



Collegium Sciences et Techniques – Orléans

Ecole d'horticulture de La Mouillère – Orléans

PROJET TUTEURÉ

En vue de l'obtention du diplôme de Licence Professionnelle Valorisation des Ressources Végétales
Option : Management des entreprises du végétal

Thème :

LES BACTERIES FIXATRICES D'AZOTE LIBRES DU SOL

Réalisé par l'étudiant :

Clément DELAMOTTE

Commanditaires :

*François MULET
Amandine BEUGNET*

Tuteur universitaire :

Véronique NIVIERE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes commanditaires, Mr François Mulet et Mme Amandine Beugnet qui m'ont fait confiance pendant cette année pour la réalisation de ce projet tuteuré. Ils ont permis de mettre en place les conditions nécessaires à la bonne réalisation de ce projet et m'ont soutenu chaque semaine afin d'encadrer cette thématique au mieux.

Je remercie tout particulièrement les personnes que j'ai contacté afin d'obtenir des informations sur cette thématique. Notamment, Pierre-Philippe Claude, agronome dans le secteur de l'azotobactérisation ainsi que Francis Bucaille, un des dirigeants de l'entreprise Gaïago spécialisée dans « l'élevage » de bactéries fixatrices d'azote libres.

Je tiens dans un second temps à remercier ma tutrice universitaire, Véronique Nivière qui m'a soutenue dans la réalisation de ce projet tuteuré et qui m'a poussé à persévérer.

Je souhaite également remercier Christian Bednarek, responsable de cette Licence Professionnelle Valorisation des Ressources Végétales à La Mouillère qui m'a également aidé pour ce projet.

Enfin, je remercie mes parents qui m'ont apporté une aide pour la relecture de ce rapport.

Table des matières

Remerciements	2
Tables des illustrations	5
Introduction	6
1. Méthodologie	7
1.1. Le sujet et les thèmes recherchés	7
1.2. Recherche bibliographique	7
1.3. Contact de spécialistes	7
1.4. Formation en ligne « Vie du sol et fertilité »	7
2. L'importance de l'azote	8
2.1. A quoi sert l'azote pour les plantes ?	8
2.2. Le cycle de l'azote	9
2.3. Les organismes participants au cycle de l'azote	10
3. Les bactéries fixatrices d'azote	11
3.1. Qu'est-ce qu'une bactérie fixatrice d'azote ?	11
3.2. Quels sont les différents types ?	12
3.2.1. Dans les racines des plantes : les bactéries endophytes	12
3.2.2. Les bactéries diazotrophes	13
3.2.3. Les bactéries endophytes	14
3.2.4. Des bactéries endophytes qui sont également diazotrophes	15
3.3. Comment fonctionne la fixation d'azote ?	15
3.3.1. L'enzyme nitrogénase	15
3.3.2. L'énergie	15
3.4. Les conditions nécessaires	16
3.5. Exemple du maïs	16
3.6. D'autres microorganismes : Les champignons	16
4. L'application dans l'agriculture	17
4.1. Les conditions sont-elles réunies dans les champs ?	17

4.2.	Le cas du compost.....	18
4.3.	L'utilisation du BRF	19
4.4.	Quantification de l'azote	19
4.5.	Le cas du FREE N 100.....	20
4.5.1.	Présentation générale	20
4.5.2.	Essaie du FREE N 100 sur blé tendre	20
4.5.3.	Témoignage d'un utilisateur.....	21
Conclusion.....		22
Bibliographie.....		23
Glossaire		24
Annexes		26

Tables des illustrations

Figure 1 : Schéma des agents participants au cycle de l'azote (Visionlearning, 2009)	9
Figure 2 : Schéma réalisé par Vers De Terre Production illustrant les différentes bactéries	11
Figure 3 : Colonisation des racines par les bactéries rhizosphériques, les bactéries associatives et les bactéries endophytes	13
Figure 4 : Illustration représentant une bactérie du genre Azotobacter	14
Figure 5 : Cartographie des stocks de carbone organique de 0 à 30 cm de profondeur en France métropolitaine	17
Figure 6 : Illustration du fonctionnement d'un sol vivant (Mon Jardin en Permaculture)	18
Figure 7 : Illustration de l'aspect du Bois Raméal Fragmenté	19
Figure 8 : Tableau des résultats d'essais sur blé tendre, réalisé par Gaïago	20

Introduction

« Il n'existe pas de problèmes dans la nature, mais seulement des solutions car l'état naturel est un état adaptatif donnant naissance à un système cohérent » d'après René Dubos dans *Courtisons la terre*. L'atmosphère contient environ 80 000 tonnes de diazote à l'hectare. L'apport en azote est inépuisable sachant que le diazote représente donc 80% de l'atmosphère terrestre. Globalement la demande en fertilisation azotée a approché les 112 millions de tonnes pour l'année 2015. Aujourd'hui, le monde agricole se focalise principalement sur les légumineuses qui possèdent un pouvoir de fixateur d'azote atmosphérique dans les sols. Cependant, force est de constater que nos sols contiennent des bactéries capables de fixer le diazote. Ces bactéries dites « libres » sont souvent considérées comme négligeables dans les systèmes agricoles conventionnels* alors qu'elles ont une valeur bien plus importante dans l'étude des milieux naturels. Les sols vivants* qui se construisent sur l'intensification de la production de biomasse du système agricole ont à leur disposition des ressources carbonées en grande quantité. C'est ce qui va permettre aux bactéries fixatrices d'azote libres d'intervenir plus efficacement.

L'enjeu aujourd'hui est donc de pouvoir transformer cet azote de l'air en une matière biologiquement active et utilisable pour nos végétaux.

La composition des sols et les facteurs environnementaux ont un impact significatif sur la composition des différentes communautés de bactéries et auront également un impact sur leurs fonctions. Comme pour tout autre microorganisme, ces bactéries ont besoin de beaucoup d'éléments, comme les protéines, les micro et macro éléments du sol et d'autres molécules. Egalement, les résidus de cultures contenant de la cellulose et hémicellulose auront un impact sur cette fixation d'azote par les bactéries libres.

Nous pouvons d'ores et déjà avancer qu'une partie non négligeable de l'azote provient de la fixation non symbiotique par les bactéries. A long terme, l'objectif est d'utiliser et de valoriser cette voie dans le cadre des techniques de culture en sols vivants et semis directes. L'azote étant un facteur limitant dans la croissance des plantes, il est important d'en maîtriser ses caractéristiques.

Comment peut-on utiliser et favoriser la fixation biologique de l'azote par les bactéries fixatrices d'azote libres dans l'agriculture ?

Notre hypothèse se dirige vers la disponibilité des sols en carbone. A partir du carbone en décomposition et d'un rapport Carbone/Azote (C/N) élevé, les bactéries fixatrices d'azote se développent davantage.

Dans ce cadre, nous avons d'abord voulu repasser la question de l'importance de l'azote. Cette étape est indispensable afin de comprendre les enjeux. Vient ensuite le thème de l'étude sur les bactéries fixatrices d'azote libres ; nous en avons donné la définition, les différents types ainsi que leur fonctionnement. Dans une dernière partie, il nous semblait très important d'évoquer ces bactéries dans le domaine agricole.

1. Méthodologie

1.1. Le sujet et les thèmes recherchés

Le sujet que nous avons choisi d'étudier concerne les bactéries fixatrices d'azote libres du sol. Pour cela, plusieurs thématiques ont pu être prises en compte. L'enjeu a dans un premier temps été de caractériser les bactéries et les différents groupes. Nous avons ensuite pu rechercher le fonctionnement de ces bactéries au sein du sol et des plantes. Enfin, le but de notre sujet est de pouvoir utiliser ces bactéries dans l'agriculture et à tout type de système, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à leur application dans cette voie.

