

54

10m Paris

Année 1998

90155

MÉMOIRE

présenté devant

L'Université Claude Bernard Lyon I et l'École Vétérinaire de Lyon

pour l'obtention du

DIPLÔME D'ÉTUDES APPROFONDIES
spécialité ÉCOLOGIE MICROBIENNE

Option Sol et Eau

par

Christine CHASTRUSSE

Localisation et diversité de bactéries cellulolytiques lors d'un cycle de dessiccation/réhumectation

Soutenu le 03 juillet 1998 devant la commission d'examen

M. FERNANDEZ
P. NORMAND
Y. RICHARD
C. STEINBERG

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote: AX 16505 Ex:



ORSTOM - Dakar
Laboratoire de
BIO-PÉDOLOGIE
BP 1386
Tél: (221) 32 18 46
Fax: (221) 32 16 75

Je remercie Jean-Luc Chotte et Marc Neyra pour leur encadrement scientifique et matériel, juste et sans ménagement.

Mes remerciements vont aussi à Robin Duponnois, Lucile Jocteur Monrozier et Danièle Thomas-Bauzon pour leurs précieux conseils.

Merci à tous le personnel des laboratoires de Bio-Pédologie, de Microbiologie et de Nématologie, et tout particulièrement à Joël Fardoux, Mathieu Ndigue Faye et Fatou Traoré.

J'adresse mes sincères remerciements à Alain Brauman, Sabine Fould et Jérôme Hamelin pour leurs conseils et leur soutien dans cette expérience hors du commun en cette terre sénégalaise.

A mes parents qui m'ont toujours accompagnée sur ce chemin de la connaissance, à mon frère et à ma soeur, à Frédérick

Merci

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CEC :	Capacité d'Échange Cationique
CFU :	Colony Forming Unit
C.o :	carbone organique
Fil :	filamenteuses
nd :	non déterminé
Nfb :	N-free broth
Nfil :	Non filamenteuses
N.o :	azote organique
NS :	Non Significatif
PCR :	Polymerase Chain Reaction
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
TSA :	Trypcase Soja Agar
* :	significatif

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

- Tableau 1 : Texture et CEC du sol de la jachère étudiée.
- Tableau 2a : Distribution pondérale du carbone organique dans les différentes fractions granulométriques du sol.
- Tableau 2b : Distribution pondérale de l'azote organique et du rapport C/N dans les différentes fractions granulométriques du sol.
- Tableau 3 : Distribution de la microflore du sol dans les différentes fractions granulométriques du sol.
- Tableau 4a : Distribution des bactéries cellulolytiques non filamenteuses sur milieu Nfb à cellulose raffinée.
- Tableau 4b : Distribution des bactéries cellulolytiques filamenteuses (sur milieu Nfb à cellulose raffinée) et leur pourcentage par rapport aux bactéries cellulolytiques totales.
- Tableau 5 : Nombre de bactéries cellulolytiques repiquées sur milieu Nfb à cellulose raffinée et formant une plage de lyse.
- Figure 1 : Distribution pondérale des fractions pour 100 g de sol sec.
- Figure 2 : Variations pondérales (en mg C/g de sol sec) du carbone organique au cours du second cycle.
- Figure 3 : Variations pondérales (en mg N/g de sol sec) de l'azote organique au cours du second cycle.
- Figure 4 : Variations de la microflore totale du sol (en nombre de micro-organismes en $10E+8/g$ de sol sec) au cours du second cycle.
- Figure 5 : Variations de la communauté de bactéries cellulolytiques non filamenteuses du sol (en CFU/g de sol sec) au cours du second cycle.
- Figure 6 : Variations de la communauté de bactéries cellulolytiques filamenteuses du sol (en CFU/g de sol sec) au cours du second cycle.

TABLE des MATIERES

1. INTRODUCTION	1
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	2
2.1. Le terrain d'étude	2
2.2. Démarche méthodologique	2
2.3. Le fractionnement physique du sol	3
2.4. Dosages du carbone et de l'azote organique.....	3
2.4.1. <i>Le carbone</i>	3
2.4.2. <i>L'azote</i>	3
2.5. Dénombrements de la microflore totale	3
2.6. Étude des bactéries cellulolytiques.....	4
2.6.1. <i>Isolement et dénombrement des bactéries cellulolytiques</i>	4
2.6.1.1. Le milieu de culture : Nfb à cellulose raffinée	4
2.6.1.2. Préparation de l'inoculum.....	4
2.6.2. <i>Visualisation de l'activité cellulolytique et isolement de souches cellulolytiques</i>	4
2.6.3. <i>Étude de la diversité spécifique</i>	5
2.6.3.1. La phase d'amplification PCR.....	5
2.6.3.2. Digestion enzymatique par RFLP.....	5
2.7. Analyse des résultats	5
3. RÉSULTATS	6
3.1. Distribution pondérale des fractions.....	6
3.2. Carbone (C.o) et azote organique (N.o).....	6
3.2.1. <i>Le carbone organique</i>	7
3.2.2. <i>L'azote organique</i>	7
3.2.3. <i>Le rapport C/N</i>	8
3.3. Dénombrements bactériens	8
3.3.1. <i>La microflore totale</i>	8
3.3.2. <i>Les bactéries cellulolytiques filamenteuses et non filamenteuses</i>	9
3.3.2.1. Les bactéries cellulolytiques non filamenteuses	9
3.3.2.2. Les bactéries cellulolytiques filamenteuses	10
3.3.2.3. Les filamenteuses par rapport aux non filamenteuses.....	10
3.4. L'activité cellulolytique	11
3.5. Diversité des bactéries filamenteuses cellulolytiques	11
4. DISCUSSION	11
4.1. Effets du cycle de dessiccation/réhumectation :	11
4.1.1. <i>Sur les résidus végétaux</i> :	11
4.1.2. <i>Sur la fraction >2000 µm</i>	12
4.1.3. <i>Sur la fraction 2000-50 µm</i>	13
4.1.4. <i>Sur la fraction 50-2 µm</i>	13
4.1.5. <i>Sur la fraction <2 µm</i>	13
4.2. Les bactéries cellulolytiques et les effets du cycle de dessiccation/réhumectation	14

5. CONCLUSIONS et PERSPECTIVES.....	16
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	19
ANNEXES I : Le fractionnement physique du sol	24
ANNEXE II : le milieu de culture Nfb à cellulose raffinée	25
A - Le milieu de base Nfb	25
B - La cellulose raffinée	26
ANNEXE III : Dénombrement de la microflore totale	27

1. INTRODUCTION

L'hétérogénéité spatiale de la structure du sol offre une grande diversité de niches écologiques aux micro-organismes telluriques (Killham *et al.*, 1993). Cette structure se définit par la taille, la forme et l'arrangement des particules (simples ou complexes) et des vides associés (Brewer, 1964). Elle donne naissance en particulier à des agrégats de taille, d'architecture et de composition physique, chimique et biologique variés. Les micro-organismes qui habitent ces agrégats sont soumis à des conditions écologiques différentes qui entraînent des adaptations très diverses. Les facteurs environnementaux tel que le stress hydrique ne vont pas avoir les mêmes effets sur les habitats et sur les micro-organismes résidant dans ces différents habitats (Killham *et al.*, 1993 ; Kabir, 1994).

Le stress hydrique est une contrainte majeure pour les êtres vivants. Chez les bactéries telluriques, l'assèchement du sol entraîne la mort de la cellule notamment par stress trophique (Griffin and Luard, 1979 ; Skopp *et al.*, 1990 ; van Gestel, 1991 ; Stark and Firestone, 1995), stress osmotique (Harris, 1981 ; Potts, 1994) et/ou par des dégâts au niveau des protéines et des acides nucléiques (Potts, 1994 ; Linders *et al.*, 1997). A côté survivent des bactéries soit sous forme de cellules quiescentes (Griffin and Luard, 1979 ; Potts, 1994), soit sous forme de cellules végétatives nécessitant la mise en place d'autres stratégies adaptatives telles que la synthèse de disaccharides internes (Crowe *et al.*, 1992 ; Potts, 1994 ; Linders *et al.*, 1997) ou d'exopolysaccharides (Potts, 1994 ; Ophir and Gutnick, 1994). Cette adaptation à la dessiccation a pour conséquence le développement sélectif de populations capables de rester actives en cas de stress hydrique. Le rôle de ces populations adaptées a spécialement son importance dans les écosystèmes arides ou semi-arides soumis à des cycles de dessiccation/réhumectation. On sait que réhydrater un sol asséché augmente les taux de carbone, azote et phosphore minéralisés (Jager and Bruins, 1975 ; Horowitz, 1979 ; Orchard and Cook, 1983), notamment en rendant plus disponibles à la décomposition les substrats organiques. On assiste alors à une stimulation des activités microbiennes par le « dopage » des micro-organismes « rescapés » (Rosacker and Kieft, 1990 ; van Gestel, 1991 ; Lebuhn *et al.*, 1994). Ainsi, ces cycles sont fondamentaux dans les processus de décomposition de la matière organique du sol en favorisant le turnover du carbone. Ils peuvent être également d'une importance clé pour la disponibilité des nutriments et la formation de la matière organique du sol. D'où l'intérêt de comprendre cette dynamique sous des conditions climatiques variables afin de pouvoir prendre les décisions nécessaires au maintien de la fertilité et de la stabilité des sols.

Mais ces études ont été faites sans tenir compte de l'hétérogénéité spatiale du sol.

Dans les zones arides et semi-arides du sud du Sahara, les fortes pressions démographiques et économiques ont amené, ces dernières décennies, à une surexploitation des terres agricoles et à la mise en culture de zones marginales fragiles. On assiste depuis à une diminution des stocks organiques des sols, et par là donc à une diminution de la fertilité et des rendements agricoles (Piéri, 1989). A cela s'ajoutent une sécheresse importante depuis plusieurs années, et des sols sableux pauvres en matières organiques sur les stocks desquelles les effets de la gestion sont moindres par rapport à ceux enregistrés dans les sols argileux (Feller *et al.*, 1993). Pour de nombreux auteurs (Swift, 1984 ; Piéri, 1989 ; Feller, 1994), le maintien de la fertilité des sols passe par la gestion de la matière organique. Parmi les moyens disponibles, la jachère est l'un des plus couramment cités. Depuis 1994, un programme de recherche financé par la CEE étudie les effets du raccourcissement du temps de jachère sur la fertilité des terres (coordonnateur Floret). Dans ce programme, une action de recherche concerne tout particulièrement le fonctionnement biologique du sol.

Le travail présenté dans ce mémoire s'inscrit dans cette action de recherche en s'intéressant tout particulièrement aux relations entre la structure du sol et les micro-organismes impliqués dans les processus de décomposition de la matière organique. Les organismes cibles de ce travail sont les cellulolytiques. Il s'agit de préciser leur localisation, leur diversité, et au cours d'une expérience de laboratoire de tester l'effet d'un cycle de dessiccation/réhumectation sur ces micro-organismes. Notre hypothèse de

travail est qu'il existe un habitat privilégié à la survie des micro-organismes cellulolytiques durant les phases de dessiccation/réhumectation.

