilisant du calcaire.

La comparaison des courbes correspondant aux traitements par les tampons CCl et BCl, des cultures A₂ (fig. 1) et des cultures A₂ et B₂ (fig. 2), fait nettement apparaître une diminution progressive de l'effet défavorable du calcaire lorsque la teneur en phosphate augmente. Il devrait donc être possible, *a priori*, de compenser l'influence du calcaire par un apport encore plus important de phosphate. Cependant, une quantité de phosphate de 1/150 molécule gramme (1/3 de KH_2PO_4 et 2/3 de Na_2HPO_4) par litre de milieu a pour effet de supprimer l'aptitude des cellules à s'enkyster (résultats non rapportés). Il est peu probable que l'on soit ici en présence d'un excès de phosphate. Plus vraisemblablement, l'alcalinisation du milieu (pH voisin de 8,0), par suite de la libération des cations alcalins dans la réaction phosphate-calcaire, est-elle responsable de cette situation. On est donc conduit à rechercher l'emploi d'autres formes de phosphore. C'est ce qui a été réalisé dans les expériences rapportées figures 3 et 4.

La présence, dans le milieu de culture, d'une grande quantité de glycérophosphate de calcium (milieu A₁, fig. 3) favorise l'enkystement ultérieur des cellules, ce qui confirme l'influence de la nutrition phosphorée sur l'aptitude des cellules à s'enkyster. La comparaison des courbes correspondant aux milieux B₂ de la figure 2 et A₁ de la figure 3 montre que l'effet du glycérophosphate est moins marqué que celui d'une quantité inférieure de phosphate. Cette comparaison est en réalité très approximative du fait que le glycérophosphate utilisé renfermait 1/3 d'insoluble.

Les cellules cultivées sur milieu renfermant du phosphate tricalcique (milieu B₁, fig. 3), s'enkytent difficilement bien que la quantité de phosphate utilisée soit grande. La très faible solubilité de ce sel détermine une carence en phosphore qui se traduit sur la production de kystes. L'aptitude à l'enkystement n'est pas sensiblement modifiée par la présence d'une quantité complémentaire de 1/600 molécule gramme de phosphate de potassium par litre dans les milieux au glycérophosphate et au phosphate de calcium (milieux A₂ et B₂, fig. 3.).

Des différentes formes de phosphore employées, ce sont donc les phosphates alcalins qui se révèlent les mieux appropriés à la nutrition des cellules dans le milieu utilisé. Cependant, l'effet dépressif qui a été attribué à l'alcalinisation consécutive à l'apport de quantités plus importantes de phos-

