

T E C H N I Q U E S M O D E R N E S

D' E T U D E D E L A R H I Z O S P H E R E

Jean-Louis GARCIA

Rapport de stages effectués à
CADARACHE, PRAGUE et NANCY

1967

I N T R O D U C T I O N

Il est incontestable que la richesse d'un sol dépend de la microflore présente, comme il est vrai que l'augmentation du rendement des cultures est fonction des disponibilités en aliments organiques et inorganiques de ce sol. De ce fait, les facteurs d'accroissement de la valeur agricole d'un sol, sont directement liés aux techniques qui permettent d'une part, de mesurer d'une manière aussi exacte que possible, le transfert des matériaux (carbone, azote, phosphore...) du sol à la plante et inversement, et d'autre part, de déterminer l'activité enzymatique spécifique d'organismes communs du sol (bactéries nitrifiantes, dénitrifiantes, du phosphore, des nodosités etc...).

Dans ce mémoire, nous nous proposons de décrire certaines techniques modernes d'étude de la rhizosphère appliquées dans les laboratoires de microbiologie des sols :

- 1- autoradiographie
- 2- analyse chromatographique des exsudats racinaires
- 3- méthodes de perfusion et du flux continu
- 4- méthodes d'application foliaire
- 5- dosage des complexes enzymatiques du sol
- 6- respirométrie

A U T O R A D I O G R A P H I E

LABORATOIRE DE RADIO-AGRONOMIE

SECTION D'AUTORADIOGRAPHIE

CENTRE D'ETUDES NUCLEAIRES DE CADARACHE

SOUS LA DIRECTION DE L. KHAU VAN KIEN

Ce stage, d'une durée très limitée, a surtout consisté en une information sur les différentes méthodes d'autoradiographie employées par M. KHAU VAN KIEN :

- autoradiographie macroscopique;
- autoradiographie semi-macroscopique;
- histoautoradiographie microscopique.

Principe :

il s'agit de faire absorber à des plantules par voie foliaire, une solution d'orthophosphate marquée au ^{32}P , et d'examiner ensuite la plante dans son ensemble et en détail, en décelant la radioactivité par les points d'impact obtenus sur une émulsion photographique.

PROTOCOLE OPERATOIRE

Nous avons opéré sur des plantules d'orge au stade trois feuilles; après avoir soigneusement déterré les plants de la serre, on lave les racines pour enlever la terre aussi complètement que possible, puis on transplante dans des fioles d'erlenmeyer de 100 ml remplies aux trois quarts d'une solution minérale. Afin d'éviter toute contamination directe du milieu, celui-ci a été isolé par plusieurs feuilles d'aluminium, le pied des plantes étant entouré de coton. Un tuteur en fil de fer permet de maintenir les plantules dressées. La radioactivité est incorporée aux plantes par la voie de l'absorption foliaire, sous forme d'une solution d'orthophosphate marqué au ^{32}P , de deux façons différentes:

- pour le premier lot de trois plantules, on dépose la solution sur les feuilles sous forme de gouttes dont le volume a été déterminé: 1 ml donne 52 gouttes et contient 0,5 mc (millicurie), il y a donc environ 10 μc (microcurie) par goutte.

On additionne à la solution d'orthophosphate marqué, une solution d'albumine collante à volume égal, pour permettre aux gouttes déposées sur les feuilles, de s'y maintenir. Il faut penser à calculer l'acti-

.../..

tivité du ^{32}P à l'aide d'une abaque. On a déposé 7 gouttes par feuille, soit 210 μc pour le premier pot en 5 heures, 9 gouttes par feuille soit 270 μc pour le deuxième pot en 29 heures, 12 gouttes par feuille soit 360 μc pour le troisième pot en 53 heures. Un quatrième pot non traité constitue le témoin.

-Pour un deuxième lot de 3 plantules, on fait absorber la solution d'orthophosphate marqué et diluée au dixième par de l'eau distillée, par l'extrémité d'une feuille taillée en biseau et trempant dans un tube contenant la solution radioactive, pendant respectivement 5 heures, 29 heures et 53 heures. Un quatrième pot non traité constitue le témoin. Le passage du phosphore dans les racines et la solution minérale est grossièrement contrôlé au compteur. On passe alors aux déterminations autoradiographiques selon les techniques suivantes:

I- AUTORADIOGRAPHIE MACROSCOPIQUE

Quand le temps d'absorption prévu s'est écoulé, on extrait la plantule de son support et on la fixe dans l'azote liquide. Puis on l'étale entre deux feuilles de papier filtre en ajoutant quelques gouttes de formol. On place les feuilles entre deux plaques de verre, doublées de deux plaques de contreplaqué, et on dispose le tout à l'étuve pour la nuit avec un poids servant de presse. Le lendemain, on retire la plante qu'on colle ensuite sur une feuille de papier bristol, en évitant les bavures. On resèche quelques instants à l'étuve et on passe dans la chambre noire. En lumière rouge, on sort le film de son enveloppe, on l'applique sur le papier bristol, on recouvre le tout avec le papier jaune qui enveloppait la pellicule et on pique les quatre coins avec une aiguille pour maintenir l'ensemble fixe. Après avoir remis le tout dans l'enveloppe, on place celle-ci entre deux plaques de verre doublées de contreplaqué avec un poids servant de presse. On laisse alors la pellicule photographique s'impressionner pendant un temps variable, fonction de la dose radioactive absorbée. Puis on la sort de l'enveloppe dans la chambre noire, et on la passe successivement dans le révélateur, dans l'eau puis dans le fixateur, pour la développer. On lave à l'eau et on laisse sécher. On peut alors la rephotographier pour en réduire le format et obtenir une diapositive ou une photo.

L'autoradiographie macroscopique des plantes séparées du support rend compte de l'absorption du radiophosphore par les feuilles et de sa migration jusqu'aux racines. Le ^{32}P apparaît en noir sur la photo (fig. I).

II- HISTO AUTORADIOGRAPHIE MICROSCOPIQUE

Après des temps variables d'absorption de la solution d'ortho-phosphate marqué, on sectionne la tige des plantules au niveau du collet et on recueille un fragment de tige, de feuille pour coupe transversale, de feuille pour coupe longitudinale, des racines du collet et des racines terminales, pour chacune des trois méthodes d'inclusion qui seront ainsi comparées:

- inclusion dans du tissu animal et coupe au cryotome;
- inclusion dans la paraffine et coupe au microtome;
- inclusion dans la cire et coupe au microtome.

I- Inclusion dans du tissu animal

Elle est nécessaire pour effectuer des coupes au cryotome, car le tissu animal enrobe parfaitement l'objet à couper, lors de la congélation, permettant ainsi d'obtenir des coupes très fines. On emploie du foie ou du rein de rat de laboratoire. On inclut chaque organe à couper entre deux sections planes de tissu congelé, avec une goutte d'eau pour consolider le tout qu'on fixe sur le cylindre porte-objet du cryotome. Après congélation on taille l'organe avec une lame de rasoir et on effectue les coupes à -19°C à l'aide du cryotome. On recueille les coupes sur des lames ILFORD.

2- Inclusion dans la cire et la paraffine

La préparation des organes à couper est commune. On les place dans un godet contenant une solution de nitrate de cobalt pour précipiter le ^{32}P (nitrate de cobalt : 1%, formol : 15%, acide acétique : 1%, eau distillée q.s.p. 100ml, pH 4). On dispose les deux godets dans un dessiccateur et on fait le vide toute une nuit pour remplacer dans les tissus, les bulles de gaz par le liquide. Le lendemain on enlève le cobalt en excès par passage des organes dans l'eau distil-



Fig. I- AUTORADIOGRAPHIE MACROSCOPIQUE

Orge ayant absorbé ^{32}P par la voie foliaire ; passage dans les racines.

-lée. Le nitrate de cobalt a précipité le ^{32}P sous forme de phosphate aux endroits de sa localisation.

a- Inclusion dans la cire

La cire utilisée est soluble dans l'eau.

Caractéristiques commerciales :

APL/65 Michrome MP 56° C

WATER WAX for embedding tissues

Edward GURR Ltd

42, Upper Richmond Road West

London, S.W. 14

On prépare 50 ml de diverses dilutions de cette cire dans l'eau :

5% , 25% , 50% , 75% et 100%

qu'on fait fondre à l'étuve à 56° C. Puis on passe successivement les organes à couper 20 minutes dans chaque dilution de 5% à 75%, et une heure dans la cire à 100% additionnée de 5% de glycérine et de 5% d'eau, puis une autre heure dans du 100% neuf, en maintenant toujours les godets à l'étuve à 56° C. On coule la cire à 100% dans un moule disposé sur une plaque de verre, et on y introduit les organes à couper, d'après un plan défini à l'avance, à l'aide d'aiguilles chauffées pour faire fondre localement la cire. On laisse refroidir, on marque des repères, et on taille le bloc que l'on fixe ensuite au porte-objet du microtome, en chauffant légèrement celui-ci pour fondre localement la cire qui adhèrera au support en refroidissant.

On effectue des coupes de quelques microns d'épaisseur, en longs rubans qu'on dépose sur des lames ILFORD. On dispose les lames sur une platine chauffante (chauffage doux) pour fondre la cire. Pour améliorer l'adhérence des coupes sur les lames, on dépose au préalable une goutte d'une solution d'albumine collante qu'on étale avec le petit doigt. On laisse les lames refroidir à température ambiante, puis on les sèche entre deux feuilles de papier joseph et on les dispose sur une plaque recouverte de papier joseph, préparation contre le papier, qu'on place ensuite à l'étuve à 56° C pour la nuit. Le lendemain les lames sont prêtes pour l'autoradiographie.

.../...

b- Inclusion dans la paraffine

On passe successivement les organes à couper dans les solutions suivantes:

alcool 50° :	20 minutes
alcool 70° :	20 minutes
alcool 90° :	I heure
alcool 95° :	I heure
alcool 100° :	I heure
xyloï ou toluène :	10 à 15 minutes
paraffine molle :	I heure
paraffine dure :	2 heures

Pour obtenir la paraffine molle, on ajoute à la paraffine du commerce qui fond à 50°-52° C, 3% d'huile de paraffine; on obtient un mélange qui, fond à 47° C. La paraffine dure est obtenue en fondant puis en filtrant la citoparaffine du commerce (Prolabo) qui fond à 56°-58° C.

Puis on coule la paraffine dure dans un moule posé sur une plaque de verre enduite d'albumine et on inclut les organes comme pour la cire enns' aidant d'aiguilles chauffées et d'après le même plan d'inclusion. On marque des repères et on laisse refroidir avant de tailler le bloc et de fixer les différentes parties sur les porte-objets du microtome comme pour la cire. On colle les rubans de coupes sur des lames ILFORD avec quelques gouttes d'albumine collante et d'eau distillée, et on sèche après égouttage, sur une platine chauffante. On élimine ensuite la paraffine par passages successifs des lames dans le toluène, la série décroissante des alcools et l'eau.

Les trois séries de lames étant prêtes, on va procéder à l'opération la plus délicate : l'étalement de l'émulsion photographique sur les lames.

On opère en lumière rouge dans une chambre noire. Avant d'éteindre la lumière, on dispose ses instruments d'après un plan bien établi, sur la paillasse préalablement recouverte d'une feuille de papier noir:

- face à soi, un cube de verre qui servira de support pour l'opération;
- à sa gauche, un chiffon, une platine chauffante portant une spatule

.../...

et une grande boîte de Pétri remplie d'eau portée à 41° C et dans laquelle on place la boîte d'émulsion, une cuvette d'eau chaude;

à sa droite, un cristalliseur contenant le rouleau qui servira à étaler l'émulsion sur les lames (celui-ci est creusé d'une encoche de 25 microns et possède un butoir servant à obtenir un déplacement parallèle), une boîte pour ranger les préparations.

Après s'être accoutumé au noir, on ouvre la boîte d'émulsion; celle-ci est solide et sec présente sous la forme de petits macaronis (référence commerciale: ILFORD, nuclear research Emulsion in gel form, émulsion type G 5 -ESSEX-England). On la porte au bain-marie à 41° C. Puis on pose la première lame sur le support et on y dépose une goutte d'émulsion prélevée à l'aide de la spatule, et on l'étale rapidement avec le rouleau. On dépose alors la lame sur la paillasse pour permettre à l'émulsion de sécher et on recommence l'opération avec les lames suivantes. Après séchage, l'épaisseur de l'émulsion est finalement réduite à 6 microns. En fin d'opération on range les lames dans leur boîte qu'on emballe dans du papier noir pour mieux les protéger de la lumière. On place les boîtes dans un réfrigérateur pendant une durée variable, pour permettre l'impression de l'émulsion photographique par le rayonnement du ³²P.

Il ne faut pas oublier de contrôler l'émulsion avant usage : on doit observer moins de 20 grains au microscope, grossissement 1000, dans le champ, après étalement sur une lame et fixation.

Toujours en chambre noire, on développe l'émulsion par passages successifs des lames dans :

- révélateur D 76 : 3 à 5 minutes;
- eau : rinçage;
- fixateur : 10 minutes.

Puis on les lave à l'eau et on les sèche; on les colore ensuite à l'érythrosine ou au bleu de toluidine, on les monte au baume du Canada ou au sirop d'apathy. On observe au microscope et on photographie : le radio-phosphore apparaît sous forme de points ou de tâches noirs (fig. 2-3-4-5 & 6)



Fig. 2- AUTORADIOGRAPHIE MICROSCOPIQUE

Section longitudinale de feuille d'Orge ; inclusion à la cire.

Absorption racinaire.

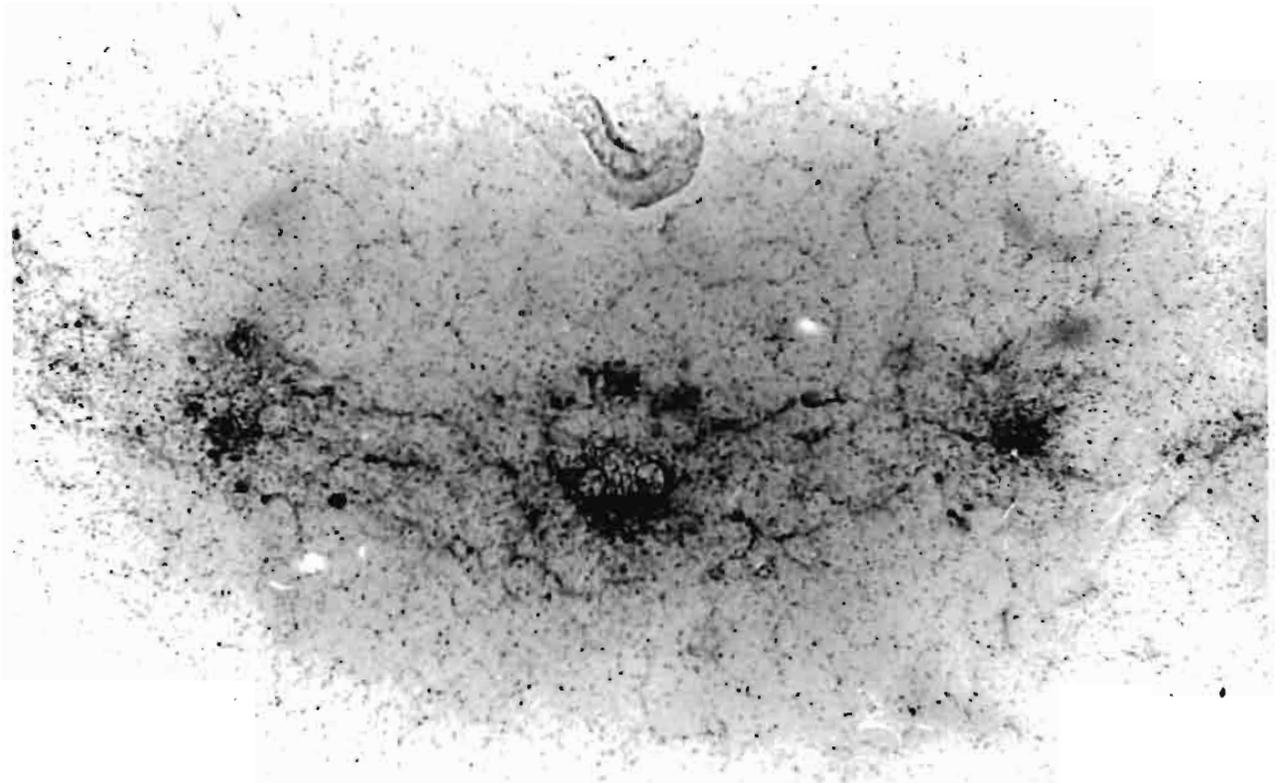


Fig. 3- AUTORADIOGRAPHIE MICROSCOPIQUE

Section transversale de feuille d'Orge ; coupe au cryostat.

Absorption racinaire.



Fig. 4- AUTORADIOGRAPHIE MICROSCOPIQUE

Section longitudinale de racine d'Orge ; inclusion à la cire.

Absorption racinaire.

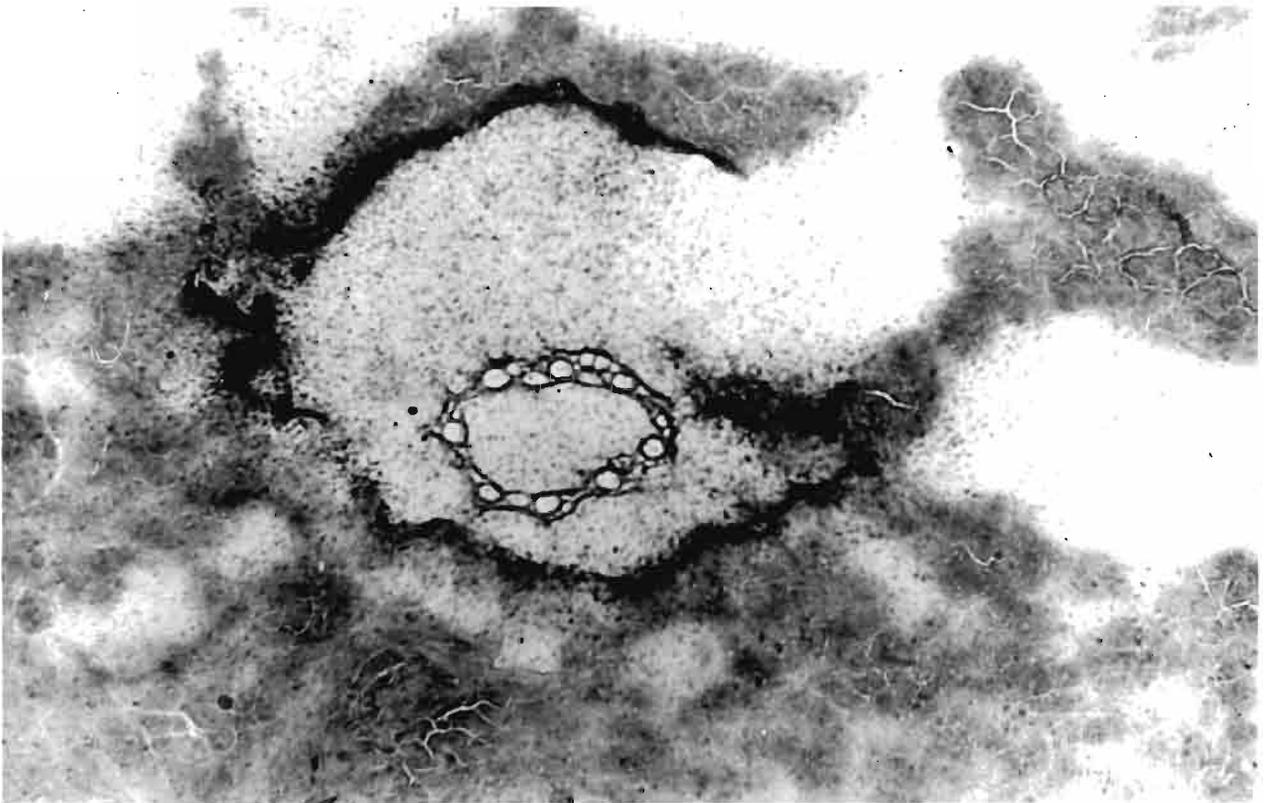


Fig. 5- AUTORADIOGRAPHIE MICROSCOPIQUE

Section transversale de racine d'Orge ; inclusion dans du foie
d'animal et coupe au cryostat.

Absorption racinaire.

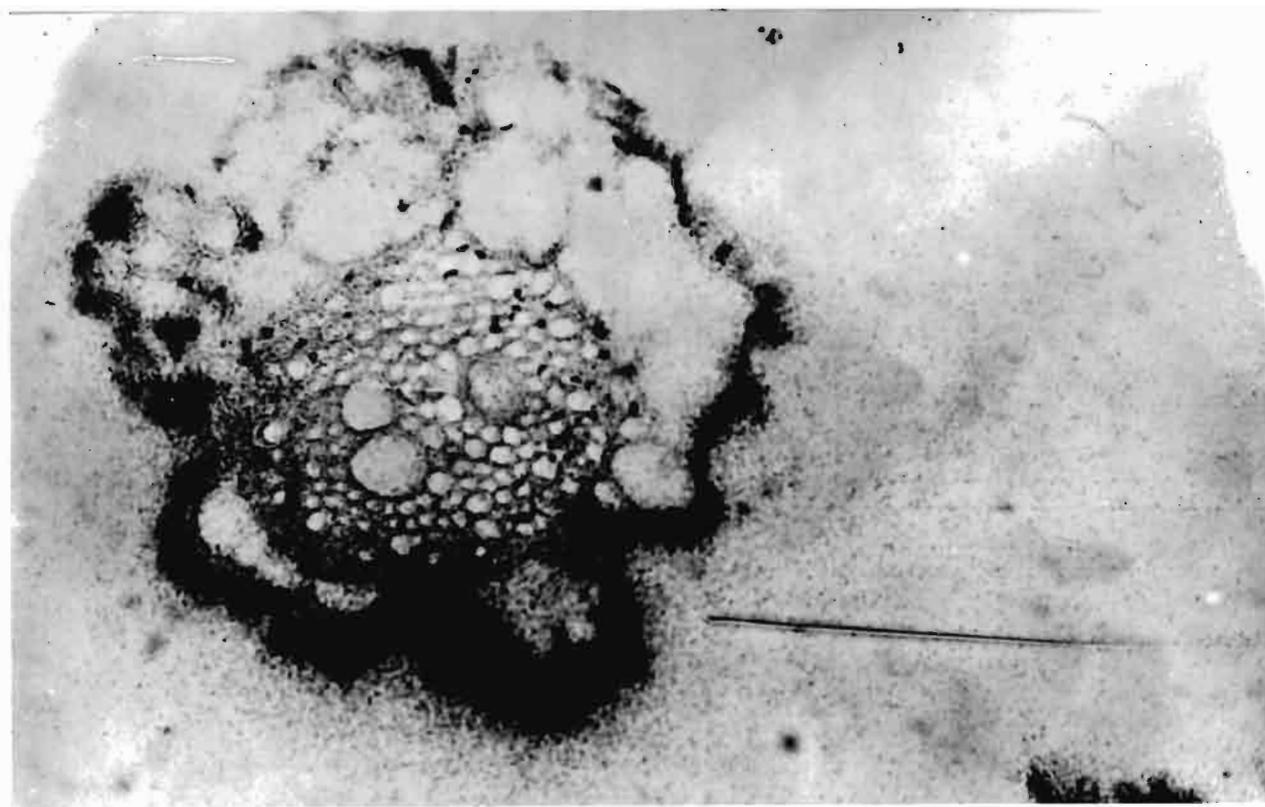


Fig. 6- AUTORADIOGRAPHIE MICROSCOPIQUE

Section transversale de racine d'Orge ; inclusion à la cire.

Absorption racinaire.

III. AUTORADIOGRAPHIE SEMI-MACROSCOPIQUE

Cette méthode, qui a fait l'objet d'une publication par KHAU VAN KIEN a u colloque de Vienne sur l'emploi des radioisotopes dans les études phytotrophiques et phytophysologiques, 5 - 6 septembre 1966, m'a seulement été exposée par son auteur. Elle a pour but d'étudier l'exudation racinaire dans le sol après absorption foliaire de ^{32}P . La principale difficulté d'une telle étude est d'obtenir des coupes histologiques non perturbées de l'association racelles-sol, sachant que ce dernier est constitué par des particules de taille et de dureté variables. Il faut donc préparer des milieux de culture artificiels, sans grains durs, mais possédant une structure poreuse aussi semblable que possible à celle des sols naturels.

Les milieux de culture utilisés par l'auteur, sont à base de kaolin ou d'autres argiles, finement pulvérisés et tamisés. Ces matériaux sont ajoutés progressivement à l'eau avec un nouet de gaze pour éviter la prise en masse. Après plusieurs lavages par décantation, on égoutte au maximum. A la pâte épaisse on incorpore, à raison d'une partie pour dix de terre humide en volume, une solution aqueuse de gélatine à 10% additionnée de milieu de KNO₃P à concentration convenable, le taux de phosphate étant réduit au 1/10^e. On mélange et brasse longtemps pour incorporer le maximum d'air. Il en résulte une pâte épaisse et onctueuse, dont on remplit des pots en polyéthylène de 50 ml. On sèche jusqu'à consistance ferme, mais souple, une légère pression du doigt devant laisser un creux. La masse démoulée est fendue par le milieu; on y insère les racines de la plante à étudier, puis on ressoude les deux bords de la fente. Les racines qui se développeront ensuite restent à proximité du plan de séparation repéré sur la paroi du pot. Les pots sont disposés dans des conditions climatiques convenables. Les plantes germées sur sol naturel ont été prélevées avec précaution, lavées soigneusement à l'eau, puis partiellement stérilisées par trempage de quelques secondes dans l'éther éthylique. Ce traitement laisse suffisamment de germes pour qu'une flore se reconstitue au contact des racines après 8 à 10 jours.

Quelques jours après la transplantation, une solution d'orthophosphate marqué au ^{32}P est déposée sur les feuilles sous forme de gouttes. Ce radioélément a été choisi surtout en raison du fait que la fraction

organique des exsudats racinaires est composée principalement de glucides phosphorés, de phospholipides, de protéines phosphorées, d'acides aminés en relation avec des carbonyl-phosphates, etc...

Afin d'éviter toute contamination directe du sol, on l'isole par plusieurs feuilles d'aluminium, le pied des plantes étant entouré de coton vaseliné et la base des pétioles, badigeonnée de silicone. Le passage du phosphore dans les racines et le sol est grossièrement contrôlé au compteur. Puis, après un temps donné, la plante est rapidement congelée dans son pot par l'azote liquide.

I- Autoradiographie d'une section de sol et de racines

Après retour progressif à une température de -2° C, on dépose et taille grossièrement le bloc de terre pour lui donner la forme d'un parallélépipède rectangle dont l'une des faces est parallèle au plan des racines. On sépare les feuilles.

Un moule métallique rectangulaire d'un volume environ 4 fois plus grand que celui du bloc et de hauteur légèrement inférieure à celui-ci, est placé sur de l'azote liquide. Le bloc est déposé au milieu du moule le plan des racines étant horizontal et légèrement au-dessus du bord du moule. On verse très lentement dans le moule de l'eau qui se congèle au fur et à mesure, jusqu'à ce que le bloc soit complètement inclus dans la glace. Le moule est ensuite fixé sur un support solide entre deux pains de carboglace; on rafe le bloc de glace au moyen d'une fraiseuse électrique ou, à défaut, d'une rape à métaux, périodiquement refroidie, jusqu'au plan des racines. La surface est ensuite polie avec du papier filtre ou un chiffon propre, puis nettoyée à l'éther de pétrole. On pratique une autoradiographie sur film kodirex protégé par une feuille de mylar de 6μ d'épaisseur, la préparation étant maintenue sous presse à l'obscurité, à -20° C, pendant 6 à 13 jours selon la dose de ^{32}P .

Cette méthode ne renseigne que très imparfaitement sur la localisation du phosphore dans les racines et le milieu environnant en raison de la faible probabilité de trouver une racine allongée dans le plan de l'unique section obtenue pour chaque plante. Le radiophosphore apparaît sous forme de taches ou d'amas irréguliers, correspondant à l'intersection de racines avec le plan d'observation ou à des exsudats.

.../...

2- Technique histoautoradiographique

Les pots sont congelés à -28° C, pendant une heure au moins. On revient comme précédemment à une température moins basse (-2° C environ) pour prélever les échantillons. Le milieu de culture congelé est découpé en petits parallélépipèdes ($1 \times 1 \times 0,5$ cm environ) dans les zones des grosses, moyennes et petites racines d'après le repère. Les fragments taillés en tronc de pyramides sont fixés sur les porte-blocs du cryotome et ramenés à la température de -28° C. Des coupes d'épaisseur régulière de 5 à 8 μ , sont obtenues ensuite au voisinage de -17° C, et recueillies sur des lames ILFORD enduites extemporanément de colle à l'albumine pour augmenter l'adhérence. On parachève l'étalement en pressant sous papier filtre. Après séchage à l'air, on recouvre les coupes de procelloïdine (3 couches d'une solution à 1% d'alcool éther). L'émulsion coulable G5 ILFORD est alors étalée à l'obscurité avec un rouleau de 25 μ . Les coupes sont ensuite conservées à l'obscurité et au froid (0° C pendant 15 à 20 jours). Après développement, les lames sont montées avec du sirop d'apathy. On peut aussi les colorer à l'érythrosine ou au bleu de toluidine avant le montage. C'est cette méthode qui fournit le plus d'images intéressantes de la distribution du radiophosphore dans les racines et de son exsudation dans le milieu, grâce au grand nombre de coupes autoradiographiques qu'elle permet d'examiner au microscope pour chaque plante. On peut examiner des plantes cultivées sans précaution d'aseptie, pour voir les bactéries ou autres microorganismes en relation avec les exsudats.

3- Conclusions de l'auteur

Dans les racines de grand diamètre, on peut observer sur leurs sections longitudinales, obliques ou transversales une concentration de la radioactivité particulièrement importante dans la zone centrale, surtout dans les vaisseaux du bois (fig. 7). La localisation du radiophosphore est plus diffuse dans les cellules du parenchyme cortical, mais plus marquée au niveau des noyaux.

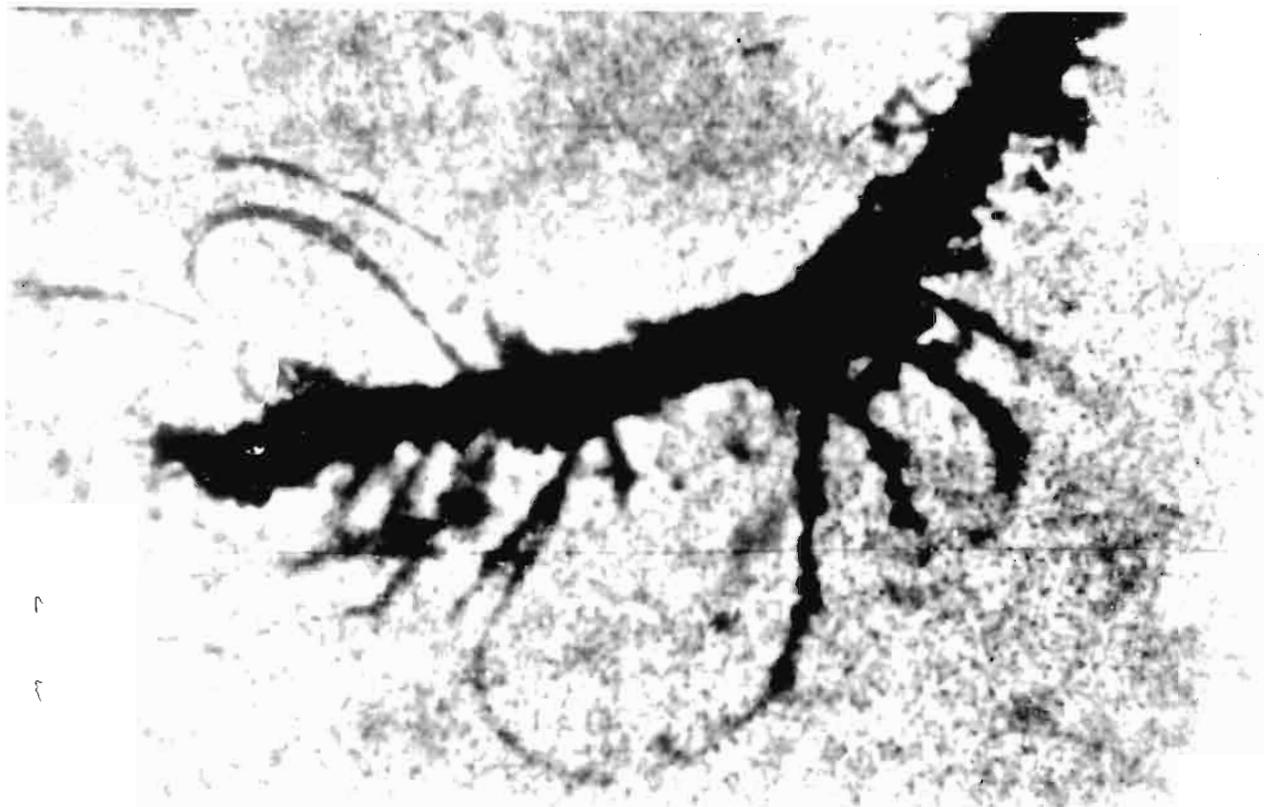


Fig.7- AUTORADIOGRAPHIE MICROSCOPIQUE
Racines en place dans le sol avec exsudation de ^{32}P dans le milieu ambiant; coupe au cryostat.