Pour cela, l'étude a été menée à partir de deux échantillons semblables de sol d'une jachère de la zone semi-aride du Sénégal. L'un des deux échantillons a subi un cycle supplémentaire de dessiccation/réhumectation en conditions contrôlées. Après fractionnement physique du sol, nous avons isolé et dénombré les bactéries cellulolytiques selon la structure en agrégat du sol. L'activité cellulolytique a été mise en évidence par la formation de plages de lyse sur un milieu sélectif contenant de la cellulose raffinée. Puis, une étude de la diversité spécifique de ces bactéries cellulolytiques a été réalisée pour chacune des fractions de sol afin de mesurer l'impact du cycle de dessiccation/réhumectation sur l'abondance et la diversité des bactéries cellulolytiques en fonction de la structure du sol.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Le terrain d'étude

Le site est localisé à Thyssé Kaymor dans une zone de savane sèche au centre du Sénégal, sous un climat de type soudano-sahélien : alternance de saison sèche (novembre à mai-juin) et de saison humide, une moyenne annuelle de 28°C, et une faible pluviométrie (200 - 600 mm par an) se manifestant sous forme de pluies extrêmement violentes. La végétation dominante est caractérisée par des arbustes soudano-sahéliens (Combrétacés, Mimosacés), au détriment des espèces hydrophiles qui assuraient autrefois un rôle phytostabilisateur du sol, essentiel face à l'érosion (Niang, communication personnelle). Le sol est de type ferrugineux tropical lessivé à tâches et concrétions sur grès sablo-argileux (Maignien, 1965).

La situation étudiée est une jachère de 20 ans en défens (c'est-à-dire clôturée, sans pression anthropique) depuis 9 ans. Le sol a été échantillonné sur ses dix premiers centimètres, sous couvert ligneux. Pour cela, nous avons doucement découpé un cube de sol de 10 cm de côté, de façon à ne pas perturber la structure naturelle de l'échantillon. Celui-ci a été conservé à température ambiante alors qu'il était à 0,57 % d'humidité.

Le tableau 1 donne quelques caractéristiques physico-chimiques de ce sol de jachère.

	Sables		Limons		Argiles	CEC meq/100 g
	grossiers	fins	grossiers	fins		
Jachère de 20 ans	23,6	31,7	20,9	13,4	10,4	5,4

Tableau 1 : Texture et CEC du sol de la jachère étudiée.

2.2. Démarche méthodologique

En février 1998, le cube de sol est réhumecté à 100% de sa capacité au champ, et il est gardé à cette humidité à 28°C durant une semaine. Puis, une moitié subit le fractionnement physique. A la suite de cela, sur chaque fraction obtenue ainsi que sur un échantillon de sol non fractionné, on effectue les études suivantes :

- la mesure pondérale de la fraction et l'estimation de son pourcentage d'humidité.
- le dosage du carbone et de l'azote organique.
- le dénombrement de la microflore totale.
- l'isolement et le dénombrement des bactéries cellulolytiques.
- l'étude de la diversité des bactéries cellulolytiques filamenteuses.

La seconde moitié de l'échantillon est gardé un mois à l'étuve à 50°C. A sa sortie, ce sol est réhumecté à 100% de sa capacité au champ et est mis ainsi une semaine à 28°C.

Puis, il subit la même série d'études que le sol précédent, à partir du fractionnement physique.

2.3. Le fractionnement physique du sol

Le sol est fractionné suivant la méthode de Chotte *et al.* (1994) (voir l'annexe I). Sur le même échantillon 3 répétitions du fractionnement sont effectuées.

Le principe de ce fractionnement du sol en classe d'agrégats repose sur la faible énergie utilisée, ceci afin de limiter la désagrégation et la dispersion des colloïdes organo-minéraux. Pour cela, le sol est préalablement immergé pendant 24h00 dans de l'eau afin de dissocier les structures les plus faiblement liées. Le sol est tamisé en douceur, lavé sous jet de pissette jusqu'à ce que l'eau qui s'écoule du tamis soit claire, signifiant que les agrégats retenus sont stables. Nous récoltons par tamisage les fractions >2000 µm, 2000-50 µm, 50-20 µm et les résidus végétaux >200 µm. Les fractions 20-2 µm et <2 µm sont récupérées par sédimentation et centrifugation. La distribution pondérale de ces fractions est comparée à celle des particules minérales simples obtenues par analyse mécanique après destruction de la matière organique et dispersion totale des particules par une solution de NH₄Cl.

2.4. Dosages du carbone et de l'azote organique

2.4.1. Le carbone

Le principe du dosage du carbone organique repose sur la minéralisation du carbone organique en gaz carbonique CO₂.

Le carbone de l'échantillon est oxydé en gaz carbonique par une solution de bichromate de potassium à 3 % en milieu sulfurique selon la réaction suivante :



La quantité d'ions Cr⁺⁺⁺ formés est proportionnelle à la quantité de carbone qui a été oxydé. Ils provoquent l'apparition d'une couleur bleu-vert que l'on peut doser en colorimétrie à la longueur d'onde de 570 nm. Nous avons utilisé pour ce dosage une chaîne d'analyse colorimétrique en flux continu Technicon II.

2.4.2. L'azote

Sous l'action de l'acide sulfurique concentré et chaud, l'azote des matières organiques est minéralisé en azote ammoniacal. Les autres substances organiques sont décomposées :

- le carbone est libéré sous forme de gaz carbonique,
- l'hydrogène donne de l'eau.

L'ammoniaque formée est immédiatement fixée par l'acide sulfurique sous forme de sulfate d'ammonium. Il est ensuite dosé en colorimétrie suivant la réaction de Berthelot par une chaîne d'analyse colorimétrique à flux continu Technicon II.

2.5. Dénombrements de la microflore totale

Le dénombrement de la microflore totale du sol est effectué par comptage direct, au microscope à épifluorescence, des bactéries colorés à l'Acridine Orange (Ramsay and Bawden, 1983). Le colorant permet la fluorescence des bactéries sous le microscope.

On ajoute 100 µl d'Acridine Orange (0,1 %) à 0,9 µl de chaque suspension/dilution de sol. Le tout est filtré à 0,2 µm (pour retenir toutes les bactéries), et le filtre est monté entre lame et lamelle (Annexe III). Le comptage est réalisé au microscope à épifluorescence UV à la dilution permettant de compter entre 0 et 20 bactéries par champ oculaire. Comme nous avons monté une lame par échantillon, alors 20 champs furent comptés pour chaque lame. Le nombre de bactéries par gramme de sol est déterminé par la formule suivante :

$$Y = X * (S/s) * (d/D) * (E/p)$$

Y : nombre de bactéries par gramme de sol sec
X : nombre moyen de bactéries par champs microscopique
S : surface de filtration
s : surface d'un champ microscopique
d : facteur de dilution
D : volume de suspension filtrée (soit, ici, 0,9 ml)
p : poids de sol sec
E : volume d'extraction (soit ici 50 ml)

2.6. Étude des bactéries cellulolytiques

2.6.1. Isolement et dénombrement des bactéries cellulolytiques

2.6.1.1. Le milieu de culture : Nfb à cellulose raffinée

Nous avons utilisé un milieu de base Nfb modifié (d'après Day and Döbereiner 1976) comportant un antifongique, la cycloheximide (Annexe II-A).

La seule source de carbone apporté à ce milieu est de la cellulose raffinée à 5 % selon la méthode de Thomas-Bauzon *et al.* (1990 et 1995) (Annexe II-B). Pour 1 l de milieu, 5 g de papier Whatman n°1 sont broyés à l'Ultra Turrax dans 250 ml d'eau distillée. La suspension obtenue est rajoutée au milieu Nfb. Ce milieu de culture est ensuite coulé en une couche très fine.

2.6.1.2. Préparation de l'inoculum

Pour chaque fraction, une aliquote (si possible de 3 à 4 g) de chacune des fractions est broyée au Waring Blender durant 90 min dans 50 ml d'eau déminéralisée stérile filtrée à 0,2 µm. Dès que l'on arrête le Waring, on pipette 1ml de la suspension qui subit alors une série de suspensions-dilutions de 10 ml en 10 ml. Ensuite, le milieu est inoculé avec 100 µl de chacune des dilutions pour lesquelles trois répétitions sont effectuées. Les boîtes sont mises à incuber à 28 °C pendant 10 jours afin de permettre le développement des colonies bactériennes.

Au bout de 10 jours, les Unités bactériennes Formant des Colonies (CFU) sont dénombrées à la loupe binoculaire, en faisant la distinction entre les colonies filamenteuses et non filamenteuses.

2.6.2. Visualisation de l'activité cellulolytique et isolement de souches cellulolytiques

A partir des boîtes initiales, des colonies bactériennes sont repiquées sur un milieu riche TSA à 3 % (3 g de Trypcase Soja Broth et 15 g d'Agar pour 1 l d'eau déminéralisée), en distinguant bien les filamenteuses des non filamenteuses. Les bactéries choisies sont représentatives de la diversité phénotypique observée dans les boîtes de Pétri. Ces colonies, identifiées par un numéro, forment une collection provisoire des bactéries cellulolytiques isolées à partir de ce sol sous jachère. Les boîtes sont mises à incuber 5 jours à 28°C. Puis, les souches sont de nouveau repiquées sur le milieu Nfb à cellulose raffinée, et les boîtes mises à 28°C durant deux semaines.

Pour visualiser l'activité cellulolytique des souches repiquées sur le milieu Nfb à cellulose raffinée, nous utilisons le Rouge Congo (à 2,5%). Ce colorant a la particularité de se fixer sur les fibres de cellulose, mais pas sur ses produits de dégradation. Dans ce dernier cas, le colorant est entraîné par une solution de lavage, du NaCl 5M. Les boîtes sont « noyées » avec la solution de Rouge Congo pendant une durée de 20 min permettant au colorant de se fixer. L'excédant de colorant non fixé est éliminé et remplacé par une solution de NaCl 5M qui reste 30 min en contact avec le milieu. Finalement, le NaCl est éliminé et les boîtes rincées doucement à l'eau. Les plages de lyse apparaissent alors décolorées, c'est-à-dire jaune-orange par rapport au reste du milieu qui est rouge.

Les plages de lyse sont visualisées à la loupe binoculaire.

Une collection de souches ayant une activité cellulolytique est ensuite constituée.

2.6.3. Étude de la diversité spécifique

Cette étude fut réalisée sur les souches de bactéries filamenteuses cellulolytiques du milieu TSA, mais isolées du milieu sélectif Nfb à cellulose raffinée. Elle a été effectuée par la méthode RFLP sur l'ADN codant pour l'ARN16S, après amplification par PCR.

2.6.3.1. La phase d'amplification PCR

Un fragment de la colonie filamenteuse est prélevé délicatement afin d'éviter au maximum de prendre du milieu gélosé. Il est préférable de choisir ce fragment dans la partie jeune de la colonie pour prendre le moins de spores possible (desquelles il est plus difficile d'obtenir l'ADN). Ce fragment est rajouté, dans un cryotube, à 16,5 µl de tampon Tris-EDTA et 3,3 µl de glycérol. Le cryotube est mis au moins 10 min à - 80°C. La PCR est effectuée à partir de 2 µl de cette solution avec le kit PCR Ready To Go. Les deux amorces furent la FGPS255 (TGG AAA GCT TGA TCC TGG CT) et la FGPS402 (AAG GAG GTG ATC TAG ACG CA). L'amplification est contrôlée sur gel d'Agarose à 1% dans du tampon TBE 1X, avec une migration à 2,5 V/cm. L'observation se fait après coloration au Bet (Bromure d'éthidium) à l'aide d'un système d'analyse de gel (Biorad Gel Doc 1000).

2.6.3.2. Digestion enzymatique par RFLP

La RFLP est réalisée sur toutes les souches qui ont amplifié, et, pour chacune d'entre elles si possible, leur ADN est digéré par deux enzymes de restriction : HaeIII et MspI. Pour cela, 6 µl d'amplifiat sont digérés par 5 unités d'enzymes selon les recommandations du fournisseur (Pharmacia Biotech)

Le gel est fait à partir de tampon TBE 1X. Les produits de digestion sont visualisés par électrophorèse sur gel de MétaPhore 3% (FMC) après une migration à 2,5 V/cm, et l'observation se fait de la même façon que pour le gel de PCR.