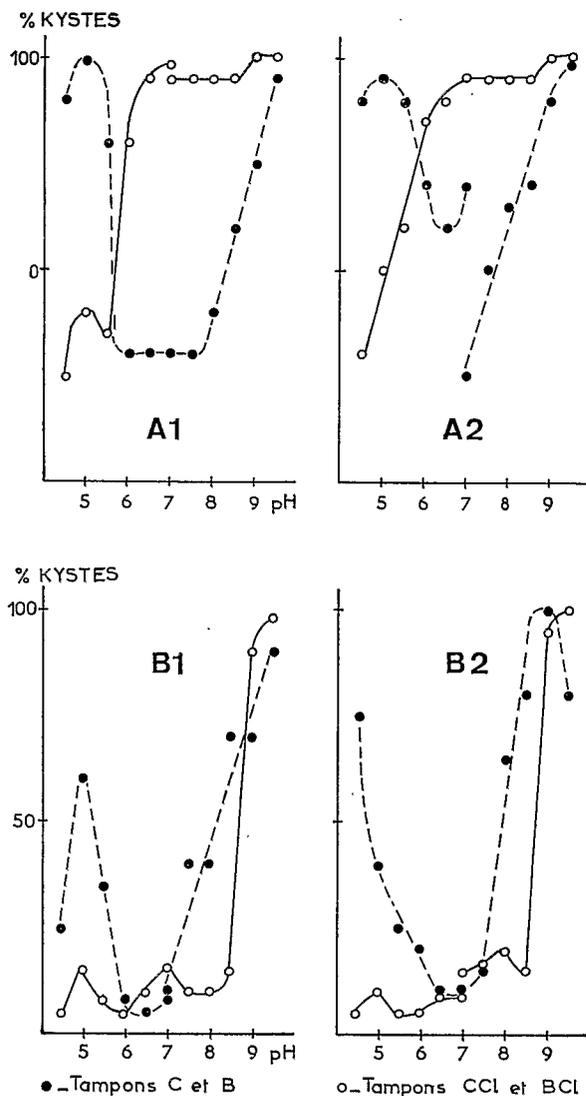


FIG. 3. — Influence de la forme du phosphate dans le milieu de culture, sur l'aptitude à l'enkystement des cellules.

Milieux: glucose 10 p. 1 000; calcaire 4 p. 1 000; glycérophosphate de calcium, 1/100 molécule-gramme/l; A₁ et A₂; phosphate tricalcique, 1/50 molécule-gramme/l; B₁ et B₂; milieu minéral M: A₂ et B₂; milieu M privé de KH_2PO_4 et additionné de 1/600 molécule-gramme/l. de KCl: A₁ et B₁.

phate n'a peut-être pas permis d'atteindre la concentration optimale. Or, le phosphate se retrouve en définitive, très vraisemblablement, sous forme calcique dans le milieu. Il suffirait donc pour atteindre la quantité optimale, sans modification du pH, de remplacer les phosphates alcalins par l'acide

