

Bio. sol.

23 MAI 1986
O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 20 210

Cote : B

L'EFFET LITIÈRE ⁽¹⁾

II. — ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DU POUVOIR INHIBITEUR DES COMPOSÉS HYDOSOLUBLES DES FEUILLES ET DES LITIÈRES FORESTIÈRES VIS-A-VIS DE LA MICROFLORE TELLURIQUE

G. BECK *, Y. DOMMERGUES *, R. VAN DEN DRIESSCHE **

RÉSUMÉ

De très nombreuses espèces forestières renferment dans leurs feuilles des composés hydrosolubles doués d'un pouvoir inhibiteur marqué vis-à-vis de certains secteurs de la microflore tellurique. Après leur chute sur le sol, où elles s'incorporent à l'horizon litière, les feuilles s'appauvrissent progressivement en substances inhibitrices hydrosolubles. L'effet inhibiteur des composés hydrosolubles des litières ne dépend pas seulement de la nature et de l'âge des litières, mais aussi de leur concentration et du pH du milieu où ils interviennent.

A l'occasion de cette étude, on a décrit une méthode simple d'analyse statistique de dispositifs expérimentaux de type factoriel.

SUMMARY

The leaves of many trees contain water soluble substances inhibiting (1) the growth of *Bacillus megaterium*; (2) the nitrification of ammonium nitrogen by a mixed nitrifying micro-population; (3) the growth of a complex soil micropopulation.

After the leaves have fallen on the soil, where they contribute to the litter, they are gradually detoxicated. Thus the inhibiting effect of the litter depends on its age; moreover it depends (1) on the tree species, (2) on the concentration of the water extracts, (3) on pH.

These facts may explain — at least in part — the accumulation of organic matter and the formation of mor and moder horizons in forest soils. The accumulation of organic matter results not only from the occurrence of recalcitrant complexes such as Handley's tannin - protein complexes, but also from the inactivation of microorganisms by inhibitory substances leached out of the litter; this inactivation is all the more intense as the soil is acid.

An experimental design of factorial type has been set up in order to study the interaction pH $\times$ litter effect. By the way, a simplified approach of the statistical analysis of all factorial designs at 3 or 2 levels has been given in detail.

(1) Etude effectuée dans le cadre de la R.C.P. 40 (Recherche coopérative sur programme n° 40).

* Centre de Pédologie biologique, C.N.R.S., 54 - Vandœuvre-les-Nancy.

** Section de Pédologie, O.R.S.T.O.M., 93 - Bondy.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Blätter vieler Holzarten enthalten wasserlösliche Verbindungen, die eine ausgeprägte hemmende Wirkung auf die tellurische Mikroflora ausüben.

Die Blätter verarmen allmählich an wasserlöslichen hemmenden Substanzen, nachdem sie auf den Boden gefallen sind und verwesen.

Die hemmende Wirkung der wasserlöslichen Verbindungen der Waldstreu hängt nicht nur von der Natur und vom Alter der Waldstreu, sondern auch von ihrer Konzentration und vom pH der Umwelt in der sie auftreten ab.

Es wird ein einfaches Verfahren zur statistischen Analyse experimenteller Anlagen von faktoriellem Typ beschrieben.

INTRODUCTION

Pour expliquer la lenteur de la décomposition de la matière organique dans certains sols forestiers, notamment dans les horizons de surface de type mor ou moder, on peut faire appel à deux hypothèses :

1. *Hypothèse de l'inhibition indirecte.*

Les molécules organiques libérées au cours de la décomposition des litières et susceptibles d'être utilisées comme aliments nutritifs par les micro-organismes telluriques, sont protégées contre l'attaque microbienne (1) par formation de complexes résistants à la biodégradation, tels que les complexes tannins-protéines décrits par HANDLEY (1961) ou DAVIES *et al.* (1964), tels que les complexes tannins-cellulose ou tannins-hémicelluloses dont l'existence est supposée par BENOIT *et al.* (1968), (2) par incrustation ou enrobage par des complexes tanniques résistants à la biodégradation (BENOIT *et al.*, 1968).

L'inhibition indirecte peut aussi résulter d'une déficience grave du milieu en éléments minéraux (par exemple sols sableux ou tourbes acides).

2. *Hypothèse de l'inhibition directe.*

Les micro-organismes telluriques ou les enzymes du sol sont inhibés par des substances toxiques d'origine végétale (c'est-à-dire libérées dans le milieu par les litières) ou d'origine microbienne (c'est-à-dire synthétisées par certaines fractions de la microflore tellurique dans des conditions écologiques particulières).

Le but de cette note est de présenter les résultats d'une étude expérimentale préliminaire destinée à vérifier la validité de la deuxième hypothèse et en particulier :

— à mettre en évidence, dans les feuilles (et accessoirement d'autres organes)

et dans les litières forestières, la présence de composés hydrosolubles capables d'inhiber certains micro-organismes telluriques ;

— à examiner pendant les 6 mois qui suivent la chute des feuilles les variations du pouvoir inhibiteur des composés hydrosolubles des litières et à comparer ces variations à celles qui concernent les feuilles marcescentes ;

— à élucider l'influence du pH sur l'intensité de l'inhibition.

L'étude de l'influence du facteur anaérobiose sur le pouvoir inhibiteur des litières n'a pas été abordée ici ; c'est pourquoi les prélèvements de litières ont été effectués exclusivement dans des stations correspondant à des sols bien ressuyés, ne présentant aucun symptôme d'hydromorphie dans les horizons de surface. Dans ce travail, nous n'avons pas cherché à déterminer les substances responsables de l'inhibition ni à élucider les mécanismes de l'inhibition ; ces deux problèmes seront examinés ultérieurement.

La plupart des notes publiées jusqu'à ce jour concernent le pouvoir inhibiteur d'extraits d'organes végétaux récoltés sur des plantes vivantes ; à ce sujet, on citera, dans le cadre des études portant sur les espèces forestières les travaux de TOPPS et WAIN (1957), MANDELS *et al.* (1961), BELL *et al.* (1962), SENING (1963), JUNG et HUBBES (1965).

Quant au pouvoir inhibiteur des litières — c'est-à-dire des résidus végétaux (feuilles, fleurs, écorces, branches) tombés au sol — on ne possède pratiquement pas de documentation à l'exception d'une note déjà ancienne de WINTER et WILLEKE (1952) d'où il résulte que, dans le cas d'*Acer pseudoplatanus* et *Carpinus betulus*, ce pouvoir semble décroître en général après la chute des feuilles.

I. MATÉRIEL VÉGÉTAL ET MÉTHODES

1. MATÉRIEL.

On a étudié parallèlement le pouvoir inhibiteur :

— de feuilles vertes récoltées sur l'arbre et accessoirement de rameaux et d'écorce ;

— de feuilles marcescentes récoltées sur l'arbre ;

— de litières récoltées au sol.

Les feuilles vertes ont été prélevées dans des forêts situées soit dans l'Est de la France, soit dans les Alpes françaises (région de Corrençon), soit au Sénégal (cf. tabl. I).

Les litières de *Quercus petraea* (chêne), *Fagus silvatica* (hêtre) et *Carpinus betulus* (charme) ont été prélevées *exclusivement sous des formations forestières feuillues caractérisées par un horizon de surface de type mull et ne présentant aucune trace d'hydromorphie* ; nous avons adopté, comme station de prélèvement de litières, la station de la Sivrite (en forêt de Haye, à proximité de Nancy) dont les caractéristiques pédologiques ont été précisées par ailleurs (DOMMERGUES et DUCHAUFOR, 1966).

Les feuilles marcescentes ont été prélevées dans la même station que les litières ou dans des stations pédologiquement très voisines.

2. PRÉPARATION DES EXTRAITS DE FEUILLES OU DE LITIÈRES.

Après leur récolte, les feuilles ou les litières sont séchées à l'air pendant un mois puis broyées au mixeur jusqu'à obtention d'une poudre. L'extraction des composés hydrosolubles s'effectue en agitant pendant 30 minutes 10 g de poudre dans 90 ml d'eau distillée froide, en présence de billes de verre ; 1 ml d'extrait correspond donc à 0,1 g de feuilles (poids sec à l'air). On procède ensuite à une filtration grossière sous vide sur un papier filtre posé sur verre fritté. L'extrait ainsi obtenu est centrifugé pendant 10 minutes à 16 000 tours/minute puis son pH est ajusté à la valeur adoptée pour les tests biologiques (4,6 ; 5,2 ; 6,0 ; 7,0) ; on stérilise les extraits ainsi obtenus par passage sur filtre millipore 0,45 μ m. Les extraits préparés comme nous venons de l'indiquer sont désignés dans le texte sous le nom d'extraits de feuilles ou de litières, ou plus succinctement sous le nom d'extraits. Ils doivent être utilisés extemporanément car, en vieillissant, des précipités se forment et les propriétés inhibitrices sont altérées.