1.2. Recherche bibliographique

Afin de répondre à notre problématique, nous avons effectué une recherche bibliographique. Pour cela, beaucoup de documents scientifiques en anglais ont été étudiés ainsi que certains en français. Grâce à ces recherches, beaucoup de questions ont pu être résolues, tandis que d'autres restent toujours introuvables dans ce flux d'articles.

1.3. Contact de spécialistes

Pour permettre de compléter mes informations, des spécialistes ont été contactés. Ainsi, Pierre-Philippe Claude, agronome, m'a transmis beaucoup d'articles et d'éclaircissements concernant mon sujet grâce à des échanges par mail. Egalement, Francis Bucaille, gérant de l'entreprise Gaïago, m'a permis de comprendre le mécanisme de certaines bactéries.

1.4. Formation en ligne « Vie du sol et fertilité »

Mes commanditaires, François Mulet et Amandine Beugnet, tout deux travaillant chez « Vers de terre production » m'ont apporté beaucoup de soutien pour la réalisation de ce projet tuteuré. Cette aide a été permise grâce à des entretiens téléphoniques hebdomadaires, la transmission d'informations ainsi que l'inscription à une formation. Leur entreprise réalise des formations destinées notamment aux agriculteurs et acteurs du secteur agricole. Amandine Beugnet m'a ainsi inscrite à leur formation « Vie du sol et fertilité » d'une durée de trois heures, effectuée via internet. Ce parcours m'a aidé à éclaircir certains points de cette thématique.

Désormais, je vais développer mon sujet en commençant par vous montrer l'importance de l'azote. Il sera ensuite exposé le thème de l'étude et nous finirons par l'application qu'il peut être fait de ces bactéries en agriculture.

2. L'importance de l'azote

La croissance des plantes dépend de la disponibilité des éléments minéraux dans le sol et notamment de la quantité d'azote disponible pour la plante. Dans l'atmosphère terrestre, nous avons la présence de presque 79% d'azote sous forme de gaz non assimilable pour la plante : le diazote.

2.1. A quoi sert l'azote pour les plantes ?

Le nitrogène* occupe une place importante dans le métabolisme des plantes. Afin d'obtenir un meilleur rendement et une production de meilleure qualité, l'azote est indispensable aux végétaux. Il représente un constituant important en source de protéines et de chlorophylle. En outre, son rôle est directement lié à la couleur de la plante, le développement racinaire, la présence foliaire et toute autre partie végétative de la plante. La déficience en azote peut entraîner une perte importante sur le rendement des cultures, par exemple le blé. (American - Eurasian Network for Scientific information, 2016)

Ce sont le sol et les conditions climatiques qui peuvent jouer un rôle significatif sur la disponibilité et l'utilisation de l'azote. D'autre part, le sol contient beaucoup de microorganismes permettant la transformation de l'azote afin qu'il soit disponible pour la plante. Ainsi, nous savons que beaucoup de bactéries jouent un rôle central sur la disponibilité en azote. Elles peuvent convertir le diazote en ammoniacque par le principe de fixation d'azote via la nitrogénase.

Désormais, afin de compléter notre réponse sur la fonction de l'azote pour les plantes, nous devons nous intéresser aux hormones. Ainsi, l'azote va permettre de fabriquer des molécules indispensables aux végétaux : les hormones.

On retrouve donc l'auxine et la cytokinine, qui sont les deux hormones les plus importantes dans la régulation et le développement de la plante. Ce processus de régulation implique le développement de l'architecture de la plante.

Egalement, la production de gibbérelline joue un rôle très important sur la première étape de développement de la plante. Quelques souches de *Azospirillum* peuvent produire de l'éthylène, qui dépend de la présence de méthionine et différentes sources de carbone. Néanmoins, plusieurs bactéries associatives endophytes et diazotrophes produisent l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate déaminase. Il avait été proposé qu'ils réduisent l'accumulation d'éthylène pour ré-établir un meilleur système racinaire.

Avec les hormones, le diazote est un important modulateur de l'architecteur des racines.

Par conséquent, nous supposons que les bactéries fixatrices d'azote vont favoriser la croissance de la plante et des racines.

2.2. Le cycle de l'azote

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'azote est présente dans l'atmosphère sous une forme non assimilable. Le diazote étant un composé inerte, il doit suivre son propre cycle pour être disponible aux végétaux.

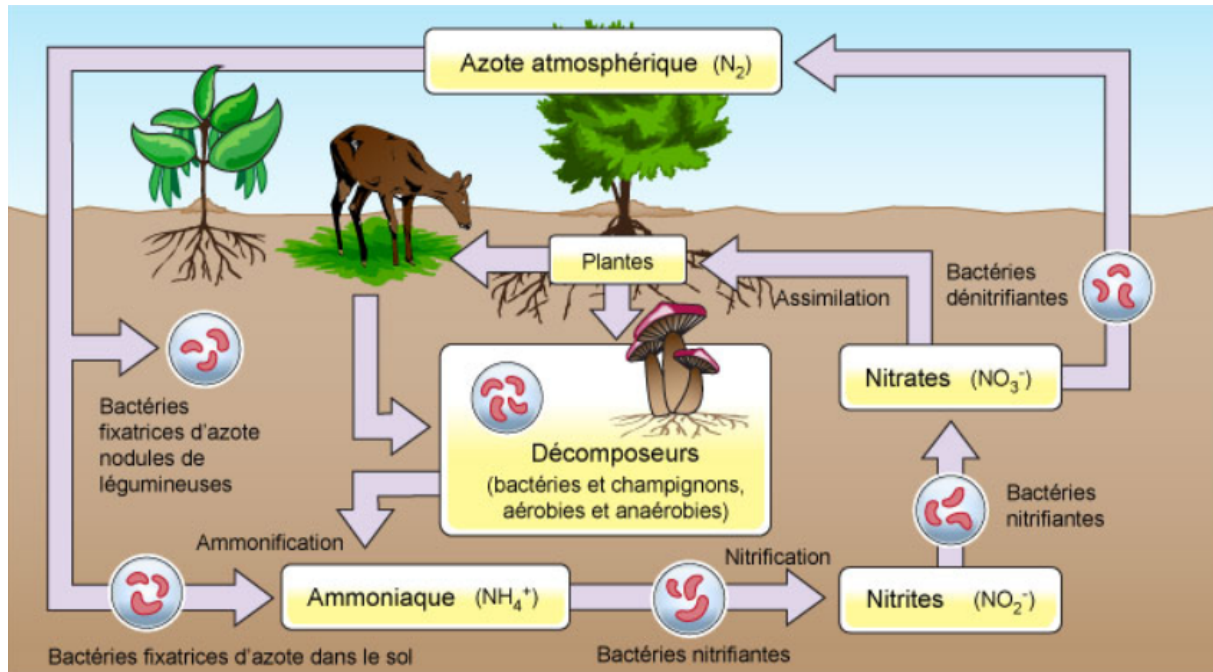


Figure 1 : Schéma des agents participants au cycle de l'azote (Visionlearning, 2009)

Sur ce schéma, nous constatons que le diazote va être fixé soit pas les bactéries symbiotiques*, soit pas les bactéries libres*. Il est ensuite transformé sous une forme d'ammoniac (NH_4^+). En outre, l'ammoniac obtenue participera au cycle des bactéries nitrifiantes qui nous permettrons d'obtenir du NO_2^- et du NO_3^- . C'est donc ces formes d'azote minérales qui pourront être utilisées par les plantes.