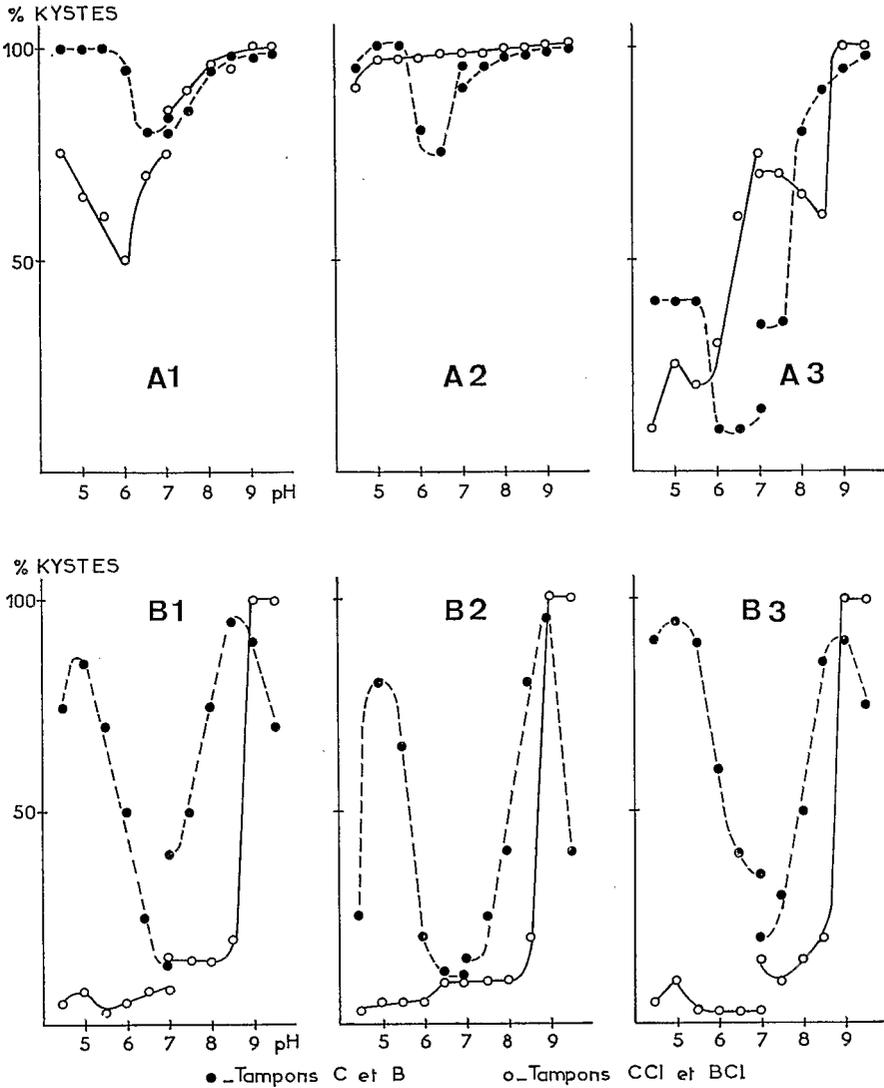


FIG. 4. — Influence de l'ordre d'addition de l'anion phosphorique et des éléments minéraux dans le milieu de culture, sur l'aptitude à l'enkystement des cellules. Milieux : glucose 10 p. 1000 ; calcaire 10 p. 1000 ; milieu minéral M privé de KH_2PO_4 et additionné de 1/600 molécule-gramme/l de KCl ; H_3PO_4 1/352 molécule-gramme/l : A1 et B1 ; H_3PO_4 1/176 molécule-gramme/l : A2 et B2 ; H_3PO_4 1/88 molécule-gramme/l : A3 et B3.

Ordre d'addition : A1, A2 et A3 : Le calcaire, l'acide phosphorique et le milieu M sont ajoutés successivement, puis on stérilise. B1, B2 et B3 : Le calcaire et le milieu M sont ajoutés successivement. On stérilise puis on ajoute H_3PO_4 qui a été stérilisé séparément.

phosphorique. Ce dernier réagira avec le calcaire sans apporter de cation dans le milieu.

Dans l'expérience rapportée figure 4, les milieux A₁, A₂ et A₃ renferment des quantités croissantes de phosphore ajouté sous forme d'acide phosphorique. Il apparaît immédiatement, dans le cas des milieux A₁ et A₂, que la production de kystes est de loin supérieure à ce qui avait été obtenu précédemment dans les meilleures conditions de culture. Les résultats sont particulièrement intéressants en ce qui concerne le milieu A₂ dont les cellules s'enkystent dans la proportion de 90 à 100 p. 100 dans 22 solutions tampons sur 24, et dans une proportion qui n'est pas inférieure à 75 p. 100 dans les deux autres. La quantité optimale de phosphate doit donc probablement se situer à proximité de celle qui est présente dans le milieu A₂, c'est-à-dire : 1/176 molécule g/l. Lorsque cette quantité est doublée (milieu A₃ fig. 4), on observe un effet dépressif très marqué.

En comparant les résultats correspondant, d'une part au milieu A₁ de la figure 4 et d'autre part au milieu B₃ de la figure 2, on constate que pour une même quantité de calcaire (10 p. 1000), l'apport d'acide phosphorique a un effet nettement plus favorable que l'apport de phosphates alcalins même lorsque ces derniers sont ajoutés en plus grande quantité (1/200 molécule gramme contre 1/352), quantité qui est d'ailleurs très voisine de l'optimum estimé précédemment. Ceci pourrait résulter de l'effet dépressif de l'alcalinisation consécutive à la réaction phosphate-calcaire.

La production de kystes par les cellules provenant des milieux B₁ et B₂ de la figure 4 est semblable à celle qui a été observée précédemment à partir des milieux carencés en phosphore. Or, la quantité de phosphate est la même que dans les milieux homologues A₁ et A₂ qui permettent l'enkystement le plus important. La seule différence avec ces derniers réside dans l'ordre d'addition de l'acide phosphorique et des autres éléments minéraux. Un facteur autre que la carence en phosphore est donc intervenu ici pour réduire l'aptitude des cellules à s'enkyster. L'ordre d'addition des éléments a été modifié pour rechercher ce facteur. Les résultats en sont rapportés figures 5 et 6.

