



HAL
open science

MÉTABOLISME DE L'AZOTE MINÉRAL EN MILIEU MARIN

Edmond Lagarde

► **To cite this version:**

Edmond Lagarde. MÉTABOLISME DE L'AZOTE MINÉRAL EN MILIEU MARIN. Vie et Milieu , 1963, pp.37-54. hal-02932109

HAL Id: hal-02932109

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-02932109v1>

Submitted on 7 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MÉTABOLISME DE L'AZOTE MINÉRAL EN MILIEU MARIN ⁽¹⁾

par Edmond LAGARDE

INTRODUCTION

Les phénomènes biologiques à participation bactérienne totale ou partielle sont, dans le milieu marin, infiniment nombreux. Parmi eux, il y a lieu de placer au premier plan les transformations des composés nitrés, auxquelles les bactéries contribuent pour une très large part.

Parmi les nombreux éléments présents dans la mer, l'azote est, avec le carbone et l'oxygène, un de ceux dont le taux présente quelquefois des variations très importantes, ces corps étant justement trois constituants indispensables au métabolisme microbien.

Divers auteurs cités par HARVEY (1945) évaluent ainsi les teneurs des eaux de mer en composés nitrés :

- azote ammoniacal .. 7-40 mg/m³ dans la Baltique,
plus de 60 mg/m³ au large de la Norvège,
30-50 mg/m³ dans l'Arctique.
- azote nitreux 7-30 mg/m³ dans l'Atlantique Sud,
4-8 mg/m³ dans les fjords norvégiens,
38 mg/m³ dans la Manche.

(1) Remis le 15 octobre 1962.

- azote nitrique 270 mg/m³ dans l'Arctique,
200-300 mg/m³ dans l'Atlantique
Nord,
400-600 mg/m³ dans l'Antarctique.
- azote organique 30-200 mg/m³.

En Méditerranée, DEVEZE (1959) trouve dans les eaux, les teneurs moyennes suivantes :

- azote ammoniacal 14,5 mg/m³.
- azote nitreux 2,6 mg/m³.
- azote nitrique 13,8 mg/m³.

alors que DUURSMA (1960) estime, dans la Mer du Nord, la teneur en N-NH₃ de 28 à 50 mg/m³, et met en évidence, dans l'Atlantique Nord, de 40 à 400 mg d'azote organique par tonne.

Les variations des teneurs des eaux de mer en composés nitrés sont donc très importantes, ainsi que le montrent les graphiques suivants empruntés à COOPER (1933) (fig. 1).

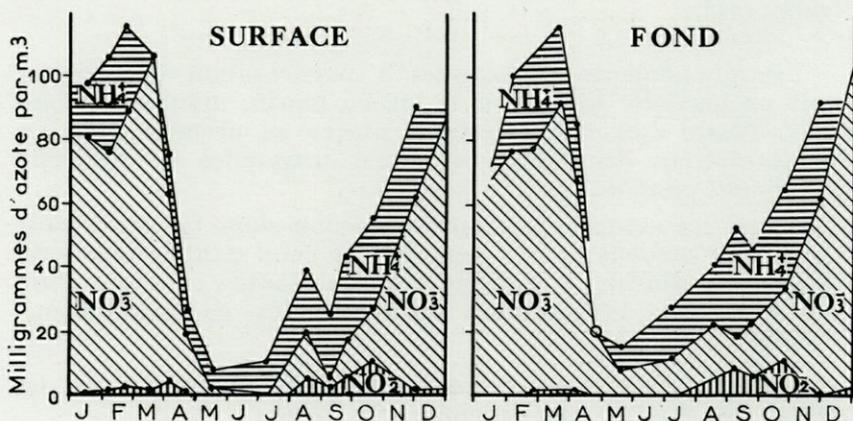


Fig. 1. — Variations durant l'année 1932, des teneurs en N-NO₂, N-NO₃ et N-NH₄ des eaux de la Manche, à 20 milles SW de Plymouth (In HARVEY, Recent Advantages in the Chemistry and biology of sea-water, 1945, Cambridge University Press).

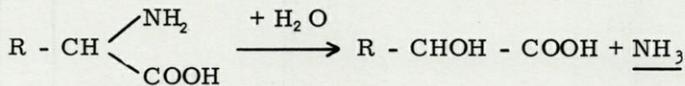
L'azote joue ainsi un rôle capital dans l'accomplissement des processus biologiques au sein du milieu marin, et il limite, certainement de façon très importante, la productivité générale de la mer. Les bactéries sont, comme dans le sol, les agents par lesquels s'opèrent les transformations des composés nitrés, et

AMMONIFICATION

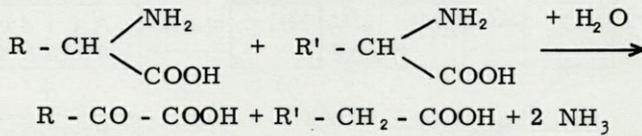
Au cours de l'ammonification, l'azote des résidus organiques animaux et végétaux est libéré sous forme d'ammoniaque. C'est un processus non spécifique, réalisé par un grand nombre de bactéries des eaux et des sédiments.

En fait, ainsi que le note POCHON (1958), l'étude de ce phénomène est complexe, car les substances azotées en cause sont très variées et toujours associées, dans les tissus végétaux tout au moins, à des composés carbonés tels que les celluloses, pectines, etc...

Le processus peut être réalisé, soit en aérobiose :

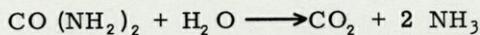


soit en anaérobiose (réaction de STICKLAND) :



WAKSMAN et RENN (1936), OSTROFF et HENRY (1939) ont montré que, sous l'effet des désaminases bactériennes, pratiquement tous les composés nitrés pouvaient être dégradés par les bactéries marines. Une partie de l'ammoniaque formé sert à l'édition des protéines cellulaires, l'autre partie en excès est libérée dans le milieu. Ces auteurs, ainsi que von BRAND et coll. (1937), ont établi que nombre de bactéries marines pouvaient décomposer rapidement « in vitro » les organismes du plancton et les algues en produisant des quantités importantes d'ammoniaque. C'est ainsi que lors du stockage de l'eau de mer à l'obscurité, on peut noter un accroissement de la multiplication bactérienne et une production d'ammoniaque (KEYS et coll., 1935; WAKSMAN et CAREY, 1935; ZOBELL et ANDERSON, 1936).

