

EVALUATION DE LA DENSITE DES MICROORGANISMES
VIVANTS DANS LES CULTURES D'AZOTOBACTER *

Y. DOMMERGUES et M. DUSAUSOY

Pour évaluer la densité des microorganismes vivants dans une culture d'Azotobacter, la méthode de choix semble être, a priori, la méthode de numération sur milieu de culture. En fait, nous l'avons observé bien souvent, cette méthode donnait - tout au moins avec certaines souches - des résultats aberrants. C'est pourquoi il nous est apparu nécessaire de vérifier la validité de cette technique en comparant des milieux solides et liquides avec ou sans adjonction d'extrait de levure, après avoir effectué les dilutions nécessaires à l'ensemencement avec des solutions de dilution de différentes compositions.

1. Méthodes et souches utilisées

a) Préparation des dilutions de la culture à analyser

Les dilutions de culture d'Azotobacter (CA) ont été faites dans différentes solutions dites solutions de dilution :

- eau distillée stérile
- solution ayant la même composition que le milieu de culture PM (cf infra)
- filtrat de culture d'Azotobacter de 3 jours stérilisé à l'autoclave ou par filtration sur membrane Millipore.
- solution stérile à 2 pour mille d'extrait de levure DIFCO

b) Milieux de culture solide

Le milieu de culture solide standard désigné ici par les initiales PMS est le milieu classique de AUGIER (1956) gélosé à 10 pour mille à la gélose Difco.

Parallèlement à ce milieu standard on a utilisé le même milieu enrichi en extrait de levure Difco à la dose de 2 pour mille (PMSEL).

Des fioles contenant 40 ml de milieu PMS ou PMSEL maintenues à $43^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, ont été ensemencées dans la masse avec 5 ml de dilution de la culture CA au 1/200ème, 1/2000ème, 1/20 000ème et 1/200 000ème ; le contenu de chacune des fioles a été réparti dans 5 boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre, ce qui correspond à 9 ml de milieu par boîte de Pétri. Les lectures ont été faites après une incubation de 6 jours à 30°C.

c) Milieux de culture liquide

Le milieu de culture liquide standard est le milieu AUGIER (1956) désigné par les initiales PM. Parallèlement à ce milieu, on a utilisé un milieu PM enrichi en extrait de levure Difco à la dose de 2 pour mille que l'on a appelé PMEL :

* Paru dans : "Biologie du Sol", 5, 23-27 (1966).

Formule du milieu P/MEL :

1) Mannitol	10 g
2) Carbonate de Ca	0,5 g
3) Extrait de levure	2 g
4) Difco agar	10 g
5) Solution saline standard	50 ml
6) Extrait de terre	10 ml
7) Solution d'oligo-éléments	1 ml
8) Eau distillée q s q.	1000 ml

Ces milieux ont été répartis en tubes de 12 x 120 mm à raison de 3 ml par tube, stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 110°C et ensemencés avec 0,5 ml de chacune des dilutions de la culture CA. Les tubes positifs sont ceux qui, au bout de 14 jours d'incubation à 30°C présentent un trouble ou un voile. Le nombre de germes vivants est déterminé à l'aide de la table de Mc Crady.

d) Comptages directs au microscope

Des comptages directs de contrôle ont été faits au microscope en contraste de phase sur la culture (CA) non diluée. Suivant la technique de SEIFERT (communication personnelle), nous considérons qu'il s'agit là de la méthode de référence par excellence car, dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placés, toutes ou presque toutes les cellules bactériennes observées au microscope sont vivantes. Les densités calculées à partir de ces comptages directs sont appelées ici densités réelles par opposition aux densités observées, résultant des comptages indirects sur milieux de culture.

e) Souches utilisées

Trois souches ont été comparées :

Deux souches d'Azotobacter chroococcum :

- souche 21 isolée d'un sol d'argile noire tropicale (vertisol) à Pout, Sénégal

- souche 55 isolée d'un sol brun calcaire, à Vandoeuvre, France.

et une souche d'Azotobacter vinelandii, souche 23, isolée d'un sol d'argile noire tropicale (vertisol) à Pout, Sénégal.

