

SULFATO-RÉDUCTION AU NIVEAU DE LA RHIZOSPHERE

INFLUENCE DE LITIÈRES SUR LA MICROFLORE DU SOL

G. BOQUEL

Microbiologie du Sol

ORSTOM - Bondy

1979

24 JUL 1980  
O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° 010.0845

## SULFATO-REDUCTION AU NIVEAU DE LA RHIZOSPHERE

..==..==..==..==..==..==..

Reproduction au laboratoire du phénomène de sulfato-réduction observé sur des racines de Luzerne ( gaine noire de sulfure ) cultivée en sol salin de Tunisie engorgé : Station de NAKTA.

### I- Dispositif expérimental

Plante utilisée : pour l'étude expérimentale, emploi du maïs ( variété INRA 420 )

#### Stérilisation et germination des graines

Immersion pendant 20 minutes dans une solution à 3% d'eau oxygénée à 110 volumes additionnée d'une goutte de Teepol.

Les graines sans rinçage sont mises à germer en boîte de Pétri de 10 cm de diamètre contenant de l'eau gélosée stérile à 2%, à la température du laboratoire.

Au bout de 3 à 4 jours, les jeunes plantules de maïs ( mesurant de 1 à 2 cm de long ) sont prêtes pour la culture en sol. Eliminer les plantules contaminées.

#### Sols utilisés :

- Sol salin : sol de NAKTA; pH 7,8
- Sol témoin, non salin : sol de BONDY; pH 7,5
- Modèle de sol {
  - Kaolin 10%
  - Ca CO<sub>3</sub> 5%
  - Sable 85%

/...

### Culture dans le sol

Emploi de tube de verre de 22 x 250 mm ouverts aux deux extrémités.

Une moitié des tubes est fermée à une extrémité par des bouchons en caoutchouc plein (engorgement).

L'autre moitié est fermée par des bouchons en caoutchouc à un trou (sans engorgement).

On remplit les tubes avec :

- de la laine de verre sur une épaisseur de 1 cm
- le sol sur une hauteur de 10 cm environ. (Mettre le même poids de sol dans tous les tubes).

Ensuite, le sol doit être amené à humidité équivalente avec de l'eau distillée ou une solution de sulfate de Na à 5% suivant les lots :

- Sol de NAKTA : Eau distillée
- Sol de BONDY : Eau distillée  
Solution de sulfate
- Modèle de sol: Eau distillée  
Solution de sulfate

Les plantules sont repiquées dans la moitié des différents lots : ( sol rhizosphérique ) L'autre moitié des différents lots ne recevant pas de plantules servira de témoin ( sol non rhizosphérique ).

On entoure la base de chaque tube d'un manchon et on laisse les plantes se développer à la lumière naturelle et à la température ambiante jusqu'à ce qu'elles atteignent environ 10 cm de hauteur.

/...

A ce stade on procède aux 2 traitements suivants :

- Absence d'engorgement dans les tubes fermés avec un bouchon à un trou.
- Engorgement dans les tubes fermés avec un bouchon plein.

Ces 2 traitements sont effectués avec la solution minérale nutritive de BÖRNER et RODEMACHER (1) dont la composition est la suivante :

Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .....	0,5	g
K NO <sub>3</sub> .....	0,2	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2	g
Mg SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O .....	0,25	g
Fe SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O .....	0,073	g
Mn Cl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O .....	0,005	g
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub> .....	0,002	g
Solution d'oligoéléments (2)	1	ml
Eau distillée Q.S.P.....	1000	ml

pH 7

Ensemencement :

Le sol modèle engorgé (témoin et salé) est partagé en 2 groupes : /...

---

BÖRNER,  
(1) RODEMACHER (M.A.), CHALVIGNAC., 1958, Ann.Inst.Pasteur, 25, 474-479

(2) POCHON (J.), TARDIEUX (F.), 1962, Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Ed. de la Tourelle PARIS.