La libération d'ammoniaque peut également se faire à partir de l'urée, et ZOBELL et FELTHAM (1935) ont démontré la présence de germes uréolytiques dans tous les horizons marins prospectés, et spécialement dans la couche superficielle des vases de la zone euphotique où vivent de nombreux animaux uréocréteurs :



L'ammonification est ainsi un processus essentiellement biologique. Il est cependant difficile de se faire une idée précise des microorganismes constituant cette flore. Dans les sols, WAKSMAN et STARKEY (1931) reconnaissent comme ammonifiants tous les microorganismes (bactéries, champignons, actinomycètes) qui, en culture pure, libèrent de l'ammoniaque à partir de substances protéiques, et leur attribuent une pareille activité dans le sol. Pour S. WINOGRADSKY, au contraire, la réalisation du processus d'ammonification serait l'apanage de quelques espèces seulement, hautement spécialisées.

BRISOU et VARGUES (1961) ont examiné 131 souches bactériennes isolées du milieu marin ou de poissons ou coquillages marins. Sur ces 131 souches, 77 étaient protéolytiques, 77 réduisaient les nitrates, 51 avaient une double action, 26 n'avaient aucune action.

Parmi les genres bactériens susceptibles de réaliser le processus d'ammonification, il faut noter : des *Vibrio*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Empedobacter*, *Bacillus*, et également des *Actinomycètes* et des *Champignons*.

L'ammoniaque libéré au cours de l'ammonification peut :

1. reconstituer des cellules bactériennes, il sert alors de source d'azote pour la biosynthèse des protéines microbiennes.
2. servir de source d'azote à certains organismes du plancton, comme l'ont montré divers auteurs : BOND (1933), BRAARUD et FÖYN (1931), COOPER (1933), HARVEY (1935), SCHREIBER (1927), ZOBELL (1935).
3. être oxydé en nitrite et en nitrate.

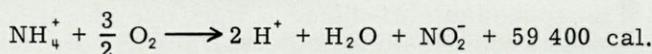
NITRIFICATION

Si l'ammonification est un processus très général et très peu spécifique, il n'en n'est pas de même pour la nitrification qui s'opère grâce à des microorganismes particuliers.

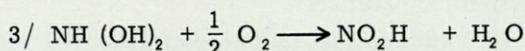
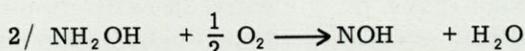
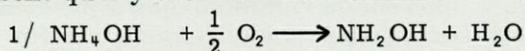
Le phénomène est connu depuis fort longtemps grâce à SCHLÖSSING et MUNTZ (1877-79) qui l'ont mis en évidence dans les eaux d'égouts et établi son origine biologique. WARINGTON (1891) ainsi que FRANKLAND (1890) montrent que le processus est réalisé en deux étapes par des microorganismes différents, isolés en culture pure par WINOGRADSKY (1890-91) qui définit leur autotrophie (1899).

La nitrification s'opère en deux temps :

a. *Nitritation* (ou nitrosation)

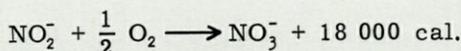


Cette réaction se fait en réalité par étapes et KLUYVER et DONKER (1926) supposent qu'il y a en fait trois stades :



Le premier stade a été vérifié par HOFMAN et LEES (1953) ainsi que par NICHOLAS et JONES (1960), les deux autres sont assez hypothétiques, les intermédiaires suggérés n'étant peut-être pas les seuls à intervenir dans la réaction.

b. *Nitratation*



Le bilan thermodynamique de ces deux réactions, est, comme l'a établi COOPER (1937), fortement exothermique, l'énergie libérée étant utilisée par les cellules bactériennes pour la synthèse de leur propre substance.

Les germes responsables de la nitrification appartiennent aux deux genres principaux :

- *Nitrosomonas*, pour le premier stade,
- *Nitrobacter*, pour le second.

Les représentants du genre *Nitrosomonas* (ou ferments nitreux) sont de petites cellules ovalaires (1,4 - 1,6 μ sur 0,9 - 1 μ), asporulées, mobiles ou immobiles selon les souches, les souches mobiles ayant une ciliature lophotriche ainsi que l'a montré RUBAN (1960); leur colorabilité est controversée, la plupart des auteurs les reconnaissent en effet comme Gram —, certains autres néanmoins les admettent comme Gram +.

Les bactéries appartenant au genre *Nitrobacter* (ou ferments nitriques) dont l'étude a été récemment complétée par ZAVARZIN (1959), sont représentées par des organismes ovalaires de petite taille (1 \times 0,8 μ), à Gram —, présentant des alternances de phases mobiles et immobiles; les formes mobiles possèdent un long flagelle latéral.

Ces représentants des genres *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* sont des germes aérobies stricts, ayant un pH optimum de culture légèrement alcalin (pH : 8,3 - 9), ils sont généralement con-

sidérés comme des autotrophes stricts, bien que certains résultats expérimentaux obtenus par KALINENKO (1953) aient pu en leur temps faire douter dans une certaine mesure de cette autotrophie. La source de carbone utilisée par ces bactéries est constituée par le C du CO₂ ou des carbonates, la source d'azote par l'ammoniaque pour *Nitrosomonas* et par le nitrite pour *Nitrobacter*. Certains oligo-éléments sont strictement requis : le phosphore et le magnésium (MEICKLEJOHN, 1952), le calcium (KINGMA BOLTJES, 1935), le cuivre et le fer (MEICKLEJOHN, 1953), le zinc ne semble pas indispensable (LEES et MEICKLEJOHN, 1948), et le manganèse serait même inhibiteur (MEICKLEJOHN, 1952).