2.7. Analyse des résultats

Les comparaisons entre les distributions des différents échantillons ont été réalisées avec un test non paramétrique de Mann-Whitney. Le risque a été fixé à 5 %. Ces tests ont été effectués avec le logiciel Statview version 4.5.

Tableau 2a : Distribution pondérale du carbone organique dans les différentes fractions granulométriques du sol.

Fraction	Carbone organique									
	mg C.g-1 de fraction sèche				mg C.g-1 de sol sec				% Σ fraction	
	Cycle 1		Cycle 2		Cycle 1		Cycle 2		Cycle 1	Cycle 2
	moy.	e.t.	moy.	e.t.	moy.	e.t.	moy.	e.t.	moy.	moy.
Résidus végétaux	275,00	nd	153,00	nd	1,38	nd	0,60	nd	15,8	9,5
>2000 μm	7,38	0,76	7,08	0,93	1,34	0,32	0,53	0,10	15,3	8,5
50-2000 μm	5,43	0,38	3,77	4,06	3,38	0,25	2,32	0,18	38,7	37,1
2-50 μm	11,35	1,50	6,81	7,79	1,97	0,13	1,87	0,29	22,5	29,8
0-2 μm	39,09	4,16	29,33	2,71	0,67	0,11	0,94	0,10	7,7	15,0
Σ des fractions					8,74		6,25		100	100
Sol non fractionné	9,35	0,53	6,10	0,46						

3. RÉSULTATS

3.1. Distribution pondérale des fractions

Au cours du fractionnement physique du sol, il n'y a pas eu de perte de matière, le bilan pondéral du fractionnement étant légèrement supérieur à 100% (109, 103, 105, 111, 106 et 113%).

Dans la figure 1, nous pouvons de suite relever la forte représentativité de la classe d'agrégats de 2000 à 50 μm . Elle représente 60% du poids du sol total pour les deux cycles 1 et 2. La classe < 2 μm , représentée essentiellement par les argiles dispersées, est très faible : 2 et 3%. Les argiles dispersées par cette méthode représentent environ 30% des argiles granulométriques obtenues par l'analyse mécanique (figure 1). Les débris végétaux sont eux quasiment insignifiants en valeur pondérale. Les poids des agrégats > 2000 μm et 50-2 μm sont du même ordre pour l'échantillon du premier cycle, au contraire de ceux du second cycle : là, le poids de la fraction >2000 diminue de 58% alors que celui de la fraction 50-2 μm augmente de 58%. D'ailleurs, les deux échantillons diffèrent significativement (au seuil de 5%) au niveau de ces classes > 2000 μm et 50-2 μm , et aussi de la classe < 2 μm dont le poids est quasiment doublé (+86%).

Il est important de souligner qu'il n'existe pas de particules minérales > 2000 μm . Cette fraction est donc constituée de particules agrégées.

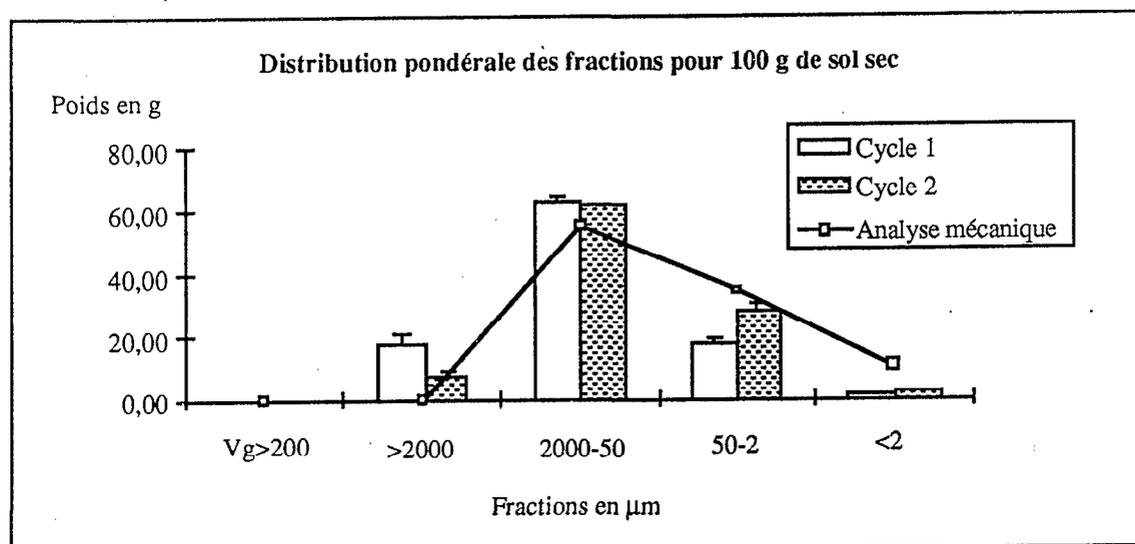


Figure 1 : Distribution pondérale des fractions (g 100 g⁻¹ sol sec). Les T représentent les écarts-types.

3.2. Carbone (C.o) et azote organique (N.o)

Au niveau du sol non fractionné, nous constatons une perte pondérale de C.o et N.o (respectivement -35% et -11%) qui n'est cependant pas significative pour N.o ($p=0,2752$). Et pourtant, seule le C.o de la fraction 50-2000 μm présente une baisse significative de sa concentration par g⁻¹ de fraction (certainement les végétaux aussi, mais cela n'a pu être testé par manque de répétition ; cela est signalé par « nd » non déterminé sur les graphiques).

Résidus végétaux mis à part, ce sont les fractions fines, et plus particulièrement la fraction <2 μm , qui sont les plus concentrées en C.o et N.o (tableau 2a et 2b). Cependant, si on prend en compte le poids de la fraction, alors ce sont les fractions 2-50 et 50-2000 μm qui fournissent le plus de C.o et N.o au sol.

3.2.1. Le carbone organique

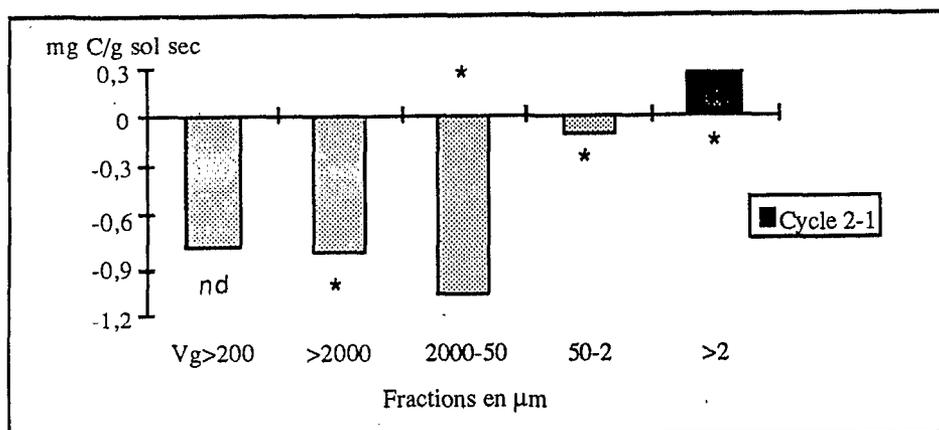


Figure 2 : Variations pondérales (en mg C/g de sol sec) du carbone organique au cours du second cycle. La différence entre les distributions des deux échantillons est significative (*) ou non (NS) au seuil de 5%.

La figure 2 montre que la fraction $<2 \mu\text{m}$ est la seule à gagner en quantité de C.o ($+0,27 \text{ mg.g}^{-1}$ de sol, soit 40% de C.o en plus). A l'opposé, les résidus végétaux et la fraction $>2000 \mu\text{m}$ en perdent 58 et 60%. Quant à la fraction 50-2000 μm , du fait de son importance pondérale, c'est elle qui lègue le plus de C.o. Par ailleurs, sa concentration diminue significativement, comme cela doit être le cas pour les végétaux. De là on peut s'intéresser à la concentration des fractions perdues ou gagnées par les différentes classes d'agrégats au cours du second cycle de dessiccation/réhumectation. Or il s'avère que ces concentrations sont, *de visu*, différentes de celles des classes du cycle 1. Ainsi, la part léguée par les résidus végétaux est 4 fois plus riche que celle qui reste ($712 \text{ mg de C.g}^{-1}$ par rapport aux 153 de la fraction qui reste), et celle de la fraction 50-2000 μm , plus de 30 fois plus concentrée. Cette dernière fraction perd 31% de son C.o dans 1% de son poids légué. Les différences sont nettement moins élevées pour les autres fractions qui, rappelons le, ne voient pas leur concentration changer de façon significative au cours du cycle.

3.2.2. L'azote organique

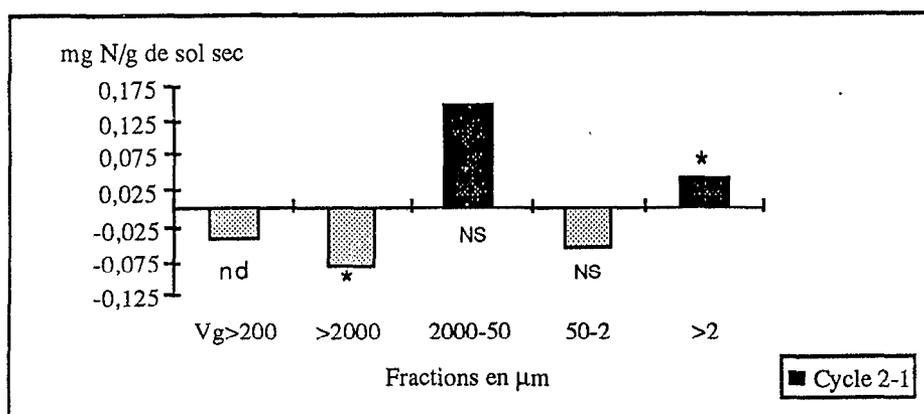


Figure 3 : Variations pondérales (en mg N/g de sol sec) de l'azote organique au cours du second cycle. La différence entre les distributions des deux échantillons est significative (*) ou non (NS) au seuil de 5%.

Les variations pondérales de l'N.o ne sont significatives que pour la fraction $>2000 \mu\text{m}$, qui perd $0,08 \text{ mg N.g}^{-1}$ de sol (soit 62% de son N.o initial) et la fraction $<2 \mu\text{m}$ qui s'enrichit de $0,04 \text{ mg N.g}^{-1}$ de sol (soit 57% en plus) (tableau 2b et figure 3).

Tableau 3 : Distribution de la microflore totale du sol dans les différentes fractions granulométriques du sol

Fraction	AIDC									
	nbre en 10E+8.g-1 fraction sèche				nbre en 10E+8.g-1 sol sec				% Σ fraction	
	Cycle 1		Cycle 2		Cycle 1		Cycle 2		Cycle 1	Cycle 2
	moy.	e.t.	moy.	e.t.	moy.	e.t.	moy.	e.t.	moy.	moy.
Résidus végétaux	120,00	100,00	9,38	9,87	0,60	0,62	0,04	0,02	12,20	0,90
>2000 μm	2,74	1,09	2,42	0,58	0,50	0,22	0,00	0,03	10,20	4,30
50-2000 μm	2,48	0,68	2,26	0,37	1,50	0,38	1,39	0,24	30,60	32,60
2-50 μm	10,20	12,60	3,29	0,61	1,80	2,03	0,90	0,10	36,70	21,20
0-2 μm	27,00	13,10	54,70	49,90	0,50	0,23	1,75	1,60	10,20	41,10
Σ des fractions					4,90		4,26		100,00	100,00
Sol Total	2,70	0,90	1,30	0,93						
					1,815		3,277			

Mais leur concentration par g^{-1} de fraction ne varie pas de façon significative, tout comme pour les autres fractions. Quant aux différences de concentrations entre les parts perdues ou gagnées et celles qui restent, elles sont aussi importantes que pour le C.o. La part perdue par les résidus végétaux est 7 fois plus riche en N.o que celle du second cycle, et celle de la fraction 50-2000 μm , 40 fois plus concentrée.