Par ailleurs, nous savons que dans un milieu naturel, la fixation biologique représente 60% des entrées du cycle de l'azote. Ce sont les bactéries qui se chargent de cette fixation.¹

Les différentes étapes du cycle de l'azote :

- Ammonification

Cette étape correspond aux différentes molécules d'origine végétale ou animale présente dans le milieu. Les champignons et bactéries vont alors transformer le nitrogène en ammoniac. (Eartheclipse.com)

- Nitrification

La nitrification est le processus par lequel les ions ammonium (NH_4^+) vont subir une transformation en nitrite (NO_2^-) ainsi qu'en nitrate (NO_3^-). (aquaportail)

¹ La fixation d'azote atmosphérique peut atteindre jusqu'à 160 U d'azote capté/ha pour la canne à sucre (Vers de Terre Production, 2018)

- **Assimilation**

L'assimilation réfère le moment où les organismes vont obtenir le nitrogène. Les racines des plantes absorbent les nitrates depuis le sol jusqu'au système des plantes. Les nitrates seront alors utilisés par la synthèse des acides nucléiques, les enzymes, les acides aminés, les protéines ainsi que la chlorophylle.

- **Dénitrification**

Ce processus correspond à l'inverse de ce qu'on vient d'évoquer. Les nitrates sont transformés en gaz pour retourner dans l'atmosphère.

2.3. Les organismes participants au cycle de l'azote

Le cycle de l'azote étant un processus complexe, beaucoup d'organismes entrent en jeu pour le cycle de l'azote. Les bactéries, la décomposition de la matière organique, les vers de terres et les champignons sont autant d'éléments à prendre en compte.

En effet, une partie de l'azote provient de la fixation moléculaire des micro-organismes. Ces micro-organismes restituent l'azote au sol après décomposition de la matière organique par les bactéries et champignons notamment.

Après avoir expliquer l'importance de l'azote et montrer son cycle, nous allons pouvoir parler des bactéries fixatrices. Dans un premier temps, il nous a semblé nécessaire d'évoquer les différents types de bactéries. Ensuite, nous expliquons comment ces bactéries fonctionnent et nous terminerons cette partie par un autre micro-organisme : les champignons.

3. Les bactéries fixatrices d'azote

3.1. Qu'est-ce qu'une bactérie fixatrice d'azote ?

Une bactérie fixatrice d'azote est un microorganisme capable de capter l'azote atmosphérique, le diazote et de le restituer à la plante sous une forme assimilable : l'ammoniaque (Deacon). Ces bactéries mesurent environ 1 micromètre de moyenne, ce qui est environ 600 000 fois plus petit qu'un homme.

Parmi les bactéries fixatrices d'azote, on retrouve :



Figure 2 : Schéma réalisé par Vers De Terre Production illustrant les différentes bactéries

Ce schéma nous explique quelles sont les bactéries présentes pour fixer l'azote. Nous avons d'un côté, celles dites « symbiotiques » qui sont fixées aux nodosités des plantes légumineuses. On laissera de côté ces bactéries pour notre sujet. Et enfin, il y a celles dites « fixatrices libres » qui se situent dans le sol ou dans les racines des plantes. Parmi ces bactéries, on distingue les saprophytes* et les rhizosphériques.*.

Il existe trois conditions à la fixation d'azote par les bactéries :

- Il faut un faible taux d'oxygène car la nitrogénase est inactive. Ainsi, ce sont les bactéries en conditions d'anaérobie qui pourront permettre la fixation d'azote. Elles se situent dans les ports remplis d'eau ou dans les agrégats*. Pour cela, l'oxygène est capté via mécanisme : la respiration et la léghémoglobine qui permet de fixer l'oxygène pour qu'il ne circule par librement.
- La présence de ressource et énergie comme le Carbone est indispensable. Les bactéries doivent en avoir en grande quantité pour que la fixation d'azote soit efficace. Pour cela, elles peuvent s'associer aux bactéries qui décomposent la paille.²
- En présence d'azote minérale, la fixation est inhibée. Pour que la fixation ait lieu, il doit y avoir peu voire pas du tout de fertilisation.

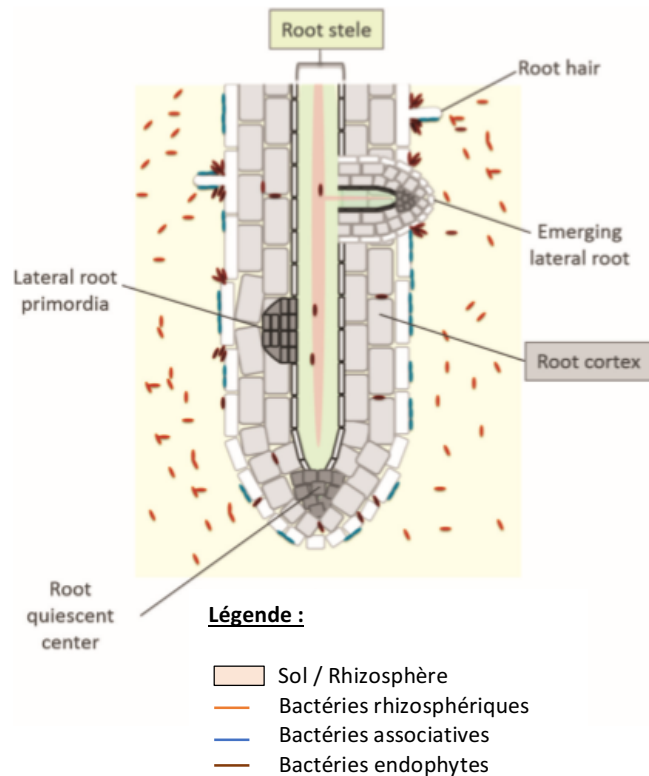
3.2. Quels sont les différents types ?

Il existe quatre types de bactéries différentes. Les bactéries endophytes, qui se situent à l'intérieur des racines des végétaux. Les bactéries diazotrophes et les bactéries endophytes permettent également de fixer l'azote. Et enfin, nous étudierons les bactéries dites « associatives ».

3.2.1. Dans les racines des plantes : les bactéries endophytes

Les bactéries endophytes vivent à l'intérieur des plantes. On peut en retrouver dans tous les organes mais la majorité se situent dans les racines. Elles sont en relation directe avec leurs plantes hôtes. La croissance des bactéries endophytes est limitée par le système de défense des plantes. Ces bactéries incluent la production d'hormones, la stimulation de la croissance racinaire, une meilleure disponibilité minérale (obtenue par médiation du fer d'une substance appelée sidérophore ou par solubilisation microbienne induit du phosphore), une meilleure absorption des nutriments, la fixation d'azote, la protection vis-à-vis des pathogènes et la réduction de stress par la baisse du niveau d'éthylène.

² Jusqu'à 72mg/N/g de paille peut être fixé (Vers de Terre Production, 2018)



3

Figure 3 : Colonisation des racines par les bactéries rhizosphériques, les bactéries associatives et les bactéries endophytes

Ce schéma permet de nous montrer la colonisation des racines par les bactéries. Les bactéries rhizosphériques représentées en orange colonisent la rhizosphère du sol sans envahir les tissus de la plante. En revanche, les bactéries en association (endophytes et diazotrophes) illustrées par un trait bleu, sont en interaction avec la surface de la plante. Enfin, les bactéries dites endophytes, en bordeaux, peuvent se trouver au sein des tissus de la plante, notamment dans l'épiderme.

3.2.2. Les bactéries diazotrophes

Les bactéries diazotrophes sont celles qui représentent le plus grand intérêt. Elles ont la capacité de développer différents types d'associations avec des racines et différents types d'espèces. (Hemerly, 2014)

Ces bactéries vivent dans le sol à l'interface entre le sol et les racines. Cette zone s'appelle la rhizosphère. Les bactéries diazotrophes libres se nourrissent de molécules sécrétées par les racines et en contrepartie, elles fixent le diazote pour le restituer à la plante sous formes d'ammonium.