Aux points d'émission des radicelles, les zones corticales des grosses racines sont fréquemment plus marquées. Les localisations les plus intéressantes se voient au niveau des radicelles et des zones terminales des racines où le ^{32}P est moins concentré, ce qui facilite les observations histologiques et cytologiques. La migration du phosphore n'apparaît pas continue dans la longueur des racines, mais semble résulter de pulsations plus ou moins périodiques.

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE
DES EXSUDATS RACINAIRES

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE DU SOL
INSTITUT DE MICROBIOLOGIE DE PRAGUE
ACADEMIE TCHECOSLOVAQUE DES SCIENCES

SOUS LA DIRECTION DE V. VANCURA

I- Matériel et Méthodes

I- Obtention des exsudats racinaires

La méthode consiste à cultiver stérilement des plantules sur du sable et à recueillir les exsudats racinaires par lavage du support à l'eau distillée. Nous avons utilisé des semences de MILLET *Panicum miliaceum* L., var. "Hanàckè", récoltées en 1966 en Tchécoslovaquie.

a- Préparation des boîtes de culture

On prépare tout d'abord le sable en le lavant dans une solution concentrée d'acide chlorhydrique, puis en le rinçant trois fois de suite dans de l'eau distillée. On le sèche ensuite à l'étuve à 105° C. On répartit le sable dans des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml et on l'imbibe d'eau distillée, de façon à l'amener à 60% de sa capacité maximum de rétention. On stérilise trois fois de suite à l'autoclave à 120° C pour détruire efficacement toutes les spores. On stérilise d'autre part à l'étuve de poupinel les boîtes de verre cylindriques requises (diamètre 14 cm, hauteur 10 cm) munies de leur couvercle. Puis on dispose stérilement dans chaque boîte, une couche de sable humidifié.

b- Stérilisation des semences

Cette méthode, préconisée par KORENJAKO, consiste tout d'abord en un lavage soigneux et prolongé des graines à l'eau du robinet, en éliminant celles qui flottent ou s'agglomèrent entre elles pour former des grappes. Puis on les stérilise dans une fiole d'Erlenmeyer de 2 L, contenant 1 L d'une solution aqueuse stérile de $HgCl_2$ à 0,1% , pendant 15 à 20 minutes, en agitant de temps en temps. On les lave ensuite plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile pour faire disparaître toute trace de mercure, et on les transfère stérilement dans les boîtes de verre, à raison d'environ 500 graines par boîte.

.../...

On les étale uniformément sur toute la surface et on répartit une fine couche de sable humide par dessus. On place alors les boites dans une serre à 25-30° C, en ayant soin de les humidifier chaque jour avec de l'eau distillée stérile.

c- Récolte des exsudats racinaires

Après 12 jours, quand les plantules ont atteint le couvercle des boites, on sépare l'ensemble en deux lots:

-premier lot: on enlève les couvercles et on laisse les plantules se dessècher jusqu'à un degré qui leur permettra cependant de repartir après humidification. Cette rehumidification est faite avec de l'eau distillée stérile et les plantes sont laissées ainsi pendant une période n'excédant pas 12 heures. Puis on opère comme pour le deuxième lot.

-deuxième lot: les couvercles des boites ne sont ôtés que lors de la récolte des exsudats. Pour cela, on enlève systématiquement tous les résidus des graines et la partie aérienne des plantules, et on lave le sable avec les racines sur un filtre büchner sous vide, avec 100 à 200 ml d'eau distillée stérile. Le filtrat sera utilisé pour laver successivement le sable de toutes les boites. En fin d'opération, on a ainsi recueilli 500 ml d'un liquide brun-orangé pour les 11 boites du premier lot et environ 350 ml pour les 8 boites du deuxième lot. Ces deux solutions qui contiennent les exsudats racinaires, sont centrifugées séparément deux fois de suite pendant 30 minutes à 4.000 tours/minute. On recueille le surnageant et on élimine l'eau par lyophilisation (congélation dans l'éthanol à -40° C puis sublimation par vide de 0,1 mm de mercure pendant 20 heures). Le résidu est broyé dans un mortier d'agate et conservé dans un flacon à couvercle rodé, dans un dessiccateur contenant de la potasse en pastilles. Le même procédé peut être appliqué au sable non planté pour contrôler l'absence de matière organique.

2- Analyse des exsudats racinaires

On doit déterminer les données suivantes:

- humidité (poids sec)
- substances minérales (cendres)
- substances réductrices
- azote total.

Les acides volatils sont directement déterminés dans la solution obtenue après lavage du sable, avant évaporation de celle-ci. Tous les autres corps sont estimés par des méthodes chromatographiques.

On peut estimer le pourcentage d'exsudats racinaires par rapport :

- au poids sec de la partie aérienne des plantes qu'on obtient après séjour d'une nuit à l'étuve à 105° C;
- au poids sec de racines qu'on obtient après lavage et élimination du sable, et séjour d'une nuit à l'étuve à 105° C ;
- , - par plante en comptant le nombre de graines germées.

Il suffit dans les deux premiers cas, de faire le rapport des deux poids secs. On trouve habituellement pour le blé ou l'orge, un rendement de 0,5 mg par plante, ce qui représente 7 à 10% du poids sec de la partie aérienne.

Avant de commencer le fractionnement des exsudats racinaires, on prépare 6 chromatogrammes avec du papier Whatman n° I. Il faut avoir soin de recouvrir la paillasse avec du papier filtre et de porter des gants de plastique. Les chromatogrammes sont découpés dans le sens de la largeur de la feuille de papier Whatman et ont 27 cm de large. On trace au crayon une ligne à 9 cm du bord supérieur, et une autre à 3 cm du bord inférieur qui va servir de base à la découpe de l'extrémité en 9 triangles de 3 cm de base (fig.8). On lave les chromatogrammes à l'eau distillée pendant une nuit par chromatographie descendante.

a- Fractionnement des exsudats racinaires en familles de composés.

Avant de pouvoir analyser la composition des exsudats par chromatographie sur papier, on doit les fractionner par échange d'ions en trois familles de composés :

.../...

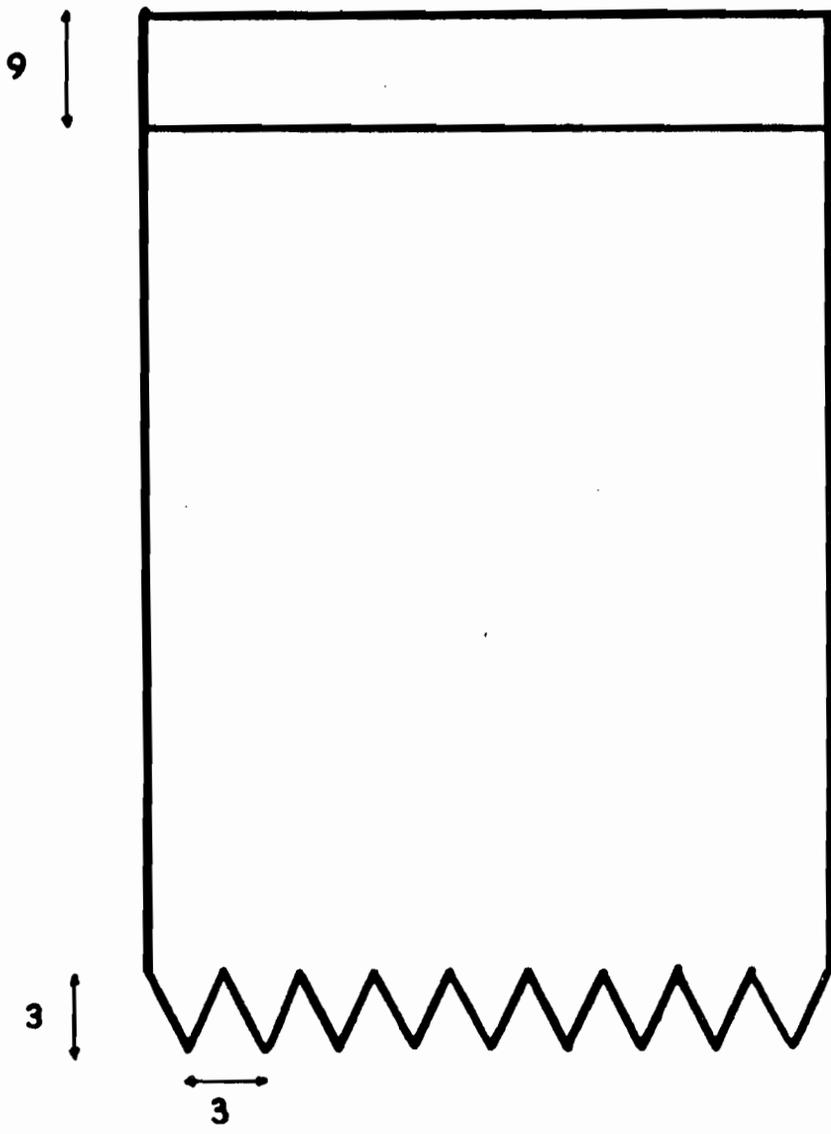


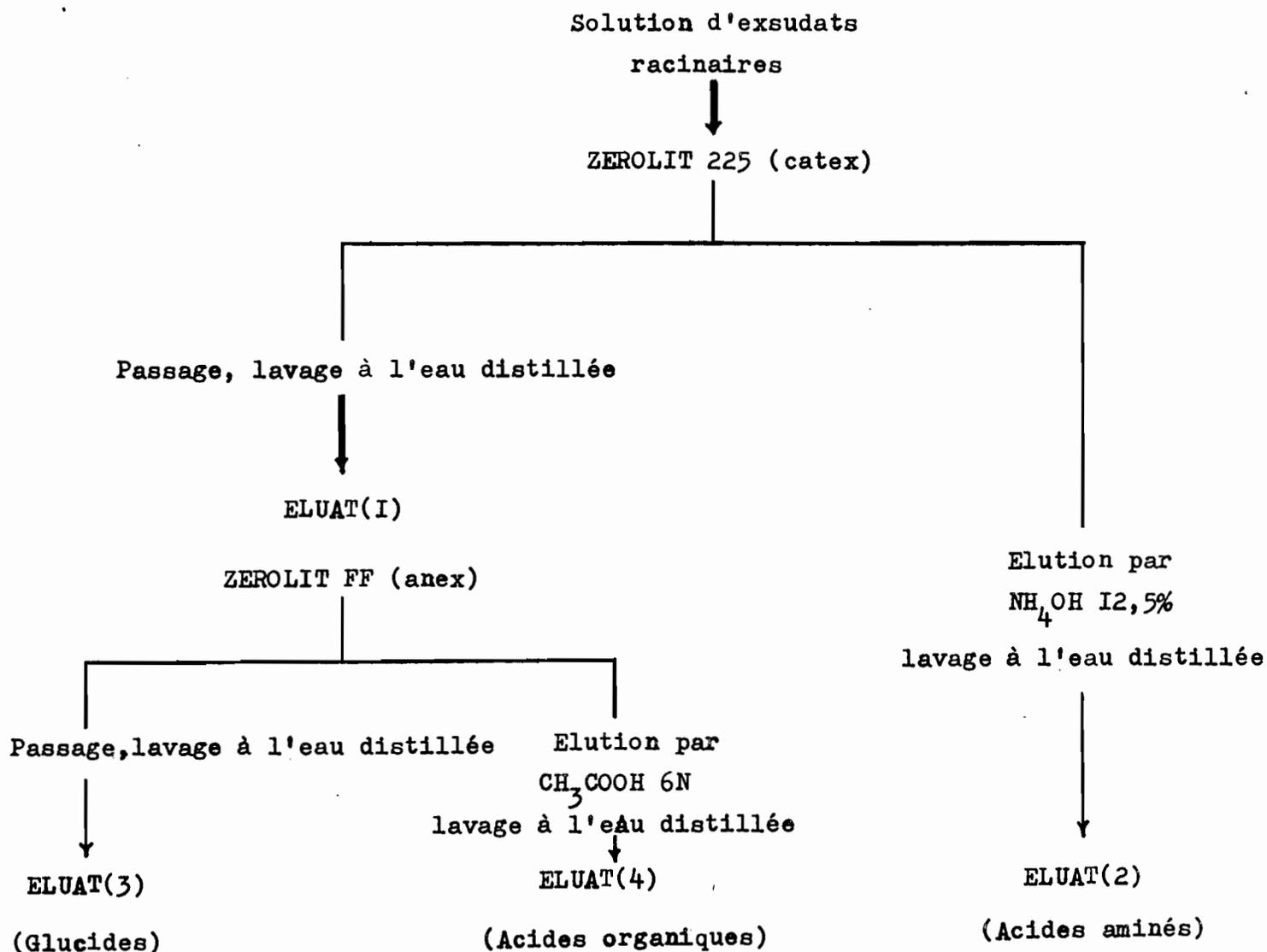
fig. 8 - Chromatogramme

- acides aminés
- acides organiques
- glucides .

Principe: 100 mg d'exsudats racinaires sont dissous dans 20 ml d'eau distillée, puis séparés par passages successifs sur deux colonnes contenant chacune une résine échangeuse d'ions différente (fig.9) :

- en substances adsorbées sur résine cationique (catex),
- en substances adsorbées sur résine anionique (anex),
- en substances neutres non adsorbées sur les deux résines.

Les deux premières fractions sont ensuite recueillies par élution.



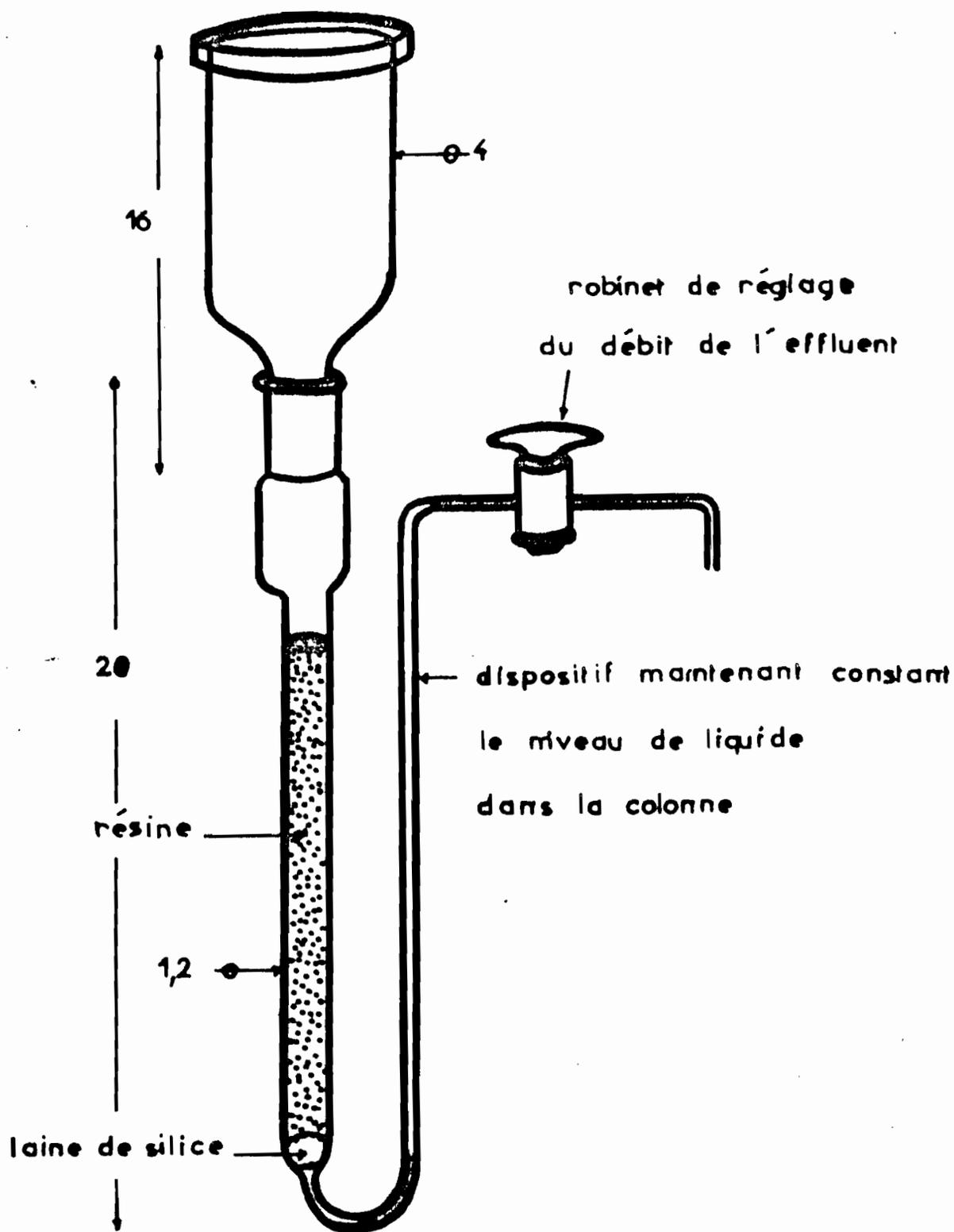


fig 9 - Colonne échangeuse d'ions

✕ -Les acides aminés sont isolés sur la résine cationique Zerolit 225 (identique à la Permutite 50), acide "fort" dont le groupe actif est $C_6H_4SO_3H$ (fabricant: United water softeners, Gunnersburg ave., Londres W4). Cette résine est mise sous forme de sel de sodium avant usage, par la méthode suivante:

on la place dans une fiole d'Erlenmeyer contenant 150 ml d'une solution aqueuse de soude à 4% et on la laisse macérer pendant une nuit, puis on la lave avec 300 ml d'eau distillée (le pH final est 6,0). On élimine l'eau et on ajoute 150 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 4% qu'on laisse en contact 3 à 4 heures avec la résine, puis on lave à nouveau à l'eau distillée jusqu'à obtention d'une réaction négative avec le nitrate d'argent (plus d'ions Cl).

La vitesse de passage de la solution aqueuse renfermant les exsudats racinaires doit être d'une goutte toutes les 15 à 30 secondes.

L'éluat (1) est recueilli dans une fiole d'Erlenmeyer de 500 ml et passé après lavage de la résine cationique par 50 ml d'eau distillée, sur la colonne contenant la résine anionique.

Les acides aminés sont élués par 100 ml d'une solution aqueuse d'ammoniaque à 12,5% et on lave de nouveau la colonne avec 50 ml d'eau distillée. L'éluat (2) est transféré dans une capsule et évaporé dans un courant d'air chaud obtenu avec une lampe à infra-rouge et un ventilateur, jusqu'à obtention d'un résidu sec.

β -Les acides organiques sont adsorbés sur la résine anionique Zerolit FF (identique à la Déacidite FF), base "forte" à groupe ammonium quaternaire $N(CH_3)_3^+Cl^-$ (fabricant: UWS). On doit mettre cette résine sous forme de formiate avant usage:

l'échangeur sous forme de chlorure, tassé dans la colonne de verre, est lavé par un lent courant de 5 ml de solution (3M) de formiate de sodium (20,4 g dans 100 ml d'eau), jusqu'à disparition de toute trace de chlorure dans l'effluent, puis le sel est éliminé par lavage à l'eau distillée (100 ml). Juste avant l'emploi, l'échangeur est lavé par 50 ml d'une solution (6N) d'acide formique (31,2 ml d'acide à 85% dans 100 ml d'eau), puis à l'eau distillée jusqu'à neutralité.

Après passage de l'éluat (1) sur la colonne et lavage par 50 ml d'eau distillée, on transfère l'éluat (3) qui en résulte, dans une capsule et on évapore comme précédemment.

On élue ensuite les acides organiques retenus par l'échangeur anionique par une solution (6N) d'acide formique, et on lave à nouveau avec 50 ml d'eau distillée. Puis on transfère cet éluat (4) dans une capsule pour l'évaporer.

Y - Les glucides sont localisés dans l'éluat (3), solution neutre recueillie après passages libreset successifs sur les deux échangeurs.

Remarque: on peut également employer d'autres types de résines:

acides "forts"	Amberlite IR I20
	Dowex 50 (standard)
bases "fortes"	Amberlite IRA 400
	Dowex I (standard)

On recueille ensuite chaque résidu d'évaporation dans un petit tube étiqueté, à l'aide de 2 ml d'une solution aqueuse à 50% d'éthanol. On dissout le résidu avec un agitateur de verre en employant 0,5 ml de solvant à chaque fois. Les solutions ainsi obtenues sont conservées au réfrigérateur, et prêtes à être analysées par chromatographie sur papier.

b- Analyse chromatographique des exsudats racinaires

On opère par chromatographie descendante dans des enceintes de verre. Chaque famille de composés est analysée sur un chromatogramme différent, qu'on dispose dans des enceintes distinctes contenant un solvant approprié. Sur la ligne tracée au crayon sur le papier chromatographique, on dépose en des points équidistants, à l'aide de micropipettes, deux quantités différentes des deux solutions à analyser, et deux ou trois solutions standard de composés à Rf connu.

-Les acides aminés sont déterminés dans la fraction adsorbée sur la résine cationique.

On dépose sur le chromatogramme 50 µl et 100 µl de la solution à analyser. Les solutions standard sont réalisées pour chaque composé à la concentration de 0,5% dans une solution aqueuse à 50% d'éthanol. On dépose sur le chromatogramme 2 µl de chacune des solutions standard suivant le plan ci-dessous:

-solutions standard I :

cystine

.../...

asparagine
 citrulline
 acide glutamique
 proline
 acide γ amino-butyrique
 valine
 iso-leucine

-solutions standard 2 :

lysine
 acide aspartique
 sérine
 hydroxyproline
 α -alanine
 proline
 methionine
 phenylalanine

-solutions standard 3 ;

ornithine
 arginine
 glutamine
 glyocolle
 thréonine
 proline
 tyrosine
 leucine

On prépare habituellement 5 ml de solution pour chaque corps et on les conserve au réfrigérateur dans des petits tubes à essai étiquetés. Il faut contrôler leur pureté avant usage, par l'absence de trouble.

Nous avons donc 7 points de dépôt sur le chromatogramme, 3 pour les solutions standard et 4 pour les solutions à analyser. On dispose le papier dans l'enceinte de chromatographie qui contient dans le fond comme dans le bac dans lequel trempe le sommet du chromatogramme, le même solvant dont la composition est:

n butanol	4 parties
acide acétique	1 partie
eau distillée	1 partie

.../...

Le chromatogramme est placé 4 fois de suite dans l'enceinte, le front du solvant devant dépasser chaque jour celui de la veille pour séparer nettement les composés, ce qui demande 7 à 9 heures. La vitesse de déplacement du solvant dépend de la température dont l'optimum est de 20° C. Le chromatogramme est ensuite suspendu dans la haute et sèche durant la nuit. La révélation se fait par simple passage du chromatogramme dans une solution à 0,2% de ninhydrine dans l'acétone. Puis on le suspend pour évaporer l'acétone et on le sèche quelques minutes à l'étuve à 105° C.

Tous les acides aminés réagissent à froid habituellement au bout de 3 heures et donnent des taches pourpres sauf pour certains comme la proline (jaune) et l'asparagine (marron). Si un corps se colore après chauffage mais non après être resté une nuit à température ambiante, ce n'est certainement pas un acide aminé en α .

Les acides forts fumants (HCl , HNO_3) affectent la stabilité de la coloration par la ninhydrine: les taches bien formées pâlisent et celles qui se forment n'apparaissent pas complètement. Cet effet est annulé par l'incorporation de pyridine dans le révélateur

Un chromatogramme révélé à la ninhydrine peut être préservé comme suit:

on trempe le papier dans une solution de nitrate de cuivre (1 ml d'une solution aqueuse saturée de nitrate de cuivre dans 100 ml d'éthanol absolu + 0,2 ml d'une solution aqueuse à 10% de HNO_3); la coloration tend vers un rose-rouge qui est stable pour plusieurs mois.

On localise les taches au crayon et on photographie le même jour, après avoir découpé le chromatogramme pour en réduire la surface.

Si on décèle la présence de sels sur le chromatogramme, il faut dessaler la solution avant de recommencer la chromatographie. Pour cela, on place l'échantillon liquide dans une petite coupelle de verre, en évitant d'entraîner le dépôt qui s'est formé au fond du tube. On évapore la solution sous une lampe à infra-rouge avec ventilation, et on extrait le résidu cinq fois de suite avec 3 ml d'une solution 6N (24%) d'acide chlorhydrique à 5% (3 ml) dans 60 ml d'acétone. On transvase dans une autre coupelle de verre en évitant d'entraîner le précipité de sels. On ajoute 0,5 ml d'eau distillée et on évapore comme précédemment. Quand il reste 3 ml environ, on ajoute 1 ml d'eau distillée pour s'assurer que tout le chlore est bien éliminé. Puis on extrait le résidu avec 1,5 à 2 ml d'une solution aqueuse à 50% d'éthanol; on peut alors recommencer l'analyse chromatographique.

-Les acides organiques sont déterminés dans la fraction adsorbée sur la résine anionique. On dépose 100 μ l et 150 μ l de cette fraction sur le chromatogramme, ainsi que les solutions standard suivantes:

-solution standard 1 :

acide citrique	10 μ l
- malique	-
- glycollique	-
- lactique	-
- malonique	-
- fumarique	-

-solution standard 2 :

acide citrique	10 μ l
- tartrique	-
- malique	-
- lactique	-
- fumarique	-

-solution standard 3 :

acide oxalique	30 μ l
- malique	10 μ l
- glycollique	-
- lactique	-
- succinique	-
- fumarique	-

Le solvant de chromatographie, n butanol/acide formique/eau distillée (4:1:5), est placé dans une ampoule à décanter d'un litre et laissé reposer une nuit, après agitation vigoureuse. Le surnageant, solution pure et claire, est placé dans le bac, et la solution trouble inférieure, dans le fond de l'enceinte à chromatographie, pour saturer l'atmosphère en ~~but~~ butanol, et éviter ainsi une diminution de sa concentration dans la phase aqueuse. On élue le chromatogramme deux fois de suite pendant 7 à 9 heures et on le révèle en vaporisant la solution suivante, qu'il faut préparer avant usage:

-glucose	5g
-éthanol absolu	50 ml
-eau distillée	50 ml
-aniline	5 ml

On sèche pendant quelques minutes à l'étuve à 105° C, tout en surveillant pour que le papier ne prenne pas une teinte brune.

γ-Les glucides sont déterminés dans la fraction neutre des exsudats racinaires. On dépose 25 et 50 µl pour chaque solution, et en deux points, les solutions standard suivantes:

-solutions standard 1 :

raffinose	10 µl
saccharose	-
maltose	5 µl
galactose	-
glucose	-
fructose	-
ribose	-
xylose	-
rhamnose	-

-solutions standard 2 :

maltose	5 µl
galactose	-
glucose	-
arabinose	-
xylose	-
ribose	-
rhamnose	-
desoxyribose	-

-solutions standard 3 : (occasionnellement)

identique à S_I sans saccharose ni maltose, mais avec cellobiose.

Toutes ces solutions sont aussi à 0,5% dans une solution aqueuse à 50% d'éthanol.

Le solvant est obtenu comme pour les acides organiques en mélangeant les composés suivants: n butanol/pyridine/benzène/eau distillée dans la proportion (5:3:1:3). Le surnageant est utilisé dans le bac et la solution inférieure, dans le fond de l'enceinte.

Le chromatogramme est développé quatre fois de suite pendant 7 à 9 heures, et révélé par trempages successifs dans des bacs métalliques contenant les solutions suivantes:

.../...

- 2,5 ml d'une solution aqueuse saturée de NO_3Ag + 1000 ml acétone: une minute;
- après séchage de 5 minutes, dans 23 ml d'une solution à 55% de NaOH + 1000 ml éthanol absolu, jusqu'à ce que les taches deviennent noires: 3 minutes environ;
- puis tout de suite dans une solution aqueuse à 5% de NH_4OH jusqu'à ce que le papier s'éclaircisse;
- puis dans une solution aqueuse à 20% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pour fixer la coloration : 5 minutes;
- on lave enfin le chromatogramme dans un bac rempli d'eau du robinet, sous un mince filet d'eau. On la laisse sécher plusieurs heures, à température ambiante. Les taches sont très brunes à noires.

δ-Les acides phénoliques peuvent être déterminés dans la fraction adsorbée sur la résine ammonique; c'est la technique qui a été employée ici.

Une méthode plus efficace consiste à les extraire par l'éther dans la solution initiale des exsudats racinaires (cf. SMITH, Chromatographic Techniques, 1958). Comme les acides phénoliques sont solubles dans l'éther, l'acétate d'éthyle, etc..., on prépare une simple extraction à l'éther, ce qui élimine tous les ions minéraux, les composés aminés et les autres corps non solubles dans l'éther. On peut aussi évaporer l'extrait purifié et le concentrer 10 à 20 fois; on réduit ainsi à 100 μl la quantité à appliquer sur le chromatogramme. Dans un simple extrait à l'éther, on obtient également des phénols non acides. On les élimine en séparant l'éther de la solution fortement alcalinisée, puis cette dernière est acidifiée et extractée de nouveau par l'éther. Ce second extrait contiendra tous les acides organiques solubles dans l'éther, c'est à dire les acides phénoliques, les acides aromatiques simples, les acides indoliques et la plupart des corps conjugués de ces composés. Puis, si on doit détecter les acides phénoliques, on emploie une solution alcaline de sel de diazonium; pour détecter les acides indoliques, on emploiera le réactif d'Ehrlich.

Méthode d'extraction

- On additionne à la solution contenant les exsudats racinaires 5 ml de chloroforme et 5 ml d'acide acétique glacial; ce dernier est ajouté pour prévenir toute oxydation alcaline des phénols, par-

ticulièremment des polyphénols.

-On dispose 20 à 35 ml de la solution dans un large tube bouché, puis on refroidit à 0° C et on ajoute une quantité suffisante de NaHCO_3 de façon à obtenir une concentration finale de 2%. On extrait alors cette solution trois fois de suite par 1/3 de volume d'éther dépourvu de peroxyde, ou d'acétate d'éthyle. Chaque fois, on pipette la couche d'éther et on la rejette; elle contient cependant les phénols non acides et les amines qui pourront aussi être détectés. Quelques-fois des précipités peuvent apparaître, mais on peut facilement les éliminer par l'addition d'un ml d'éthanol en agitant une fois.

-Puis on ajoute à la solution alcaline 1/3 de volume d'éther pour éviter la formation d'écume et pour dissoudre tout composé phénolique qui pourrait précipiter et se coller sur les parois du récipient. On l'acidifie ensuite à pH 2 avec une solution (5N) d' H_2SO_4 et on la sature avec un sel, soit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à la concentration de 50 g/100 ml soit NaCl avec 25g/100 ml; le premier est le plus satisfaisant pour prévenir la formation d'émulsions.

-On extrait la solution acide avec trois fois 1/2 volume d'éther, qui pourra contenir 25% d'éthanol pour accroître la solubilité conjuguée. Après chaque agitation et séparation des phases, toujours dans le même tube, on pipette la couche d'éther dans un petit bécher et on l'évapore à l'aide d'un courant d'air froid. Ainsi chaque volume d'éther est évaporé pendant qu'on obtient le volume suivant.

-On dissout le résidu sec dans une solution d'éthanol à 95% ou d'acétate d'éthyle, en utilisant 1/10^e du volume initial de la solution.

Autres méthodes : au centre de Pédologie-biologique de Nancy-Vandœuvre, on emploie deux méthodes d'extraction :

-extraction continue à l'éther

On acidifie la solution (pH 2) par H_2SO_4 ; l'extraction à l'éther est effectuée pendant 16 heures dans un appareil qui permet une extraction en continu (fig. 10), avec enrichissement des produits solubles dans l'éther et recyclage de l'éther.

.../...