3. TESTS BIOLOGIQUES DESTINÉS A METTRE EN ÉVIDENCE LE POUVOIR INHIBITEUR DES EXTRAITS DE FEUILLES OU DE LITIÈRES.

Nous avons testé simultanément trois populations bactériennes de complexité croissante :

- une micropopulation pure de *Bacillus megaterium* n° 63 (souche asporulée) qui présente l'avantage sur les souches habituelles de collection de se développer encore bien au pH 4,6 ;

- une micropopulation mixte de bactéries nitrifiantes obtenues par enrichissement à partir d'un sol brun calcaire (sol brun calcaire du Montet) et constituée de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* accompagnés d'un cortège de germes hétérotrophes ;

- une micropopulation complexe constituée par la microflore totale d'un sol brun calcaire (sol brun calcaire du Montet).

a) Test de croissance de *B. megaterium* n° 63.

La méthode consiste à enregistrer au biophotomètre Bonet-Maury (Jouan) les courbes de croissance de *B. megaterium* n° 63 en présence de doses variables d'extraits

aqueux de feuilles et de comparer ensuite les taux de croissance calculés à partir de ces courbes.

Le milieu de culture concentré deux fois (milieu Y'C concentré deux fois) a la composition suivante :

KH_2PO_4	2,000 g
KNO_3	1,000 g
$\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,400 g
$\text{CaCl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,200 g
NaCl	0,200 g
FeCl_3	0,020 g
Glucose	2,000 g
Hydrolysate de caséine Difco	2,000 g
Extrait de levure Difco	2,000 g
Solution standard d'oligo-éléments (POCHON et TARDIEUX, 1962)	2 ml
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

Après ajustement du pH à une des valeurs choisies pour l'expérience (4,6 ; 5,2 ; 6,0 ; 7,0), le milieu Y'C concentré est stérilisé par passage sur filtre millipore 0,45 μm . On y ajoute stérilement de l'eau stérile et de l'extrait stérile de feuilles ou de litières de façon à obtenir des milieux de culture dont la concentration définitive en extraits est de 0,5 pour cent (témoin) ou 20 pour cent et dont la concentration en sels minéraux et en éléments nutritifs est celle du milieu Y'C non concentré. Pour de nombreux extraits, il est difficile de dépasser un apport de 20 pour cent (ce qui correspond à 2 pour cent de feuilles ou litières sèches) en raison de l'interférence de précipitations chimiques ou de la coloration trop forte. L'ensemencement est réalisé en ajoutant

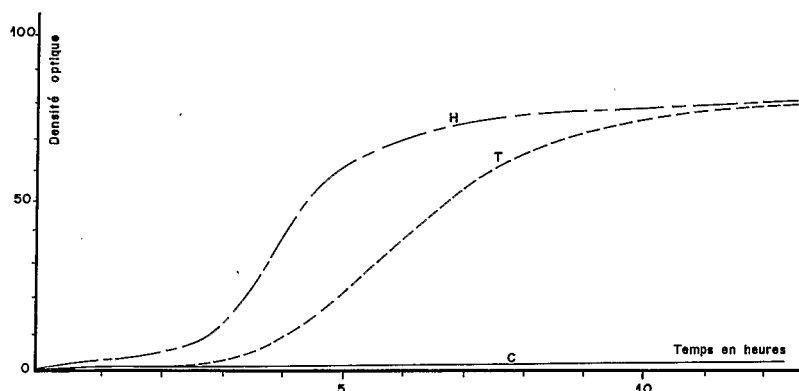


FIG. 1. — Courbe de croissance de *B. megaterium* en présence d'extraits aqueux de litière de chêne récoltée en novembre (courbe C), de litière de hêtre récoltée en décembre (courbe H) et en l'absence d'extraits (courbe T). L'indice de croissance (IB) est 0 % pour le chêne et 180 % pour le hêtre.

Growth curve of B. megaterium in a liquid medium containing water extract of Quercus petraea litter picked up in november (curve C), water extract of Fagus silvatica litter picked up in december (curve H) and in the blank (curve T). In that assay the growth index (IB) for Quercus petraea is 0 % and for Fagus silvatica 180 %.

0,01 ml de culture pure de *B. megaterium* n° 63 âgée de 24 h dans 8 ml du milieu enrichi en extrait placé dans des cuves standard d'une capacité de 10 ml et 30 mm d'épaisseur. L'incubation a lieu dans une enceinte thermostatée et ventilée à 30 °C. On a reproduit sur la figure 1 les courbes de croissances obtenues dans une des expériences où l'on a comparé la croissance de *B. megaterium* en présence de litière de chêne (C) et de hêtre (H). L'indice de croissance IB est calculé à partir de la formule :

$$IB = \frac{\mu_f}{\mu_t} \times 100$$

où μ_f représente le taux de croissance de *B. megaterium* dans le milieu enrichi en extrait de feuilles ou de litières et μ_t le taux correspondant obtenu dans le milieu témoin (milieu non enrichi en extrait).

Le taux de croissance est lui-même déterminé graphiquement à l'aide d'abaques à partir des courbes de densité optique données par le biophotomètre.

Lorsque l'indice IB est inférieur à 100, il y a inhibition ; plus l'inhibition est importante, plus la valeur de l'indice IB est faible. Au contraire, lorsque l'indice IB est supérieur à 100, il y a stimulation.

Comme, en général, la phase de latence de *B. megaterium* ne dépasse pas 24 h, il n'a pas été nécessaire de prolonger la durée du test au-delà de 24 h.

b) Test de nitrification par une micropopulation mixte.

On prépare d'abord le milieu de culture de MEIKLEJOHN (1953, 1962) concentré deux fois.

Milieu de Meiklejohn concentré deux fois :

CaCO ₃ en poudre	20,00 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,32 g
Solution minérale	180 ml
Solution de phosphate	20 ml
Eau distillée	800 ml

Solution minérale :

NaCl	0,30 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,14 g
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,03 g
Eau distillée	90 ml

Solution de phosphate :

KH ₂ PO ₄	3,40 g
Eau distillée bouillie et refroidie	250 ml

On ajoute stérilement au milieu de Meiklejohn concentré, préalablement stérilisé à l'autoclave, de l'eau stérile et de l'extrait stérile de feuilles ou de litières de façon à obtenir des milieux de culture dont la concentration définitive en extrait est de 0 ou 5 pour cent et la concentration définitive en sels minéraux est celle du milieu de Meiklejohn normal, c'est-à-dire non concentré.

Le carbonate de calcium que renferme le milieu maintient celui-ci à un pH au moins égal à 7,2.

L'ensemencement est réalisé en ajoutant 0,5 ml de la culture mixte de bactéries nitrifiantes obtenue par la technique de SAKAI (1964) dans 40 ml du milieu enrichi en extrait placé dans des fioles cylindriques en pyrex de 250 ml.

L'incubation qui a lieu sur agitateur rotatif (185 tours/minute) à $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dure 21 jours. L'indice de nitrification IN est calculé comme suit :

$$\text{IN} = \frac{nf}{nt} \times 100$$

où nf représente la teneur en nitrate après incubation des milieux enrichis en extraits de feuilles ou de litières et nt représente la teneur en nitrate du témoin.

c) *Test de croissance d'une micropopulation complexe.*

La méthode originale que nous avons mise au point consiste à ensemençer par aérosol avec une micropopulation complexe des boîtes bi-Pétri dont un compartiment renferme un milieu gélosé enrichi en extraits de feuilles et l'autre le milieu témoin. Après incubation on effectue pour chaque boîte le rapport du nombre des colonies développées dans l'un et l'autre compartiment.

Le milieu de culture utilisé est identique au milieu Y'C concentré décrit plus haut mais il est gélosé à 40 pour mille et on y a remplacé le glucose par le mannitol qui supporte mieux la stérilisation à l'autoclave. On y ajoute stérilement à 43°C un volume égal d'extrait stérile de feuilles ou de litières pour obtenir le milieu enrichi en extrait qui renferme ainsi 50 pour cent d'extrait (ce qui correspond à 5 pour cent de feuilles ou litières sèches). Le milieu témoin est obtenu comme dans le cas précédent, par adjonction d'un volume équivalent d'eau stérile.

On coule dans l'un des compartiments de la boîte bi-Pétri 8 ml du milieu expérimental et dans l'autre 8 ml du milieu témoin. Après refroidissement, chaque boîte est ensemençée sous une hotte réservée à cet effet par un aérosol obtenu avec le séparateur de germes Hauduroy (BÉNÉ et GIRARD, 1964) dans lequel on introduit une suspension-dilution 10^{-1} du sol brun calcaire du Montet. La durée de la pulvérisation à l'aérosol est de 20 secondes environ par boîte. L'inoculum varie sensiblement d'une boîte à l'autre ; mais les deux compartiments de chaque boîte reçoivent toujours un inoculum identique. L'expérience montre qu'il est nécessaire d'ensemencer 10 boîtes bi-Pétri par test.

