UNIVERSITE DU BURUNDI

FACULTE D'AGRONOMIE ET BIO-INGENIERIE (FABI)

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE PRODUCTION VEGETALE (SPV)

COURS DE MICROBIOLOGIE DU SOL

Syllabus de cours de Baccalauréat 2eme année en Sciences de Productions Végétales)

Volume horaire : (2 crédits, 30heures)

Par

Dr. Samson MUSONERIMANA

Emails : smusonerimana@yahoo.fr ou samson.musonerimana@ub.edu.bi

Année Académique 2024-2025

TABLE DE MATIERE

Liste des figures **9**

1. INTRODUCTION **12**

1.1. DEFINITION DE LA MICROBIOLOGIE DU SOL 12

1.2. CARACTERISTIQUES DE LA MICROBIOLOGIE DU SOL 13

1.3. RELATIONS AVEC LES AUTRES DISCIPLINES SCIENTIFIQUES 15

1.4. LES OBJECTIFS DE LA MICROBIOLOGIE DU SOL 16

2. LES GRANDS GROUPES DE MICROORGANISMES DU SOL ET LEUR ROLE **17**

2.1. VIRUS 19

2.2. PROCARYOTES 19

2.2.1. Procaryotes photosynthétiques 19

2.2.2. Bactéries non photosynthétiques 23

2.2.3. Actinomycètes 26

2.3. CHAMPIGNONS 30

2.3.1. Moisissures à plasmodium 30

2.3.2. Champignons flagellés 30

2.3.4. Champignons supérieurs 31

2.3.5. Champignons imparfaits (Fungi imperfecti, Deutéromycètes) 32

2.3.6. Rôle des champignons dans les sols 32

2.4. ALGUES 33

2.4.1. Taxonomie 33

2.4.2. Rôle dans les sols 33

2.5. PROTOZOAIRES 35

2.5.1. Taxonomie des protozoaires 36

2.5.2. Distribution et densité dans les sols 36

2.5.3. Rôle dans le sol 36

2.6. LES GRANDS GROUPES NUTRITIONNELS MICROBIENS 38

2.7. LES GRANDS GROUPES FONCTIONNELS DE MICROORGANISMES 39
2.8. IMPORTANCE RELATIVE DES DIFFERENTS GROUPES MICROBIENS 40
3. LE SOL EN TANT QU'HABITAT POUR LES MICROORGANISMES 41
3.1. INTRODUCTION 41
3.2. LES COMPOSANTS DU SOL 41
3.2.1. Composants minéraux 42
3.2.2. Eau du sol 44
3.2.3. Gaz du sol 45
3.2.4. Matière organique 45
3.3. PROFIL PEDOLOGIQUE ET MACROENVIRONNEMENTS 46
3.4. MICROENVIRONNEMENTS ET ACTION SUR L'ACTIVITE DES 50
3.4.1. Interactions au niveau colloïdal 50
3.4.2. Influence de l'absorption sur le métabolisme des microorganismes 53
3.4.3. Niveau de l'agrégat 54
3.5. DISTRIBUTION DES MICROORGANISMES DANS LE SOL 56
4. METHODES D'ETUDE DES MICROORGANISMES DU SOL 57
4.1. CULTURES D'ENRICHISSEMENT ET ISOLEMENT DE SOUCHES 57
4.1.1. Milieux sélectifs 57
4.1.2. Enrichissement du sol en microorganismes spécifiques 57
4.2. NUMERATIONS 59
4.2.1. Comptages directs 59
4.2.2. Comptages indirects par ensemencement de milieux solides ou liquides 59
4.2.3. Mesure de l'apparition ou la disparition d'un métabolite spécifique 63
4.3. ESTIMATION DE LA BIOMASSE MICROBIENNE 64
4.3.1. Mesures directes 64
4.3.2. Méthodes indirectes 65
4.4. MESURES D'ACTIVITE (EXEMPLES) 66

4.4.1. Respirométrie 66
4.4.2. Fixation de N2, mesure de la réduction de l'acétylène 66
4.4.3. Mesure de la production primaire apparente des microalgues 69
4.5. PROBLEMES D'ECHANTILLONNAGE ET ANALYSE STATISTIQUE DES 70
4.6. METHODES MOLECULAIRES 73
4.6.1. Extraction de l'ADN du sol. 73
4.6.2. Purification de l'ADN extrait du sol. 74
4.6.3. Quantification de l'ADN du sol. 74
5. INTERACTIONS ENTRE MICROORGANISMES DANS LE SOL 75
5.1. NEUTRALISME 75
5.2. COMPETITION 75
5.3. MUTUALISME 75
5.4. COMMENSALISME 76
5.5. AMMENSALISME 76
5.6. PARASITISME OU PREDATION 76
6. RELATIONS ENTRE LES MICROORGANISMES ET LE SOL 77
6.1. EFFETS DES PROPRIETES DU SOL SUR LA DISTRIBUTION DES 77
6.2. EFFETS DES MICROORGANISMES SUR LES PROPRIETES DU SOL 81
6.2.1. Action sur la structure du sol 81
6.2.2. Action sur le pH 82
6.2.3. Action sur le potentiel d'oxydoréduction 84
7. RELATIONS NON SYMBIOTIQUES ENTRE PLANTES ET MICROORGANISMES DU SOL 86
7.1. INTERACTIONS AU NIVEAU DE LA RACINE: RHIZOSPHERE 86
7.1.1. Anatomie de la racine 87
7.1.2. Influence de la racine sur le développement des microorganismes 87
7.1.3. Effet des microorganismes de la rhizosphère sur la croissance de la plante 89
7.2. INTERACTIONS AU NIVEAU DE LA GRAINE: SPERMOSPHERE 90

7.2.1. Sulfato-réduction spermosphérique 90
7.2.2. Germination du riz en présence de cyanobactéries 91
7.3. LITIERES 91
7.3.1. Redistribution des cations dans le profil 91
7.3.2. Décomposition de la litière par les microorganismes 92
7.3.3. Inhibition ou stimulation de la croissance par la litière 92
8. SYMBIOSES 92
8.1. INTRODUCTION 92
8.2. LEGUMINEUSES 93
8.2.1. Les symbiontes 93
8.2.2. Nodules des légumineuses 95
8.2.3. Aspects agronomiques 96
8.3. SYMBIOSES ACTINORHIZIENNES 97
8.3.1. Les symbiontes 97
8.3.2. Nodules actinorhiziens 97
8.3.3. Aspects agronomiques 98
8.4. AZOLLA 99
8.4.1. Les symbiontes 99
8.4.2. Fonctionnement de la symbiose 99
8.4.3. Aspects agronomiques 100
8.5. LES MYCORHIZES ET LEUR POTENTIEL AGRONOMIQUE 100
8.5.1. Les différents types de mycorhizes 102
8.5.2. Fonctionnement de la mycorhize 105
8.5.3. Effet physiologique des mycorhizes sur la plante 106
8.5.4. Influence de l'environnement sur les mycorhizes 108
8.5.5. Aspects appliqués 110
8.6. ASSOCIATIONS MULTIPLES 113

9. RELATIONS MICROORGANISMES-FAUNE DU SOL 113

10. CYCLE DU CARBONE 114

10.1. GENERALITES 115

10.2. FIXATION DU CO2 PAR LES MICROORGANISMES AUTOTROPHES 118

10.3. UTILISATION DES EXSUDATS RACINAIRES PAR LES MICROORGANISMES 118

10.4. MINERALISATION DES RESIDUS ORGANIQUES : CELLULOLYSE, ... 118

10.4.1. La Cellulolyse 119

10.4.2. La ligninolyse 120

10.5. METHANOGENESE, METHANOTROPHIE, EMISSION ET CONSOMMATION DE CH4 PAR LES SOLS 122

10.5.1. Préambule: implications agronomiques et écologiques de la méthanogénèse et de la methanotrophie 122

10.5.2. Méthanogénèse 124

10.5.3. Méthanotrophie 128

10.5.4. Relations entre méthanogènes et méthanotrophes 128

10.5.5. Le transfert du méthane du sol à l'atmosphère 129

10.5.6. Estimations des activités dans différents types de sols 130

10.5.7. Les voies de réduction possibles 136

10.5.8. Un bilan dans les sols ? 137

10.6. IMMOBILISATION DU C SOUS FORME ORGANIQUE: HUMIFICATION 138

10.6.1. Différentes formes de la matière organique du sol 138

10.6.2. Formation de l'humus à partir de la lignine 138

10.6.3. Humification des composés carbonés non aromatiques 138

10.6.4. Humification directe 138

10.6.5. Maturation de l'humus 138

10.6.6. Déshumification 139

11. CYCLE DE L'AZOTE 140

11.1. GENERALITES 140

11.2. APPORTS D'ORIGINE MICROBIENNE: FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE 140
11.2.1. Introduction 140
11.2.2. Mécanismes de la fixation biologique de l'azote 141
11.2.3. Méthodes de mesure de l'activité fixatrice 144
11.2.4. Fixation symbiotique 146
11.2.5. Fixateurs libres 150
11.2.6. Contribution de la fixation biologique au budget mondial de l'azote 151
11.2.7. Problèmes posés par l'utilisation pratique de la fixation biologique de N2 154
11.3. MINERALISATION DE L'AZOTE ORGANIQUE 158
11.3.1. Protéolyse 159
11.3.2. Ammonification 159
11.3.3. Putréfaction 159
11.3.4. Devenir de l'azote ammoniacal dans le sol 159
11.4. NITRIFICATION 161
11.4.1. Oxydation de l'ammonium en nitrite: nitrosation 162
11.4.2. Oxydation du nitrite en nitrate: nitratation 162
11.4.3. La nitrification dans le sol 162
11.4.4. Devenir du nitrate dans le sol 162
11.5. DENITRIFICATION 163
11.5.1. Etapes intermédiaires et germes responsables 163
11.5.2. Dénitrification dans le sol 164
11.5.3. Effet rhizosphère sur la dénitrification 168
11.5.4. Réduction dissimilatrice du nitrate en NH4+ 169
12. LE CYCLE DU SOUFRE 169
12.1. Généralités 170
12.2. LE CYCLE GLOBAL DU SOUFRE DANS LA BIOSPHERE 170
12.3. ASSIMILATION DU SULFATE 171

12.3.1. Incorporation du sulfate dans la cellule 172

12.3.2. Mécanismes enzymatiques de l'assimilation du sulfate 172

12.4. INCORPORATION DU SOUFRE ORGANIQUE DANS LA FRACTION ORGANIQUE DU SOL 172

12.5. MINERALISATION DU SOUFRE ORGANIQUE 173

12.6. RESPIRATION ANAEROBIE DES COMPOSES OXYGENES DU SOUFRE 173

12.6.1. Réduction dissimilatrice du sulfate (sulfato-réduction) 173

12.6.2. Réduction dissimilatrice du soufre élémentaire (sulfo-réduction) 179

12.6.3. Réduction dissimilatrice du thiosulfate (thiosulfato-réduction) par les procaryotes non sulfatoréducteurs 181

12.7. OXYDATION DES COMPOSES INORGANIQUES DU SOUFRE: SULFOOXYDATION 183

12.7.1. Oxydation par les bactéries chimiotrophes incolores 184

12.7.2. Oxydation par les bactéries photosynthétiques 186

12.7.3. Oxydation chimique 187

12. 8. QUELQUES PROBLEMES PARTICULIERS LIES AU CYCLE DU SOUFRE 188

12.8.1. Le biotope d'estuaire 188

12. 8.2. Les eaux douces sulfureuses 189

12.8.3. La zone réductrice sous l'interface eau-sédiment 189

12.8.4. Activité des bactéries du cycle du soufre en rizière 189

12.8.5. Sulfato-réduction spermosphérique et rhizosphérique 190

12.8.6. Toxicité des sulfures pour les nématodes phytoparasites 191

12.8.7. Acidification des sols riches en sulfures par sulfo-oxydation aérobie 192

12.8.8. L'alimentation en soufre de la plante 192

12.8.9. Corrosion dûe aux bactéries du cycle du soufre 192

13. CYCLE DU PHOSPHORE 194

13.1. GENERALITES 194

13.2. FORMES DU PHOSPHORE DANS LE SOL 194

13.3. SOLUBILISATION DU PHOSPHORE MINERAL 195

13.3.1. Solubilisation par les acides organiques 195
13.3.2. Solubilisation par les acides minéraux 195
13.3.3. Solubilisation par le CO2 195
13.3.4. Solubilisation par l'hydrogène sulfuré 195
13.4. MINERALISATION DU PHOSPHORE ORGANIQUE 196
13.5. IMMOBILISATION SOUS FORME ORGANIQUE 196
13.6. OXYDATION ET REDUCTION DU PHOSPHORE 196
13.7. ROLE DES MICORHIZES DANS L'ASSIMILATION DU P PAR LA PLANTE 196
13.7.1. Mycorhizes ectotrophes des arbres 196
13.7.2. Endomycorhizes 197
14. CYCLE DU FER 197
14.1. GENERALITES 197
14.2. LES BACTERIES A GAINE 198
14.3. OXYDATION DU FER PAR THIOBACILLUS FERROXYDANS 198
14.3.1. Mécanisme enzymatique 198
14.3.2. Pollution acide des eaux de draînage des résidus miniers 199
14.3.3. Lixiviation des minerais de métaux par *Thiobacillus ferrooxydans* 200
15. LES PESTICIDES ET LES MICROORGANISMES DU SOL 201
15.1. GENERALITES 201
15.2. METABOLISME MICROBIEN DES COMPOSES AROMATIQUES 201
15.3. DECOMPOSITION DES PESTICIDES PAR LES MICROORGANISMES 203
15.4. INFLUENCE DES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU SOL 204
15.5. ROLE DU COMETABOLISME DANS LA DEGRADATION DES PESTICIDES 205
16. CONCLUSION 205
References 207

Liste des figures

Figure 1. 1 Schéma des interactions et des transferts d'énergie dans l'écosystème sol-plante 13

Figure 1. 2 Schéma de la contribution des microorganismes au cycle de la matière organique dans les sols (les activités impliquant des activités microbiennes sont inscrites en italique) 15

Figure 1. 3 Relations entre la microbiologie du sol et les autres disciplines scientifiques 16

Figure 2. 1 Arbre phylogénique universel montrant l'existence des trois domaines: bacteria, archaea et eucarya. L'ordre de branchement, de la gauche vers la droite, et la longueur des branches sont basés sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S (d'après Woese et al. 1990) 18

Figure 2. 2 Différents types de cellules chez les cyanobactéries et leur rôle 20

Figure 2. 3 Différents types de ramification chez les cyanobactéries 21

Figure 2. 4 Différents types morphologiques de cyanobactéries 21

Figure 2. 5 Principaux groupes d'actinomycètes (d'après Lechevalier et Pramer, 1971) 29

Figure 2. 6 Morphologie, sporangiophore et zygospores de zygomycètes fréquemment isolés du sol 31

Figure 2. 7 Représentation schématique des carpophores d'ascomycètes et de basidiomycètes 32

Figure 2. 8 Conidiophores de Deutéromycètes (Champignons imparfaits) 32

Figure 2. 9 Morphologie de quelques algues communes dans les sols 34

Figure 2. 10 Comptage des grands groupes de microorganismes dans un sol fertile (Hutchinson, 1958) 40

Figure 3. 1 Représentation schématique de la notion de sol 41

Figure 3. 2 Diagramme de texture des sols suivant l'USDA (Classification américaine) 43

Figure 3. 3 Tensiomètre simple: la tension est mesurée par la hauteur h de la colonne d'eau 44

Figure 3. 4 Représentation schématique des composants de l'humus 46

Figure 3. 5 Profil pédologique d'un sol brun lessivé 47

Figure 3. 6 Profil pédologique d'un podzol. 48

Figure 3. 7 Macroenvironnements dans un sol de rizière inondée 48

Figure 3. 8 Colonne de Winogradsky 49

Figure 3. 9 Modèle de Kobayachi et Okuda 50

Figure 3. 10 Charges électrostatiques et interactions entre particules 51

Figure 3. 11 Divers types d'association argiles-microorganismes. 52

Figure 3. 12 Représentation schématique d'un aggrégat 54

Figure 3. 13 Histogramme de mesures ponctuelles de populations d'algues dans une rizière 56

Figure 4. 1 Appareil pour percolation du sol en circuit fermé 58

Figure 4. 2 Représentation schématique de la réalisation de suspension-dilutions de sol 59

Figure 4. 3 Représentation schématique de comptages par étalement de suspension-dilutions de sol sur boites de Pétri 60

Figure 4. 4 Représentation schématique de la détermination du NMPP* 60

Figure 4. 5 Fréquence relative du premier chiffre (1 à 9) de n comptages de cyanobactéries dans des groupes de sols différents par quatre expérimentateurs indépendants 61

Figure 4. 6 Correlation entre les comptages ou les logarithmes des comptages de cyanobactéries dans 589 échantillons de sol à deux dilutions successives n et n+1 62

Figure 4. 7 Représentation schématique de l'origine du biais observé dans la distribution du premier chiffre des estimations de populations de cyanobactéries dans les sols 63

Figure 4. 8 Corrélation entre la mesure directe de la biomasse des cyanobactéries dans une rizière et les indices d'abondance estimés par un opérateur inexpérimenté (1) ou entraîné (2) 65

Figure 4. 9 Principe de la détermination de la biomasse microbienne par fumigation-incubation 66

Figure 4. 10 Mesure de la production de CO2 par le sol 66

Figure 4. 11 Dispositif pour la mesure de l'ARA sur des carottes de sol de rizière 68

Figure 4. 12 Dispositif pour la mesure de l'ARA *in situ*. 68

Figure 4. 13 Corrélation entre la concentration maximale de l'eau de submersion et la production primaire dans l'eau d'une rizière 69

Figure 4. 14 Effet de l'utilisation d'échantillons composites sur la distribution des mesures en microbiologie du sol 70

Figure 4. 15Moyennes, maxima, minima, écart-types et coefficient de variation (CV) de groupes de 230 estimations de la fixation de l'azote (ARA) dans une parcelle de 16 m2 , calculés à partir du choix au hasard de 2 à 20 valeurs parmi 25 mesures ponctuelles dans la parcelle (valeurs 2 à 20 de l'axe des x). Les 25 valeurs individuelles correspondent à la valeur 1 de l'axe des x. 71

Figure 4. 16 Corrélation entre moyennes et variances de groupes de cinq mesures de réduction d'acétylène *in situ*. 72

Figure 4. 17 Histogrammes de comptages de cyanobactéries dans 40 sous-parcelles d'une rizière (valeurs originales et transformées) 73

Figure 5. 1 Taux de croissance de populations mixtes en fonction du type d'association 76

Figure 5. 2 Relations de compétition et de prédation impliquées dans l'inhibition directe et indirecte des cyanobactéries fixatrices d'azote par les engrais azotés..... 77

Figure 6. 1 Corrélation entre la densité des populations de cyanobactéries fixatrices de N2 et le pH dans 102 sols de rizières 79

Figure 6. 2 Corrélation entre la densité des populations de cyanobactéries fixatrices de N2 et la teneur en phosphore assimilable dans 102 sols de rizières 80

Figure 6. 3 Variations journalières du pH dans l'eau des rizières en fonction du type de végétation ... 83

Figure 6. 4 Etapes de l'établissement de conditions réductrices après submersion d'un sol de rizière . 85

Figure 7. 1 Schéma de la rhizosphère 86

Figure 7. 2 Schéma des gradients d'exsudats et d'oxygène dans la rhizosphère en sol exondé et en sol submergé 88

Figure 7. 3 Schéma de la sulfato-réduction spermosphérique 91

Figure 8. 1 Etapes de la nodulation par poils absorbants (d'aprés Shaw et coll. 1982) 94

1. INTRODUCTION

L'objectif majeur des recherches en microbiologie du sol est de comprendre le déroulement des processus microbiens dans les sols et leur rôle dans le maintien et l'amélioration de leur fertilité; il devient alors possible d'envisager de maintenir et d'améliorer la fertilité et la productivité à long terme des sols en choisissant des pratiques culturales qui influencent de façon bénéfique les activités microbiennes.

1.1. DEFINITION DE LA MICROBIOLOGIE DU SOL

Le sol est le produit de l'altération, du remaniement et de l'organisation des couches supérieures de la croûte terrestre sous l'action de la vie, de l'atmosphère et des échanges d'énergie qui s'y manifestent.
La composition et l'activité de la faune et des communautés de plantes et de microorganismes qui colonisent le sol, en surface et en profondeur dépendent des propriétés particulières du sol. En retour, ces organismes exercent leurs effets sur la nature et la forme des composés organiques du sol ainsi que sur certaines de ses propriétés physico-chimiques (structure, pH etc...). Ils contribuent à l'altération de la roche mère et mélangent, associent ou complexent aux particules minérales issues de la roche mère, un matériel organique dont les uns ont fait la synthèse, et d'autres effectué la fragmentation, la dégradation et le remaniement. Les uns tirent de l'atmosphère les éléments de leurs synthèses (C, N, O). D'autres les lui restituent. Le maintien de la vie sous ses différentes formes dépend de l'équilibre de ces échanges dans lesquels les microorganismes jouent un rôle prépondérant. L'étude physique et chimique des sols est donc inséparable de l'étude des organismes qui y vivent.
La microbiologie des sols a pour objet principal l'étude des interactions entre les communautés microbiennes et les autres composants de l'écosystème sol-végétation (**Fig. 1.1**):

- Interactions entre les communautés microbiennes et le sol considéré comme milieu organique et minéral: (interactions μS1 et μS2 dans la **Fig. 1.1**);
- Interactions entre les communautés microbiennes et la végétation: (interactions μP1 et μP2);
- Interactions entre les communautés microbiennes et la faune du sol (interactions μF1 et μF2);
- Interactions entre les communautés microbiennes: (interactions μ1μ2 et μ2μ1);
- Les interactions entre le sol et la végétation (SP1, SP2) et entre la faune du sol et la végétation (SF1, SF2) sortent en grande partie des préoccupations des microbiologistes du sol

.

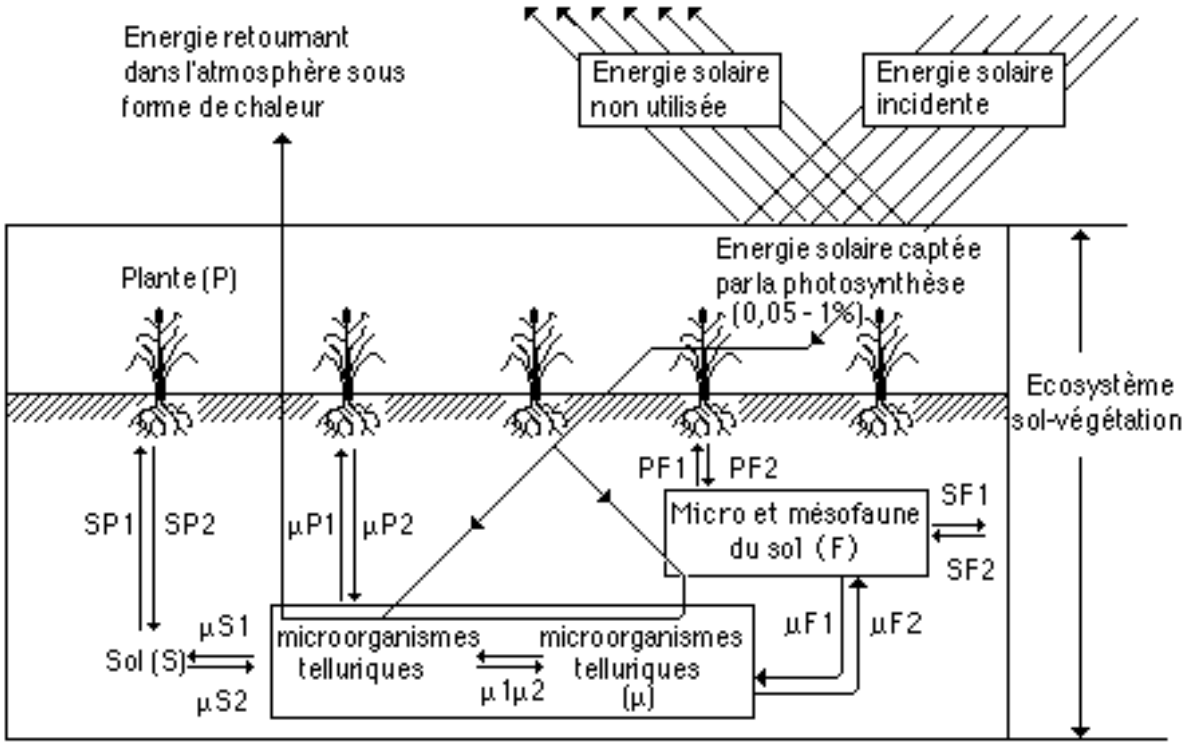


Figure 1. 1 Schéma des interactions et des transferts d'énergie dans l'écosystème sol-plante

1.2. CARACTERISTIQUES DE LA MICROBIOLOGIE DU SOL

La microbiologie du sol est orientée vers l'étude du comportement de micropopulations complexes et, en cela, elle se rapproche de la microbiologie des eaux, des vases et boues, de la microbiologie alimentaire. Elle diffère cependant de ces différentes disciplines par les caractéristiques très particulières du sol en tant que milieu pour le développement de microorganismes.

1° Le sol est constitué par une juxtaposition de macro et de microhabitats dans lesquels les conditions écologiques peuvent, à un moment donné, être très différentes les unes des autres: il en résulte une hétérogénéité très marquée qui complique les études.

2° Le sol est un support organique et minéral qui ne se comporte absolument pas comme un substrat inerte. En particulier, les produits du métabolisme microbien peuvent être stabilisés, c'est-à-dire soustraits provisoirement aux processus de biodégradation par adsorption sur les colloïdes minéraux ou organiques. Les lois chimiques et physiques établies dans les solutions ne s'appliquent souvent que très imparfaitement aux divers processus physiques, chimiques et biologiques qui se déroulent dans le sol. Ces processus sont d'ailleurs souvent si intimement intriqués qu'il faut faire appel à des artifices expérimentaux pour les dissocier.

3° L'énergie nécessaire au développement des microorganismes hétérotrophes qui constituent la plus grande partie des micropopulations telluriques, provient presque exclusivement de la photosynthèse végétale. On conçoit, dans ces conditions, toute l'importance que revêt, en microbiologie du sol, l'étude du facteur végétation.

4° La microfaune et la mésofaune du sol sont des composants qui sont parfois très actifs. Leurs interactions avec la microflore ne sont encore que très imparfaitement connues.

En raison de la complexité des environnements et des populations, les méthodes d'étude en microbiologie du sol présentent pratiquement tous les niveaux d'approche (**Tableau 1.1**)

Tableau 1.1 Méthodes d'étude en microbiologie du sol

•• **Modèles simplifiés** (études autécologiques: relations entre un individu et le milieu)

Comportent en général une seule espèce microbienne.