Si le processus de nitrification est assuré principalement par les autotrophes *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, il semble établi maintenant que certains hétérotrophes libres ou associés avec des nitrificateurs vrais puissent oxyder les dérivés ammoniacaux. NECHAEVA (1947) a ainsi caractérisé un organisme apparenté à *Mycobacterium rubrum*, vivant en symbiose avec des nitrificateurs vrais. KALINENKO (1948) rapporte de même l'isolement, à partir d'horizons terrestres et marins de bactéries nitrifiantes hétérotrophes, ne se développant pas sur milieu minéral.

VERNON (1898) dans le golfe de Naples, BRANDT (1902) à Kiel, ISSATCHENKO (1914) dans l'Arctique, furent les premiers à isoler des nitrificateurs autotrophes d'horizons sédimentaires marins proches du rivage, mais toutes leurs recherches dans l'eau libre ou les sédiments profonds restèrent infructueuses, ce qui amena WAKSMAN et coll. (1933) à conclure à l'origine terrestre des bactéries nitrificatrices trouvées dans les zones marines de drainage terrestre. Semblable conclusion avait déjà été émise par GRAN (1903) et par NATHANSON (1906). Après de nombreuses recherches, BERKELEY (1919), LIPMAN (1922), HARVEY (1925) (1926) (1928) concluaient également à la présence de bactéries nitrificatrices dans les fonds, spécialement si ces derniers sont de nature sableuse et calcaire, et à leur absence en haute mer.

Il était tout de même assez étrange de considérer la nitrification comme étant le processus réalisé uniquement dans les sédiments, car la teneur la plus élevée en NH₃ du milieu marin se situe dans les eaux de surface, cet NH₃ provenant de la décomposition bactérienne des résidus animaux et végétaux. L'interprétation la plus fréquemment admise est que les eaux de surface, riches en NH₃, sont portées par des mouvements de convection jusqu'au fond où s'opère la nitrification; les nitrates seraient alors entraînés en sens inverse vers la surface où ils seraient consommés par les végétaux. RAKESTRAW (1936) et ZOBELL (1935) ont toutefois émis des doutes sur la valeur de cette théorie, faisant en particulier remarquer que le potentiel d'oxy-

do-réduction optimum pour la nitrification se situe dans la zone aérobie, entre + 0,3 et + 0,55 volt, cette condition est donc peu compatible avec les propriétés réductrices que présentent les sédiments peu après leur surface. De même, von BRAND et coll. (1942) ont constaté que les germes nitrificateurs sont pour la plupart inhibés par des températures de l'ordre de + 5° C qui règnent en général au niveau des fonds océaniques.

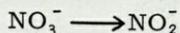
Il semble donc que la nitrification doive se produire à la surface des mers; la possibilité d'une oxydation photochimique de l'ammoniaque en nitrite et même en nitrate a été suggérée par ZOBELL (1933) et par RAKESTRAW et HOLLAENDER (1936); elle n'explique cependant qu'en partie l'origine des nitrates dans la mer, étant donné qu'elle ne peut se dérouler que dans les couches d'eau les plus superficielles (ATKINS, 1932). Récemment, WATSON (1961) relatait par contre l'isolement en plein océan de nitrificateurs autotrophes, cette découverte remettrait donc en question le problème de l'origine des nitrates dans la mer.

DÉNITRIFICATION ET RÉDUCTION DES NITRATES

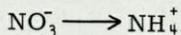
Le nitrate ainsi formé peut être assimilé directement par les organismes végétaux marins ou utilisé par les bactéries qui le transforment en composés nitrés réduits ou en substance cellulaire bactérienne. Cette étape de la dénitrification et de la réduction des nitrates en milieu marin a suscité de nombreux travaux. Elle est en effet fondamentale dans l'étude du cycle de l'azote et WOOD (1958) n'hésite ainsi pas à affirmer que la balance générale de l'azote dans la mer est étroitement liée aux processus de dénitrification et de fixation. Il semble, en tout état de cause, établi que la productivité générale de la mer dépend en grande partie des teneurs en phosphate et en nitrate du milieu marin (HARVEY, 1945).

A l'inverse des nitrificateurs, peu nombreux et très spécialisés, les bactéries dénitrificatrices et réductrices des nitrates sont, elles, très nombreuses et très diverses. Il est généralement convenu d'en distinguer trois groupes distincts :

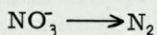
a) les bactéries qui réduisent les nitrates en nitrites :



b) les bactéries qui réduisent les nitrates en ammoniaque :

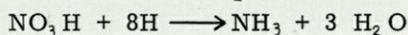


c) les bactéries qui réduisent les nitrates en azote :



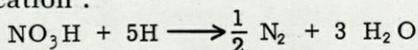
Le mécanisme de la réduction des nitrates et de la dénitrification est encore mal connu.

La réduction de l'azote nitrique en ammoniacque :



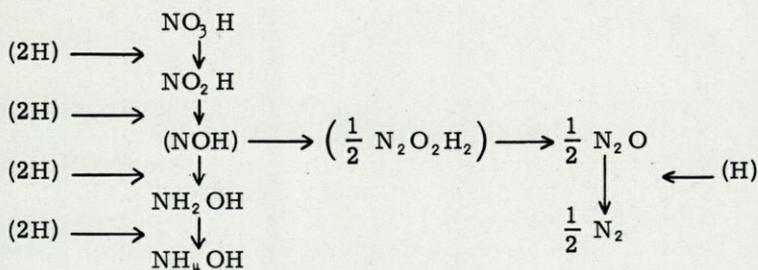
correspond à la fixation de 8 atomes d'hydrogène.

La dénitrification :



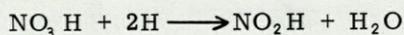
correspond à l'échange de 5 atomes d'hydrogène.

De même que lors de la nitrification, ces divers processus procèdent par étapes, qui comportent chacune l'échange de 1 ou 2 atomes d'hydrogène, et KLUYVER (1953) proposa ainsi le schéma suivant, expliquant le mécanisme de la réduction des nitrates et de la dénitrification :



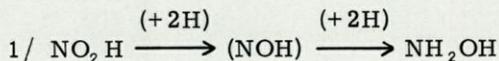
(emprunté à KLUYVER, 1953).