Les boîtes sont mises à incuber à 28°C pendant un temps compris entre 5 et 10 jours. Après cette incubation, on procède au comptage des colonies dans chaque boîte bi-Pétri (fig. 2). L'indice de croissance IM est calculé comme suit :

$$\text{IM} = \frac{cf}{ct} \times 100$$

où cf représente le nombre de colonies développées sur le milieu gélosé enrichi en extrait et ct le nombre de colonies développées sur le milieu témoin.

d) *Variante du test de croissance d'une micropopulation complexe.*

Dans la dernière expérience (expérience factorielle décrite au paragraphe III.2) l'ensemencement par aérosol de suspension-dilution a été remplacé par un ensemence-

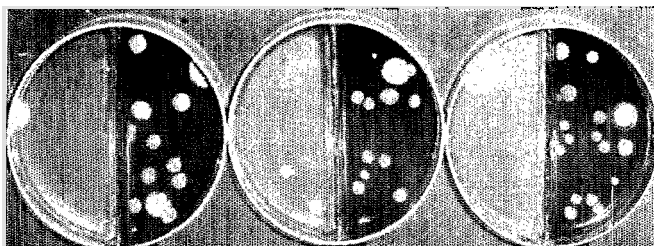


FIG. 2. — Simulation de l'environnement édaphique sous deux formations forestières. La moitié gauche des boîtes bi-Pétri simule l'environnement sous *Picea abies* : il s'agit d'un milieu de pH 4,6 renfermant 50 % d'extraits de litière de *P. abies*. La moitié droite simule l'environnement sous *Fagus sylvatica* : il s'agit d'un milieu de pH 5,2 renfermant 50 % d'extrait de litière de *F. sylvatica*. Chaque boîte bi-Pétri a reçu un inoculum uniformément réparti par aérosol de suspension-dilution de sol brun calcaire. Le milieu simulant le sol sous *P. abies* apparaît comme beaucoup plus nettement défavorable au développement des colonies microbiennes que le milieu simulant le sol sous *F. sylvatica*. On a photographié ici 3 boîtes bi-Pétri.

Simplified model simulating the edaphic environment under two different types of forest. The left side of the bi-Petri dishes simulates the environment under Picea abies; the nutrient medium contains 50 % of water extract of P. abies litter; its pH is 4,6. The right side of the bi-Petri dishes simulates the environment under Fagus sylvatica; the nutrient medium contains 50 % of water extract of F. sylvatica litter; its pH is 5,2. Each bi-Petri dish has been inoculated by an aerosol of a suspension-dilution of calcareous brown soil. The medium simulating the environment under the P. abies forest is much more unfavorable to the microorganisms than the medium simulating the environment under the F. sylvatica forest.

ment dans la masse consistant en un apport de 5 ml de suspension-dilution 10^{-1} du sol brun calcaire du Montet utilisé dans le test précédent. Dans ce cas, les résultats n'ont pas été exprimés sous forme d'indice de croissance IM mais en densités (transformées en $\log_{10}$) de micro-organismes se développant sur les différents milieux.

Remarque :

Chacun des 4 tests a été conduit en triple exemplaire au moins.

4. RAPPEL DE LA NOTION D'EXPÉRIENCE FACTORIELLE.

Une expérience effectuée *in vitro* ou *in situ* est dite factorielle lorsque deux facteurs au moins y sont étudiés, simultanément, à plus d'un niveau. Quelle que soit leur nature — qualitative ordonnée, qualitative non ordonnée, ou quantitative — ces facteurs y entrent, en général, à deux ou trois niveaux.

Le test des interactions entre les facteurs pris deux à deux constitue l'essence même d'une expérience factorielle. Ces interactions sont appelées interactions à deux facteurs ou interactions de premier ordre. Les interactions d'ordre plus élevé sont supposées non significatives ou ininterprétables et servent, par conséquent, à estimer l'erreur expérimentale, qui est le carré moyen dénominateur du test F de

chaque effet factoriel. Toutefois, quand le nombre de degrés de liberté résiduels, ainsi rendu disponible, est inférieur à quatre et, *a fortiori*, lorsqu'il est nul, la nécessité de répéter l'expérience s'impose. Les interactions entre les répétitions et les effets factoriels viennent alors gonfler le nombre de degrés de liberté résiduels.

Nous définissons la répétition (r) comme l'ensemble de tous les traitements factoriels obtenus par combinaison des facteurs à tous leurs niveaux. Ainsi, une expérience factorielle trois puissance trois (3^3) (trois facteurs à trois niveaux) est conduite en une ($r = 1$), deux ($r = 2$), ou trois ($r = 3$) répétitions des 27 traitements. D'autre part, une expérience factorielle deux puissance six (2^6) (six facteurs à deux niveaux) est le plus souvent faite en une demi-répétition ($r = 1/2$) des 64 traitements.

Quant au bloc (b), il désigne un nombre (k) de traitements, inférieur, égal, ou supérieur à celui des combinaisons factorielles d'une répétition, mais dont la proximité, ou la juxtaposition, au sein de l'aire expérimentale (une enceinte climatique par exemple), permet de considérer la somme (b) de ses observations comme reflétant une partie homogène d'un milieu expérimental hétérogène. Si nous prenons l'exemple du 3^3 , la somme des carrés entre blocs :

$$\frac{\Sigma b^2}{k} - \frac{(\Sigma b)^2}{3^3 \times r}$$

élimine plus ou moins bien, l'hétérogénéité perturbatrice de l'expérience. En effet, la somme des carrés entre blocs est d'autant plus grande — la somme des carrés résiduelle d'autant plus petite — que les différences entre blocs sont grandes. Mais les degrés de liberté (d.l.) nécessaires au calcul du carré moyen entre blocs :

$$\left(\frac{\Sigma b^2}{k} - \frac{(\Sigma b)^2}{3^3 \times r} \right) / d.l.$$

ne peuvent être enlevés que des degrés de liberté résiduels (puisque tous les effets principaux et toutes les interactions de premier ordre doivent être estimées). Il s'en suit que la somme des carrés de l'erreur est amputée d'une somme de carrés entre blocs, inconnue, et, après cela, divisée par un nombre de degrés de liberté plus faible, mais connu, pour donner le carré moyen de l'erreur. Les degrés de liberté entre les blocs doivent provenir, en partie, des degrés de liberté correspondant à des interactions de deuxième ordre et plus. On dit de ces interactions qu'elles sont confondues avec les blocs.

Une familiarité très grande avec le milieu expérimental est seule garante du choix judicieux de ce complexe répétitions-blocs que l'on appelle dispositif expérimental. Du dispositif expérimental en un seul bloc, englobant toutes les répétitions, au dispositif en blocs minimaux, la gamme de choix est parfois grande pour un même type d'expérience (c'est-à-dire pour un même nombre de facteurs, de niveaux

et de répétitions). Une expérience deux puissance trois (2^3) (trois facteurs à deux niveaux) impose déjà un choix entre plusieurs dispositifs comme le montre le tableau I.

TABLEAU I

Expérience factorielle deux puissance trois (2^3) (trois facteurs à deux niveaux), en sept dispositifs différents pour illustrer le mécanisme de répartition des degrés de liberté.

Two cube factorial experiment (2^3) (three factors at two levels) designed in seven theoretical ways to compare the allocation of degrees of freedom.

Dispositif expérimental	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	η
Degrés de liberté							
Blocs	0	2	5	0	1	3	0
Effet principal A	1	1	1	1	1	1	1
Effet principal B	1	1	1	1	1	1	1
Effet principal C	1	1	1	1	1	1	1
Interaction AB	1	1	1	1	1	1	1
Interaction AC	1	1	1	1	1	1	1
Interaction BC	1	1	1	1	1	1	1
Erreur	17	15	12	9	8	6	1
Total	23	23	23	15	15	15	7
Nombre de répétitions	3	3	3	2	2	2	1

Les traitements d'une expérience factorielle sont désignés par des codes numériques. Il y a autant de chiffres qu'il y a de facteurs étudiés dans l'expérience. Le chiffre 0 désigne le premier niveau, 1 le deuxième, 2 le troisième. Exemples : un traitement faisant intervenir à la fois le niveau 2 du premier facteur et le niveau 1 du second sera le traitement 21 tandis que le traitement 00 sera celui qui consiste à appliquer les deux facteurs au premier niveau.

Les traitements sont appliqués dans un ordre aléatoire, en consultant des tables de permutations (MOSES et OAKFORD, 1963). Quand il y a plus d'un bloc, la permutation des traitements se fait à l'intérieur de chaque bloc, et cela reste vrai quelle que soit la contenance (en nombre de traitements) du bloc par rapport à celle de la répétition. Il ne faut toutefois pas perdre de vue que la construction d'un bloc qui renferme moins de traitements que la répétition se fait selon des règles précises définies par FINNEY (1947). Au cours de la transcription d'un dispositif déjà construit, figurant dans un manuel (COCHRAN et COX, 1957, par exemple), il est indispensable de permuer les traitements.