3.2.3. Le rapport C/N

Dans le sol non fractionné (tableau 2b), ce rapport C/N est de 15 au premier cycle, et de 11 pour le second. Au premier cycle, les résidus végétaux et la fraction 50-2000 μm ont le même rapport de 23, et les autres fractions ont toutes un rapport de 10. Mais cela évolue différemment au second cycle. Ainsi, ce rapport augmente pour les résidus végétaux et la fraction 2-50 μm , et cela correspond ici surtout à un déficit en N.o ; les pertes en C et N ont suivi la même allure pour la fraction $>2000 \mu m$, et le rapport reste le même ; pour les fractions 50-2000 μm et $<2 \mu m$, le rapport diminue notamment à cause d'un enrichissement en N.o.

3.3. Dénombrements bactériens

3.3.1. La microflore totale

Dans le tableau 3, nous pouvons de suite noter que la diminution du nombre de micro-organismes dans le sol non fractionné après le cycle de dessiccation/réhumectation n'est pas significative. Par ailleurs, il faut souligner que la somme du nombre de micro-organismes totaux isolés de chaque fraction est respectivement 1,8 et 3,3 fois plus élevée que les micro-organismes dénombrés dans le sol non fractionné après les cycles 1 et 2.

Pour le premier échantillon, la concentration de micro-organismes (par g^{-1} de fraction) la plus élevée a été enregistrée dans les résidus végétaux. Elle est de 5 à 50 fois supérieure à celles des autres fractions. Cependant, du fait du poids des fractions 2-50 μm et 50-2000 μm , les micro-organismes associés à ces fractions représentent respectivement 36,7 et 30,6% des micro-organismes totaux.

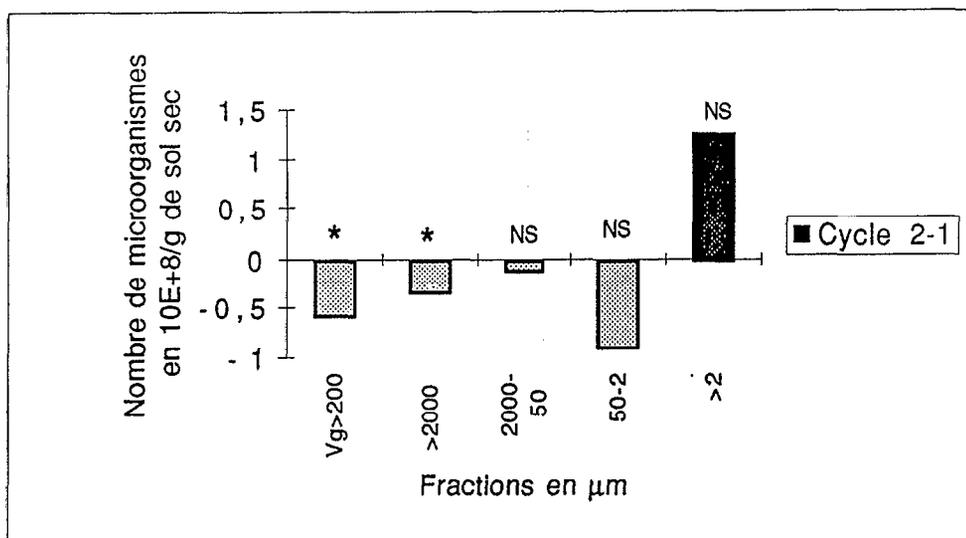


Figure 4 : Variations de la microflore totale du sol (en nombre de micro-organismes en $10E+8/g$ de sol sec) au cours du second cycle. La différence entre les distributions des deux échantillons est significative (*) ou non (NS) au seuil de 5%.

Tableau 4a : Distribution des bactéries cellulolytiques non filamenteuses sur milieu Nfb à cellulose raffinée

Fraction	Nombre de CFU de bactéries cellulolytiques non filamenteuses									
	CFU en 10E+6.g-1 de fraction sèche				CFU en 10E+6.g-1 de sol sec				% Σ des fractions	
	Cycle 1		Cycle 2		Cycle 1		Cycle 2		Cycle 1	Cycle 2
	moy.	e.t.	moy.	e.t.	moy.	e.t.	moy.	e.t.	moy.	moy.
Résidus végétaux	375,00	322,00	20,50	14,90	1,88	0,70	0,08	0,11	23,7	1,0
>2000 μm	2,60	1,40	0,37	0,39	0,47	0,23	0,03	0,02	5,9	0,3
50-2000 μm	1,19	0,80	0,77	0,49	0,74	0,52	0,47	0,30	9,3	5,8
2-50 μm	26,90	9,70	16,60	5,24	4,67	1,47	4,55	1,32	58,8	55,7
0-2 μm	10,40	7,80	94,90	72,30	0,18	0,12	3,04	2,35	2,3	37,2
Σ des fractions					7,94		8,17		100,0	100,0
Sol non fractionné	2,18	0,93	1,06	0,90						

Après le second cycle, ce schéma est bien différent comme le montre la figure 4. En effet, la fraction végétale perd 94% de sa microflore, soit quasiment toute sa communauté microbienne. A l'opposé, la fraction 0-2 μm s'enrichit (sa concentration est multipliée par 2) et sa population est multipliée par 3,5 dans le sol total (de $0,5 \cdot 10^8$ à $1,75 \cdot 10^8$ bactéries par g^{-1} de sol). Il est à noter d'ailleurs que cette microflore représente 66% de ce qui est perdu par l'ensemble des autres fractions. La fraction $>2000 \mu\text{m}$ perd de façon significative 63% de sa population, et ce qui est perdu (par g^{-1} de fraction) a une concentration équivalente à celle de la fraction initiale. Quant à la fraction 2-50 μm , alors qu'elle gagne 58% en poids, elle perd quand même 50% de sa communauté microbienne. Notons toutefois que ceci n'est pas significatif statistiquement ($p=0,5127$).

3.3.2. Les bactéries cellulolytiques filamenteuses et non filamenteuses

Nous devons tout d'abord souligner que la diminution du nombre de bactéries cellulolytiques, filamenteuses (Fil) ou non (Nfil), entre les deux échantillons de sol non fractionnés (tableaux 4a et 4b), n'est pas significative. Notons par ailleurs que l'on trouve plus de bactéries Nfil après fractionnement ($\times 3,6$ et $\times 7,7$ respectivement pour les cycles 1 et 2), ce qui n'est pas le cas pour les bactéries Fil.

3.3.2.1. Les bactéries cellulolytiques non filamenteuses

Dans le premier échantillon, les résidus végétaux sont largement plus riches plus que les autres fractions en bactéries Nfil (tableau 4a) : $3,7 \cdot 10^8$ bactéries par g^{-1} de fraction, soit au moins 10 à 100 fois plus. Les bactéries Nfil associées à ces résidus végétaux représentent 24% de la communauté bactérienne Nfil de ce sol. La fraction 2-50 μm fournit $4,7 \cdot 10^6$ bactéries par g^{-1} de sol, soit 59% des Nfil du sol. Elle est la seconde fraction la plus densément peuplée en Nfil. Les fractions grossières, elles, sont 10 à 20 fois moins peuplées.

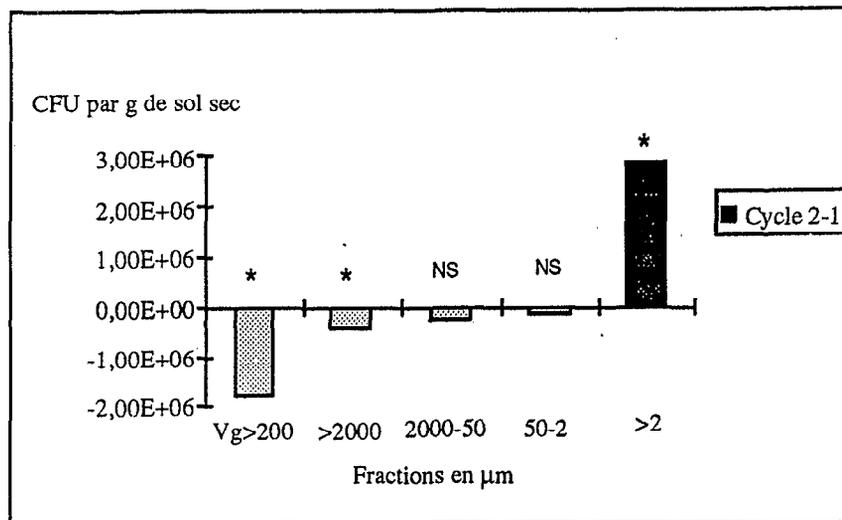


Figure 5 : Variations de la communauté de bactéries cellulolytiques non filamenteuses du sol (en CFU/g de sol sec) au cours du second cycle. La différence entre les distributions des deux échantillons est significative (*) ou non (NS) au seuil de 5%.

Au cours du second cycle, ceci évolue de façon significative pour les fractions $>2000 \mu\text{m}$, $<2 \mu\text{m}$ et les résidus végétaux (figure 5). En effet, ces résidus et les agrégats $>2000 \mu\text{m}$ perdent (respectivement) 96 et 95% de leur communauté de bactéries cellulolytiques Nfil, alors que la fraction $<2 \mu\text{m}$ voit sa population multipliée par 17. Ce gain ($+2,86 \cdot 10^6$ Nfil

Tableau 4b : Distribution des bactéries cellulolytiques filamenteuses (sur milieu Nfb à cellulose raffinée)
et leur pourcentage par rapport aux bactéries cellulolytiques totales

Fraction	Nombre de CFU de bactéries cellulolytiques filamenteuses									
	CFU en 10E+6.g-1 de fraction sèche				CFU en 10E+6.g-1 de sol sec				% Σ des fractions	
	Cycle 1		Cycle 2		Cycle 1		Cycle 2		Cycle 1	Cycle 2
	moy.	e.t.	moy.	e.t.	moy.	e.t.	moy.	e.t.	moy.	moy.
Résidus végétaux	14,50	15,80	7,68	10,30	0,07	0,04	0,03	0,07	7,5	2,5
>2000 μm	0,93	0,27	0,32	0,16	0,17	0,04	0,02	0,02	18,3	1,7
50-2000 μm	0,43	0,29	0,29	0,21	0,27	0,19	0,18	0,13	29,0	15,1
2-50 μm	1,44	0,68	1,27	0,48	0,25	0,10	0,35	0,13	26,9	29,4
0-2 μm	9,80	2,21	19,00	14,50	0,17	0,05	0,61	0,47	18,3	51,3
Σ des fractions					0,93		1,19		100,0	100,0
<u>Sol non fractionné</u>	1,29	0,41	0,97	0,85						

par g^{-1} de sol) est sensiblement égal à la somme de toutes les bactéries perdues par les autres fractions ($-2,63 \cdot 10^6$ Nfil par g^{-1} de sol).