La dépression de l'aptitude à l'enkystement dans le milieu A de la figure 5 est semblable ou même un peu plus accusée que dans le milieu B₂ de la figure 4. Par contre, dans le milieu B de la figure 5, elle est fortement atténuée. En fonction de l'ordre d'addition des éléments, les milieux A et B se différencient de la manière suivante : dans le premier, certains éléments minéraux apportés par le milieu M, solubles dans l'excès d'acide phosphorique, ont précipité sous forme de phosphates au cours de la neutralisation par le calcaire ; dans le deuxième, en revanche, ces éléments, qui ont été ajoutés après la neutralisation de l'acide, ne sont pas insolubilisés sous forme de phosphates.

En ce qui concerne le milieu B₂ de la figure 4, on peut de même concevoir un passage d'éléments sous forme de phosphate au cours de l'abaissement momentané de pH qui suit l'addition d'acide phosphorique, puis leur insolubilisation. La différence d'aptitude à l'enkystement entre les cellules provenant du milieu A₂ de la figure 4 et celles qui proviennent du milieu B de la figure 5 demeure assez inexplicable. Peut-être traduit-elle un effet de

la stérilisation sur le phosphate de calcium dans le milieu A2 ou une libération d'hydrates métalliques lorsque le milieu M est stérilisé en présence de calcaire, donc en milieu basique.

Cette interprétation des résultats implique un effet dépressif sur l'enkystement des cellules, de carences déterminées par l'insolubilisation d'un ou plusieurs éléments. Il convient donc de rechercher ce ou ces éléments, et pour cela de faire intervenir séparément le processus d'insolubilisation sur

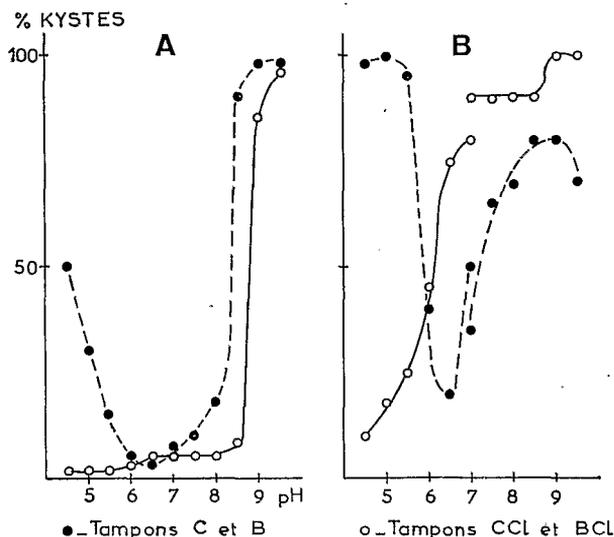


FIG. 5. — Influence de l'ordre d'addition de l'anion phosphorique et des éléments minéraux dans le milieu de culture, sur l'aptitude à l'enkystement des cellules.

Milieux : glucose 10 p. 1 000 ; calcaire 10 p. 1 000 ; milieu minéral M privé de KH_2PO_4 et additionné de 1/600 molécule-gramme/l de KCl ; H_3PO_4 1/176 molécule-gramme/l.

Ordre d'addition : A : On stérilise le calcaire puis on ajoute le milieu M et H_3PO_4 qui ont été stérilisés en mélange. B : On stérilise le calcaire puis on ajoute successivement H_3PO_4 et le milieu M qui ont été stérilisés séparément.

chacun des éléments suspectés. C'est ce qui a été réalisé dans l'expérience rapportée dans la figure 6.

Les cellules cultivées dans le milieu A de la figure 6, où le fer se retrouve sous forme de phosphate, ont une très faible aptitude à l'enkystement. On n'observe pas ce comportement lorsque le magnésium est sous forme de phosphate, vraisemblablement parce qu'il demeure assimilable par les cellules (milieu B).