Pour clore ce rappel de la notion d'expérience factorielle, signalons qu'il est commode de désigner les expériences factorielles à trois et / ou à deux niveaux par la formule :

$$(3^m \times 2^n) \times r \text{ en blocs de } k \text{ unités}$$

dans laquelle sont introduits les paramètres que nous venons de définir :

k : nombre d'unités expérimentales par bloc ;

r : nombre de répétitions ;

m : nombre de facteurs à trois niveaux ;

n : nombre de facteurs à deux niveaux.

C'est ainsi que les sept dispositifs du tableau I portent les noms suivants :

α : $(3^0 \times 2^3) \times 3$ en bloc de 24 unités ;

β : $(3^0 \times 2^3) \times 3$ en blocs de 8 unités ;

γ : $(3^0 \times 2^3) \times 3$ en blocs de 4 unités ;

δ : $(3^0 \times 2^3) \times 2$ en bloc de 16 unités ;

ϵ : $(3^0 \times 2^3) \times 2$ en blocs de 8 unités ;

ζ : $(3^0 \times 2^3) \times 2$ en blocs de 4 unités ;

η : $(3^0 \times 2^3) \times 1$ en bloc de 8 unités.

5. DÉCOMPOSITION DES INTERACTIONS.

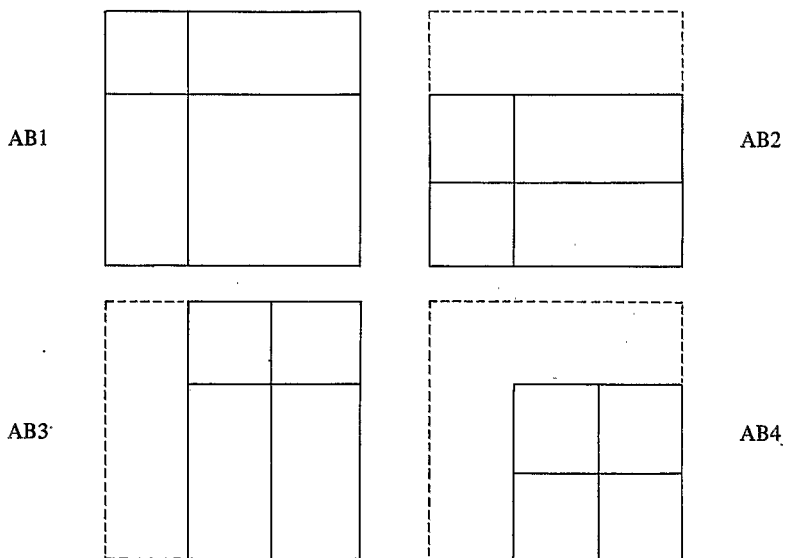
Pour la décomposition des tableaux 3×3 d'interaction, nous adoptons, à l'instar de YATES *et al.* (1959), le schéma proposé par KIMBALL (1954) dans un autre domaine, celui des composantes du critérium χ^2 pour tableaux de contingence.

La composante générale d'un effet principal résulte de la comparaison entre la réponse au premier niveau et la moyenne des réponses aux deux autres niveaux. La seconde composante porte sur la différence de réponse à ces deux derniers niveaux ; elle bloque le second degré de liberté de l'effet principal et est appelée composante additionnelle. Les deux décompositions peuvent être appliquées aux lignes et aux colonnes du tableau 3×3 . Il existe ainsi quatre façons de décomposer le tableau : la décomposition générale des lignes et des colonnes ; la décomposition additionnelle des lignes et générale des colonnes ; la décomposition générale des lignes et additionnelle des colonnes ; la décomposition additionnelle des lignes et des colonnes. Dans tous les cas, le tableau 3×3 de 9 moyennes et 4 degrés de liberté est ramené à un tableau 2×2 de 4 moyennes et 1 degré de liberté. La décomposition est orthogonale ; la somme des composantes étant égale à l'interaction. La terminologie utilisée n'est toutefois pas satisfaisante. Proposés pour des doses d'engrais (YATES *et al.*, *op. cit.*) — qui sont des facteurs quantitatifs — les termes général et additionnel ne conviennent pas à la décomposition de facteurs

qualitatifs, ordonnés ou non. On peut leur substituer un simple numérotage, analogue à celui de KIMBALL (*op. cit.*). A titre d'exemple, l'interaction AB :

		B		
		0	1	2
A	0			
	1			
	2			

est décomposée en quatre composantes AB 1, AB 2, AB 3 et AB 4, qui sont schématisées :



6. EXPOSÉ D'UNE MÉTHODE SIMPLIFIÉE D'ANALYSE POUR TOUS LES DISPOSITIFS FACTORIELS A TROIS ET / OU DEUX NIVEAUX.

L'accès à des ordinateurs puissants (CDC 3600 du CIRCE, Centre de Calcul du C.N.R.S., Campus d'Orsay) ne nous dispense pas de simplifier, quand c'est possible, les calculs intervenant dans une analyse statistique.

Pour tous les dispositifs $(3^m \times 2^n) \times r$ en blocs de k unités, une méthode simplifiée peut être appliquée au calcul et au test de toutes les composantes des interactions et des effets principaux. Le programme pour ordinateur n'est pas encore écrit.

Désignons par R_1, R_2, R_3, R_4 les différences, en valeur absolue, entre les deux sommes des moyennes situées sur les diagonales des tableaux 2×2 . Ainsi, pour AB 1

$$R_1 = |s + v - t - u|$$

s	t
u	v

Examinons, successivement, le calcul des interactions 3×3 , 3×2 et 2×2 , et celui des effets principaux à 3 et à 2 niveaux.

Les carrés moyens des composantes d'**interaction** 3×3 de tous les dispositifs $(3^m \times 2^n) \times r$ sont obtenus directement à partir des quatre tableaux 2×2 de moyennes :

$$\text{composante 1} = 4 r 3^{m-2} 2^n R_1^2/9$$

$$\text{composante 2} = r 3^{m-2} 2^n R_2^2/3$$

$$\text{composante 3} = r 3^{m-2} 2^n R_3^2/3$$

$$\text{composante 4} = r 3^{m-2} 2^n R_4^2/4$$

Les composantes des **interactions** 3×2 sont obtenues à partir des deux tableaux 2×2 :

$$\text{composante 1} = r 3^{m-1} 2^{n-1} R_1^2/3$$

$$\text{composante 2} = r 3^{m-1} 2^{n-1} R_2^2/4$$

Les interactions 2×2 ne sont évidemment pas décomposables :

$$\text{interaction} = r 3^m 2^{n-2} R^2/4$$

Les effets principaux à 3 niveaux offrent la décomposition définie plus haut ; R_1 et R_2 étant les deux différences entre les réponses :

$$\text{composante 1} = 2 r 3^{m-1} 2^n R_1^2/3$$

$$\text{composante 2} = r 3^{m-1} 2^n R_2^2/2$$

Les effets principaux à 2 niveaux ne sont pas décomposables :

$$\text{effet principal} = r \cdot 3^m \cdot 2^{n-1} R^2/2$$

Tous les effets factoriels étant calculés, il reste à les soustraire de la somme totale des carrés des données (Σy^2) en même temps que la somme des carrés des blocs ($\Sigma b^2/k$) et à diviser par le nombre de degrés de liberté résiduels (d.l.) pour obtenir le carré moyen de l'erreur :

$$\frac{(\Sigma y^2) - (AB1 + AB2 + \dots + C2) - (\Sigma b^2/k)}{d.l.}$$

En multipliant ce carré moyen de l'erreur par le F au risque 1 %, donné par les tables, on obtient un carré moyen critique. Est significatif, tout effet factoriel qui dépasse le carré moyen critique.

Un cas d'application est donné au paragraphe III.2.

II. — MISE EN EVIDENCE DU POUVOIR INHIBITEUR DES EXTRAITS HYDROSOLUBLES DES FEUILLES ET DES LITIÈRES FORESTIÈRES. VARIATIONS SAISONNIÈRES

1. FEUILLES VERTES ET, ACCESSOIREMENT, ÉCORCES ET RAMEAUX RÉCOLTÉS SUR L'ARBRE.

Il ressort du tableau II que les extraits de *feuilles vertes* de nombreuses espèces forestières tempérées et tropicales présentent un pouvoir inhibiteur considérable puisqu'à la dose de 5 pour cent (correspondant à l'incorporation au milieu de 0,5 pour cent seulement de feuilles sèches) et à un pH non excessivement acide (5,2), la plupart d'entre elles inhibent la croissance de *B. megaterium*. Fait surprenant, les feuilles de *Pinus sylvestris* sont moins riches en composés hydrosolubles inhibiteurs que les feuilles de toutes les autres espèces testées.

A titre comparatif, on a effectué des tests sur des écorces de *Pinus sylvestris* et de *Melaleuca leucodendron* ; pour la première espèce, l'extrait d'écorce est plus actif que l'extrait foliaire ; pour la seconde, c'est l'inverse.

En ce qui concerne *Casuarina equisetifolia*, les extraits, qui ont été obtenus non à partir des feuilles mais à partir des rameaux, sont très nettement inhibiteurs.