3.3.2.2. Les bactéries cellulolytiques filamenteuses

Dans le tableau 4b, on peut constater que ce sont les résidus végétaux qui sont les plus riches en bactéries Fil dans le premier échantillon ($1,45 \cdot 10^6$ Fil par g^{-1} de fraction). Les autres fractions sont en moyenne 10 fois moins concentrées, spécialement les fractions grossières ($>50 \mu\text{m}$). Mais si on ramène au poids de la fraction, les cellulolytiques Fil des résidus végétaux sont peu nombreux, alors que c'est la fraction 2-50 μm qui en fournit le plus au sol.

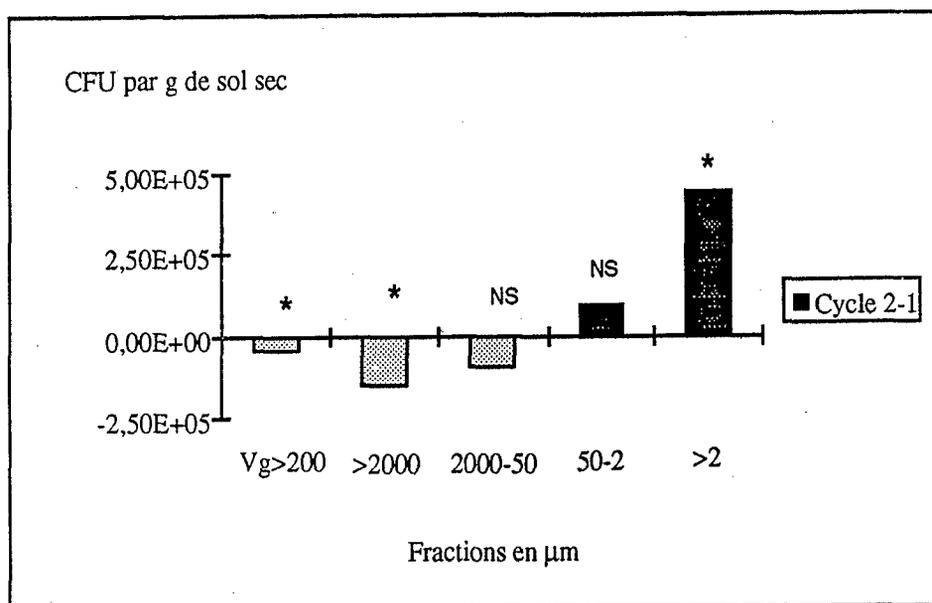


Figure 6 : Variations de la communauté de bactéries cellulolytiques filamenteuses du sol (en CFU/g de sol sec) au cours du second cycle. La différence entre les distributions des deux échantillons est significative (*) ou non (NS) au seuil de 5%.

Après le second cycle de dessiccation/réhumectation, on observe une variation significative de la quantité de cellulolytiques Fil dans les fractions $>2000 \mu\text{m}$, $<2 \mu\text{m}$ et les résidus végétaux (figure 6). La fraction $>2000 \mu\text{m}$ perd 88% de sa communauté, et les végétaux 57%. *A contrario*, la fraction $<2 \mu\text{m}$ voit sa communauté de cellulolytiques Fil multipliée par 3,6. Du coup, c'est cette fraction qui non seulement est la plus riche, mais qui a également la communauté de bactéries cellulolytiques Fil la plus importante dans le second échantillon.

Notons que, contrairement à la microflore totale et au Nfil, la fraction 2-50 μm gagne 40% de cellulolytiques Fil.

3.3.2.3. Les filamenteuses par rapport aux non filamenteuses

Si on regarde la part des Fil par rapport aux cellulolytiques totaux (qui sont la somme des Nfil et Fil) au cours des deux cycles, on peut constater un changement dans la composition des communautés de bactéries cellulolytiques. Tout d'abord, dans le sol non fractionné, les Fil représentent 10% dans le premier échantillon et 13% dans le second. De même, les résidus végétaux s'enrichissent en Fil (qui passent de 4 à 27% des cellulolytiques), tout comme la fraction $>2000 \mu\text{m}$ (27 à 42%). Par contre, la fraction $<2 \mu\text{m}$ s'appauvrit en Fil : de 49% au premier cycle, elles ne représentent plus que 17% au

Tableau 5 : Nombre de bactéries cellulolytiques repiquées sur milieu Nfb à cellulose raffinée et formant une plage de lyse

Fraction	Nombre de bactéries filamenteuses				Nombre de bactéries non filamenteuses			
	cycle 1		cycle 2		cycle 1		cycle 2	
	<i>formant une plage</i>	<i>repiquées</i>	<i>formant une plage</i>	<i>repiquées</i>	<i>formant une plage</i>	<i>repiquées</i>	<i>formant une plage</i>	<i>repiquées</i>
Résidus végétaux	1	1	39	85	3	233	<i>nd</i>	<i>nd</i>
>2000 μm	17	92	11	85	5	92	<i>nd</i>	<i>nd</i>
50-2000 μm	7	59	15	80	2	139	<i>nd</i>	<i>nd</i>
2-50 μm	5	27	24	85	0	39	<i>nd</i>	<i>nd</i>
0-2 μm	56	137	14	85	2	143	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Sol total	18	55	14	87	5	150	<i>nd</i>	<i>nd</i>

second. La proportion de Fil par rapport aux cellulolytiques totaux ne varie pas pour les fractions 50-2000 μm (28%) et 2-50 μm (5 à 7%).

3.4. L'activité cellulolytique

Alors que sur le premier milieu cellulose les colonies se sont développées assez rapidement (quelques jours à une semaine), il leur a fallu 15 jours (Fil) à 3 semaines (Nfil) sur le second milieu où elles ont été repiquées. Sur ce second milieu, nous avons observé *de visu* que la grande majorité des Nfil s'étaient développées, et quasiment toutes les Fil.

Du tableau 5, il ressort surtout la différence entre les bactéries cellulolytiques Fil et Nfil. Alors que nous avons pu visualiser une plage de lyse chez une grande partie des Fil repiquées sur milieu Nfb à cellulose raffinée (de 12 à 46, selon les fractions, pour 100 bactéries repiquées), nous en avons vu une que chez 0 à 5% des Nfil repiquées selon les fractions.

3.5. Diversité des bactéries filamenteuses cellulolytiques

L'analyse de la diversité a porté sur des souches isolées de chaque fractions de sol. La rareté des colonies de bactéries associées aux résidus végétaux végétaux a rendu impossible cette étude sur cette fraction. Par ailleurs, seules les bactéries filamenteuses ont été retenues; dans la mesure où nous n'avons visualisé quasiment aucune plage de lyse chez les bactéries Nfil. De plus, il nous fut pas possible de continuer cette étude sur le second échantillon.

Il convient de noter la faible quantité de souches (44) sur lesquelles nous avons obtenu un profil, ceci étant dû tout d'abord au faible nombre de cellulolytiques filamenteux ayant fait une plage de lyse, puis à l'élimination des souches dont l'ADN n'a pas pu être amplifié ou digéré.

La digestion par les enzymes Hae III et Msp I a révélé respectivement 13 et 6 profils génotypiques différents sur les 44 souches analysées. Ces profils sont souvent proches, les différences ne portant que sur un nombre restreint de fragments. Certains de ces profils sont dominants. Avec Hae III, 3 des 13 profils regroupent plus de 50% des souches. Avec Msp I, l'homogénéité est encore plus forte. Dans ce cas, près de 90% des souches présentent le même profil.

4. DISCUSSION

A travers cette étude, nous avons voulu connaître les effets de l'alternance de phases de dessiccation et de réhumectation sur les communautés de bactéries cellulolytiques, ceci afin de voir s'il pouvait exister un habitat microbien protégeant efficacement les micro-organismes de la dessiccation. Aussi, nous allons tout d'abord examiner les effets globaux entraînés par le cycle sur notre échantillon de sol. Puis, nous pourrons voir plus particulièrement la communauté bactérienne des cellulolytiques.

4.1. Effets du cycle de dessiccation/réhumectation :

4.1.1. Sur les résidus végétaux :

Avec moins de 1 g pour 100 g de sol, les résidus végétaux libres ont une valeur pondérale minime. Cependant, avant le cycle de dessiccation/réhumectation, ils abritent une très forte concentration de bactéries cellulolytiques (Nfil et Fil), et de micro-organismes en général. Cette fraction est très riche en C.o et N.o facilement

métabolisable, donc, plus qu'un habitat, c'est une source énergétique de premier ordre. Dans ce sol, cette fraction peut être qualifiée de « hot spot », c'est-à-dire une niche écologique privilégiée par les micro-organismes.

Mais à la suite de la dessiccation et de la réhumectation, cette fraction végétale perd environ 95% de sa microflore et de ses bactéries cellulolytiques Nfil, et 57% de ses cellulolytiques Fil. Cette chute s'accompagne d'une forte diminution de C.o et N.o. On peut alors supposer que la matière organique facilement métabolisable a été en grande partie minéralisée par les micro-organismes cellulolytiques. Alors, la communauté microbienne aurait subi un stress trophique qui s'est certainement ajouté au stress hydrique durant le mois de dessiccation, conduisant ainsi à la baisse très sensible des micro-organismes. Il est à remarquer que les Nfil ont été plus atteints que les Fil, menant à un enrichissement relatif de la communauté cellulolytique en bactéries filamenteuses (de 4% elles passent à 27% des cellulolytiques totaux au second cycle). Or, les bactéries filamenteuses sont plus résistantes à la dessiccation et au stress trophique que les non filamenteuses (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Kilbertus and Proth, 1978 ; Griffin and Luard, 1979 ; Swift *et al.*, 1979). En effet, la dessiccation entraîne notamment un stress trophique en diminuant le film d'eau à la surface des particules, et en empêchant alors les micro-organismes d'accéder à de nouvelles sources trophiques quand les leurs sont épuisées (Griffin and Luard, 1979 ; Horowitz, 1979 ; Swift *et al.*, 1979 ; van Gestel, 1991). Or, de par leur possibilité de croître et de coloniser d'autres milieux, et de constituer des formes de résistance telles que des spores, les organismes filamenteux évitent mieux ce stress trophique.

Ainsi, les communautés microbiennes, cellulolytiques ou non, inféodées à cette fraction végétale ont été très touchées par les effets du cycle de dessiccation/réhumectation. Cet habitat, peut-être plus soumis aux contraintes et variations environnementales, offre des conditions fluctuantes aux micro-organismes, et devient alors très favorable ou très défavorable selon les saisons. Il serait intéressant de voir s'il abrite des populations différentes des autres (ex., espèces à stratégie r).

4.1.2. Sur la fraction >2000 μm

Ces fractions grossières peuvent tout d'abord être caractérisées par une biocénose tellurique pauvre, pauvre en organismes vivants, cellulolytiques Nfil et Fil y compris, et en C.o et N.o. Ces macroagrégats sont donc essentiellement minéraux, peu propices *a priori* aux micro-organismes.