On peut alors citer 3 exemples de bactéries diazotrophes : Azotobacter, Pseudomonas, Azomonas

³ Traduction en français

Root Stele = stèle racinaire

Root hair = poil racinaire

Emerging lateral root = racine latérale émergente

Root cortex = cortex racinaire

Root quiescent center = Centre racinaire inactif

Lateral root primordia = racine latérale primitive

Ces trois bactéries ont besoin d'une enzyme pour pouvoir fonctionner : la nitrogénase. Elle est indispensable et va permettre de catalyser la réaction de transformation du diazote de l'air en azote assimilable par les plantes.

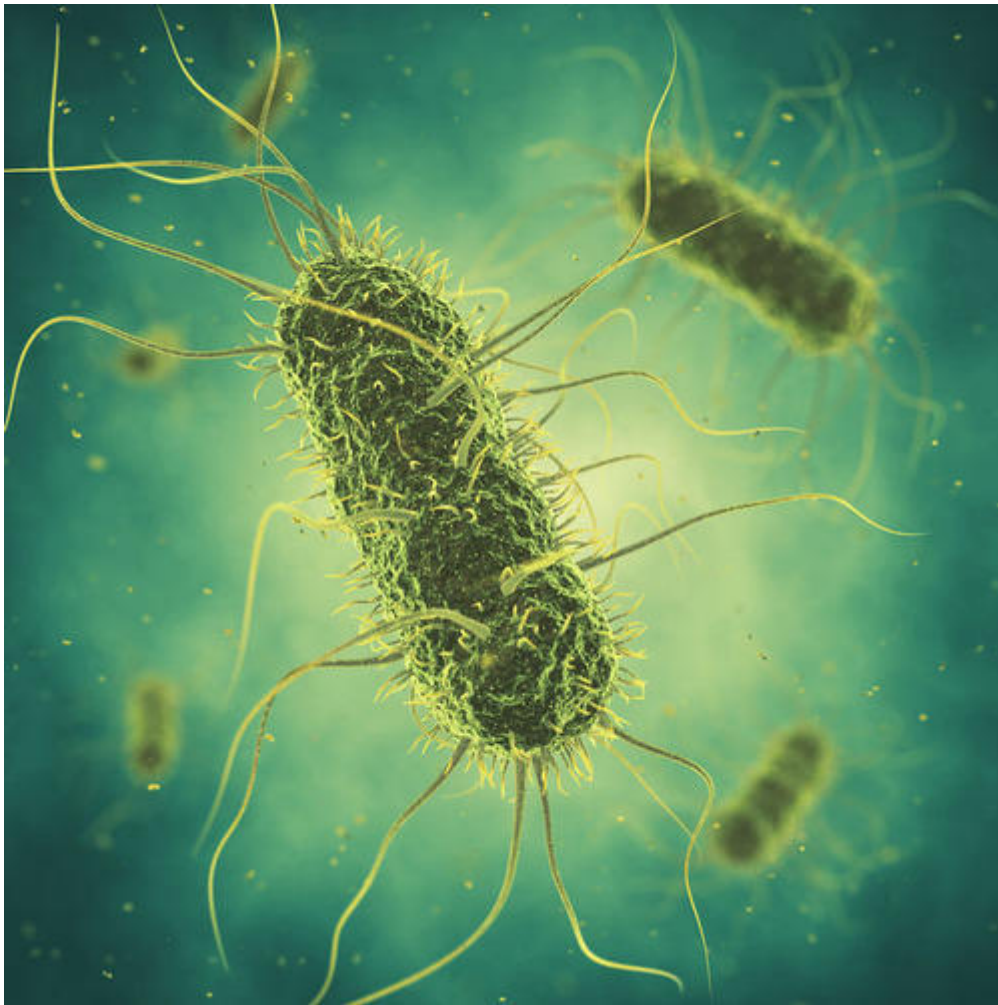


Figure 4 : Illustration représentant une bactérie du genre *Azotobacter*

3.2.3. Les bactéries endophytes

Ces bactéries envahissent les tissus de la plante. Ce sont les racines qui possèdent le plus grand nombre de bactéries endophytes comparé aux tissus aériens. La colonisation de ces bactéries se produit dans les cellules intercellulaires des vaisseaux du xylème. Les bactéries se retrouvent à l'intérieur des espaces vides de la plante et donc ce n'est pas un parasite. Elles ne sont pas considérées comme des parasites car elles ne vont pas dans les cellules de la plante.

L'espace intercellulaire de l'épiderme et la région corticale de la racine sont les sites majeurs de la colonisation de ces bactéries.

La production d'hormones* par les plantes par les bactéries endophytes est considérée comme important, voire même, l'élément majeur pour promouvoir la croissance de l'hôte.

3.2.4. Des bactéries endophytes qui sont également diazotrophes

Après avoir fixé l'azote, les bactéries associatives (c'est-à-dire, les bactéries endophytes qui peuvent également être diazotrophes) produisent des hormones. L'auxine et la gibbérelline sont les principales mais d'autres hormones peuvent également entrer en jeu et seront distribuées pour améliorer l'absorption des nutriments. Les résultats bénéfiques de cette association incluent une augmentation significative de la hauteur de la plante et de la biomasse, la longueur de la racine, la production de matière sèche et le rendement du grain.

Auxine, cytokinine et gibbérelline sont apportés par plusieurs associations de bactéries endophytes et diazotrophes comme *Azospirillum* sp, *Klebsiella* sp, *G. diazotrophicus*, *Azoarcus* sp, *Hebaspirillum* sp.

Il a été observé que le nombre de bactéries associatives isolées des tissus de canne à sucre diminuait dans les plantes qui étaient fertilisées avec une haute dose d'azote comparé avec le nombre de bactéries dans les plantes qui recevaient de petites doses d'azote.

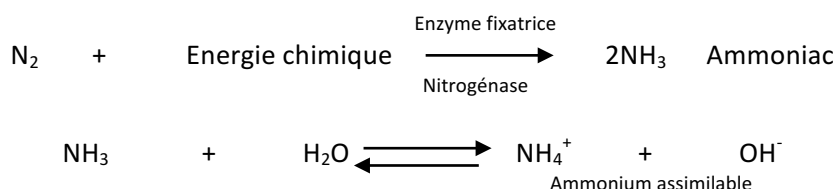
3.3. Comment fonctionne la fixation d'azote ?

3.3.1. L'enzyme nitrogénase

L'enzyme nitrogénase* est extrêmement sensible à l'O₂. La fixation des bactéries a besoin de mécanismes excluant O₂ pour le N₂ (ceci correspond à l'activité de nitrogénase). Beaucoup de bactéries comme *Azotobacter*, *Azomonas* ou *Beijerinckia* excluent l'O₂ à travers une respiration rapide ou la formation de polysaccharides extracellulaires. De plus, beaucoup de bactéries diazotrophes fixeront le N₂ selon des conditions de microaerophilie ou anaérobie. Les conditions anaérobies peuvent être créées par la saturation en eau du sol et des quantités substantielles de fixation d'azote ont été mesurées dans ces conditions. Dans les sols aérés, la formation d'agrégats permet aux conditions anaérobies et microaerophilie d'exister simultanément selon les conditions aérobiques. Par ailleurs, des substrats comme le carbone dissous peuvent être alloués tant au système aérobique qu'à celui anaérobique. Il est possible pour des produits organiques solubles de décomposer selon le modèle aérobique pour approvisionner en carbone la fixation de bactéries anaérobique et microaerophilie sans agrégats. (M.M. Roper, 2018)

3.3.2. L'énergie

La fixation d'azote par les bactéries demande beaucoup d'énergie, qui est une source facilement utilisable. L'énergie chimique est captée dans la cellulose ou la lignine. On peut ainsi retrouver les deux équations suivantes :



Les bactéries vont donc mettre l'azote sous deux formes ammoniacale grâce à l'enzyme nitrogénase. Ainsi, grâce à la récupération du carbone, elles vont pouvoir absorber le diazote. Dans la plante, le NH₄⁺ récupéré de la bactérie, va mettre N d'un côté et H₄⁺ de l'autre. Grâce à cette séparation de molécule, N va être la protéine et H₄⁺ va être mise dans le rhizosphère. Cela va permettre d'acidifier la rhizosphère. Le pH autour de la racine est entre 5.5 et 4.