TABLEAU II

Indice de croissance de *B. megaterium* (IB) en présence d'extraits aqueux de feuilles vertes (et accessoirement d'écorces et de rameaux) d'espèces forestières tempérées et tropicales.

Growth index of B. megaterium (IB) in nutrient media containing water extracts of green leaves (and incidentally of barks or stems) of temperate and tropical trees.

Espèces végétales	Lieu de prélèvement	Nature de l'organe ou du tissu végétal	pH des extraits avant ajustement au pH 5,2	Indices de croissance (IB) à pH 5,2 pour deux doses d'extraits	
				5 %	20 %
<i>Picea abies</i> (épicéa)	Est de la France	Feuilles	4,2	0	0
<i>Pseudotsuga menziesii</i> (pin d'Orégon)	"	"	4,2	0	0
<i>Abies alba</i> (sapin)	"	"	4,2	0	0
<i>Pinus strobus</i> (pin Weymouth)	"	"	4,2	0	0
<i>Pinus sylvestris</i> (pin sylvestre)	"	"	4,6	86	0
<i>Pinus sylvestris</i> (pin sylvestre)	"	Ecorce	3,6	0	0
<i>Pinus montana</i> sp. (pin à crochets)	Corrençon (Alpes françaises)	Feuilles	4,3	0	0
<i>Acacia albida</i>	Bambey (Sénégal)	"	5,1	0	0
<i>Eucalyptus</i> sp.	Dakar (Sénégal)	"	4,7	0	0
<i>Melaleuca leucodendron</i> (niaouli)	"	"	5,0	0	0
<i>Melaleuca leucodendron</i> (niaouli)	"	Ecorce	3,6	50	0
<i>Casuarina equisetifolia</i> (filao)	"	Rameaux	5,2	0	0

N. B. — Il y a inhibition lorsque l'indice est inférieur à 100 ; l'inhibition est d'autant plus intense que l'indice est faible. Il y a stimulation lorsque l'indice est supérieur à 100.

2. VARIATIONS SAISONNIÈRES DU POUVOIR INHIBITEUR DES FEUILLES MARCESCENTES DE CHÊNE, HÊTRE ET CHARME.

Chez certaines espèces à feuilles caduques — chêne essentiellement, charme et hêtre accessoirement — une partie des feuilles persiste en automne et en hiver et tombe très tardivement en fin d'hiver ou au printemps.

Le pouvoir inhibiteur de ces feuilles — dites feuilles marcescentes — a été déterminé à partir d'échantillons prélevés sur les arbres en octobre, novembre, décembre, janvier ; il a été comparé au pouvoir inhibiteur de feuilles récoltées en septembre. Les résultats figurant au tableau III révèlent des différences très nettes entre les trois espèces comparées : *Quercus petraea* (chêne), *Fagus silvatica* (hêtre), *Carpinus betulus* (charme).

TABLEAU III

Indice de croissance de *B. megaterium* (IB), indice de nitrification (IN) et indice de croissance d'une micropopulation complexe (IM) dans des milieux renfermant des extraits aqueux de feuilles fraîches et de feuilles marcescentes de chêne, hêtre et charme prélevées à différentes dates au cours de l'automne et de l'hiver.

Growth index of B. megaterium (IB), nitrification index (IN), growth index of a complex micropopulation (IM) in a nutrient media containing water extracts of dead leaves remaining on the tree during winter of Quercus petraea, Fagus silvatica, Carpinus betulus collected in September, October, November, December and January.

Tests	Date de la récolte	<i>Quercus petraea</i> (chêne)	<i>Fagus silvatica</i> (hêtre)	<i>Carpinus betulus</i> (charme)
Indice de croissance de <i>B. megaterium</i> (IB) à pH 5,2 en présence d'extraits apportés à la dose de 5 %	Septembre	0	—	0
	Octobre	0	—	0
	Novembre	0	175	87
	Décembre	0	180	112
	Janvier	0	120	120
Indice de nitrification (IN) à pH 7,2 en présence d'extraits apportés à la dose de 5 %	Septembre	1	—	3
	Octobre	2	—	2
	Novembre	3	62	3
	Décembre	0	90	5
	Janvier	24	130	6
Indice de croissance d'une micropopulation complexe (IM) à pH 5,2 en présence d'extraits apportés à la dose de 50 %	Septembre	1	—	1
	Octobre	0	—	1
	Novembre	3	12	3
	Décembre	1	22	14
	Janvier	2	25	14

N. B. — Il y a inhibition lorsque l'indice est inférieur à 100 ; l'inhibition est d'autant plus intense que l'indice est faible. Il y a stimulation lorsque l'indice est supérieur à 100.

Les extraits de feuilles de chêne sont les plus toxiques et leur activité persiste pendant toute la saison considérée. Les extraits de feuilles de hêtre perdent leur toxicité un peu plus rapidement. Quant au charme, il occupe une position intermédiaire.

3. VARIATIONS SAISONNIÈRES DU POUVOIR INHIBITEUR DES LITIÈRES DE CHÊNE, HÊTRE ET CHARME (tableau IV).

L'évolution dans le temps de l'indice de croissance de *B. megaterium* (IB) comporte 3 phases : (1) phase de diminution de l'inhibition, (2) phase d'apparition et d'augmentation de la stimulation plus ou moins précoce (décembre pour le hêtre ou le charme, février pour le chêne) (3) phase de diminution de la stimu-

TABLEAU IV

Indice de croissance de *B. megaterium* (IB), indice de nitrification (IN) et indice de croissance d'une micropopulation complexe (IM) dans des milieux renfermant des extraits aqueux de litières de chêne, hêtre et charme récoltées chaque mois de novembre à avril.

Growth index of B. megaterium (IB), nitrification index (IN), growth index of a complex micropopulation (IM) in nutrient media containing water extracts of litter of Quercus petraea, Fagus silvatica and Carpinus betulus collected in November, December, January, February, March and April.

Tests	Date de la récolte	<i>Quercus petraea</i> (chêne)	<i>Fagus silvatica</i> (hêtre)	<i>Carpinus betulus</i> (charme)
Indice de croissance de <i>B. megaterium</i> n° 63 (IB) à pH 5,2 en présence d'extraits apportés à la dose de 5 %	Novembre	0	—	100
	Décembre	80	184	120
	Janvier	86	120	—
	Février	156	106	114
	Mars	156	100	100
	Avril	125	116*	116*
Indice de nitrification (IN) à pH 7,2 en présence d'extraits apportés à la dose de 5 %	Novembre	1	—	—
	Décembre	64	68	—
	Janvier	66	60	—
	Février	84	—	88
	Mars	—	77	90
	Avril	91	—	—
Indice de croissance (IM) d'une micropopulation complexe à pH 5,2 en présence d'extraits apportés à la dose de 50 %	Novembre	0	—	2
	Décembre	22	12	—
	Janvier	26	35	—
	Février	29	32	27
	Mars	34	31	18
	Avril	45	53	53

N. B. — Il y a inhibition lorsque l'indice est inférieur à 100 ; l'inhibition est d'autant plus intense que l'indice est faible. Il y a stimulation lorsque l'indice est supérieur à 100.

* Les litières sont mélangées et il n'a pas été possible de les séparer en raison de leur état relativement avancé de décomposition.

lation. Ainsi dans le cas du chêne, l'indice IB passe successivement de 0 à 86, puis de 86 à 156 et retombe enfin à 125.

L'évolution dans le temps de deux autres indices — indice de nitrification (IN) et indice de croissance de la micropopulation complexe (IM) — montre une diminution assez régulière du pouvoir inhibiteur. On peut donc admettre qu'après leur chute sur le sol, les feuilles y sont progressivement déttoxifiées et que cette déttoxification est assez avancée au bout de 6 mois.

III. — INFLUENCE DU pH SUR LE POUVOIR INHIBITEUR D'EXTRAITS DE FEUILLES ET DE LITIÈRES APPLIQUÉS A DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS

1. EXPÉRIENCE PRÉLIMINAIRE PORTANT SUR DES EXTRAITS A FORT POUVOIR INHIBITEUR.

Les extraits comparés ont été les suivants : extraits de feuilles vertes de *Picea abies* (épicéa), extrait d'écorce de *Pinus sylvestris* (pin sylvestre), extraits de litières fraîches de *Quercus petraea* (chêne rouvre).

L'examen des résultats du test de croissance de *B. megaterium* (tableau V) révèle que la toxicité des extraits décroît lorsque le pH augmente quelle que soit la dose utilisée (5 à 20 pour cent).

En ce qui concerne le test de croissance de la micropopulation complexe l'interprétation est plus difficile. La levée de l'inhibition s'observe seulement dans le cas du pin sylvestre. Pour les autres extraits (feuilles vertes d'épicéa, litière de chêne), l'élévation du pH n'altère pas le pouvoir inhibiteur vraisemblablement en raison d'une teneur plus élevée de ces extraits en substances toxiques.