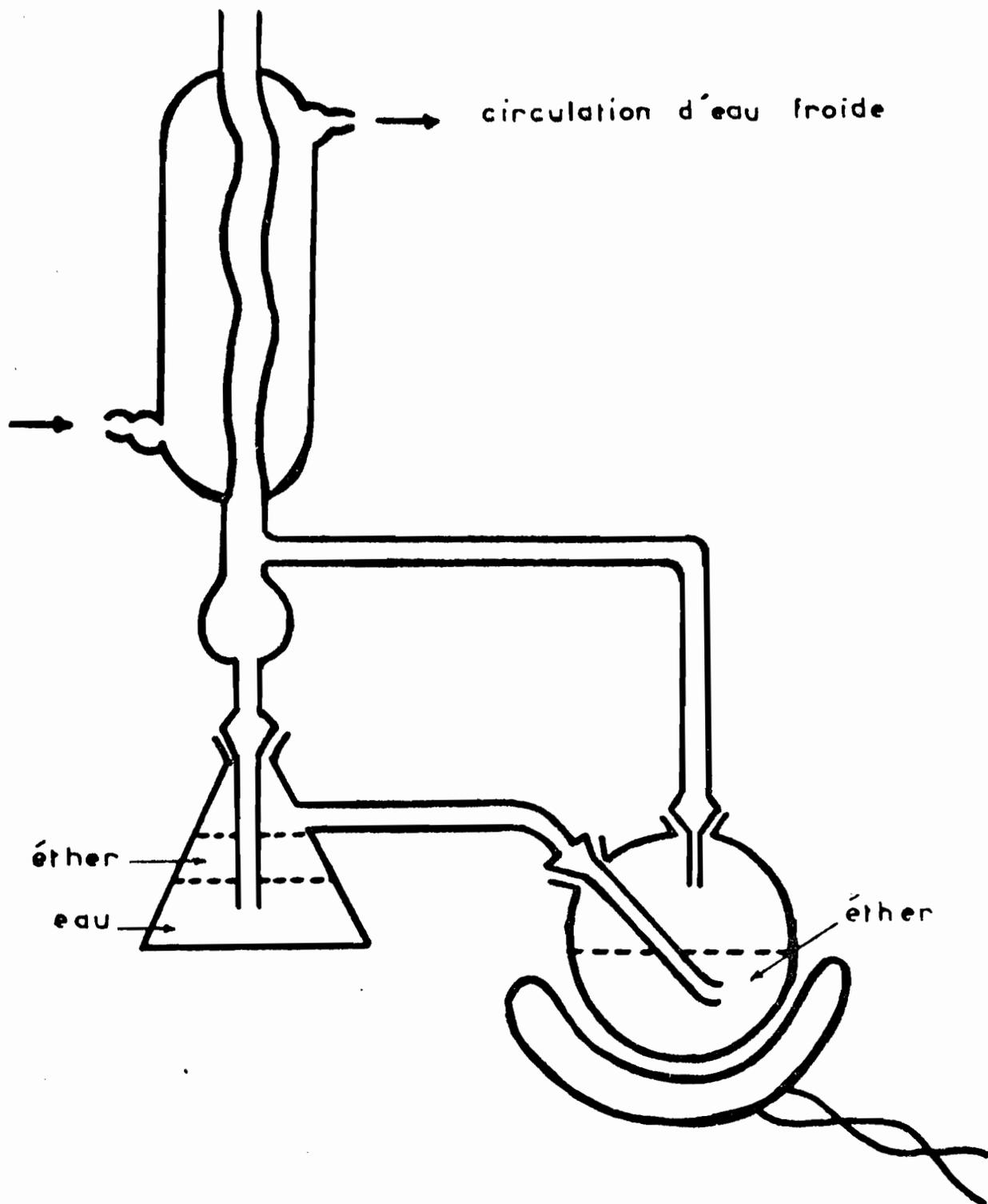


fig. 10 - Appareil d'extraction continue
à l'éther

-Extractions successives à l'acétate d'éthyle

On mélange dans une ampoule à décanter de 100 ml, 20 à 30 ml de la solution acidifiée (pH 1) par HCl N ou 2N, avec le même volume d'acétate d'éthyle. Puis on agite pendant une minute et on récupère le tout. Il faut recommencer l'opération trois fois de suite; s'il y a apparition d'une émulsion, on laisse décanter et on élimine la phase sur-nageante, en reprenant l'émulsion par une petite quantité d'acétate d'éthyle. Il faut ensuite éliminer les traces d'eau dans une fiole d'Erlenmeyer hermétiquement bouchée, avec une pincée de SO_4Na_2 anhydre, par agitation. Puis on filtre et on concentre à 25-50 ml ; la solution est alors prête pour la chromatographie.

On emploie habituellement les quatre standards suivants; en 4 points différents :

- acide ortho-coumarique
- acide para-coumarique
- acide férulique
- acide para-hydroxybenzoïque

à raison de 10 μ l par standard, et à la concentration de 0,5% dans l'éthanol à 95%.

Le solvant de chromatographie a la composition suivante: n-butanol/pyridine/eau (140:30:30). Le chromatogramme est développé une seule fois en 7 à 9 heures.

On révèle avec l'acide diazoto-sulfanilique, de la façon suivante:

25 g d'acide sulfanilique sont dissous dans 125 ml à 10% de KOH. Après refroidissement, on ajoute 100 ml à 10% de $NaNO_2$. On agite puis on place dans une ampoule à décanter. On laisse ensuite couler goutte à goutte la solution dans 40 ml d'HCl (densité 1,19) dans 20 ml d'eau froide, tout en agitant. La température de la réaction ne doit pas dépasser 8° C. Dans le fond, on recueille les sels diazotiques qu'on lave avec de l'eau distillée à 3-4° C, deux ou trois fois, puis avec l'éthanol refroidi, et enfin à l'éther refroidi. Puis on dessèche à l'air à température ambiante. Ces sels sont stables si on les conserve dans un flacon teint et en chambre froide plusieurs mois.

On dissout ensuite 0,1 g de ces sels avant usage, dans 20 ml à 10% de solution aqueuse de Na_2CO_3 . On révèle par vaporisation. Les colorations

.../...

des solutions standard sont les suivantes:

-acide ortho-coumarique	:	orangé
-acide para-coumarique	:	rouge
-acide férulique(4-OH-3-methoxy cinnamique)	:	violet
-acide para-hydroxybenzoïque	:	jaune

II- Résultats et discussion

Pour le premier lot d'environ quatre mille semences dont on n'a pas desséché les plantules, nous avons obtenu 0,2 g d'exsudats racinaires poids sec, ce qui représente une sécrétion moyenne de 0,05 mg par graine. Le deuxième lot de cinq mille cinq cent semences dont on a desséché puis rehumidifié les plantules, a fourni 0,3 g d'exsudats racinaires, ce qui représente une sécrétion moyenne de 0,0545 mg par graine. Dessiccation et réhumidification ont donc entraîné un léger accroissement de la quantité d'exsudats racinaires, qui est toutefois dix fois plus faible que pour le blé.

I- Composition des acides aminés

Les acides aminés identifiés sont donnés dans l'ordre croissant de leur Rf. Ceux qui ont le même Rf, sont placés entre parenthèses (fig. II) :

ornithine
 arginine (lysine, asparagine)
 glutamine (citrulline)
 acide aspartique (sérine)
 glycocolle
 acide glutamique
 α -alanine
 méthionine (valine)
 phenylalanine
 leucine (isoleucine)

Pour obtenir une identification plus complète, il aurait fallu faire une analyse chromatographique bidimensionnelle. Nous pouvons quand même cons-

.../...

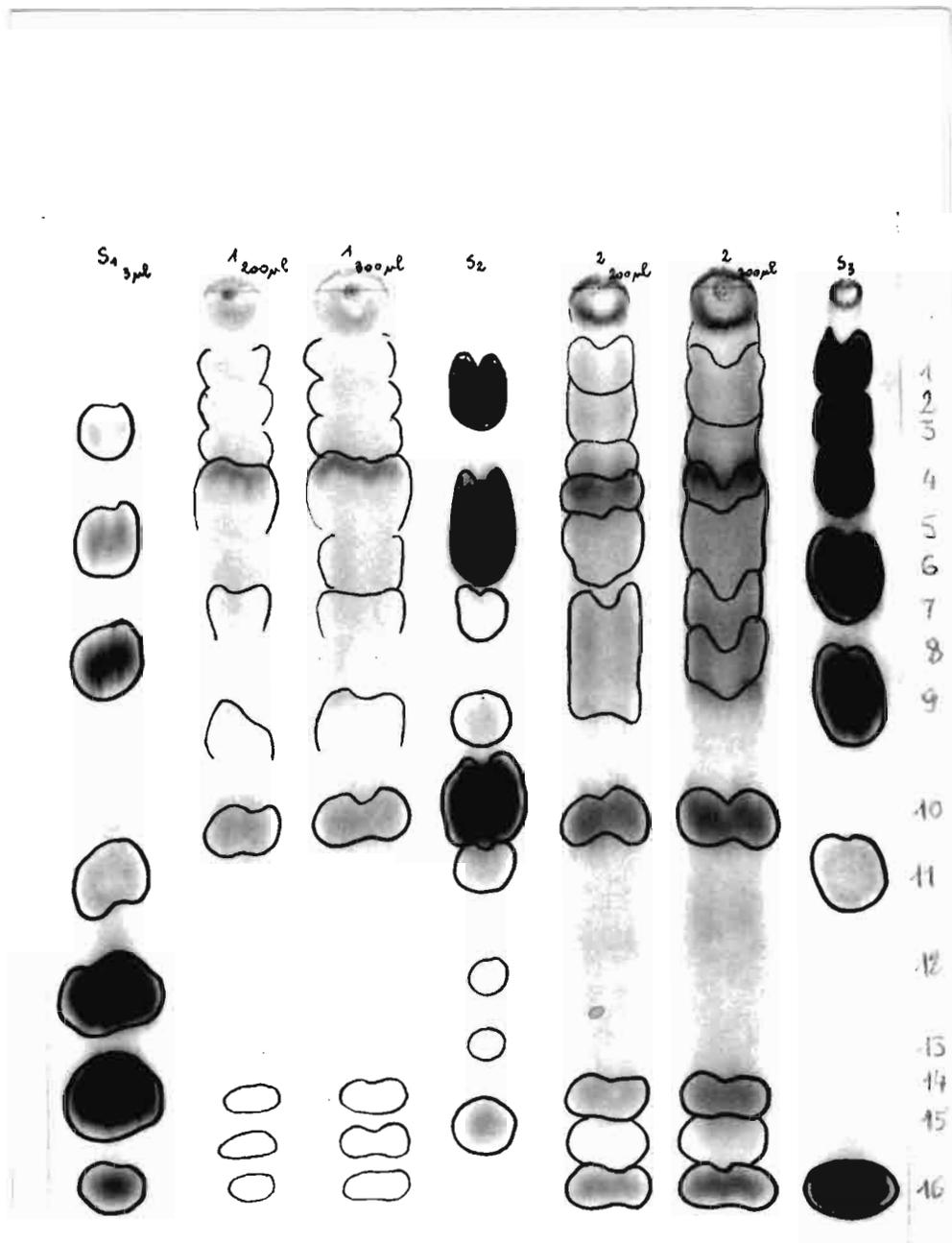


FIG. II - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

1-Ornithine , 2-Lysine , 3-Asparagine (Arginine) , 4-Glutamine , 5-Acide Aspartique (Sérine , Citrulline) , 6-Glycocolle , 7-Hydroxyproline , 8-Acide Glutamique , 9- Thréonine , 10- α -Alanine , 11-Proline , 12-Acide γ -Amino-butyrrique , 13-Méthionine , 14-Valine , 15-Phénylalanine , 16-Leucine (Isoleucine).

tater une nette différence quant à la quantité entre les lots avec et sans dessiccation. Il nous a fallu dessaler la fraction cationique car le premier chromatogramme a révélé la présence de sels (fig. I2).

Il nous a fallu ensuite recommencer une troisième fois la chromatographie les concentrations des solutions à analyser étant trop faibles (fig. I3). Les acides aminés présents en plus grande quantité sont l' α -alanine et la glutamine.

2- Les acides organiques

Il sont représentés sur la figure I4 et comprennent seulement deux composés: l'acide malique en quantité élevée et l'acide fumarique beaucoup moins abondant.

3- Les glucides

La teneur des exsudats racinaires de Millet est très pauvre en glucides. Beaucoup sont à l'état de trace, mais on peut toutefois admettre la présence de glucose, fructose (arabinose) et rhamnose (fig. I5).

4- Les acides phénoliques

La méthode d'investigation employée n'a pas permis de déceler de tels acides. Il faudrait employer l'extraction à l'éther de la solution initiale pour s'assurer de l'absence effective de ces composés (fig. I6).

Mise à part la composition en acides organiques, acides aminés et glucides, on peut noter un autre aspect intéressant, si on compare les exsudats racinaires des plantes normales et ceux des plantes desséchées et réhumidifiées. En effet, la quantité d'acides aminés est supérieure dans le deuxième cas, ce qui correspond aux résultats de ROUATT et al., tandis que l'on assiste à l'inverse en ce qui concerne les glucides.

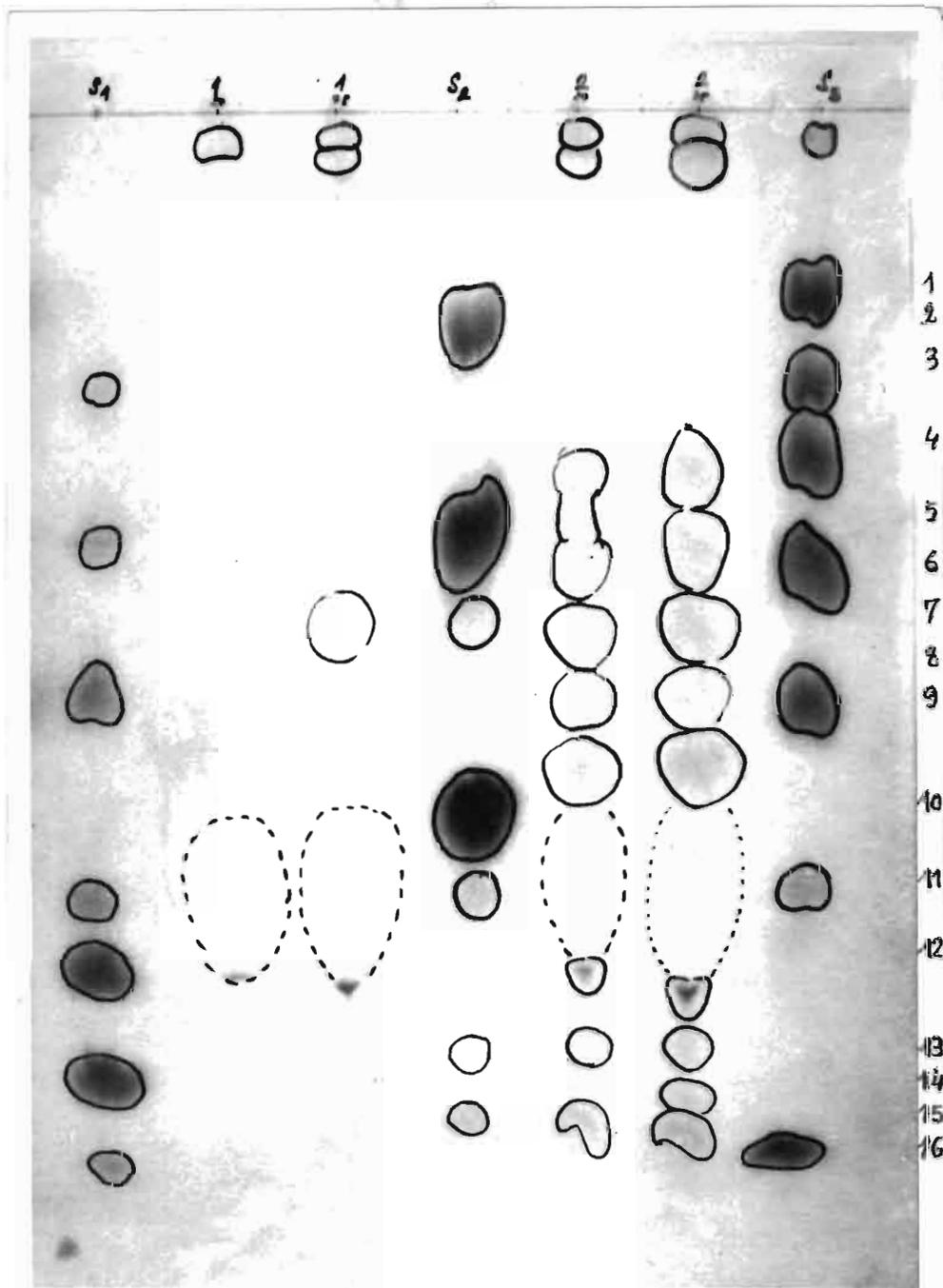


FIG. 12 - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

1-Ornithine , 2-Lysine , 3-Asparagine , 4-Glutamine , 5-Acide Aspartique (Sérine, Citrulline) , 6-Glycocolle , 7-Hydroxyproline , 8-Acide Glutamique , 9-Thréonine , 10- α Alanine , 11-Proline , 12-Acide γ -Aminobutyrique , 13-Méthionine , 14-Valine , 15-Phénylalanine , 16-Leucine (Isoleucine).

Les taches en pointillés représentent les sels.

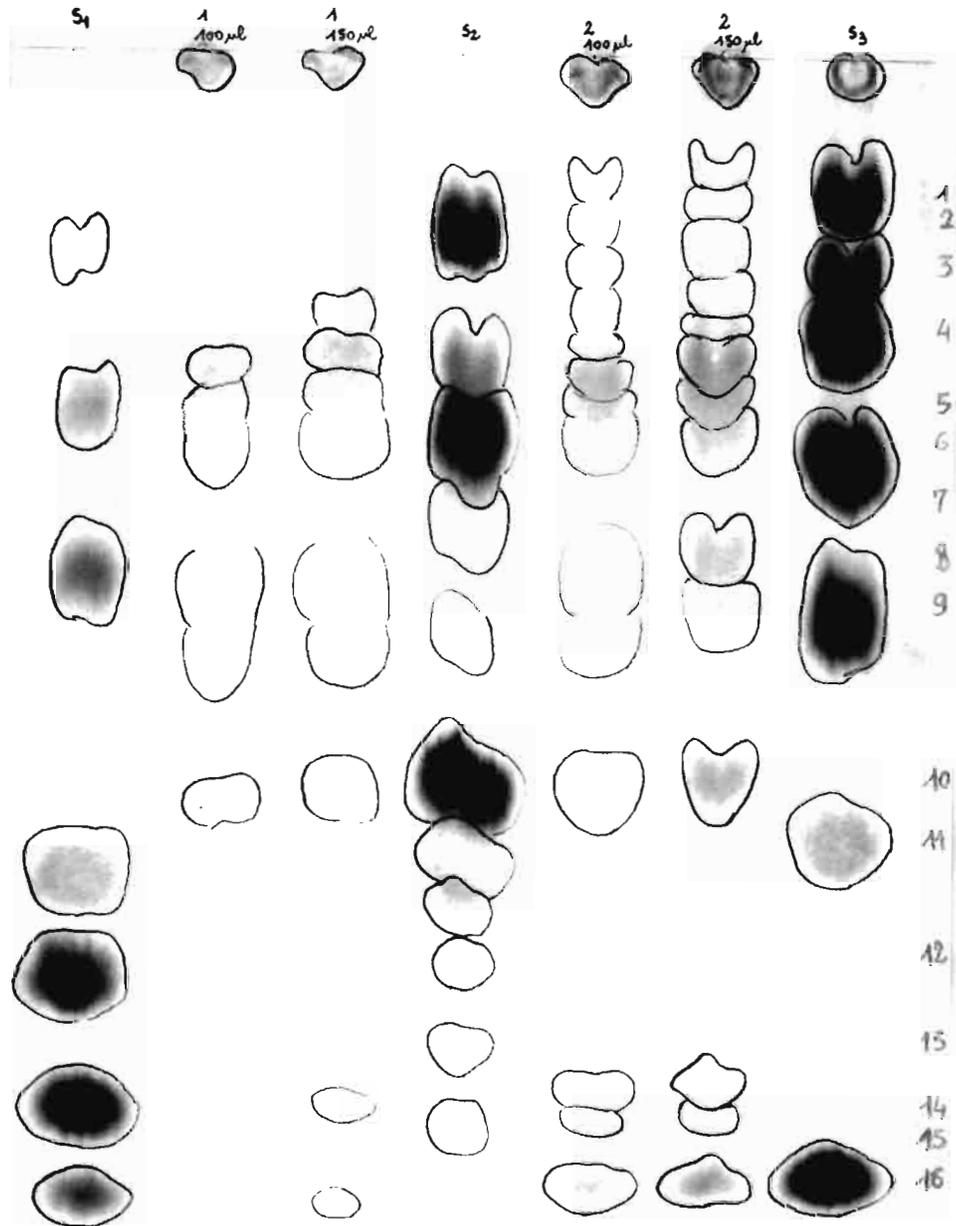


FIG. 13 - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

1-Ornithine , 2-Lysine , 3-Asparagine (Arginine) , 4-Glutamine

5-Acide Aspartique (Sérine , Citrulline) , 6-Glycocolle , 7-Hydroxy-Proline , 8-Acide Glutamique , 9-Thréonine , 10- α -Alanine , 11-Proline

12- γ -Amino-butyrrique , 13-Méthionine , 14-Valine , 15-Phénylalanine , 16-Leucine (Isoleucine).

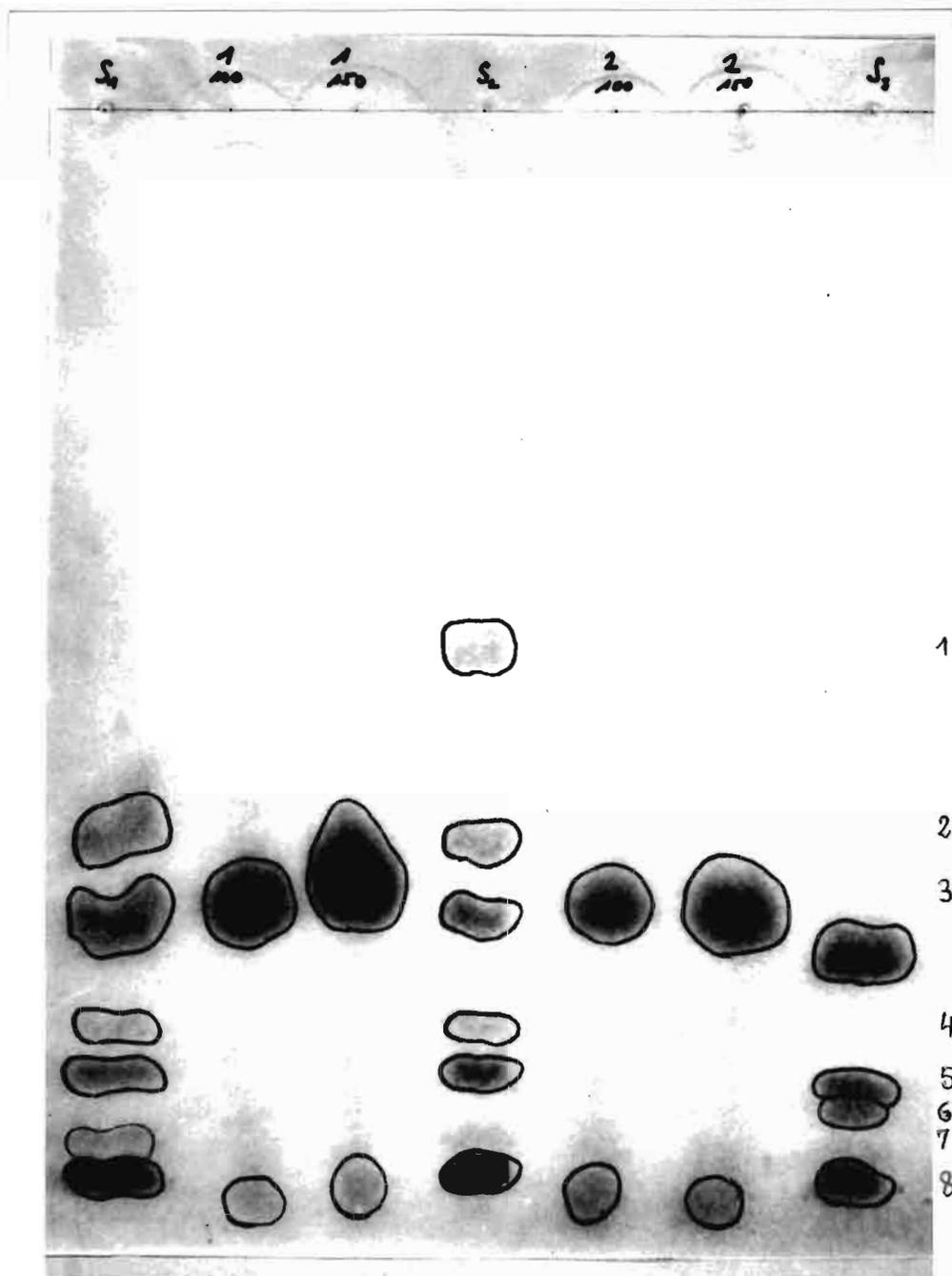


FIG. I4 - COMPOSITION EN ACIDES ORGANIQUES

1-Tartrique , 2-Citrique , 3-Malique , 4-Glycollique , 5-Lactique ,
 6-Succinique , 7-Malonique , 8-Fumarique .

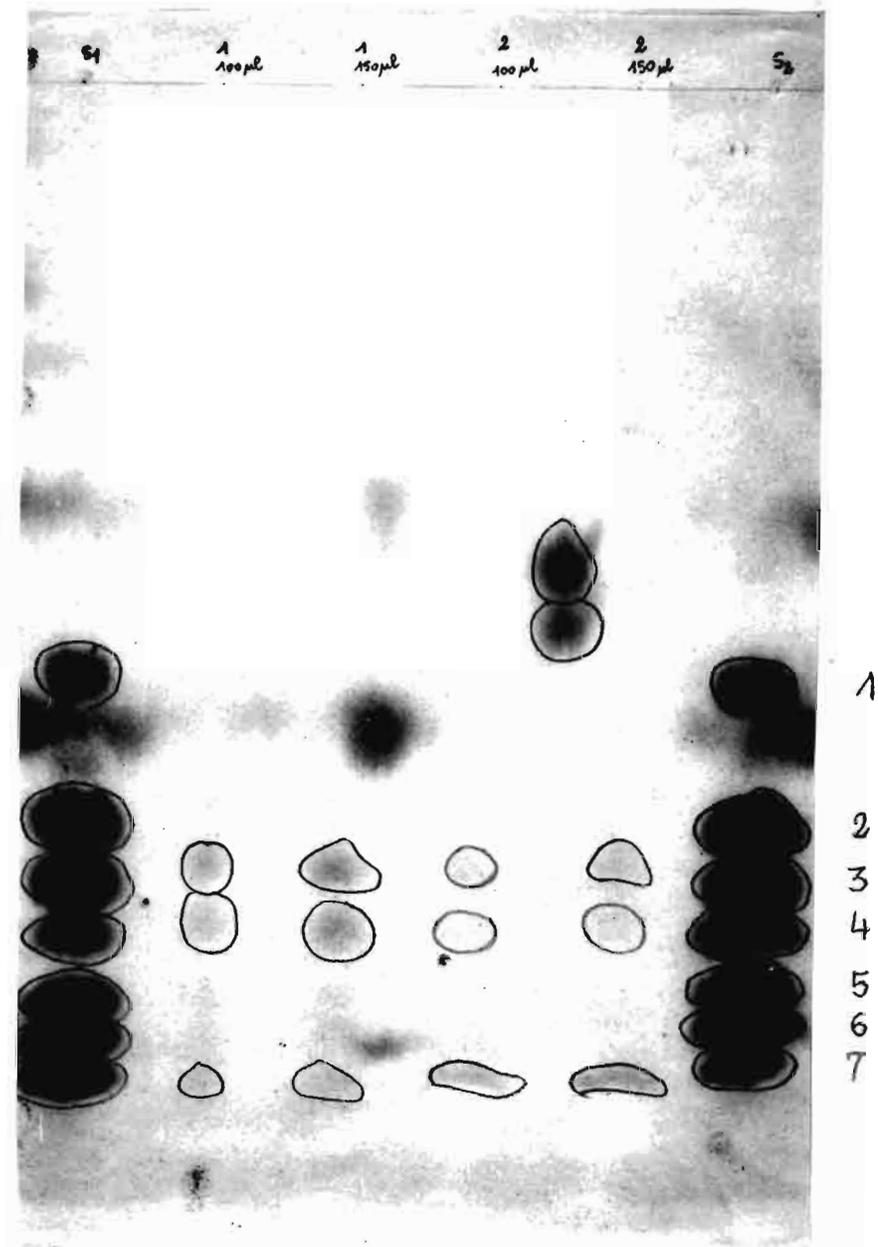


FIG. 15 - COMPOSITION EN GLUCIDES

1-Maltose , 2-Galactose , 3-Glucose , 4-Fructose (Arabinose) ,
 5- Ribose , 6-Xylose , 7-Rhamnose .

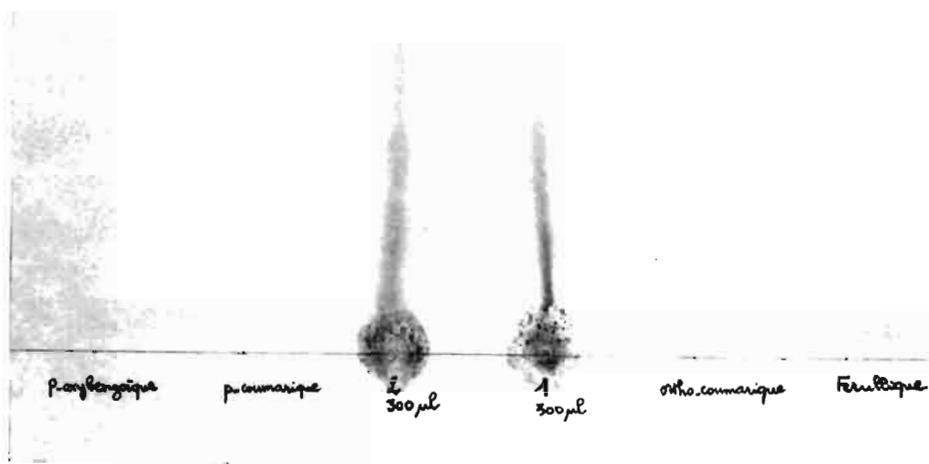
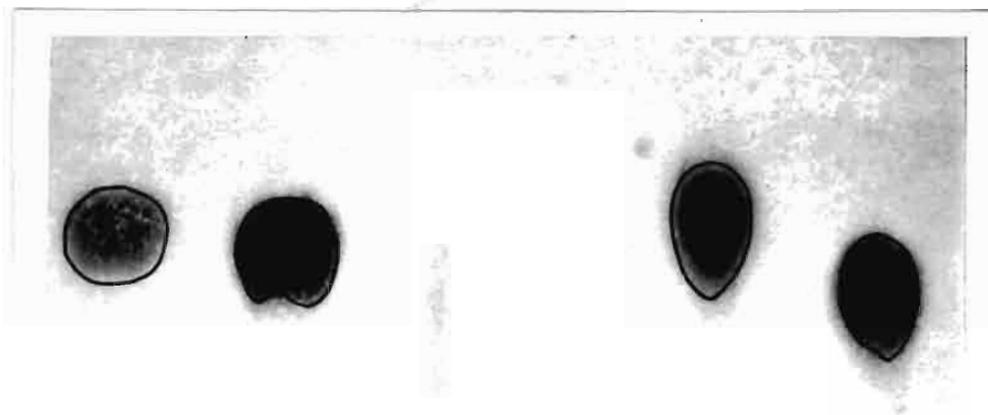


FIG. 16 - COMPOSITION EN ACIDES PHENOLIQUES

III- Etude de la croissance de PSEUDOMONAS putida, en présence d'exsudats racinaires de MILLET

Pour tester la valeur nutritive des exsudats racinaires de Millet, deux expériences ont été menées à l'aide du biophotomètre de BONNET MAURY et JOUAN, avec une souche de Pseudomonas putida K₂.

Les milieux suivants ont été utilisés :

-Taylor I :	KH ₂ PO ₄	0,4 g
-	MgSO ₄	0,05 g
	NaCl	0,1 g
	FeCl ₃	0,01 g
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5 g
	glucose	1 g
-Taylor I' :	Taylor I sans glucose et azote	
-Taylor 2 :	Taylor I + 4 g de casamino-acides (Vit. free)	
-Taylor 3 :	Taylor I + 5 g tryptone + 3 g d'extrait de levure	

On stérilise les deux solutions d'exsudats racinaires deux fois 10 minutes à 1/2 atmosphère, en ajustant leur pH à 6,8-7,0 entre les deux stérilisations, et en les filtrant ou en les centrifugeant si elles sont troubles. Il ne faut pas utiliser de filtre bactériologiques. La souche bactérienne doit être jeune (20 heures). On recueille les bactéries dans le tube avec milieu de Taylor 3 gélosé incliné, avec quelques ml d'eau distillée stérile. Et on ensemence avec 0,2 ml de cette suspension, chaque cuve des deux systèmes suivants:

Expérience I : exsudats racinaires sans dessiccation

- 1- Taylor I, 5 ml + eau distillée, 5 ml
- 2- Taylor 2, 5 ml + eau distillée, 5 ml
- 3- Taylor 3, 5 ml + eau distillée, 5 ml
- 4- Taylor I, 5 ml + solution à 0,25% d'exsudats racinaires, 5 ml
- 5- Taylor 2, 5 ml + solution à 0,25% d'exsudats racinaires, 5 ml
- 6- Taylor 3, 5 ml + solution à 0,25% d'exsudats racinaires, 5 ml

.../...

Expérience II : exsudats racinaires après dessiccation

- 1- Taylor I', 5ml + solution à 0,1% d'exsudats racinaires, 5 ml
- 2- Taylor I', 5 ml + solution à 0,2% d'exsudats racinaires ,5 ml
- 3- Taylor I', 5ml + solution à 0,5% d'exsudats racinaires, 5 ml
- 4- Taylor I', 5 ml + eau distillée, 5 ml
- 5- Taylor 3, 5 ml + eau distillée, 5 ml
- 6- Taylor I', 5 ml + solution à 0,5% d'exsudats racinaires, 5 ml

Les courbes de croissance sont enregistrées automatiquement.

Résultats-Expérience I

Elle nous donne peu de renseignements, car les courbes sont très voisines. On peut cependant distinguer, dans la phase exponentielle de croissance, l'ordre décroissant suivant (fig. I7) :

6 - 3 - 5 - 4 - 2 - 1

Le milieu le plus riche (Taylor 3), additionné d'exsudats racinaires(6), présente la meilleure croissance, supérieure à celle obtenue avec le milieu de Taylor 3 sans exsudat (3). Il en est de même pour les deux autres milieux: 5 et 2 , 4 et 1 .