- un groupe non ensemencé qui servira de témoin
- un groupe ensemencé avec une suspension-dilution  $10^{-1}$  du sol de NAKTA. ( 5 ml par tube ) riche en germes sulfato-réducteurs.

## II - Analyses

Lorsque la sulfato-réduction apparait au niveau des racines (10 à 15 jours après les traitements et l'ensemencement) on procède à certaines analyses du sol de la rhizosphère (prélèvement du sol qui se trouve dans un rayon de 2 à 3 mm autour des racines) et du sol non rhizosphérique.

### Analyse microbiologique

#### Détermination de la densité des sulfato-réducteurs

Mise en évidence de la formation de sulfure dans un milieu de culture contenant des sulfates et ensemencé avec des dilutions de terre.

Milieu de culture de STARKEY-PICHINOTY (3)

Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	4 g
Mg SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O .....	2 g
NH <sub>4</sub> Cl .....	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,5g
Fe et Ca .....	traces
Lactate de Na à 60% .....	10 ml
Extrait de Levure DIFCO .....	1 g
H <sub>2</sub> O distillée ...Q.S.P.....	1000 ml

pH 7,2 - 7,4

/...

---

(3) STARKEY-PICHINOTY (F.), 1966. Information Exchange group n°1

Répartir 5 ml de milieu par tube de 12 x 120 mm, boucher au coton et stériliser 20 minutes à 120°.

L'indicateur de formation d'hydrogène sulfuré est un clou, introduit après stérilisation à l'alcool à 90° dans chaque tube: formation de sulfure de fer noir

Ensemencement : 1 ml de dilution de sol de  $10^{-2}$  à  $10^{-6}$  et 3 tubes par dilution.

Incubation : 14 jours à 28°

Pour chaque dilution, compter les tubes où il y a formation de sulfure et calculer le nombre de germes par gramme de sol.

Détermination de la densité des Azotobacter

Ensemencement avec des dilutions de sol d'un milieu gélosé en boîtes de Pétri et comptage des colonies.

Milieu de culture :

Solution saline de Winogradsky.....	50 ml
Phosphate monopotassique .....	0,75 g
Soude N/10 .....	33 ml
Mannitol .....	10 g
Extrait de terre (6) .....	10 ml
Solution d'oligoéléments .....	1 ml
Gélose .....	20 g
Eau distillée ....Q.S.P.....	1000 ml

Répartir le milieu dans des Erlenmeyers de 150 ml: 60 ml par fiole, stériliser 20 minutes à 120°

/...

---

(6) POCHON (J.) TARDIEUX (F.) 1962, Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Ed. de la Tourelle PARIS

Ensemencement :

Refroidir les Erlenmeyers à 47° et dans 60 ml de milieu maintenu liquide à cette température incorporer 3 ml de dilutions de sol de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup>. Homogénéiser et couler 3 fois 20 ml du milieuensemencé dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre. Incubation à 28° et lecture des boîtes au bout de 5 à 7 jours.

Analyse chimique.

Evaluation qualitative des sulfures dans le sol.

D'après la technique de NECKERS (J.) WALKER (C.), 1952  
Field test for active sulfides in soil, Soil Sci., 74, 467-470.

Dosage chimique des sulfures dans le sol.

D'après la technique de CHAUDHRY (I.) CORNFIELD (A.), 1966  
Détermination of sulphide in water-logged soils, Plant and Soil, 25, 474-478

---

DOMMERMUES (Y.), COMBREMONT (R.) BECK (G.) OLLAT (C.), 1968,  
La sulfato-réduction rhizosphérique dans les sols salins.  
Conférence de Microbiologie générale et appliquée. BUCAREST

DOMMERMUES (Y.) COMBREMONT (R.) BECK (G.) OLLAT (C.), 1969,  
Note préliminaire concernant la sulfato-réduction rhizosphérique dans un sol salin tunisien. Rev.Ecol.Biol.Sol.