• A l'échelle moléculaire:

Concernent l'influence inductive, répressive ou inhibitrice des paramètres écologiques sur la synthèse des enzymes microbiennes,

Exemple: Répression par l'oxygène de la synthèse de la nitrate-réductase.

• A l'échelle cellulaire,

Portent sur les interactions entre paramètres écologiques et organismes considérés isolément,

Exemple: Influence sur l'activité respiratoire de l'adsorption des cellules *d'Azotobacter* sp. sur des particules électronégatives.

• A l'échelle des micropopulations pures, Portent sur des ensembles de microorganismes appartenant à une même espèce dont on étudie le développement en colonie, la croissance globale, la génétique.

Exemples:

Influence de composés à structure phénolique sur la croissance de *Bacillus* sp.

Effet d'une culture de cyanobactéries sur l'agrégation de particules de sable.

•• **Modèles complexes** (études synécologiques: relations entre communautés et milieu)

Utilisent plusieurs espèces microbiennes et éventuellement du sol et des végétaux

Exemples: Cultures gnotobiotiques (riz + *Azospirillum* + sable stérile + milieu de culture)

•• **Etudes *in situ*** (études synécologiques)

Exemples:

Inventaire des populations de *Rhizobium* dans certains sols tropicaux.

Mesures *in situ* de la fixation biologique de l'azote.

Cette introduction à la microbiologie du sol privilégie les aspects appliqués. Elle met l'accent sur les études synécologiques et les relations entre les microorganismes telluriques et la végétation.

En effet la production végétale dans les écosystèmes naturels ou cultivés dépend étroitement de l'activité de la microflore. Les microorganismes du sol, qui sont en grande majorité des hétérotrophes, reçoivent l'énergie dont ils ont besoin des organismes photosynthétiques (plantes chlorophylliennes essentiellement) qui mettent à leur disposition leurs produits de photosynthèse sous forme de résidus (matière organique fraîche). Une fois incorporée au sol, la matière organique fraîche est finalement oxydée par les microorganismes du sol jusqu'au stade CO2 et H2O avec libération d'éléments minéraux (Fig. 1.2).

Si les microorganismes n'intervenaient pas dans l'écosystème sol-végétation, les composés carbonés photosynthétisés s'accumuleraient et on aboutirait à un blocage sous forme organique de la réserve planétaire de CO2 et à un épuisement rapide des réserves minérales, d'où arrêt de toute vie végétale à la surface du globe.

Les microorganismes sont responsables de 80 à 90 % de l'oxydation biologique totale.

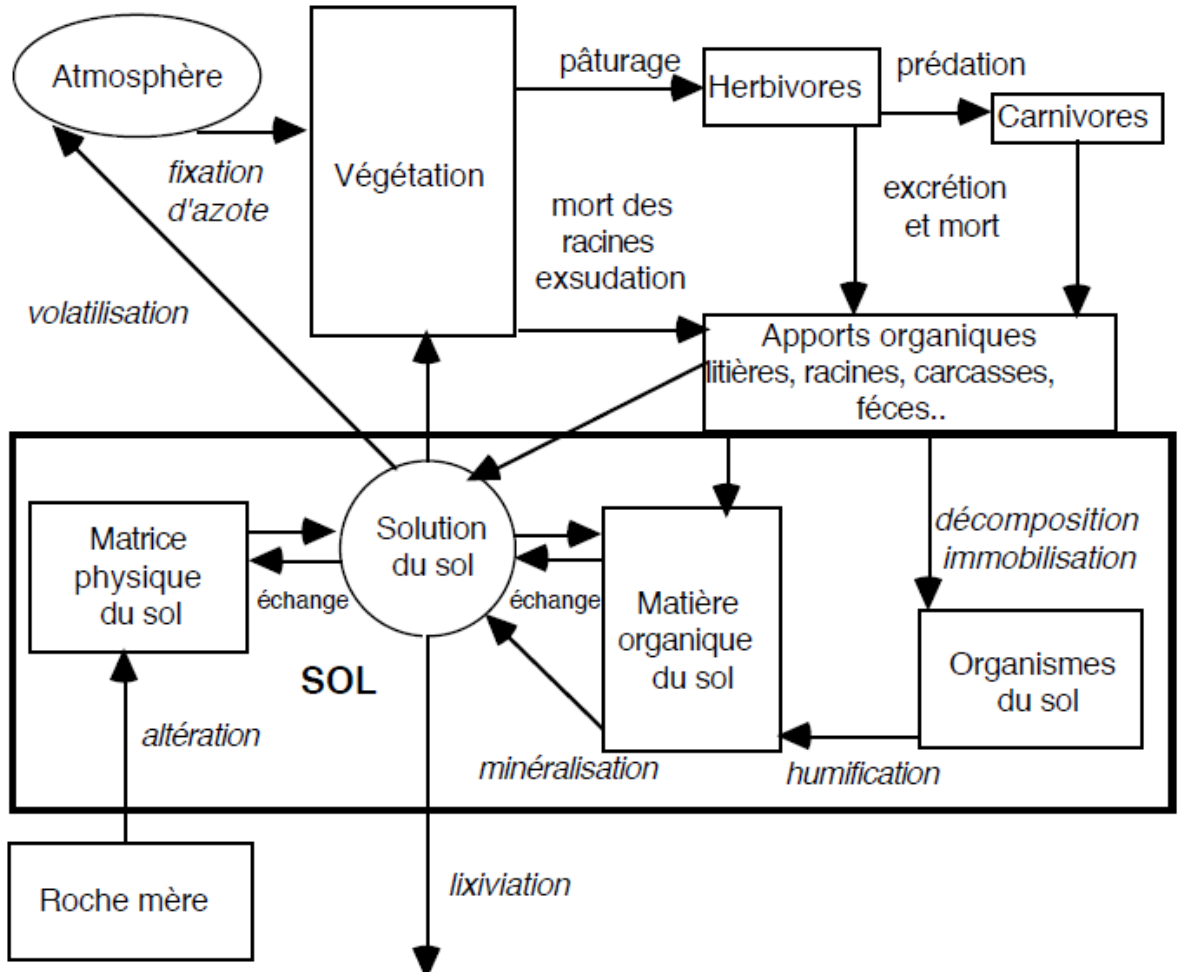


Figure 1. 2 Schéma de la contribution des microorganismes au cycle de la matière organique dans les sols (les activités impliquant des activités microbiennes sont inscrites en italique)

1.3. RELATIONS AVEC LES AUTRES DISCIPLINES SCIENTIFIQUES

Pour mener à bien ses recherches dans le domaine de l'observation et de l'expérimentation, le microbiologiste du sol doit faire appel à de nombreuses disciplines: bactériologie, mycologie, algologie, zoologie, phytophysiologie, phytopathologie et, bien entendu, pédologie, agronomie et écologie (Fig. 1.3). La biochimie constitue pour lui l'outil essentiel nécessaire à la mise en évidence des nombreuses réactions impliquées dans les interactions entre la microflore tellurique et les autres composants de l'écosystème sol-plante.

Récemment la biologie moléculaire et la génétique ont fourni à la microbiologie du sol de nouveaux outils permettant:

- l'identification fine de souches autochtones ou introduites dans les écosystèmes naturels ou cultivés,
- d'envisager la transformation génétique de souches pour une utilisation agronomique ou en relation avec la protection de l'environnement et la dépollution de sols.

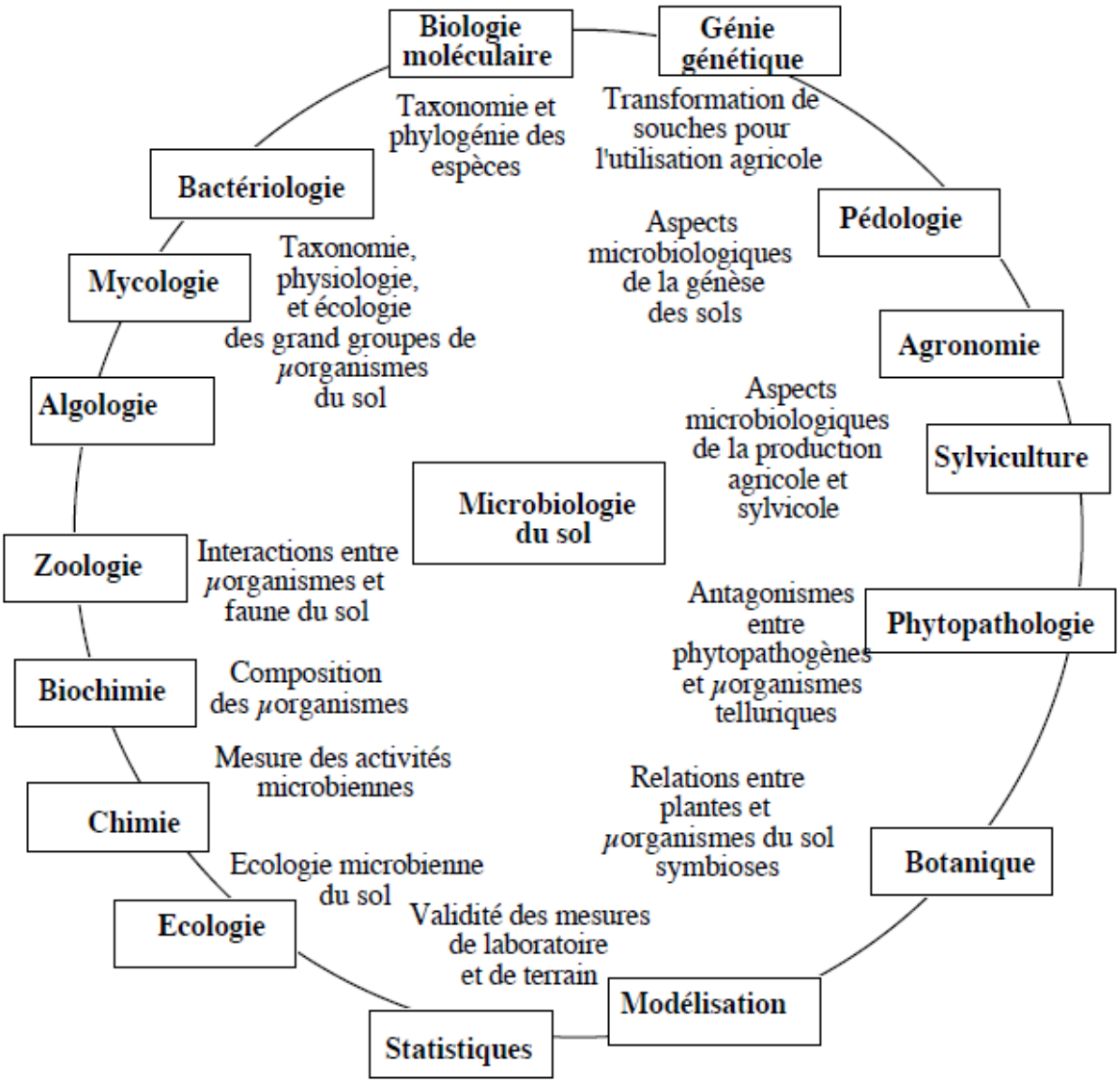


Figure 1. 3 Relations entre la microbiologie du sol et les autres disciplines scientifiques

1.4. LES OBJECTIFS DE LA MICROBIOLOGIE DU SOL

Les objectifs de la recherche fondamentale et appliquée en microbiologie du sol sont regroupés par thèmes dans la liste non exhaustive ci-après:

• Taxonomie:

- Taxonomie générale.
- Taxonomie des microorganismes du sol.

• Ecologie:

- Compréhension des relations entre les propriétés de l'environnement et la distribution géographique des microorganismes.
- Compréhension des aspects microbiologiques des grands cycles biologiques. Contribution à leur modélisation.

• Science du sol:

Compréhension des processus microbiens impliqués dans:

- L'altération des roches et des minéraux des sols.
- La migration des différents éléments.
- Les modifications de la structure et du stock humique des sols.

• Agronomie et sylviculture:

- Optimisation de l'utilisation des engrais chimiques et organiques.
- Optimisation de l'utilisation des pesticides.
- Utilisation agronomique de la fixation biologique de l'azote.
- Protection phytosanitaire des cultures.

• Environnement:
- Dépollution des sols après accumulation de produits toxiques.
- Compréhension des aspects microbiologiques de l'émission des gaz à effet de serre (CH4 et CO2). Mise au point de méthodes qui diminuent cette émission.
• Industrie:
- Biolixiviation.
- Isolement de microorganismes ayant des potentialités pour la production industrielle de molécules simples (par exemple acides acétique, citrique, lactique, etc...) et de molécules complexes (vitamines, hormones, antibiotiques, enzymes, acides aminés essentiels, etc...).
• Médecine
- Compréhension des mécanismes de conservation et de transport des souches pathogènes.
• Banques génétiques, collections de souches
- Le sol constitue une réserve de microorganismes pour les biotechnologies.

2. LES GRANDS GROUPES DE MICROORGANISMES DU SOL ET LEUR ROLE

Dans le sol, les microorganismes sont représentés par quelques métazoaires, des protozoaires, des algues microscopiques, des champignons, des bactéries, des actinomycètes, des cyanobactéries et des virus. Les bactéries, les cyanobactéries et les actinomycètes n'ont pas de noyau individualisé; leur information génétique est portée par une molécule cyclique d'acide désoxyribonucléique et des plasmides. Ces organismes sont appelés procaryotes, par opposition aux autres organismes possédant un noyau individualisé, les eucaryotes.
Différentes classifications ou différents groupements peuvent être utilisées pour présenter les microorganismes du sol. Toutefois une présentation fondée sur la taxonomie phylogénique n'est pas toujours adaptée à une discipline qui met l'accent sur les activités des organismes. En effet, la taxonomie phylogénique sépare de façon parfois très marquée des microorganismes ayant un comportement très voisin dans les sols. Un exemple caractéristique est celui des algues et des cyanobactéries qui se comportent tous deux en producteurs primaires photosynthétiques dans les sols et les eaux douces, mais qui sont classés dans deux domaines différents (**Fig 2.1**).

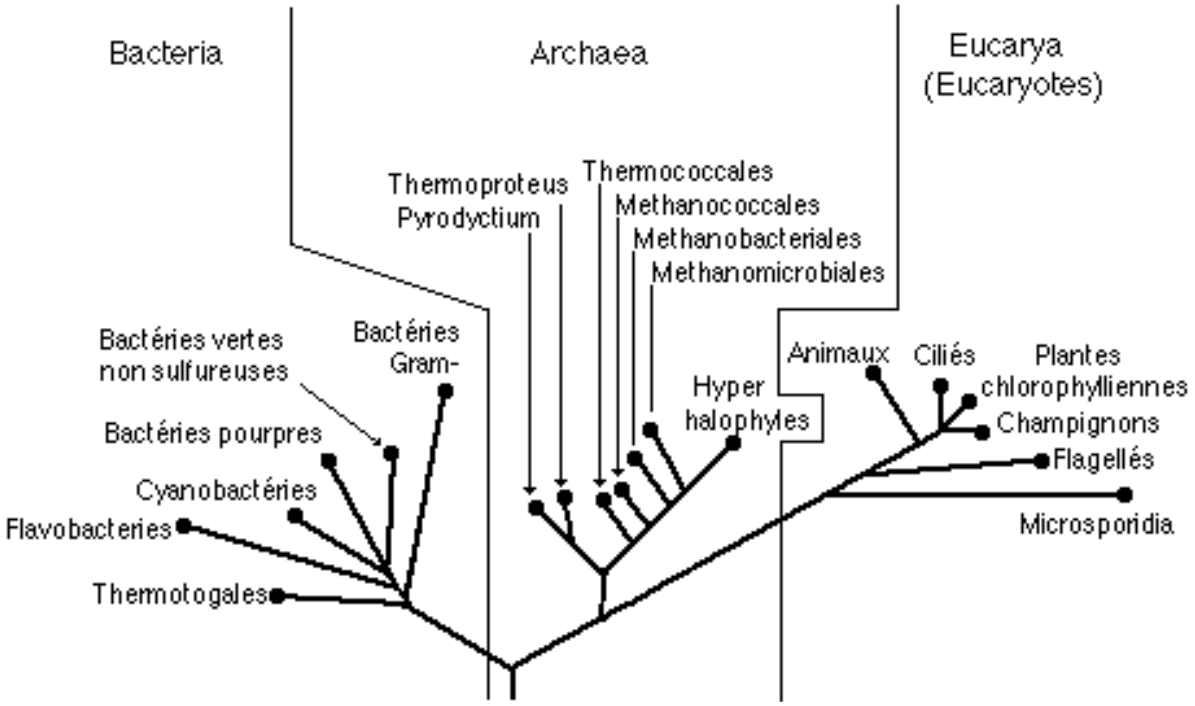


Figure 2. 1 Arbre phylogénique universel montrant l'existence des trois domaines: bacteria, archaea et eucarya. L'ordre de branchement, de la gauche vers la droite, et la longueur des branches sont basés sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S (d'après Woese et al. 1990)

Dans ce chapitre nous avons adopté une présentation des microorganismes qui est fondée sur des classifications traditionnelles et qui privilégie (1) les caractéristiques trophiques des organismes et (2) leurs activités. Les bactéries photosynthétiques productrices d'O2 (cyanobactéries) ou non, les bactéries non photosynthétiques au sens traditionnel du terme et les actinomycètes sont présentés sous trois titres séparés regroupés sous la rubrique des procaryotes (Tableau 2.1). Il convient de garder à l'esprit que cette présentation n'a été adoptée que pour des raisons de facilité et ne concorde absolument pas avec la taxonomie phylogénique récente des bactéries. Le but de ce chapitre est avant tout d'introduire les différents groupes de microorganismes et leurs activités principales dans les sols.

Tableau 2.1. Principaux taxons de microorganismes du sol (plan du chapitre)

Grands groupes	Taxons considérés comme importants dans le sol	Commentaires
Virus		
Procaryotes photosynthétiques	Cyanobactéries	Ex. Cyanophycées (algues)
	Bactéries pourpres et vertes	
Bactéries	Pseudomonales chimio-autotrophes	
	Pseudomonales chimio-hétérotrophes	
	Eubactériales	
	Protistes inférieurs	
Actinomycètes	Mycobactériacées	Les Actinomycètes sont des bactéries Gram + à structure végétative de type mycélien
	Actinomycétacées (ou Proactinomycètes)	
	Streptomycétacées	
	Actinoplanacées	
Champignons	Moisissures à plasmodium	
	Champignons à flagelle	
	Zygomycètes	
	Champignons supérieurs	
	Champignons imparfaits	
Algues	Algues vertes	
	Eugléniens	aussi dans les Protozoaires
	Algues jaunes, Diatomées	
Protozoaires	Amibes	
	Testacés	
	Flagellés	
	Ciliés	

2.1. VIRUS

Ce sont les plus petites entités vivantes. Ils ne peuvent se multiplier qu'à l'intérieur des cellules d'autres organismes vivants. Leur taille varie de 100 à 1000 Å. Ils sont formés uniquement d'une enveloppe protéique contenant un acide nucléique (ADN ou ARN). Chaque virus parasite un hôte spécifique.

Les virus vivants dans des microorganismes du sol parasitent des bactéries (bactériophages), des cyanobactéries (cyanophages), des actinomycètes (actinophages) et des champignons. L'importance écologique des virus est encore mal connue. En particulier on peut envisager leur implication dans des échanges génétiques.

2.2. PROCARYOTES

2.2.1. Procaryotes photosynthétiques

2.2.1.1. Les cyanobactéries

Les cyanobactéries sont des procaryotes photosynthétiques dont certains sont capables de fixer l'azote atmosphérique. Possédant un système photosynthétique producteur d'oxygène, elles ont été pendant longtemps classées dans les algues (algues bleu-vert, cyanophycées). Leur nature procaryotique les a fait reclasser dans les bactéries Gram négatives. Elles ont des formes structurales très diverses qui vont des organismes unicellulaires à des organismes pluricellulaires filamenteux présentant des ramifications de plusieurs types et formant des thalles.

Leur couleur est due à la présence de pigments (chlorophylle, carotènes, xanthophylles,

phycocyanine bleue et phycoérythrine rouge) et de mucilage. Elle varie du jaune sale au noir en passant par différentes teintes de bleu-vert ou de brun.

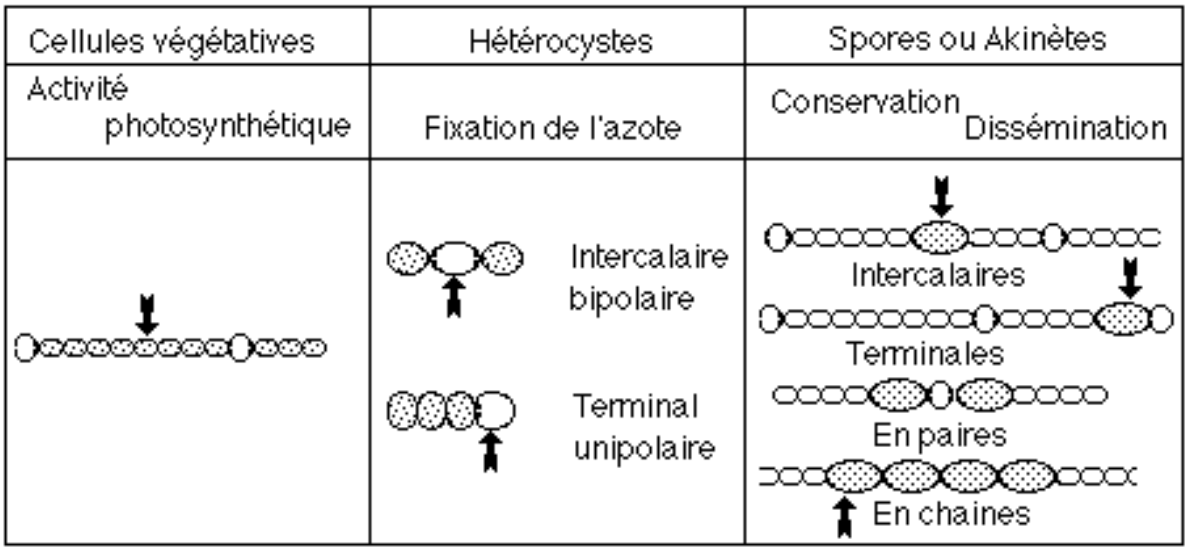


Figure 2. 2 Différents types de cellules chez les cyanobactéries et leur rôle

Chez les formes présentant le maximun de complexité on rencontre trois types de cellules (Fig. 2.2).

La cellule végétative est du type procaryote. Le plasma périphérique (chloroplasme) est habituellement plus fortement pigmenté que le centroplasme et contient des pigments qui sont concentrés dans des phycobilisomes situés sur la surface de lamelles photosynthétiques (thylakoïdes).

L'hétérocyste est une cellule à paroi épaisse, habituellement translucide, qui se rencontre chez certaines cyanobactéries (Hétérocystées). Il est le site de la fixation d'azote et se forme à partir des cellules végétatives en conditions limitantes d'azote. Il est caractérisé par la présence de nodules polaires aux points d'attache aux cellules végétatives.

Les spores ou akinètes sont produites chez les formes hétérocystées. Elles sont résistantes aux conditions adverses et demeurent viables sur de longues périodes. On les distingue par leur grande taille, leur forme, leur pigmentation modifiée et la présence de nombreux granules cytoplasmiques.

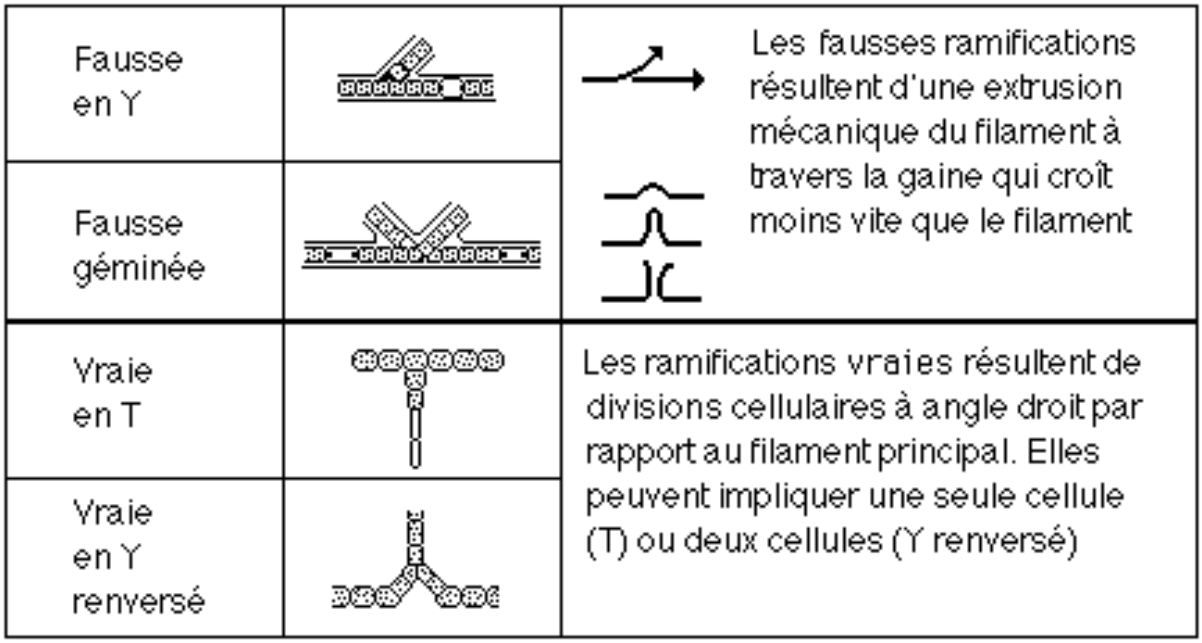


Figure 2. 3 Différents types de ramification chez les cyanobactéries

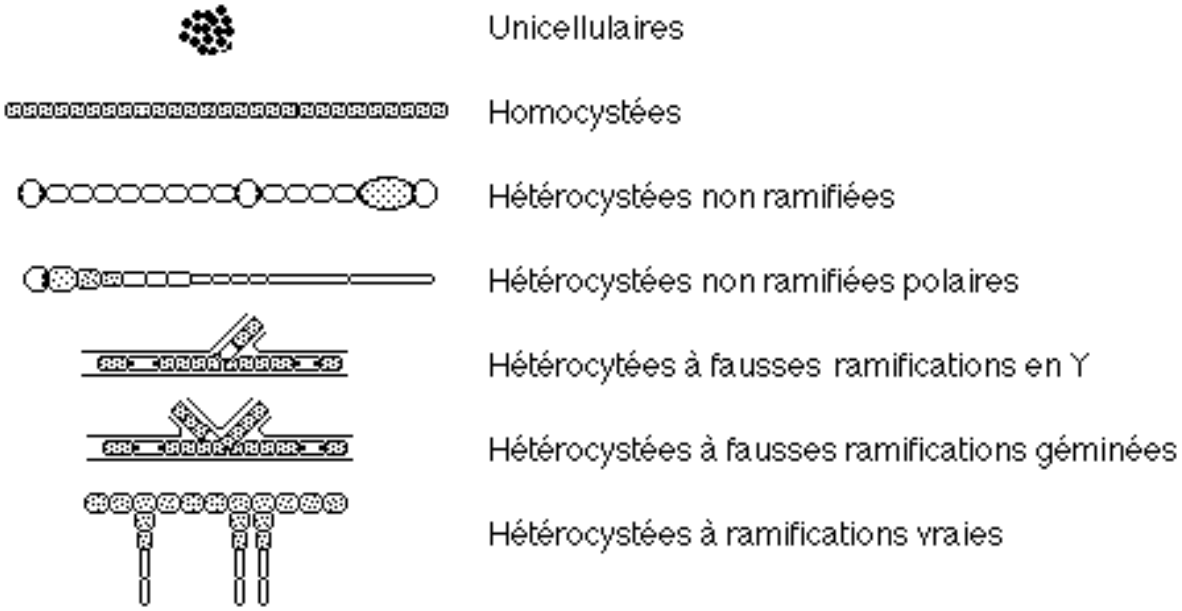


Figure 2. 4 Différents types morphologiques de cyanobactéries

La classification traditionnelle est fondée sur des caractères morphologiques (Fig. 2.4.):

• aspect de la croissance : unicellulaire, coloniale, filamenteuse

• aspect et forme de la colonie

• parmi les organismes filamenteux :

- ramification vraie ou fausse (Fig. 2.3.)
- différenciation cellulaire : hétérocystes et akinètes
- polarité : base et apex du filament
- gaine : absence ou présence ; épaisseur
- nature des fausse ramifications : simple ou double

• taille et forme des cellules, hétérocystes et akinètes.