C'est donc une carence en fer qui est responsable de la dépression constatée avec les milieux où l'acide phosphorique n'est pas ajouté au calcaire avant l'addition des autres éléments minéraux. La différence d'aptitude à l'enkystement entre les cellules provenant du milieu C de la

figure 6 et celles qui proviennent du milieu A₂ de la figure 4 pourrait résulter d'une carence en manganèse dans le premier milieu où la teneur est mille fois plus faible.

Les résultats rapportés par Layne et Johnson [2] concernant l'influence favorable d'une carence en fer, sur l'enkystement, sont à première vue en contradiction avec ce qui a été observé ici. En fait, il y a entre les deux situations une différence importante: dans un cas le fer est absent, dans

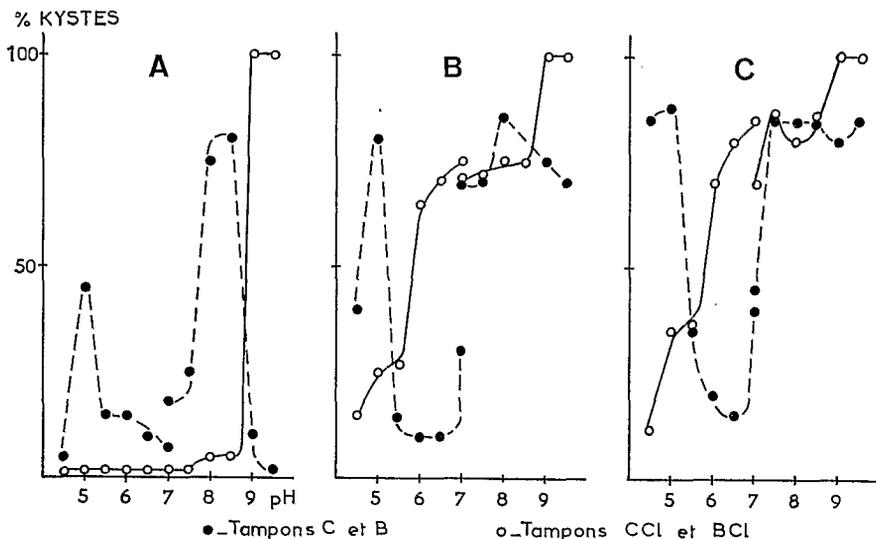


FIG. 6. — Influence de l'ordre d'addition de l'anion phosphorique et des éléments minéraux dans le milieu de culture, sur l'aptitude à l'enkystement des cellules.

Milieux : glucose 10 p. 1 000 ; calcaire 10 p. 1 000 ; concentration en fractions de molécule-gramme/l des éléments suivants : H_3PO_4 (1/176), KCl (1/600), $MgCl_2$ (1/2 000), Na_2SO_4 (1/2 000), $Fe_2(SO_4)_3$ (1/80 000), $MnSO_4$ (1/7.10⁷), solution d'oligo-éléments de Augier, 0,05 ml/l.

Ordre d'addition : A : Au calcaire on ajoute le mélange de H_3PO_4 et de $Fe_2(SO_4)_3$, on stérilise puis on ajoute les autres éléments minéraux qui ont été stérilisés en mélange. B : Au calcaire on ajoute le mélange de H_3PO_4 et de $MgCl_2$, on stérilise puis on ajoute les autres éléments minéraux qui ont été stérilisés en mélange. C : Au calcaire on ajoute H_3PO_4 , on stérilise puis on ajoute les autres éléments minéraux qui ont été stérilisés en mélange.

l'autre cas il est présent sous forme très peu soluble. Si l'on accentue les carences on obtient cependant des résultats qui sont en accord avec les observations de ces auteurs. Ainsi les cellules provenant d'un milieu renfermant dix fois moins de magnésium, de fer et de manganèse que le milieu M, s'enkystent dans une proportion de 90 à 100 p. 100 dans les différentes solutions tampons C et B (résultats non rapportés). Cependant, la morphologie de ces kystes reflète profondément la carence des cellules dont ils sont issus : l'exine est généralement très fine et l'on rencontre

fréquemment le corps central privé de l'enveloppe d'exine et l'enveloppe privée de corps central. Ceci traduit la fragilité des enveloppes, rompues vraisemblablement au cours du montage des préparations. Ces observations confirment également celles qui ont été rapportées par Layne et Johnson.