-Expérience II

Nous pouvons tout d'abord constater l'absence de la phase de latence (fig. I8). L'ordre décroissant des courbes est le suivant :

5 - 3 - 6 - 2 - 1 - 4

Le milieu de Taylor 3 est très supérieur au milieu I' . Parmi ceux-ci, l'influence de la concentration des exsudats racinaires est très nette. Le milieu de Taylor I' avec l'eau distillée, ne montre aucune croissance, ce qui démontre la valeur nutritive incontestable des exsudats racinaires. Les courbes 3 , 6 , 2 et 1 montrent une inflexion assez nette dans leur phase exponentielle de croissance, ce qui pourrait s'expliquer par la consommation rapide d'un composé ou d'un groupe de composés, jusqu'à son épuisement total, puis une baisse de croissance durant le temps d'adaptation aux autres composés.

Transmission

c

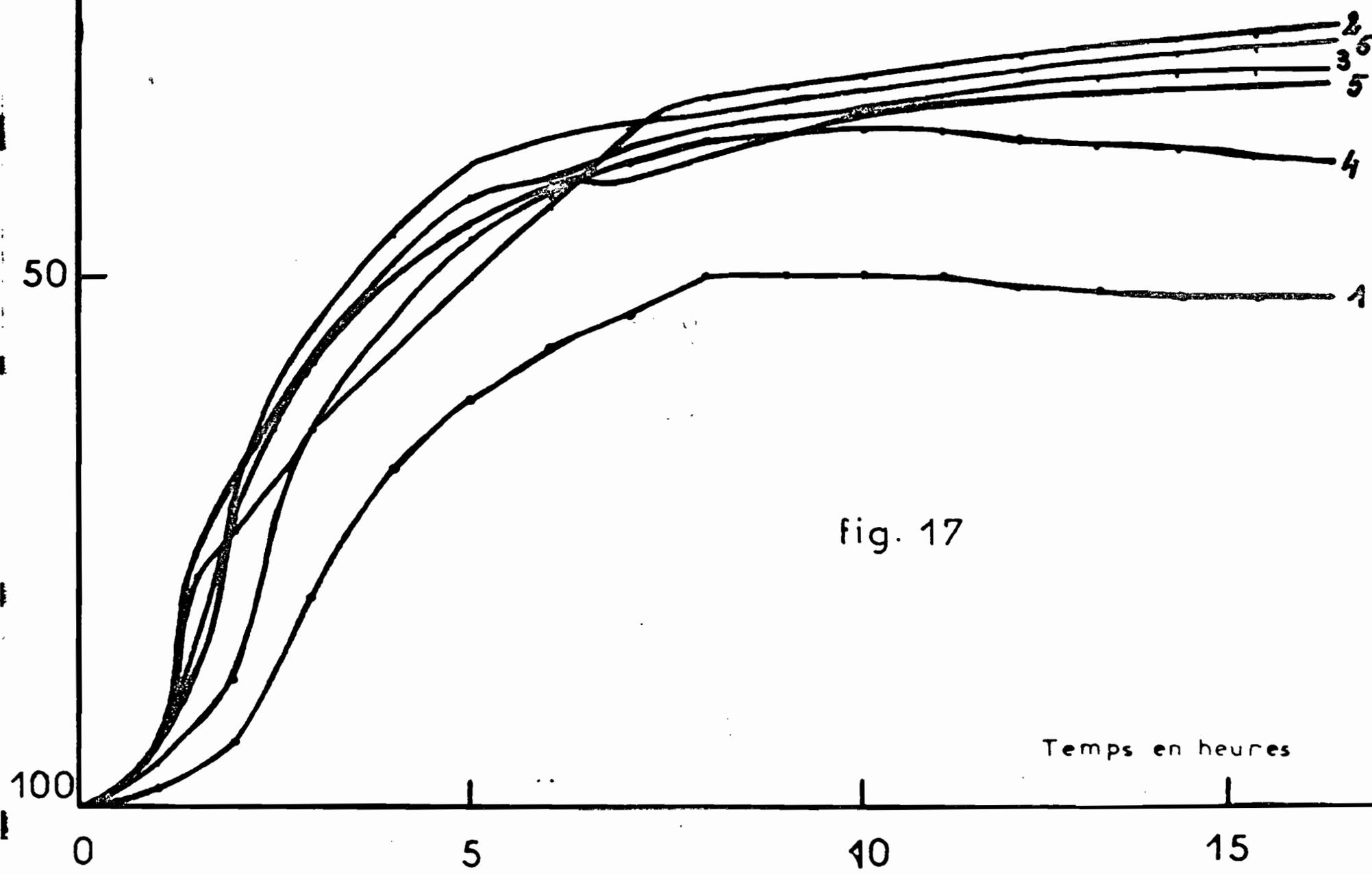
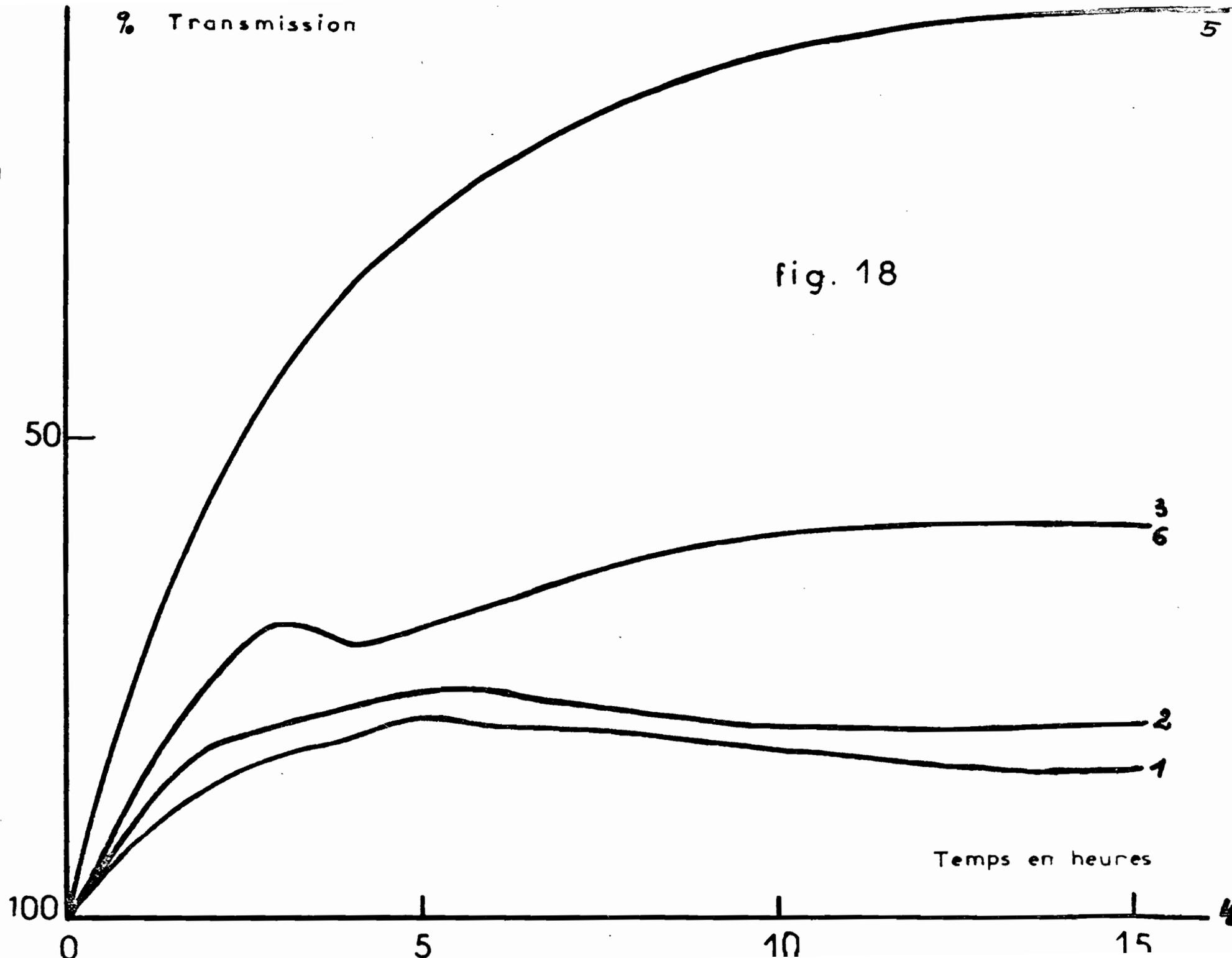


fig. 17

Temps en heures



% Transmission

fig. 18

Temps en heures

5

3

6

2

1

4

50

100

0

5

10

15

BIBLIOGRAPHIE

- 1- VANCURA V. : Detection of giberellis acid in Azotobacter cultures.
Nature 192 : 88-89 - 1961 .
- 2- VANCURA V. , MACURA J. : The effect of root excretions on Azotobacter.
Folia microbiol. 6 : 250-259 - 1961 .
- 3- VANCURA V. , MACURA J. : Indole derivatives in Azotobacter cultures.
Folia microbiol. 5 : 293-297 - 1960 .
- 4-VANCURA V. : Root exudates of plant. I. Analysis of root exudates of
barley and wheat in initial phases of growth.
Plant & Soil 21 : 231-248 - 1964 .
- 5- VANCURA V. , HOVADIK A. : Composition of root exudates in the course
of plant development.
Plant Microbes Relationships. Proc. Symp. on Relationships between soil
microorganisms and plant roots, p.21-25 .
Publ. House Czechoslov. Acad. Sci. , Prague - 1965 .
- 6-VAGNEROVA K. , VANCURA V. : Production and utilisation of aminoacids by
various species of rhizosphere bacteria.
Folia Microbiol. 7 : 55-60 - 1962 .
- 7- IVOR SMITH : Chromatographic Techniques
Heinemann - Medical Books - LTD - LONDON 1958 .
- 8- LOISELEUR J. : Techniques de laboratoire . Tome I, I^{er} fascicule
Chimie physique - Chimie biologique 3^e éd.
Masson et C^{ie} - 120, bd St Germain, Paris 6^e .

M E T H O D E S D E P E R F U S I O N
E T D U F L U X C O N T I N U

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE DU SOL
INSTITUT DE MICROBIOLOGIE DE PRAGUE
ACADEMIE TCHECOSLOVAQUE DES SCIENCES
SOUS LA DIRECTION DE J. MACURA

Principe

Dans le but d'expérimenter deux méthodes distinctes de percolation d'une colonne de sol, nous avons étudié le pouvoir nitrifiant de ce sol en percolant une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et en mesurant la teneur en nitrite et en nitrate des divers percolats au cours du temps. Les deux méthodes testées diffèrent essentiellement par le fait que dans l'une, mise au point par MACURA, la solution nutritive, ajoutée d'une façon continue au sol, est toujours neuve, tandis que dans l'autre, le percolat alimente lui-même la colonne de sol, qui constitue dans les deux cas, un système ouvert.

A- MATERIEL ET METHODES

I- Appareils

I- Méthode du flux continu

L'appareil utilisé se compose d'un réservoir pour alimenter la colonne, d'un mécanisme de régulation du débit d'alimentation, d'une colonne contenant l'échantillon de sol, d'un récepteur pour le percolat, d'un dispositif permettant l'aération, l'élimination du CO_2 et d'autres gaz éventuellement, et d'un dispositif pour estimer la quantité de CO_2 dégagé, lors de l'étude du métabolisme d'une substance carbonnée (photo I, fig. I9).

a- Réservoir d'alimentation

C'est un flacon de 5 litres, contenant la solution nutritive apportée continuellement au sol et qui renferme les composés dont on veut tester le métabolisme par la population microbienne. Le réservoir est clos par un bouchon à deux orifices par lesquels passent deux tubes de verre, l'un pour l'aération, l'autre pour l'acheminement de la solution nutritive jusqu'au sol. Le premier est relié à un filtre en coton et à un piège à CO_2 le deuxième est connecté au tube d'alimentation de la colonne par l'intermédiaire d'un tube de caoutchouc qui passe dans une valve électromagnétique. Celle-ci permet de contrôler

.../...

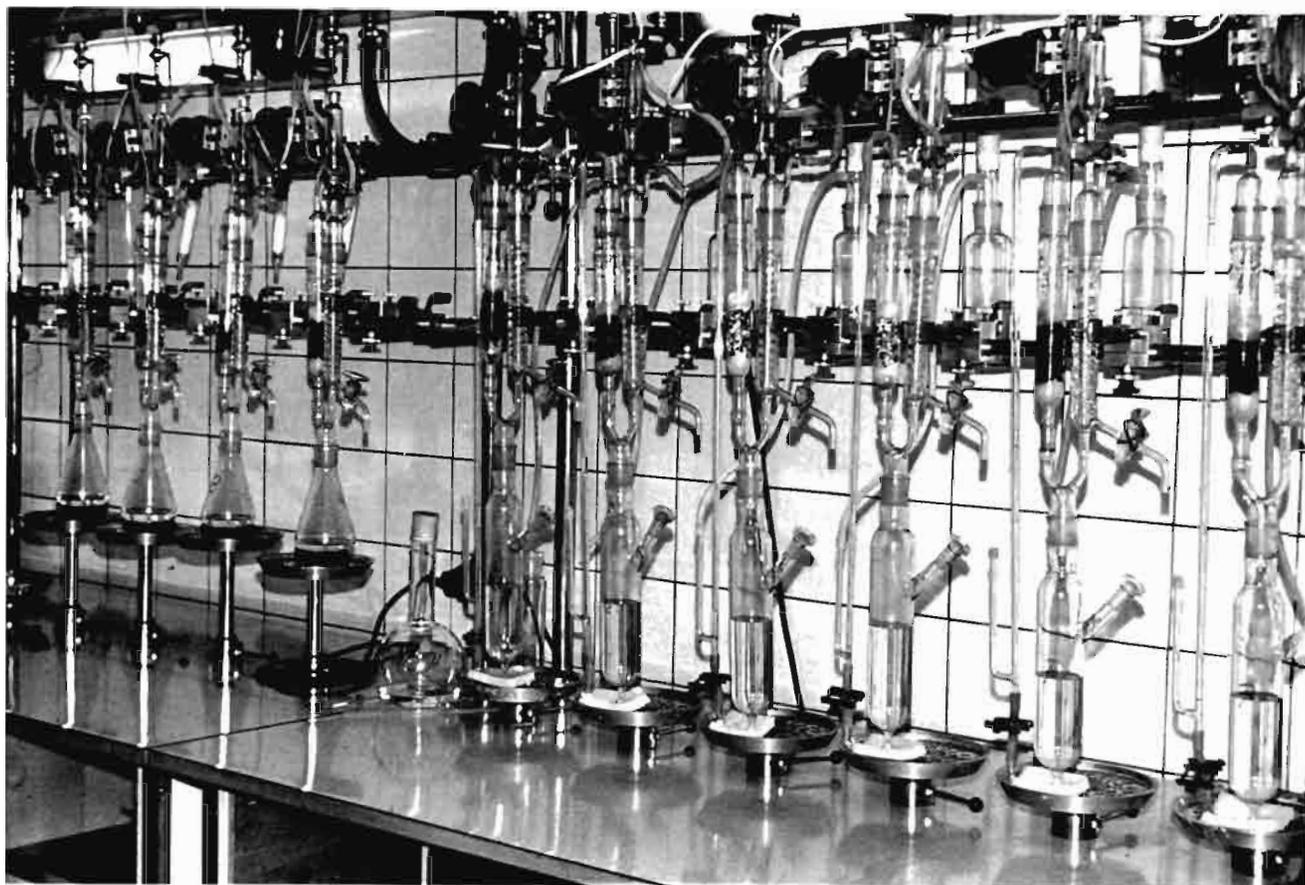


PHOTO I - APPAREILS DE PERCOLATION

A gauche : méthode du flux continu

A droite : méthode de perfusion

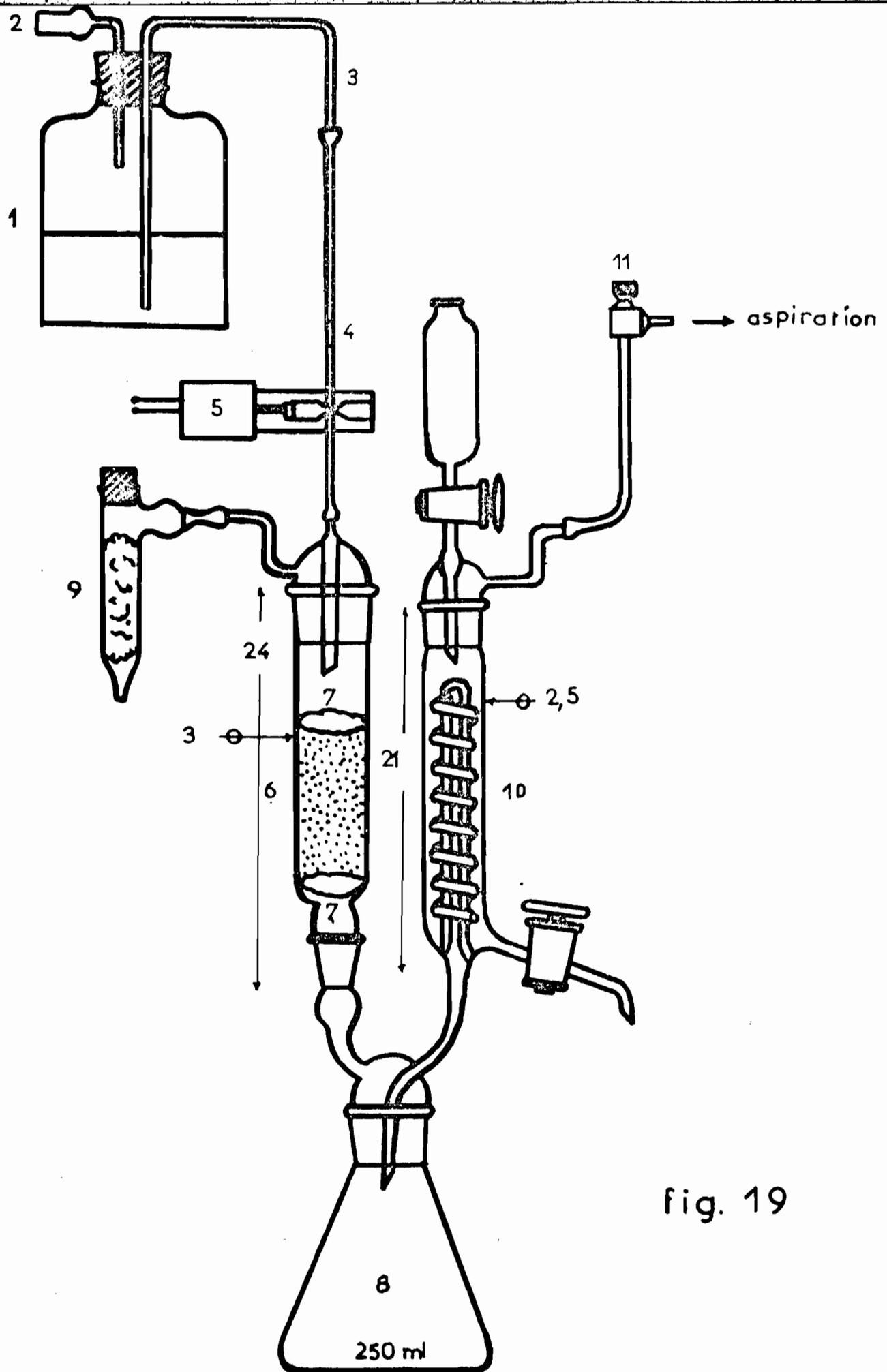


fig. 19

LEGENDE DE LA FIGURE 19

Méthode du flux continu

- I- Réservoir pour le milieu nutritif
- 2- Tube avec coton stérile
- 3- Tube conduisant la solution nutritive
- 4-Capillaire
- 5- Valve électromagnétique
- 6- Colonne de perfusion contenant le sol
- 7- Laine de silice
- 8- Récepteur de percolat
- 9- Tube avec coton stérile
- IO- Tube absorbeur de CO₂
- II- Valve de contrôle de l'aspiration

C

le débit de la solution nutritive. Ces valves sont elles-mêmes contrôlées par une minuterie, rendant possible la régulation de leur durée d'ouverture ainsi que de l'intervalle entre deux ouvertures. Pour permettre au taux d'alimentation de rester sensiblement constant, on place un tube capillaire avant la valve électromagnétique.

b-Colonne de perfusion

C'est une colonne de verre de 3 cm de diamètre et de 22 cm de long. L'extrémité inférieure, effilée et munie d'un rodage externe, est connectée au récepteur de percolat par un tube de verre. L'extrémité supérieure, munie d'un rodage interne, est close par un bouchon de verre rodé, percé de deux ouvertures reliées à deux tubes de verre: le tube central est le conduit d'alimentation de la colonne en solution nutritive, le tube latéral permet l'aération du sol. Celui-ci est disposé entre deux couches de laine de silice, de façon à obtenir une imbibition uniforme.

c-Récepteur de percolat

C'est un flacon de verre muni d'un bouchon rodé à deux ouvertures, l'une connectée à la colonne de perfusion, l'autre à une colonne d'absorption du gaz carbonique dégagé lors de la respiration du sol. On peut placer ce flacon dans un vase Dewar rempli de glace pour empêcher toute prolifération microbienne et post-métabolisation du percolat, ou bien additionner quelques gouttes d'antiseptique.

d-Aération du sol et estimation du CO₂ dégagé

On peut aérer le sol à l'aide d'air comprimé ou en opérant au moyen d'une trompe à eau, une succion constante dont on contrôle l'intensité par une valve réglable. Si on étudie le métabolisme d'une substance carbonée, on purifie l'air par passage dans un train de flacons de lavage contenant de la chaux, de la soude et éventuellement de l'acide sulfurique.

.../...

La stérilité est obtenue par un filtre de coton. Après être passé au travers de la colonne de sol, l'air est recueilli dans le tube d'absorption rempli d'une solution titrée d'hydroxyde de sodium, ce qui permet de mesurer quantitativement la teneur en gaz carbonique en fonction du temps et de remplacer facilement la solution d'NaOH (photo 2).

e-Contrôle thermostatique

L'appareil est placé dans une chambre thermostatée à la température de $28 \pm 2^\circ \text{C}$.

2-Méthode de perfusion

L'appareil diffère du précédent par le fait que le réservoir d'alimentation est aussi le récepteur de percolat. C'est un gros tube de 5 cm de diamètre et 27 cm de long, connecté à l'extrémité inférieure de la colonne de percolation, à l'aide d'un bouchon rodé à deux ouvertures; la deuxième permet de relier le réservoir au tube absorbeur de CO_2 . La solution nutritive remonte dans la colonne de perfusion par un tube de verre de 0,5 cm de diamètre et de 65 cm de hauteur, sous l'influence de la succion permanente obtenue comme pour l'appareil précédent. On effectue les prélèvements dans le réservoir par une tubulure latérale munie d'un bouchon rodé (photo I - fig. 20).

II- Procédés expérimentaux

I- Méthode du flux continu

a-Préparation du sol

On emploie un sol tamisé au tamis de 5 mm, après dessiccation dans un courant d'air. Puis on place 30 g dans chaque colonne de perfusion. Avant de commencer l'expérience, on humidifie le sol avec de l'eau distillée.

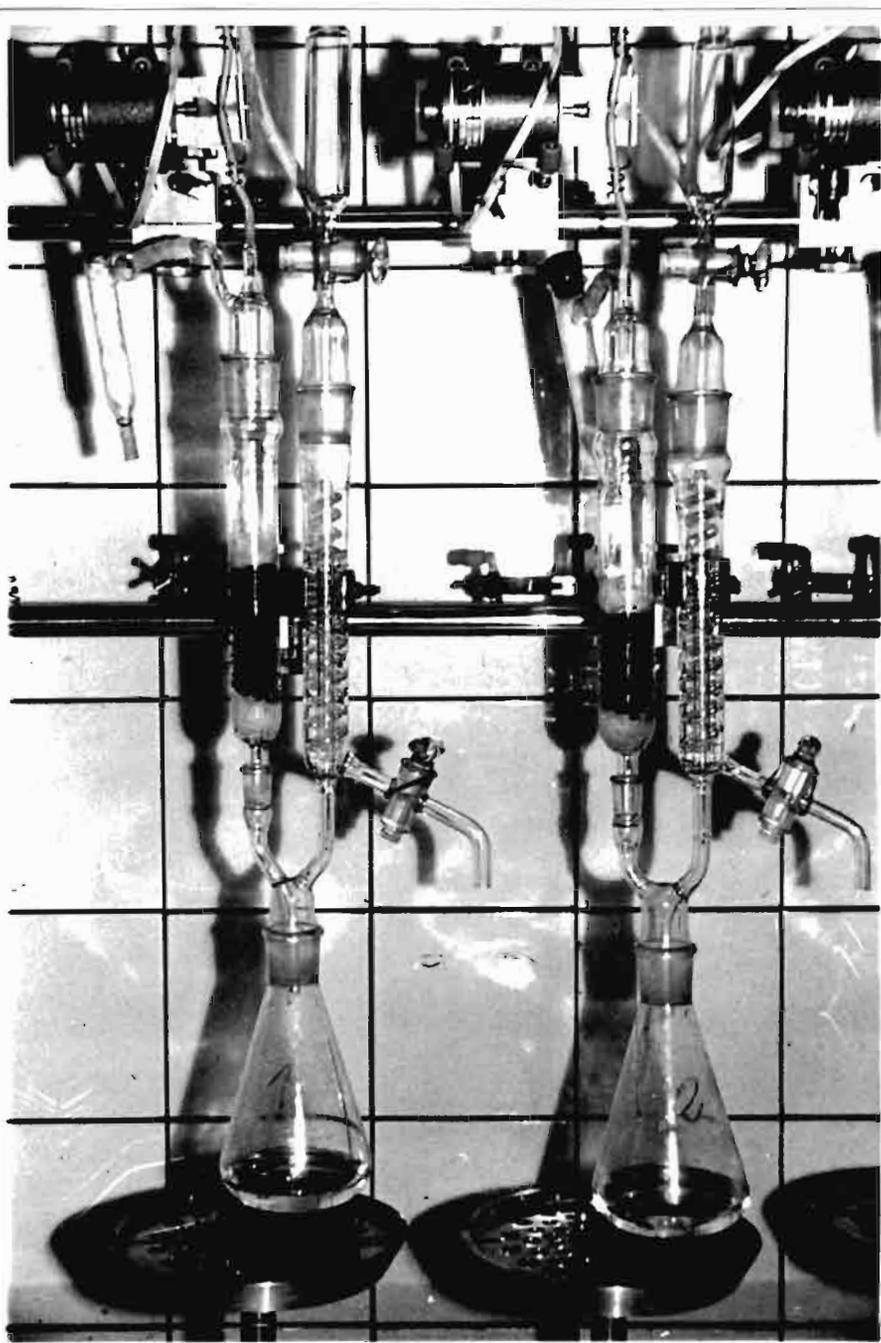


PHOTO 2 - APPAREIL DU FLUX CONTINU

Détail

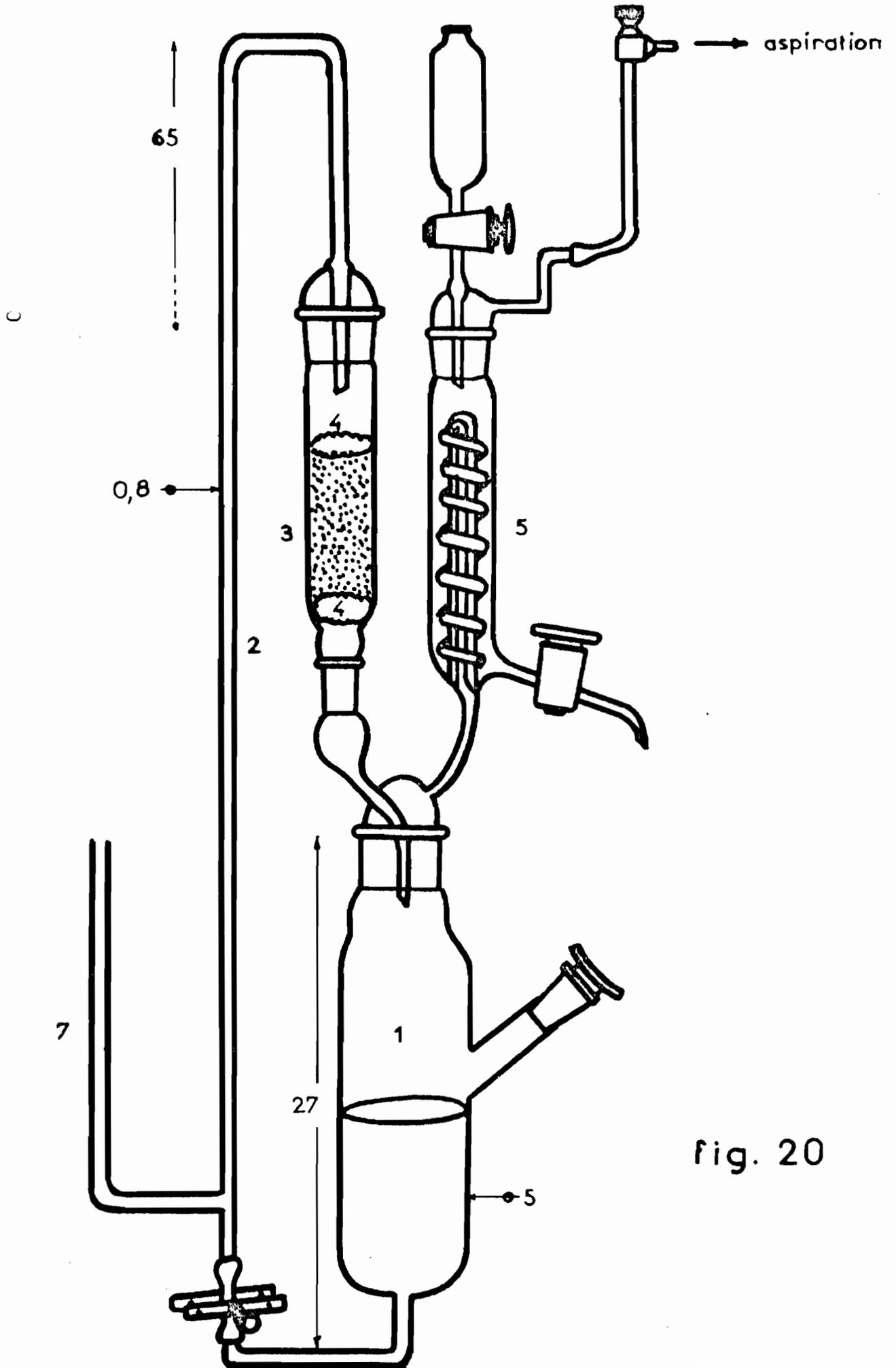


fig. 20

LEGENDE DE LA FIGURE 20

Méthode de perfusion

- 1- Solution nutritive
- 2- Tube conduisant la solution nutritive
- 3- Colonne de perfusion contenant le sol
- 4- Laine de silice
- 5- Tube absorbeur de CO₂
- 6- Valve de contrôle de l'aspiration
- 7- Prise d'air

b-Début et déroulement de l'expérience

On sait qu'après réhumidification de sols desséchés dans un courant d'air, la consommation d'oxygène et la production de gaz carbonique sont accrues; on l'attribue aux changements de disponibilité des aliments provoqués par le séchage. De plus, les sols contiennent différentes quantités de composés minéraux solubles, tels les nitrates, etc... Comme ces transformations peuvent modifier le déroulement des processus que l'on veut étudier, pendant la phase initiale des expériences, et fausser les résultats obtenus, on percole les colonnes de sol avec de l'eau distillée, pendant un certain temps.

On a montré que sous ces conditions, on note un accroissement du dégagement de gaz carbonique par le sol le premier jour, puis celui-ci décroît graduellement pour se maintenir à un bas niveau constant à partir du troisième jour. Les nitrates sont aussi élués au bout du deuxième ou troisième jour, quand on fait passer de l'eau distillée stérile. La percolation de cette eau pendant les 3 à 5 premiers jours de l'expérience, est ainsi suffisante pour déplacer du sol de nombreux aliments minéraux solubles et pour lui faire atteindre un équilibre biologique.

Après cette période préliminaire, on percole la solution nutritive; elle contient les substances dont on veut tester le métabolisme par la population microbienne du sol, ou bien l'effet sur le métabolisme d'autres substances.

Le taux de percolation doit être constant ou contrôlé par un mécanisme régulateur. En excluant les cas particuliers dans lesquels on expérimente l'effet du taux de percolation, on calcule celui-ci de telle manière que le poids de solution qui passe au travers de la colonne de perfusion en 24 heures, soit égal au poids du sol, soit habituellement 30 à 50 ml. Ce taux varie en général de 2 ml par heure, et on le calcule en mesurant la quantité de solution recueillie dans le récepteur de percolat. La quantité de substance additionnée au sol dépend de sa concentration dans la solution nutritive et du taux de percolation. Dans le cas présent, nous avons utilisé une solution de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ contenant 140 μg par ml.