Les cyanobactéries sont capables d'adopter différents modes de métabolisme carboné. La photosynthèse est leur principale méthode de nutrition (autotrophie), cependant, en présence de substrats organiques et de CO2, certaines espèces utilisent le carbone organique pour leurs synthèses cellulaires. Quelques espèces

peuvent croître à l'obscurité en hétérotrophie.
Les cyanobactéries utilisent l'azote minéral des nitrates, nitrites et sels ammoniacaux. L'azote nitrique est la source d'azote préférée dans la plupart des milieux de culture.
L'aptitude à la fixation de N2 (incorporation de l'azote atmosphérique comme source d'azote dans les cellules d'un organisme) se rencontre chez un grand nombre de cyanobactéries. Toutes les formes hétérocystées fixent l'azote, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose. Quelques formes nonhétérocystées (homocystées) filamenteuses fixent l'azote en anaérobiose. Certaines formes unicellulaires (*Aphanothece* et *Gloeothece*) sont également capables de fixer l'azote en aérobiose.
La fixation de N2 intervient seulement lorsqu'il y a une déficience en azote minéral. En particulier, la formation des hétérocystes est inhibée par des sources d'azote combiné telles que les nitrates ou l'ammonium.
En raison de leur caractère photosynthétique, les cyanobactéries (fixatrices de N2 ou non), sont des producteurs primaires. Dans les milieux fertiles, leur contribution, qui est faible par rapport à celle des Phanérogames, passe souvent inaperçue. Par contre dans les milieux extrêmes (pluviométrie réduite, températures élevées ou très basses, milieux hypersalés ....) elles constituent, avec les algues, le producteur primaire principal. Dans certaines conditions, elles peuvent se développer de façon explosive à la surface des sols ou dans les eaux douces (fleurs d'eau, manne de la bible...)
Comme les algues eucaryotes, les cyanobactéries fixatrices et non fixatrices de N2 contribuent, par la production de mucilage et l'action mécanique des formes filamenteuses, à améliorer la structure des sols pauvres, en particulier les sols sableux, et à les protéger de l'érosion par la formation de croûtes "algaires". Les cyanobactéries sont parmi les premiers organismes à coloniser les milieux abiotiques tels que les volcans nouvellement formés.
L'indépendance trophique des cyanobactéries fixatrices de N2 à l'égard de l'azote et du carbone, liée à une grande adaptabilité aux variations des facteurs de l'environnement, en fait des organismes ubiquistes dont le développement est freiné par une faible compétitivité en présence d'azote assimilable.
Elles ont un rôle important dans la conservation de la fertilité azotée de certains écosystèmes naturels (déserts, sols sableux ...) et cultivés (sols submergés recevant peu ou pas de fertilisation minérale...).

2.2.1.2. Les bactéries rouges et vertes

Ce sont des microorganismes qui tirent leur énergie de la lumière, possèdent des pigments spécifiques (bactériochlorophylles) et ne produisent pas d'oxygène (Tableau 2.2.).
Les bactéries rouges sont mobiles; elles se développent à la lumière en anaérobiose en utilisant le CO2 comme source de carbone et des composés minéraux réduits (H2S, H2) comme donneurs d'électrons. Elles peuvent aussi croître à l'obscurité en aérobiose en oxydant des composés organiques, et en utilisant du carbone combiné.
Les bactéries vertes sont immobiles et ne se développent qu'en anaérobiose à la lumière sur CO2. Les Chlorobactériacées (bactéries vertes) et les Thiorhodacées (rouges) en raison de leurs exigences écologiques particulières (anaérobiose + lumière) se rencontrent dans des milieux contenant des sulfures et riches en matière organique tels que les bassins de décantation, les saprobes, les eaux lacustres riches en matière organique, les litières végétales aquatiques et certains sols hydromorphes.

Elles ont un rôle important dans le cycle du soufre.
Les Athiorhodacées se rencontrent dans le même type de milieux mais ne requièrent pas de sulfures. Les environnements naturels favorables au développement des bactéries photosynthétiques sont caractérisés par la présence d'un horizon réduit affleurant la surface du sol.

Tableau 2.2. Principales caractéristiques des cyanobactéries et des bactéries photosynthétiques non productrices d'oxygène

	Cyanobactéries (ex Cyanophycées)	Chlorobactériacées (Bactéries sulfureuses vertes)	Bactéries rouges	
			Thiorhodacées (Bactéries pourpres sulfureuses)	Athiorhodacées (Bactéries pourpres non sulfureuses)
Habitat	Ubiquistes	Sols submergés Milieux saumâtres Saprobes	Sols submergés Milieux saumâtres Saprobes	Sols submergés Saprobes
Besoin en sulfures et composés organiques dans l'habitat	Les sulfures et les composés organiques ne sont pas nécessaires	Milieu renfermant des sulfures	Milieu renfermant des sulfures	Milieu renfermant des composés organiques
Besoin en O_2	Aérobies	Anaérobies	Anaérobies	Anaérobies et parfois aérobies facultatifs
Production d'O_2 photosynthétique	+	-	-	-
Type de chlorophylle	Chlorophylle a	Chlorophylle *"Chlorobium"*	Bactério-chlorophylle	
Présence de phycobiline	+	-	-	-
Fixation de N_2 chez	de nombreux genres	*Chlorobium*	*Chromatium*	*Rhodospirillum* *Rhodopseudomonas* *Rhodomicrobium*
Sulfo-oxydation	-	+	+	-

2.2.2. Bactéries non photosynthétiques

Les bactéries du sol ont une grande variété de formes. Elles peuvent être mobiles ou immobiles, et posséder ou non des formes de résistance (spores, kystes).
On utilise fréquemment une réaction colorée de la membrane (coloration de Gram) pour caractériser les espèces. Bien que certaines bactéries puissent avoir des colorations de Gram variables suivant leur état physiologique, cette coloration est toujours largement utilisée en taxonomie car les bactéries qui font visiblement partie d'un même sous-groupe, réagissent de la même façon.
Les caractères morphologiques tels que la forme des microorganismes, l'aptitude à former des spores, et la réaction de Gram ont été les premiers éléments de la taxonomie bactérienne.
Chez les bactéries sporulantes deux genres principaux, *Bacillus* et *Clostridium* sont abondants dans le sol. Le genre *Bacillus*, très hétérogène, comprend des espèces anaérobies facultatives ou aérobies, alors que les *Clostridium* sont tous des fermentaires anaérobies stricts. Ces deux genres sont Gram positif ou variable.
Les bactéries Gram positives non sporulantes comprennent trois groupes principaux:
• Les bactéries lactiques fermentaires, donc anaérobies facultatives.
• Les bactéries méthanogènes, anaérobies strictes, utilisent le CO2 comme accepteur final d'électrons et produisent du méthane.

• Les corynébactéries de forme très variable, intermédiaires entre les bactéries et le grand groupe des actinomycètes.

Parmi les bactéries Gram négatives hétérotrophes, de très nombreuses espèces peuvent utiliser une grande variété de composés organiques comme source de carbone et d'énergie. Ce groupe d'une grande importance agronomique, comprend les genres fixateurs d'azote *Pseudomonas, Azotobacter, Rhizobium,* etc...

Les Entérobactéries sont Gram négatives et anaérobies facultatives. Elles se développent en aérobiose sur un très grand nombre de substrats organiques, mais la fermentation anaérobie n'est possible qu'à partir de quelques sucres simples. Le représentant le plus connu de ce groupe est *Escherichia coli* qui a servi de matériel pour de nombreuses études de physiologie, biochimie et génétique. Certaines espèces d'*Enterobacter* et de *Klebsiella* sont fixatrices d'azote.

Nous présentons ci-après une classification simplifiée des bactéries non photosynthétiques du sol par Dommergues et Mangenot (1970) qui distinguent:

1. les Eubactéries subdivisées en deux ordres:

• Les Pseudomonadales: bâtonnets droits, courbes ou à forme hélicoïdale, habituellement avec des flagelles polaires à l'une ou aux deux extrémités, tous Gram négatifs.

Elles sont divisées en trois goupes:

- Les Pseudomonadales phototrophes (bactéries photosynthétiques) que nous traitons

séparément avec les cyanobactéries

- Les Pseudomonadales chimio-autotrophes (= chimio-lithotrophes) (Tableau 2.3)
- Les Pseudomonadales chimio-organotrophes (= chimio-hétérotrophes) (Tableau 2.4)

• Les Eubactériales: cellules sphériques ou en bâtonnets droits; lorsqu'elles sont mobiles, elles sont dotées de flagelles péritriches; pas de pigments photosynthétiques; prennent facilement les colorants d'aniline; ne sont pas acido-résistantes. Elles sont divisées en neuf familles (Tableau 2.5)

2. Les protistes inférieurs subdivisés en:

• Chlamydobactériales ou bactéries ferrugineuses filamenteuses.

• Beggiatoales ou bactéries sulfureuses filamenteuses.

• Myxobactériales mobiles par une sorte de reptation au contact des surfaces solides.

Les différents taxons/genres de bactéries sont très inégalement représentés dans les divers types pédologiques. Il convient de garder à l'esprit que les estimations d'abondance relative des différents taxons de bactéries sont obligatoirement biaisées par la plus ou moins grande facilité d'isolement et de culture des organismes *in vitro*.

Tableau 2.3 Pseudomonadales chimio-autotrophes (d'après Dommergues et Mangenot, 1970)

Familles	Principaux caractères distinctifs	Principaux genres vivant dans le sol
Nitrobactériacées	Bâtonnets; chimio-autotrophes tirant leur énergie de l'oxydation: de l'ammoniac en nitrite: bactéries nitrosantes du nitrite en nitrate: bactéries nitratantes	 *Nitrosomonas* *Nitrobacter*
Thiobactériacées	Bâtonnets droits; chimiolithotrophes tirant leur énergie de l'oxydation du soufre élémentaire ou de composés minéraux réduits du soufre	*Thiobacillus*
Méthanomonadacées	Bâtonnets droits; chimiolithotrophes tirant leur énergie de l'oxydation de: • H_2 • CO_2 • CH_4	 *Hydrogenomonas* *Carboxydomonas* *Methanomonas*
Caulobactériacées Sidérocapsacées	Bactéries appartenant au groupe des ferrobactéries et oxydant le fer ferreux en fer ferrique; parfois chimiolithotrophes obligatoires, plus souvent chimiolithotrophes facultatives et chimio-organotrophes	*Caulobacter* *Gallionella* *Siderophacus* *Siderocapsa* *Siderosphaera ...* *Siderobacter...*

Tableau 2.4. Classification des Pseudomonadales chimio-hétérotrophes(d'après Dommergues et Mangenot, 1970)

Familles	Principaux caractères distinctifs	Principaux genres vivant dans le sol
Pseudomonadacées	Bâtonnets droits; aérobies et produisant souvent des pigments hydrosolubles qui diffusent dans le milieu ou non hydrosolubles	*Pseudomonas* *Xanthomonas* *Acetobacter* *Azotomonas*
Spirillacées aérobies	Bâtonnets courbes ou en hélice, formant souvent des chaînettes. Forme en virgule Bâtonnets courbes, long, minces, cellulolytiques Bâtonnets courts, cellulolytiques	 *Vibrio* *Cellvibrio* *Cellfalcicula*
Spirillacées anaérobies	Bâtonnets courbes, anaérobies stricts tirant leur énergie du couplage de l'oxydation (incomplète) de substrats organiques et parfois de H_2 avec la réduction des sulfates en H_2S; Longues cellules hélicoïdales	*Desulfovibrio* *Spirillum*

Tableau 2.5 Classification des Eubactériales (d'aprés Dommergues et Mangenot, 1970)

Familles	**Principaux caractères distinctifs**	**Principaux genres vivant dans le sol**
Azotobactériacées	Gram négatifs; bactéries aérobies fixant l'azote moléculaire en présence de substrat carboné	*Azotobacter* *Beijerinckia* *Derxia*
Achromobactériacées	Bâtonnets Gram négatifs, à faible pouvoir fermentaire vis-àvis des hydrates de carbone • ne produisant pas de pigment	*Achromobacter* *Flavobacterium*

	• produisant des pigments jaunes ou orange	
Entérobactériacées	Bâtonnets Gram négatifs, aérobies ou anaérobies facultatifs, fermentant activement les hydrates de carbone	*Escherichia* *Proteus* *Aerobacter* *Serratia*
Micrococcacées	Cocci sphériques Gram positifs • cellules en paquets irréguliers ou en tétrades produisant quelquefois des pigments jaunes, orange ou rouges • cellules en paquets cubiques (division dans trois plans perpendiculaires)	*Micrococcus* *Sarcina*
Brévibactériacées	Bâtonnets Gram positifs, quelquefois morphologie coccoïde ou filamenteuse souvent pigmentés; aérobies ou anaérobies facultatifs	*Brevibacterium*
Lactobacillacées	Gram positifs; effectuant une fermentation lactique des sucres; microaérophiles ou anaérobies • cocci en chaînettes (division dans un seul plan) • bâtonnets droits et minces	*Steptococcus* *Leuconostoc* *Lactobacillus*
Corynébactériacées	Bâtonnets Gram positifs à morphologie irrégulière; cellules souvent disposées en rangées parallèles ou apposées en V en raison d'un type de division particulier, surtout aérobies ; pouvoir fermentaire souvent médiocre; présentant une certaine parenté avec les Mycobactériacées.	*Corynebacterium* *Cellulomonas* *Arthrobacter*
Bacillacées	Principale famille formant des endospores, gros bâtonnets droits Gram positifs; souvent mobiles • aérobies, spores ovales dont le diamètre est inférieur à celui de la cellule végétative *(B. megaterium; B. cereus; B. subfilis; B. Licheniformis)* ou supérieur *(B. macerans, B. polymyxa) ou* spores sphériques *(B. pasteurii*) • anaérobies stricts, cellules en général déformées par la spore qui peut être terminale ou subterminale, sphérique ou ovale; de nombreuses espèces fixent l'azote atmosphérique.	*Bacillus* *Clostridium*

2.2.3. Actinomycètes

Souvent décrits comme un groupe distinct par les microbiologistes du sol, les actinomycètes sont en fait des Eubactéries Gram positives à structure végétative de type mycélien (Fig. 2.5). Les actinomycètes présentent des similitudes

avec les Eubactéries et les Champignons et il existe des formes de transition entre les formes mycéliennes typiques et les formes unicellulaires présentant une aptitude peu marquée à former un mycélium ramifié. Le diamètre des filaments des formes mycéliennes est toutefois environ deux fois plus faible (0,5 à 1,2 μm) que celui des mycélia de champignons.

Les Actinomycètes se rapprochent morphologiquement des champignons par :

• la formation de mycélium, souvent aérien, et de conidies;

• l'absence en culture de la turbidité caractéristique des bactéries et la formation d'amas de cellules;

• un taux de croissance généralement cubique (f [x3]) et non exponentiel comme chez les Bactéries.

Toutefois les analogies entre les Champignons et les Actinomycètes sont en fait une convergence de forme plutôt que d'une parenté génétique en raison de la structure procaryote des Actinomycètes alors que les Champignons ont une structure eucaryote.

2.2.3.1. Taxonomie des Actinomycetes

Stanier (1966) subdivise les Actinomycètes en quatre familles (Tableau 2.6):

2.2.3.1. 1. Mycobactériacées

Ce sont les Actinomycètes dont la morphologie est la plus voisine de celle des bactéries: le mycélium qu'ils forment en début de développement se rompt rapidement pour libérer des bâtonnets ramifiés ou irréguliers. Les Mycobactériacées présentent des affinités marquées avec les Corynébactériacées et les bactéries lactiques. Ils se différencient des autres Bactéries et Actinomycètes, à l'exception de certains *Nocardia*, par leur acido-résistance. Cette famille est représentée par le seul genre *Mycobacterium*, qui comprend des espèces pathogènes, dont la plus connue est *M. tuberculosis*, agent de la tuberculose. Les espèces du sol joueraient un rôle actif dans la dégradation des protéines, des hydrates de carbone, des acides organiques et des alcools.

2.2.3.1.2. Actinomycétacées (ou Proactinomycètes)

Cette famille représentée par les genres *Nocardia* et *Actinomyces* (Tableau 2.6.) occupe une position intermédiaire entre les Mycobactériacées, caractérisées par une structure bactérienne et les Streptomycétacées, caractérisées par une structure pseudo-mycélienne. Elle diffère des Mycobactériacées par sa croissance presque entièrement mycélienne avec toutefois une tendance variable à la segmentation. Elle diffère des Streptomycétacées par l'absence de conidies.

Le genre *Nocardia* comprend de nombreuses espèces du sol. Le genre *Actinomyces*, constitué d'espèces anaérobies ou micro-aérophiles parasites, ne présente pas d'intérêt en microbiologie du sol.

Tableau 2.6. Principaux genres d'actinomycètes (d'après Stanier et al. 1966)

Familles	Développement mycélien	Mode de reproduction	Acido-résistance	Autres caractéristiques	Genres
Mycobactériacées	Transitoire limité	Scission binaire	+		*Myco-bacterium*
Actinomycétacées (Proactinomycètes) (Nocardioformes)	Extensif	Fragmentation massive des hyphes	+ -	Aérobies	*Nocardia*
	Extensif	Fragmentation massive des hyphes	-	Anaérobies	*Actinomyces*
Steptomycétacées	Extensif	Conidies	-	Conidies en chaînettes	*Steptomyces*
	Extensif	Conidies	-	Conidies isolées ou en groupes	*Micro-monospora*
Actinoplanacées	Extensif	Sporangiophores mobiles	-	Fomation de sporanges	*Actinoplanes*

Tableau 2.7. Caractéristiques principales de genres d'Actinomycètes fréquents dans les sols

Nocardia	Filaments qui se fragmentent rapidement en unités bactériformes. Les filaments se développent rarement au-dessus du milieu. Les spores sont rarement produites.
Thermoactinomyces	Spores uniques formées sur des filaments dans et au-dessus du milieu. Spores thermorésistantes. Espèces thermophiles.
Streptomyces	Longues chaînes de spores formées sur des filaments qui se développent au dessus du milieu de culture. De nombreuses espèces produisent des antibiotiques.
Streptosporangium	Spores formées dans des sporanges ou en chaines sur les filaments au-dessus du milieu. Colonies morphologiquement semblables aux *Steptomyces*.
Micromonospora	Les filaments ne se développent pas au dessus du milieu. Spores uniques produites dans ou à la surface du milieu. Croissance lente.

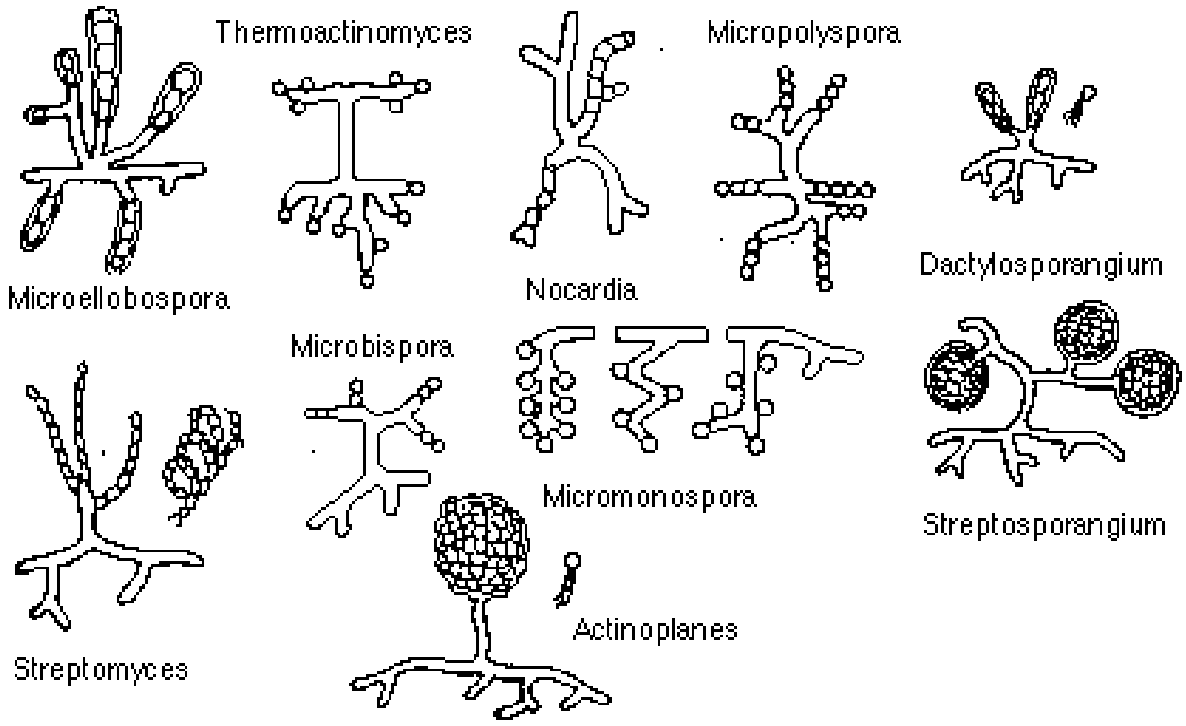


Figure 2. 5 Principaux groupes d'actinomycètes (d'après Lechevalier et Pramer, 1971)

2.2.3.1.4. Actinoplanacées

Les espèces appartenant à cette famille ont un cycle qui présente un stade mobile (sporangiospores mobiles). Le genre *Actinoplanes* est aquatique.

2.2.3.2. Rôle des Actinomycètes dans le sol

Dans le sol, la densité des Actinomycètes, essentiellement représentés par les genres *Nocardia* et *Streptomyces* (Tableau 2.7.), est en général 3 à 15 fois plus faible que celle des Bactéries et varie entre 105 et 108 unités par g de sol. Leur densité augmente dans les sols alcalins et décroît dans les sols submergés. Les besoins énergétiques et alimentaires limités des Actinomycètes expliquent leur ubiquité: ils sont présents sous tous les climats, sur tous les types de résidus. Leur rôle dans le sol est important en raison de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries, et à produire des substances probiotiques, antibiotiques ou toxiques.

Les premiers stades de la dégradation de la matière organique fraîche sont le fait de bactéries et de champignons. Les Actinomycètes ne se développent pas durant ces premiers stades en raison de leur inaptitude à la compétition: par contre, ils se développent relativement bien sur une matière organique partiellement dégradée et inapte à porter une microflore fongique et bactérienne. En raison de leur aptitude à dégrader la chitine, de très nombreux Actinomycètes sont capables de décomposer les membranes des Champignons et peuvent ainsi poursuivre la dégradation de la matière organique entreprise par la microflore fongique.

Les Actinomycètes pourraient aussi intervenir dans les processus d'humification en produisant des composés proches des acides humiques. *Streptomyces* peut synthétiser à partir de l'amidon des substances complexes à noyau aromatique, douées, comme les substances humiques, d'une capacité d'échange et constituant des précurseurs des acides humiques et fulviques.

Les substances probiotiques produites par les Actinomycètes comprennent entre autres les

vitamines Bl, B2, B6, B12, la biotine et l'acide folique. Cinquante à soixante-quinze pour cent des souches d'Actinomycètes sont productrices d'antibiotiques (streptomycine, chlortétracycline, oxytétracycline, cycloheximide ...) qui affectent les interrelations entre microorganismes. Certaines espèces synthétiseraient des substances toxiques pour les plantes ou au contraire, stimuleraient leur croissance.

Frankia est un actinomycète symbiotique qui forme des nodules fixateurs d'azote (nodules
actinorhiziens) avec un certain nombre d'arbres qui ont un intérêt économique en particulier pour le reboisement de sols peu fertiles (Casuarinacées).

2.3. CHAMPIGNONS

Microorganismes non photosynthétiques, les champignons regroupent une grande variété d'organismes eucaryotes qui sont divisés en sous-groupes en fonction de critères morphologiques. Les champignons forment généralement des filaments fins ou hyphes qui peuvent être cloisonnés ou non et sont communément polynucléés. L'ensemble des hyphes forme le mycelium (ou thalle). La partie visible des champignons supérieurs (le carpophore ou "champignon" au sens culinaire du terme) ne constitue qu'une très faible partie du mycélium présent dans le sol. Les estimations de biomasse fungique dans les horizons organiques de surface des sols exondés sont de 30 à 60 mètres d'hyphes par gramme de sol, soit des valeurs d'au moins une tonne par hectare. Les champignons peuvent être subdivisés en cinq grands groupes:

2.3.1. Moisissures à plasmodium

2.3.1.1. Acrasiomycètes

Ce sont les formes cellulaires des moisissures à plasmodium. Les unités sont constituées de
formes amoebiennes uninucléées qui s'agglomèrent pour former un plasmodium dans lequel les cellules ne sont pas attachées les unes aux autres mais se comportent comme une structure mobile unique. Le plasmodium peut se transformer en sporocarpe qui porte des spores asexuées. Parmi les huit genres connus, *Dictylostelum* est facilement isolé du sol et est le genre le plus étudié. Les Acrasiomycètes se développent sur la matière organique en décomposition dans les environnements humides et se nourrissent par ingestion de bactéries.