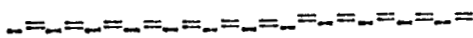
DOMMERMUES (Y.) JACQ (V.) BECK (G.), 1969.

Influence de l'engorgement sur la sulfato-réduction rhizosphérique dans un sol salin. C.R. hebd. seanc. Acad.Sci. PARIS  
( sous presse )

SOLS	1ère phase		2ème phase	
	Culture du maïs en sol amené à humidité équivalente avec:		Traitements	Ensemencement
NAKTA	H <sub>2</sub> O		Sans engorgement	-
			Avec engorgement	-
BONDY	Témoin	H <sub>2</sub> O	Sans engorgement	-
			Avec engorgement	-
BONDY	Salé	SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> à 5%	Sans engorgement	-
			Avec engorgement	-
Modèle	Témoin	H <sub>2</sub> O	Avec engorgement	dilution du sol de NAKTA
	Salé	SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> à 5%	Avec engorgement	dilution du sol de NAKTA



INFLUENCE DE LITIÈRES SUR LA MICROFLORE DU SOL.



Comparaison de la toxicité de trois extraits de litières (à deux pH différents) incorporés à un milieu de culture gélosé ensemencé avec des dilutions de terre.

Litières étudiées :

- Teck : Tectona grandis
- Filao : Casuarina equisetifolia
- Niaouli : Melaleuca leucodendron

Préparation des extraits de litières.

Agitation 30 minutes de 10 g. de litière pulvérisée avec 90 ml d'eau distillée stérile. Après centrifugation le liquide sur-nageant est amené une moitié à pH 4,5, l'autre moitié à pH 6.

Les extraits stérilisés sur filtre Millipore sont prêts à l'emploi.

Préparation du milieu de culture. (concentré 2 fois)

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 2 g.
- $\text{KNO}_3$  ..... 1 g.
- $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ..... 0,400g.
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  ..... 0,200g.
- $\text{NaCl}$  ..... 0,200g.
- $\text{FeCl}_3$  ..... 0,020g.
- Mannitol ..... 2 g.

/...

- Solution d'Oligoéléments(1) ..... 2ml
- Hydrolysate de caséine DIFCO (2) ..... 2 g.
- Yeast extract (2) ..... 2 g.
- Gélose ..... 40g.
- Eau distillée .....Q.S.P.....1000 g.

Une moitié du milieu est amené à pH 4,5, l'autre moitié à pH 6,0.

Répartir les milieux dans des Erlenmeyers de 100 ml à raison de 30 ml par fiole. Stériliser 20 minutes à l'autoclave à 120°.

Ensuite l'extrait de litière est ajouté aseptiquement à la concentration de 50% : soit 30 ml par Erlenmeyer.

- l'extrait à pH 4,5 au milieu à pH 4,5
- l'extrait à pH 6,0 au milieu à pH 6,0

Ensemencement

Dans le milieu de culture où la gélose est maintenue ondue au bain-marie à 47°, inoculer 4 ml des dilutions de terre suivantes:

- dans le cas des milieux à pH 4,5 : dilutions 10<sup>-3</sup> et 10<sup>-4</sup>
- dans le cas des milieux à pH 6,0 : dilutions 10<sup>-4</sup> et 10<sup>-5</sup>

Après homogénéisation, le contenu de chaque Erlenmeyer est réparti dans 4 boîtes de Pétri stériles de 10 cm de diamètre : soit 15 ml de milieu par boîte.

(1) POCHON (J.), TARDIEUX (F.), 1962, Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Ed. de la Tourelle PARIS.

(2) Produits DIFCO

Incubation à 28° et lecture des boîtes après 4 jours :  
comptage du nombre de colonies par boîte.

Pour chaque dilution calculer la moyenne de 3 boîtes et  
déterminer le nombre de germes par gramme de sol.

-----