.../...

c-Estimation de l'intensité de l'activité

microbienne

Elle se fait par le dégagement de gaz carbonique lors du métabolisme de matières organiques. Ce gaz est absorbé dans une solution titrée de soude, dans le tube absorbeur. On détermine la quantité de CO_2 par titration. Quand on étudie la nitrification, l'intensité du processus dépend de la quantité de nitrites et de nitrates déterminés dans le percolat. Exceptée la détermination du gaz carbonique, toutes les mesures sont faites à l'aide du percolat. Etant donné que l'on a déterminé la concentration de la substance à tester, dans la solution nutritive et dans le percolat, ainsi que la quantité de ce dernier, il est possible d'estimer la quantité de substance utilisée par la microflore du sol ou retenue par le sol. En analysant le percolat, il est aussi possible d'identifier les produits finaux du métabolisme. Pour un grand nombre d'entre eux, la quantité peut être affectée par leur absorption dans le sol. Pour effectuer l'analyse microbienne du sol, on doit utiliser le sol de la colonne de perfusion.

2- Méthode de perfusion

On procède comme précédemment, mais le taux de percolation est difficile à estimer; en effet, la solution nutritive accomplit de façon continue, un cycle fermé. On recueille les échantillons pour l'analyse à l'aide d'une pipette, à raison de 5 ml par prise d'essai. La percolation s'arrête d'elle-même quand le niveau du percolat atteint celui du tube latéral faisant office de prise d'air; ceci restreint la durée de l'expérience. La solution de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a une concentration identique à celle utilisée pour l'autre expérience (140 $\mu\text{g/ml}$).

III- Calculs

Par rapport à la deuxième méthode où les propriétés de la culture changent continuellement, ainsi que les conditions de milieu, en raison de l'épuisement du substrat et de l'accumulation des produits terminaux du métabolisme, la méthode de culture continue permet d'opérer

.../...

sous des conditions constantes, en respectant l'importance et la composition de la population microbienne, et celle du milieu. La technique du flux continu représente un type spécial de culture continue. Le milieu qui contient les aliments et les substances dont on veut tester le métabolisme, passe continuellement au travers de la colonne de sol dans laquelle sont adsorbés les microorganismes. Ceci est une particularité caractéristique qui distingue ce procédé des autres méthodes de culture où le substrat est ajouté au milieu tout en une seule fois, au début de l'expérience. On peut également estimer la transformation du substrat pendant un intervalle de temps choisi, sans causer de perturbation au sol.

Pour obtenir des données quantitatives sur la consommation du substrat, il est nécessaire de connaître le volume de la solution qui percole le sol et qu'on désigne par v . Cette valeur représente le produit du taux de percolation f , exprimé en ml/heure, et de la durée t de l'expérience. La valeur est obtenue en pratique, en mesurant le volume du percolat. Si l'on connaît la concentration du substrat dans la solution nutritive S_R et si l'on peut estimer la concentration du substrat dans le percolat S_E , on a percolé au total $S_R \cdot v$, et on retrouve $S_E \cdot v$ mg de substance dans le percolat au temps t . Il s'en suit que la quantité de substrat consommé ou retenu par le sol est

$$S = (S_R - S_E) v \quad \text{mg}$$

Ces valeurs sont exprimées pour ~~des~~ intervalles séparant deux mesures, en général pour des périodes de 24 heures, ou bien sous la forme d'une somme cumulative dont on trace la courbe représentative. Si la consommation du substrat pendant les premières 24 heures est S_1 , durant les secondes 24 heures S_2 , etc..., la courbe représentera la somme de ces valeurs. Il en est de même pour les produits terminaux du métabolisme, tels que le CO_2 , les nitrites, les nitrates, etc..., qui sont aussi exprimés pour des intervalles de 24 heures et sous forme de somme cumulative avec courbe représentative. Dans ce cas, on doit cependant soustraire les formations endogènes de gaz carbonique, de nitrites, de nitrates, etc..., dans les témoins percolés à l'eau distillée.

IV- Méthodes de dosage

1- Dosage des nitrites

On emploie la méthode colorimétrique de GRIESS-ILOSVAJ.

a- Principe

On traite une partie aliquote de percolat par un réactif diazotique (acide sulfanilique) en solution acétique, pour convertir le nitrite en un sel de diazonium. Puis on traite ce sel par l' α -naphthylamine dans une réaction couplée, pour le convertir en un composé azo. On mesure alors au colorimètre à la longueur d'onde optimale (520 m μ), l'absorption de la lumière par la solution rose obtenue.

b- Réactifs

-dissoudre 0,5 g d'acide sulfanilique dans 150 ml d'acide acétique à 15% .

-dissoudre 0,1 g d' α -naphthylamine dans 20 ml d'eau distillée bouillante, et diluer la solution obtenue dans 150 ml d'acide acétique à 15%.

-mélanger les deux solutions après refroidissement .

-solution standard de nitrite: dissoudre 0,247 g de NaNO_2 dans l'eau et diluer à 1000 ml dans une fiole jaugée. Si on utilise NaNO_2 pur et sec, cette solution contient 50 μg de $\text{N-NO}_2/\text{ml}$. Il faut la conserver au réfrigérateur.

c- Analyse du percolat

On mélange 1 ml (contenant moins de 5 μg d'azote nitreux) et 1 ml du réactif dans une fiole jaugée de 50 ml, en ajoutant le réactif après avoir dilué avec environ 20 ml d'eau distillée. Puis on laisse reposer une heure et on complète au trait de jauge avec de l'eau distillée. On mesure alors l'intensité de la coloration au colorimètre à 520 m μ (filtre vert).

.../...

β-Réactifs

-dissoudre 0,5 g de sulfanilamide dans 100 ml d'HCl 2,4 N. Il faut préparer la solution au minimum 24 heures avant usage et la conserver au réfrigérateur.

-dissoudre 0,3 g de N-1-naphthylethylènediamine hydrochloride dans 100 ml d'HCl 0,12 N. Conserver la solution dans un flacon teinté au réfrigérateur.

γ-Analyse du percolat

On met 2 ml dans une fiole jaugée de 50 ml et on dilue avec environ 40 ml d'eau distillée. On ajoute 1 ml du réactif diazotique (sulfanilamide) et on agite. Puis, après 5 minutes, on ajoute 1 ml du deuxième réactif, on agite et on laisse reposer 20 minutes. On complète ensuite au trait de jauge avec de l'eau distillée, on agite et on mesure la densité optique au colorimètre à 520 mμ.

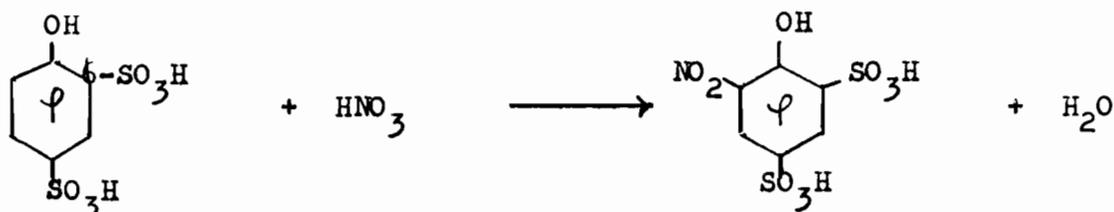
2- Dosage des nitrates

On emploie la méthode colorimétrique à l'acide 2-4 phénoldisulfonique.

a- Principe

On nitrate l'acide 2-4 phénoldisulfonique en position 6. Le développement de la coloration a lieu si:

- la nitration est effectuée pendant 10 minutes sur un milieu sec (elle est en effet partiellement inhibée par l'eau);
- le milieu est alcalinisé par NH_4OH 6N.



.../...

L'addition de CaCO_3 évite la perte de nitrate lors de l'évaporation. On mesure au colorimètre, à la longueur d'onde optimale (420 m μ), l'absorption de la lumière par la solution colorée en jaune.

b-Réactifs

-acide phénoldisulfonique: dissoudre 25 g de phénol blanc pur dans 225 ml d' H_2SO_4 concentré ($d=1,84$) et chauffer la solution dans un flacon légèrement bouché, dans un bain-marie bouillant pendant 6 heures. Conserver la solution dans un flacon teinté avec bouchon de verre.

-solution d'ammoniaque: mélanger un litre de NH_4OH ($d=0,89-0,90$) et un litre d'eau.

- CaCO_3 en poudre fine.

-solution standard de nitrate: dissoudre 0,122 g de KNO_3 dans l'eau et diluer à 1000 ml dans une fiole jaugée. La solution contient 100 μg d'azote nitrique par ml, si on a utilisé du nitrate de potassium pur et sec. Conserver la solution au réfrigérateur.

c-Analyse du percolat

On pipette 1 ml (contenant moins de 15 ppm de Cl^-) dans un bécher en pyrex de 50 ml, on ajoute environ 0,05 g de CaCO_3 et on évapore l'échantillon sur une plaque chauffante, dans une atmosphère exempte de vapeurs d' HNO_3 , en évitant l'ébullition. Il faut retirer les béchers quand les échantillons sont secs et éviter de poursuivre le chauffage. On laisse refroidir et on ajoute 2 ml d'acide Phénoldisulfonique à l'aide d'une pipette à écoulement rapide. On agite par rotation du bécher, pour que l'acide dissolve le résidu desséché.

Puis, après avoir laissé reposer 10 minutes, on ajoute 20 ml d'eau en agitant par rotation, et à l'aide d'une burette, on ajoute lentement la solution d'ammoniaque tout en agitant, jusqu'à ce qu'apparaisse une coloration jaune qui indique l'alcalinisation de la solution. On ajoute alors environ 2 ml en excès. Puis on transvase la solution dans une fiole jaugée de 100 ml, à l'aide d'un petit entonnoir, en rinçant abondamment à l'eau distillée, et on complète au trait de jauge. On agite et on mesure l'intensité de la coloration au colorimètre à 420 m μ (filtre bleu).

.../...

d-Courbe étalon

On détermine la concentration en nitrate d'un échantillon, en se référant à une courbe étalon dressée d'après les résultats obtenus avec des solutions contenant respectivement

0 , 10 , 30 , 50 , 70 et 100 μg d' N-NO_3^- .

Dans ce but, on dilue 10 ml de la solution standard de nitrate dans 100 ml d'eau dans une fiole jaugée et on agite. Puis on met respectivement 0 , 1 , 3 , 5 , 7 et 10 ml de cette solution standard diluée dans des béchers en pyrex de 50 ml et on mesure les intensités des colorations obtenues par le procédé décrit pour l'analyse du percolat.

B- RESULTATS ET DISCUSSION

Dans tout ce qui suit, on désignera par C la méthode du flux continu et par P la méthode de perfusion. L'expérience a démarré le 5 juin de la manière suivante:

- C : percolation des quatre colonnes à l'eau distillée;

- P : percolation de deux colonnes témoins à l'eau distillée, et de deux colonnes avec la solution de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.

Le 8 juin, on commence à percoler deux colonnes de l'expérience C par la solution de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. Les dosages sont effectués dès le lendemain. Pour les nitrites, il faut préparer 14 fioles jaugées de 50 ml: 6 pour la courbe étalon, 4 pour C (2 échantillons + 2 témoins) et 4 pour P (2 échantillons + 2 témoins).

Pour les nitrates, on utilise 14 béchers de 50 ml. Si l'on s'aperçoit que la concentration est trop forte, d'après l'intensité de la coloration, on recommence l'opération avec une quantité moins élevée de percolat.

Nous avons effectué 6 dosages successifs pour chacun des deux ions NO_2^- et NO_3^- , et les résultats se trouvent consignés dans les tableaux suivants:

.../...

Tableau I : Quantités de percolat en ml recueillies dans l'expérience C
(C_I et C₂ représentent les témoins).

	9 juin (1j)	12 juin (3j)	14 juin (2j)	16 juin (2j)	19 juin (3j)	21 juin (2j)
C _I	45	41	34	34	48	48
C ₂	67	60	50	51	76	77
C ₃	58	43	36	37,5	57	57
C ₄	54	42	35	36	54	54

I- Dosage des nitrites

Tableau II : 9 juin (P_I et P₂, C_I et C₂ représentent les témoins).

	Quantité percolat ml	Densité optique	µg N-NO ₂ ⁻ corresp.	
	1	0,070	1	
	2	0,144	2	
	3	0,206	3	
	4	0,294	4	
P _I	1	0		µg N-NO ₂ /ml
P ₂	1	0		
P ₃	0,1	0,118	1,68	16,8
P ₄	0,1	0,110	1,57	15,7
C _I	1	0		µg N-NO ₂ /ml total
C ₂	1	0		
C ₃	1	0,035	0,5	29
C ₄	1	0,020	0,3	16,2

.../...

	Quantité percolat ml	Densité optique	$\mu\text{g N-NO}_2^-$ corresp.	
Sol. Stand.	1	0,065	1	
	2	0,130	2	
	3	0,195	3	
	4	0,260	4	
P ₁	1	0		$\mu\text{g N-NO}_2^-/\text{ml}$
P ₂	1	0		
P ₃	0,2	0,040	0,62	3,1
P ₄	0,2	0,070	1,08	5,4
C ₁	1	0		$\mu\text{g N-NO}_2^-$ total
C ₂	2	0		
C ₃	1	0,102	1,58	68
C ₄	1	0,085	1,32	55,5

Tableau IV : 14 juin

	Quantité percolat ml	Densité optique	$\mu\text{g N-NO}_2^-$ corresp.	
	1	0,062	1	
Sol.	2	0,127	2	
stand.	3	0,180	3	
	4	0,247	4	
P ₁	1	0		$\mu\text{g N-NO}_2^-/\text{ml}$
P ₂	1	0		
P ₃	1	0,010	0,20	0,20
P ₄	1	0,022	0,34	0,34
C ₁	1	0		
C ₂	1	0		
C ₃	1	0		
C ₄	1	0		

Tableau V : I6 juin

	Quantité percolat ml	Densité optique	$\mu\text{g N-NO}_2^-$ corresp.	
Sol. stand.	I	0,062	I	
	2	0,130	2	
	3	0,180	3	
	4	0,255	4	
P ₁	I	0		$\mu\text{g N-NO}_2^-/\text{ml}$
P ₂	I	0		
P ₃	I	0,015	0,2	0,2
P ₄	I	0,015	0,2	0,2
C ₁	I	0		$\mu\text{g N-NO}_2^- \text{ t.}$
C ₂	I	0		
C ₃	I	0,030	0,5	28,5
C ₄	I	0,040	0,64	34,5

Tableau VI : I9 juin

	Quantité percolat ml	Densité optique	$\mu\text{g N-NO}_2^-$ corresp.	
Sol. stand.	I	0,050	I	
	2	0,120	2	
	3	0,180	3	
	4	0,240	4	
P ₁	I	0		$\mu\text{g N-NO}_2^-/\text{ml}$
P ₂	I	0		
P ₃	I	0,015	0,2	0,2
P ₄	I	0,015	0,2	0,2
C ₁	I	0		$\mu\text{g N-NO}_2^- \text{ t.}$
C ₂	I	0		
C ₃	I	0,030	0,5	28,5
C	I	0,040	0,64	34,5

	Quantité percolat ml	Densité optique	$\mu\text{g N-NO}_2^-$ corresp.	
Sol. stand.	1	0,060	1	
	2	0,120	2	
	3	0,180	3	
	4	0,245	4	
P ₁				
P ₂				
P ₃	EXPERIENCE TERMINEE			
P ₄				
C ₁	1	0		$\mu\text{g N-NO}_2^-$ t
C ₂	1	0		
C ₃	1	0,028	0,46	26,2
C ₄	1	0,038	0,64	34,5

2- Dosage des nitrates

Tableau VIII : 9 juin

	Quantité percolat	Densité optique	$\mu\text{g N-NO}_3^-$ corresp.	
Sol. stand.	0,1	0,043	10	
	0,3	0,097	30	
	0,5	0,143	50	
	0,7	0,185	70	
P ₁	1	0,045	14	$\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{ml}$
P ₂	1	0,030	9	idem
P ₃	1	0,080	26	
P ₄	1	0,080	26	$\mu\text{g N-NO}_3^-$ t.
C ₁	1	0,020	6	270
C ₂	1	0,015	4	268
C ₃	1	0,030	9	522
C ₄	1	0,023	6	324

Tableau IX : 12 juin

	Quantité percolat ml	Densité optique	$\mu\text{g N-NO}_3^-$ corresp.	
Sol. stand.	0,1	0,045	10	
	0,3	0,120	30	
	0,5	0,190	50	
	0,7	0,248	70	
P ₁	1	0,042	10,4	$\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{ml}$
P ₂	1	0,040	10,2	
P ₃	1	0,262	68	idem
P ₄	1	0,262	68	$\mu\text{g N-NO}_3^- \cdot \text{t.}$
C ₁	1	0,012	3	8,8 128
C ₂	1	0,015	4	240
C ₃	1	0,042	11	473
C ₄	1	0,038	10	420

Tableau X : 14 juin

	Quantité percolat ml	Densité optique	$\mu\text{g N-NO}_3^-$ corresp.	
Sol. stand.	0,1	0,050	10	
	0,3	0,130	30	
	0,5	0,195	50	
	0,7	0,280	70	
P ₁	1	0,038	8,6	$\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{ml}$
P ₂	1	0,038	8,6	id.
P ₃	0,5	0,170	42,2	idem 84,4
P ₄	0,5	0,170	42,2	84,4
C ₁	1	0		$\mu\text{g N-NO}_3^- \cdot \text{t.}$
C ₂	1	0		
C ₃	1	0,025	6	216
C ₄	1	0,020	4	154

Tableau XI : 16 juin

	Quantité percolat	Densité optique	$\mu\text{g N-NO}_3^-$ corresp.	
Sol. stand.	0,1	0,050	10	
	0,3	0,120	30	
	0,5	0,205	50	
	0,7	0,270	70	
P ₁	1	0,030	7,5	$\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{ml}$
P ₂	1	0,040	10	id.
P ₃	0,5	0,182	46	92
P ₄	0,5	0,180	45,8	91,6
C ₁	1	0,015	4	136
C ₂	1	0,015	4	136
C ₃	1	0,020	5	187,5
C ₄	1	0,020	5	180

Tableau XII : 19 juin

	Quantité percolat ml	Densité optique	$\mu\text{g N-NO}_3^-$ corresp.	
Sol. stand.	0,1	0,050	10	
	0,3	0,120	30	
	0,5	0,210	50	
	0,7	0,290	70	
P ₁	1	0,030	7,6	$\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{ml}$
P ₂	1	0,030	7,6	id.
P ₃	0,5	0,190	48	96
P ₄	0,5	0,200	51	102
C ₁	1	0		$\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ t.}$
C ₂	1	0		
C ₃	1	0,035	9	506
C ₄	1	0,035	9	486

	Quantité percolat ml	Densité optique	$\mu\text{g N-NO}_3^-$ corresp.	
Sol.	0,1	0,050	10	
	0,3	0,122	30	
	0,5	0,220	50	
	0,7	0,300	70	
P ₁				
P ₂	EXPERIENCE TERMINEE			
P ₃				
P ₄				
C ₁	I	0		$\mu\text{g N-NO}_3^- \text{t.}$
C ₂	I	0		
C ₃	I	0,018	4,2	239,5
C ₄	I	0,012	2,4	129,6

On peut alors tracer les courbes cumulatives représentatives des quantités de nitrite et de nitrate apparues par ml de percolat.

Tableau XIV : Quantités cumulatives de N-NO_2^- et N-NO_3^- par ml pour C

j.	N-NO_2^- $\mu\text{g/ml}$	Σ $\mu\text{g/ml}$	N-NO_3^- E $\mu\text{g/ml}$	Σ $\mu\text{g/ml}$	N-NO_3^- T $\mu\text{g/ml}$	Σ $\mu\text{g/ml}$	N-NO_3^- E-T $\mu\text{g/ml}$	Σ $\mu\text{g/ml}$
9	0,4	0,4	7,5	7,5	5	5	2,5	2,5
12	1,45	1,85	10,5	18	3,5	8,5	7	9,5
14	0	1,85	5	23	0	8,5	5	14,5
16	0,4	2,25	5	28	4	12,5	1	15,5
19	0,57	2,82	9	37	0	12,5	9	24,5
21	0,50	3,32	3,3	40,3	0	12,5	3,3	27,8

3- Discussion

L'expérience de perfusion P s'est terminée d'elle-même le quatorzième jour, quand le niveau du percolat a atteint, par suite des prélèvements successifs, le niveau de la prise d'air latérale (fig. 20₇). Mais cette période a suffi pour établir les différentes courbes (fig. 21):

-les nitrites sont apparus pendant les cinq premiers jours (16 µg N/ML) puis leur concentration a rapidement diminué pour devenir presque nulle en fin d'expérience.

Nous n'avons décelé aucune trace de nitrite dans les témoins percolés à l'eau distillée.

-par contre, il est apparu dans ces témoins, au début de l'expérience, une faible quantité de nitrate (11,5 µg N/ml), provenant du lessivage de la colonne de sol.

-enfin, dans les colonnes percolées par la solution de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nous avons pu noter que la concentration de N-NO_2^- , d'abord inférieure à celle de N-NO_3^- (essai-témoin 14 µg/ml en 4 jours), croissait rapidement et demeurait presque constante en fin d'expérience (91 µg N/ml en 14 jours). Comme la solution nutritive contenait 140 µg N/ml, nous voyons qu'environ les 2/3 de l'azote ammoniacal ont été transformés en nitrate, en 15 jours. Nous avons arrêté l'expérience du flux continu C le seizième jour. Les quantités totales de N-NO_2^- et de N-NO_3^- à chaque dosage (tableau XIV) sont irrégulières; ceci provient d'une variation du taux de perfusion, dû sûrement à un mauvais fonctionnement des valves électromagnétiques, ce qui constitue le grand défaut de l'appareil.

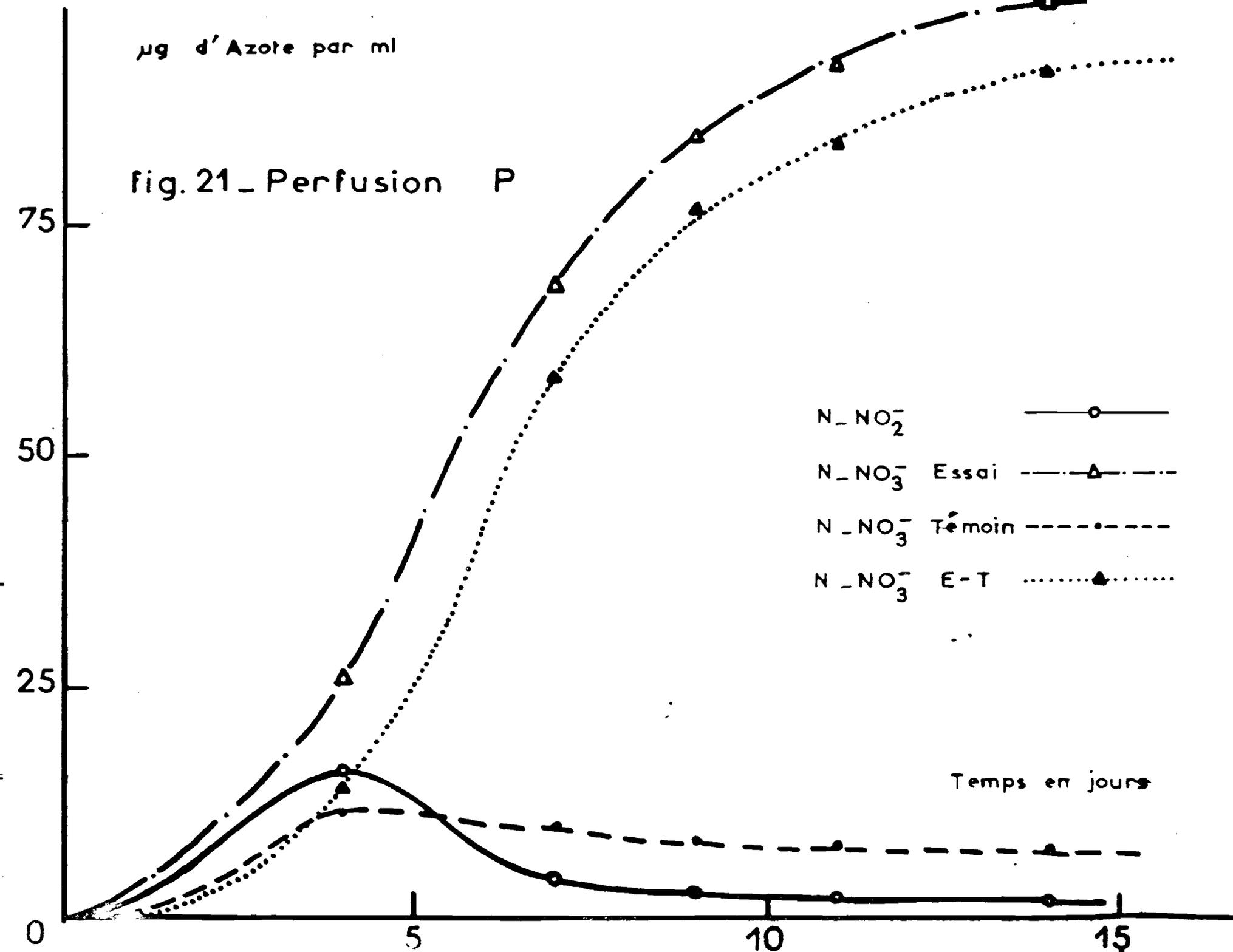
La courbe cumulative des quantités d'azote nitreux et nitrique apparues par ml (fig. 22) reflète par contre assez bien le processus de nitrification. Mais par comparaison avec les résultats obtenus pour l'expérience de perfusion P, nous voyons que cette courbe cumulative représente celle obtenue dans les 5 premiers jours pour l'expérience P (tableau XV):

	N-NO_2^- µg/ml	N-NO_3^- E µg/ml	N-NO_3^- T µg/ml	N-NO_3^- E-T µg/ml
P	13	41	11,5	25
C	49,32	40,5	12,5	27,8

.../...

μg d'Azote par ml

fig. 21 - Perfusion P

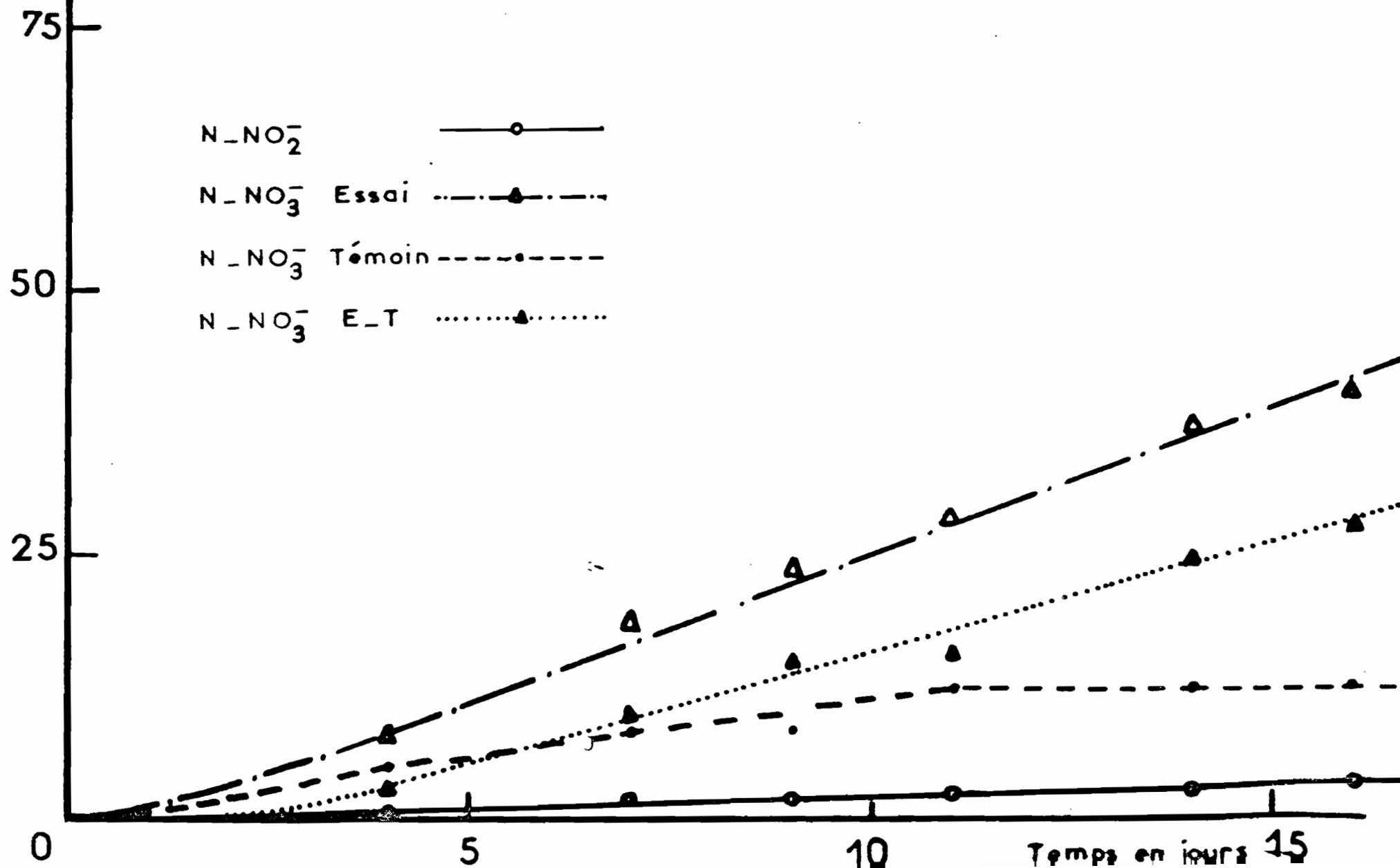


N-NO_2^- —○—
 N-NO_3^- Essai —△—
 N-NO_3^- Témoin —●—
 N-NO_3^- E-T▲.....

Temps en jours

μg d'Azote par ml

fig. 22 - Flux continu C



Nous pouvons noter cependant que la quantité de N-NO_2^- apparue est supérieure dans le cas de la perfusion P.

Il faut souligner à ce propos que la quantité de solution nutritive qui percole le sol, est largement supérieure dans P que dans C en un même laps de temps, car si l'on peut régler son débit par une valve électromagnétique dans le cas du flux continu, il n'en est pas de même pour la perfusion, pour laquelle on peut d'ailleurs reprocher le trop gros diamètre (0,8 cm) du tube de remontée de la solution nutritive (fig. 20₂). Un tube de 0,4 cm de diamètre serait plus approprié.

BIBLIOGRAPHIE

- I- MACURA J. : Continuous Flow Method in soil microbiology. I-Apparatus.
Fol. microbiol. 6 : 328 - 1961.
- 2- MACURA J. , KUNC F. : Continuous Flow Method in soil microbiology. II-
Observation on glucose metabolism.
Folia microbiol. 6 : 398-407 -1961.
- 3- MACURA J. , SZOLNOKI J. , VANCURA V. : Decomposition of glucose in soil.
Soil organisms.Proc. of the colloquium on the soil fauna, soil micro-
flora and their relationships,Oosterbeck, p.231-237.
North-Holland Publi. Co., Amsterdam, 1963.
- 4- MACURA J. : Application of the continuous flow method in soil microbio-
logy. Continuous cultivation of microorganisms.
Proc. of the 2nd Symposium, p.121-132.
Publi. House Czechoslov. Acad. Sci. Prague. 1963.
- 5- MACURA J. : Interrelations between microorganisms and plant in the rhi-
zosphere.
Plant Microbes Relationships. Proc. Symp. on relationships between soil
microorganisms and plant roots, p.26-33.
Publ. House Czechoslov. Acad. Sci., Prague. 1965.
- 6- MACURA J. , KUNC F. : Continuous Flow Method in soil microbiology.
III_Biological immobilization of nitrogen and phosphorus.
Fol. microbiol.10 : 36-43.-1965.
- 7- MACURA J. , KUNC F. : Continuous Flow Method in soil microbiology.
IV- Decomposition of glycine.
Fol. microbiol. 10 : 115-124-1965.
- 8- MACURA J. , KUNC F. : Continuous Flow Method in soil microbiology.
V-Nitrification.
Fol. microbiol. 10 : 125-135-1965.
- 9- MACURA J. , SZOLNOKI J. , KUNC F. , VANCURA V. , BABICKY A. : Decompo-
sition of glucose continuously added to soil.
Fol. microbiol. 10 : 44-54- 1965.
- 10- MACURA J. , KUNC F. : Decomposition of root exudates in soil.
Fol. microbiol. 11 : 239-247- 1966.
- 11- BREMNER J.M. : Inorganic forms of nitrogen . Methods of soil analysis.
Part. 2: Chemical and microbiological properties, p.1179-1237.
Ed. C.A. Black,American Soc. of Agronomy, Inc. Publ.,Madison-1965

METHODES D'APPLICATION
FOLIAIRE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE DU SOL
INSTITUT DE MICROBIOLOGIE DE PRAGUE
ACADEMIE TCHECOSLOVAQUE DES SCIENCES
SOUS LA DIRECTION DE J. VRANY

Ce court mémoire me permet d'exposer quelques techniques employées dans ce laboratoire par VRANY. Elles ont pour but de tester l'influence de certaines substances, soit sur le rendement d'une récolte, soit sur la microflore rhizosphérique. Dans le premier cas, on ne doit prendre aucune précaution d'aseptie, tandis que dans le deuxième cas, il faut opérer avec des cultures stériles hydroponiques pour l'analyse des exsudats racinaires, ou avec des cultures hydroponiques inoculées par la souche microbienne à tester.