2.3.1.2. Myxomycètes

Ce sont des moisissures à plasmodium *sensu stricto*. Elles forment un plasmodium rampant acellulaire. Ce sont des organismes qui se rapprochent du règne animal en raison de la formation d'un plasmode et de leur mode alimentaire (ingestion de bactéries) et des champignons par leurs structures reproductives et la formation de spores. Les Myxomycètes sont largement répandus dans les sols. Ils se développent sur la végétation en décomposition dans les environnements humides et frais. Certains se développent dans les prés et sur les déjections animales. Certains plasmodes peuvent atteindre des tailles de l'ordre de 50 cm de diamètre. Le genre *Physarum* qui contient plus de 100 espèces a donné lieu à de nombreuses études sur la morphologie et la physiologie des champignons.

2.3.2. Champignons flagellés

Se rencontrent dans les sols et les eaux. De nombreuses formes sont des phytoparasites. Ils produisent des spores mobiles asexuées appelées zoospores.

2.3.2.1. Oomycètes

Des spores biflagellées sont produites dans un sporange. De nombreuses espèces sont

parasites des végétaux: *Pithium* (*P. debarianum*: parasite des semences), *Plasmospora* (*P. viticola*: mildiou de la vigne), *Phytophtora* (*P. infestans*: moisissure de la pomme de terre). Le genre *Saprolegna* appartient au sous-groupe des moisissures des eaux.

2.3.2.2. Chytridomycètes

Produisent des spores uniflagellées mobiles. Se développent pricipalement dans les eaux mais se rencontrent aussi dans les sols. Les genres communs dans les sols sont *Allomyces* et *Rhizophydium*.

2.3.3. Zygomycètes

Ils sont capables de fermenter divers carbohydrates. Ils produisent généralement un mycélium d'hyphes coenocytiques, des sporangiophores asexués (Fig. 2.6.), et des zygospores dormantes à paroi épaisse.

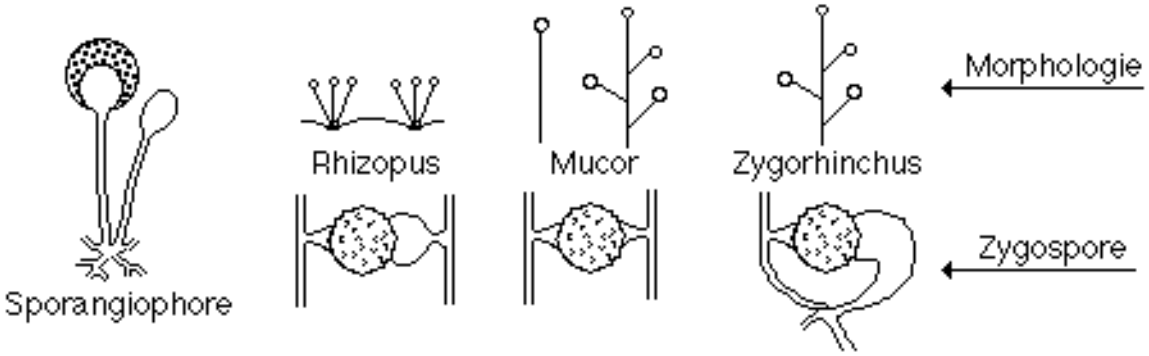


Figure 2. 6 Morphologie, sporangiophore et zygospores de zygomycètes fréquemment isolés du sol

Le groupe est principalement saprophytique, toutefois il comporte également des phytoparasites et des espèces d'intérêt alimentaire ou industriel (production d'alcools et d'acides organiques tels que l'acide lactique, citrique, ou oxalique). Certaines espèces restent sous la forme levure en anaérobiose ou en aérobiose en présence de fortes concentrations de glucose (> 5%) (*Rhizopus nigricans*: levure de boulanger).

2.3.4. Champignons supérieurs

2.3.4.1. Ascomycètes

Ils constituent le groupe le plus nombreux. Ils se reproduisent par des ascospores groupées par 8 dans une cellule, l'asque. (Fig. 2.7). Celle-ci provient d'un zygote, c'est-à-dire d'un oeuf formé par la réunion de 2 filaments de "type" opposé. De nombreuses espèces produisent également des conidies, petites spores asexuées se formant à l'extrémité de certains filaments.
De nombreuses espèces sont saprophytes. La majeure partie du mycelium se développe dans le sol et produit des fructifications à la surface du sol.

Parmi les ascomycètes on rencontre les levures capables de produire des asques, les morilles et les truffes, les champignons en forme de coupe du type pezzizes.
Les ascomycètes comportent de nombreux phytoparasites causant des moisissures des racines, des tiges et des fruits. L'ergot du seigle (*Claviceps purpurea*) qui produit des alcaloïdes toxiques pour l'homme et les animaux appartient à ce groupe ainsi que les levures fermentaires utilisées pour la fabrication du vin, de la bière et du pain.

2.3.4.2. Basidiomycètes

La fructification forme ce qui est appelé communément un champignon, avec pied et chapeau.

Les spores (basidiospores), sont groupées par 4 à l'extrémité de cellules spécialisées, les basides (Fig.2.7.).

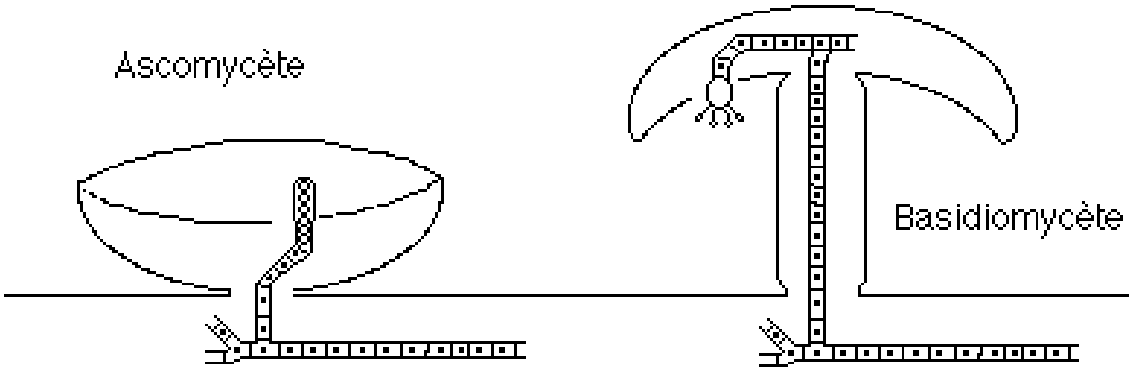


Figure 2. 7 Représentation schématique des carpophores d'ascomycètes et de basidiomycètes

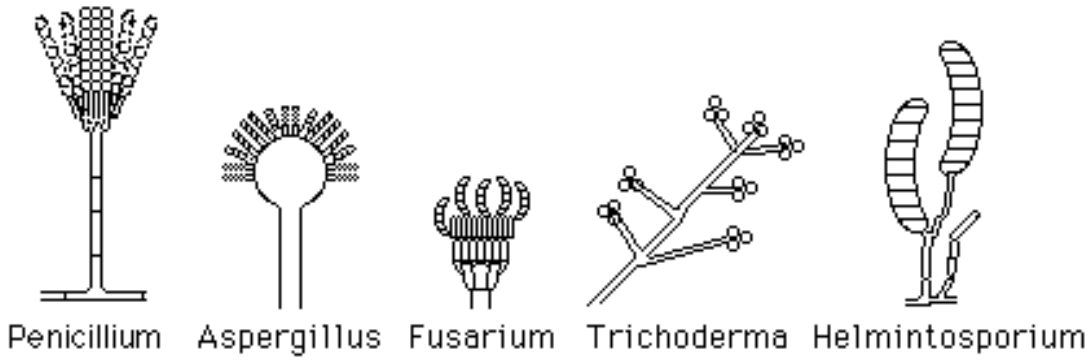


Figure 2. 8 Conidiophores de Deutéromycètes (Champignons imparfaits)

2.3.5. Champignons imparfaits (Fungi imperfecti, Deutéromycètes)

Quand on ne connaît pas la forme de reproduction sexuée d'un champignon, il est placé dans le groupe des champignons imparfaits; mais il se peut que cette reproduction sexuée soit observée par la suite, l'espèce étant alors déplacée dans le groupe qui convient. Deux catégories sont fréquemment isolées des sols:

Les Deutéromycètes *sensu stricto* sont des formes caractérisées par un mycélium cloisonné septé et se reproduisent par des conidies (spores asexuées) portées par des conidiophores caractéristiques des genres (Fig. 2.8).

Les "Mycelia sterilia" ne forment pas de conidies et se reproduisent par fragmentation des hyphes.

2.3.6. Rôle des champignons dans les sols

Les champignons constituent les agents principaux de la décomposition de la matière organique dans les sols exondés. Leur rôle dans le cycle de l'azote est peu spectaculaire. Leur rôle essentiel est la minéralisation du carbone organique. Les champignons possèdent à un degré parfois très élevé l'aptitude à dégrader de grandes quantités de matière organique en se contentant de faibles quantités d'azote. Ceci est, en particulier, le cas des moisissures du bois. Ces caractéristiques

expliquent la prépondérance des champignons dans les sols pauvres et dans les débris végétaux de plantes âgées ou le rapport C/N est très élevé.

Sur le plan écologique on peut distinguer deux groupes: les champignons du sol et les champignons des racines (Tableau 2.8). Les premiers sont caractérisés par leur aptitude à se développer aux dépens de débris organiques sans passer par une phase symbiotique ou parasite. Cette phase est nécessaire pour les champignons des racines dont la faible compétitivité leur permet d'attaquer uniquement des hôtes vivants ou sénescents dans des conditions de compétition réduite.

Tableau 2. 8. Champignons du sol et des racines

Saprophytes obligatoires (se nourissent de cadavres animaux ou végétaux ou de l'humus)		Champignons du sol
Champignons susceptibles de s'associer aux racines	Parasites facultatifs polyphages (sur débris ou racines vivantes)	
	Parasites spécifiques (sur racines vivantes et mortes)	Champignons des racines
	Symbiontes mycorrhiziens	

2.4. ALGUES

2.4.1. Taxonomie

Cet ensemble regroupe des formes extrêmement variées de tailles diverses, depuis les organismes unicellulaires microscopiques jusqu'aux algues marines qui peuvent atteindre 30 m de long.

Ce sont les plus simples des eucaryotes chlorophylliens (Fig 2.9). Leur classification est fondée sur la composition des pigments et de la paroi cellulaire (Tableau 2.9) Les formes terrestres sont essentiellement des Chlorophycées, Euglénophycées (aussi considérées comme des protozoaires), et des Chrysophycées (Diatomées). Les cyanobactéries (ex algues bleues ou Cyanophycées) sont désormais classées avec les bactéries mais leur comportement dans les sols et les eaux est similaire à celui des algues eucaryotes unicellulaires et filamenteuses.

2.4.2. Rôle dans les sols

Les algues, en raison de leur caractère photosynthétique, ont une signification différente des autres microorganismes du sol. Alors que les bactéries et champignons sont principalement des agents de décomposition et de minéralisation, les algues sont des producteurs primaires. Dans les milieux fertiles, leur contribution, qui est faible par rapport à celle des Phanérogames, passe souvent inaperçue.

Par contre dans les milieux extrêmes (pluviométrie réduite, températures élevées ou très basses, milieux hypersalés ....) elles constituent le producteur primaire principal.

Les algues unicellulaires et filamenteuses ont un rôle important comme producteur primaire dans les sols désertiques (en valeur relative) et les sols submergés (en valeur absolue). Par les mucilages qu'elles produisent et par l'action mécanique des filaments, elles ont un rôle important dans l'amélioration de la structure des sols exondés dont elles augmentent l'agrégation. Elles protègent les environnements arides ou désertiques contre l'érosion en formant des croûtes à la surface du sol.

Les algues macrophytiques sortent du domaine de la microbiologie, mais certaines (*Chara, Nitella, Hydrodyction* ...) jouent un rôle important dans la biologie des sols inondés et en particulier des rizières.

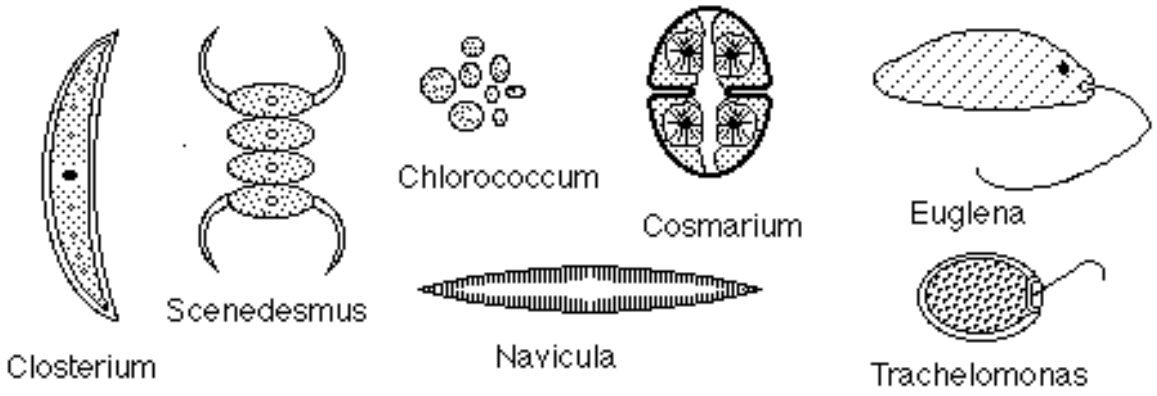


Figure 2. 9 Morphologie de quelques algues communes dans les sols

Tableau 2.9. Caractéristiques principales des divisions d'algues

Division	Pigments et organisation des plastides	Paroi cellulaire	Habitat
Chlorophycophyta (Algues vertes)	Chlorophylle a et b; α,β,γ carotène; plusieurs xanthophylles; 2 à 5 thylakoïdes/pile	Cellulose [β- (1->4)-glucopyranoside]; glycosides d'hydroxyproline; xylanes, mannanes; paroi calcifiée ou absente chez qq. espèces	Dulçaquicole Saumâtre Marin **Terrestre***
Charophyta	Chlorophylle a et b; α,β,γ carotène; plusieurs xanthophylles; thylakoïdes associés de façon variable	Cellulose [β- (1->4)-glucopyranoside]; calcifié chez qq. espèces	Dulçaquicole Saumâtr
Euglenophycophyta	Chlorophylle a et b; γ carotène; plusieurs xanthophylles; 2 à 6 thylakoïdes/pile quelquefois plus	Absente	Dulçaquicole Saumâtre Marin **Terrestre**
Phaephycophyta (Algues brunes)	Chlorophylle a et c; β carotène; fucoxanthine et autres xanthophylles; 2 à 6 thylakoïdes/pile	Cellulose, acide alginique et mucopolysaccharides sulfatés (fucoïdan)	Dulçaquicole (+)** Saumâtre (+++) Marin (+++)
Chrysophycophyta (algues jaunes) Comprennent les diatomées	Chlorophylle a et c; α,β,ε carotène; plusieurs xanthophylles dont la fucoxanthine chez les Chryso-, Bacillario- et Prymnesio-phyceae; 3 thylakoïdes/pile	Cellulose, silice, carbonate de calcium, substances mucilagineuses; chitine ou absente chez qq. espèces	Dulçaquicole Saumâtre Marin **Terrestre**
Pyrrhophycophyta	Chlorophylle a et c;	Cellulose;	Dulçaquicole

(Dinoflagellées)	β carotène; plusieurs xanthophylles; 3 thylakoïdes/pile	substances mucilagineuses; absente	Saumâtre Marin
Cryptophycophyta (Cryptomonades)	Chlorophylle a et c; β et ε carotène; xanthophylles caractéristiques (allo- , croco- et monadoxanthin); Phycobilines; 2 thylakoïdes/pile	Absente	Dulçaquicole Saumâtre Marin
Rhodophycophyta (Algues rouges)	Chlorophylle a et d; α et β carotène; Phyco- et Allophyco-cyanine; R et B phycoerythrine; plusieurs xanthophylles; thylakoïdes simples	Cellulose; xylane; polysaccharides sulfatés (galactanes); calcifiée chez qq. espèces	Dulçaquicole (+) Saumâtre (+++)

* Noter que les formes telluriques correspondent seulement à trois des huit divisions d'algues.
** + peu fréquent; +++ fréquent

2.5. PROTOZOAIRES

Ce sont des Protistes eucaryotes, unicellulaires, photosynthétiques ou non, mobiles ou immobiles, libres ou parasites, d'une grande variété de formes structurales et de modes de nutrition. Plus de 30.000 espèces vivantes et fossiles ont été décrites.

Les Protozoaires non parasites ont besoin d'un environnement aqueux pour manifester une activité métabolique. Considérés comme des organismes aquatiques, ils se développent toutefois parfaitement dans les sols hydromorphes et dans des sols exondés. Ce sont des constituants normaux et cosmopolites de la microflore tellurique. On a démontré la présence de Rhizopodes testacés dans des sols sahariens en présence de végétaux et dans divers lithosols très secs où ils peuvent résister à la dessiccation grâce à l'enkystement. La taille des protozoaires varie de quelques microns à plusieurs centimètres et est généralement plus faible dans le sol que dans l'eau. Cette réduction de taille résulterait de ce que les protozoaires telluriques doivent se mouvoir dans le mince film d'eau qui tapisse les pores du sol, alors que les formes aquatiques disposent d'un espace non limité.

Les protozoaires ont longtemps été classés dans le règne animal en raison de leur mobilité et de leur absence de pouvoir photosynthétique. Ce sont, en fait, des Protistes eucaryotes au même titre que les Champignons ou les Algues. Bien qu'à l'exception des Phytomastigophora (*Euglena*), les protozoaires soient dépourvus de chlorophylle, ils présentent des affinités certaines avec les algues, dont ils auraient pu évolutivement dériver en perdant leurs chloroplastes.

Leur cycle comporte une phase d'activité, pendant laquelle ils se déplacent, se nourrissent et se reproduisent; et une phase d'enkystement inactive. L'enkystement résulte de la sécrétion par la cellule d'une enveloppe épaisse qui la protège contre les facteurs de l'environnement quand ils deviennent défavorables: chaleur, dessiccation etc. Les kystes constituent un organe de protection et de dissémination des protozoaires des sols.

2.5.1. Taxonomie des protozoaires

On divise les Protozoaires en quatre classes dont trois présentes dans les sols (Tableau 2.10):

• Les Sarcodina ou Rhizopodes (Amibes et Testacés): forment des pseudopodes à l'état adulte.

• Les Mastigophora ou Flagellés: se déplacent à l'aide de flagelles mais peuvent aussi, chez certaines espèces, présenter des mouvements amiboïdes.

• Les Sporozora ou Sporozoaires: exclusivement parasites et sans intérêt en biologie du sol.

• Les Ciliophora ou Ciliés: se déplaçent à l'aide d'organites contractiles très courts (cils) et possèdent deux types de noyaux (macronucleus et micronucleus).

En fonction leur mode de nutrition, les Protozoaires peuvent se classer en trois groupes:

• Les protozoaires photosynthétiques: ce sont les Phytomastigophora dotés de pigments chlorophylliens diffus ou localisés, rattachés souvent aux Algues. *Euglena* est le genre le plus répandu. L'importance écologique de ce groupe est limitée dans les sols exondés mais significative dans les sols de rizière.

• Les protozoaires saprophytes: ce groupe renferme surtout des Flagellés et quelques Ciliés qui se nourrissent de substances organiques solubles diffusant à travers le protoplasme.

• Les protozoaires holozoïques: ce groupe comprend une grande partie des Protozoaires du sol et surtout des Ciliés. La nutrition se fait par ingestion de particules solides et notamment de microorganismes. La plupart des Protozoaires du sol peuvent se nourrir de bactéries: toutefois les bactéries présentent une valeur nutritive variable et certaines produisent des substances toxiques, en particulier des polysaccharides extracellulaires, qui les protègeraient de la prédation par les Protozoaires. Les Actinomycètes ne semblent pas constituer des aliments valables pour les Protozoaires, à l'exception de certaines souches de *Nocardia* et *Mycobacterium*. Certains Actinomycètes produisent des antibiotiques actifs contre les Protozoaires (chloromycétine. néomycine, actidione, etc.). Les hyphes de Champignons ne sont pas utilisées par les Amibes: les spores peuvent être ingérées mais sont rarement digérées. Par contre les levures telluriques, dont la densité peut atteindre de 50 000 à 500 000 unités g-1 de sol, pourraient parfois constituer un apport nutritif non négligeable pour les Protozoaires.

2.5.2. Distribution et densité dans les sols

La distribution des Protozoaires dans le sol est généralement corrélée avec celle des bactéries qui constituent la base de leur alimentation. Ils sont généralement plus abondants dans l'horizon de surface où ils trouvent une nourriture bactérienne plus abondante et une meilleure aération. Leur distribution présente de grandes variations dans les sols. Il existe des espèces acido-, neutro- et basi-philes. La stimulation des populations bactériennes dans la rhizosphère se traduit par une multiplication des Protozoaires. Par contre, lorsque l'effet rhizosphérique favorise électivement les Champignons ou les Actinomycètes, il y a au contraire régression des Protozoaires.

Suivant les groupes, la densité des Protozoaires varie de 103 à 105 g-1 de sol. Les biomasses correspondantes, difficiles à estimer, seraient de l'ordre de la centaine de kg ha-1 pour les amibes et de la dizaine de kg ha-1 pour les Rhizopodes testacés.

2.5.3. Rôle dans le sol

Le rôle des Protozoaires dans le sol est encore mal compris. Les prédateurs jouent un rôle certain dans l'équilibre biologique des sols puisqu'ils consomment de très grandes quantités de bactéries: un Rhizopode utilise environ 40000 bactéries par division cellulaire (Alexander, 1961). Mais on ignore encore actuellement les conséquences de cette consommation importante de bactéries. La comparaison d'un sol stérile ensemencé soit avec une bactérie, soit avec une bactérie et un protozoaire, montre qu'en présence du protozoaire, la densité bactérienne diminue au bout de quelques jours. Ce type d'expérience amènerait à conclure à une diminution de l'activité bactérienne par les protozoaires et éventuellement à une diminution possible de la fertilité des sols. Cette interprétation est contredite par des expériences mettant en évidence la stimulation d'activités bactériennes (ammonification, fixation d'azote) sous l'effet de Protozoaires prédateurs. On admet que la destruction d'une partie de la flore bactérienne stimule, en définitive, son activité biochimique, les explications avancées étant le rajeunissement des micropopulations, l'accélération du turn-over bactérien et de la synthèse par les Protozoaires de substances favorables à l'activité bactérienne.

Les Protozoaires peuvent se développer dans la rhizosphère de nombreuses plantes où ils pourraient jouer (1) un rôle indirect en ralentissant la prolifération des bactéries ou en stimulant leur activité, (2) un rôle direct en synthétisant des substances exerçant une action sur le développement des plantes supérieures.

Leur contribution à la dégradation ou la synthèse de la matière organique dans le sol est très mal connue. Cet aspect est vraisemblablement bien moins important que leur activité prédatrice.

Tableau 2. 10. Classification et densité des protozoaires du sol (d'après Dommergues et Mangenot, 1970)

Sarcodina (Rhizopodes)	Protozoaires les plus simples, se déplaçant au moyen de pseudopodes Deux groupes suivant la présence ou non d'un test dur recouvrant la cellule	Rhizopodes amibiens. Ne possèdent pas de test. (10^3 à 10^5 g^{-1} de sol)	*Naegleria* *Hartmanella* *Lecythium* *Nuclearia*
		Rhizopodes testacés. Test présent (10^3 à 10^4 g^{-1} de sol)	*Diffuglia* *Trinema* *Euglypha* *Centropyxis*
Mastigiphora (Flagellés) (10^3 à 10^5 g^{-1} de sol)	Protozoaires pourvus de flagelles. Nombreuses espèces dotées de pseudopodes. Deux groupes suivant l'absence ou la présence de chlorophylle	Photomastigophora Photosynthétiques (algues?)	*Eugléna* *Clamydomonas*
		Zoomastigophora Non photosynthétiques	*Heteromitra* *Allantion* *Oikomonas* *Scytomonas* *Cercomonas* *Bodo* *Tetramitrus* *Cercobodo*
Ciliophora (Ciliés) (10^3 g^{-1} de sol)	Protozoaires les plus spécialisés; dotés de cils pendant la phase adulte; organisation nucléaire particulière caractérisée par la présence de deux noyaux.		*Colpoda* *Oxytrichia* *Gonostomum* *Pleurotrichia* *Balantiophorus* *Enchelis*

2.6. LES GRANDS GROUPES NUTRITIONNELS MICROBIENS

Pour rendre compte de la variété des métabolismes microbiens, il est nécessaire de considérer au moins deux caractères: la nature de la source d'énergie et de la principale source de carbone.

On différencie deux principales sources d'énergie: la lumière chez les phototrophes et l'énergie chimique chez les chimiotrophes. La combinaison des caractères nutritionnels (source de carbone) et de la source d'énergie donne 4 principales catégories d'organismes (Tableau 2.11):

Les photoautotrophes utilisent la lumière comme source d'énergie et le CO2 comme source de carbone. Ce groupe inclut la plupart des organismes photosynthétiques: végétaux supérieurs, algues, nombreuses bactéries photosynthétiques.

Les photohétérotrophes utilisent la lumière comme source d'énergie et un composé organique comme source de carbone. Cette catégorie comprend certaines bactéries vertes ou pourpres.

Les chimioautotrophes tirent leur énergie de l'oxydation de composés minéraux réduits (H_2S, S°, S_2O_3, NH_3, NO_2, H2) et utilisent le CO2 comme source de carbone. Ce groupe ne contient que des bactéries.

Les chimiohétérotrophes utilisent l'énergie chimique et tirent leur carbone de composés organiques. Pour certains microorganismes, un seul composé peut à la fois être source de carbone et d'énergie (prototrophie). On parle d'auxotrophie quand l'organisme exige un ou plusieurs facteurs de croissance (vitamines).

On distingue trois sous-types de métabolisme chez les chimiotrophes, suivant la nature de l'accepteur final d'électrons:

• la respiration: l'accepteur final est l'oxygène.

• la respiration anaérobie: l'accepteur final est un composé minéral autre que l'oxygène (nitrate, sulfate).

• la fermentation: l'accepteur final est un composé organique.