Parmi ces étapes, la seule qui soit bien connue est la réduction du nitrate en nitrite :



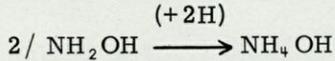
réalisée par une enzyme spécifique, la nitrate-réductase, extraite par NASON et EVANS (1953), à partir de moisissures (*Neurospora crassa*), de végétaux (graine de soja), de bactéries (*Rhizobium japonicum*), enzyme adaptative pour la synthèse de laquelle le molybdène est indispensable.

Certaines bactéries poursuivent la réduction du nitrite en ammoniacque et l'on peut considérer ici deux étapes :



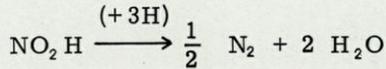
s'effectuant elle-même, selon KLUYVER en deux stades par l'intermédiaire du nitroxyde (NOH). Cette étape est très importante,

car elle représente le stade au cours duquel la réaction bifurque, soit vers l'ammoniaque, soit vers l'azote gazeux. L'enzyme responsable serait la nitrite-réductase, mise en évidence par NASON et EVANS (1953), pour la synthèse de laquelle le manganèse serait indispensable.



Cette dernière étape est, selon divers auteurs (MEDINA et NICHOLAS, 1957) (SPENCER, TAKAHASHI et NASON, 1957), catalysée par l'hydroxylamine-réductase, une flavo-métallo-protéine présentant des analogies avec la nitrite-réductase, mais distincte cependant de celle-ci.

La réduction du nitrite en azote (dénitrification vraie) :



correspondant à l'échange de 3 atomes d'hydrogène, relève d'un processus extrêmement mal connu. Divers intermédiaires ont été évoqués, le premier pourrait être le nitroxyle (NOH), qui se dimériserait spontanément en acide hyponitieux ($\text{N}_2\text{O}_2\text{H}_2$); le mode de passage entre ce polymère et l'azote gazeux est inconnu. D'autres intermédiaires pourraient être néanmoins invoqués, ainsi que l'ont souligné récemment FEWSON et NICHOLAS (1961).

La microflore dénitrifiante et réductrice des nitrates est largement représentée en milieu marin, à la fois dans l'eau et dans les sédiments. Sur les 60 espèces nouvelles décrites en 1944 par ZoBELL et UPHAM (1944), 34 en effet réduisaient les nitrates en nitrites, deux seulement les réduisaient en azote. BRISOU et VARGUES (1961), étudiant 131 souches isolées d'eaux, de vases ou de poissons de mer, montrent que 77 d'entre elles réduisent les nitrates, ces germes appartenant aux genres *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*. LAGARDE (1961) a évalué récemment l'importance de la microflore totale dénitrifiante, dans des eaux et des sédiments prélevés dans des zones littorales de la Méditerranée. Cette microflore, dans les horizons prospectés, représentait de 0,25 à 26,8 % de la microflore aérobie totale. 72 souches microbiennes ont été isolées lors de cette étude, appartenant aux genres : *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*. 17 souches réduisaient le nitrate en nitrite, 53 le réduisaient en ammoniaque, deux seulement réduisaient le nitrate en azote. SREENIVASAN et VENKATARAMAN (1956), étudiant la microflore dénitrifiante des

eaux baignant la côte Sud de l'Inde, isolent des souches réduisant les nitrates en nitrites et en azote, qu'ils classent toutes dans le genre *Pseudomonas*.

Les bactéries qui réduisent les nitrates en nitrites et même en ammoniacque n'ont dans la mer qu'une importance écologique relative, car, ainsi que l'ont montré divers auteurs (von BRAND et coll., 1937, 1942; BOND, 1933; BRAARUD et FÖYN, 1931; COOPER, 1933; HARVEY, 1933; SCHREIBER, 1927; ZOBELL, 1935), les organismes phytoplanctoniques sont capables d'utiliser l'ammoniacque, le nitrite ou le nitrate; l'activité de ces bactéries n'influe donc pas de manière sensible sur la fertilité générale de l'océan.

Les bactéries dénitrificatrices vraies ($\text{NO}_3 \rightarrow \text{N}_2$) sont infiniment plus rares (ZOBELL et UPHAM, 1944; LAGARDE, 1961). Théoriquement cependant, les organismes de ce groupe ont une grande importance sur le plan écologique, car leur activité tend à appauvrir le milieu en azote assimilable. On peut se demander pourtant si cette activité « in situ » est très grande, COOPER (1937) a montré en effet que la réduction du nitrate en azote est une réaction fortement endothermique, qui requiert un apport d'énergie considérable. Elle se produira par conséquent dans les horizons marins riches en matières organiques utilisables pour le métabolisme bactérien, plus spécialement dans les couches superficielles des sédiments (LAGARDE, 1961).

Quoiqu'il en soit, la perte azotée qui résulte dans la mer de la dénitrification est, théoriquement du moins, compensée par les activités des fixateurs d'azote.

FIXATION DE L'AZOTE

Si les végétaux et les animaux sont incapables de métaboliser l'azote atmosphérique, certains microorganismes possèdent un équipement enzymatique leur permettant de l'utiliser pour leurs synthèses protéiques.

Dans le sol, les microorganismes fixateurs peuvent être :

- des bactéries libres (aérobies, anaérobies, photosynthétiques) ou symbiotiques (*Rhizobium*);
- ou des algues.

Dans la mer, la fixation de l'azote s'accomplit grâce à des germes libres (aérobies et anaérobies) et à des algues, la présence de microorganismes symbiotiques n'ayant encore été rigoureusement démontrée.

Les fixateurs aérobies

Les fixateurs aérobies sont très répandus dans le milieu marin. Parmi eux, les représentants du genre *Azotobacter*, dont l'espèce type est *Azotobacter chroococcum* sont les plus importants. Bien que ces microorganismes aient servi de matériel à de très nombreuses études, leur morphologie est à l'heure actuelle encore très mal connue. Elle présente en effet de véritables cycles évolutifs dont l'étude a été entreprise par LÖHNIS et SMITH (1923), S. WINOGRADSKY (1926) (1938) et plus récemment par POCHON et TCHAN (1948), ainsi que JENSEN (1954).