I- Cultures non stériles en pot

Il s'agit dans ce cas de tester par exemple, l'influence de l'application foliaire d'urée sur le rendement d'une céréale. On peut opérer:

a- quantitativement

en injectant avec une microsiringue, une quantité connue de la substance, au niveau de la tige ou des gaines foliaires, ou bien en déposant des gouttes de la substance, additionnée de Tween ou d'albumine collante, sur les feuilles.

b- qualitativement

On peut tremper les feuilles pendant 30 minutes dans une solution de la substance à tester, ou bien les presser entre deux éponges imbibées par la solution, ou bien encore vaporiser celle-ci sur les plantes à l'aide d'un atomiseur, en ayant soin bien entendu, dans chaque cas, de bien isoler le sol des pots à l'aide de coton et de papier d'aluminium.

2- Cultures hydroponiques stériles

Il faut d'abord laver les graines pendant 30 à 60 minutes, puis les stériliser pendant 20 minutes dans une solution stérile à 0,1% de chlorure mercurique.

.../...

Après trois ou quatre rinçages à l'eau distillée stérile pendant deux heures, les graines sont placées dans des boîtes de Pétri, sur une couche d'agar à 0,7% pour les faire germer. On teste leur stérilité sur une fraction, dans des tubes de bouillon de culture, mis à l'étuve à 28° C, à raison d'une graine par tube.

Critique: certains auteurs comme POCHON, mettent en garde contre l'emploi du chlorure mercurique. Les lavages répétés à l'eau distillée ne suffiraient pas en effet, à éliminer complètement le mercure de la surface des graines.

Les boîtes de Pétri sont laissées à température ambiante ou bien placées à l'étuve à 25-30° C pendant deux à trois jours, de façon à obtenir des racines de 1 cm de long environ (les graines utilisées pour la démonstration étaient des semences de maïs). Puis les graines germées sont déposées dans des tubes de culture stériles, munis d'une ouverture latérale et renfermant des petites billes de verre pour support de culture, et de l'eau distillée (fig. 23).

Pour les longues expériences, on remplace l'eau par une solution minérale nutritive. On place les tubes sur un support dans une serre. Quand les plantules sont au stade trois feuilles, on injecte par l'ouverture latérale la substance à tester (antibiotique, herbicide, urée, etc...) dans la tige, à l'aide d'une microseringue. Il suffit ensuite d'examiner les exsudats racinaires pour déterminer la transformation chimique de la substance, ou de tester son influence sur la population microbienne inoculée au début de l'expérience.

3- Autres dispositifs de culture stérile

Deux autres dispositifs sont employés au laboratoire:

a- l'un consiste à cultiver les graines dans un tube dont le fond est constitué par un fin filet de nylon; ce tube est placé dans une fiole d'Erlenmeyer contenant l'eau distillée stérile ou le milieu minéral nutritif, et dans lequel se développeront les racines (fig. 24).

b- L'autre système est basé sur les mêmes principes, mais permet de placer trois tubes sur un milieu commun contenu dans une boîte de verre cylindrique dont le couvercle métallique comporte trois ouvertures pour les trois tubes, et deux petites pour permettre l'arrivée de l'air et la sortie du milieu liquide (fig. 25).

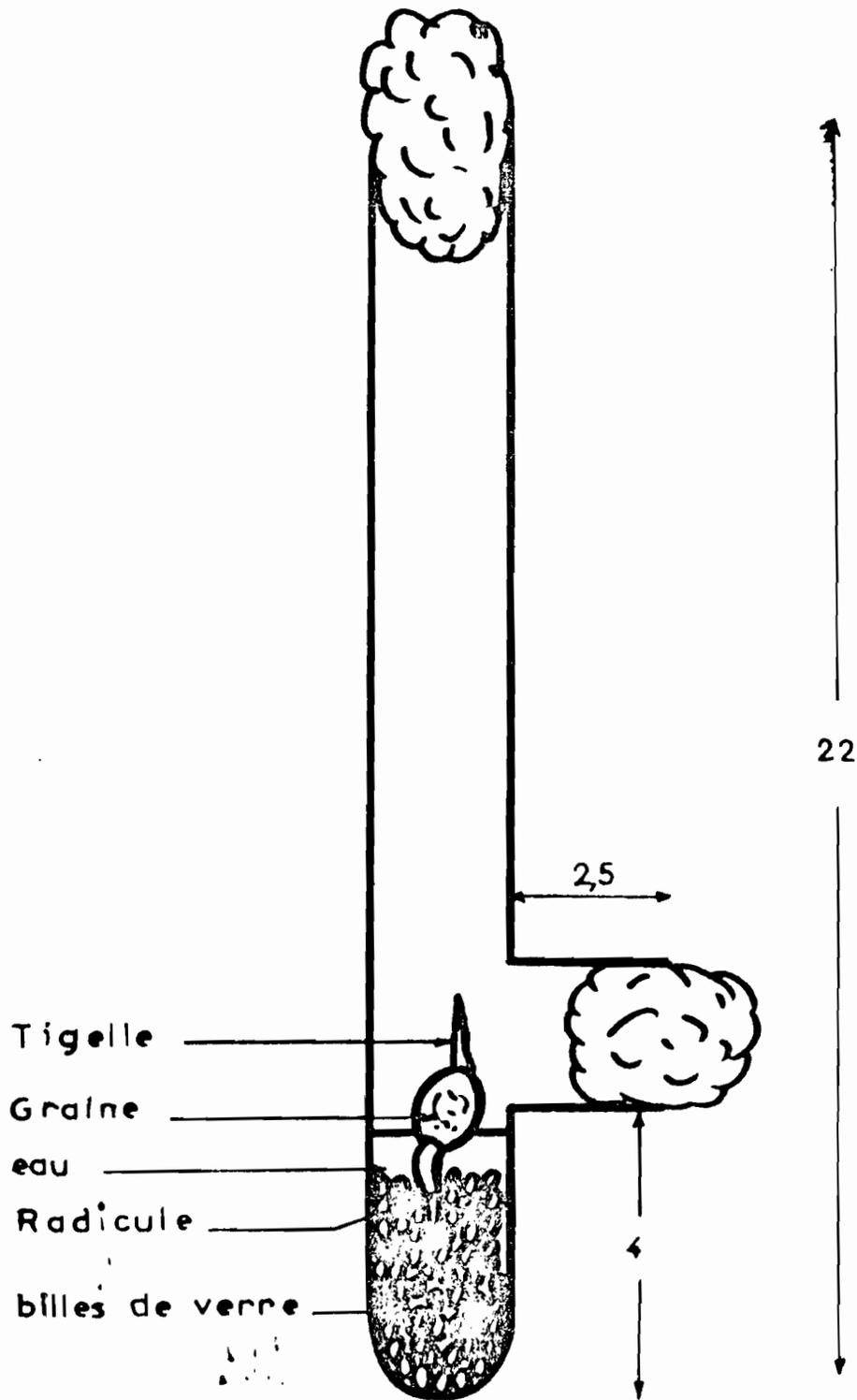


fig. 23 _ Dispositif de culture stérile

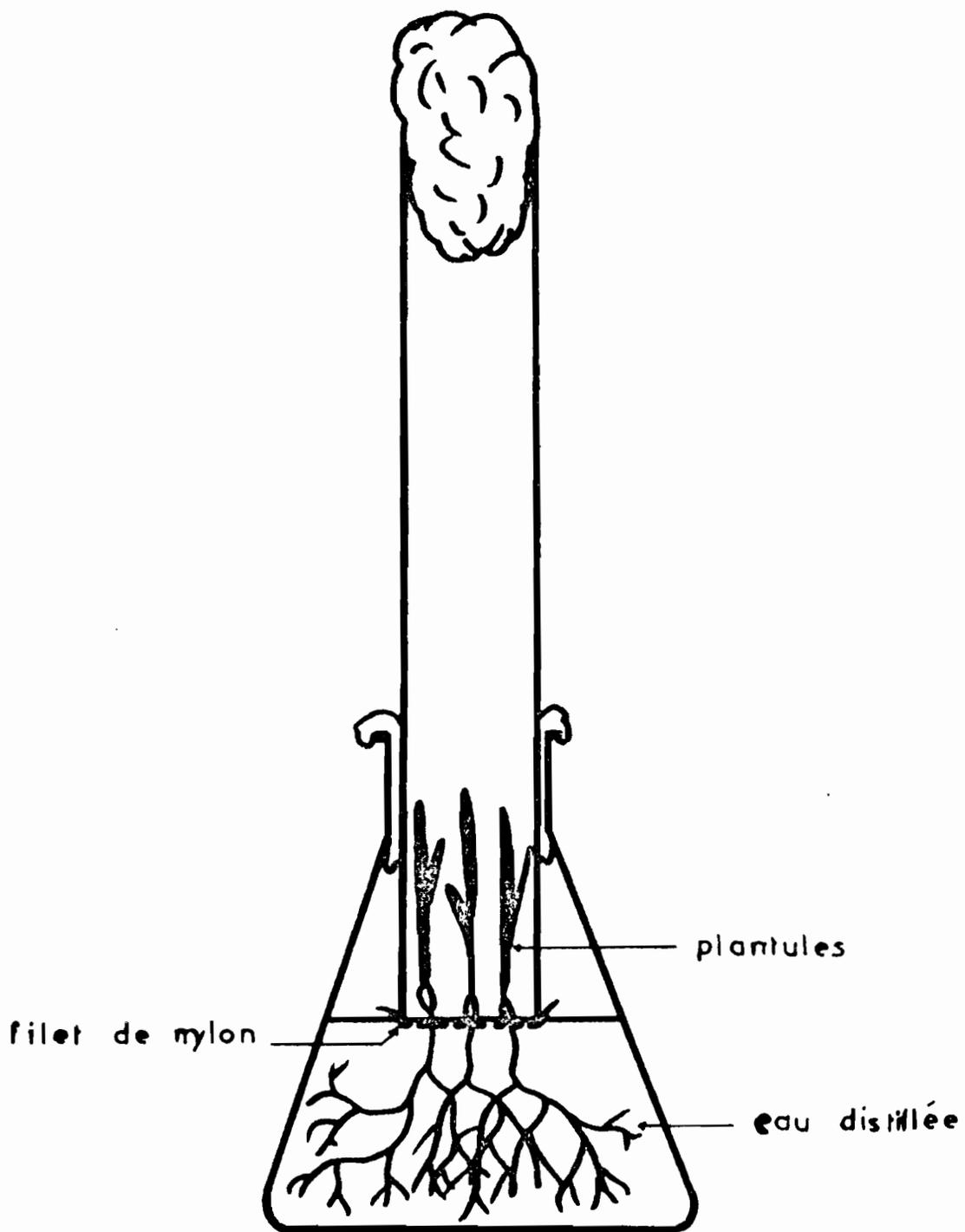
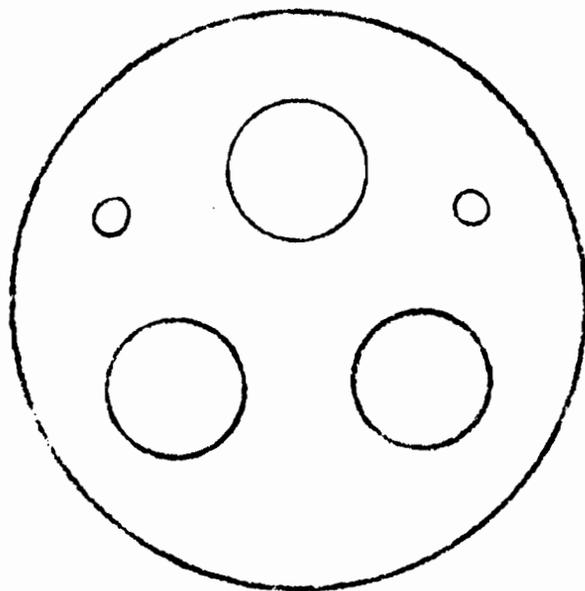
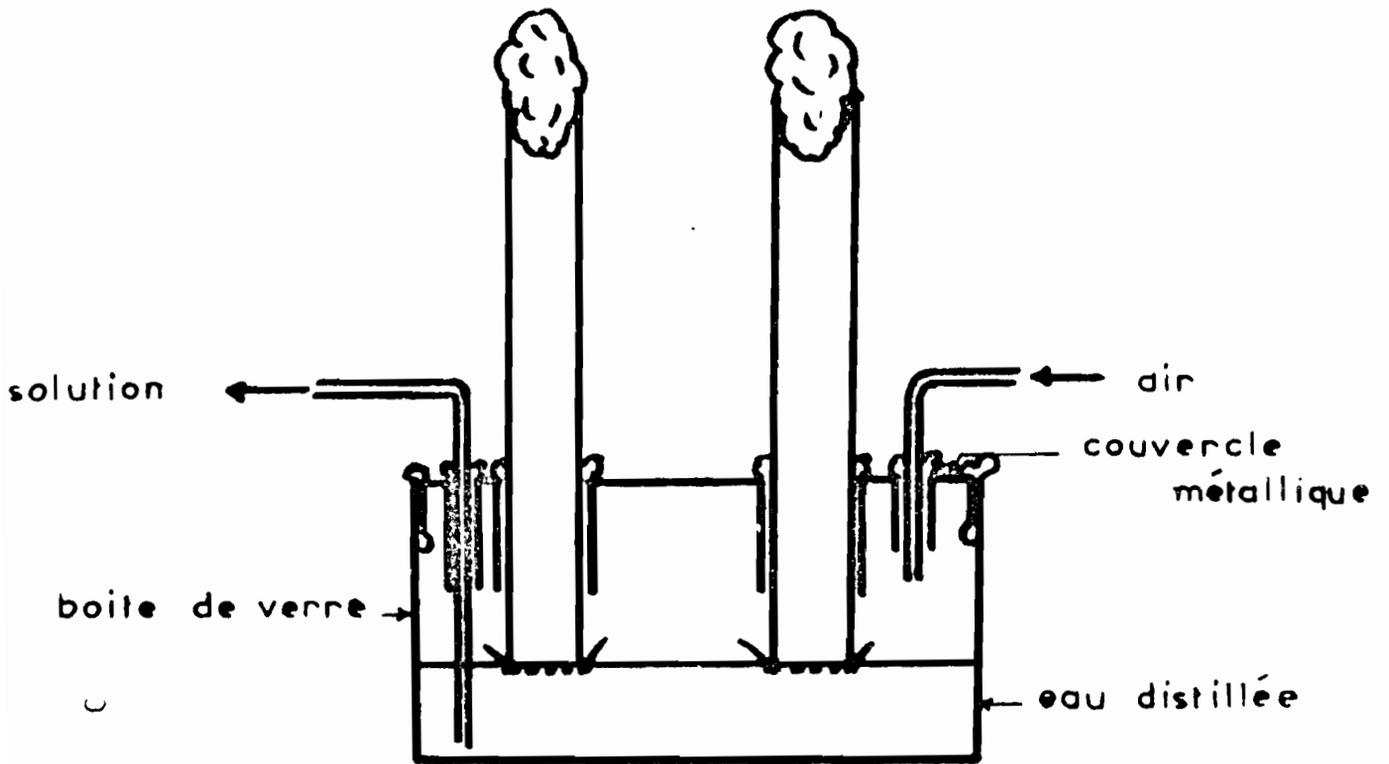


fig. 24 _ Dispositif de culture stérile



Couvercle

fig. 25 — Dispositif de culture stérile

BIBLIOGRAPHIE

- 1- VRANY J. , VANCURA V. , MACURA J. : The effect of foliar application of some readily metabolized substances, growth regulators and antibiotics on rhizosphere microflora.
Fol. microbiol. 7 : 61-70- 1962.
- 2- VRANY J. : Effect of foliar application of urea on the root microflora.
Fol. microbiol. 8 : 351-355- 1963.
- 3- VRANY J. : Effect of foliar application on the rhizosphere microflora.
Plant microbes relationships. Proc. symp. on relationships between soil microorganisms and plant roots, p.34-41. Publ. House Czechoslov. Acad. Sci. , Prague -1965.

oooOooo

M E T H O D E S D E D O S A G E
D E S C O M P L E X E S E N Z Y M A T I Q U E S D U S O L
R E S P I R O M E T R I E

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE DU SOL
CENTRE DE PEDOLOGIE-BIOLOGIQUE DE NANCY-VANDOEUVRE
SOUS LA DIRECTION DE Y. DOMMERMUES

Dans le but d'étudier l'effet rhizosphérique, nous avons cultivé en serre dans des plant-tubes, sur du sol de Bambey(Sénégal, sol DIOR tropical), une graminée fourragère tropicale, l'ELEUSINE coracana. Les pots témoins non plantés ont constitué le sol non rhizosphérique, tandis que les pots plantés d'une façon très dense, représentaient le sol rhizosphérique. Afin de comparer l'activité biologique globale de ces deux sols, nous avons procédé à la mesure du dégagement du CO₂, ainsi qu'au dosage des complexes enzymatiques suivants:

- deshydrogénase,
- saccharase,
- amylase.

Puis nous avons essayé de mettre au point une méthode eudiométrique de dosage de la catalase.

La deuxième partie de ce stage, nous a permis d'expérimenter un respiromètre différentiel pour étudier notamment l'effet rhizosphérique, la toxicité de certains extraits végétaux sur la microflore du sol, ainsi que l'influence des argiles sur cette toxicité et sur la biodégradation de ces substances complexes.

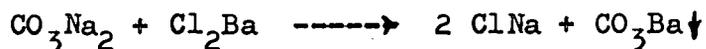
I- MESURE DU DEGAGEMENT DE CO₂ DU SOL

I-Principe de la méthode

Le dégagement du CO₂ du sol est fonction de son activité biologique et surtout de sa teneur en carbone organique facilement minéralisable.

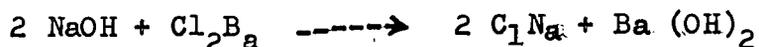
Les échantillons de sol humidifiés à 100% de la capacité au champ, sont mis dans des récipients étanches renfermant eux-même des béchers contenant des quantités connues de soude titrée. Au bout de 7 jours, on dose la soude libre dans les récipients renfermant les échantillons de sol et dans les récipients témoins n'en renfermant pas. Par la différence, on a la quantité de soude carbonatée, par la respiration du sol.

Pour effectuer le dosage de la soude libre, on élimine le carbonate de sodium formé, en le faisant passer à l'état de carbonate de baryum insoluble par adjonction de chlorure de baryum dilué.



La soude non carbonatée est dosée par de l'acide chlorhydrique qui doit être assez dilué (au maximum N/5) pour éviter la décomposition du CO₃Ba resté en suspension dans la liqueur.

En fait, la base libre qu'on dose n'est pas la soude qui était dans la solution à titrer, mais la baryte car:



On opère en présence de thymolphtaléine qui vire du bleu au blanc dès qu'il y a excès d'HCl.

2-Préparation de l'échantillon

On met dans un bocal à fermeture canette de 200 ml, 30 g de sol que l'on porte à une humidité correspondant à la capacité au champ. On y place également un bécher de 30 ml contenant 10 ml de soude

approximativement N qui se carbonatera en présence du CO_2 provenant de la respiration du sol.

3-Incubation

On ferme le bocal hermétiquement et on le met à l'incubation à 28°C , en maintenant la température aussi constante que possible pour éviter les condensations sur les parois du bocal.

4-Dosage de la soude libre

On verse la soude carbonatée dans chaque bécher dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 ml. On lave ce bécher avec 40 ml d' H_2O environ. Puis on verse dans chaque fiole, 4 ml de chlorure de baryum à 20% et on ajoute deux gouttes de thymolphtaléine à 0,2%. On dose alors, en faisant couler lentement HCl N/5 à l'aide d'une burette, jusqu'à disparition de la couleur bleue.

5-Calculs

La quantité de soude carbonatée est égale à la différence entre la quantité de soude dosée à la sortie des bocalx témoins et la quantité dosée à la sortie des bocalx contenant la terre.

1 ml HCl N/5 correspond à 4,4 mg CO_2

6-Résultats

Ils sont consignés dans le tableau I. Les mesures ont été effectuées aux 25° et 40° jours et nous permettent de voir d'une part, la supériorité très nette du sol rhizosphérique sur le sol témoin non planté, et d'autre part l'accentuation de la différence entre les deux mesures au cours du temps.

Tableau I : Mesure du dégagement de CO₂ d'un sol tropical DIOR

R = sol rhizosphérique

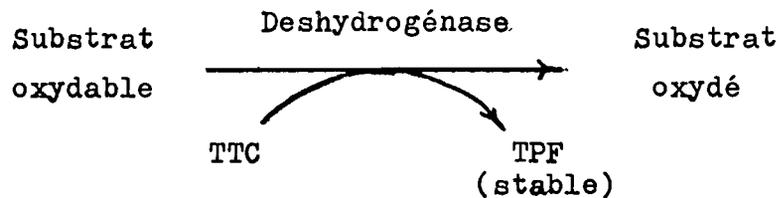
S = sol non planté

Sols	Hcl N/5	Hcl N/5	n'=témoin n'-a'	Coefficient humidité H%	mg CO ₂ /g bxcx0,1466	Total % C	Coefficient minéralisation d/ex3,181
	Mesures a	Moyennes a'	b	c	d	e	cm
R 25j	48,7 48,6 48,5 49,1	48,6	0,5	1,15	0,084	0,13	2,06
S 25j	48,9 48,8 48,8 49,1	48,8	0,3	1,07	0,047	0,13	1,15
R 40j	48,4 47,4 48,3 48,8	48,0	0,8	1,04	0,122	0,13	2,98
S 40j	48,8 48,8 48,8 48,9	48,8	0,1	1,10	0,016	0,13	0,39

II- MESURE DE L'ACTIVITE DESHYDROGENASIQUE

I- Définition

Les deshydrogénases sont les enzymes qui catalysent le transfert de l'hydrogène de la matière organique (substrat ou donneur) sur un accepteur d'hydrogène. Dans un sol en ~~anaérobiose~~ aérobie, cet accepteur est l'oxygène; en anaérobiose, l'oxygène peut être remplacé par un accepteur d'hydrogène artificiel: le T.T.C. (2-3-5 Triphényltétrazolium chlorid $C_{19}H_{15}ClN_4$ incolore). Celui-ci se transforme en TPF (Triphénylformazan $NNHC_6H_5$ rouge).



2- Principe de la méthode

-La quantité de TPF formée est proportionnelle à la quantité d'hydrogène transférée par la deshydrogénase.

-La quantité de TPF formée s'évalue par lecture au spectrophotomètre à 485 m μ . Au préalable, une courbe étalon est établie à partir de TPF.

Les résultats s'expriment en μl d' H_2 /g de sol sec/24 h. Cette méthode qui constitue une mesure des processus d'oxydation biologique dans le sol, donne de très bons résultats comparatifs.

3- Mode opératoire

suivant la méthode de
 CASIDA (L.E.), KLEIN (D.A.), SANTORO (T.) -1964
 Soil deshydrogenase activity
 Soil Science -98, (6), 371-376.

a- Mise en route

On mélange soigneusement 30 g de sol et 0,3 g

.../...

de CO_3Ca qu'on répartit en fractions de 6 g dans des tubes à essai de 18 ou de 22. Dans chaque tube on verse 1 ml d'une solution aqueuse à 3% de TTC et 2,5 ml d'eau distillée (éventuellement on ajoute une solution 0,02 M de DL-alanine), on malaxe à l'aide d'une tige de verre, on agite au vortex. L'humidité doit être telle qu'il apparait un peu d'eau libre à la surface du sol. On bouche les tubes et on incube 24 heures à 37° C.

b-Le lendemain

on transvase le sol sur un filtre (coton hydrophile ou papier filtre sans cendre) posé sur une fiole de 100 ml. On rince suffisamment à l'alcool méthylique ou à l'acétone, jusqu'à ce que le filtre employé perde sa couleur rouge et on ajuste à 100 ml avec de l'alcool méthylique ou l'acétone. On mesure ensuite la densité optique à 485 m μ au spectrophotomètre. On fait une gamme étalon avec du TPF, en partant d'une solution mère de 50 mg de TPF pour 100 ml de solvant (acétone ou alcool méthylique). La gamme étalon correspondra à des concentrations comprises entre 0 et 5 mg de TPF/100 ml de solvant. En aucun cas, on ne dépassera la concentration de 6 mg/100 ml. On effectue trois dosages par échantillon, et un témoin sans TTC dans chaque cas (blanc)

4- Résultats

La droite d'étalonnage du TPF est ramenée à l'ordonnée à l'origine ($y=0$). Dans le cas où l'appareil de lecture ne permet pas une remise à l'origine directe de la courbe d'étalonnage, si c est la densité optique lue pour l'acétone, on a

$$y-c = ax \quad \text{soit} \quad Y = ax$$

Soit d^0 la densité optique lue avec un échantillon donné, d la moyenne des densités optiques des trois lectures du même échantillon.

Soit d' la densité optique lue avec un blanc.

On reporte sur la courbe étalon la valeur de la densité optique $d-d'$ et l'on obtient directement la teneur de l'échantillon de 6 g de sol en TPF, soit f . Le résultat s'exprime en mg de TPF par g de sol sec.

$F = f/6 \times$ coefficient correcteur d'humidité
ou mieux, en μl d'hydrogène par g de sol sec par 24 heures.

$$F' = F \times 150,35 \quad (\text{tableau II})$$

Les résultats peuvent être exprimés en fonction du carbone total. Ils sont obtenus en se reportant à la courbe étalon (fig. 26) et confirment la supériorité du sol rhizosphérique sur le sol non planté. De plus, nous pouvons noter pour ce sol, un indice d'activité deshydrogénasique élevé.

Tableau II : activité deshydrogénasique
d'un sol tropical DIOR

R = sol rhizosphérique

S = sol non planté

Sols	Densité optique	d'-témoin:	mg% TPF:	:mg TPF/ :µl H/24h:		:g sol PS: g/sol : F'/C:		
	d	d-d'	f	coef. H:	F=f/6.H:Fx150,35:	F'		
	Mesures	Moyennes						
R 25j	6	7,6	3,6	0,15	1,15	0,03	4,32	3319
	II 6							
	4							
S 25j	6,5	6,3	1,3	0,10	1,07	0,02	2,68	2058
	7							
	5,5							
	5							

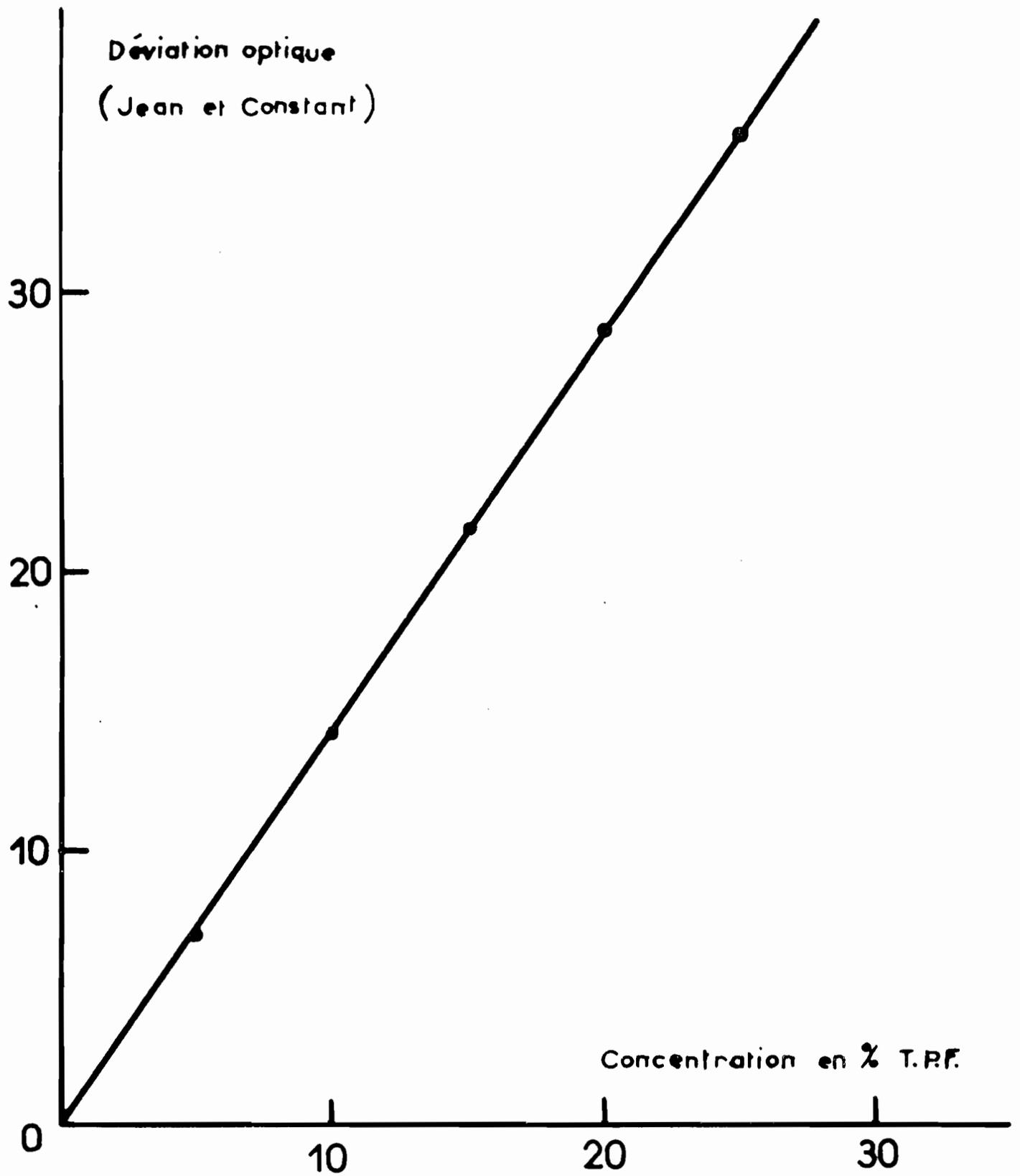


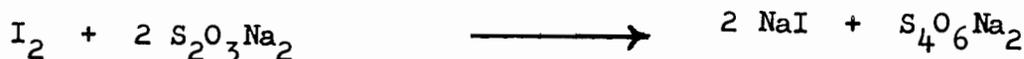
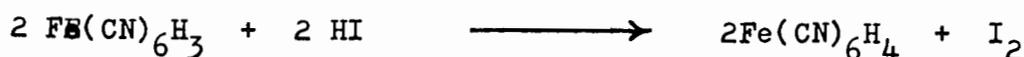
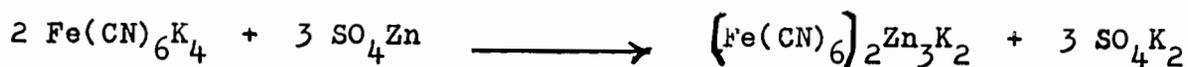
fig. 26 - DESHYDROGENASE

Courbe d'étalonnage

III- DOSAGE DE LA SACCHARASE

I- Principe

On fait agir, en milieu alcalin, le filtrat renfermant les glucides sur une solution titrée de ferricyanure de potassium. Le ferrocyanure engendré passe à l'état de ferrocyanure de zinc insoluble et l'excès de ferricyanure est dosé par iodométrie.



Par différence avec le témoin, on obtient la quantité de ferricyanure qui a réagi, donc la quantité de sucres réducteurs libérés par l'hydrolyse du saccharose.

2- Extraction de l'enzyme

On introduit 100 g de sol dans une fiole d'erlenmeyer de 200ml. On ajoute 3 ml de toluène avec une burette, on mélange soigneusement et on attend 15 minutes. Puis on ajoute 20 ml exactement de tampon PH=5,5 préparé comme suit:

500 ml d'une solution de phosphate disodique à 11,941 g/l

185 ml d'une solution d'acide acétique à 6 g/l (on vérifie le pH du tampon par colorimétrie ou au pH-mètre).

Ce tampon assurera le pH optimum pour l'action de l'enzyme. On ajoute ensuite 20 ml exactement d'une solution de saccharose à 5% fraîchement préparée. Dans les témoins, on met 20 ml d'eau au lieu de 20 ml de solution sucrée. Les deux solutions doivent être à 37° C. On ferme les fioles avec des bouchons de liège. On agite et on met à l'étuve 24 heures à 37° C, en même temps qu'un ballon bouché de deux litres, rempli d'eau distillée qui servira le lendemain matin. On agite les fioles 6 à 10 heures après.

.../...

3- Dosage des sucres réducteurs

Le lendemain, on verse dans chaque fiole 60 ml d'eau distillée à 37° C qui provient du ballon, et on agite. Puis on replace à l'étuve I heure. On jette ensuite sur filtre à plis, et on prélève exactement 1, 2, 3, 4, 5 ou 10 ml du filtrat et on verse dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 ml. On ajoute 10 ml d'eau distillée à la burette, puis exactement 10 ml de solution I (voir formule ci-dessous) à l'aide d'une burette. ON place au bain-marie bouillant 20 minutes. Pendant ce temps, on prépare une quantité suffisante de solution II avec IK (voir formule ci-dessous). On refroidit avec de la glace pilée et on ajoute 10 ml de solution II, ainsi que 10 ml de solution III (acide acétique à 9% en volume). On ajoute enfin 0,5 g environ de Thiodène, réactif d'iodométrie d'emploi très commode, et on titre à l'hyposulfite de sodium N/20. On effectue trois dosages par échantillon.

4- Composition des solutions utilisées

Solution I : solution de ferricyanure de potassium N/20 dissoudre dans l'eau distillée, 16,5 g de ferricyanure de potassium RP et 70 g de carbonate de sodium anhydre RP, amener à un litre.