Tableau 2.11. Grands groupes de microorganismes en fonction des sources de carbone et d'énergie

Donneur d'électrons -> Source d'énergie	Donneur d'électrons minéral **Autotrophes** **(Lithotrophes)**	Donneur d'électrons organique **Hétérotrophes** **(Organotrophes)**
Energie électromagnétique (lumière) **Phototrophes**	**Photoautotrophes** (Photolithotrophes) Plantes vertes Algues Bactéries sulfureuses pourpres (Thiorhodacées) Bactéries sulfureuses vertes (Chlorobactériacées) Exemple: photosynthèse CO_2 +2H_2O -> (CH_2O) +H_2O +O_2 le donneur d'électrons est H_2O	**Photohétérotrophes** (Photoorganotrophes) Bactéries pourpres non sulfureuses (Athiorhodacées)
Energie chimique **Chimiotrophes***	**Chimioautotrophes** (Chimiolithotrophes) Bactéries nitrifiantes Bactéries sulfo-oxydantes Ferrobactéries Bactéries hydrogéno-oxydantes Exemple: Nitrification NH_4+ +3/2 O_2 -> NO_2- +H_2O +	**Chimiohétérotrophes** (Chimioorganotrophes) Animaux Végétaux non chlorophylliens Micro-organismes hétérotrophes Réaction générale: DH_2 + A -> D + AH_2

	2H+ le donneur d'électrons est NH4+; l'accepteur d'électrons est O_2	D: donneur d'électrons A: accepteur d'électrons oxydé AH2: accepteur d'électrons réduit

2.7. LES GRANDS GROUPES FONCTIONNELS DE MICROORGANISMES

L'activité catalytique des microorganismes contribue d'une façon très importante à la chimie du sol.

Les microbiologistes du sol ont donc élaboré une classification basée sur l'activité des microorganismes dans le sol: par exemple, les organismes qui peuvent décomposer la cellulose sont regroupés dans la catégorie des cellulolytiques.

Le Tableau 2.12 classe certains taxons de microorganismes dans les principales catégories fonctionnelles.

Tableau 2.12. Groupements fonctionnels de taxons de microorganismes du sol

Catégories	**Bactéries**	**Actinomycètes**	**Champignons**	**Algues**
Producteurs primaires	*Cyanobactéries*			Clorophycées Diatomées
Cellulolytiques	*Cytophaga* *Nocardia* *Aspergillus*	*Clostridium* *Streptomyces* *Fusarium*	*Cellulomonas* *Micromonospora* *Trichoderma*	
Ligninolytiques				*Coprinus* *Agaricus* *Poria*
Pectinolytiques	*Bacillus* *Fusarium* *Erwinia*	*Streptomyces*	*Verticillium* *Clostridium*	
Chitinolytiques	*Achromobacter* *Bacillus* *Nitrosomonas* *Nitrobacter*	*Streptomyces*	*Aspergillus*	
Nitrifiants	*Mycobacterium* *Bacillus* *Nitrosomonas* *Nitrobacter*	*Steptomyces*	*Aspergillus*	
Denitrifiants	*Achromobacter* *Pseudomonas* *Thiobacillus* *Bacillus*			
Fixateurs de N2	Cyanobactéries *Azotobacter* *Beijerinckia* *Klebsiella* *Azospirillum* *Rhizobium* cf. tableau 11.7			
Sulfooxydants	*Thiobacillus* *Beggiatoa* Bactéries vertes Bactéries		*Aspergillus* *Penicillium*	

	pourpres			
Sulfato-réducteurs	*Desulfotomaculum* *Desulfomonas* *Desulfovibrio* *Desulfobacter*			

2.8. IMPORTANCE RELATIVE DES DIFFERENTS GROUPES MICROBIENS

Les bactéries forment généralement le groupe le plus important numériquement dans le sol. La fig.2.10 présente la distribution des microorganismes dans un sol agricole tempéré fertile. Toutefois les comptages de microorganismes ne reflètent que très imparfaitement l'image de la microflore des sols et il serait plus réaliste d'exprimer les données en termes de biomasse. Le tableau 2.13. présente des ordres de grandeur des comptages de microorganismes dans les sols.

Dans les sols exondés les champignons constituent fréquemment le composant majeur en termes de biomasse. Dans les sols submergés, suivant la productivité de l'eau de submersion, ce sont les algues ou les bactéries qui dominent la biomasse microbienne.

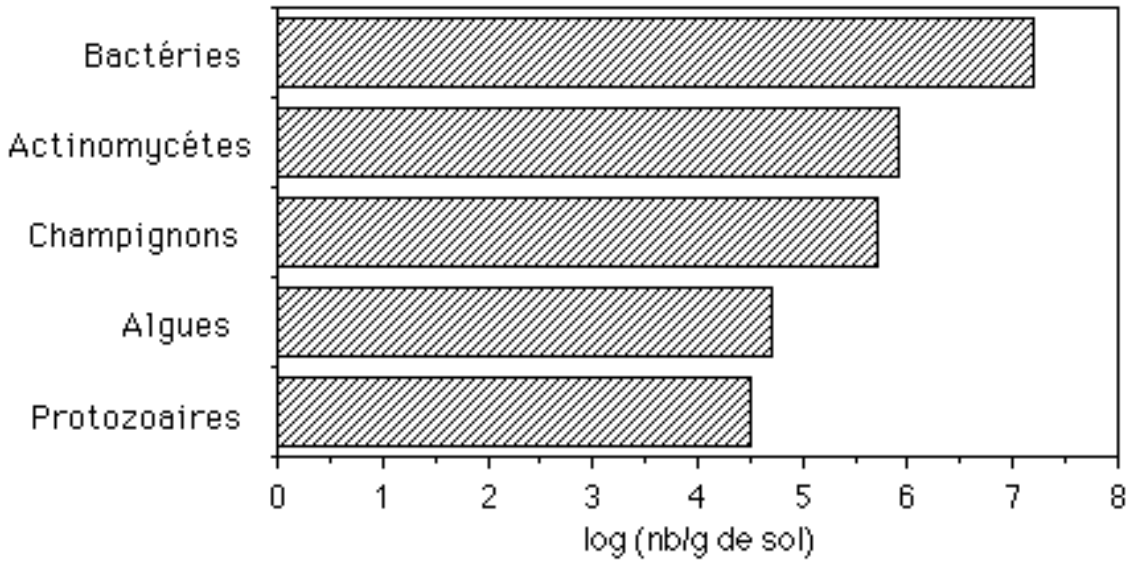


Figure 2. 10 Comptage des grands groupes de microorganismes dans un sol fertile (Hutchinson, 1958)

Tableau 2.13. Ordre de grandeur des densités et biomasses de microorganismes dans les sols.

Organismes	**Numérations**	**Biomasse**
Bactéries	Numération sur milieu liquide ou solide: 10^5 - 10^8 g^{-1} sol sec Comptage direct : 10^8 - 10^{10} g^{-1} sol sec	100 à 4000 kg poids frais ha^{-1}
Actinomycètes	10^5 - 10^8 g^{-1} sol sec	
Champignons	10^4 - 10^6 g^{-1} sol sec	10 à 1000 m d'hyphes g^{-1} sol

		50 à 5000 kg poids frais ha^{-1}
Algues et cyanobactéries	sols exondés: 10^2 - 10^4 g^{-1} sol sec sols submergés: 10^3 - 10^8 g^{-1} sol sec	sols exondés: 0 à 500 kg poids frais ha^{-1} sols submergés: 0 à 30 000 kg poids frais ha^{-1}
Protozoaires	103 - 105 g-1 sol sec	?

3. LE SOL EN TANT QU'HABITAT POUR LES MICROORGANISMES

3.1. INTRODUCTION

Le sol est formé par la transformation d'une roche mère sous l'influence de facteurs physiques, physico-chimiques et biologiques. On peut définir le sol en tant que pédosphère, comme étant l'intersection des lithosphères, hydrosphère, biosphère et atmosphère, modifiée au cours du temps et éventuellement sous l'action de l'homme (Fig. 3.1).

Dans ce chapitre nous considérons successivement les composants du sol, l'organisation du sol en microenvironnements (horizons), l'organisation à plus petite échelle, en micro- et macro-agrégats, et finalement la distribution des microorganismes dans le sol.

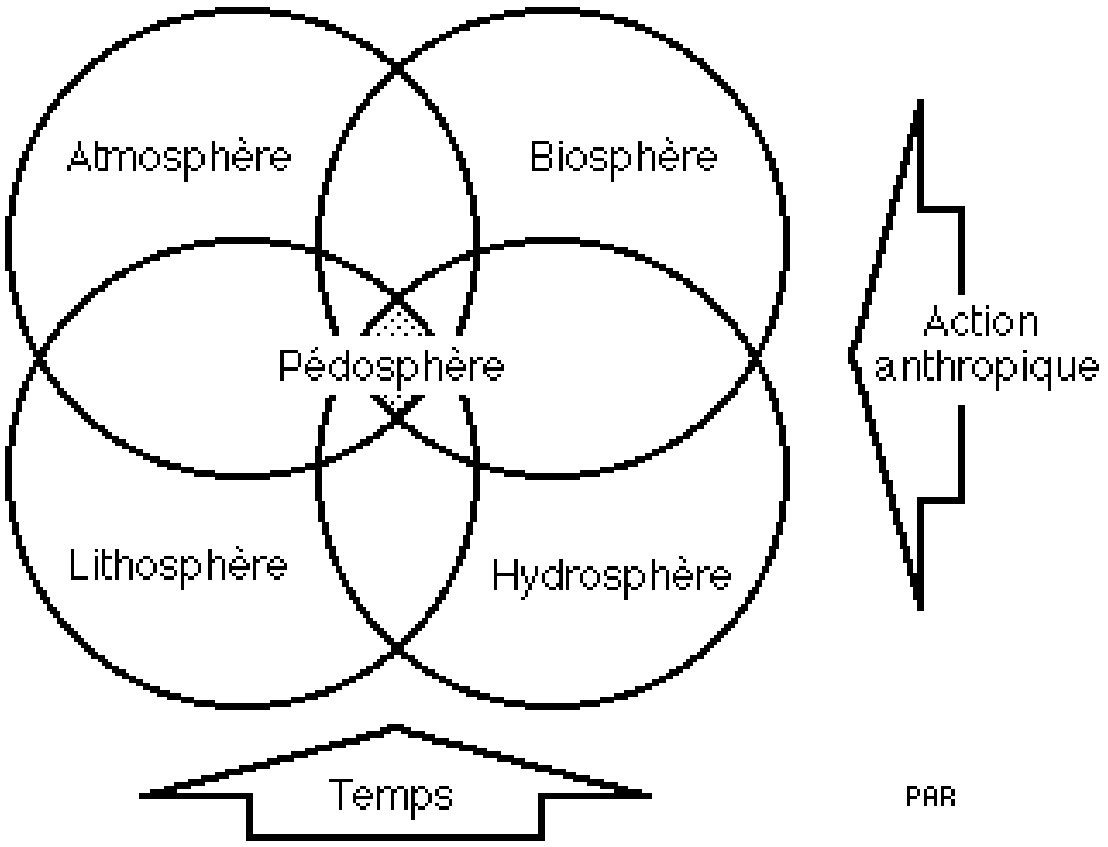


Figure 3. 1 Représentation schématique de la notion de sol

3.2. LES COMPOSANTS DU SOL

Le sol est constitué de particules minérales de taille, de forme et de composition variables, d'organismes vivants, de matière organique à différents stades de

décomposition, de gaz, d'eau et d'éléments minéraux dissous. Ces composants ne sont, bien entendu, pas mélangés de façon homogène et l'on peut distinguer, dans un sol, différents niveaux d'organisation qui s'échelonnent des colloïdes (complexe argilo-humiques = association entre particules d'argile et matière organique), jusqu'aux horizons pédologique et aux macro-environnements tels que la rhizosphère.

La formation de complexes argilo-humiques et d'agrégats est la caractéristique structurale principale de la majorité des sols. Les complexes argilo-humiques se forment grâce à la production par la microflore et les racines des plantes de filaments et de mucilage qui se combinent avec les particules argileuses. La structure du sol se développe ensuite, lorsque des forces physiques (dessiccation, gonflement-réduction de volume, alternance de gel et de dégel, action des animaux ....) induisent la formation d'agrégats. L'agrégation est l'un des facteurs principaux contrôlant l'activité microbienne du sol et le cycle de sa matière organique.

La texture détermine en partie le niveau d'agrégation des sols et influence leurs activités biologiques.

La teneur et la nature des argiles du sol sont des caractéristiques importantes qui conditionnent la taille des pores du sol et sa capacité de retenir l'eau. La fraction argileuse du sol est celle qui a le plus d'influence sur les microorganismes du sol en raison des surfaces importantes auxquelles elle correspond et des phénomènes d'absorption qui s'y développent. Un gramme d'argile (particules < 2μm) peut contenir plus de 1010 particules qui correspondent à une surface totale d'environ 8 x 10^6 cm^2. La fraction argileuse est particulièrement riche en éléments minéraux et contient de la silice, de l'oxygène et de l'aluminium ainsi que les éléments suivants: Fe, Mg, K, Ca, Na.

3.2.1. Composants minéraux

Les composants minéraux résultent de l'altération de la roche mère et d'apports exogènes résultant de l'érosion.

Les particules minérales sont classées en fonction de leur taille et l'on distingue traditionnellement les catégories suivantes:

Type de particule et Diamètre (mm)

- Gravillons > 2,00
- Sables grossiers 2,00 à 0,20
- Sables fins 0,20 à 0,05
- Limons grossiers 0,05 à 0,02
- Limons fins 0,02 à 0,002
- Argiles < 0,002

La teneur relative en sables, limons et argiles détermine la texture des sols et leur classification dans des groupes de texture (ex: sable argileux, limon argilo-sableux etc...) (Fig 3.2)

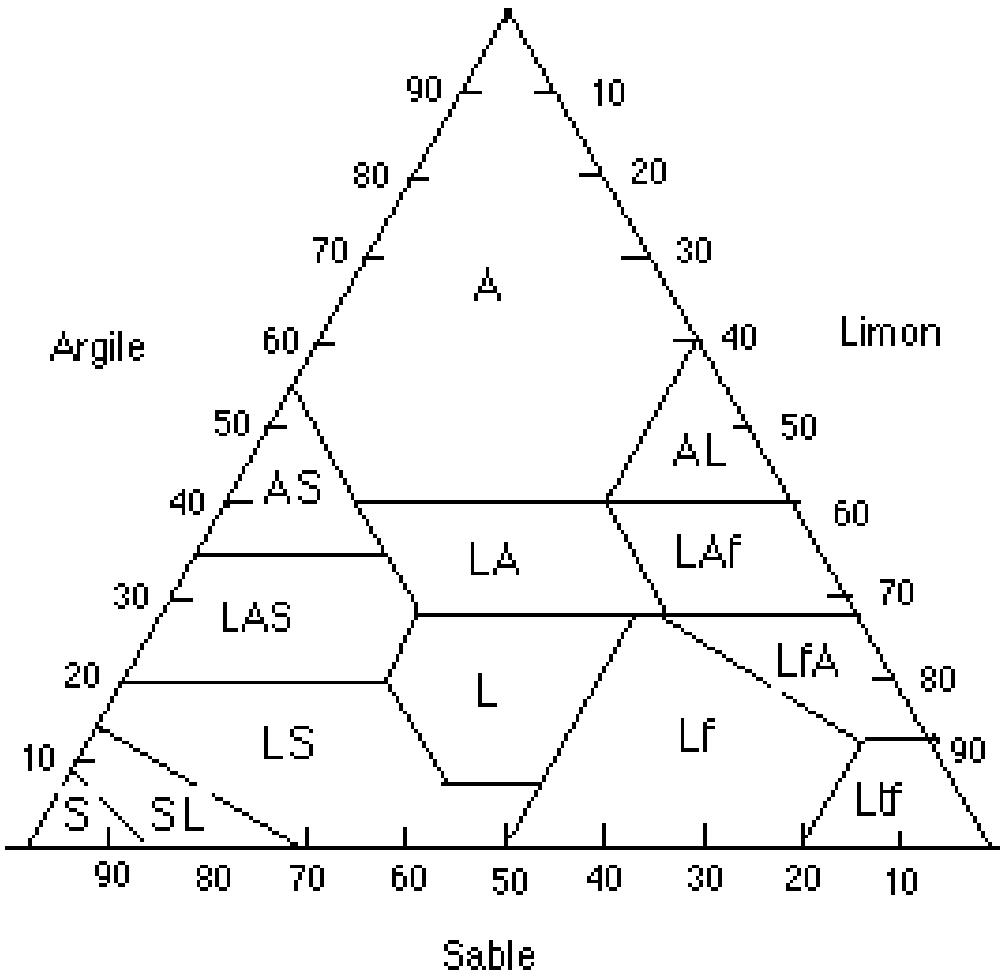


Figure 3. 2 Diagramme de texture des sols suivant l'USDA (Classification américaine)

A: argile ou argileux; L: limon ou limoneux; S: sable ou sableux; f: fin; tf: trés fin
exemple: LA = Limon argileux; AL = Argile limoneux

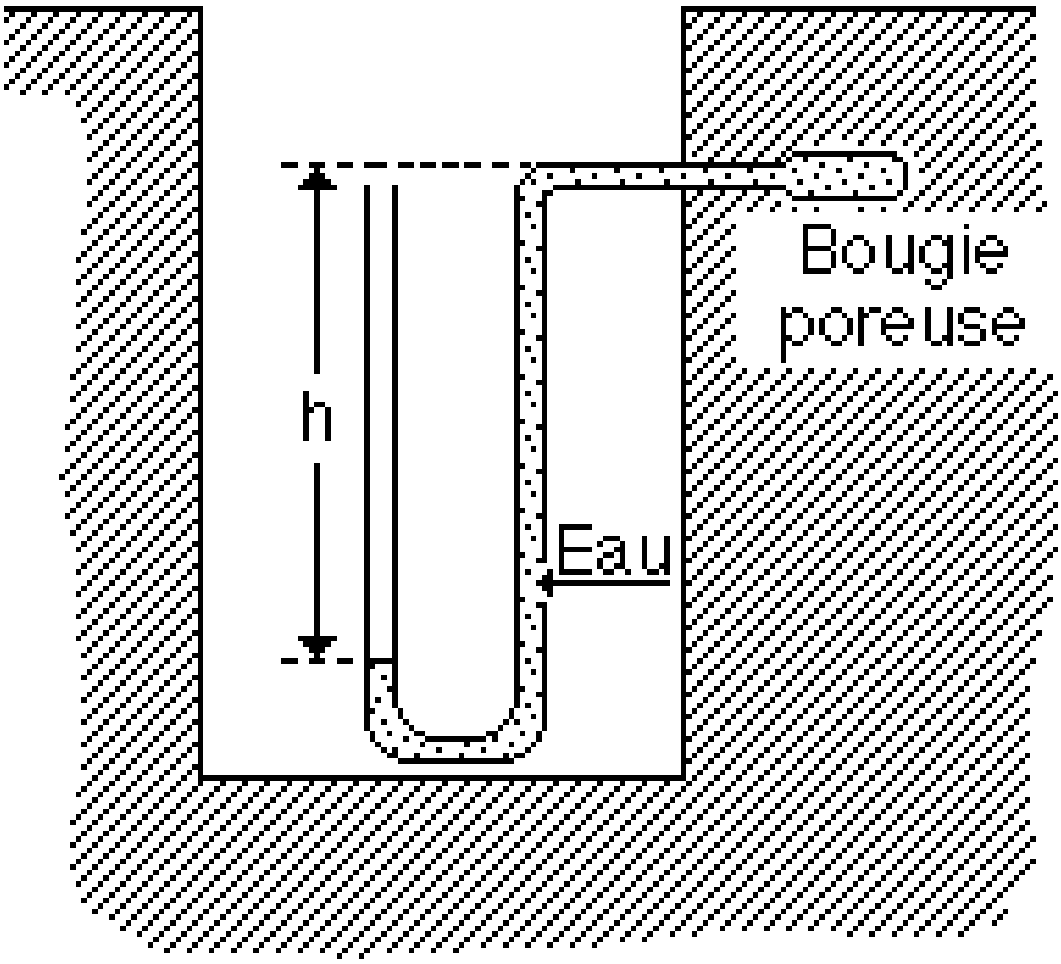


Figure 3. 3 Tensiomètre simple: la tension est mesurée par la hauteur h de la colonne d'eau

3.2.2. Eau du sol

Dans le sol, l'eau est soumise à des forces de rétention qui sont essentiellement des forces matricielles (forces d'attraction et de capillarité) et des forces osmotiques.

La nature dipolaire des molécules d'eau est à l'origine de forces d'attraction entre les molécules d'eau et les particules du sol qui se comportent comme des ions. Ces forces peuvent être très élevées.

Les forces de capillarité sont dues à un phénomène de tension superficielle, lié à l'existence dans le sol d'un système de capillaires (pores du sol).

Les forces osmotiques se manifestent dans les sols salés, les sols agricoles après application d'engrais et aux très faibles humidités, lorsque la concentration des sels dans la solution du sol augmente de façon significative.

Aux humidités moyennes, la tension de l'eau dans le sol est mesurée par un tensiomètre (Fig 3.3).

Comme la tension croît très rapidement lorsque l'on se rapproche des faibles humidités, on utilise le logarithme de la tension exprimée en cm d'eau que l'on désigne par le symbole pF.

Pour chaque type de sol il existe une relation entre l'humidité du sol (teneur en eau) et la tension.

Les niveaux remarquables de tension sont:

• 400 bars (400 atmosphères, pF 5,6) limite supérieure pour l'activité de la majorité des microorganismes;

• 15 bars (15 atmosphères = pF 4,2) point de flétrissement permanent de nombreux végétaux;

• 0,33 bars (1/3 d'atmosphère = pF 2,5) humidité équivalente des sols à texture moyenne ou grossière = humidité du sol saturé puis soumis à une centifugation de 1000 g pendant 30 minutes.

3.2.3. Gaz du sol

Les gaz du sol sont les mêmes que ceux de l'atmosphère (N_2, O_2, CO_2). Toutefois dans les sols, la concentration de l'oxygène a tendance à décroître et celle du CO_2 à augmenter par rapport à celles de l'air. Dans les sols bien aérés, la concentration de l'oxygène descend rarement en dessous de 18 - 20% et celle de l'oxyde de carbone peut atteindre 1 à 2%. Les gaz résultant des activités biologiques tels que les oxydes d'azote sont présents de façon transitoire.

La solubilisation des gaz dans la solution de sol dépend de leur nature. Ceux qui se solubilisent le mieux sont ceux susceptibles de s'ioniser dans l'eau tels que CO_2, NH_3 et H_2S. L'oxygène est moins soluble et sa concentration peut devenir pratiquement nulle dans les sols submergés. N_2 est encore moins soluble que l'O_2 et sa diffusion très lente peut limiter l'activité fixatrice de N_2 dans les sols.

Le passage de l'aérobiose à l'anaérobiose dans les sols se fait à des teneurs en oxygène de l'ordre de 1%. L'aération générale des sols a moins d'importance dans le statut aérobiose/anaérobiose que l'agrégation. On peut calculer que dans les agrégats de plus de 3mm le centre de l'agrégat est dépourvu d'oxygène. La densité parfois élevée de bactéries anaérobies dans l'horizon de surface confirme le rôle de ces agrégats dans la conservation pendant de longues périodes de la microflore anaérobie dans des sols aérobies.

Tableau 3.1. Grandes classes de matière organique dans le sol (Adapté de Dommergues et Mangenot)

Edaphon	Organismes vivants: microflore, microfaune, mésofaune
Matière organique fraîche sensu stricto = Apports = Matière organique non décomposée	Litières, Feuilles mortes, tiges et brindilles. Résidus de récolte. Racines mortes. Exsudats racinaires. Biomasse microbienne morte. Cadavres d'animaux.
Matière organique non humifiée = "Humus" libre = Matière organique labile = Matière organique en cours de décomposition et d'humification	Fraction légère à C/N élevé, facilement biodégradable, pouvant être séparée des argiles par des moyens physiques. Cette fraction s'identifie souvent avec les litières en décomposition. L'organisation cellulaire, nette dans les résidus jeunes, a tendance à disparaître au cours de l'humification
Matière organique humifiée = Humus sensu stricto	Fraction dense à C/N voisin de 10, résistant plus ou moins à la biodégradation, liée aux argiles et non séparable de celles-ci par des moyens physiques. Comprend les acides fulviques et humiques et l'humine

3.2.4. Matière organique

Le sol contient différentes sortes de matières organiques qui peuvent être groupées en quatre grandes classes (Tableau 3.1). La quantité et la nature des matières organiques présentes dans le sol déterminent pour une large part, les caractéristiques de celui-ci et conditionnent sa fertilité.

Il est important pour l'écologiste et l'agronome de distinguer la matière

organique propre au sol, c'est à dire l'humus au sens strict, et les substances étrangères, incomplètement ou non transformées qui lui sont simplement mélangées.

La prépondérance de fractions non humifiées dans un sol indiquent souvent une activité biologique réduite, elle conduit à la constitution d'un stock d'éléments nutritifs inutilisé et à l'apparition de substances agressives mobiles dégradant le sol.

La dominance de fractions humifiées correspond souvent à des sols de bonne structure, d'activité microbiologique intense et à des cycles d'éléments nutritifs équilibrés. Dans ces sols, la matière organique est complexée avec les argiles. Elle contribue à l'agrégation du sol et sert de tampon pour les éléments nutritifs. Toutefois il existe aussi des humus inertes et des substances humiques mobiles. La distinction entre matière organique humifiée et non humifiée n'est donc pas absolument tranchée sur le plan écologique.

Les substances humiques sont principalement des polyphénols, de chaîne assez courte, polymérisés avec des composés phosphorés ou soufrés. On distingue traditionnellement, à partir de méthodes d'extraction chimiques par des solvants alcalins, trois grands types de fractions humiques:

• Les acides fulviques: extractibles et demeurant dissous ou dispersés après acidification.

• Les acides humiques, extractibles mais précipitant à pH 1.

• L'humine, résidu non extractible.

Ces différents types correspondent à des niveaux de polymérisation différents (Fig. 3.4.)