Le cycle évolutif d'*Azotobacter chroococcum* est schématisé par POCHON de la façon suivante :

- les formes jeunes sont représentées par des bâtonnets de $2 \times 4 \mu$ mobiles (ciliature péritriche);
- les formes adultes qui en dérivent sont de gros cocci sphériques, ayant un diamètre de 2 à 4μ , immobiles, contenant de nombreuses granulations (lipides, volutine, glycogène, etc.);
- les formes vieilles sont des kystes à coque épaisse, qui peuvent germer et donner à nouveau la forme initiale.

D'autres modes de reproduction plus complexes ont été décrits par BISSET et HALE (1953), et par DONDERO et ZELLE (1953) notamment.

Les *Azotobacter* sont des germes à Gram négatif, aérobies stricts. Il est cependant établi maintenant qu'ils peuvent supporter des tensions réduites d'oxygène, ainsi que l'ont montré PARKER et SCUTT (1954) (1958) (1960), ainsi que TSCHAPEK et GIAMBAGI (1955). Dans ces conditions, la fixation apparaît, pour certaines souches tout au moins, plus efficace.

Ces microorganismes hétérotrophes sont, vis-à-vis de leurs sources carbonées, extrêmement polyvalents, un grand nombre de composés peuvent en effet être utilisés par ces germes, comme source d'énergie et de carbone nécessaire aux synthèses cellulaires : des alcools, des sels d'acides organiques, des glucides, des polyosides, etc... Cependant, certaines substances trouvées en quantités importantes dans certains sédiments marins, du type cellulose, hémicellulose, composés humiques, ne sont pas directement attaquées par les *Azotobacter*.

Le problème de la nutrition azotée de ces germes est plus simple : en l'absence d'azote combiné, ils fixent l'azote moléculaire, et le rendement de fixation est évalué en culture par le rapport :

$$\text{rendement de fixation} = \frac{\text{Quantité d'azote fixé}}{\text{Quantité de carbone consommé}}$$

Ce rendement est en général faible (de l'ordre de 1 %) et varie suivant l'âge, l'état de la souche et la nature de la source carbonée fournie.

Le nitrate à doses faibles stimule la fixation, et inhibe celle-ci à des concentrations plus fortes (supérieures à 100 mg de NO_3 par litre), mais est sans effet sur la croissance.

Les besoins minéraux varient avec la source d'azote, mais d'une façon générale sont indispensables : calcium, phosphore, fer, magnésium, molybdène.

La fonction de fixation de l'azote a été reconnue par ailleurs chez de nombreux microorganismes. Des représentants des genres *Pseudomonas* et *Achromobacter* fixant l'azote ont été décrits par ANDERSON (1955), JENSEN (1958), PROCTOR et WILSON (1958) (1959), VOETS (1955); des *Bacillus* fixateurs ont été également isolés par BREDEMAN (1908), FULMER et FRED (1917), HINO et WILSON (1958), ainsi que des *Spirilles* (RODINA, 1956), des *Actinomycètes* (FEDOROV et ILINA, 1959), des *Levures* (BROWN et METCALFE, 1957), des *bactéries photosynthétiques* (GEST et KAMEN, 1949) (LINDSTRÖM et coll., 1949, 1951) (PRATT et FRENKEL, 1959).

La grande majorité des germes reconnus fixateurs aérobies possèdent dans leur équipement enzymatique des hydrogénases, ce qui semblerait confirmer la thèse de LINSTRÖM selon laquelle toute bactérie pourvue d'une hydrogénase était capable de fixer l'azote moléculaire; néanmoins, des bactéries possédant cette enzyme ne sont pas fixatrices.

Les fixateurs anaérobies.

Relativement peu d'espèces bactériennes anaérobies semblent douées du pouvoir de fixation de l'azote, en milieu marin.

La première souche fixatrice étudiée fut l'anaérobie *Clostridium pastorianum*, isolée par WINOGRADSKY (1893). C'est un bacille de 1,5 à 8 μ de longueur sur 0,8 à 1,3 μ de largeur, à extrémités arrondies, mobile (ciliature péritriche), à Gram positif, sporulé (la spore, ovale, déformante, mesure de 1,3 à 1,6 μ).

Ce germe, anaérobie strict, est un organisme polyphage, utilisant comme source de carbone un nombre important de composés : glucose, maltose, saccharose, glycérol, etc..., mais pas la cellulose. En l'absence d'azote combiné, il fixe l'azote moléculaire, mais les rendements de fixation sont, comme pour *Azotobacter*, assez faibles. Le molybdène a également une action favorisante sur la fixation.

D'autres bactéries anaérobies ont été reconnues fixatrices

d'azote : ROSENBLUM et WILSON (1949) ont ainsi étudié nombre de souches appartenant au genre *Clostridium*, mais la présence de ces organismes, bien que très possible, reste à démontrer dans le milieu marin.

Il est intéressant de noter enfin que des représentants du genre *Desulfovibrio*, qui réduisent les sulfates en H_2S , sont également doués du pouvoir de fixation de l'azote, ainsi que l'ont établi SISLER et ZO BELL (1951), puis LE GALL, SENEZ et PICHINOTY (1959).

Les algues fixatrices.

Certaines *Myxophycées* sont, elles aussi, en l'absence d'azote combiné, capables de fixer l'azote moléculaire. Ce pouvoir, soupçonné par FRANK (1889), a été étudié par de nombreux auteurs : DREWES (1928), BURRIS (1932), ALLISON (1937), BURRIS et WILSON (1946). DREWES (1928) a ainsi montré que des cultures pures de *Nostoc punctiforme* et d'*Anabaena variabilis* pouvaient fixer 2 à 3 mg d'azote en 50 jours, dans 250 ml de milieu. De même, ALLISON (1937) a établi que *Nostoc muscorum* fixait jusqu'à 18 mg d'azote en 85 jours, dans 100 ml de milieu.

Ces exemples suggèrent l'importance probable de la fixation de l'azote par les algues, dans la mer, comme le souligne ALLEN (1961) dans un récent travail, mais les démonstrations expérimentales en sont encore très fragmentaires.