Solution II : iodure de potassium, sulfate de zinc et chlorure de sodium. Préparer une solution contenant 50 g de sulfate de zinc et 250 g de chlorure de sodium par litre. Cette solution est stable, et on lui ajoutera au moment de l'emploi, une quantité d'iodure de potassium telle que la solution contienne 2,5 g pour cent. Il faut toujours ajuster à 100 ml.

5- Calculs et expression des résultats

On utilise la table qui figure à la page 66 du tome III du traité de chimie végétale de BRUNEL. Si l'on prélève 5 ml du filtrat pour le dosage des sucres, on multipliera par 2 les résultats figurant au tableau de la page 66. Si l'on prélève 1, 2, 3, 4 ml de filtrat, on multiplie par 10, 5, 3,3, 2,5 les résultats figurant au tableau de la page 66. Les résultats sont alors exprimés en mg de glucose/g de sol humide.

.../...

Il est nécessaire de les corriger, compte tenu de l'humidité du sol. Si l'humidité est X%, on applique le coefficient:

$$\frac{100 + X}{100}$$

Exemple: si l'humidité est 23%, on multiplie le chiffre obtenu par 1,23. On exprime les résultats en mg de glucose/g de sol sec (N_S). Afin de les standardiser, il est conseillé (DURAND 1965) d'exprimer ces résultats en μM ou en $m\mu M (10^{-3} \mu M)$ de produit formé par minute. Il suffit alors de multiplier N_S par le coefficient 3,858.

Exemple: si $N_S = 7,00$ mg de glucose/g de sol, l'activité exprimée en $m\mu M$ est:
 $7,00 \times 3,858 = 27.10^{-3} \mu M/\text{minute}/g$ de sol

Tous ces résultats peuvent être exprimés en fonction du carbone total.

6- Remarques

-Il est nécessaire de faire un témoin pour chaque type de sol étudié

-Pour l'extraction de l'enzyme, on utilise des solutions (solution tampon, solution de saccharose) faite avec de l'eau distillée dans un appareil en pyrex.

-Dans le cas des sols sableux, ou contenant moins de matière organique, on utilisera 20 g de sol au lieu de 10, les quantités des solutions d'extraction et de saccharose restant les mêmes.

7- Résultats

Ils sont contenus dans le tableau III, et confirment les résultats antérieurs:

- supériorité du sol rhizosphérique;
- accroissement de la différence avec le temps.

IV- DOSAGE DE L'AMYLASE

I- Principe

L'amylase est un enzyme du groupe des hydrolases et catalyse l'hydrolyse de l'amidon en glucose. On dose ce dernier de la même façon que pour la saccharase.

2- Mode opératoire

On procède comme pour le dosage de la saccharase, mais en remplaçant le saccharose par l'amidon apporté sous forme de 20 ml d'une solution d'amidon soluble fraîchement préparé. On porte la durée d'incubation à 4 jours. On effectue également trois dosages par échantillon.

3- Résultats

Ils s'expriment (tableau IV)

- en mg de sucres réducteurs par g de sol, soit N_A ;
- en 10^{-3} $\mu\text{M}/\text{minute}/\text{g}$ de sol. Dans ce cas, on applique à N_A le coefficient : 0,9645.

On peut penser que la première mesure (25^e jour) est erronée, car R < S. Le deuxième résultat confirme ceux obtenus pour les autres complexes enzymatiques.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Ces méthodes de dosage de l'activité enzymatique d'un sol nous ont donc permis d'une part, de confirmer la supériorité de l'activité biologique du sol rhizosphérique sur le sol non planté, d'autre part de situer cette activité biologique d'un sol tropical par rapport à celle de différents sols tempérés étudiés dans ce laboratoire, et de voir qu'elle est très réduite. Ceci confirme la faible valeur du taux de carbone (0,13%).

Tableau IV : Dosage de l'Amylase
dans un sol tropical DIOR

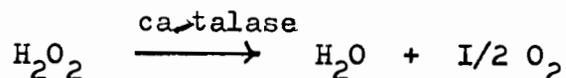
Sols	fil trat ml	Fe(CN) ₆ K ₃ N/20	Mes.	Moy.	n=échan n'=tém. n'-n	Tabl. 30	H% xH%	mg amy g sol _m x10 ⁻³	10 ⁻³ μM/gsol _{tot} x0,9645	C%	Taux/C 10 ⁻³ ug/g x100/C
R 25j IO			8,8								
			8,6	8,7							
			8,7		1,0	1,51	1,15	1,74	1,67	0,13	1288
			9,7	9,7							
S 25j IO			8,6								
			8,6	8,6							
			8,6		1,1	1,67	1,07	1,79	1,72	0,13	1326
			9,7	9,7							
R 40j IO			8,5								
			8,7	8,6							
			8,6		1,3	2,00	1,04	2,08	2,01	0,13	1543
			9,9	9,9							
S 40j IO			8,7								
			8,7	8,7							
			8,8		1,1	1,67	1,10	1,84	1,77	0,13	1363
			9,8	9,8							

V- DOSAGE DE LA CATALASE PAR LA METHODE EUDIOMETRIQUE

La méthode eudiométrique est la plus simple et la plus pratique, parmi les méthodes de détermination de l'activité catalasique.

I- Principe

On fait réagir sur une quantité connue de sol, une solution à 3% d'eau oxygénée, et on mesure le dégagement d'oxygène au cours du temps:



2- Protocole expérimental

L'appareil (fig.27) modifié par KRUGLOV et PAROMENSKAYA (Soviet Soil Science, janvier 66-I), est constitué par deux burettes réunies par le bas, par un connecteur à trois voies, la troisième reliant une ampoule D à l'aide d'un tube de caoutchouc. Les burettes et l'ampoule contiennent de l'acide sulfurique à 5%. La burette B qui sert à mesurer le volume d'oxygène dégagé, est reliée par un connecteur à trois voies C à la fiole active A, siège de la réaction, et qui est placée sur un agitateur magnétique E. Cette fiole de 100 ml possède un diverticule latéral dans lequel on dépose l'eau oxygénée avant de la faire réagir sur le sol. On détermine l'activité catalasique de la manière suivante:

on place 0,5g de CaCO_3 et 3 g de sol dans le fond de la fiole A, ainsi qu'un barreau aimanté. On dépose 5 ml d'une solution à 3% d'eau oxygénée dans le diverticule et on bouche hermétiquement la fiole. A l'aide de l'ampoule D, on ajuste le niveau de l'acide sulfurique dans la burette B à la graduation zéro. On ferme l'extrémité libre du correcteur à trois voies C à l'aide d'une pince de Mohr, et on teste l'étanchéité de l'appareil. On projette ensuite l'eau oxygénée sur le sol, en évitant d'échauffer l'atmosphère intérieure de la fiole pour ne pas fausser les résultats, et on met instantanément en marche, l'agitation magnétique.

On mesure toutes les 5 minutes, le volume de gaz dégagé, en amenant les niveaux de l'acide sulfurique dans la burette et dans l'ampoule dans un même

.../...

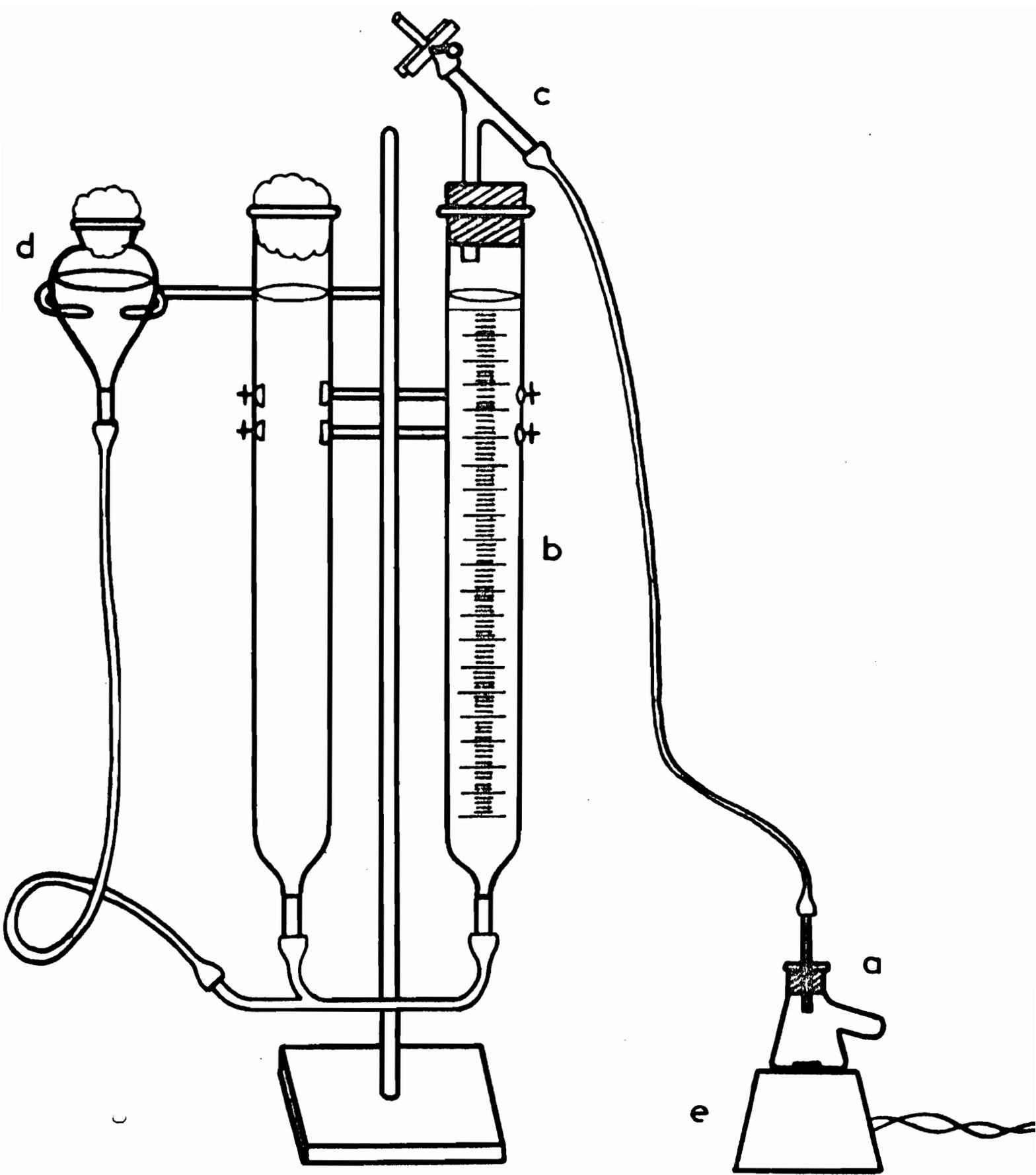


fig.27. - Appareil pour déterminer l'activité catalasique

plan, en manoeuvrant l'ampoule 15 secondes avant d'effectuer la mesure. On opère donc à pression constante.

Dans le cas d'analyses en série, on peut préparer d'avance toutes les fioles comme précédemment; habituellement, il faut 6 à 7 minutes pour déterminer l'activité catalasique d'un échantillon de sol. L'agitation magnétique entraîne une plus grande stabilité de la vitesse de la réaction.

3- Résultats

n Nous avons comparé l'activité catalasique de trois types de sols bien différents:

- un sol agricole brun calcaire (Montet-France);
- un sol ferralitique (Manankazo-Madagascar);
- un sol tropical (Dior-Sénégal).

Les courbes obtenues sont très différentes, et l'ordre croissant de l'activité catalasique, correspond bien à celui de l'activité biologique globale (fig.28).

4- Remarques

a- Critiques

Il est fort probable que les résultats obtenus par cette méthode sont supérieurs à ceux qui correspondent à l'activité réelle du complexe enzymatique car il se produit dans le sol des réactions chimiques non enzymatiques quand on y introduit l'eau oxygénée, entraînant un dégagement gazeux supplémentaire.

b-Dans un but pratique, nous avons modifié quelque peu le dispositif ci-dessus, en adaptant le calcimètre de DIETRICH-FRÜHLING (Prolabo-522I) à la mesure de l'activité catalasique d'un sol (fig.29).

c-Il existe d'autres méthodes de dosage dont celle de BAROCCIO (cité par DURAND dans la revue d'écologie et de biologie du sol tome 2, fascicule 2 -1965), qui consiste à doser l'eau oxygénée restant à

ml Oxygène dégagé / 3 g de sol

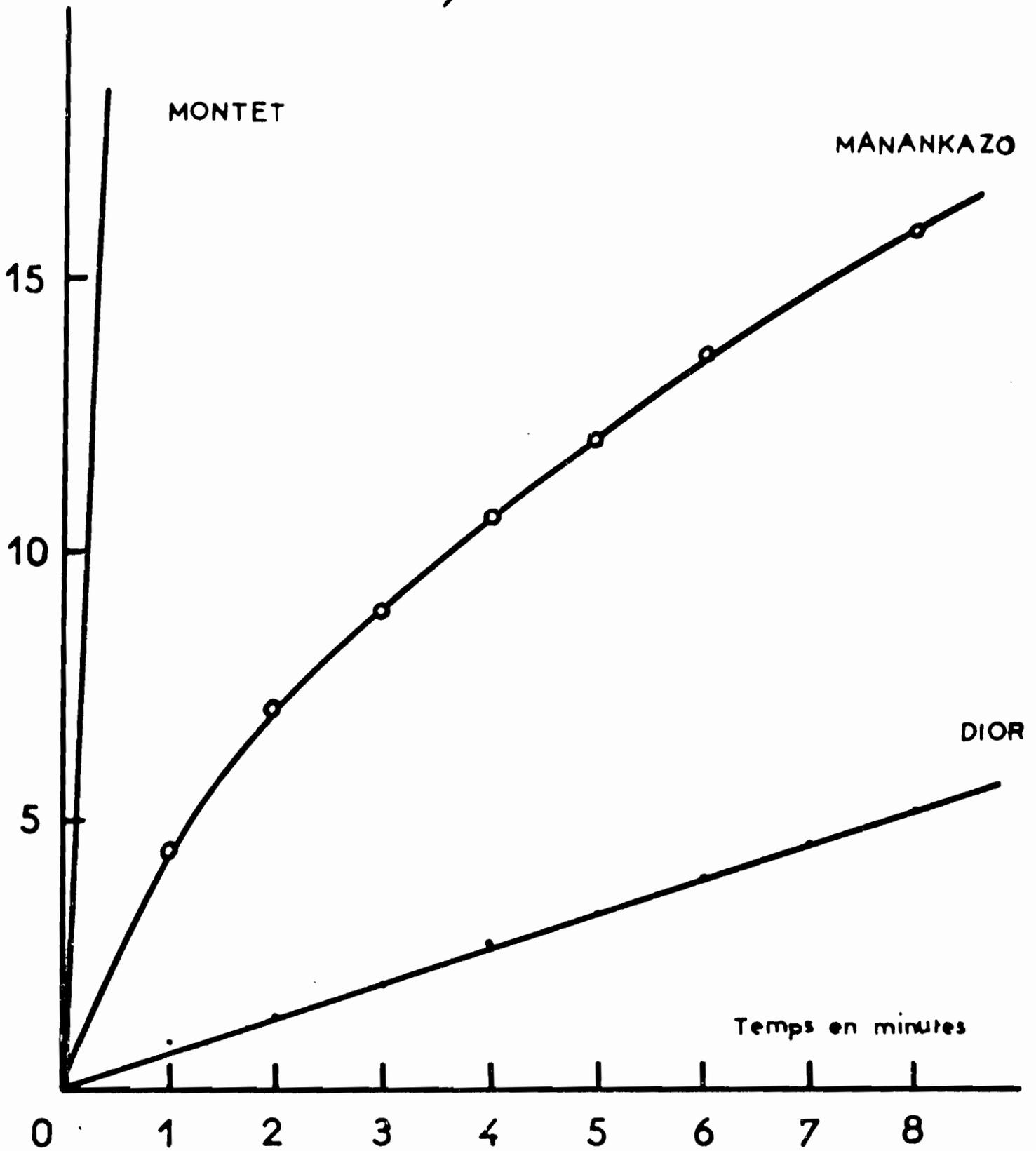


fig.28 - Activité Catalasique

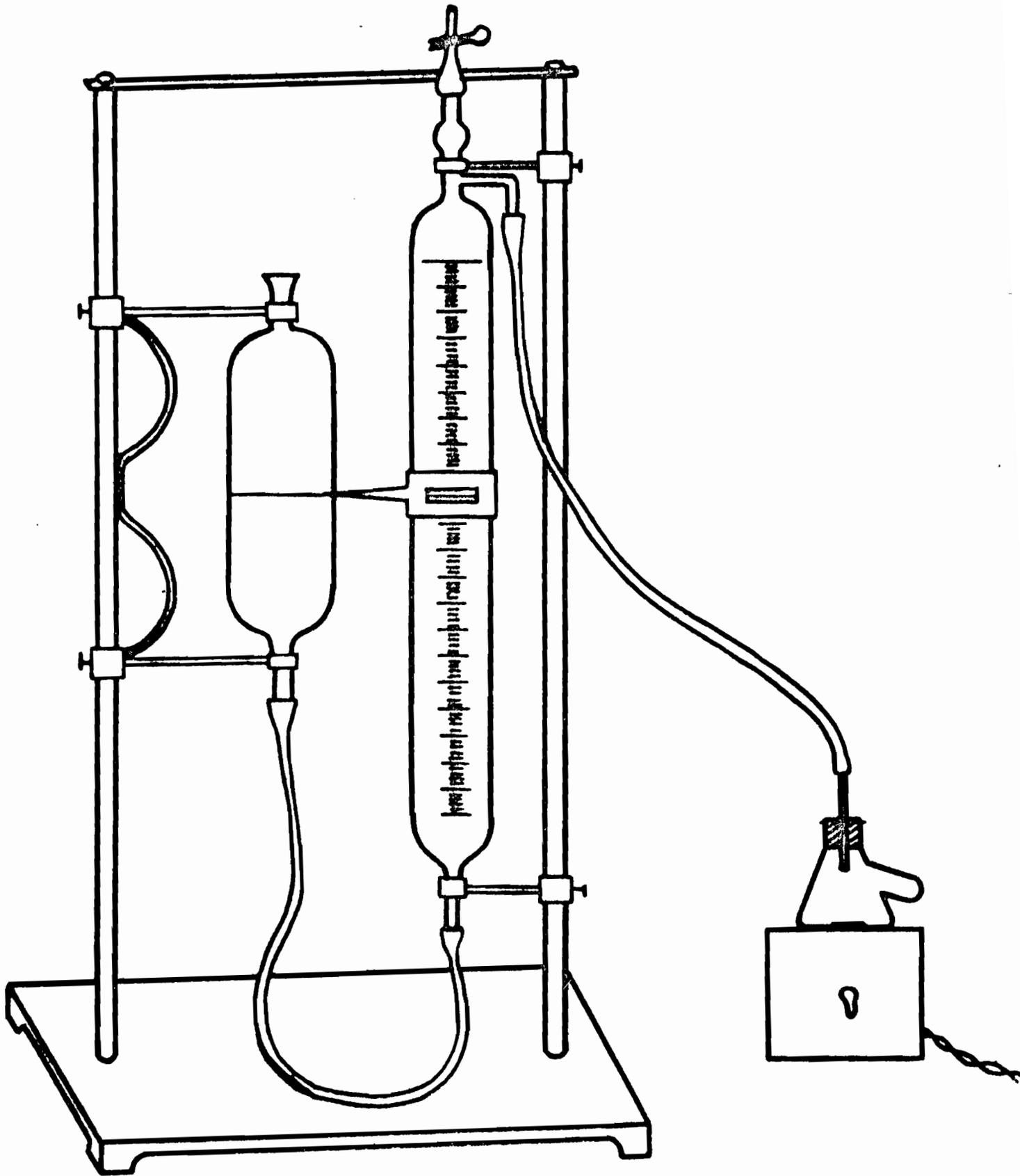


fig. 29

la fin de la réaction.

Protocole opératoire : dans un bécher de 100 ml, on met successivement 1 g de terre séchée à l'air, 10 ml de tampon phosphate de pH 6,8 (9,078 g KH_2PO_4 et 11,876 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ par litre) et 2 ml d' H_2O_2 à 3% préparée extemporanément. On ajoute vivement de temps en temps et on arrête la réaction au bout de 4, de 10 ou de 60 minutes, à l'aide de 10 ml d' H_2SO_4 4N. On complète à 100 ml avec de l'eau, on filtre et prélève 25 ml du filtrat que l'on place dans une fiole d'Erlenmeyer de 300 ml. On ajoute deux à trois gouttes d'une solution de molybdate d'ammonium à 1% et 5 ml d'IK à 10%. On porte à l'obscurité pendant 3 minutes et on dose l'iode libérée à l'aide de thiosulfate 0,05 N. On fait un essai à blanc avec du sable calciné et un essai au temps zéro en mettant l'acide sulfurique en même temps que l'eau oxygénée.

BAROCCIO exprime les résultats en ml de thiosulfate 0,05 N. Pour différentes terres, l'activité varie de 7,90 à 61,75 en opérant à 22° et laissant l'action se poursuivre pendant une heure.

VI- RESPIROMETRIE

I- Description du respiromètre différentiel GILSON

a- Principe

Il s'agit d'un respiromètre pour lequel toutes les mesures sont réalisées non plus à volume constant comme pour le respiromètre classique de WARBURG, mais en différentiel et à pression constante(fig.30).

b- Avantages

Ce principe de base permet en effet d'éviter au manipulateur, les divers inconvénients des appareils conventionnels à volume constant:

- le jaugeage de la verrerie,
- les calculs complexes de correction(mesures différentielles) ,
- les capillaires obstrués,
- la non interchangeabilité des fioles.

Les lectures se font directement à l'aide de volumètres à affichage digital dont l'échelle de mesure s'étend sur 500 microlitres. Tous les robinets sont en acier sur lexan et possèdent à chaque orifice, un joint torrique d'étanchéité.

c- Inconvénients

Les manomètres volumétriques étant connectés aux fioles actives par des tubes en tygon, ne peuvent être employés en cas d'utilisation de gaz à haute concentration(100% d'O₂ ,d'H₂ ,de CO₂ , d'N₂ etc...) qui diffuseraient au travers du tygon. L'appareil ne peut donc servir qu'à des études de respiration sous atmosphère normale .

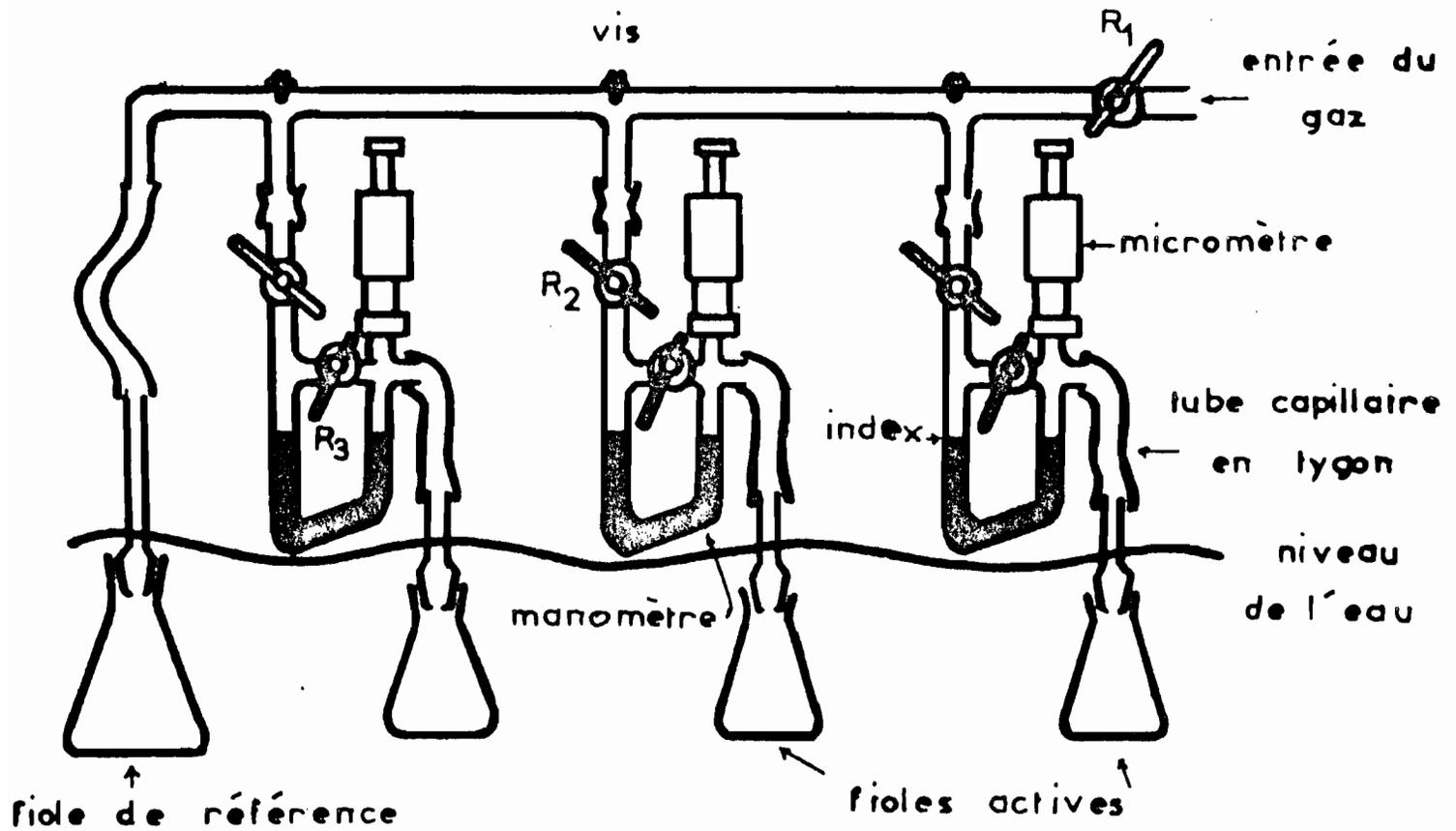


fig.30 _ Schéma du Respiromètre

Différentiel GILSON

2- Etude de l'effet rhizosphérique

Dans le but de vérifier une nouvelle fois, mais avec une autre technique, la supériorité de l'activité biologique d'un sol de rhizosphère sur un sol non planté, nous avons mesuré l'absorption d'oxygène à l'aide du respiromètre GILSON, par des échantillons de sol de la rhizosphère d'ELEUSINE coracana(sol Dior de Bambey-Sénégal), le sol témoin provenant des pots non plantés. Nous avons utilisé des fioles de mesure, spécialement conçues pour l'étude respirométrique des sols(fiole DROBNIK modifiée). Ces fioles, d'une capacité d'environ 50 ml(fig.31), sont allongées pour permettre de recevoir un plateau inoxydable pouvant contenir 15 g de sol. Elles sont également munies d'un tube de purge, et d'un récipient central de 1 ml pour l'absorbant de CO_2 .

a- Mise en route de l'expérience

On règle le bain thermostaté du respiromètre à 30°C , puis on ajuste le volume des deux fioles de compensation, avec de l'eau distillée, de telle façon que leur volume d'air, soit égal à la somme des volumes des diverses fioles actives. On pèse ensuite les échantillons de sol sur les plateaux correspondant et on les humidifie avec de l'eau distillée, de façon à atteindre une capacité au champ de 60%, favorable au développement optimum de la microflore du sol. On place un ml d'une solution à 40% de KOH dans le puit central de chaque fiole, et on y ajoute un morceau de papier filtre roulé qui offrira, après s'être imbibé de potasse, une surface beaucoup plus grande pour fixer le CO_2 dégagé par la respiration. On dispose alors les plateaux dans les fioles correspondantes, suivant un ordre établi à l'avance, et on ajuste les bouchons rodés, préalablement graissés au Rhodorsil(graissage au silicone), ainsi que les robinets de purge. Puis on fixe les fioles au manomètre correspondant, on ferme les robinets de purge de toutes les fioles ainsi que le robinet de communication avec l'atmosphère extérieure et on laisse incubé pendant une heure au maximum, pour permettre à l'atmosphère intérieure des diverses fioles, de se mettre à la température du bain. On ferme alors simultanément les robinets R_3 (fig.30) et on commence les mesures dont l'échelonnement sera fonction de l'intensité de la respiration.

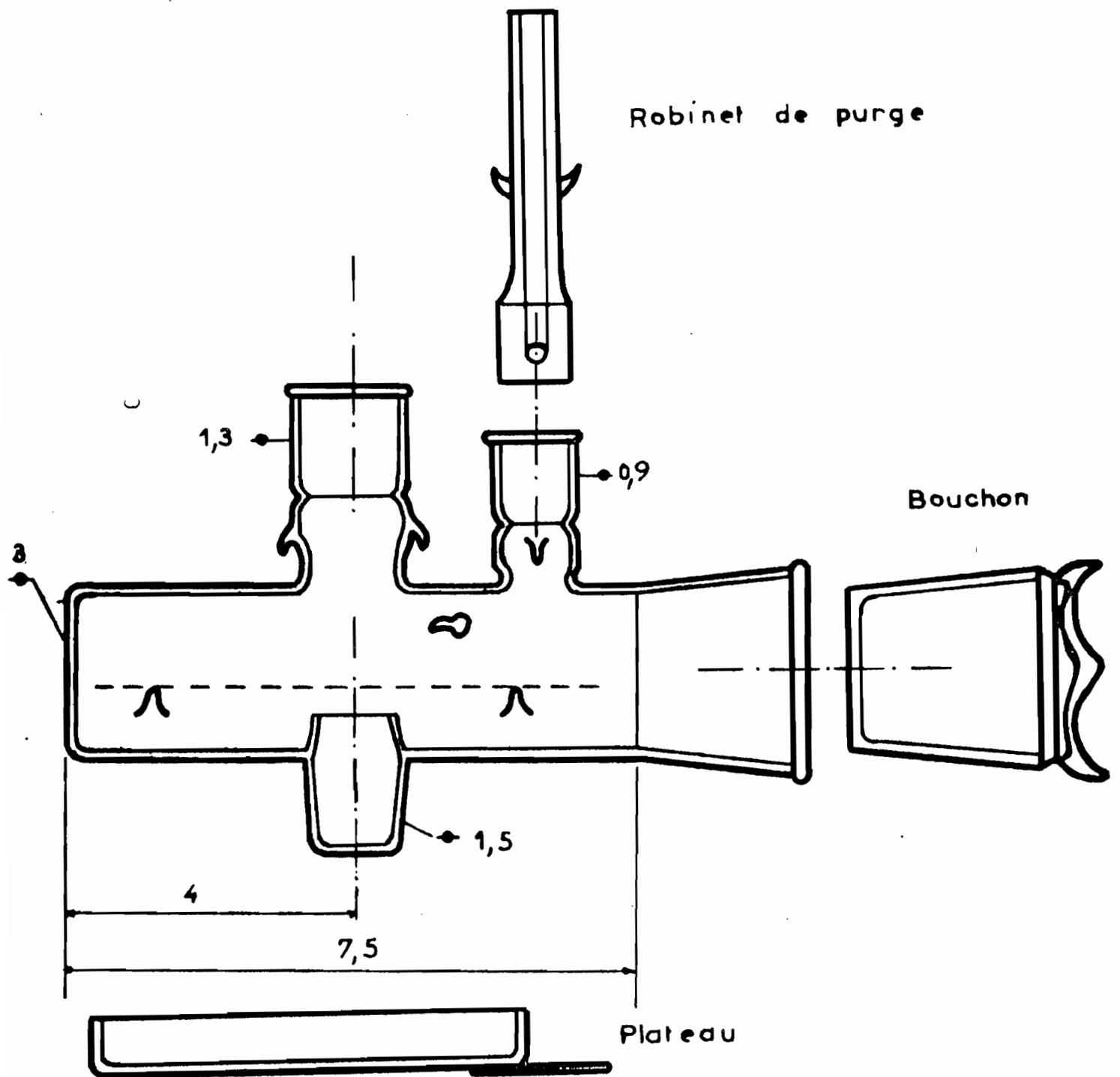


fig. 31 - Fiole de DROBNIK modifiée

b-Résultats (fig.32)

ILs confirment ceux obtenus précédemment:

sol rhizosphérique : 100 μ l d'O₂ absorbés en 6 heures par 10 g de sol (poids sec);

sol non planté : 38 μ l d'O₂ absorbé en 6 heures par 10 g de sol P.S.
Il y a donc toujours supériorité du sol rhizosphérique, mais la respiration est néanmoins très faible, comparée à celle d'un sol tempéré.

3- Etude de la biodégradation d'extraits aqueux de litières forestières

a-Principe

Nous avons percolé une colonne de sol par un extrait à l'eau de litière forestière pendant 48 heures, pour mesurer ensuite l'absorption d'oxygène, à l'aide du respiromètre GILSON, par des échantillons de sol, en faisant une comparaison avec le même sol percolé par de l'eau distillée.

b-Protocole opératoire et résultats

Nous avons réalisé trois expériences similaires en faisant varier la technique d'inclusion de l'extrait de litière au sol, le type de litière et enfin le type de sol.

α -Mise au point de la technique, par comparaison de la percolation avec l'apport de substance au dernier moment.

Nous avons percolé deux colonnes d'un sol de Syvrite planté en feuillus(sol brun lessivé) d'une part avec un extrait à l'eau d'écorce de Pin, et d'autre part avec de l'eau distillée. La percolation terminée, on élimine le liquide en excès par filtration sous vide. Nous avons réalisé une expérience similaire en n'ajoutant l'extrait d'écorce de Pin et l'eau, qu'au dernier moment au sol pour l'humidifier approximativement à 60% de sa capacité au champ.