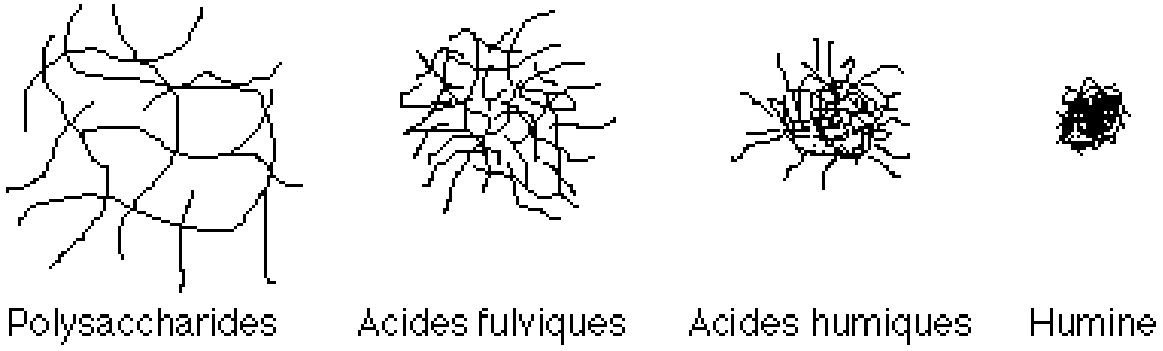


Figure 3. 4 Représentation schématique des composants de l'humus

3.3. PROFIL PEDOLOGIQUE ET MACROENVIRONNEMENTS

Au cours des transformations de la roche mère qui conduisent à la formation du sol, interviennent des processus de synthèse et de décomposition, de migrations et d'accumulation de substances minérales et organiques entraînant la formation d'horizons.

Dans les sols non cultivés, on distingue généralement trois horizons principaux:

• un horizon appauvri en substances ou horizon éluvial, désigné par la lettre A;

• un horizon enrichi ou horizon illuvial, désigné par la lettre B; et

• la roche mère ou horizon C.

La croissance des plantes et la mise en culture causent la formation de zones spécifiques telles que la rhizosphère, l'horizon perturbé par le travail mécanique du sol (Ap = horizon A perturbé) ou la semelle de labour, qui contribuent, avec les horizons pédologiques, à diversifier le sol en une série de niches écologiques dont la juxtaposition constitue un environnement complexe et hétérogène.

Les figures 3.5 et 3.6 présentent deux exemples de profils de sols tempérés. Le sol brun lessivé est caractéristique de sols de prairies fertiles. Une activité microbienne intense dans l'horizon de

surface dégrade les acides aliphatiques des litières. Le podzol est un sol fréquent dans les forêts de conifères.
Il est caractérisé par une faible activité microbienne en surface qui se traduit par un lessivage très marqué du fer et de l'aluminium sous l'effet de la complexation de ces éléments par les acides aliphatiques de la litière de pin qui ne sont pas dégradés à la surface du sol.
La figure 3.7 présente les macroenvironnements qui se différencient dans un sol de rizière après la submersion et le repiquage du riz.
Ces exemples indiquent qu'un sol doît être considéré comme un "patchwork" de macro- et de micro- environnements présentant des conditions de croissance pour les microorganismes qui peuvent varier dans de très larges limites. En particulier, il convient de toujours garder présent à l'esprit que si les analyses physicochimiques moyennes de sol constituent une information précieuse pour le microbiologiste ou l'écologiste, elles ne sont qu'indicatives et que les valeurs *in situ*, au niveau du macro-environnement ou de l'agrégat sont susceptibles de varier dans de larges limites autour de ces valeurs moyennes.

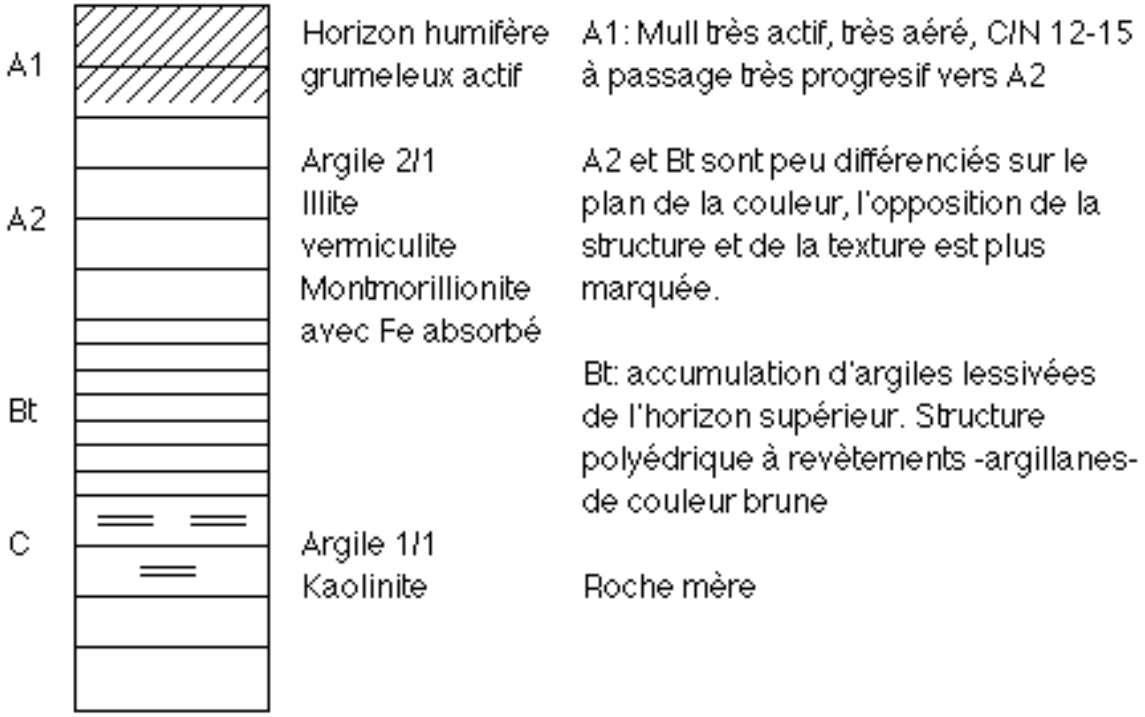


Figure 3. 5 Profil pédologique d'un sol brun lessivé

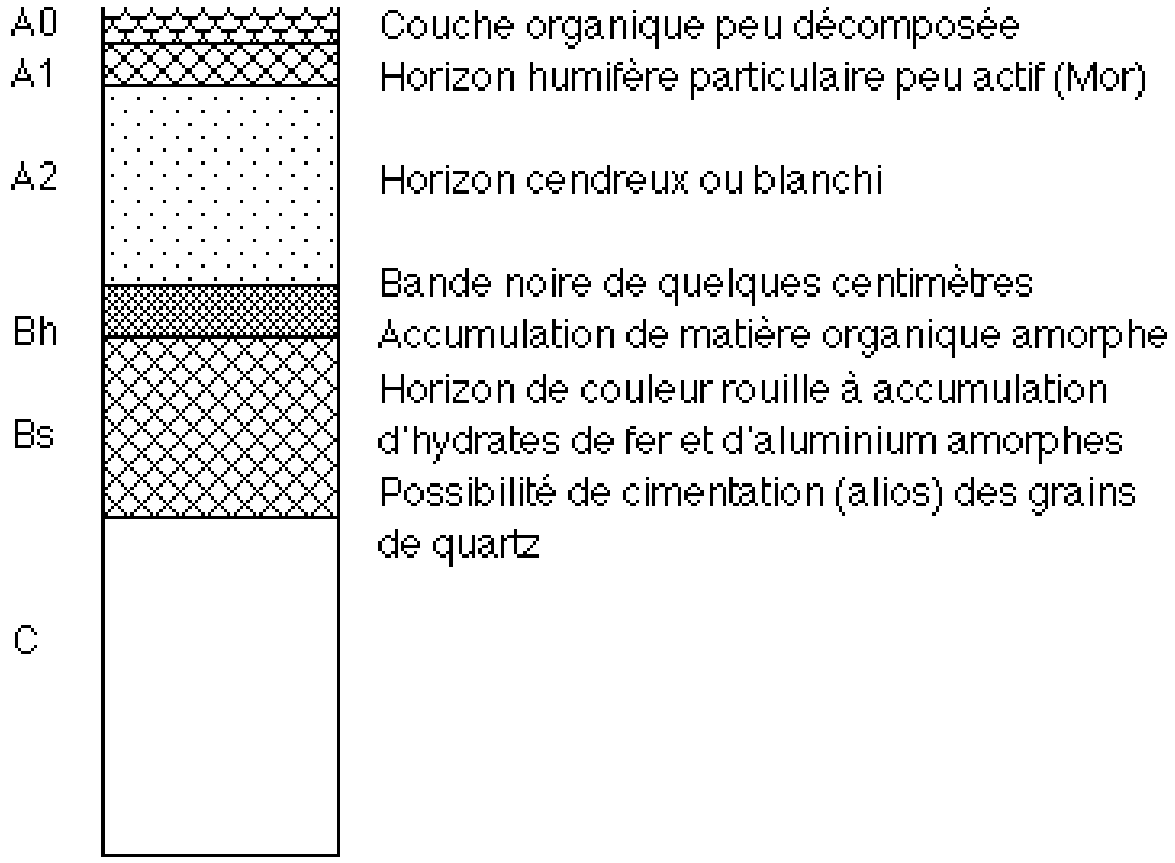


Figure 3. 6 Profil pédologique d'un podzol.

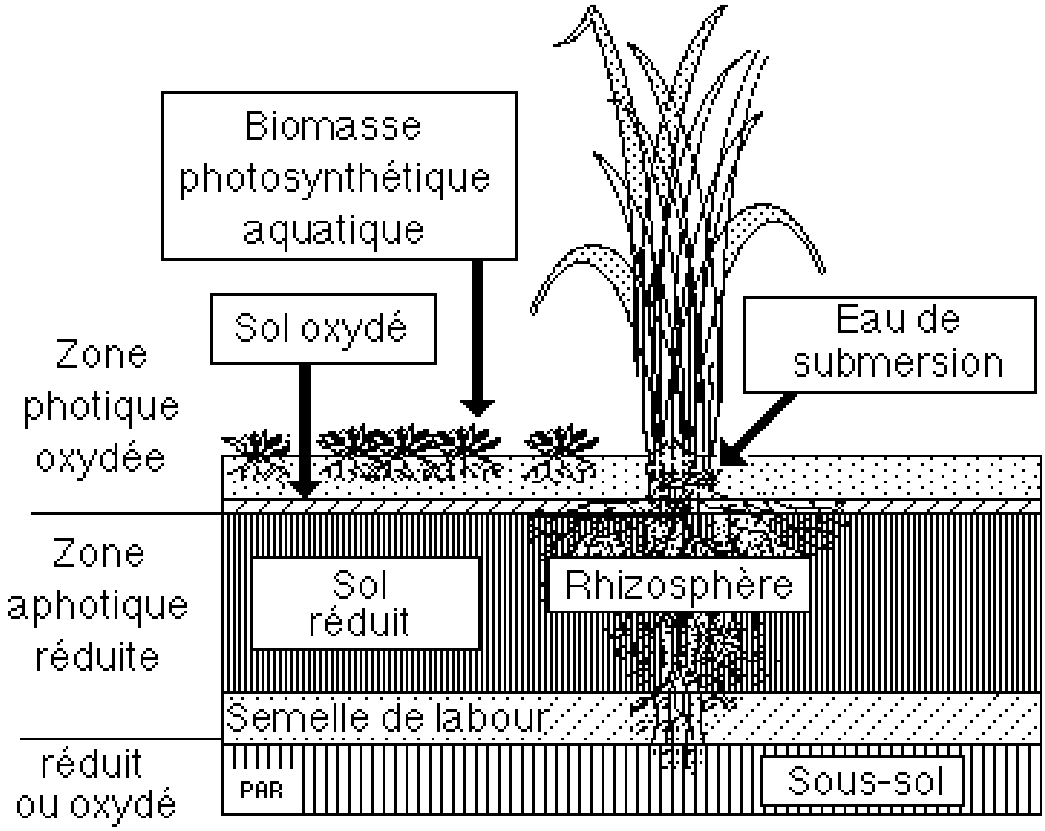


Figure 3. 7 Macroenvironnements dans un sol de rizière inondée

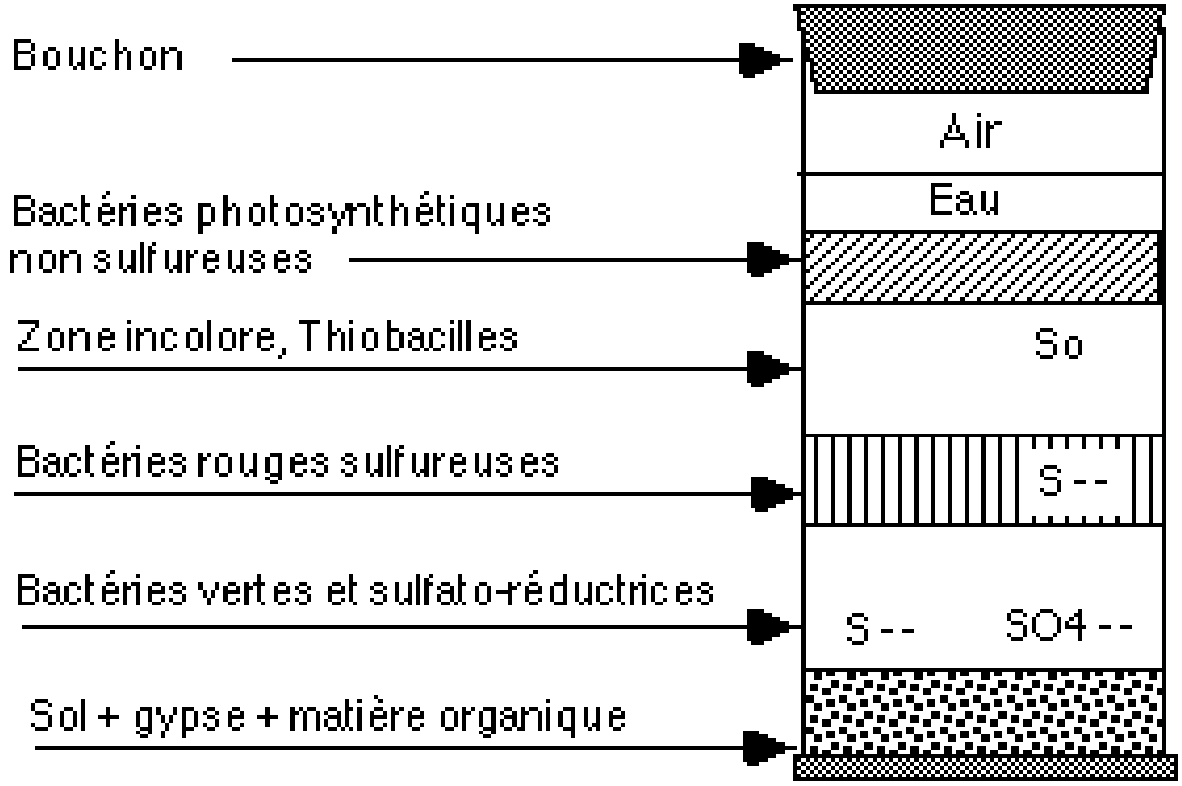


Figure 3. 8 Colonne de Winogradsky

Il existe des interactions trophiques étroites entre les microorganismes présents dans différentes niches écologiques du sol présentant des conditions physico-chimiques très différentes.

Ceci est démontré pour les sols submergés par l'expérience de la colonne de Winogradski. On enrichit un échantillon de sol en gypse et en débris organiques et on le place 3 à 5 cm au fond d'un cylindre rempli d'eau. Un peu d'espace est laissé sous le bouchon qui est hermétiquement placé. La colonne ainsi préparée est laissée à la lumière et à la température ambiante pendant plusieurs mois.

Les composés organiques sont dégradés par les bactéries sulfatoréductrices dans le sol enrichi en sulfate de calcium, les sulfures produits sont réoxydés par différents microorganismes: bactéries vertes et rouges, utilisant le CO2 produit par décomposition de la matière organique pour leurs synthèses. Au sommet de la colonne, où se trouve l'oxygène, se développent des cyanobactéries et des bactéries sulfooxydantes aérobies. Cette colonne peut ainsi fonctionner en équilibre pendant de nombreuses années, l'apport d'énergie étant fourni par la lumière (Fig. 3.8).

On observe également la succession dans le temps de ces groupes microbiens (algues vertes,

sulfato-réducteurs, bactéries rouges et vertes, puis bactéries rouges non sulfureuses) dans un sol de rizière enrichi par des sulfates et des phosphates et incubé à la lumière (Figure 3.9).

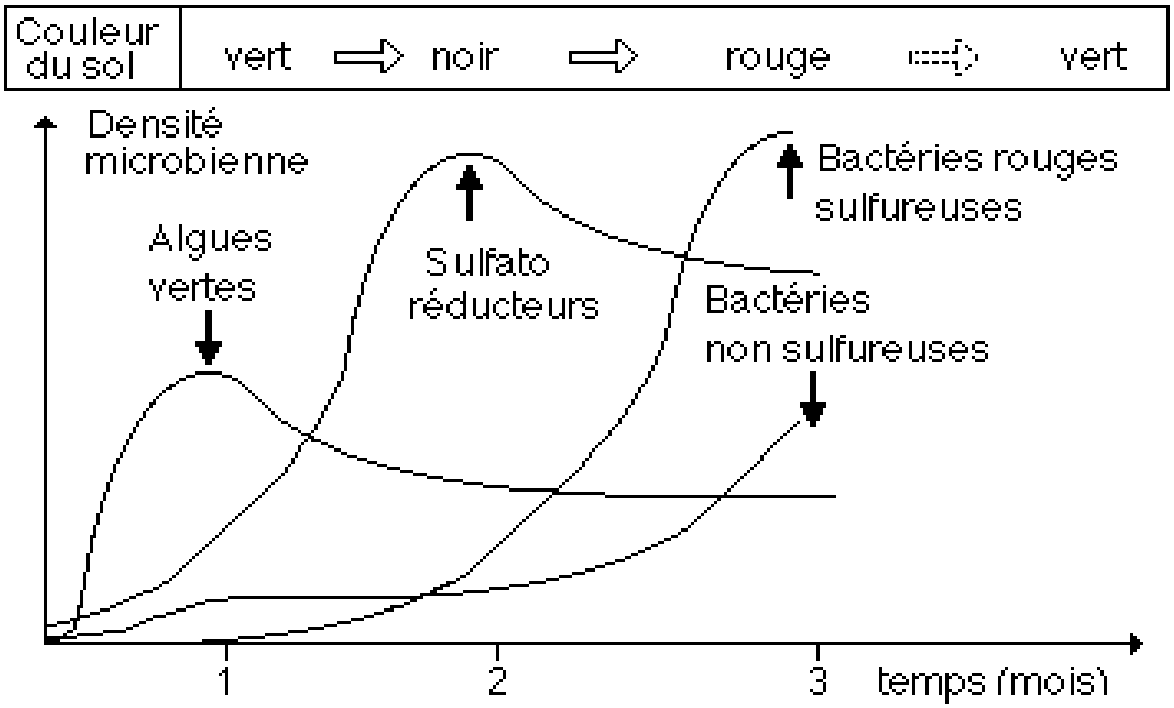


Figure 3. 9 Modèle de Kobayachi et Okuda

3.4. MICROENVIRONNEMENTS ET ACTION SUR L'ACTIVITE DES **MICROORGANISMES**

3.4.1. Interactions au niveau colloïdal

3.4.1.1. Charge des particules

Les interactions entre particules colloïdales minérales (argiles) et bactéries ont une grande importance dans la vie microbienne du sol. Elles dépendent de la nature et de la charge électrostatique de la surface des particules et des microorganismes.

La charge électrostatique des bactéries est due:

• à des radicaux ionogènes de certains composants de la membrane, tels que les acides aminés
(radicaux NH2+ ou COOH- terminal);

• à l'adsorption ou la désorption d'ions bivalents: Ca, Mg, etc.;

• au métabolisme même de la bactérie (transfert d'électrons de l'intérieur vers la membrane).

La charge électrostatique des particules colloidales d'argile est due à l'adsorption d'ions, la capacité d'échange caractérisant tel ou tel type d'argile. Ces charges sont réparties sur les bords et les surfaces.

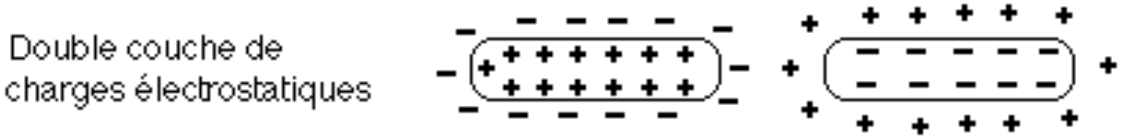
En solution acide, les faces sont chargées positivement, en milieu alcalin elles sont chargées négativement. Les bords du cristal d'argile sont en général chargés positivement (Fig. 3.10).

3.4.1.2. Interactions entre particules chargées (particules colloïdales minérales et bactéries)

Par le jeu combiné des forces attractives et répulsives, les particules chargées peuvent dans certains cas s'agglomérer (floculer).

Les forces répulsives sont des forces électromagnétiques qui se développent entre particules de charges identiques. A noter que les particules électriquement chargées possèdent une double couche de charges: la charge de la surface engendre une couche de charges contraires dans le milieu au contact de la particule (Figure

3.9). Les forces répulsives entre charges identiques augmentent de façon exponentielle quand la distance diminue.



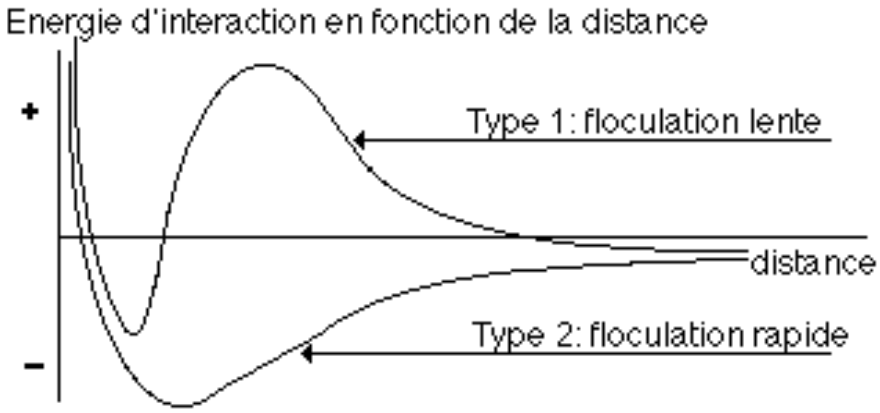


Figure 3. 10 Charges électrostatiques et interactions entre particules

Les forces attractives ont trois origines : interaction entre charges opposées, effet de polarisation d'une particule chargée sur une particule non chargée, attraction des masses. Ces deux dernières forces sont additives: à charge égale, les grosse particules s'attirent plus que les petites. Les forces attractives sont inversement proportionnelles à une puissance de la distance entre particules.

L'interaction est donc fonction de la somme des effets répulsifs et attractifs: on trouve deux types d'interactions entre particules chargées:

• Type 1: avec un maximum aux distances moyennes, et minimum aux grandes distances

• Type 2 l'interaction décroit régulièrement avec la distance (Figure 3.10).

Dans le premier cas, la floculation sera lente, dans le second cas rapide. Le temps nécessaire à la floculation est fonction des charges (donc de l'électrolyte de la solution) et de l'agitation brownienne (température). En milieu faiblement concentré, les forces répulsives sont proportionnellement plus fortes et la floculation plus lente.

3.4.1.3. Interactions entre bactéries et surfaces chargées

Les cellules peuvent être attirées ou repoussées à proximité d'une surface chargée suivant le signe et la charge totale de la bactérie et de la surface. Les résines échangeuses d'ions sont un bon matériel pour l'étude de ces interactions. Par exemple, une résine anionique chargée d'anions échangeables forme autour d'elle une épaisse couche de cations. Les bactéries qui sont chargées négativement à un pH basique ou neutre ne sont pas adsorbées. Au contraire à pH acide inférieur à 3, les bactéries chargées positivement sont fortement adsorbées sur la résine.

3.4.1.4. Interactions entre bactéries et argiles

3.4.1.4.1. Mécanismes de l'adhésion

Entre bactérie chargée négativement et argile Na+, l'adhésion est très rapide, surtout en milieu acide, les bords de la particule d'argile étant alors fortement chargés. Un traitement à l'héxamétaphosphate qui masque les bords de la particule argileuse a pour effet de diminuer l'adhésion avec les bactéries.

Entre bactérie chargée positivement et argile Na+ l'adhésion est possible sur les faces de l'argile qui sont chargées négativement. Les groupements amine ou carboxyl des acides aminés sont responsables de l'adhésion avec les argiles, par l'intermédiaire d'ions bivalents qui peuvent former des ponts électrostatiques entre deux particules chargées de même signe.

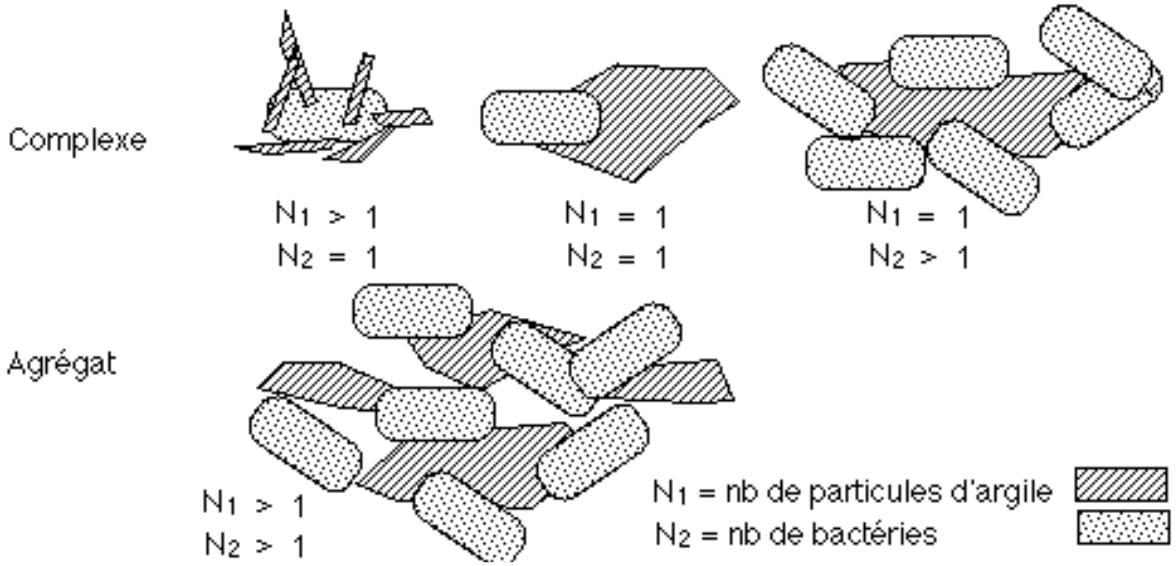


Figure 3. 11 Divers types d'association argiles-microorganismes.