De plus, le cycle de dessiccation/réhumectation a entraîné une désagrégation de cette fraction qui perd 58% de son poids. En effet, les macroagrégats sont moins stables que les autres face à des contraintes telles que la sécheresse, les pluies, les cycles de dessiccation/réhydratation, ou les cultures (Orchard and Cook, 1983 ; Mbagwu and Bazzoffi, 1988 ; Oades, 1992 ; Beare *et al.*, 1994). Ceci est dû à la nature des liaisons impliquées dans la structuration et la stabilisation de ces macroagrégats (Beare *et al.*, 1994). La dessiccation entraîne également une désagrégation de la matière organique (Dommergues et Mangenot, 1970). Ici, le cycle a dû désagréger aussi bien la matière organique que les agrégats en général car la part perdue par cette fraction >2000 μm a quasiment la même concentration en C.o, N.o et micro-organismes que la fraction initiale. Cette fraction perd donc environ 60% de N.o, C.o et micro-organismes totaux, mais le déficit en bactéries cellulolytiques est de 94% pour les Nfil et 88 % pour les Fil. Aussi, si une partie des cellulolytiques a dû se retrouver dans des agrégats de taille inférieure, une autre partie a certainement disparu par mortalité. A la réhumectation, les bactéries qui survivent à la dessiccation redeviennent actives et consomment le carbone facilement métabolisable. Aucun apport exogène n'a été réalisé dans notre expérience, et une baisse de C.o a bien été enregistrée entre les deux cycles. Au stress hydrique s'est donc ajouté un stress trophique, particulièrement néfaste aux saprophytes comme les cellulolytiques, qui disparaissent en plus grande proportion par rapport aux organismes totaux.

De tout ceci, on peut dire que cette fraction représente un habitat instable pour les micro-organismes.

4.1.3. Sur la fraction 2000-50 μm

A l'inverse de la fraction $>2000 \mu\text{m}$, les résultats montrent une certaine stabilité de cette classe d'agrégats. La stabilité se retrouve au niveau des faibles variations de poids, d' N.o, de la microflore totale et des bactéries cellulolytiques Nfil et Fil. Seul le C.o diminue significativement, et on constate alors une diminution du rapport C/N. Cela pourrait dénoter une activité de minéralisation importante. Cette fraction est peu concentrée, voire la moins concentrée, en C.o, N.o, micro-organismes totaux et cellulolytiques. Mais de par son importance pondérale (plus de 60%), c'est dans cette fraction que se trouvent la plus grande partie du C.o, de l'N.o, des micro-organismes et des cellulolytiques Fil. Mais pas les Nfil. Cette taille d'agrégat serait donc plus favorable au pseudo-mycellium des Fil.

Nous pouvons par ailleurs émettre l'hypothèse que cette stabilité peut être due à un équilibre entre des gains et des pertes de matériel, et cette fraction serait une fraction transitoire. Au niveau des micro-organismes, il est probable que différents phénomènes interviennent : transfert de micro-organismes accompagnant le matériel, mais également mort de micro-organismes sous l'effet de la dessiccation, puis multiplication des populations rescapées après réhumectation.

4.1.4. Sur la fraction 50-2 μm

Dans le premier échantillon, cette fraction est, de façon général, la plus riche derrière les résidus végétaux et la fraction $<2 \mu\text{m}$. Comme elle a une part pondérale plus importante que ces dernières, elle abrite la plus grande partie de la microflore totale et des cellulolytiques du sol. Cet habitat est donc loin d'être négligeable.

Mais son évolution après le cycle de dessiccation/réhumectation diffère de celle des autres fractions. En effet, bien qu'elle gagne plus de 10 g de sol, soit quasiment tout ce qui est perdu par la fraction $>2000 \mu\text{m}$, elle ne gagne pas pour autant en quantité de micro-organismes et de N.o, et elle perd même en C.o. Donc, si on supprimait cet apport extérieur, il serait intéressant de savoir si cette fraction perdrait de façon significative en N.o et en micro-organismes.

4.1.5. Sur la fraction $<2 \mu\text{m}$

Après les résidus végétaux, cette fraction est en général la plus riche. Elle représente la fraction interagrégats, donc pas le même type d'habitat que les fractions supérieures. Après un fractionnement physique, malgré la faible énergie utilisée, les micro-organismes les plus faiblement liés aux agrégats sont dispersés et sont retrouvés dans cette fraction argileuse. C'est également dans cette fraction que se sont accumulés certains des micro-organismes et des matières organiques perdus par désagrégation. En effet, cette fraction voit sa quantité de C.o et d'N.o augmenter de 40 et 57%, et ses populations de micro-organismes totaux sont multipliées par 3,5, ses cellulolytiques par 17 (Nfil) et 3,6 (Fil), alors qu'elle ne gagne que 1,48g (soit 86% de son poids initial). Le matériel qu'elle reçoit est donc très riche. C'est là que l'on peut tout d'abord supposer retrouver les micro-organismes perdus par la fraction $>2000\mu\text{m}$. De plus, elle est la seule à gagner du C.o et de l'N.o. On peut alors penser qu'elle reçoit une partie de la matière organique libérée par la dessiccation, ce qui contribue à son enrichissement en micro-organismes, cellulolytiques de surcroît, de deux manières. En effet, cette matière organique va tout d'abord amener avec elle les micro-organismes saprophytes, et elle peut en outre contribuer à leur multiplication.

Ainsi, le cycle de dessiccation/réhumectation a entraîné une déstructuration des macroagrégats, conduisant à un transfert de matière dans les classes d'agrégats de tailles inférieures. Mais l'enrichissement très important de la fraction $<2 \mu\text{m}$ en organismes vivants, et particulièrement en cellulolytiques non filamenteux, et de la fraction 50-2 μm

en un matériel plus inorganique, montre que ce transfert ne s'est pas fait de manière homogène. Tout d'abord, il semble donc que la déstructuration d'un agrégat $>2000 \mu\text{m}$ donne principalement des agrégats de $50-2 \mu\text{m}$ qui seraient alors des agrégats très stables physiquement. Toutefois, cette déstructuration amène à une libération de trois éléments distincts qui ne vont pas avoir le même devenir : la matière organique, les micro-organismes et des éléments (ou agrégats) plus inorganiques. Parmi les micro-organismes, ce sont particulièrement des cellulolytiques non filamenteux qui sont présents dans la fraction argileuse inter agrégat. Cette communauté est certainement constituée d'une partie présente au départ et qui a pu se multiplier, et d'une autre partie apportée avec le matériel dispersé. Dans les deux cas, ces bactéries Nfil trouvent dans cette fraction inter agrégat un environnement aérobie plus favorable à la cellulolyse, et donc à leur croissance, que l'intérieur des agrégats.

4.2. Les bactéries cellulolytiques et les effets du cycle de dessiccation/réhumectation

Dans ce sol sableux d'une jachère semi-aride, la communauté bactérienne des cellulolytiques se rencontre préférentiellement (en quantité comme en concentration) dans les fractions fines de 2 à $50 \mu\text{m}$, mais aussi bien sûr et surtout au niveau des résidus végétaux libres. D'ailleurs, nous pouvons regarder la part de cette communauté dans chaque fraction par rapport à la microflore totale. Il nous faut souligner tout d'abord que ces résultats sont à prendre avec précaution dans la mesure où les techniques employées, le comptage de la microflore totale à l'Acridine Orange et l'isolement des cellulolytiques sur milieu sélectif, sont bien différentes. De plus, si la première est biaisée dans le sens d'une surestimation (comptage des bactéries mortes), la seconde l'est dans le sens d'une sous-estimation (comptage des bactéries viables cultivables). Nous pouvons toutefois dire que la part des cellulolytiques dans les micro-organismes totaux est la plus importante dans la fraction végétale puis dans la fraction $2-50 \mu\text{m}$ qui est cependant moins riche en carbone et azote organique que la fraction $<2 \mu\text{m}$. Mais par rapport à cette dernière, elle offre des habitats structurés et stables.

Ces fractions $2-50 \mu\text{m}$ et végétales abritent des communautés de bactéries cellulolytiques composées (respectivement) à 96 et 95% de bactéries non filamenteuses. Les bactéries filamenteuses, dont on peut dire qu'elles sont représentées essentiellement par des actinomycètes, sont d'une part dans les classes d'agrégats de tailles supérieures ($>50 \mu\text{m}$), qui sont d'ailleurs plus pauvres en matières organiques, et d'autre part entre les agrégats, qui sont un environnement plus instable. Avec de telles constatations, nous pouvons émettre deux hypothèses quant au déterminisme d'une telle localisation. Les Fil occuperaient de telles niches du fait de leur taille et/ou seraient exclus des niches occupées par les Nfil de par une moindre compétitivité, et se seraient alors adaptées à des conditions environnementales plus difficiles.

Le cycle de dessiccation/réhumectation a changé ce schéma ci-dessus, mais sans entraîner pour autant une diminution des populations bien qu'il n'y ait eu aucun apport extérieur de matière organique. La dessiccation suivie de la réhydratation ont permis notamment une meilleure accessibilité de la matière organique aux micro-organismes (van Gestel, 1991), et ceux-ci ont pu se nourrir et se multiplier (puisque l'on a eu minéralisation de 35% du C.o du sol) des organismes tués par la dessiccation (Rosacker and Kieft, 1990 ; van Gestel, 1991 ; Lebuhn *et al.*, 1994). Il serait intéressant de voir ce qui se passerait si nous faisons plusieurs cycles pour épuiser le sol en C.o.

Ce cycle a certainement joué sur la composition même des populations de cellulolytiques et leur distribution dans l'espace par une action physique sur les agrégats. La déstructuration des macroagrégats a entraîné le transfert de populations dans la fraction argileuse $<2 \mu\text{m}$, menant alors à un enrichissement relatif en bactéries Fil de la fraction $>2000 \mu\text{m}$.

Du fait de leur meilleure résistance à la dessiccation, on aurait pu s'attendre à un développement préférentiel de ces bactéries filamenteuses (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Swift *et al.*, 1979 ; Stott *et al.*, 1986 ; Rosacker and Kieft, 1990). Or, elles

représentent 10% des cellulolytiques totaux dans le sol total avant le cycle, et 13% après. Ces chiffres ne peuvent pas être testés, mais on peut dire que la différence n'apparaît pas flagrante. Il faudrait connaître cette proportion au moment de la dessiccation.

Le fait de trouver une si faible population de cellulolytiques dans la fraction $>2000 \mu\text{m}$, et le résultat contraire pour la fraction $2-50 \mu\text{m}$, paraît de prime abord surprenant. En effet, la fraction $>2000 \mu\text{m}$ contient des débris végétaux dans les premiers stades de leur décomposition, c'est-à-dire encore sous forme de fibres cellulosiques pour certains. Dans la fraction $2-50 \mu\text{m}$ se trouve de la matière organique à des stades de décomposition plus avancés. Deux hypothèses se posent. D'une part, cette fraction $2-50 \mu\text{m}$ contiendrait également de fin débris végétaux sous forme de fibres de cellulose, d'autre part, les bactéries isolées ne seraient pas des cellulolytiques strictes. Ce dernier point nous ramène aux résultats sur le nombre de bactéries Nfil dont on n'a pas pu visualiser une plage de lyse. Ce nombre est très faible (0 à 5%) par rapport au nombre de bactéries repiquées. Plusieurs hypothèses peuvent être posées pour expliquer ceci. Nous n'avons pas pu visualiser ces plages car l'activité cellulolytique est trop faible ou parce que le test n'est pas suffisamment précis. Ou alors, ces bactéries ne sont pas des cellulolytiques à activité cellulasique : elles se seraient développées à partir de produits de dégradation de la cellulolyse et/ou de cadavres microbiens. Une autre hypothèse est que ces bactéries Nfil n'auraient pas d'exoenzymes pour la cellulolyse, et qu'elles devraient alors adhérer à la fibre pour la dégrader. Pour les études suivantes, nous préconisons plutôt un isolement en milieu liquide et une mesure de l'activité par dosage des sucres réducteurs (Thomas-Bauzon, communication personnelle).