3.4. Les conditions nécessaires

Les facteurs environnementaux ont un impact significatif sur la composition des bactéries diazotrophes. Ainsi, la protéine nitrogénase est extrêmement sensible à l'oxygène et peut être très rapidement inactive comme nous avons pu le voir précédemment. En outre, il existe aussi les facteurs liés au sol comme le pH. Le potentiel de fixation d'azote par les bactéries libres peut être altérée lorsque le potentiel hydrogène (pH) du sol est différent de 7 – 7.5.

3.5. Exemple du maïs

Afin d'illustrer le rôle des bactéries fixatrices d'azote, nous nous permettrons d'utiliser une étude menée dans le Wisconsin par « Mandaamin Institue » qui montre la relation entre les bactéries et le maïs.

Plusieurs biofertilisants* ont été utilisés pour inoculer le maïs et d'autres céréales avec les bactéries diazotrophes pour améliorer l'efficacité du diazote et la disponibilité des nutriments face au niveau réduit de fertilisation.

Dans beaucoup de cas, il n'y a pas eu d'effets apparents de l'inoculation sur la balance du diazote ou la productivité du plant de maïs. En revanche, sur beaucoup d'autres cas, il y a eu un effet important qui inclut à la fois la stimulation de la croissance et la fixation de diazote.

Le maïs cultivé de nos jours diffère largement dans leur capacité à établir une relation bénéfique avec les bactéries diazotrophes. Cependant, les anciennes variétés de maïs ont montré qu'ils peuvent accueillir diverses communautés endophytes et rhizosphériques riches en diazotrophes et en antagonistes d'espèces fusarium.

L'établissement d'une relation entre la plante et les bactéries diazotrophes dépend probablement des niveaux bas d'éthylène contenu dans les tissus de la plante. (Walter Goldstein, 2016)

3.6. D'autres microorganismes : Les champignons

En plus des bactéries fixatrices d'azote libres, nous retrouvons des champignons. Il existe alors différents types de champignons : Les champignons symbiotiques et les champignons saprophytes.

Les premiers sont dits symbiotiques car ils sont en relation directe avec la plante. Ils lui permettent d'explorer un volume du sol plus vaste et d'accéder à des éléments nutritifs peu mobiles comme le phosphore. Ils appartiennent au monde des microorganismes et constituent un microbiote. Ainsi, les champignons sont la partie visible du microbiote* chez les plantes et permettent d'avoir une relation symbiotique entre les deux parties. Ils peuvent être associés aux racines, c'est ce qu'on appelle les mycorhizes. De la sorte, cette relation symbiotique permet de nourrir la plante en eau, phosphore et azote. Ces champignons réalisent une symbiose avec les racines.

Les seconds sont dits saprophytes car ils dégradent la Matière Organique du sol, utile à la fixation d'azote. Comme ils décomposent la M.O en petites molécules, celles-ci pourraient être disponibles pour la plante.

Nous savons ici que les champignons jouent un rôle important dans le fonctionnement de la fixation d'azote par les bactéries libres mais malheureusement nous ne sommes pas capables d'obtenir plus de documents. L'absence de bibliographie nous empêche de réaliser une partie spécifique aux champignons et nous ne pourrions pas quantifier le phénomène.

4. L'application dans l'agriculture

4.1. Les conditions sont-elles réunies dans les champs ?

Un sol agricole conventionnel est cultivé avec des techniques utilisant beaucoup le travail du sol, les apports d'engrais, les produits phytosanitaires, Par ailleurs, très peu d'agriculteurs utilisent des couverts végétaux. Nous savons que pour avoir des bactéries, un sol doit être de qualité en ayant de la matière organique, des micro-organismes et une vie du sol très importante.

Ainsi, le monde agricole a appris aux végétaux à utiliser seulement des engrais minéraux.

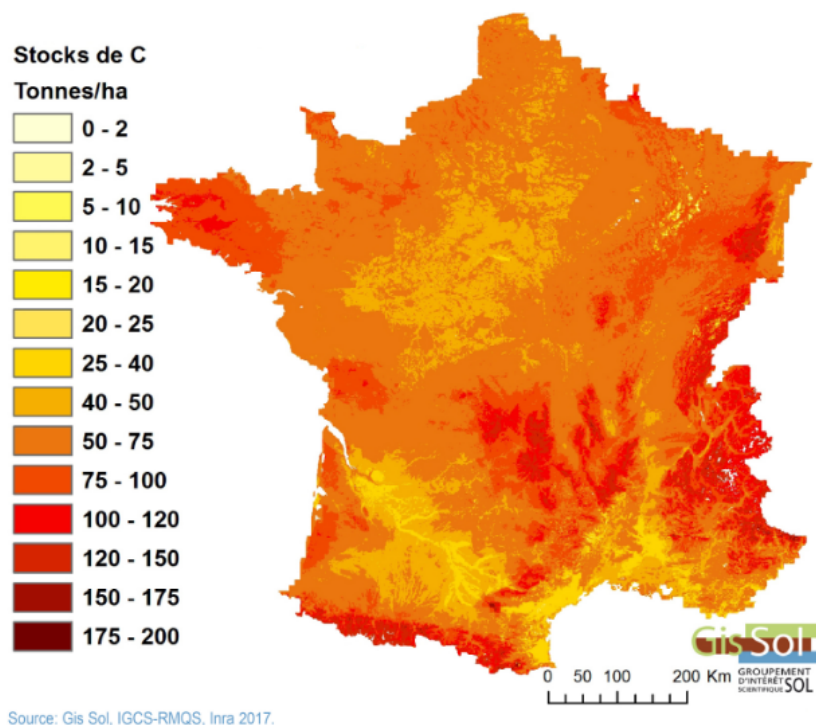


Figure 5 : Cartographie des stocks de carbone organique de 0 à 30 cm de profondeur en France métropolitaine

Cette carte permet de nous montrer l'ampleur des dégâts sur les sols agricoles français. En effet, nous observons que les stocks les plus faibles en carbone se situent sur des terres cultivées. La Beauce et le nord, régions les plus prisées pour les cultures de blé, orge, colza et pomme de terre ont des sols contenant très peu de carbone (de 10 à 75 T/ha). Ainsi, même sur des sols de qualité, c'est-à-dire, des sols limoneux dans le bassin parisien, on observe des résultats moyens (40-50T/ha).

Pour que les bactéries fixatrices d'azote puissent jouer leur rôle correctement, nous avons donc besoin d'un sol vivant. Mais alors, en quoi consiste un sol vivant ?

Les vers de terre sont cruciaux dans la qualité du sol puisqu'ils permettent de remplacer la charrue en creusant des galeries. Ces vers permettent ainsi de structurer correctement les sols et de l'aérer.