3.4.1.4.2. Formation du complexe argile-bactérie

L'adhésion peut être représentée par la formule : N1 A + N_2 B -> AN1 BN_2 où N_1 et N_2 sont respectivement les nombres de particules d'argile et de bactéries associés. Quand N_1 ou N_2 = 1, l'association est appelée complexe, quand N_1 et N_2 sont tous deux supérieurs à 1, l'association est appelée agrégat (Fig. 3.11).

La quantité d'argile fixée par une bactérie dans un complexe dépend du pH: par exemple, la quantité de bentonite adsorbée par *Bacillus subtilis* décroît quand le pH augmente, elle est nulle à pH 8. Une particule argileuse de grosse taille traitée par des ions bivalents peut former un complexe avec plusieurs bactéries. Les complexes se forment en général rapidement, l'adhésion étant complète en moins d'une minute. Au contraire les agrégats se forment plus lentement, en 2 ou 3 heures. Le temps nécessaire à l'agrégation dépend de la concentration en particules, il diminue quand cette concentration augmente jusqu'à une certaine limite.

3.4.1.4.3. Formation d'autres types d'associations

Certaines bactéries sécrètent des composés visqueux à haut poids moléculaire, relativement insolubles, formant ainsi une capsule. Ces composés jouent un grand rôle dans les associations entre bactéries et argiles qui peuvent atteindre des tailles macroscopiques.

3.4.2. Influence de l'absorption sur le métabolisme des microorganismes

On imagine facilement que l'adhésion à une surface solide influence la croissance et l'activité des microorganismes du sol, mais on connait encore mal le détail de cette action.

3.4.2.1. Influence d'une surface chargée sur l'activité des bactéries

Chez plusieurs espèces (*Azotobacter agilis, Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens*) l'adsorption sur une résine chargée H+ déplace l'optimum physiologique vers des valeurs de pH basiques par rapport aux valeurs observées en milieu liquide. De même l'oxydation des nitrites par *Nitrobacter* se produit à un pH plus basique quand la bactérie est adsorbée sur une surface solide.

3.4.2.2. Inactivation des enzymes par les surfaces chargées

Les enzymes, catalyseurs des réactions biochimiques dans la cellule, sont des protéines possédant une configuration spécifique nécessaire à leur activité. Elles perdent une partie de cette activité si elles sont adsorbées puis désorbées d'une surface chargée probablement en raison d'un changement dans la configuration spatiale au contact de la surface.

3.4.2.3. Effet de masque par des particules solides

Quand une cellule est adsorbée sur une surface solide ou attachée à une particule, la surface de paroi cellulaire accessible aux substrats en solution se trouve diminuée, et l'on peut s'attendre à ce que l'activité métabolique soit freinée. C'est en effet ce qui est parfois observé, mais l'activité normale est restaurée par la désorption de la cellule.

3.4.2.4. Stimulation de l'activité des bactéries adsorbées sur une surface solide

La fermentation alcoolique par les levures est plus rapide pour des cellules adsorbées sur des fibres de cellulose. De même l'activité déshydrogénasique de *Desulfovibrio* est favorisée par l'adsorption sur un gel de silice. Le temps de génération de cellules d'*Escherichia coli* cultivées sur une résine est inférieur au temps de génération de cellules cultivées en milieu liquide.

3.4.2.5. Inclusion de bactéries dans des matrices inertes

L'activité de différentes bactéries est maintenue pendant une très longue durée (plusieurs mois) sans division cellulaire si les bactéries sont incluses dans des gels inertes (polyacrylamide, par exemple) après croissance en milieu liquide. Cette technique d'inclusion permet de conserver des préparations actives et viables pour l'inoculation de milieu neuf, ou de réaliser des percolations à travers le gel, l'activité enzymatique des bactéries se maintenant pratiquement constante sans multiplication ni entraînement des germes dans le percolat.

3.4.2.6. Effet des argiles sur l'activité et la croissance des bactéries

Dans les complexes ou les agrégats entre bactéries et argiles, les effets complexes des charges et des surfaces se combinent. En général, l'activité et la croissance sont stimulées par les argiles.

Il a été montré que l'ammonium adsorbé sur les argiles était plus accessible aux bactéries nitrifiantes que l'ammonium de la solution; la vitesse de la nitrification étant proportionnelle à la quantité d'ammonium fixé et non à la concentration d'ammonium dans la solution. On peut aussi augmenter cette vitesse en ajoutant du sol stérile, c'est-à-dire des sites de fixation.

La montmorillonite augmente significativement le taux de croissance de certaines bactéries:

Azotobacter chroococcum, Thiobacillus thiooxydans, T. denitrificans, Desulfovibrio vulgaris par exemple; de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ou de champignons (*Aspergillus niger*).

3.4.2.7. Influence de l'argile sur la survie en conditions arides

Un effet protecteur de la montmorillonite et de la kaolinite a été observé pour des cellules de
Rhizobium et *d'Azotobacter* soumises à la dessiccation.

3.4.3. Niveau de l'agrégat

Nous considérons maintenant l'influence de la structure agrégée du sol (Fig. 3.12) sur l'activité des microorganismes, en supposant acquises les notions de porosité, d'eau gravitaire, capillaire et hygroscopique, etc ...

3.4.3.1. Répartition des microorganismes dans l'agrégat

On peut estimer la proportion de microorganismes qui se développent à la surface des agrégats en séparant par lavage les cellules fixées à l'extérieur: après plusieurs lavages par un tampon stérile, le nombre de microorganismes mis en suspension diminue, on estime alors que les germes extérieurs ont été épuisés. Les bactéries GRAM-positives sporulantes sont plutôt réparties à l'extérieur, les GRAMnégatives étant situées dans les pores centraux. Cette observation peut être expliquée en considérant que les bactéries sporulantes sont plus résistantes à la dessiccation et peuvent donc se maintenir vers l'extérieur où les conditions hygrométriques sont plus variables. Par sonication des agrégats lavés, on libère alors les microorganismes internes, contenant une plus forte proportion de bactéries GRAMnégatives non sporulées sensibles à la dessiccation.

3.4.3.2. Distribution de cellules ajoutées à des agrégats stériles

Si l'on ensemence des agrégats stérilisés et séchés par une suspension bactérienne, on observe que la proportion entre bactéries "externes" et "internes" est la même dans tous les agrégats, mais varie avec la densité microbienne de la suspension ajoutée: plus cette densité augmente, plus on augmente le rapport externes/internes. Il semble donc que les microorganismes colonisent préférentiellement les parties internes de l'agrégat, les sites externes n'étant saturés qu'après les sites internes.

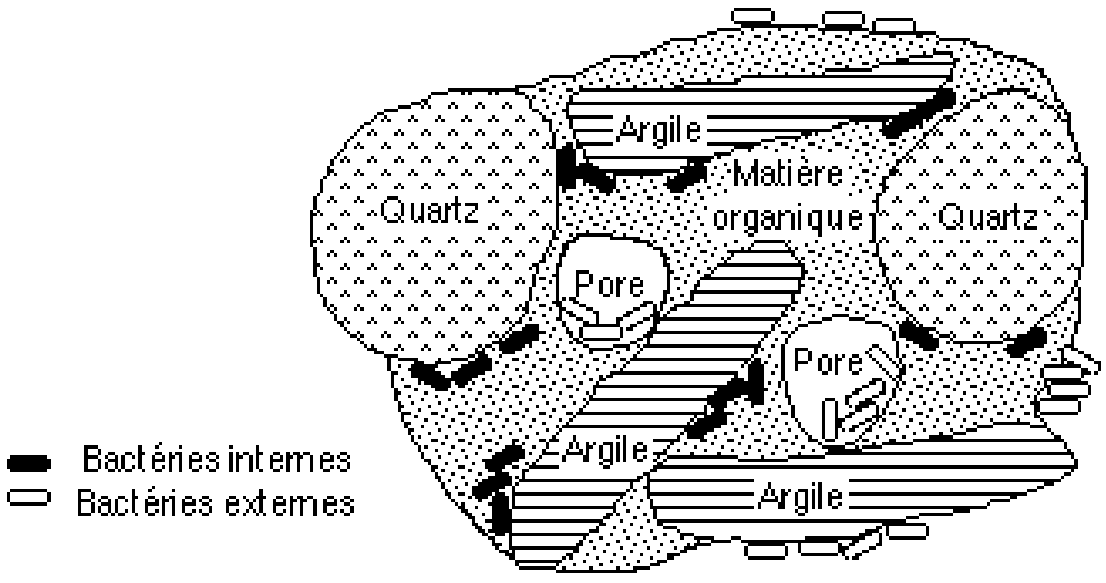


Figure 3. 12 Représentation schématique d'un aggrégat

3.4.3.3. Nombre de cellules dans l'agrégat en fonction de leur diamètre

On peut calculer le nombre de particules sphériques contenues dans un volume de 1 cm en fonction de leur diamètre:

Diamètre de la particule (mm)	Nombre de particules par cm3
10	1,00
1	$1,00 . 10^3$
0.1	$1,00 . 10^6$
0.02	$1,25 . 10^8$
0.005	$8,00 . 10^9$
0.001	$1,00 . 10^{12}$

En supposant que $1,25 . 10^8$ bactéries (nombre courant) soient réparties de façon uniforme dans un cm3 de sol, chaque agrégat d'au moins 0,02 mm contiendra au moins une bactérie. Dans un sol frais, la taille des agrégats est comprise entre 0,01 et 0,05 mm , les comptages montrent que chaque agrégat contient entre 1 et 100 cellules .

3.4.3.4. Activité des microorganismes dans les agrégats

Les agrégats du sol contiennent donc de nombreux microorganismes, la plupart aérobies: leur activité est limitée par la diffusion de l'oxygène dans l'agrégat, la croissance des aérobies étant ralentie quand la concentration est inférieure à 2%.
On peut vérifier cette influence de la diffusion de l'oxygène sur l'activité des bactéries dans les agrégats en comparant le quotient respiratoire, exprimé en oxygène consommé par unité de poids et de temps, de deux types d'agrégats :

• type 1: agrégats préparés en mélangeant une suspension peu dense avec des agrégats stériles séchés, les bactéries internes étant proportionnellement plus nombreuses par rapport aux bactéries externes

• type 2: préparés avec une suspension dense, les bactéries externes étant alors proportionnellement plus abondantes.
Dans les deux cas, le quotient respiratoire augmente avec le nombre de cellules jusqu'à un maximum quand la diffusion devient le facteur limitant: le maximum est plus élevé pour les agrégats du type 2, la diffusion limitant davantage l'activité des bactéries internes plus abondantes dans le type 1 (Fig. 3.13).

Fig. 3.13. Respiration d'agrégats en fonction de la densité de la solution d'ensemencement
(voir le texte pour le protocole expérimental)

3.4.3.5. Effet de l'eau sur l'activité des microorganismes dans les agrégats

L'eau contenue dans les agrégats influe de deux façons principales sur l'activité des microorganismes dans les agrégats :

• l'espace disponible à la croissance augmente avec la teneur en eau, qui est donc un facteur positif,

• la diffusion de l'oxygène diminue avec la teneur en eau, le coefficient de diffusion étant 1000 fois plus faible dans l'eau que dans l'air, l'augmentation de la teneur en eau est alors un facteur négatif.

Ces deux effets s'opposant, il y a donc en général un optimum de teneur en eau pour l'activité microbienne dans un sol, cette valeur dépendant évidemment de la texture et de la structure. Par exemple, l'activité nitrifiante ou sulfooxydante est maximum pour des teneurs en eau correspondant à pF 2,5 , c'est à-dire une valeur limite entre eau capillaire et gravitaire.

Dans les sols inondables où l'activité de certains groupes de bactéries anaérobies est importante (sulfatoréductrices, fixatrices d'azote, méthanogènes, etc), cette activité augmente avec la teneur en eau, l'optimum étant atteint avec la saturation.

3.5. DISTRIBUTION DES MICROORGANISMES DANS LE SOL

Dans les écosystèmes naturels ou cultivés, trois types principaux de distribution des organismes vivants peuvent se rencontrer:

-la distribution régulière: chaque individu colonise toujours le même volume, un individu en excluant un autre. Cette distribution peut être observée chez les animaux supérieurs non grégaires qui délimitent leur aire de chasse (hibous par exemple); elle n'a jamais été décrite pour les microorganismes du sol.

-La distribution au hasard: les individus se répartissent de façon aléatoire, la présence d'un individu en un point n'influençant pas la répartition des autres. La loi de répartition est alors une loi de Poisson.

Cette distribution est rarement observée dans le sol, sauf pour des populations très peu denses. Dans un milieu agité (eaux en mouvement), des populations denses peuvent être distribuées au hasard.

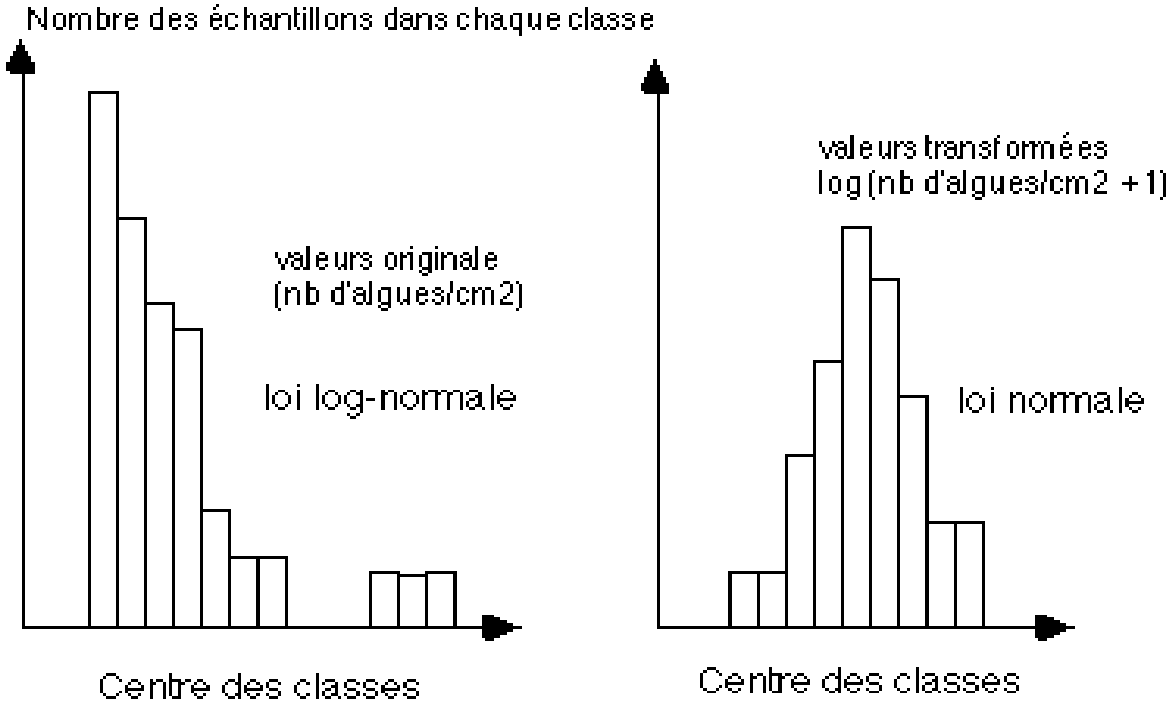


Figure 3. 13 Histogramme de mesures ponctuelles de populations d'algues dans une rizière

-La distribution agrégée: les individus forment des amas de plus ou moins grande densité. Les échantillons extraits de telles populations se répartissent suivant des lois binomiales négatives ou Log-normales.

C'est le cas le plus général pour les microorganismes dans le sol ou à sa surface (Fig 3.14) et ceci quel que soit l'échelle de l'étude (parcelle, microparcelle, motte de terre, agrégat). Une caractéristique importante de ce type de distribution est leur non normalité. Ceci implique des méthodes d'échantillonnage adaptées et la transformation mathématique des données avant traitement statistique (cf § 4.5).

La distribution verticale des microorganismes dans les sols est souvent liée à la succession des horizons: dans les horizons qui se caractérisent par des teneurs différentes en matière organique, des pH ou des textures différentes, les microorganismes se répartissent différentiellement suivant leurs caractères physiologiques.

La distribution la plus fréquente est de type décroissant, l'horizon supérieur étant généralement plus riche en matière organique est également plus riche en microorganismes.

Une distribution convexe est rencontrée quand l'horizon B (horizon enrichi ou horizon illuvial) estplus riche en matière organique que la surface, par exemple dans les podzols.

Une distribution concave est possible si l'horizon inférieur (au contact de la roche mère en décomposition) est plus actif: c'est le cas de certains sols forestiers.

4. METHODES D'ETUDE DES MICROORGANISMES DU SOL

Les méthodes nécessaires pour l'étude des microorganismes du sol concernent principalement l'isolement et l'identification des organismes, et la quantification des populations et de leurs activités.

L'isolement de souches peut ou non passer par un stade d'enrichissement au cours duquel le développement de certains composants de la microflore est favorisé.

4.1. CULTURES D'ENRICHISSEMENT ET ISOLEMENT DE SOUCHES

Les besoins nutritionnels des microorganismes étant très variés, il n'existe pas de milieu artificiel qui permette la croissance de toutes les espèces microbiennes présentes dans un sol.

Quand on ensemence un milieu solide avec une suspension-dilution de sol, de nombreuses espèces forment des colonies à la surface du milieu, avec une compétition réduite entre les colonies si elles ne sont pas trop proches les unes des autres. Par contre, en milieu liquide, les espèces les mieux adaptées au milieu initial se développent plus vite et deviennent dominantes.

Si l'on désire étudier une microflore "totale" (bactéries anaérobies totales, phototrophes, etc...) il faudra utiliser un milieu peu sélectif et une croissance sur milieu gélosé. Pour étudier une microflore spécifique, on utilisera un milieu sélectif liquide ou solide.

4.1.1. Milieux sélectifs

Il existe deux catégories de milieux sélectifs:

• Milieu minimum: ne contient que le minimum de substrats nécessaires à un groupe nutritionnel, les autres groupes ne pouvant pas se développer par manque d'un composé essentiel. Par exemple, un milieu minimum pour fixateurs d'azote ne contient pas d'azote combiné et est incubé en présence d'azote gazeux.

• Milieu avec inhibiteur: contient des composés inhibant la croissance de certains groupes, favorisant ainsi la croissance des autres. On utilise des inhibiteurs variés tels que des colorants naturels, des antibiotiques, des sels biliaires, etc.

Par exemple, les bactéries GRAM-négatif sont plus facilement isolées en présence de crystal violet qui inhibe les bactéries GRAM-positif. Au contraire, les GRAM-négatifs sont sensibles à l'azoture de sodium. Les eucaryotes sont sensibles à l'actidione qui affecte moins les procaryotes.

4.1.2. Enrichissement du sol en microorganismes spécifiques

Dans certains cas où l'on cherche à isoler des microorganismes spécifiques présents à une très faible densité, il est nécessaire de favoriser leur multiplication dans le sol par un traitement approprié avant de chercher à les isoler. Une technique qui a été utilisée avec succès pour un prétraitement avec des substrats spécifiques est celle de la percolation qui peut s'effectuer avec ou sans renouvellement du milieu.

4.1.2.1. Percolation avec du milieu non renouvelé

Cette technique (Fig. 4.1) permet non seulement de favoriser le développement de populations spécifiques mais aussi d'étudier leur cinétique.

Par exemple, en percolant une colonne de sol avec une solution enrichie en NH4+, on constate une augmentation absolue et relative du nombre des nitrifiants. Si la même colonne est soumise à un second cycle de percolation, la phase de latence observée au début du premier cycle disparait. Enfin, si la percolation est poursuivie pendant un temps assez long, la vitesse des réactions biochimiques devient constante ainsi que le nombre des microorganismes dans la solution: le sol est alors "saturé" les microorganismes ayant rempli toutes les microniches accessibles. Si la percolation est menée en anaérobiose avec une solution de nitrates, le percolat s'enrichit en bactéries dénitrifiantes qui oxydent les composés organiques du sol en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électrons.

La percolation en milieu non renouvelé permet également la recherche d'espèces microbiennes particulières, comme par exemple de bactéries dégradant des pesticides ou des herbicides.

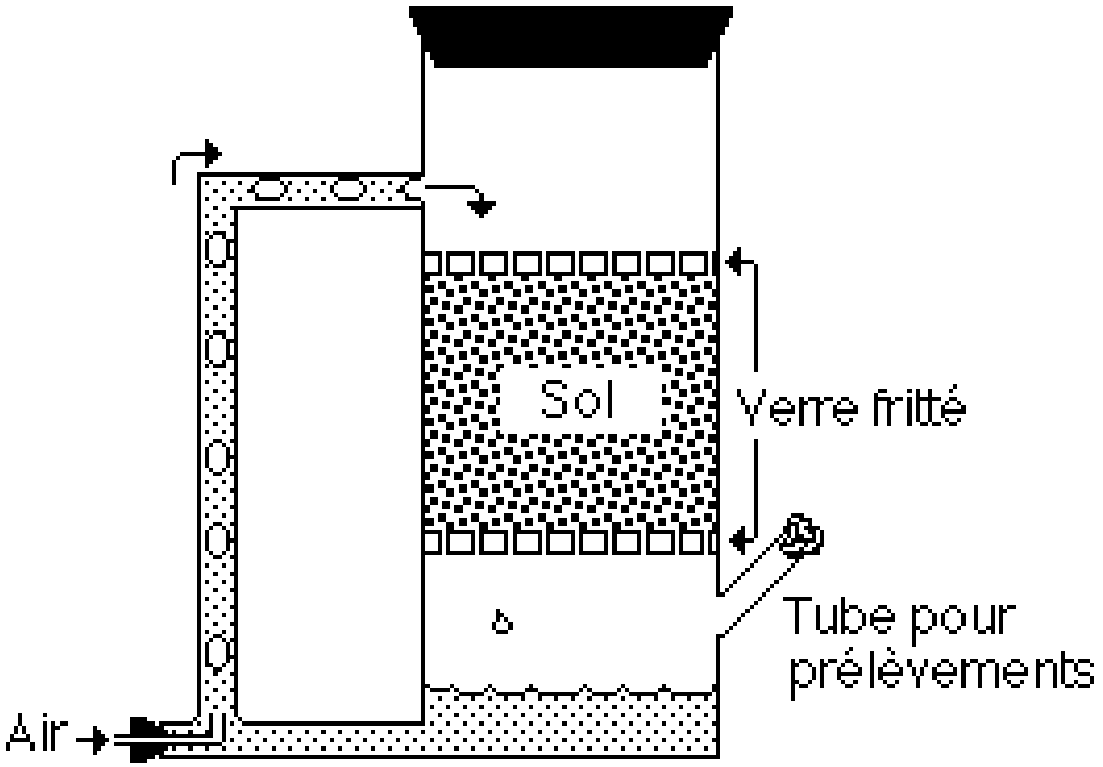


Figure 4. 1 Appareil pour percolation du sol en circuit fermé

4.1.2.2. Percolation avec du milieu renouvelé

En percolant une colonne de sol par une solution renouvelée, Macura et Malek ont montré que l'oxydation du glucose est proportionnelle au temps de percolation après 3 jours d'incubation, le système ayant alors trouvé son équilibre. Des numérations faites à différents endroits de la colonne montrent que les groupes microbiens s'installent à des endroits différents de la colonne.

En anaérobiose, la dégradation du glucose produit principalement des acides organiques: lactique, formique, acétique en début de percolation, puis acide acétique et butyrique quand l'équilibre est atteint.

4.2. NUMERATIONS

Les numérations de microorganismes du sol peuvent être effectuées soit directement sous le microscope, soit de façon indirecte en ensemençant des milieux sélectifs.

4.2.1. Comptages directs

Les comptages directs sont effectués à partir de suspension-dilutions de sol placées dans un hématimètre. Cette méthode est fastidieuse et d'emploi relativement difficile en raison de la présence des particules de sol. Des colorations spécifiques sont souvent utilisées pour faciliter le comptage de certains groupes.

4.2.2. Comptages indirects par ensemencement de milieux solides ou liquides

Ces techniques sont fondées sur l'hypothèse qu'un seul microorganisme placé dans le milieu convenable se développe en donnant une colonie. Des suspensions-dilutions successives de l'échantillon de sol (Fig 4.2) sont utilisées pour inoculer soit des boîtes de Pétri contenant du milieu gélosé, soit des tubes de milieu.

Dans le cas des boîtes de Pétri (Fig. 4.3), on compte le nombre de colonies apparues après incubation en utilisant différents dispositifs pour faciliter ce comptage, qui peut éventuellement être automatisé.

Dans le cas des tubes de milieu, la détermination de la plus forte dilution donnant lieu à une croissance permet d'estimer le nombre le plus probable (MPN, most probable number) de germes présents dans le sol en utilisant des tables établies par McCrady.