2. EXPÉRIENCE FACTORIELLE CONSACRÉE A L'ÉTUDE DU POUVOIR INHIBITEUR DES LITIÈRES.

Comme l'expérience préliminaire que l'on vient de décrire suggère l'interaction des facteurs pH et concentration, nous avons mis sur pied le dispositif expérimental suivant, dont l'analyse a été conduite suivant la méthode simplifiée décrite au paragraphe I.6.

TABLEAU V

Influence du pH et de la concentration des extraits aqueux (feuilles vertes d'épicéa, écorce de pin sylvestre, litière de chêne) sur l'indice de croissance de *B. megaterium* (IB) et sur l'indice de croissance d'une micropopulation complexe (IM).

Influence on the growth index of B. megaterium (IB) and on the growth index of a complex micropopulation (IM) of pH and of concentration of water extracts (green leaves of Picea abies, bark of Pinus sylvestris, litter of Quercus petraea).

Tests	Dose des extraits	Nature des extraits	pH			
			4,6	5,2	6,0	7,0
Indice de croissance de <i>B. megaterium</i> (IB)	5 %	Feuilles vertes de <i>Picea abies</i> (épicéa)	0	0	0	64
		Ecorce de <i>Pinus sylvestris</i> (pin sylvestre)	0	0	0	80
		Litière (feuilles tombées récoltées en novembre) de <i>Quercus petraea</i> (chêne)	0	0	125	60
	20 %	Feuilles vertes de <i>Picea abies</i> (épicéa)	0	0	0	50
		Ecorce de <i>Pinus sylvestris</i> (pin sylvestre)	0	0	0	70
		Litière (feuilles tombées récoltées en novembre) de <i>Quercus petraea</i> (chêne)	0	0	62	40
Indice de croissance d'une micropopulation complexe (IM)	50 %	Feuilles vertes de <i>Picea abies</i> (épicéa)	2	5	5	1
		Ecorce de <i>Pinus sylvestris</i> (pin sylvestre)	27	21	28	102
		Litière (feuilles tombées récoltées en novembre) de <i>Quercus petraea</i> (chêne)	1	3	2	2

Les trois facteurs étudiés dans notre expérience ($3^3 \times 2^0$) $\times$ 2 en blocs de 27 unités sont :

- | | | | |
|------------------------------|--------|-------|-------|
| a) la nature de la litière : | épicéa | chêne | hêtre |
| b) le pH : | 4,6 | 5,2 | 6,0 |
| c) la dose de litière : | 5 % | 20 % | 50 % |

Les trois tableaux d'interaction AB, AC et BC qui s'en dégagent sont constitués avec les données du tableau VI et présentés sous la forme de neuf moyennes .

TABLEAU VI

Expérience factorielle ($3^3 \times 2^0$) $\times$ 2 en blocs de 27 unités destinée à mettre en évidence l'existence éventuelle d'interactions entre quelques facteurs de l'environnement.

Factorial experiment conducted in order to get information on the interactions between some environment factors. The design is a ($3^3 \times 2^0$) $\times$ 2 in blocks of 27 units.

Traitements appliqués au milieu de culture	Densité des micro-organismes ($\log_{10}$)	
	Premier bloc	Deuxième bloc
000	5,83	5,81
100	5,79	5,86
200	5,85	5,77
010	6,45	6,46
110	6,28	6,32
210	6,28	6,26
020	6,19	6,46
120	6,38	6,37
220	6,37	6,40
001	5,57	5,48
101	5,77	5,90
201	5,61	5,65
011	6,28	6,22
111	6,30	6,27
211	6,34	6,11
021	6,17	6,19
121	6,25	6,36
221	6,39	6,48
002	5,03	4,94
102	5,54	5,47
202	5,75	5,67
012	5,78	5,88
112	6,02	5,94
212	5,96	6,02
022	6,03	6,02
122	6,17	6,24
222	6,16	6,21
Totaux	162,54	162,76

	4,6	5,2	6,0		5 %	20 %	50 %		5 %	20 %	50 %
épicéa	5,4433	6,1783	6,1767	épicéa	6,2000	5,9850	5,6133	4,6	5,8183	5,6633	5,4000
chêne	5,7217	6,1883	6,2950	chêne	6,1667	6,1417	5,8967	5,2	6,3417	6,2533	5,9333
hêtre	5,7167	6,1617	6,3350	hêtre	6,1550	6,0967	5,9617	6,0	6,3617	6,3067	6,1383
	AB				AC				BC		

Les composantes de ces interactions sont toutes calculées :

5,4433	6,1775
×	
5,7192	6,2450

$$AB1 = (8 \times |5,4433 + 6,2450 - 6,1775 - 5,7192|^2)/3$$

$$AB1 = 0,115815$$

6,2000	5,7992
×	
6,1609	6,0242

$$AC1 = 0,185997$$

5,8183	5,5317
×	
6,3517	6,1579

$$BC1 = 0,022965$$

5,7217	6,2417
×	
5,7167	6,2484

$$AB2 = 2 \times 0,0117^2 = 0,000274$$

6,1667	6,0192
×	
6,1550	6,0292

$$AC2 = 0,000942$$

6,3417	6,0933
×	
6,3617	6,2225

$$BC2 = 0,023849$$

	6,1783	6,1767
	×	
	6,1750	6,3150

$$AB3 = 2 \times 0,1416^2 = 0,040101$$

	5,9850	5,6133
	×	
	6,1192	5,9292

$$AC3 = 0,066030$$

	5,6633	5,4000
	×	
	6,2800	6,0358

$$BC3 = 0,000730$$

	6,1883	6,2950
	×	
	6,1617	6,3350

$$AB4 = (3 \times 0,0666^2)/2 = 0,006653$$

	6,1417	5,8967
	×	
	6,0967	5,9617

$$AC4 = 0,018150$$

	6,2533	5,9333
	×	
	6,3067	6,1383

$$BC4 = 0,034474$$

Les effets principaux A, B et C de cette expérience sont aussi obtenus à partir des données du tableau VI et présentés sous forme de trois moyennes.

épicéa	chêne	hêtre	4,6	5,2	6,0	5 %	20 %	50 %
5,9328	6,0683	6,0711	5,6272	6,1761	6,2689	6,1739	6,0744	5,8239

A

B

C

Les composantes des effets principaux sont calculées :

5,9328	6,0697
--------	--------

5,6272	6,2225
--------	--------

6,1739	5,9492
--------	--------

$$A1 = 12 \times 0,1369^2 = 0,224899$$

$$B1 = 4,252585$$

$$C1 = 0,605881$$

	6,0683	6,0711
--	--------	--------

	6,1761	6,2689
--	--------	--------

	6,0744	5,8239
--	--------	--------

$$A2 = 9 \times 0,0028^2 = 0,000071$$

$$B2 = 0,077507$$

$$C2 = 0,564752$$

Le carré moyen de l'erreur, nécessaire au test des effets factoriels, s'obtient comme suit :

$$\left(\sum y^2 - AB1 - AB2 - \dots - C2 - \frac{\sum b^2}{k} \right) / d.l. =$$

$$\left(5,83^2 + 5,79^2 + \dots + 6,21^2 - 0,115815 - 0,000274 - \dots - 0,564652 - \frac{162,54^2 + 162,76^2}{27} \right) / 34 = (1966,1754 - 6,241675 - 1959,632190) / 34 = 0,008869$$

Le produit du F au risque 1 % pour 34 degrés de liberté (7,44) par ce carré moyen de l'erreur donne le carré moyen critique 0,065983. Tous les carrés moyens qui dépassent 0,065983 sont significatifs ; citons, dans l'ordre : AB1, AC1, AC3, A1, B1, B2, C1 et C2.

Cette analyse ne met en évidence aucune composante d'effet principal libre de toute composante d'interaction. Or, une composante d'effet principal ne peut être interprétée en tant que telle que si elle est libre de toute composante d'interaction, car, par définition, le mot interaction signifie que la réponse à un premier facteur est sous la dépendance de la réponse à un second facteur. Ainsi, les deux composantes C1 et C2 de l'effet principal C, tout en étant toutes deux significatives, deviennent sans objet du fait de la signification des composantes AC1 et AC3 de l'interaction AC. C'est pourquoi nous interpréterons uniquement les composantes

significatives AB1, AC1 et AC3 et négligerons, bien que significatives, les composantes A1, B1, B2, C1 et C2.

α) Composante de l'interaction nature de la litière $\times$ pH.

La composante d'interaction AB1 est schématisée par le tableau suivant :

		pH	
		4,6	5,2 et 6,0
Nature de la litière	épicéa	5,44	6,18
	chêne et hêtre	5,72	6,25

Le pouvoir inhibiteur des extraits de litière est fortement accentué par l'acidité quelle que soit la nature de la litière considérée.

La comparaison entre des traitements « épicéa à pH 4,6 » et « chêne et hêtre à pH 5,2-6,0 » revêt une importance particulière puisqu'en fait, elle constitue un modèle simplifié mais cependant assez fidèle reproduisant les conditions édaphiques existant effectivement *in situ* dans de nombreuses stations, telles que la station de la Sivrite (région de Nancy) décrite antérieurement sous le nom de station D (BAUZON *et al.*, 1969). En effet, la comparaison des caractéristiques biologiques du sol d'une parcelle plantée en épicéa (et dont le pH est de 4,6) avec les caractéristiques biologiques du sol d'une parcelle contigüe plantée en chêne et hêtre (et dont le pH est de 5,2) révèle aussi une diminution importante de la population microbienne sous conifères.