Tous les résultats qui viennent d'être exposés concernent uniquement les traitements par les tampons C, B, CCl et BCl. L'efficacité comparée des tampons à la peptone et au butanol ressort de l'examen de la figure 7 où sont rapportés les résultats pour l'ensemble des traitements avec une culture

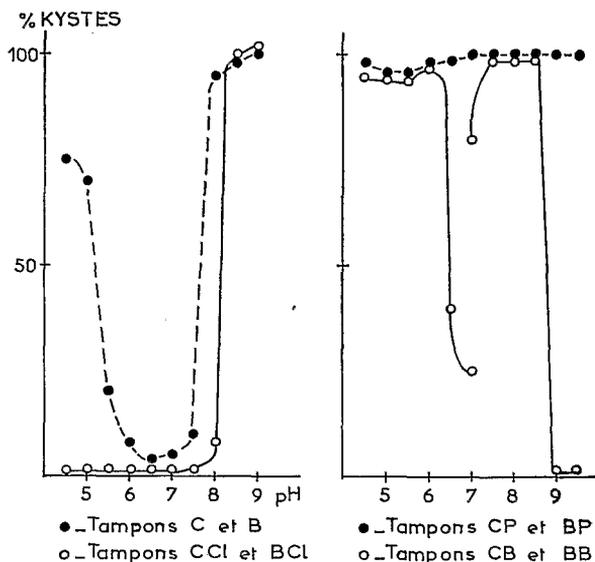


FIG. 7. — Influence du butanol et de la peptone dans le milieu de traitement, sur l'enkystement des cellules.

Milieu : glucose 10 p. 1 000 ; calcaire 10 p. 1 000 ; milieu minéral M privé de KH_2PO_4 et additionné de 1/600 molécule-gramme de KCl ; H_3PO_4 1/352 molécule-gramme/l.

On stérilise le calcaire puis on ajoute H_3PO_4 et le milieu M qui ont été stérilisés en mélange.

carencée en fer. Alors que dans cette culture l'aptitude à l'enkystement est très réduite comme l'indiquent les productions de kystes avec les solutions tampons habituelles, en présence de peptone à la concentration 10 p. 100 l'enkystement affecte 95 à 100 p. 100 des cellules sur toute l'étendue de la zone pH. La peptone est donc un facteur d'enkystement beaucoup plus énergique que le changement de pH ou l'élévation de la concentration saline. On ne peut, en fait, dissocier l'influence de ces divers facteurs dont les effets sont additifs, comme le montre l'examen microscopique des kystes. Ceux-ci présentent, en effet, dans leur morphologie, l'empreinte très générale du pH qui a été décrite initialement. Ainsi, les kystes obtenus en présence de peptone sont très bien condensés, au moins de pH 4,5 à pH 6,0. Au-delà,

le corps central est arrondi et de moins en moins dense. Vers pH 8,0, son contour devient assez mal délimité. Dans tous ces kystes les granules sont complètement résorbés. Le butanol à la concentration 2 p. 100 se révèle un bon agent d'enkystement, tout au moins dans la zone pH la plus acide. A partir de pH 7,5, on observe des granules non résorbés qui sont de plus en plus nombreux et volumineux, si bien qu'à pH 9,0 et 9,5 l'aspect des kystes est encore très proche de celui des cellules végétatives.

CONCLUSION

La recherche des facteurs susceptibles de déclencher le processus d'enkystement dans les cellules d'*Azotobacter chroococcum* a mis en évidence le rôle d'un changement de pH associé ou non à une forte concentration saline ou à la présence de peptone ou de n-butanol. Parmi ces traitements, certains conduisent à un enkystement complet.