2. Résultats

Les trois protocoles expérimentaux utilisés ont conduit aux résultats synthétisés dans les tableaux 1, 2 et 3 ; le 3ème protocole ayant, en fait, pour but essentiel de vérifier les résultats obtenus antérieurement. Il est apparu préférable de présenter l'analyse de ces résultats, non pas dans l'ordre chronologique des 3 expériences successives, mais en rassemblant les faits majeurs mis en évidence sous 4 rubriques : comparaison des milieux solides et liquides, influence de l'apport d'extrait de levure dans les solutions de dilution, influence de l'apport d'extrait de levure dans les milieux de culture, comparaison du comportement des différentes souches d'Azotobacter.

L'analyse statistique a porté seulement sur les résultats des méthodes de comptage indirect par culture dans les deux premières expériences (tableaux 1 et 2) et à la fois sur ces résultats et sur les résultats de la méthode de comptage direct au microscope dans le cas de la dernière expérience (tableau 3).

Les résultats figurant aux tableaux sont exprimés en nombre de cellules bactériennes par ml de culture (CA).

a) Comparaison des milieux liquides et solides

La comparaison des milieux solides et liquides fait essentiellement l'objet du tableau 1, qui démontre la nette supériorité du milieu liquide (même non enrichi en extrait de levure : traitement 2), sur le milieu solide, enrichi en extrait de levure (traitement 3). Dans le cas de la souche 23, la numération en milieu liquide PM donne une densité (38 000 000) sensiblement égale à la densité réelle (60 000 000). Par contre, pour la souche 21, la densité déterminée sur milieu liquide (80 000) bien que très supérieure à la densité déterminée sur milieu solide, même enrichi en extrait de levure (3 300), est très inférieure à la densité réelle (72 000 000).

Cette supériorité du milieu de numération liquide sur le milieu solide explique les différences d'évaluation de la densité des Azotobacter dans les sols suivant que les numérations sont faites en milieu liquide ou solide.

b) Influence de l'apport d'extrait de levure dans les solutions de dilution

L'incorporation d'extrait de levure Difco à la dose de 2 pour mille dans la solution servant à la dilution de la culture avant son ensemencement apparaît comme très favorable à la conservation et au développement ultérieur des cellules bactériennes aussi bien sur milieu solide (comparer les traitements 2 et 3, tableau 1) que sur milieu liquide (comparer les traitements 2 et 3, tableaux 2 et 3).

Cette action favorable de l'emploi d'extrait de levure dans la solution de dilution apparaît avec une grande netteté avec les souches 21 et 55, mais n'est pas sensible dans le cas de la souche 23.

c) Influence de l'apport d'extrait de levure dans les milieux solides ou liquides

La comparaison des traitements 1 et 2 met bien en évidence l'influence favorable de l'incorporation d'extrait de levure au milieu de culture, qu'il soit sous forme solide ou sous forme liquide, mais cet apport d'extrait de levure dans le milieu est à lui seul insuffisant pour satisfaire aux exigences des souches 21 et 55. En effet, il apparaît toujours nécessaire, avec de telles souches, d'ajouter aussi de l'extrait de levure à la solution de dilution pour obtenir une densité équivalente à la densité réelle : il ressort clairement de la comparaison des résultats figurant aux deux dernières lignes du tableau 3, que le double apport d'extrait de levure (dans la solution de dilution et dans le milieu lui-même) permet toujours d'obtenir par comptage sur milieu de culture une densité conforme à la densité réelle (déterminée par comptage direct au microscope.)

d) Comparaison du comportement des souches d'Azotobacter

Les trois expériences mettent en évidence une différence de comportement très nette entre les souches non exigeantes sur le plan nutritionnel,

telle que la souche 23 et les souches exigeantes telles que les souches 21 et 55. Le tableau 3 montre clairement l'indifférence de la souche 23, et au contraire, la grande sensibilité des souches 21 et 55.