Le mécanisme de la fixation est encore très mal connu, encore qu'il ait été établi maintenant de façon certaine que l'enchaînement des réactions passe par l'ammoniaque; cet intermédiaire a été en effet mis en évidence, aussi bien avec des extraits acellulaires (CARNAHAN et coll., 1960) qu'avec des cellules intactes (ZELITCH et coll., 1951) (NEWTON et coll., 1953) de germes fixateurs, *Azotobacter* et *Clostridium pastorianum* en l'occurrence. D'autres intermédiaires tels que l'hydrazine, l'hydroxylamine ont été évoqués, mais leur formation n'a pu être démontrée (CARNAHAN et coll., 1960).

Des microorganismes fixateurs d'azote furent mis en évidence pour la première fois dans la mer par BENECKE et KEUTNER (1903). Ils trouvèrent ainsi d'abondantes populations d'*Azotobacter* dans les zones à plancton, ce qui laissa croire à REINKE (1903) à une symbiose entre les organismes du phytoplancton et des algues et la bactérie, et *Clostridium pastorianum* fut mis en évidence dans les eaux profondes et les sédiments de diverses mers froides ou chaudes du globe. KEUTNER (1905) en concluait que ces organismes sont des hôtes normaux du milieu marin.

L'existence de fixateurs d'azote spécifiquement marins, contestée par certains auteurs (KORINEK, 1932); LLOYD, 1930), a été cependant reconnue par la majorité des chercheurs, dans tous les océans prospectés (ISSATCHENKO, 1914; WAKSMAN et coll., 1933; KRIS, 1959; KRIS et coll., 1952; ZARMA, 1958; PSHENIN, 1959; SOUSCHKINA, 1949), encore que WOOD (1958) ait récemment émis quelques réserves sur l'indigénicité de souches d'*Azotobacter* isolées par lui d'horizons marins voisins des côtes australiennes.

Signalons enfin la description par PSHENIN (1959) de formes bactériennes ressemblant à des *Rhizobium*, et trouvées par cet auteur dans des thalles de *Phyllophora*. Si cette découverte était confirmée, il est certain qu'elle remettrait en question l'existence dans la mer de fixateurs symbiotiques, non encore prouvée formellement à l'heure actuelle.

La fixation de l'azote requiert une énergie importante, les germes responsables se trouveront par conséquent là où ils disposeront d'une quantité importante de matière organique, et ce, en milieu marin, dans des zones bien déterminées. Divers auteurs (KEDING, 1906; ISSATCHENKO, 1914; BAVENDAMM, 1931; WAKSMAN et coll., 1933; ZARMA, 1958; PSHENIN, 1959) ont établi que les fixateurs aérobies sont trouvés presque exclusivement en surface, au voisinage des algues et dans les couches superficielles des sédiments; les fixateurs anaérobies prédominent par contre dans les couches profondes des sédiments, où ils paraissent seuls actifs.

Le rôle joué effectivement par la microflore azo-fixatrice dans les conditions naturelles est difficile à apprécier, et il fait l'objet de sérieuses réserves. Selon WAKSMAN et coll. (1933), l'humus marin serait trop pauvre en substances énergétiques pour que *Clostridium pastorianum* puisse y exercer une activité appréciable. Le problème est peut-être différent pour les fixateurs aérobies, associés étroitement aux végétaux marins et disposant là de ressources en carbohydrates. Les conclusions de VON BRAND et coll. (1942) sont plus catégoriques encore puisque ces auteurs nient à la fixation bactérienne une quelconque importance en milieu marin.

Quoiqu'il en soit, et puisque les données concernant ces problèmes restent peu précises, force nous est d'espérer que les techniques modernes, écologiques et biochimiques en particulier, permettront de résoudre ces problèmes.

Centre National de la Recherche Scientifique,
Laboratoire Arago, Banyuls-sur-Mer

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN, M.B., 1961. — Nitrogen Fixing Organisms in the Sea. *Symposium of Marine Microbiology*, Chicago.
- ALLISON, F.E., 1937. — *Bot. Gaz.*, 98 : 433.
- ANDERSON, G.R., 1955. — *J. Bact.*, 70 : 129-133.
- ATKINS, W.R.G., 1932. — *J. Cons. int. explor. Mer.*, 7 : 171.
- AUDOYNAUD, A., 1875. — *C.R. Acad. Sci.*, 81 : 619.
- BAVENDAMM, W., 1931. — *Ber. deutsch. Bot. Ges.*, 49 : 282-287.
- BEIJERINCK, M.W., 1890. — *Meddel. K. Akad. Wetensch.*, 7 : 239.
- BENECKE, W. et KEUTNER, J., 1903. — *Ber. deutsch. Bot. Ges.*, 21 : 333.
- BERKELEY, C., 1919. — *Trans. Roy. Soc. Canada*, 13 : 15.
- BISSET, K.A. et HALE, C.M., 1953. — *J. Gen. Microb.*, 8 : 442-448.
- BOND, R.M., 1933. — *Bull. Bingham Ocean. Coll.*, 4 : 1-89.
- BRAARUD, T. et FOYNS, B., 1931. — *Avhandl. Norsk. Vid. Akad. i Oslo*, 14 : 1-24.
- BRANDT, K., 1899. — *Wiss. Meeresunter. Abr. Kiel*, 4 : 213-230.
- BRANDT, K., 1902. — *Wiss. Meeresunters. Abt. Kiel, N.F.*, 6 : 23-79.
- BREDEMAN, 1908. — *Zbl. f. Bakt.*, II, 22 : 44.
- BRISOU, J. et VARGUES, H., 1961. — Proteolysis and nitrate reduction in sea water (*Symposium of Marine Microbiology*, Chicago)..
- BROWN, M.E. et METCALFE, G., 1957. — *Nature*, 180 (4580) : 282.
- BURRIS, R.H., 1932. — *Proc. Soil. Sci. Soc. Amer.*, 7 : 258.
- BURRIS, R.H. et WILSON, P.W., 1946. — *Ann. Rev. Bioch.*, 108 : 254.
- CARNAHAN, J.E., MORTENSON, L.E., MOWER, H.F. et CASTLE, J.E., 1960. — *Bioch. Biophys. Acta*, 44 : 520-535.
- COOPER, L.H.N., 1933. — *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 18 : 677; 19 : 55.
- COOPER, L.H.N., 1937. — *J. Mar. Biol. Ass.*, 22 : 183-204.
- DEVÈZE, L., 1959. — *Rec. Trav. Stat. Mar. Endoume*, 25 (15).
- DONDERO, N. et ZELLE, M., 1953. — *Science*, 118 : 34-36.
- DREWES, K., 1928. — *Zbl. f. Bakt.*, II, 76 : 88.
- DUURSMAN, E.K., 1960. — *Netherl. J. Sea Res.*, 1 (1/2) : 1-148.
- FEDOROV, M.V. et ILINA, T.K., 1959. — *Mikrobiologiya*, 28 (4) : 541-7.
- FEWSON, C.A. et NICHOLAS, D.J.D., 1961. — *Nature*, 190 (4770) : 2-7.
- FISCHER, B., 1894. — *Ergebnisse des Plankton Exp. der Humboldt Stift.*, 4 : 1-83.
- FRANK, 1889. — *Ber. Deutsch. Bot. Gaz.*, 7 : 34.
- FRANKLAND, P.F. et FRANKLAND, G., 1890. — *Trans. Roy. Soc. London*, 181 : 107.
- FULMER, H.L. et FRED, E.B., 1917. — *J. Bact.*, 2 : 422.
- GEST et KAMEN, 1949. — *Science*, 109 : 538.
- GEST et KAMEN, 1949. — *J. Bact.*, 58 : 239.
- GRAN, H.N., 1901. — *Bergens Mus. Aarb.*, 10 : 1.
- GRAN, H.N., 1903. — *Naturen. Bergen.*, 27 : 33.
- HARVEY, H.W., 1925. — *J. Mar. Biol. Ass.*, 13 : 953.
- HARVEY, H.W., 1926. — *J. Mar. Biol. Ass.*, 14 : 71.
- HARVEY, H.W., 1928. — *Biological Chemistry and Physics of Sea Water*, Cambridge University Press.
- HARVEY, H.W., 1933. — *J. Mar. Biol. Ass.*, 19 : 253-276.
- HARVEY, H.W., 1945. — *Recent advances in the Chemistry and Biology of Sea water*, Cambridge University Press.
- HINO, S. et WILSON, P., 1958. — *J. Bact.*, 75 (4) : 403-8.
- HOFMAN, T. et LESS, H., 1953. — *Bioch. J.*, 54 : 579.