Le cycle de dessiccation/réhumectation n'a pas entraîné de diminution de la communauté cellulolytique. Ce point est satisfaisant car on peut alors considérer cette jachère de 20 ans comme un écosystème en équilibre dans lequel les micro-organismes sont plus ou moins adaptés aux contraintes environnementales. Leurs populations fluctuent en fonction des cycles de dessiccation/réhumectation. Ceci supporte le fait que la jachère peut être considérée comme un bon moyen de gestion de la matière organique dans les pays soudano-sahéliens soumis à une alternance d'une saison sèche intense et d'une saison des pluies. Mais l'intérêt est d'optimiser ce système. Dans un sol sous jachère, l'importance de l'agrégation est positivement corrélée avec l'âge de la jachère, et négativement avec le degré d'anthropisation. Les études sur la jachère en tant que moyen de gestion de la matière organique du sol et de la fertilité cherchent la bonne mesure entre ces deux facteurs, l'âge et la pression anthropique, de la structuration du sol. Dans notre cas, nous voudrions savoir s'il existe une classe d'agrégat, c'est-à-dire un habitat, préférable à la survie des micro-organismes cellulolytiques, principaux acteurs du cycle du carbone et du turnover de la matière organique.

Un cycle de dessiccation/réhumectation augmente les taux de minéralisation du carbone, de l'azote et du phosphore (Jager and Bruins, 1975 ; Horowitz, 1979 ; Orchard and Cook, 1983 ; van Gestel, 1991), notamment en rendant la matière organique plus accessible aux micro-organismes. Aussi, pour conserver les stocks de matière organique du sol, il faut limiter cette vitesse de minéralisation (à un niveau d'équilibre). Or, de nos résultats nous avons montré une instabilité de la fraction $>2000 \mu\text{m}$, amenant à une libération de la matière organique et des micro-organismes vers la fraction $<2 \mu\text{m}$ notamment. A côté, les agrégats de $2000-50 \mu\text{m}$ apparaissent stables, non perturbés par le cycle, sans changement significatif des populations de cellulolytiques. Mais ce sont les agrégats de $50-2 \mu\text{m}$ qui apparaissent toutefois les plus stables, et qui sont en outre les plus riches en micro-organismes, C.o et N.o. Malgré cette richesse, ce sont eux qui ont la perte de C.o la plus faible, signifiant une minéralisation et une dispersion plus faible de la matière organique. Ce serait dans cette fraction que cette matière serait alors la mieux protégée et la plus stable.

5. CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Dans ce sol de jachère semi-aride, la classe d'agrégat la plus favorable aux micro-organismes durant les alternances de saisons sèches et humides, serait la classe 2-50 μm . En effet, les agrégats de cette classe apparaissent stables face aux contraintes physiques de la dessiccation et de la réhumectation. Ils sont en outre riches en carbone et azote organiques, tout comme en bactéries cellulolytiques et en micro-organismes totaux. Mais il reste un point important à éclaircir. Il serait intéressant de connaître l'activité cellulolytique réelle des microorganismes associés à chacune des fractions, ceci afin de savoir s'il existe un site plus efficace vis à vis des processus de dégradation de la cellulose dans ces sols semi-arides tropicaux.

Au niveau des bactéries cellulolytiques, les études de diversité sont à élargir et à approfondir. Nos résultats montrent une faible diversité génotypique chez les bactéries cellulolytiques filamenteuses. De là, on peut mieux envisager une étude sur les activités spécifiques, en parallèle avec les activités réelles au niveau des fractions. On pourrait ainsi voir si ces fractions abritent des populations différentes avec des activités différentes. Il serait alors envisageable de faire un suivi de ces populations au cours de cycles de dessiccation/réhumectation avec des techniques telles que l'hybridation *in situ*.



Références bibliographiques

- Beare M.H., M.L. Cabrera., P.F. Hendrix and D.C. Coleman. 1994. Aggregate-protected and unprotected organic matter pools in conventional and no-tillage soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58:787-795.
- Brewer R. 1964. *Fabric and mineral analysis of soils*. John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney, 470 pp.
- Chotte J.L., Villemin G., Guillore P. and Jocteur Monrozier L. 1994. Morphological aspects of microorganism habitats in a vertisol. In *Soil Micromorphology: Studies in Management and Genesis*, A.J. Ringrose-Voase and G.S. Humphreys (Eds), Proc. IX Int. Working Meeting on Soil Micromorphology, Townsville, Australia, July 1992. *Developments in Soil Science* 22, Elsevier, Amsterdam, pp-395-403.
- Crowe J.H., A.F. Hoekstra and L.M. Crowe. 1992. Anhydrobiosis. *Ann. Rev. Physiol.* 54 : 579-599.
- Day J.M. and Döbereiner J. 1976. Physiological aspects of N₂-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil. Biol. Biochem.* 8: 45-50.
- Dommergues Y. et F. Mangenot. 1970. *Écologie microbienne du sol*. Masson et Cie (ed.), Paris. 796 p.
- Feller C. 1994. *La matière organique dans les sols tropicaux à argile 1.1. Recherche de compartiments organiques fonctionnels. Une approche granulométrique*. Doctorat d'État, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 393 p.
- Feller C., P. Lavelle, A. Albrecht & B. Nicolardot. 1993. *La jachère et le fonctionnement des sols tropicaux : rôle de l'activité biologique et des matières organiques. Quelques éléments de réflexion*. In : C. Floret & G. Serpantie (Eds), la jachère en Afrique de l'Ouest, collection colloques et séminaires. ORSTOM. Paris : 33-46.
- Griffin D.M. and E.J. Luard. 1979. Water stress and microbial ecology ; pp. 49-63. In M. Shilo (ed.), *Strategies of microbial life in extreme environments*. Dahlem Konferenzen, Berlin.
- Harris R.F. 1981. Effect of water potential on microbial growth and activity ; pp. 23-95. In J.F. Parr, W.R. Gardner and L.F. Elliot (ed.), *Water potential relations in soil microbiology*. *Soil Science Society of America* special publication n° 9. *Soil Science Society of America*, Madison, Wis.
- Horowitz N.H. 1979. Biological water requirements ; group report pp. 15-27. In M. Shilo (ed.), *Strategies of microbial life in extreme environments*. Dahlem Konferenzen, Berlin.
- Jager G. and E.H. Bruins. 1975. Effect of repeated drying at different temperatures on soil organic matter decomposition and characteristics, and on soil microflora. *Soil Biology and Biochemistry.* 7:153-159.
- Kabir M., J.L. Chotte, M. Rahman, R. Bally and L. Jocteur Monrozier. 1994. Distribution of soil fractions and location of soil bacteria in a vertisol under cultivation and perennial grass. *Plant and Soil* 163:243-255.

- Kibertus G. and J. Proth. 1978. Effets de la dessiccation sur les bactéries Gram-négatives d'un sol. *Soil Biology and Biochemistry*. 11:109-114.
- Killham K., M. Amato and J.N. Ladd. 1993. Effect of substrate location in soil and soil pore-water regime on carbon turnover. *Soil Biol. Biochem.* 25:57-62.
- Lebuhn M., B. Heilmann and A. Hartmann. 1994. Effects of drying/rewetting stress on microbial auxin production and L-tryptophan catabolism in soils. *Biology and fertility of soils*. 18:302-310.
- Linders L.J.M., G.I.W. deJong, G. Meerdink and K. VantRiet. 1997. Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum* : the role of moisture distribution and water activity. *Journal of Food Engineering*. 31:237-250.
- Maignien R. 1965. *Notice explicative ; carte pédologique du Sénégal en 1/1000.000 ORSTOM-Dakar* : 63 p. + 1 carte.
- Mbagwu J.S.C. and P. Bazzoffi. 1988. Stability of microagregates as influenced by antecedent moisture content, organic waste amendment and wetting and drying cycles. *Catena Verlag*, 15:565-76.
- Oades J.M. 1992. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma*, 56:377-400.
- Ophir T. and D.L. Gutnick. 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:740-745.
- Orchard V.A. and F.J. Cook 1983. Relationship between soil respiration and soil moisture. *Soil Biology and Biochemistry*. 15:447-453.
- Pieri C. 1989. *Fertilité des terres de savanes*. Montpellier, France, Ministère de la coopération/CIRAD : 61-333.
- Potts M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews*. 58:755-805.
- Ramsay A.J. and Bawden A.D. 1983 Effects of sterilization and storage on respiration, nitrogen status and direct counts of soil bacteria using acridine orange. *Soil Biol. Biochem.* 15: 263-268.
- Rosacker L.L. and T.L. Kieft.. 1990. Biomass and adenylate energy charge of a grassland soil during drying. *Soil Biology and Biochemistry*. 22:1121-1127.
- Skopp J., M.D. Jawson and J.W. Doran. 1990. Steady-state microbial activity as a function of soil water content. *Soil Science Society of America Journal*, 54:1619-1625.
- Stark J.M. and M.K. Firestone. 1995. Mechanisms for soil moisture effects on activity of nitrifying bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 61:218-221.
- Stott D.E., L.F. Elliott, R.I. Papendick and G.S. Campbell. 1986. Low temperature or low water potential effects on the microbial

decomposition of wheat residue. *Soil Biology and Biochemistry*.
18:577-582.

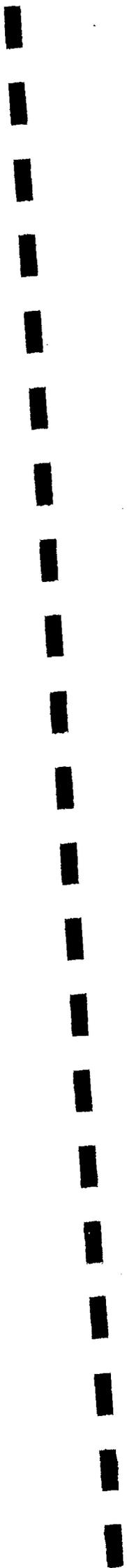
Swift M.J.. 1984. Soil biological processus and fertility (TSBF). *Planning for research. Biol. Int.*, 9 : 24 p.

Swift M.J., O.W. Heal and J.M. Anderson. 1979. *Decomposition in terrestrial ecosystems*. Studies in Ecology volumes ; Blackwell Scientific Publication. 370 p.

Thomas-Bauzon D., E. Kiffer, G. Janin et F. Toutain. 1995. Méthodologie de recherche de bactéries cellulolytiques diazotrophes appliquée aux meules de *Sphaerothermes sphaerothorax*. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie, Ecologie*.318:699-707.

Thomas-Bauzon D., E. Kiffer, G. Pizelle et E. Petitdemange. 1990. *Fixation d'azote et cellulolyse : activités nitrogénase et/ou cellulose d'organismes fixateurs d'azote et/ou cellulolytiques*. Nancy : Presses universitaires.

van Gestel M. 1991. *Microbial biomass responses to soil drying and rewetting*. Dissertations de agricultura. Fakulteit der Landbouwwetenschappen. 144 pages.



Annexes

ANNEXE I : Le fractionnement physique du sol (Chotte *et al.*, 1994)

La veille, 100 g. de sol sec sont immergés dans de l'eau distillée à 4°C pour dissocier les structures faiblement liées. Puis ce sol est passé sur une série de tamis de 2000, 1000, 200, 50 et 20 µm. Chacun de ces passages se fait par un lavage en douceur, soit par jet de pissette, soit par l'eau de la pissette recueillie dans le récipient contenant le tamis (ce qui permet de minimiser la quantité d'eau utilisée). C'est cette eau récoltée à chaque passage qui est tamisée sur le tamis suivant. Le lavage d'un tamis se prolonge jusqu'à ce que l'eau qui s'écoule du tamis soit claire. Alors la fraction est recueillie dans un bécher, préalablement taré, qui est mis en bascule quelques heures afin de concentrer l'eau résiduelle. Cette eau est éliminée par succion capillaire avec du papier filtre, et la fraction est gardée à 4°C.