3. Discussion

Bien que la présente étude porte seulement sur trois souches d'Azotobacter, il est possible d'en déduire que les exigences nutritionnelles des Azotobacter sont vraisemblablement plus complexes qu'on ne le suppose habituellement. Certains auteurs, dont RUBENCHIK (1963), signalent bien la possibilité d'exigences en vitamines chez certaines souches d'Azotobacter, mais les formules de milieu de culture de ce microorganisme publiées jusqu'à présent, ne prévoient pas d'adjonction d'extrait de levure ou de vitamines. Elles recommandent uniquement l'adjonction d'extrait de terre. Les essais dont nous venons de relater les résultats démontrent clairement que l'extrait de terre (qui existe dans le milieu PM) ne suffit pas à satisfaire les besoins en facteurs de croissance de certaines souches d'Azotobacter.

On pourrait objecter que les souches utilisées ici ont perdu, lors de repiquages antérieurs, leur aptitude à synthétiser des vitamines qui leur sont nécessaires. Cette hypothèse est peu vraisemblable car il s'agit de souches isolées relativement récemment (moins de 2 ans) et repiquées tous les 6 mois, donc au maximum 4 fois depuis le premier isolement qui a été simultané pour les 3 souches. Notons, en outre, que de telles exigences se manifestent chez certaines souches d'Azotobacter dès leur isolement du sol : nous avons, en effet, souvent remarqué que les Azotobacter et plus encore les Beijerinckia, notamment ceux du groupe B. fluminensis) apparaissent seulement dans les milieux PM ayant reçu un fort inoculum de sol.

L'adjonction d'extrait de levure à la solution de dilution et au milieu de culture ne présente aucun inconvénient lorsqu'il s'agit d'évaluer la densité des cellules d'Azotobacter dans une culture pure ; mais cette adjonction semble plus difficile dans le cas de numérations sur des échantillons de sol en raison de la baisse considérable du pouvoir électif du milieu. On notera toutefois que l'emploi de nystatine apporté au milieu à la dose de 40 mg par litre de milieu peut améliorer la situation en éliminant une grande partie des microchampignons.

4. Résumé

Pour évaluer la densité des Azotobacter par la méthode de numération sur milieu de culture, l'auteur préconise l'emploi de milieu liquide et l'adjonction d'extrait de levure à la dose de 2 pour mille, non seulement dans les milieux de culture eux-mêmes (milieu PMEL), mais aussi dans la solution nécessaire à l'obtention des dilutions en vue de l'ensemencement des milieux (solution stérile à 2 pour mille d'extrait de levure Difco). L'adjonction de levure est en effet nécessaire à la croissance des souches d'Azotobacter à exigences nutritionnelles complexes. La méthode préconisée donne des résultats conformes à ceux que l'on obtient par la méthode de comptage direct au microscope.

Bibliographie :

- AUGIER (J.), 1956 - Annls. Inst. Pasteur, 31, 759
 RUBENCHIK (L.I.), 1963 - "Azotobacter and its use in agriculture", Israel Program for scientific translations, Jerusalem, p. 273.

Tableau I. - Densité des Azotobacter (2 souches) déterminée sur 3 milieux solides et un milieu liquide avec dilution préalable dans l'eau ou dans l'extrait de levure (1ère expérience).