- ISSATCHENKO, B.L., 1914. — Recherches sur les Bactéries de l'Océan Glacial Arctique. Monographie Petrograd, 300 p.
- JENSEN, H.L., 1954. — *Bact. Rev.*, 18 : 195-213.
- JENSEN, H.L., 1958. — *Arch. Mikrobiol. Dtsch.*, 29 (4) : 348 B.
- KALINENKO, V.O., 1948. — *Pochvovednie*, 357-63.
- KALINENKO, V.O., 1953. — *Dokladi. Akad. Nauk. SSSR*, 92 : 161.
- KEDING, M., 1906. — *Wiss. Meeresunters. Abt. Kiel*, NE, 9 : 273-309.
- KEUTNER, J., 1905. — *Wissen. Meeresunters. Abt. Kiel*, 8 : 27.
- KEYS, A., CHRISTENSEN, E.H. et KROGH, A., 1935. — *J. Mar. Biol. Ass.*, 20 : 181-196.
- KINGMA BOLTJES, 1935. — *Arch. Mikrobiol.*, 6 : 79.
- KLUYVER, A.J. et DONKER, H.J.L., 1926. — *Chem. Zelle*, 13 : 134.
- KLUYVER, A.J., 1953. — Symposium *Metabolismo Microbico*, Roma. *Thomas Publis. Springfield*, 3.
- KORINEK, J., 1932. — *Centabl. f. Bakt.*, II Abt., 86 : 201.
- KRISS, A.E., MARKIANOVITCH, E.M. et ROUKINA, E.A., 1952. — *Trav. Stat. Biol. Sebastopol*, 8 : 220-287.
- KRISS, A.E., 1959. — *Morskaya Mikrobiologiya*, Moscou.
- LAGARDE, E., 1961. — Microflore dénitrifiante de certaines zones littorales méditerranéennes. Congrès Ecologie Marine, Naples (sous presse).
- LEES, H. et MEICKLEJOHN, J., 1948. — *Nature*, 161 : 398.
- LE GALL, J., SENEZ, J.C. et PICHINOTY, F., 1959. — *Ann. I.P.*, 96 : 223-230.
- LINDSTROM, BURRIS, R.H. et WILSON, 1949. — *J. Bact.*, 58 : 313.
- LINDSTROM, LEWIS et PINSKY, 1951. — *J. Bact.*, 61 : 481.
- LIPMAN, C.B., 1922. — *Science*, 56 : 501.
- LOYD et BLODWEN, 1930. — *J. Mar. Biol. Ass.*, 16 : 879.
- LÖHNIS, F. et SMITH, N.R., 1923. — *J. Agr. Res.*, 23 : 401-32.
- MEDINA, A. et NICHOLAS, D.J.D., 1957. — *Nature*, 179 : 533.
- MEDINA, A. et NICHOLAS, D.J.D., 1957. — *J. Gen. Micr.*, 17 (5).
- MEDINA, A. et NICHOLAS, D.J.D., 1957. — *Bioch. Bioph. Acta*, 25 : 138.
- MEICKLEJOHN, J., 1952. — *Nature*, 170 : 1131.
- MEICKLEJOHN, J., 1953. — *J. Gen. Microb.*, 8 : 58.
- NASON, A. et EVANS, H.J., 1953. — *J. Biol. Chem.*, 202 : 655.
- NATHANSON, A., 1906. — *Abh. Matt., Phys. Kl. Kgl. Sächs. Ges. Wiss.*, 29 : 335.
- NECHAEVA, B., 1947. — *Mikrobiologiya*, 16 : 418-28.
- NEWTON, J.W., WILSON, P.W., et BURRIS, R.H., 1953. — *J. Biol. Chem.*, 204 : 445.
- NICHOLAS et JONES, 1960. — *Nature*, 165 : 512.
- OSTROFF et HENRY, B.S., 1939. — *J. Cell. Comp. Physiol.*, 13 : 353-71.
- PARKER, C.A., 1954. — *Nature*, 173 : 780.
- PARKER, C.A. et SCUTT, P.B., 1958. — *Bioch. Biophys. Acta*, 29 (3) : 662.
- PARKER, C.A. et SCUTT, P.B., 1960. — *Bioch. Biophys. Acta*, 38 (2) : 230-8.
- POCHON, J. et TCHAN, 1948. — *Ann. I. P.*, 74 : 182-8.
- POCHON, J. et de BARJAC, H., 1958. — *Traité de Microbiologie des sols*. Dunod Ed., Paris.
- PRATT, D.C. et FRENKEL, A.W., 1959. — *Plant Physiol.*, 34 (3) : 333-7.
- PROCTOR, M.H. et WILSON, P.W., 1958. — *Nature*, 182 (4639) : 891.
- PROCTOR, M.H. et WILSON, P.W., 1959. — *Arch. Mikrobiol.*, 32 (3) : 254-60.
- PSHENIN, L.N., 1959. — *Doklad. Nauk Akad. SSSR.*, 129 (4) : 930-3.
- PSHENIN, L.N., 1959. — *Mikrobiologiya*, 28 : 927-32.
- RAKESTRAW, N.W., 1936. — *Biol. Bull.*, 71 : 133-67.
- RAKESTRAW, N.W. et HOLLAENDER, A., 1936. — *Science*, 84 : 442.
- REINKE, J., 1903. — *Ber. deutsch. Bot. Ges.*, 21 : 481.