Pour recueillir la fraction végétale > 200 µm : chaque fragment est prélevé avec une pince sur chacun des tamis > 200 µm et est lavé si besoin. Sont également récoltés les débris qui flottent à la surface de l'eau sous tamis.

Nous avons travaillé sur les fractions > 2000, 2000-50, 50-2 et < 2 µm. Les tamis intermédiaires sont là pour éviter le colmatage, et une fois toutes les « sous-fractions » récoltées, elles sont rassemblées avant l'élimination de l'eau résiduelle.

En fin de tamisage, on obtient environ 4 litres de la fraction < 20 µm. Cette fraction est laissée toute une nuit à sédimenter dans un bécher de 5 litres. Le lendemain, les 15 premiers centimètres sont pompés : ils représentent les agrégats < 2 µm alors que restent dans le bécher les agrégats < 20µm. Ainsi, dès cet instant, cette fraction < 20µm va subir une série de sédimentation/ siphonnage afin de séparer au fur et à mesure les agrégats 2-20 µm et <2 µm qui les accompagnent. Pour cela, la technique s'appuie sur la loi de Stokes qui nous donne le temps de sédimentation d'une particule (sphérique) d'un diamètre donnée.

La sédimentation et le siphonnage sont effectués par la suite dans des colonnes à sédimenter d'1 litre et de 5 cm de diamètre. Ainsi, par exemple, les 10 premiers centimètres qui sont siphonnés dans une eau à 21°C au bout de 7h50 ne sont représentés que par des particules <2 µm. Il a fallu au plus 7h50 aux agrégats de 20-2 µm (accompagnés de particules <2 µm) pour sédimenter sur 10 cm. Cette série de sédimentation/ siphonnage est effectuée jusqu'à ce que la colonne d'eau à prélever soit claire. Alors il ne reste dans la colonne que les agrégats de 20-2 µm.

Afin de flocculer les fractions <20 µm et éliminer le maximum d'eau, il est ajouté du CaCl₂ à 0,1 M final. Douze heures plus tard environ, le surnageant clair est éliminé et les fractions 20-2 µm et <2 µm sont recueillies dans des béchers de 100 ml préalablement tarés. Ces fractions sont ensuite centrifugées à 5000 g (6500 rpm) jusqu'à élimination complète du surnageant limpide.

La partie sédimentation/ siphonnage a le désagrément de prolonger la méthode initiale (qui utilise la centrifugation à sa place), portant à 5-6 jours sa durée au lieu de 2.

ANNEXE II : le milieu de culture Nfb à cellulose raffinée

A - Le milieu de base Nfb (N-free broth) modifié, d'après Day and Döbereiner 1976.:

Pour 1 litre de milieu :

Solution phosphate

K ₂ HPO ₄	3,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,017 g
cellulose raffinée 5%	250,0 ml
Agar bactériologique	15,0 g
eau déminéralisée	686,0 ml

Solution de sels 1

MgSO ₄ ,7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂	0,02 g
eau déminéralisée	40 ml

Solution de sels 2

NaCl	0,1 g
Na ₂ MoO ₄ ,2H ₂ O	0,02 g
eau déminéralisée	10 ml

Solution de Fe-EDTA, pour 100 ml

FeSO ₄ ,7H ₂ O	1,262 g
EDTA,2H ₂ O	1,184 g
eau déminéralisée	100 ml

Solution de vitamine, pour 100 ml

biotine	10 mg
eau déminéralisée	100 ml

Solution de cycloheximide, pour 100 ml

cycloheximide	10 g
éthanol	100 ml

Les solutions de sels, de Fe-EDTA, de vitamine et de cycloheximide sont préalablement préparées et gardées à 4°C. Les solutions de sels sont autoclavées (séparément) alors que les autres doivent être filtrées à 0,2 µm.

Ces solutions sont ensuite rajoutées au milieu phosphate autoclavé, dans les proportions suivantes :

Pour 1 litre de milieu :

Solution de sels 1	40 ml
de sels 2	10 ml
de Fe-EDTA	1 ml
de vitamine	1 ml
de cycloheximide	2 ml

B - La cellulose raffinée

Pour 1 l de milieu, 5 g de papier Whatman n°1 sont broyés à l'Ultra Turrax dans 250 ml d'eau distillée. En fait, 1,25 g de papier est finement découpé dans une éprouvette en plastique de 100 ml, puis 70 ml d'eau étaient rajoutés. Le tout est broyé durant environ 1 min. L'opération est répétée 4 fois, et les 40 ml restant servent au rinçage de l'éprouvette. Cette suspension, très épaisse, est ensuite rajoutée au milieu de base Nfb avant d'ajuster le pH à 7.0 et d'ajouter l'Agar bactériologique.

Pour couler le milieu, un impératif se posait : le couler le plus finement possible pour visualiser par la suite les plages de lyse bactériennes. De ce fait, nous avons légèrement modifié le protocole initiale. Tout d'abord, une couche de milieu gélosé à 15 % était préalablement coulée afin d'éviter que la couche du milieu cellulose raffinée se sèche trop vite par la suite. Et à la sortie du milieu cellulose raffinée de l'autoclave, il nous a fallu rajouter 500 ml d'eau distillée stérile dans le litre de milieu car celui-ci était trop épais. Puis, pour couler une fine couche, était utilisée une pipette de 10 ml, mise à l'envers dans la propipette. Ce système permettait de couler efficacement une couche de 1 mm avec 6 ml de milieu environ. La dernière contrainte était de couler au plus vite le milieu dans les boites car il se solidifie très rapidement.

ANNEXE III : Dénombrement de la microflore totale (Ramsay and Bawden, 1983)

Ce dénombrement de la microflore totale du sol s'effectue par comptage direct, au microscope à épifluorescence, des bactéries colorés à l'Acridine Orange. Pour cela nous sommes partis des suspensions de sol. Toute solution utilisée pour cette manipulation est préalablement filtrée à 0,2 µm, et l'eau distillée est en plus autoclavée.

Une fois la série de suspensions-dilutions terminée, 0,9 ml de chaque dilution est additionné à du formaldéhyde (4 % final) dans un eppendorf, afin de fixer et conserver à 4°C les bactéries.

Puis, 100 µl d'Acridine Orange (0,1 %) filtrée à 0,2 µm est ajoutée à 0,9 µl de chaque dilution de sol. La suspension est agitée au vortex puis laissée 2 min afin que le colorant puisse agir. Puis ce 1 ml est filtré sur une membrane Nucléopore de 0,2 µm. Ces filtres ont été préalablement colorés au Noir Soudan B (10 mg dissous dans 75 ml d'alcool absolu filtré puis dilué dans 75 ml d'eau distillée filtrée) afin de diminuer l'autofluorescence du filtre.

Le filtre est ensuite rincé 2 fois avec 5 ml d'eau déminéralisée filtrée à 0,2 µm pour éliminer le surplus d'acridine. Puis, 1 ml de propanol-2 (isopropanol) filtré à 0,2 µm est ajouté et laissé 1 min afin de fixer les cellules. Le filtre est de nouveau lavé avec 3-4 ml d'eau déminéralisée filtrée à 0,2 µm. On monte ensuite le filtre entre lame et lamelle dans du glycérol tamponné à pH=7,6. La lamelle est fortement pressée afin de réduire au maximum l'espace entre le filtre et la lamelle.

Le comptage est réalisé au microscope à épifluorescence UV (objectif 100 à immersion) à la dilution qui permet de compter entre 0 et 20 bactéries par champ. Comme nous n'avons effectué qu'une lame par dilution, nous avons compté 20 champs (au lieu de 10 habituellement pour 2 lames préparées).

Le nombre de bactéries par gramme de sol sec est déterminé par la formule suivante :

$$Y = X * (S/s) * (d/D) * (E/p)$$

- Y : nombre de bactéries par gramme de sol sec
- X : nombre moyen de bactéries par champs microscopique
- S : surface de filtration
- s : surface d'un champ microscopique
- d : facteur de dilution
- D : volume de suspension filtrée (soit, ici, 0.9 ml)
- p : poids de sol sec
- E : volume d'extraction (soit ici 50 ml)

Notons qu'il faut que la dilution choisie laisse apparaître les bactéries sans ambiguïté par rapport aux impuretés d'apparences similaires ou qui pourraient les cacher.

De plus, il faut garder quelques réserves quant aux résultats. En effet, cette technique conduit à une surestimation globale de la concentration bactérienne viable car, en plus des artéfacts de comptage dus aux impuretés de morphologie et de fluorescence similaires aux bactéries, cette méthode quantifierait également les bactéries non viables.

Soutenu le 03 juillet 1998

Nom : CHASTRUSSE
Prénom : Christine
Spécialité : Écologie Microbienne
Nature : Diplôme d'Étude Approfondies
Option : Sol & eau

Titre : Localisation et diversité de bactéries cellulolytiques lors d'un cycle de dessiccation/réhumectation. Cas d'un sol ferrugineux tropical sous jachère naturelle.

Résumé :

Le but de ce travail a été de rechercher un habitat privilégié à la survie de bactéries cellulolytiques durant les phases de dessiccation/réhumectation dans un sol semi-aride de jachère au Sénégal.

Un fractionnement physique a été réalisé sur deux échantillons de sol dont l'un a subi un cycle de dessiccation/réhumectation en conditions contrôlées. Sur les différentes classes d'agrégats ont été isolées et dénombrées les bactéries cellulolytiques filamenteuses et non filamenteuses à partir d'un milieu sélectif contenant de la cellulose raffinée. Une étude de la diversité génotypique a été conduite sur ces isolats.

Avant le cycle expérimental de dessiccation/réhumectation, les bactéries cellulolytiques occupent préférentiellement la fraction 2-50 μm et les résidus végétaux libres $>200 \mu\text{m}$, avec une dominance des bactéries non filamenteuses dans ces fractions alors que la part des isolats filamenteux est plus élevée dans les fractions $>50 \mu\text{m}$ et $<2 \mu\text{m}$.

Le cycle de dessiccation/réhumectation a entraîné une désagrégation de la fraction $>2000 \mu\text{m}$, libérant et fournissant aux fractions 2-50 μm et $<2 \mu\text{m}$ du matériel minéral, organique et des micro-organismes. Ces apports, notamment de matières organiques, ont dû contribuer à l'augmentation et à la multiplication des communautés de cellulolytiques de la fraction argileuse interagrégats. Les populations de micro-organismes des fractions 2-50 μm et 50-2000 μm apparaissent stables. Cependant la fraction 2-50 μm est non seulement plus riche en carbone et azote organique que la fraction 50-2000 μm , mais la structure de ses agrégats serait en outre plus résistante aux contraintes de la dessiccation et de la réhumectation.

De là il serait intéressant de mesurer l'activité réelle dans chacune des fractions. De plus, ce travail montre que la diversité génotypique des bactéries cellulolytiques filamenteuses serait faible dans ce sol, ce qui pourrait faciliter une étude plus approfondie sur le comportement de chacune de ces souches dans cet écosystème.

Mots clés : bactéries cellulolytiques, structure du sol, cycle de dessiccation/réhumectation, jachère, localisation des micro-organismes, diversité microbienne, Sénégal.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Bio-Pédologie

ORSTOM
B.P. 1386
Dakar
SÉNÉGAL

Maître de stage : J.L. CHOTTE

jury : M. FERNANDEZ, P. NORMAND, Y. RICHARD,
C. STEINBERG