Il est très peu probable que les conditions de ces traitements soient réunies avec la même intensité dans le milieu naturel. Néanmoins, ces résultats montrent que l'enkystement peut être provoqué par une modification du milieu autre que celles qui résultent de la simple évolution des cultures. De plus, il a été montré que l'aptitude des cellules à s'enkyster est très variable. Elle peut être très grande lorsque les conditions de nutrition sont satisfaisantes. Dans ce cas, les traitements les plus modérés ont provoqué l'enkystement presque complet des cellules. Il est en outre vraisemblable que de nombreux autres facteurs qui n'ont pas été étudiés peuvent induire la formation des kystes.

Il a été montré qu'une carence en phosphore ou en fer dans le milieu de culture avait un effet dépressif sur l'aptitude des cellules à s'enkyster. Il en résulte que le traitement des cellules pourrait constituer un test pour la détection de ces carences.

RÉSUMÉ

Des cellules d'*Azotobacter chroococcum* cultivées en milieu liquide au glucose, sont transférées dans des solutions tampons dont les pH sont échelonnés entre les valeurs 4,5 et 9,5. Après une nuit à 30° on dénombre les kystes.

Lorsque les solutions renferment uniquement les éléments du tampon, leur concentration saline est de 0,2 M. Les cellules s'y enkystent dans une proportion qui croît de part et d'autre de la neutralité pour atteindre 80 à 100 p. 100 aux valeurs pH extrêmes.

La présence complémentaire de NaCl à la concentration M détermine une élévation du taux d'enkystement en zone de pH neutre. Cette élévation ne se produit pas lorsque les cellules sont carencées en phosphore ou en fer.

L'addition de peptone à la concentration 10 p. 100 dans les solutions tampons entraîne l'enkystement de la presque totalité des cellules dans toute la zone pH explorée.

Le n-butanol à la concentration 2 p. 100 favorise l'enkystement en milieux acide et peu basique.

Ce comportement des cellules montre que l'enkystement peut être provoqué par des modifications du milieu autres que celles qui résultent de la simple évolution des cultures. Il affecte une proportion plus ou moins grande des cellules suivant le traitement apporté. D'autre part, l'aptitude des cellules à s'enkyster, exprimée par le traitement, est fonction des conditions de la culture initiale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUGIER (J.). A propos de la numération des *Azotobacter* en milieu liquide. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 94, 759.
 - [2] LAYNE (J. S.) and JOHNSON (E. J.). Natural factors involved in the induction of cyst formation in *Azotobacter*. *J. Bact.*, 1964, 87, 684.
 - [3] LIN (L. P.) and SADOFF (H. L.). Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of β -hydroxybutyrate. *J. Bact.*, 1968, 95, 2336.
 - [4] SOCOLOFSKY (M. D.) and WYSS (O.). Cysts of *Azotobacter*. *J. Bact.*, 1961, 84, 946.
 - [5] STEVENSON (L. H.) and SOCOLOFSKY (M. D.). Cyst formation and poly- β -hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *J. Bact.*, 1966, 91, 304.
 - [6] TCHAN (Y. T.), BIRCH-ANDERSEN (A.) and JENSEN (H. L.). The ultrastructure of vegetative cells and cysts of *Azotobacter chroococcum*. *Arch. Mikrobiol.*, 1962, 43, 50.
 - [7] WINOGRADSKY (S.). Etudes sur la microbiologie du sol. — V. Analyse microbiologique du sol, principes d'une nouvelle méthode. *Ann. Inst. Pasteur*, 1932, 48, 89.
 - [8] WINOGRADSKY (S.). Etudes sur la microbiologie du sol et des eaux. — IX. Sur la morphologie et l'écologie des *Azotobacter*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, 60, 351.
-

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Mai 1970, tome 118.)

INDUCTION DE L'ENKISTEMENT
CHEZ AZOTOBACTER CHROOCOCCUM

PAR

M. MOURARET

(avec la collaboration technique de **M^{me} L. SUAVIN**)

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

23 OCT. 1972

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

Collection de Référence

n° 5722 Bio. Sols