- RODINA, A.G., 1956. — *Mikrobiologiya*, 25 : 145-9.
ROSENBLUM, E.D. et WILSON, P.W., 1949. — *J. Bact.*, 57 : 413.
RUBAN, E.L., 1960. — *Mikrobiologiya*, 29 (1) : 34-7.
RUSSEL, H.L., 1892. — *Bot. Gaz.*, 17 : 312.
SCHLOSSING, J.H. et MUNTZ, C.A., 1877-79. — *C.R. Acad. Sci.*, 84 : 301;
C.R. Acad. Sci., 85, 1018; *C.R. Acad. Sci.*, 86 : 891; *C.R. Acad. Sci.*,
89 : 1074.
SCHREIBER, E., 1927. — *Wiss. Meeresunters.*, 16 : 1-35.
SISLER, F.D. et ZOBELL, C.E., 1951. — *Science*, 113 : 511.
SOUSCHKINA, N.M., 1949. — Distribution écologico-géographique d'Azoto-
bacter dans la Mer Noire. Edit. Ac. Sci. U.R.S.S.
SPENCER, D., TAKAHASHI, H. et NASON, A., 1957. — *J. Bact.*, 73 : 553.
SREENIVASAN, A. et VENKATAMARAN, R., 1956. — *J. Gen. Microbiol.*, 15 :
241-7.
TSCHAPEK, M. et GIAMBAGI, M., 1955. — *Arch. Mikrob.*, 21 : 376-90.
VERNON, H.M., 1898. — *Mitt. Zool. Stat. Nâpel*, 13 : 341-425.
VOETS, 1955. — *Naturwissensch.*, 43.
BRAND, T. VON, RAKESTRAW, N.W. et RENN, C.E., 1937. — *Biol. Bull.*,
72 : 165-75.
BRAND, T. VON, RAKESTRAW, N.W. et ZABOR, J.W., 1942. — *Biol. Bull.*,
83 : 273-82.
WAKSMAN, S.A., et STARKEY, R., 1931. — *Soil and the Microbe*, p. 131.
WAKSMAN, S.A., CAREY, C.L. et REUSZER, H.W., 1933. — *Biol. Bull.*, 63 :
57-79.
WAKSMAN, S.A., HOTCHKISS, M. et CAREY, C.L., 1933. — *Biol. Bull.*, 65 :
137-67.
WAKSMAN, S.A. et CAREY, C.L., 1935. — *J. Bact.*, 29 : 531-45.
WAKSMAN, S.A. et RENN, C.E., 1936. — *Biol. Bull.*, 70 : 472-83.
WARINGTON, R., 1891. — *J. Chem. Soc.*, 59 : 484.
WATSON, S.W., 1961. — *Symposium of Marine Microbiology*. Chicago.
WINOGRADSKY, S., 1890-91. — *Ann. I. Past.*, 4 : 213-231, 257-75, 760-71;
Ann. I. Past., 5 : 92-100, 577-616.
WINOGRADSKY, S., 1893. — *C.R. Acad. Sci.*, 116 : 1385.
WINOGRADSKY, S. et OMELIANSKY, W., 1899. — *Cent. Bakt.*, 2 (5) : 329-43,
377-87, 429-40.
WINOGRADSKY, S., 1926. — *Ann. I. Past.*, 40 : 455-520.
WINOGRADSKY, S., 1938. — *Ann. I. Past.*, 60 : 351-400.
WOOD, E.J.F., 1958. — *Bact. Rev.*, 22 (1) : 1-19.
ZARMA, M., 1958. — *C.R. Ass. Plén. Comm. Sci. Int. Explor. Mer Méditer-
ranée*, Monaco.
ZAVARZIN, G. et LEGUNKOVA, R., 1959. — *J. Gen. Microbiol.*, 21 : n° 1,
186-190.
ZELITCH, I., ROSENBLUM, E.D., BURRIS, R.H. et WILSON, P.W., 1951. —
J. Biol. Chem., 191 : 295.
ZO BELL, C.E., 1933. — *Science*, 77 : 27.
ZO BELL, C.E., 1935. — *J. Bact.*, 29 : 78.
ZO BELL, C.E., 1935. — *Proc. Nat. Ac. Sci.*, 21 : n° 9, 517-22.
ZO BELL, C.E. et FELTHAM, C.B., 1935. — *Science*, 81 : 234-6.
ZO BELL, C.E. et ANDERSON, D.Q., 1936. — *Biol. Bull.*, 71 : 324-42.
ZO BELL, C.E. et UPHAM, H.C., 1944. — *Bull. Scripps Inst. Océanog.*, 5 :
239-92.