La figure 2 synthétise les résultats d'une expérience complémentaire concernant ce modèle simplifié simulant les conditions d'intervention de l'épicéa et du hêtre. Cette expérience a consisté à ensemercer avec un aérosol de suspension-dilution 10^{-1} du sol brun calcaire du Montet des boîtes bi-Pétri dont la moitié gauche renferme un milieu à pH 4,6 contenant 50 pour cent d'extrait de feuilles d'épicéa récoltées au mois de novembre et la moitié droite à pH 5,2 renferme 50 pour cent d'extrait de feuilles de hêtre récoltées à la même époque dans la même station (Sivrite).

β) Composantes de l'interaction nature de la litière $\times$ dose.

Les composantes AC1 et AC3 de l'interaction sont schématisées dans les deux tableaux suivants.

		Dose	
		5 %	20 et 50 %
Nature de la litière	épicéa	6,20	5,80
	chêne et hêtre	6,16	6,02

		Dose	
		20 %	50 %
Nature de la litière	épicéa	5,99	5,61
	chêne et hêtre	6,12	5,93

Il apparaît ici que l'effet de la dose de l'extrait est beaucoup plus marqué dans le cas de l'épicéa que dans celui des feuillus (chêne et hêtre), ce fait suggérant que les composés inhibiteurs qui interviennent n'ont pas la même constitution chimique.

On remarquera que les doses utilisées dans nos modèles expérimentaux sont relativement faibles puisque 1 ml d'extrait correspond à 0,1 g de feuille ; une dose de 20 pour cent d'extrait dans 100 ml de milieu de culture correspond donc à l'incorporation à ce milieu du produit de l'extraction de 2 g de feuilles seulement. D'autre part, l'extraction est de courte durée (30 minutes) et est toujours effectuée à l'eau froide. Bien entendu, le broyage accroît la quantité de composés hydro-solubles extraits ; mais, d'après NYKVIST (1963), cet accroissement est négligeable dans le cas des espèces feuillues. On peut donc penser, *a priori*, que la méthode d'extraction utilisée ici donne des résultats comparables à l'extraction *in situ* par les eaux de pluies percolant à travers les litières.

CONCLUSIONS

1. CONCLUSIONS D'ORDRE MÉTHODOLOGIQUE.

a) *Choix des tests destinés à mettre en évidence l'action des substances inhibitrices sur la microflore du sol.*

Pour étudier l'action des substances inhibitrices vis-à-vis des micro-organismes telluriques, on peut faire appel à quatre types de tests :

α) *Tests enzymatiques.*

On examine l'influence de la substance inhibitrice à tester sur une enzyme

donnée en présence du substrat correspondant (cf. par ex. MANDELS *et al.*, 1961 ; BELL *et al.*, 1962 ; BENOIT et STARKEY, 1968).

β) *Tests fondés sur l'utilisation de cultures microbiennes pures.*

— *Test de croissance* : la croissance peut être mesurée par enregistrement de la densité optique de la culture en milieu liquide (c'est la technique que nous avons adoptée ici pour le test de croissance de *B. megaterium*), par estimation, sur un milieu gélosé, du diamètre de la zone d'inhibition autour d'un disque de papier filtre imbibé de la substance présumée inhibitrice (c'est la technique des antibiogrammes ; voir par ex. : RICE, 1964), par évaluation du taux de germination de spores fongiques ou d'élongation des hyphes (voir par ex. : TOPPS et WAIN, 1957).

— *Test respirométrique* : on compare l'activité respiratoire d'une culture en présence ou en l'absence de la substance présumée inhibitrice.

γ) *Tests fondés sur l'utilisation de cultures microbiennes complexes.*

— *Test respirométrique* : le principe en est le même que dans le cas des cultures pures (cf. par ex. : BENOIT *et al.*, 1968) ;

— *Test fondé sur le dosage du produit final de métabolisme microbien* : c'est le test que nous avons adopté ici pour déterminer l'indice de nitrification (IN) ;

— *Test de croissance d'une micropopulation complexe* (IM) : le test original, qui a été mis au point à l'occasion de la présente étude, se différencie des deux tests évoqués ci-dessus par le fait que les micro-organismes testés se développent indépendamment les uns des autres.

δ) *Tests fondés sur l'utilisation du sol lui-même.*

— *Test respirométrique* : (cf. par ex. : LEWIS et STARKEY, 1968) ;

— *Test fondé sur le dosage du produit final de métabolisme microbien* : (voir par ex. : BASARABA, 1964).

Sur le plan synécologique, ces différents tests présentent une valeur très inégale. Il est bien évident que les tests les plus intéressants sont ceux qui sont fondés sur l'utilisation du sol lui-même. Mais ils sont beaucoup moins sensibles et leur interprétation est délicate ; c'est pourquoi, dans cette étude qui présente un caractère exploratoire, nous avons fait exclusivement appel à des tests fondés sur l'emploi de milieux synthétiques. On remarquera à ce sujet que les tests les plus fins sont le test de croissance de *B. megaterium* n° 63 (IB) et le test de nitrification (IN) ; la raison en est simplement que *B. megaterium* et les micro-organismes nitrificateurs appartiennent à des catégories de micro-organismes très sensibles à l'action des substances inhibitrices. Le test de croissance de la micropopulation complexe (IM) présente l'intérêt de mettre en évidence immédiatement les souches résistantes

et sensibles aux substances inhibitrices et de simuler le cloisonnement du sol en microhabitats où de nombreux micro-organismes se développent indépendamment les uns des autres.

b) *Nécessité de l'utilisation de dispositifs expérimentaux de type factoriel pour l'étude des facteurs régissant l'effet litière.*

Les résultats obtenus montrent que l'étude des facteurs régissant l'effet litière doit pouvoir mettre en évidence les interactions susceptibles d'exister entre ces facteurs, d'où la nécessité d'utiliser des dispositifs expérimentaux de type factoriel.

2. CONCLUSIONS D'ORDRE ÉCOLOGIQUE.

a) *Les organes frais de très nombreuses espèces arborescentes renferment des substances hydrosolubles inhibitrices vis-à-vis des micro-organismes.*

On connaît depuis longtemps la présence, dans les tissus végétaux, de substances antimicrobiennes hydrosolubles. Mais leur étude est passée au second plan au moment de la découverte des antibiotiques (NAGY et TENGEDY, 1967) et n'a porté qu'exceptionnellement sur les arbres (TOPPS et WAIN, 1957 ; MANDELS *et al.*, 1961 ; BELL, 1962 ; SENING, 1963). En outre, il faut noter que, parmi les auteurs qui se sont penchés sur ce problème, bien peu ont envisagé le cas des micro-organismes non pathogènes. Dans cette note, nous nous sommes contentés de vérifier rapidement la fréquence de l'activité inhibitrice des extraits aqueux de feuilles et écorces chez diverses espèces forestières de zones tropicale et tempérée. Le tableau II qui regroupe les résultats de notre inventaire montre qu'à la dose de 20 pour cent tous les extraits hydrosolubles d'organes végétaux frais testés inhibent *B. megaterium*, qu'il s'agisse d'espèces forestières feuillues ou de conifères ; à la dose de 5 pour cent deux extraits seulement font preuve d'un pouvoir inhibiteur réduit : l'extrait de feuilles de *Pinus sylvestris* et l'extrait d'écorce de *Melaleuca leucodendron*.

b) *Les litières d'espèces feuillues perdent progressivement leur activité inhibitrice après la chute des feuilles.*

Cette détoxification des feuilles après leur chute — étudiée ici seulement dans le cas de *Quercus petraea*, *Fagus silvatica* et *Carpinus betulus* est due soit au lessivage par les eaux de pluie des substances hydrosolubles inhibitrices, soit à leur biodégradation à la surface du sol, soit aux deux processus agissant conjointement.

tement. Un argument en faveur de cette dernière thèse réside dans le fait que les feuilles marcescentes subissent une détoxification beaucoup plus lente que les feuilles au sol (feuilles de la litière).

Il convient de rapprocher ces résultats des observations faites par BRUCKERT et JACQUIN (1966) dans une station très voisine de celle que nous avons étudiée ici. Ces auteurs ont montré qu'au cours de l'hiver, les litières de *Quercus petraea* s'appauvrissent considérablement en acides benzoïques et coumariques, composés dont on connaît le pouvoir inhibiteur vis-à-vis de certains micro-organismes ; ainsi la teneur en acide vanillique au mois d'avril représente seulement 29 pour cent de la teneur au moment de la chute des feuilles (novembre) ; en ce qui concerne l'acide *p*-hydroxybenzoïque et l'acide coumarique, les pourcentages correspondants sont respectivement 39 et 54.