Les bactéries, permettent d'assembler les particules du sol et les champignons de stabiliser les agrégats. Afin de fonctionner correctement ce sol aura besoin de matière organique pour remplir correctement ces fonctions de fertilité. (Vers de Terre Production, 2018)

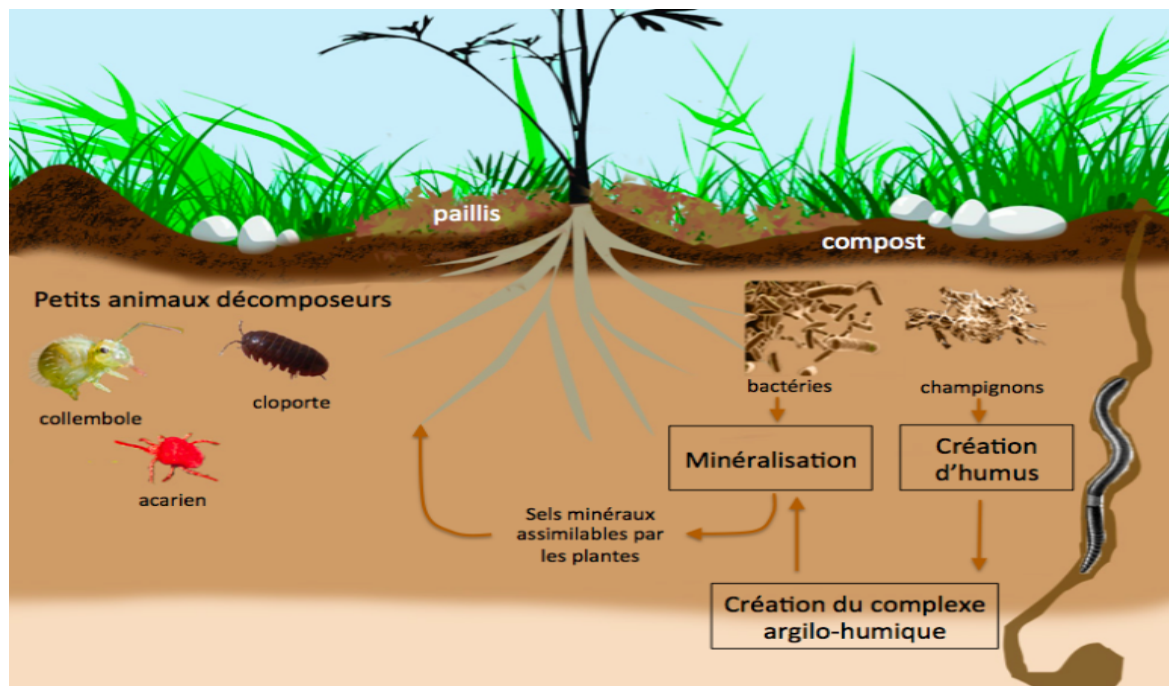


Figure 6 : Illustration du fonctionnement d'un sol vivant (Mon Jardin en Permaculture)

Ce schéma nous montre le fonctionnement d'un sol et le rôle des différents éléments. La faune va donc travailler le sol afin de décomposer la matière organique. Cette matière organique est ensuite transformée en humus par des bactéries ou des champignons. C'est finalement cet humus qui va libérer les éléments indispensables pour la plante comme l'azote puis le phosphore ou le potassium.

Grâce à ces différentes conditions, les bactéries pourront se développer correctement et auront sans doute, une durée de vie prolongée, à condition que le sol soit couvert en continue.

4.2. Le cas du compost

Dans cette partie, nous évoquerons l'azote dans le processus de compostage. Cependant, avec le manque de bibliographies et de résultats d'expérimentation, nous ne quantifierons pas ce phénomène. Des pertes d'azote peuvent avoir lieu durant les différentes étapes du compostage et peuvent prendre deux directions différentes.

Pour cette partie, nous prendrons l'exemple du fumier de bovin qui a été étudié par une étudiante chez l'INRS – EAU (BOCHOVE, 1993)

Dans un premier temps, nous savons que la perte d'azote peut se faire par volatilisation de l'ammoniac et de composés volatiles d'origine organiques (exemple : amines volatiles*). Cette volatilisation a lieu lors de la phase la plus importante du compostage, c'est-à-dire, lorsque les micro-organismes se multiplient de manière importante et dégradent la matière organique disponible. C'est durant cette première phase que la perte de l'ammoniac est la plus importante selon différents auteurs (J.W., 1975) et (J.M., 1978). Grâce aux différentes publications, nous savons que c'est durant la phase de refroidissement du processus de compostage qu'il y a une fixation relativement importante de l'azote pour le cas du fumier de bovin.

D'autre part, la production d'ammoniac est déterminée par le rapport entre la minéralisation de l'azote organique par les micro-organismes et l'immobilisation de l'ammonium sous forme d'azote microbien.

Ce rapport dépend des quantités de carbone et d'azote biodisponibles, exprimé le plus souvent via le rapport C/N.

Le rapport C/N est un indicateur qui permet de représenter une Matière Organique. C'est le ratio entre la quantité de Carbone et la quantité d'azote présente dans le milieu (Vers de Terre Production, 2018). La proportion de NH_4^+ immobilisée par rapport au NH_4^- accumulé dans le compost dépend des besoins en azote des micro-organismes. Ces besoins en azote varient selon le type de micro-organismes. Par exemple, les champignons ont un rapport compris entre 3 et 5 (Paul, 1989). Les besoins en azote des bactéries sont donc supérieurs à ceux des champignons. Il faut également noter que le NH_4^+ est préféré au NO_3^- par les micro-organismes pour leur croissance.

4.3. L'utilisation du BRF

Afin d'aborder la thématique du BRF, il est nécessaire d'en définir ses caractéristiques. Tout d'abord, Bois Raméal Fragmenté est « le résultat du broyage frais (ou copeaux) de rameaux et petites branches vertes d'un diamètre inférieur à 7 cm, avec ou sans feuilles. Les branches sont issues d'essences d'arbres feuillus (Angiospermes dicots). Il est toutefois possible d'utiliser un peu de conifères (Gymnospermes) en mélange, à hauteur de 20%. Ce broyat est destiné à être appliqué au sol. » selon Eléa Asselineau et Gilles Domenech. (Mathias)



Figure 7 : Illustration de l'aspect du Bois Raméal Fragmenté

Le BRF permet de recréer de manière « artificiel » l'humus forestier. Il couvre le sol afin d'empêcher que les rayons du soleil puissent tuer la biomasse du sol. Par ailleurs le BRF permet de garder l'humidité dans les sols. Cette matière étant dégradable, il permet d'obtenir de la matière organique qui servira de nourriture pour les micro-organismes du sol.

4.4. Quantification de l'azote

Les données sur la quantification de l'azote dans les sols et sur la quantité d'azote fixée par les bactéries sont difficiles à trouver dans la bibliographie aujourd'hui. En revanche quelques données ont pu être récoltées sur des expériences avec travail du sol et apports d'engrais minéraux. En revanche nous avons pu découvrir que ces techniques sont défavorables à la multiplication des bactéries dans les sols agricoles. Les estimations qui ont pu être réalisées sur des sols cultivés et non fertilisés à l'azote minérale représentent 5 à 50 kg/ha/an. Or ces données ont été publiées il y a plusieurs années.

Aujourd'hui les techniques culturales ont évolué et la restitution au sol des pailles est de plus en plus importante.⁴ (Vers de Terre Production, 2018)

D'autres part, nous savons que dans des sols où la présence de carbone est élevée, alors la fixation d'azote sera plus importante.