Densités observées (déduites des numérations sur milieux de culture)	Milieu solide	Dilution préalable dans	Milieu de culture	N° du traitement	Souche 23	Souche 21
		l'eau distillée	sans extrait de levure (PMS)	1	380 000	500
			avec extrait de levure (PMSEL)	2	1 200 000	400
	l'extrait de levure à 2 pour mille	avec extrait de levure (PMSEL)	3	16 700 000	3 300	
	Milieu liquide	l'eau distillée	sans extrait de levure (PM)	4	38 000 000	80 000
<u>Densités réelles</u> (déduites des comptages directs au microscope)					60 000 000	72 000 000

L'analyse statistique qui a porté sur les traitements 1, 2, 3, et 4, met en évidence des différences hautement significatives ($P = 0,01$), entre les traitements (2) et (3) (effet favorable de l'adjonction de levure dans le milieu) et entre les traitements (1), (2), (3) d'une part et (4) d'autre part (supériorité du milieu liquide). Est simplement significative ($P = 0,05$) la différence entre les traitements (2) et (3) pour la souche 21.

Tableau 2. - Densité des Azotobacter (2 souches) déterminée sur 2 milieux liquides après dilution préalable dans l'eau ou dans l'extrait de levure (2ème expérience)

Densités observées déduites des numé- rations sur milieux de culture	Dilution préalable dans	Milieu de cul- ture liquide	N° du traite- ment	Souche 23	Souche 21
	l'eau distillée	Sans extrait de levure (PM)	1	48 000 000	185 000
		Avec extrait de levure (FMEL)	2	29 000 000	1 100 000
	l'extrait de levure à 2 pour mille	Avec extrait de levure (PMEL)	3	35 000 000	126 000 000
<u>Densités réelles</u> (déduites des comptages directs au microscope)				40 000 000	82 000 000

Comme dans le cas de l'expérience précédente, l'analyse statistique ne concerne que les résultats des méthodes de numération sur milieux de culture. Il n'existe aucune différence significative entre les densités observées et réelles pour la souche 23.

En ce qui concerne la souche 21, les traitements (1) et (2) diffèrent significativement ($P = 0,05$) et les traitements (2) et (3) très significativement ($P = 0,01$).

Tableau 3. - Densités des Azotobacter (3 souches) déterminée sur 2 milieux liquides avec dilution préalable dans l'eau ou dans l'extrait de levure (3ème expérience)

Densités observées (déduites des numérations sur milieux de culture).	Dilution préalable dans	Milieu de culture liquide	N° du traitement	Souche 23	Souche 21	Souche 55
	l'eau distillée	sans extrait de levure (PM)	1	18 000 000	103 000	21 300
		avec extrait de levure (PMEL)	2	16 800 000	150 000	20 200
	l'extrait de levure à 2 pour mille	avec extrait de levure (PMEL)	3	34 000 000	39 000 000	165 000 000
<u>Densités réelles</u> (déduites des comptages directs au microscope)				36 000 000	156 000 000	66 000 000

L'analyse statistique a porté ici à la fois sur les résultats de la méthode de comptage indirect par culture (traitements 1, 2, 3) et sur ceux de la méthode de comptage direct au microscope.

Quelque soit la souche considérée (a), la densité observée déduite des numérations sur milieu liquide à l'extrait de levure après dilution dans l'extrait de levure est statistiquement identique à la densité réelle déduite des comptages au microscope, (b) le traitement 3 qui comporte la dilution dans l'extrait de levure diffère des traitements (1) et (2), mais dans le cas de la souche 23, la différence est simplement significative ($P = 0,05$) alors que pour les souches 21 et 55, la différence est hautement significative ($P = 0,01$).

Biodol

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE DE PEDOLOGIE BIOLOGIQUE

Document N° 11

Date 1966

EVALUATION DE LA DENSITE DES MICROORGANISMES
VIVANTS DANS LES CULTURES D'AZOTOBACTER

Y. DOMMERMES et M. DUSAUDY

8 JUIL. 1970

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

Collection de Référence

n° 14171

ADRESSE : B. P. N° 5 VANDŒUVRE-LES-NANCY - 54

DISTRIBUTION LIMITÉE