μl Oxygène absorbé
pour 10g sol P.S.

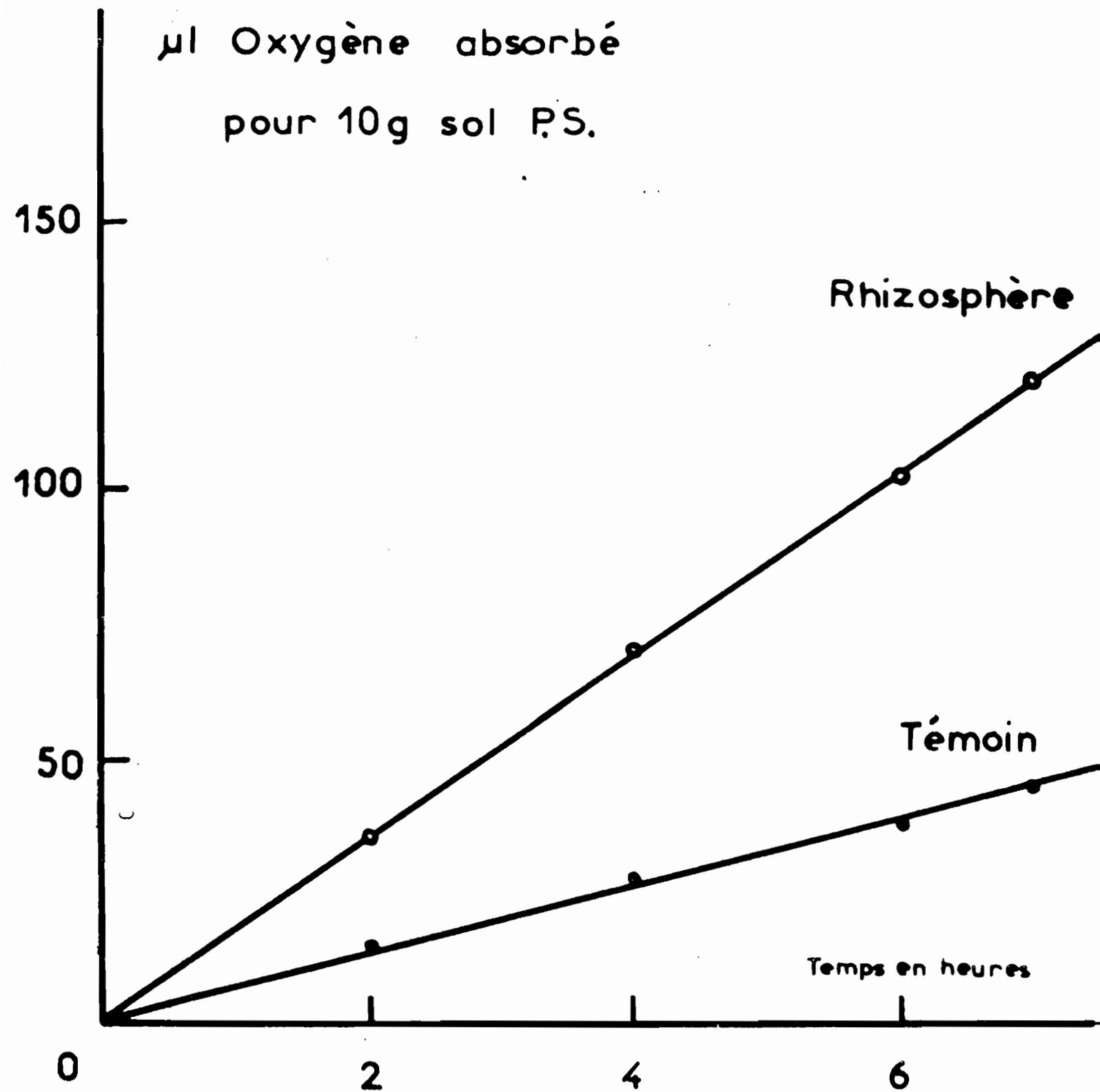


fig. 32 - Effet Rhizosphérique.

La percolation s'est révélée comme étant la meilleure technique pour de telles études car la différence de l'extrait d'écorce de Pin avec l'eau est plus accentuée que dans le cas de l'apport au dernier moment (fig. 33).

β -Influence du type de litière

Nous avons comparé deux litières forestières très différentes: un extrait à l'eau d'écorce de Pin et un extrait à l'eau de feuilles de Charme, en percolant par ces deux extraits, deux colonnes de sol de Syvrite planté en feuillus. L'extrait de feuilles de Charme s'est révélé être le plus actif sur la micropopulation du sol (fig. 34).

γ -Interaction du type de sol

Nous avons comparé, dans une expérience identique à la précédente, l'influence des deux extraits à l'eau d'écorce de Pin et de feuilles de Charme sur deux sols différents:

- un sol de Syvrite planté en feuillus (sol brun lessivé)
- un andosol (sol brun cryptopodzolique de type moder).

On retrouve toujours la supériorité de l'extrait de feuilles de Charme, mais pour l'andosol, la différence entre les deux extraits est très atténuée par comparaison avec le sol de Syvrite, au profit de l'extrait d'écorce de Pin (fig. 35).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Pour tirer de meilleurs résultats de cette série d'expériences, il aurait fallu en effet, pouvoir doser la quantité de substance active appliquée au sol, en mesurant leur teneur en carbone, après lyophilisation des extraits aqueux, pour pouvoir les comparer pour une même teneur en carbone et faire des études de biodégradation en employant des teneurs en carbone croissantes. Ceci représente d'ailleurs une technique générale que l'on pourrait appliquer pour de nombreuses autres substances organiques et notamment les exsudats racinaires.

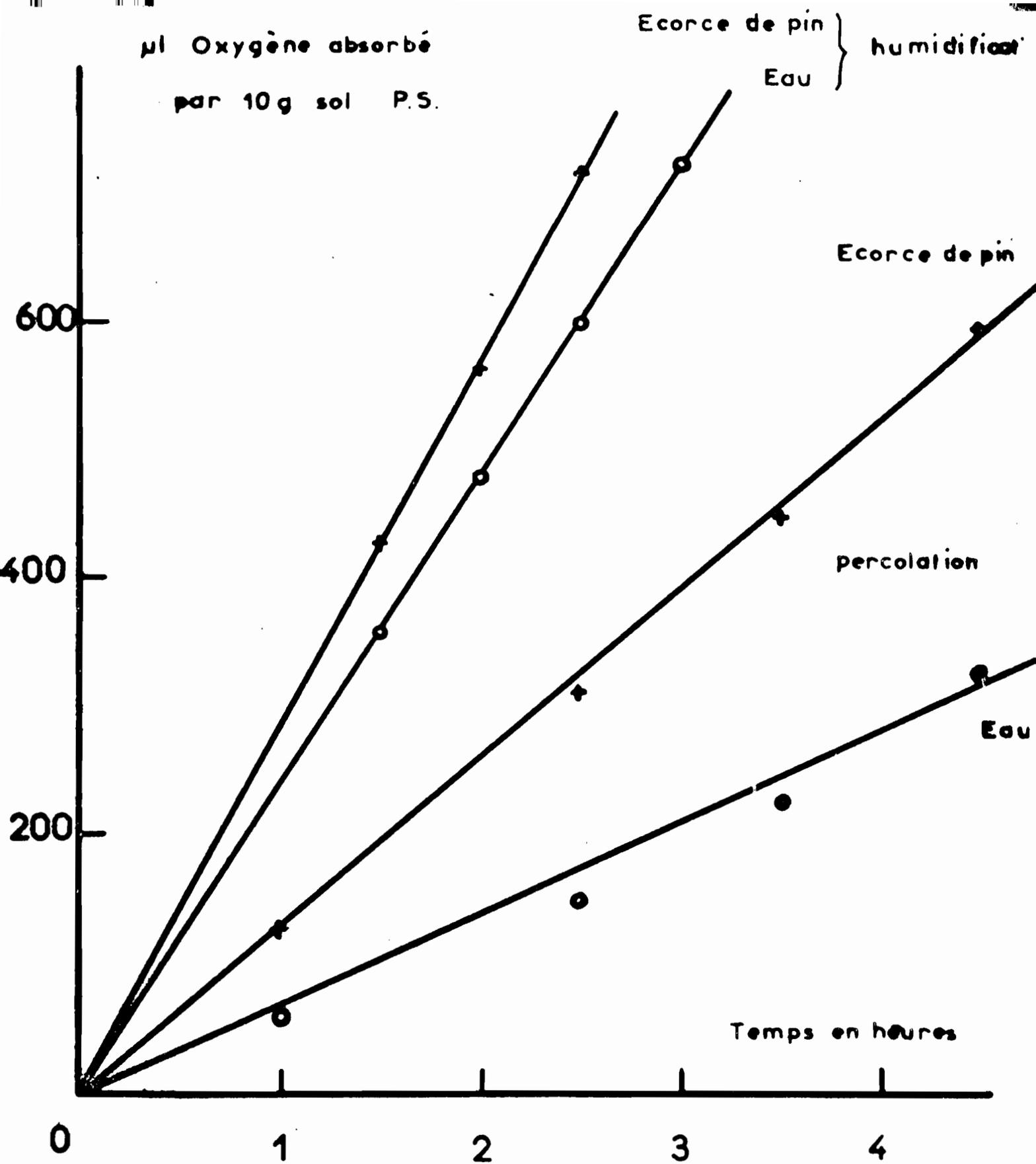


fig.33 - Comparaison humidification
et percolation

$\mu\text{l O}_2$ absorbé par 10 g sol PS.

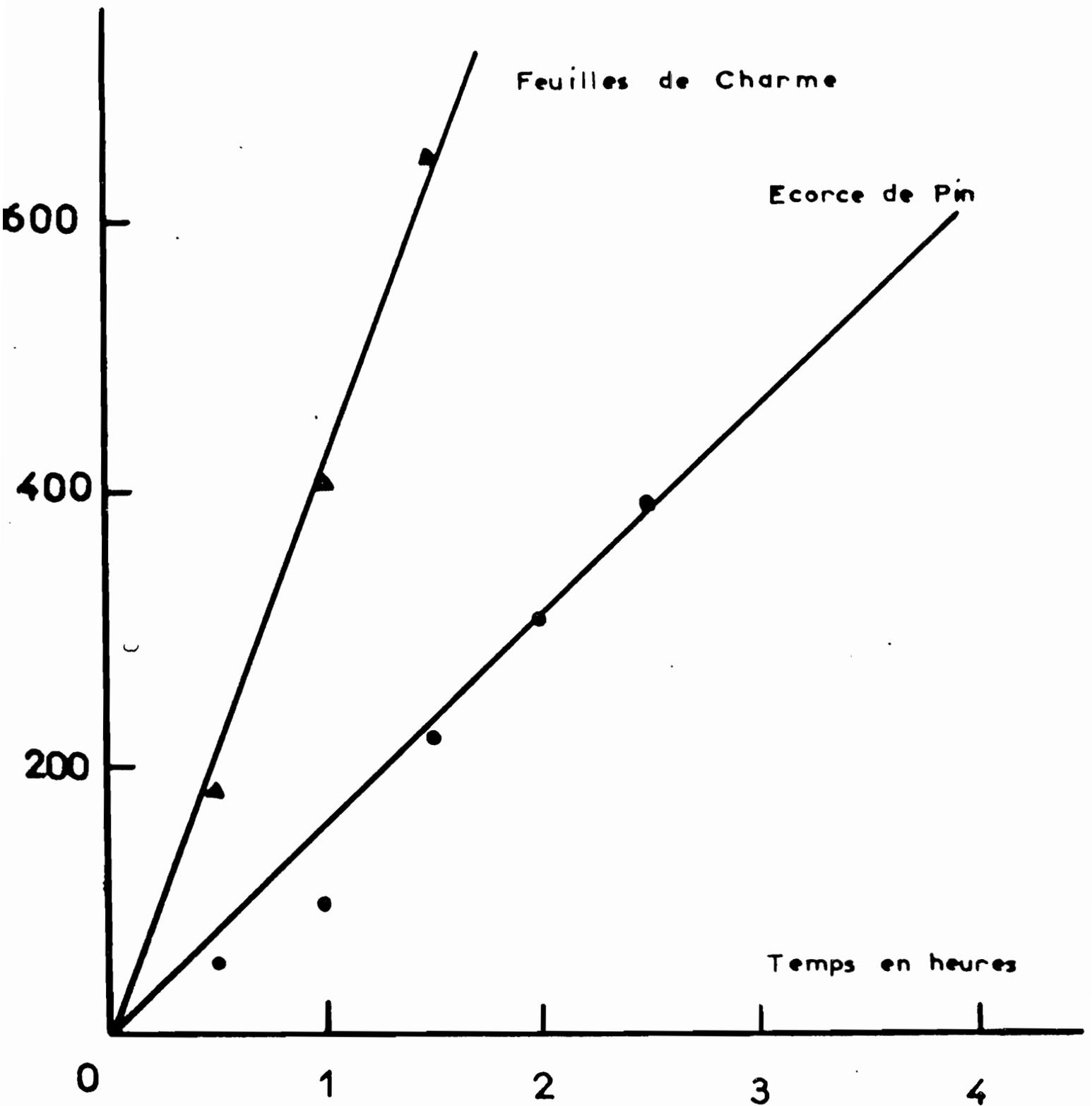


fig. 34 - Influence du type de litière

$\mu\text{l O}_2$ absorbé par 10g sol P.S.

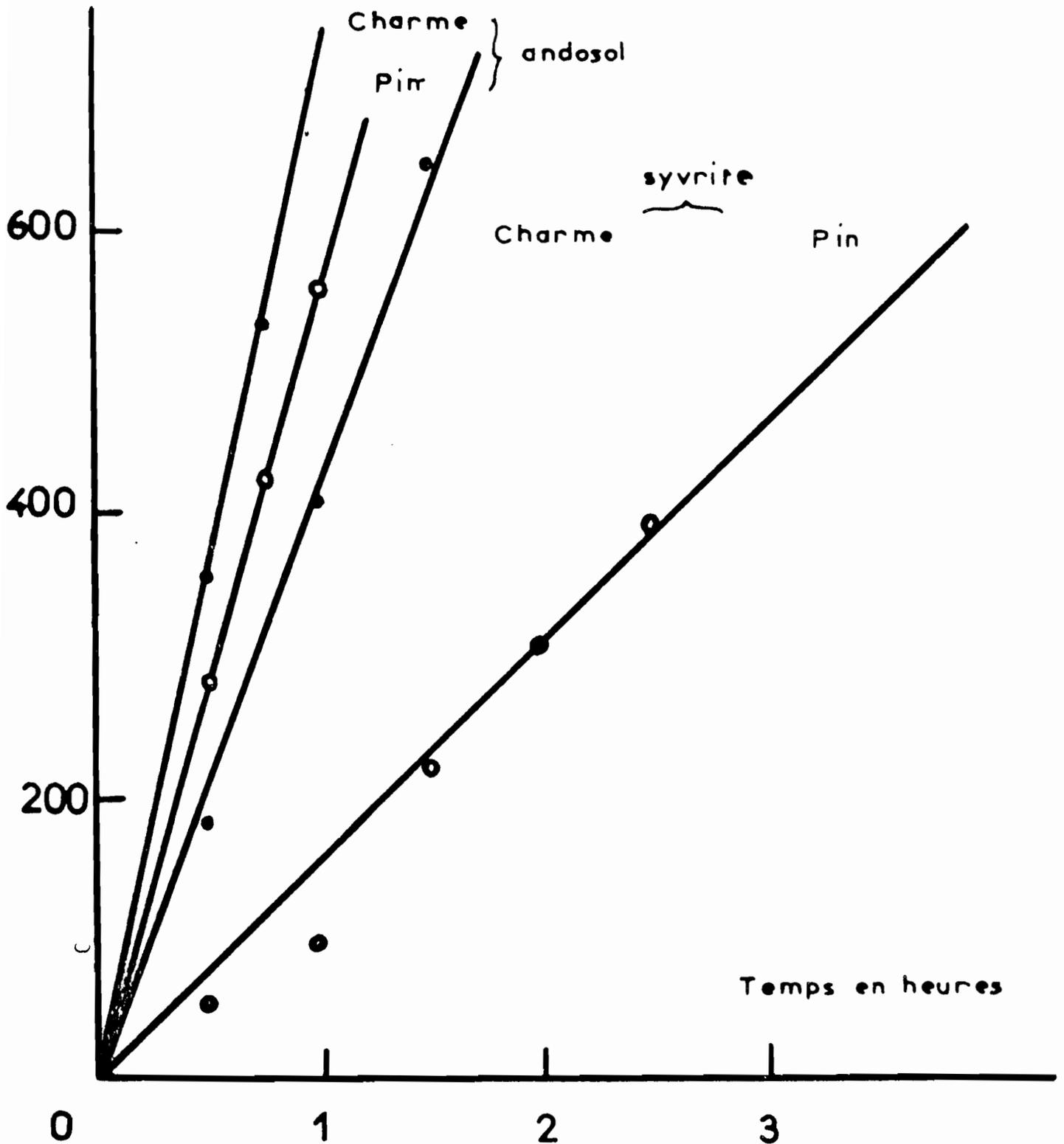


fig. 35 - Influence du type de sol

4- Etude de l'influence des argiles

a- Sur la toxicité de l'extrait aqueux d'écorce de Pin vis à vis de BACILLUS megaterium var. non sporulée

Nous avons opéré en milieu liquide, dans des fioles de mesures de 15 ml, pourvues d'un diverticule latéral, d'un puit central et d'un robinet de purge. L'argile utilisé était du kaolin lavé.

α-Protocole expérimental

On prépare les quatre systèmes suivants, avec trois répliques pour chacun d'eux:

- système 1 : dans la fiole: 2 ml de milieu Y_C'ensemencé avec B. megaterium
dans le diverticule: 1 ml d'eau distillée,
dans le puit central: 0,3 ml de KOH 40%.
- système 2 : dans la fiole: 2 ml de milieux Y_C'ensemencé avec B. megaterium
dans le diverticule: 1 ml d'extrait aqueux d'écorce de Pin
dans le puit central: 0,3 ml de KOH 40%.
- système 3 : dans la fiole: 2 ml de milieu Y_C'ensemencé avec B. megaterium
+ kaolin lavé (6 mg/ml),
dans le diverticule: 1 ml d'eau distillée,
dans le puit central: 0,3 ml de KOH 40%.
- système 4 : dans la fiole: 2 ml de milieu Y_C'ensemencé avec B. megaterium
+ kaolin lavé (6 mg/ml),
dans le diverticule: 1 ml d'extrait aqueux d'écorce de Pin,
dans le puit central: 0,3 ml de KOH 40%.

Le milieu Y_C' a la composition suivante: KH_2PO_4 1 g, KNO_3 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, NaCl 0,1 g, FeCl_3 0,01 g, glucose 1 g, oligoéléments 1 ml, casamino-acides 1 g, extrait de levure 1 g, eau distillée 1000 ml.

On met les fioles à incuber dans le bain thermostaté à 30° C sous agitation pendant 15 à 30 minutes, puis on ferme la communication des deux branches des manomètres et on effectue des mesures de l'absorption d'oxygène toutes les demi-heures. Au bout de deux heures, on fait passer rapidement le contenu des diverticules dans le milieuensemencé et on continue les mesures.

.../...

β- Résultats

D'après le tracé des courbes d'absorption totale d'O₂ d'une part (fig.36) et d'absorption horaire d'O₂ (vitesse d'absorption) d'autre part (fig.37), nous pouvons constater que le kaolin a ralenti l'intensité de la respiration, mais que la toxicité de l'extrait d'écorce de Pin a le même effet en présence ou non d'argile, car les courbes obtenues sont parallèles. Ce ralentissement de la respiration pourrait s'expliquer par l'absorption d'une partie de la population bactérienne entre les feuillets de kaolin. Il en résulterait une inactivation partielle, donc un abaissement de l'absorption d'oxygène.

b-Sur la biodégradation de l'extrait aqueux d'écorce de Pin par une souche de BACILLUS megaterium var. non sporulée

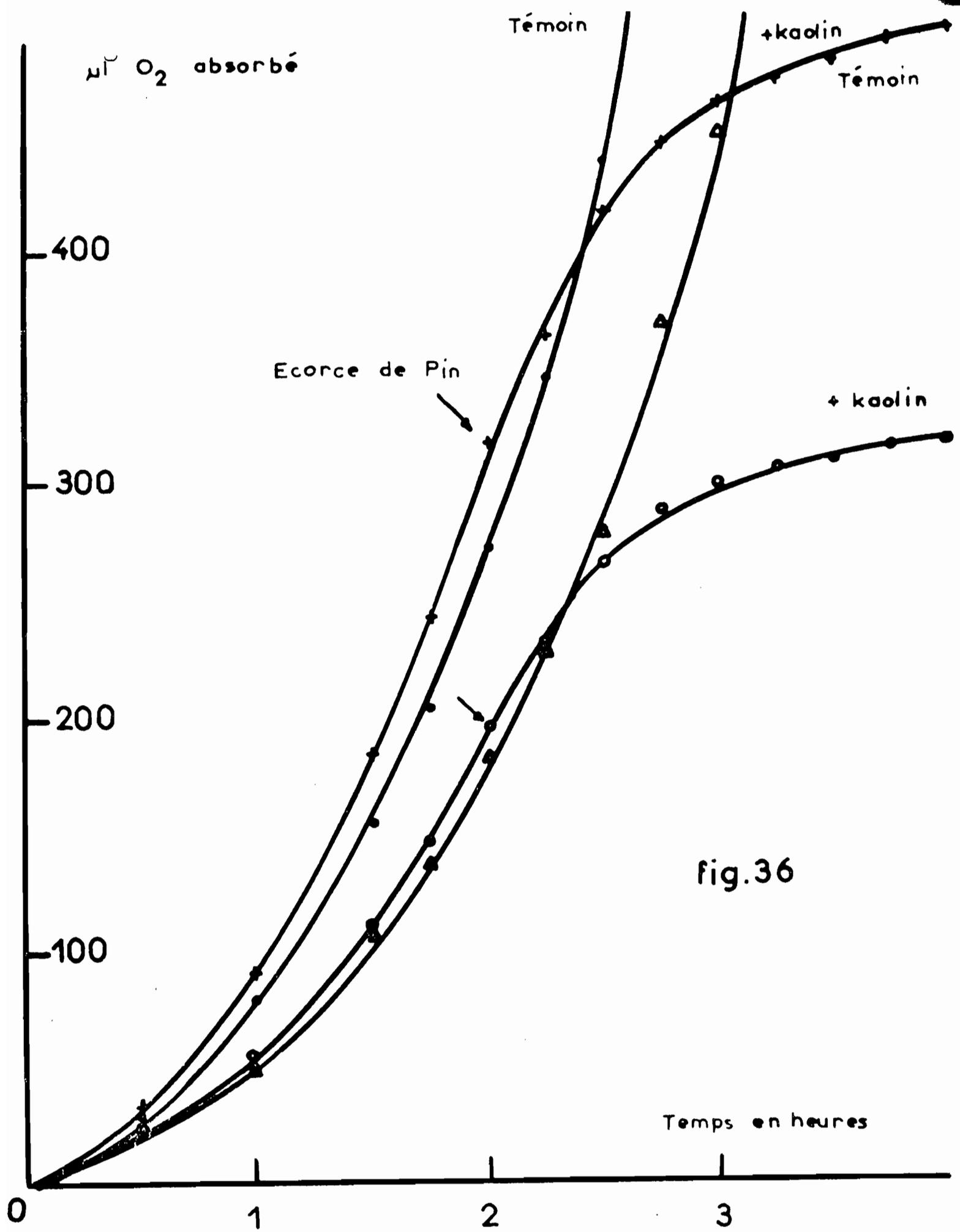
Nous avons constitué pour cette expérience, un sol artificiel en mélangeant en parties égales, du kaolin et du sable de Fontainebleau broyé, et nous avons comparé l'absorption d'O₂ avec un milieu liquide, suivant le protocole suivant:

- système 1 : 3,5 ml de milieu Y_C' ensemencé avec B. megaterium + 0,3 ml de KOH 40% dans le puit central.
- système 2 : 3,5 ml d'extrait aqueux d'écorce de Pin ensemencés avec B. megaterium + 0,3 ml de KOH 40% dans le puit central.
- système 3 : 10 g de sol artificiel + 3,5 ml de milieu Y_C' ensemencé avec B. megaterium + 0,3 ml de KOH 40% dans le puit central.
- système 4 : 10 g de sol artificiel + 3,5 d'extrait d'écorce de Pin ensemencés avec B. megaterium + 0,3 ml de KOH 40% dans le puit central.

Après avoir mesuré l'absorption d'oxygène au respiromètre GILSON à 30° C pendant 5 heures I/2 sans agiter, nous avons mis en route l'agitation pendant une durée de 2 heures I/2.

Résultats: La respiration est plus intense en milieu liquide, surtout pour le milieu Y_C' sous agitation, car l'aération du milieu est supérieure à celle obtenue dans le sol artificiel qui, une fois humidifié, a une consistance pâteuse. Par contre, on obtient une courbe identique en présence d'extrait d'écorce de Pin qui est toxique pour le bacille, même en milieu liquide agité (fig.38).

.../...



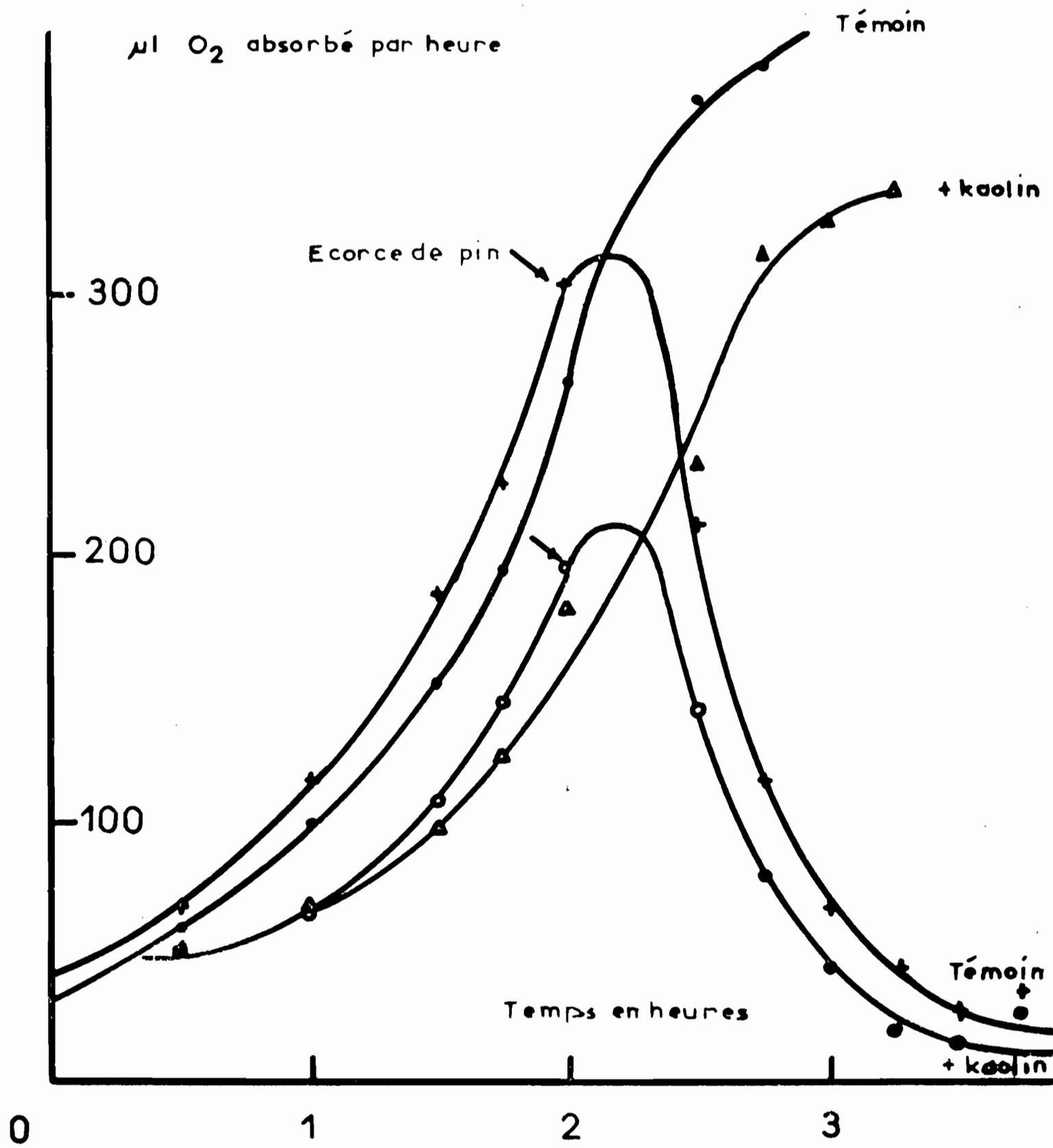
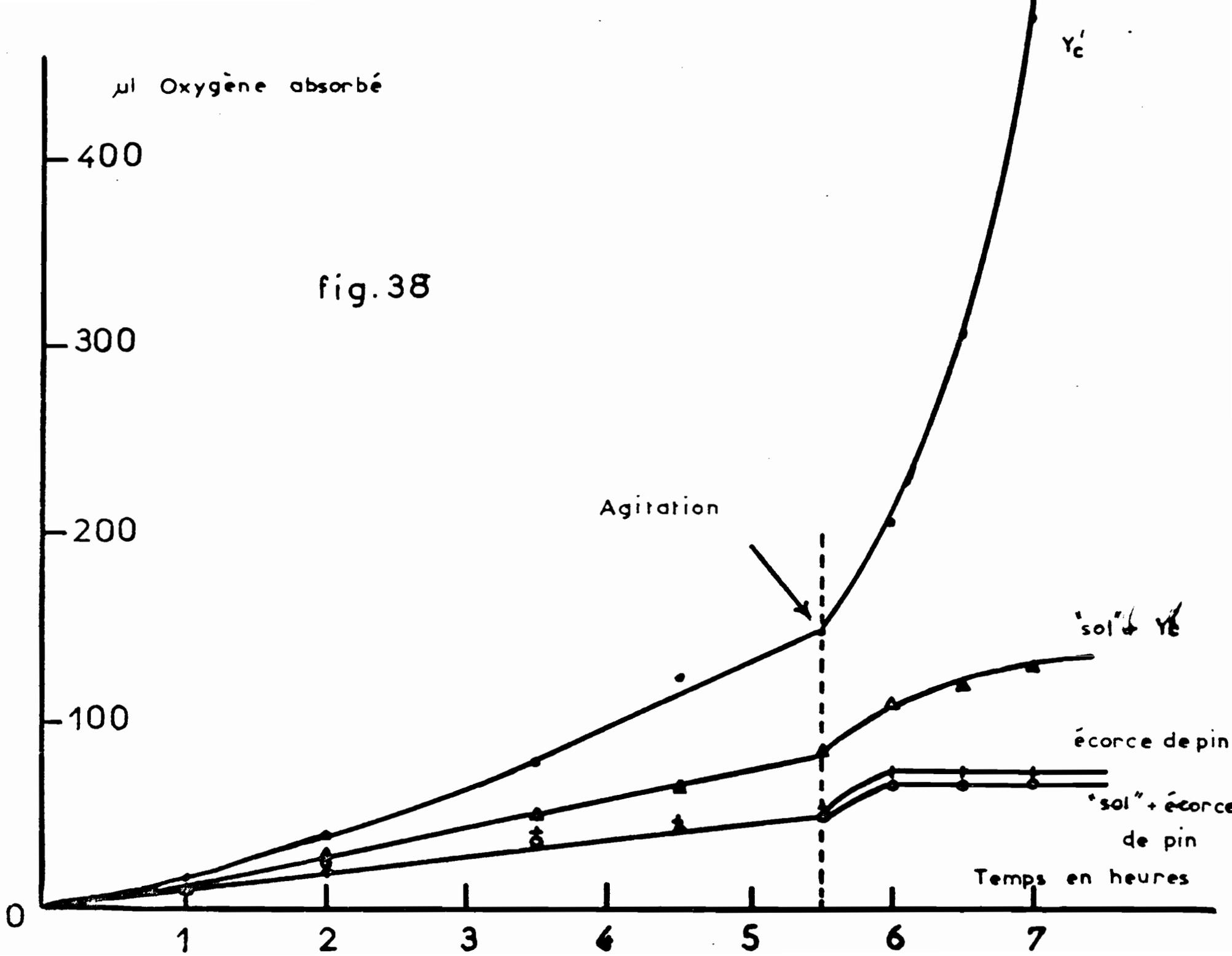


fig. 37 - Vitesse d'absorption

μl Oxygène absorbé

fig. 38



BIBLIOGRAPHIE

- 1- HOFFMANN (E.) , SEEGERER (A.) : Uber des enzysystem unserer kulturböden. I-Saccharase.
Biochem. Z. 322, 174-179 -1951.
- 2- ROSS (D.J.) : A seasonal study of oxygen uptake of some pasture soils and activities of enzymes hydrolysing sucrose and starch.
J. of Soil Science ,16 ,(1) ; 73-85 - 1965.
- 3- BRUNEL : Traité pratique de chimie végétale. Tome III, p.64 .

Garcia Jean-Louis.

Techniques modernes d'étude de la rhizosphère : rapport de stages effectués à Cadarache, Prague et Nancy.

s.l. : ORSTOM, 1967, 122 p. multigr.