4.5. Le cas du FREE N 100

4.5.1. Présentation générale

L'entreprise Gaïago a développé et mis en circulation en 2016, le premier produit naturel contenant des bactéries fixatrices d'azote libres. Nommé « activateur de sol » par l'ANSES, il est destiné à fixer l'azote de l'air pour le rendre utilisable par la plante. Dans ce cas présent, les bactéries utilisées sont du genre *Azotobacter SP*, ce sont des bactéries en aérobies. L'entreprise avance des résultats très encourageants : ½ l de FREE N 100 par hectare permettrait de remplacer 100 à 150 kg d'engrais de synthèse. (Gaïago, 2016)

Etudier les bactéries fixatrices dites « libres » est un enjeu donc primordial pour l'agriculture de demain et va permettre sans doute, de limiter ou d'éviter le recours aux produits de synthèse.

Ces produits doivent normalement être utilisés dans le cadre d'une transition pour passer d'un système conventionnel à un système de semis direct. Ce produit serait intéressant afin de retrouver une population de bactéries qui devrait être présentes à l'état naturel dans les sols agricoles.

4.5.2. Essai du FREE N 100 sur blé tendre

	Témoin 0 N	FREE N 100 + 0 N	Témoin 218 U	FREE N 100 + 166 U	FREE N 100 + 218 U
Rendement (qtx/ha)	34.9	43.1	69.4	69.7	74.2
PS	71.8	72.4	75.8	75.4	76.2
Humidité	12.6	12.8	15.4	15.6	15.6

Figure 8 : Tableau des résultats d'essais sur blé tendre, réalisé par Gaïago

En étudiant les résultats obtenus par l'entreprise, on constat qu'en utilisant simplement le produit, on a déjà une augmentation de rendement. Ainsi, en comparant au témoin à 0 apport d'azote, on obtient 34.9 quintaux/hectare alors qu'avec la solution contenant les bactéries, on obtient un rendement de 43.1 quintaux/hectare, soit un gain de rendement de 23%. Par ailleurs, on peut constater en comparer le témoin + 218 U d'azote et le FREE N 100 + 166 U d'azote, on obtient encore une fois un meilleur résultat avec un gain de 7%.

Cette étude a été réalisée sur un sol agricole lambda. On peut alors imaginer que sur un sol vivant, contenant toutes les conditions nécessaires au développement des micro-organismes et surtout, des bactéries, une augmentation nette du rendement sans aucun apport engrais de synthèse.

⁴ Chez certaines espèces cultivées (riz, canne à sucre, ...), la fixation biologique fournirait jusqu'à 60% de l'azote contenu dans la plante.

4.5.3. Témoignage d'un utilisateur

Philippe Lattelais est agriculteur en Seine maritime et pratique l'ultra bas volume depuis 7 ans.

Les raisons qui ont poussées Mr Lattelais à être en bas volume :

Les produits phytosanitaires réduisent fortement les défenses immunitaires des plantes. La qualité des sols se dégradent au fur et à mesure des années.

Techniques culturales :

- Travail du sol
- Aucun labour cette année
- Labour en conditions humide

Votre utilisation du FREE N 100 :

- 45€/ha pour une dose de 0.5l/ha => en condition humide car le produit est sensible aux ultras violets
- 140 U/N rajouté avec un rendement moyen de 100 Q/ha.

Cette année, l'agriculteur a réalisé un essai au sein d'une parcelle qui a été divisée en deux. La moitié de la parcelle a été pulvérisée à l'aide du FREE N 100, aucune pression rouille n'a été observée. L'autre moitié n'a pas été pulvérisée avec ce produit, une pression rouille importante a pu être constatée.

Selon Mr Lattelais, dans des sols avec des potentiels aussi élevés qu'en Seine Maritime, il n'est pas envisagé de se passer complètement d'un apport d'engrais minéraux. En revanche, sur des sols de plus mauvaises qualités où les potentiels de rendement sont de l'ordre de 60 à 70 quintaux, il est tout à fait possible d'arrêter la fertilisation azotée et d'adopter uniquement un produit à base de bactéries fixatrices d'azote libres.

Par ailleurs, l'agriculteur a constaté que dès qu'un sol se retrouve nue, les bactéries fixatrices meurent. Cependant, un sol utilisant des couverts végétaux permet de maintenir une population de bactéries importante. Ainsi, selon son témoignage, il n'a jamais eu des couverts de moutarde aussi grand, qu'en utilisant le produit à base de bactéries.

Conclusion

Cette étude nous a permis d'identifier et de définir le rôle des bactéries fixatrices d'azote libres du sol. Nous savions que des micro-organismes participaient à la fixation de l'azote mais sans en connaître davantage. Nos recherches bibliographiques et les différentes personnes que nous avons pu contacter nous ont amené à comprendre l'enjeu de ces bactéries. Ainsi, nous savons que dans des sols conventionnels, l'absence de vie du sol et de micro-organismes empêche les bactéries de vivre. Pour qu'elles soient présentes, ces bactéries ont besoin de ressources carbonées à partir de matière en décomposition. Les sols dits « vivants » avec des vers de terre, des bactéries, des champignons, sont des lieux qui pourront accueillir les bactéries fixatrices. Cependant, un sol peut être de qualité mais s'il se retrouve nu pendant une période longue, une interculture par exemple, les bactéries meurent. C'est ce que nous a confirmé un agriculteur de Seine maritime utilisant un produit à base de bactéries fixatrices d'azote. Ainsi, il est nécessaire de couvrir ces sols avec par exemple, des couverts végétaux (moutarde, trèfle, ...)

Plusieurs types de bactéries fixatrices existent. Tout d'abord, il y a celles qui fonctionnent dans les racines des plantes, appelées endophytes ; celles qui fonctionnent dans le sol, les diazotrophes. Enfin, une troisième catégorie de bactéries se rajoute, ce sont les bactéries associatives.

Notre objectif dans cette étude a été de montrer quelles sont les bactéries qui peuvent être présentes, quels sont leurs rôles et comment elles fonctionnent. Cependant, par manque de recherche scientifique et de bibliographie il a été très difficile d'obtenir des résultats quantitatifs.

Bibliographie

- American - Eurasian Network for Scientific information. (2016, Septembre). Role of Nitrogen for Plant Growth and Development : A Review . *Advances in Environmental Biology*, pp. 209-2018.
- aquaportail. (n.d.). *Définition du cycle de l'azote* .
- aquaportail. (n.d.). *Lexique mots en N / nitrogénase* . Retrieved from www.aquaportail.com .
- biofertilisant.fr. (n.d.). *Qu'est-ce qu'un biofertilisant ?* . Retrieved from www.biofertilisants.fr.
- BOCHOVE, E. V. (1993). *L'étude du cycle de l'azote dans le processus de compostage : la cas du fumier de bovin*. Université du Québec : Institut National de la Recherche Scientifique .
- Deacon, J. (n.d.). *The Microbial World : The Nitrogen cycle and Nitrogen Fixation*.
<http://archive.bio.ed.ac.uk>.
- Earthclipse.com. (n.d.). *The nitrogen cycle*.
- futura planète . (n.d.). *Planète / Définition* . Retrieved from www.futura-sciences.com.
- Gaïago. (2016). Une première en France pour FREE N 100, l'activateur de sol du breton Gaïago.
- Hemerly, A. (2014). Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *Journal of Experimental Botany*, 12.
- J.M., V. H. (1978). *European composting methods : treatment and use of farm yard manure and slurry*. Compost Science .
- J.W., W. G. (1975). *Conservation of nitrogen in dairy manure during composting*. American Society of Agricultural Engineers.
- M.M. Roper, V. G. (2018). *Enhancing Non-symbiotique N2 Fixation in Agriculture* .
- Mathias, X. (n.d.). *Le BRF : Une autre façon d'appréhender son sol*. Ferme de la Sainte Marthe.
- Mon Jardin en Permaculture . (n.d.). *Un sol vivant : Comment ça fonctionne ?* Retrieved from www.monjardinpermaculture.fr.
- Morot-Gaudry, J.-F. (1997). *Assimilation de l'azote chez les plantes : aspects physiologique, biochimique et moléculaire* .
- Paul, E. e. (1989). Soil microbiology and biochemistry. *Academic press, INC*.
- Vers de Terre Production. (2018). *Vie du sol et fertilité*.
- Visionlearning. (2009). United States Environmental Protection Agency.
- Walter Goldstein, P. D. (2016). *Partnerships between Maize and Bacteria for Nitrogen Efficiency and Nitrogen Fixation*. Elkhorn, Wisconsin : Mandaamin Institute .