Dans les litières de conifères, on constate aussi une baisse de la teneur en acides phénols au cours de l'hiver (HAYES, 1965 ; DUCHAUFOR *et al.*, 1968) et l'on peut supposer qu'une certaine détoxification se manifeste parallèlement ; mais nous n'avons encore aucune information précise concernant la vitesse de détoxification de ces litières.

Le processus de détoxification des litières revêt une importance considérable sur le plan écologique puisqu'il apparaît comme étant un préalable obligatoire à l'installation d'une vie microbienne active dans les litières.

L'apparition de substances stimulantes qui peut succéder à la phase de détoxification est plus difficile à expliquer ; dans l'état actuel de nos recherches il n'est pas possible de choisir entre l'une ou l'autre des deux hypothèses suivantes :

(1) si les feuilles renferment à la fois des substances inhibitrices et stimulantes pour la microflore et si les substances inhibitrices sont plus facilement lessivées que les substances stimulantes, ces dernières pourraient agir lorsque les substances inhibitrices ont disparu ;

(2) les micro-organismes de la litière produiraient des substances stimulantes.

c) *L'acidité du milieu renforce le pouvoir inhibiteur des litières.*

Dans une étude antérieure (BAUZON *et al.*, 1969) portant sur des échantillons de sol analysés immédiatement après leur prélèvement, on a montré l'existence d'une corrélation positive entre le pH et l'activité respiratoire du sol d'une part, entre le pH et l'activité enzymatique (saccharase et amylase) d'autre part. Cette observation suggère l'intervention du pH dans le processus de stabilisation de la matière organique des sols forestiers. L'expérience factorielle dont les résultats ont été exposés plus haut vient à l'appui de cette thèse et confirme les travaux de DAVIES *et al.* (1964) et BENOIT *et al.* (1968).

Comme les litières de conifères acidifient fortement le sol, on comprend très bien que les substances inhibitrices libérées par ces litières exercent un effet beau-

coup plus marqué sur la microflore que les litières d'espèces feuillues (chêne, hêtre, charme par exemple).

3. NOTION D'INHIBITION DIRECTE D'ORIGINE VÉGÉTALE ET D'ORIGINE MICROBIENNE.

Dans l'introduction, nous avons rappelé que la stabilisation de la matière organique dans les horizons de surface des sols forestiers (horizons hologaniques) pourrait s'expliquer — en partie tout au moins — soit par une *inhibition indirecte* de l'activité microbienne résultant de la protection des molécules biodégradables, soit par une *inhibition directe* résultant de l'action toxique sur les micro-organismes eux-mêmes ou sur les enzymes telluriques de substances inhibitrices d'origine végétale ou microbienne. Les résultats de la présente étude montrent que l'inhibition directe par intervention de substances inhibitrices d'origine végétale est possible. Mais cette intervention semble limitée aux sols acides et elle est assez fugace — tout au moins en ce qui concerne les litières d'espèces feuillues.

Pour expliquer l'accumulation de matière organique dans certaines stations, l'hypothèse de l'inhibition par les substances d'origine végétale est insuffisante ; il est nécessaire d'envisager l'intervention de substances inhibitrices d'origine microbienne. Des essais préliminaires nous ont révélé qu'effectivement des substances inhibitrices pouvaient être synthétisées par voie microbienne dans les litières incubées en anaérobiose. Les conditions écologiques régissant la synthèse de ces dernières, feront l'objet d'une publication ultérieure.

BIBLIOGRAPHIE

- BAUZON D., VAN DEN DRIESSCHE R., DOMMERGUES Y., 1969. — L'effet-litière I. Influence de la végétation forestière sur quelques caractéristiques biologiques des sols. *Œcologia Plantarum*, **4**, 99-122.
- BASARABA J., 1964. — Influence of vegetable tannins on nitrification in soil. *Pl. Soil*, **21**, 8-16.
- BELL T. A., ETCHHELLS J. L., WILLIAMS C. F. *et al.*, 1962. — Inhibition of pectinase and cellulase by certain plants. *Botanical Gazette*, Chicago, **123**, 220-223.
- BÉNÉ R., GIRARD Th., 1964. — Utilisation du « séparateur de germes » de Hauduroy dans l'isolement des germes telluriques. *Biologie du Sol*, **1**, 14-15.
- BENOIT R. E., STARKEY R. L., 1968. — Inhibition of decomposition of cellulose and some other carbohydrates by tannin. *Soil Sci.*, **105**, 291-296.

- BENOIT R. E., STARKEY R. L., BASARABA J., 1968. — Effect of purified tannin on decomposition of some organic compounds and plant material. *Soil Sci.*, **105**, 153-158.
- BRUCKERT S., JACQUIN F., 1966. — Relation entre l'évolution des acides hydrosolubles de deux litières forestières et les processus pédogénétiques. *Bull. Ec. natn. Super Agron.*, **8**, 95-112.
- COCHRAN W., COX G., 1957. — *Experimental designs*, 2^e édition, Wiley, New-York, London, 611 p.
- DAVIES R. I., COULSON C. B., LEWIS D. A., 1964. — Polyphenols in plant, humus, and soil. *J. Soil Sci.*, **15**, 299-309 ; 310-318.
- DOMMERGUES Y., DUCHAUFOUR Ph., 1966. — Caractérisations pédologiques et microbiologiques des stations lorraines R.C.P. 40. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, **3**, 533-547.
- DUCHAUFOUR Ph., VEDY J. C., BRUCKERT S., 1968. — Contribution à l'étude expérimentale *in situ* de l'évolution chimique et de l'altération d'un grès et d'un granite vosgien sous l'influence de deux types de litières. Evolution du carbone et de l'azote au cours du premier cycle de végétation. *Bull. A.F.E.S.*, **1**, 5-18.
- FINNEY D., 1947. — The construction of confounded arrangements. *Emp. J. Exp. Agric.*, **15**, 107-112.
- HANDLEY W. R. C., 1961. — Further evidence for the importance of residual leaf protein complexes in litter decomposition and the supply of nitrogen for plant growth. *Pl. Soil.*, **15**, 37-73.
- HAYES A. J., 1965. — Studies on the decomposition of coniferous leaf litter. I. Physical and chemical changes. *J. Soil Sci.*, **16**, 121-140.
- JUNG J., HUBBES M., 1965. — Growth inhibition of *Bacillus cereus* in vitro by glycosidal substances extracted from bark of *Fraxinus*. *Canad. J. Bot.*, **43**, 469-474.
- KIMBALL A., 1954. — Short-cut formulas for the exact partition of χ^2 in contingency tables. *Biometrics*, **10**, 452-458.
- LEWIS J. A., STARKEY R. L., 1968. — Vegetable tannins, their decomposition and effects on decomposition of some organic compounds. *Soil Sci.*, **106**, 241-248.
- MANDELS M., HOWLETT W., REESE E. T., 1961. — Natural inhibitors of cellulase. *Can. J. Microbiol.*, **7**, 957-959.
- MEIKLEJOHN J., 1953. — Iron and the nitrifying bacteria. *J. gen. Microbiol.*, **8**, 58-65.
- MEIKLEJOHN J., 1962. — Microbiology of the nitrogen cycle in some Ghana soils. *Emp. J. Exp. Agric.*, **30**, 115-126.
- MOSES L., OAKFORD R., 1963. — *Tables of random permutations*. Stanford Univ. Press, Stanford, 233 p.
- NAGY J. G., TENDERDY R. P., 1967. — Antibacterial action of essential oils of *Artemisia* as an ecological factor. I. — Antibacterial action of the volatile oils of *Artemisia tridentata* and *Artemisia nova* on aerobic bacteria. *Appl. Microbiol.*, **15**, 819-821.
- NYKVIST N., 1963. — Leaching and decomposition of water soluble organic substances from different types of leaf and needle litters. *Stud. For. Succ.*, **3**, 3-31.
- POCHON J., TARDIEUX P., 1962. — *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. Editions de la Tourelle, Saint-Mandé, 111 p.
- RICE E. L., 1964. — Inhibition of nitrogen fixing and nitrifying bacteria by seed plants. *Ecology*, **45**, 824-837.

- SAKAI H., 1964. — Determinative method for nitrification depressing power of chemicals in soil. *Biologie du Sol*, **1**, 1-2.
- SENING G., 1963. — The effect of aqueous leaf extracts in the autumn on the growth and activity of cellulose-decomposing microorganisms. *Zbl. Bakt.*, **117**, 13-40.
- TOPPS J. H., WAIN R. L., 1957. — Fungistatic properties of leaf exudates. *Nature*, London, **179**, 652-653.
- WINTER A. G., WILLEKE L., 1952. — Untersuchungen über Antibiotica aus höheren Pflanzen. *Naturwissenschaften*, **39**, 45-46 ; 190-191.
- YATES F., LIPTON S., SINHA P., DAS GUPTA K., 1959. — An exploratory analysis of a large set of $3 \times 3 \times 3$ fertilizer trials in India. *Emp. J. Exp. Agric.*, **27**, 263-275.