Glossaire

Agrégats : Ce sont des particules minérales du sol assemblées entre elles (sables et limons) ainsi que les ciments colloïdaux (argiles, matières humiques, hydroxydes de fer et d'aluminium) qui caractérisent la structure du sol à l'échelle macroscopique.

Amines volatiles :

Bactéries libres : Les bactéries « libres » sont celles qui se situent dans le sol ou dans les racines des plantes et qui permettent la fixation de l'azote par les plantes.

Bactéries symbiotiques : Les bactéries symbiotiques sont celles qui réagissent en symbiose avec les nodosités des plantes légumineuses.

Biofertilisants : « Un biofertilisant est un produit contenant des micro-organismes vivants qui contribuent à améliorer la croissance des plantes. Il optimise les fonctions du sol et sa fertilité grâce à l'action des micro-organismes qu'il contient. » (biofertilisant.fr)

Hormones : Une hormone végétale est une substance biologique active qui régule la croissance et le développement des plantes. Elles peuvent agir en tant que vecteur d'information concernant les stress environnementaux (stress hydrique par exemple). (futura planète)

Le nitrogène : Le nitrogène est communément appelé « azote ». Cette molécule de symbole (N) est essentiellement présente dans l'air et est essentielle pour la plante.

Les sols vivants : Les sols vivants sont des surfaces où la qualité du sol et de la vie microbienne est importante. Ici, on favorise l'abondance de micro-organismes comme les bactéries, les champignons et les vers de terre. L'objectif est d'avoir un sol où la vie y est importante.

Les systèmes agricole conventionnels : Ce sont toutes les techniques agricoles réalisées depuis les années 80 qui consistent à utiliser des produits phytosanitaires et des techniques de travail du sol comme le labour ou le déchaumage. Ils sont dits « conventionnel » car ces techniques sont réalisées par la majorité des agriculteurs.

Microbiote : Un microbiote correspond à l'ensemble des micro-organismes d'un milieu de vie bien défini, ici, il représente la population d'un sol contenu dans le sol.

Nitrogénase : La nitrogénase est une enzyme sensible à l'oxygène, catalysant la réduction de l'azote gazeux (N_2) en ion ammonium (NH_4^+). Cette enzyme est responsable de la fixation biologique de l'azote et est présente dans les cellules des organismes. (aquaportail)

Rhizosphérique : Les bactéries rhizosphériques sont celles qui vivent dans la rhizosphère.

Saprophyte : Les champignons saprophytes sont ceux qui se nourrissent de matière organique morte.

Ubiquistes : Signifie que les bactéries sont très répandues dans le sol.

Annexes

Annexe 1 : Première planification sur la réalisation de mon projet tuteuré (janvier 2018)

[illegible]

Annexe 2 : Deuxième planification après modification de mon plan d'étude le 04 mai 2018

Planification du projet tuteuré															
ACTIVITES	Début du plan	Durée du plan	Durée réelle	Semaines											
				19	20	21	22	23	24	25	26				
Introduction	3	23	20												
Méthodologie	20	2	2												
L'importance de l'azote															
A quoi sert l'azote pour les plantes	19	2	2												
Le cycle de l'azote	19	4	4												
Les organismes participants au cycle de l'azote	19	4	4												
Les bactéries fixatrices d'azote															
Qu'est-ce qu'une bactérie fixatrice d'azote ?			20												
Quels sont les différents types ?			5												
Comment fonctionne la fixation d'azote ?			10												
Les conditions nécessaires			4												
Exemple du Maïs			1												
D'autres micro-organismes			3												
L'application à l'agriculture															
Les conditions sont-elles réunies au champs ?			3												
Le cas du compost			4												
L'utilisation du BRF	21	2	2												
Quantification de l'azote			4												
Le cas du FREE N 100	20	3	3												
Conclusion															
Glossaire															
												LEGENDES			
												En cours de réalisation			
													Réaliser		
													A réaliser		
													Rédaction		
													Préparation orale		
													Orale		

Annexe 3 : Tableau de bord

[illegible]

13/03/2018	Chez moi	Avancement des recherches	Clément	4h		
15/03/2018	Chez moi	Discussion par téléphone Commanditaire	Clément	1h		
22/03/2018	La Mouillère	Avancement + rédaction	Clément	3h		
05/04/2018	Chez moi	Discussion par téléphone Commanditaire	Clément	1h	Avancer certains points du rapport. Prévoir des relectures pour les fautes d'orthographe	
10/04/2018	Chez moi					
12/04/2018	Chez moi	Discussion par téléphone Commanditaire	Clément	1h30		
14/04/2018	Chez moi		Clément			
19/04/2018	Chez moi	Discussion par téléphone Commanditaire	Clément	1h		
25/04/2018	Chez moi		Clément			
26/04/2018	Chez moi				Modification du plan pour correspondre aux informations trouvées et aux informations manquantes	
04/05/2018	Chez moi	Discussion par téléphone Commanditaire	Clément	1h		Besoin de réaliser une pause dans le rapport car manque d'efficacité,
15/05/2018	Université - CoST	Avancement de la rédaction	Clément	4h		
17/05/2018	Université - CoST	Discussion par téléphone Commanditaire	Clément	1h30		
22/05/2018	La Mouillère	Avancement de la rédaction	Clément			
23/05/2018	La Mouillère	Entretien téléphonique Philippe Lattelais	Clément	30 minutes	Transcription de l'entretien pour le rapport	Témoignage d'un agriculteur sur un produit à base de bactéries fixatrices d'azote
23/05/2018	La Mouillère	Transcription de l'entretien téléphonique	Clément	1h	Modifier et améliorer la transcription	
24/05/2018	La Mouillère	Rencontre avec ma tutrice + discussion avec n	Clément	1h	Tour d'horizon sur l'avancement du projet	Quelques points à détailler.
26/05/2018						
27/05/2018						
28/05/2018						
29/05/2018	Chez moi	Avancement + rédaction	Clément	3h		Oublie de la part du commanditaire de l'entretien téléphonique
31/05/2018	Chez moi	Discussion par téléphone Commanditaire	Clément	00:00:00		
02/06/2018	Chez moi	Avancement de la rédaction	Clément	3h		
07/06/2018	Chez moi	Discussion par téléphone Commanditaire	Clément	1h	Relecture complète du rapport + réalisation de transitions + revoir certaines formulations	
09/06/2018	Chez moi					
11/06/2018	Chez moi	Avancement de la rédaction	Clément	4h	Réalisation des annexes + relecture du rapport	
12/06/2018	Chez moi	Avancement de la rédaction	Clément	3h	Relecture + reformulation	
12/06/2018	Chez moi	Avancement de la rédaction	Clément	3h	Echange par mail avec commanditaire + relecture	
14/06/2018	Chez moi		Clément			
15/06/2018	Chez moi	Discussion par téléphone Commanditaire	Clément	1h		
15/06/2018	Chez moi	RENDU DU RAPPORT	Clément		RENDU DU RAPPORT	RENDU DU RAPPORT

Pause dans la rédaction du rapport afin de voir plus claire sur les points à améliorer. Cette pause est nécessaire également pour la qualité de la relecture et la modification de certains points