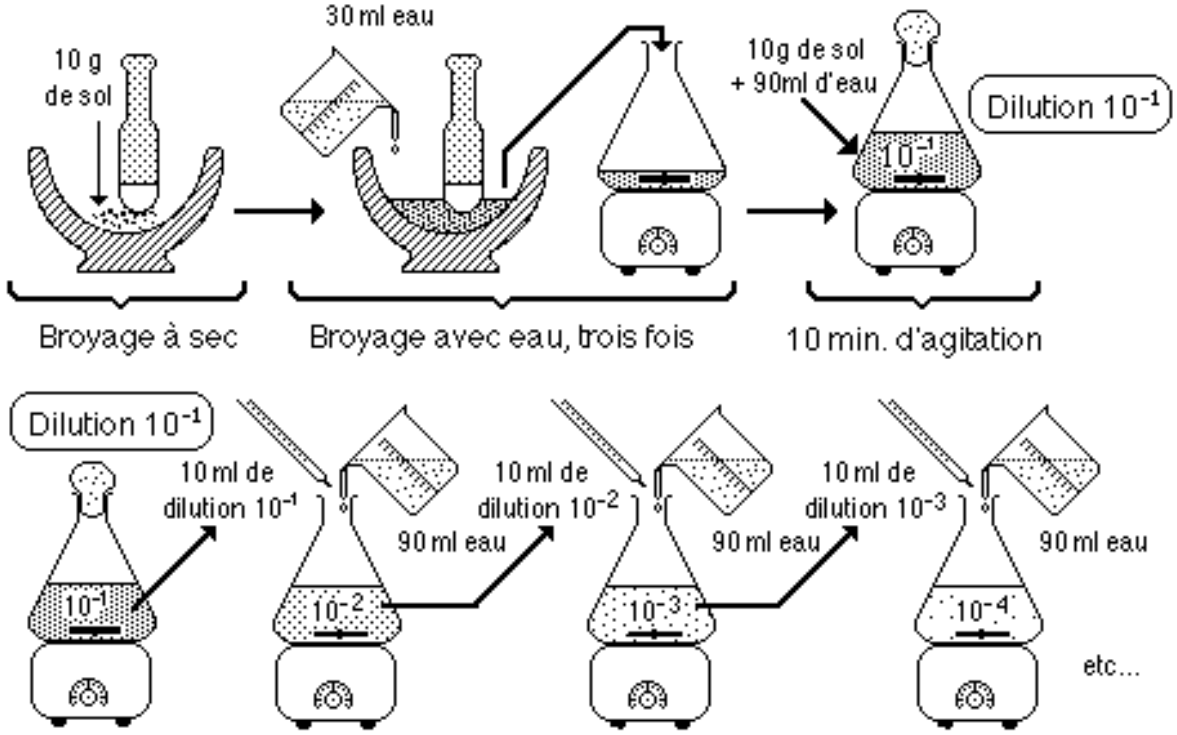


Figure 4. 2 Représentation schématique de la réalisation de suspension-dilutions de sol

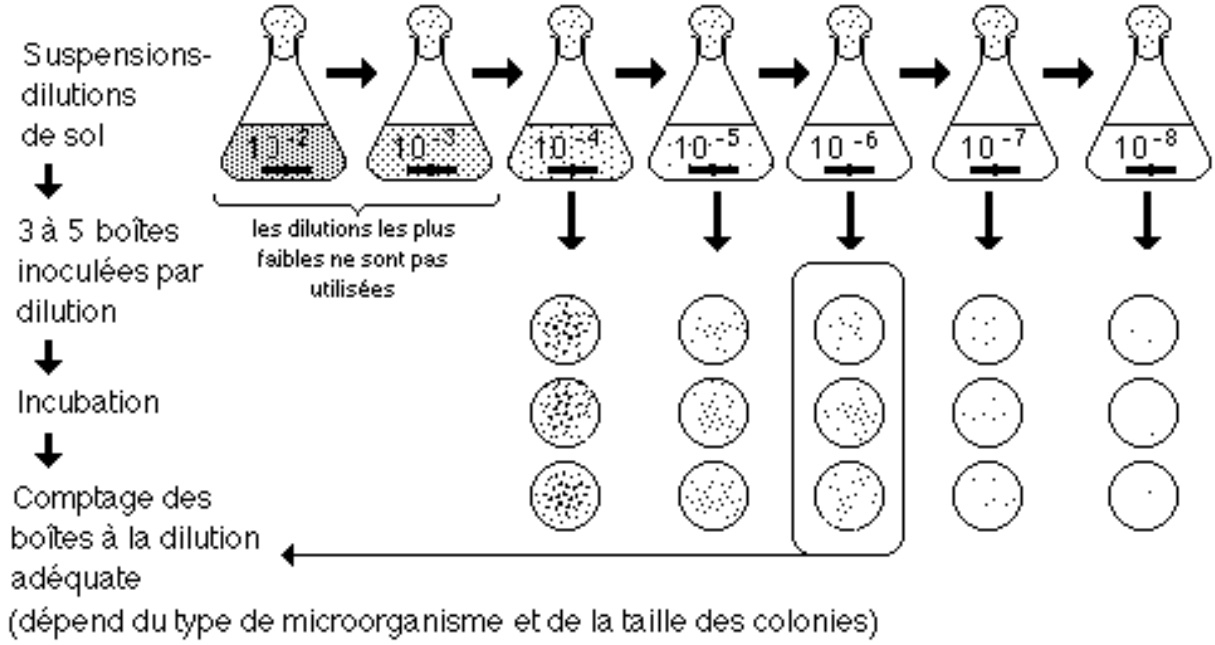


Figure 4. 3 Représentation schématique de comptages par étalement de suspension-dilutions de sol sur boites de Pétri.

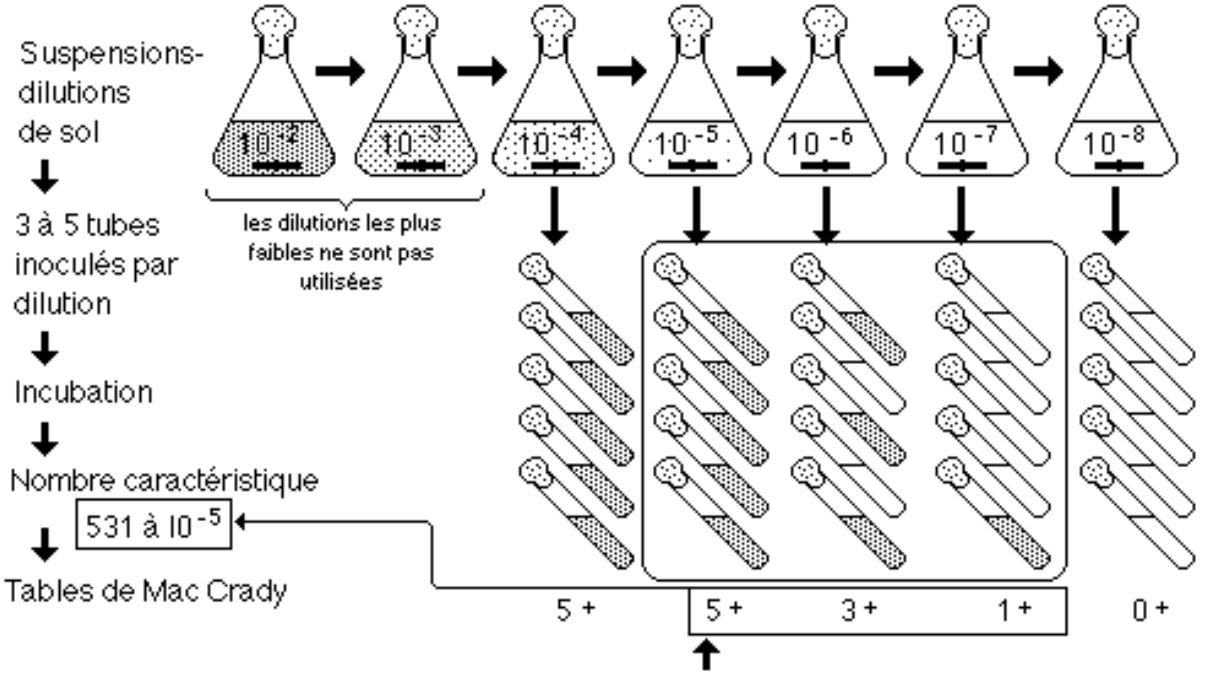


Figure 4. 4 Représentation schématique de la détermination du NMPP*

Dans cet exemple, la dernière dilution où les 5 tubes sont positifs est 10^{-5}. Cinq est le premier chiffre du nombre caractéristique. Ensuite les dilutions 10^{-6} et 10^{-7} montrent respectivement 3 et 1 tubes positifs. Le chiffre caractéristique est 531 pour une dilution de 10^{-5}. Si des tubes positifs étaient encore observés à une dilution suivante, par exemple 1 tube à la dilution 10^{-8}, ce tube serait compté avec la dilution précédente et le nombre carractéristique deviendrait 532. Le calcul s'effectue à partir du nombre de microorganismes indiqué par la table (Table 4.1) en fonction de la quantité de sol contenue dans un tube à la dilution 10^{-5}

* Nombre moyen le plus probable

Tableau 4.1 . Table de Mac Grady pour 5 tubes ensemencés par dilution caractéristique

Nombre caracté-ristique	Nombre de microor-ganismes	Nombre caracté-ristique	Nombre de microor-ganismes	Nombre caracté-ristique	Nombre de microor-ganismes	Nombre caracté-ristique	Nombre de microor-ganismes
000	0,0	203	1,2	400	1,3	513	8,5
001	0,2	210	0,7	401	1,7	520	5,0
002	0,4	211	0,9	402	2,0	521	7,0
010	0,2	212	1,2	403	2,5	522	9,5
011	0,4	220	0,9	410	1,7	523	12,0
012	0,6	221	1,2	411	2,0	524	15,0
020	0,4	222	1,4	412	2,5	525	17,5
021	0,6	230	1,2	420	2,0	530	8,0
030	0,6	231	1,4	421	2,5	531	11,0
100	0,2	240	1,4	422	3,0	532	14,0
101	0,4	300	0,8	430	2,5	533	17,5
102	0,6	301	1,1	431	3,0	534	20,0
103	0,8	302	1,4	432	4,0	535	25,0
110	0,4	310	1,1	440	3,5	540	13,0
111	0,6	311	1,4	441	4,0	541	17,0
112	0,8	312	1,7	450	4,0	542	25,0
120	0,6	313	2,0	451	5,0	543	30,0
121	0,8	320	1,4	500	2,5	544	35,0
122	1,0	321	1,7	501	3,0	545	45,0
130	0,8	322	2,0	502	4,0	550	25,0
131	1,0	330	1,7	503	6,0	551	35,0
140	1,1	331	2,0	504	7,5	552	60,0
200	0,5	340	2,0	510	3,5	553	90,0
201	0,7	341	2,5	511	4,5	554	160,0
202	0,9	350	2,5	512	6,0	555	180,0

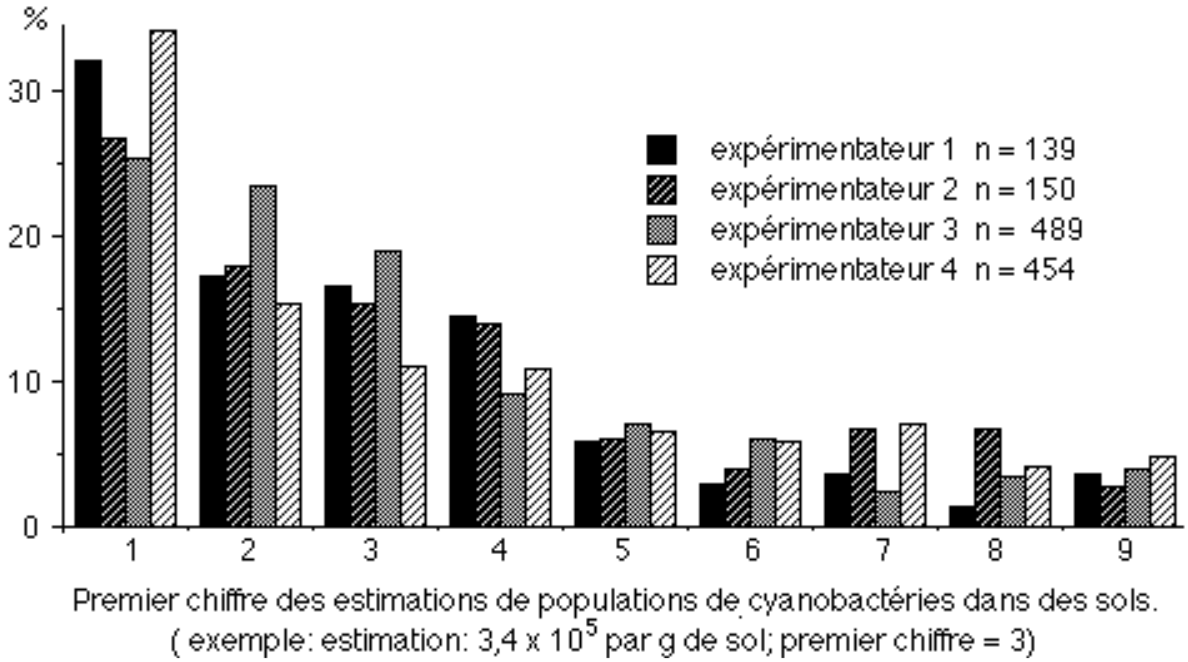


Figure 4. 5 Fréquence relative du premier chiffre (1 à 9) de n comptages de cyanobactéries dans des groupes de sols différents par quatre expérimentateurs indépendants

Ces méthodes donnent des résultats assez variables et le plus souvent par défaut, car on sait que beaucoup d'espèces ne peuvent croître, dans les conditions habituelles, à partir d'une seule cellule.

De plus, les erreurs inhérentes aux dilutions s'amplifient avec les dilutions les plus élevées, les résultats étant calculés à

partir de comptages à des dilutions pouvant parfois atteindre 109 ou 1010.
Nous présentons ci-après comme exemple des limitations des comptages indirects, un biais rencontré dans les comptages de cyanobactéries par étalement sur boîte et l'explication de ce biais:
L'étude des résultats de numération de cyanobactéries dans un grand nombre de sols de rizières dans quatre pays différents, par quatre chercheurs différents (Fig. 4.5) montre que les premiers chiffres des résultats ne se répartissent pas de façon égale entre les nombres de 1 à 9 et que les nombres les plus faibles (1, 2, 3 ...) sont plus fréquents que les nombres élevés.
La comparaison des comptages à deux dilutions successives au 1/10 ème montre que le rapport des valeurs au lieu d'être de l'ordre de 10, est d'environ 6 (Fig. 4.6). Ceci s'explique par la grand taille des colonies de cyanobactéries et l'importance de la compétition lorsque le nombre de colonies par boîtes (n) est trop élevé (n > 10 à 30 suivant la taille des colonies).
D'autre part l'étude des comptages par les quatre expérimentateurs montre que le nombre de colonies compté par boîte est généralement compris entre 10 à 40. Les boîtes comportant plus de 50 colonies ne sont pas comptées (histogramme sur la gauche de la Fig. 4.7). Le comptage est effectué à la dilution suivante. Les valeurs comprises entre 50 et 100 sont donc remplacées par des valeurs six fois plus faibles qui s'échelonnent de 10 à 15 (Fig. 4.7), d'où une proportion supérieure des valeurs commençant par le chiffre 1.
Ce type d'erreur est loin d'être le seul dans les numérations indirectes fondées sur l'utilisation de suspension-dilutions. Les problèmes dépendent du type de microorganismes, de leur mode de fragmentation, de la nature des compétitions et de la densité des formes de résistance dans le sol. Il faudra donc garder présent à la mémoire les limitations de ces méthodes et dans la mesure du possible effectuer les numérations avec des répétitions. Les numérations sans répétition doivent être considérées comme une indication d'ordre de grandeur dont la précision est de l'ordre de la puissance de dix.

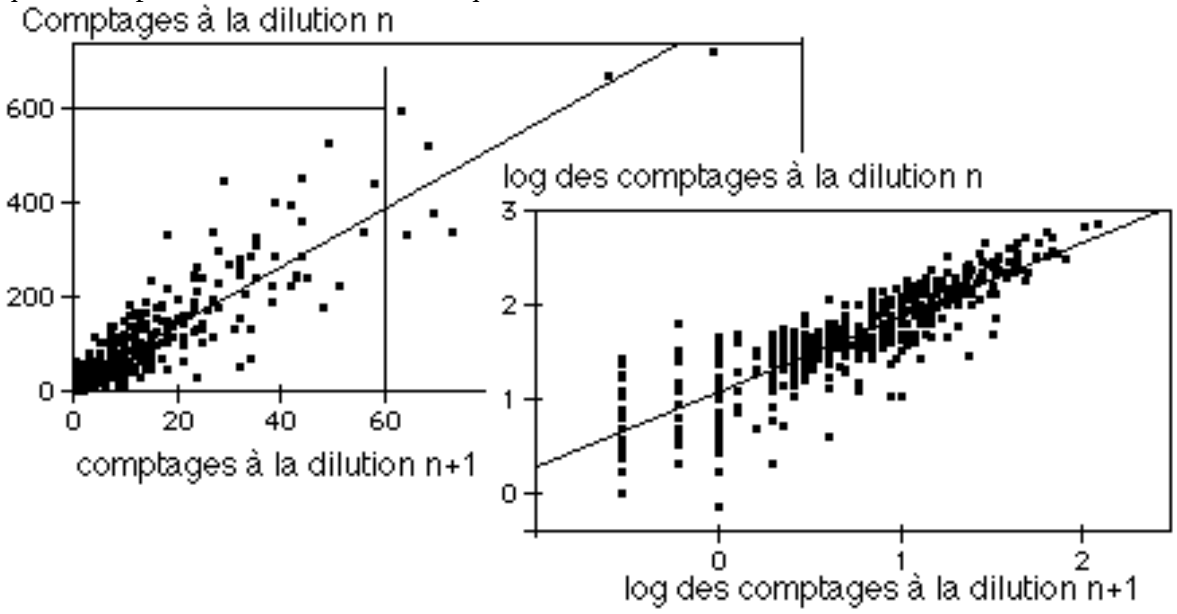


Figure 4. 6 Correlation entre les comptages ou les logarithmes des comptages de cyanobactéries dans 589 échantillons de sol à deux dilutions successives n et n+1

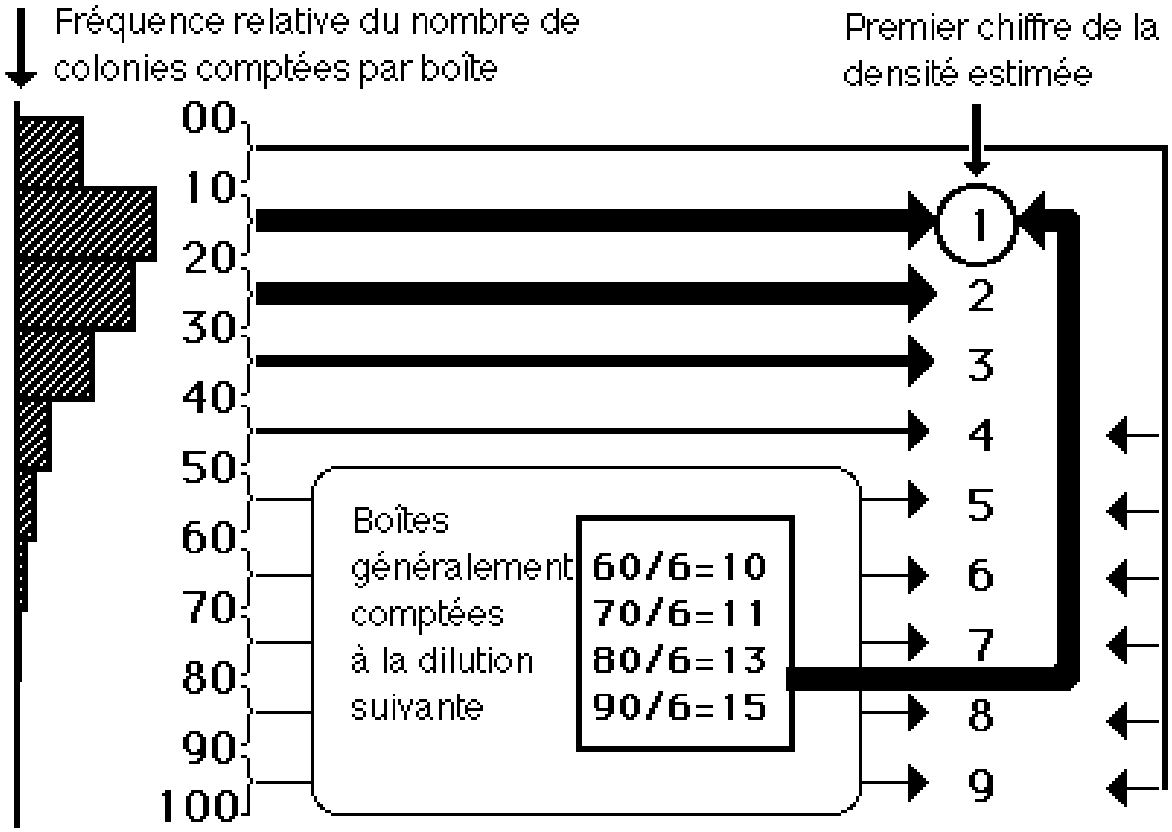


Figure 4. 7 Représentation schématique de l'origine du biais observé dans la distribution du premier chiffre des estimations de populations de cyanobactéries dans les sols

4.2.3. Mesure de l'apparition ou la disparition d'un métabolite spécifique

A la différence des méthodes précédentes, on inocule le milieu de croissance avec une forte densité de germes, et l'on mesure le temps nécessaire à l'apparition ou à la disparition d'un métabolite.

Par exemple pour estimer la densité de bactéries sulfato-réductrices, on utilise le noircissement d'un filtre inoculé avec une suspension de sol. Le noircissement est causé par une précipitation de FeS résultant de la production de H2S par les bactéries sulfato-réductrices.

Le temps d'incubation nécessaire sera proportionnel au log2 du nombre de microorganismes inoculés. En effet, pendant la croissance, la production ou la disparition d'un métabolite est proportionnelle au nombre "n" de germes présents à l'instant "t":

$dm/dt = A. n$ (1)

n étant fonction du nombre initial de germes au début de l'incubation (no)

$n = n_o . 2kt$ (2)

k étant le taux exponentiel de croissance, (= nombre de divisions par unité de temps). On a :

$m = A. n_0 2kt_0 t. dt$ (3)

La quantité de métabolite produit ou consommé nécessaire pour que le test soit positif étant une constante, en posant K = k m il vient :

$$\log2\ no = \log2\ K - \log2\ (\ 2^{kt} - 1\ ) \quad (4)$$

soit

$$\log2\ no = A' - \log2\ (\ 2^{kt} - 1\ ) \quad (5)$$

L'équation 5 montre que le temps nécessaire à l'apparition du test positif est proportionnel au log2 du nombre initial de germes no si $2kt >> 1$, ce qui est en général le cas puisque la croissance des microorganismes est rapide (temps de doublement inférieur à 1 heure)

Les méthodes de numération utilisant ce principe sont en général plus reproductibles et plus fiables que les méthodes basées sur des dilutions élevées.

4.3. ESTIMATION DE LA BIOMASSE MICROBIENNE

4.3.1. Mesures directes

Les biomasse de microalgues et de certaines fleurs d'eau à bactéries, peuvent être estimées par mesure directe (récolte et mesure du poids sec). Dans ce cas, l'utilisation d'indices d'abondance estimés par observation visuelle peut remplacer une partie des mesures (Tableau 4.2). La méthode a une précision moyenne qui varie avec l'expérience des utilisateurs (Fig. 4.8) mais est souvent suffisante pour la majeure partie des études écologiques (voir un exemple d'utilisation d'un indice d'abondance pour étudier l'effet des engrais azotés sur la croissance des cyanobactéries au § 11.2.2)

Tableau 4.2. Indices d'abondance utilisés pour les cyanobactéries (CB) des rizières

Observations	Code	Index	Index %
pas de CB visibles	0	0	0
colonies présentes mais rares	+	1	5 ?
colonies fréquentes	++	2	10 ?
nombreuses colonies	+++	3	15 ?
trés nombreuses colonies	++++	4	20 ?
couverture du 1/4 de la parcelle	1/4	5	25
couverture du 1/3 de la parcelle	1/3	6	33
couverture de 1/2 de la parcelle	1/2	7	50
couverture de 2/3 de la parcelle	2/3	8	67
couverture de 3/4 de la parcelle	3/4	9	75
couverture de la totalité de la parcelle	All	10	100

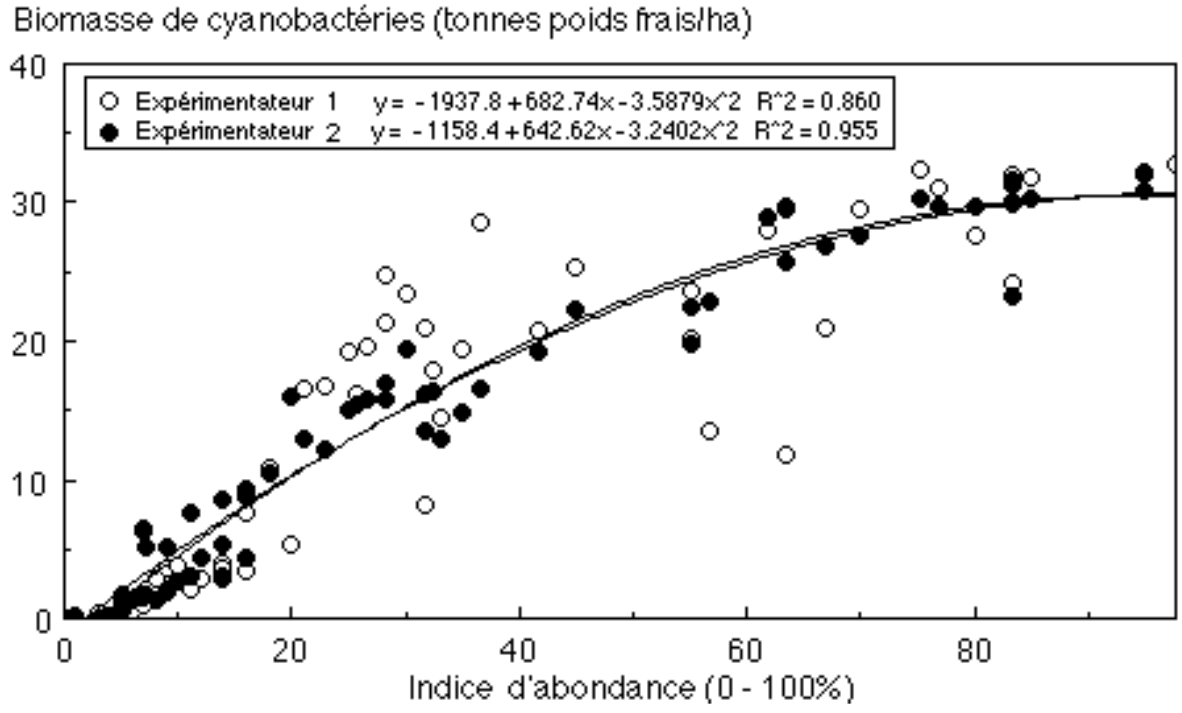


Figure 4. 8 Corrélation entre la mesure directe de la biomasse des cyanobactéries dans une rizière et les indices d'abondance estimés par un opérateur inexpérimenté (1) ou entraîné (2)

4.3.2. Méthodes indirectes

4.3.2.1. Comptage et estimation du biovolume

Les différents types de microorganismes sont comptés en les regroupant par classes de forme et de taille. Pour chaque classe on estime le biovolume. Les comptages sont multipliés par les biovolumes correspondants et additionnés.

4.3.2.2. Extraction de l'ADN du sol

Les méthodes existantes ne sont pas encore au point sur le plan quantitatif. On peut:

• soit appliquer d'abord des traitements destinés à séparer les microorganismes du sol puis extraire l'ADN de ces microorganismes. Les méthodes disponibles n'extraient qu'environ 30 à 40% des microorganismes du sol, mais l'ADN obtenu est d'excellente qualité.

• soit lyser les microorganismes dans le sol et extraire l'ADN. La méthode permet de récupérer un pourcentage élevé de l'ADN du sol mais cet ADN peut être fortement contaminé par de l'ADN extracellulaire provenant de cellules mortes et de matériel non microbien.

4.3.2.3. Méthodes fondées sur la fumigation du sol

Ces méthodes sont utilisées pour estimer la biomasse totale des microorganismes du sol.

Un échantillon du sol à étudier est traité par des vapeurs de chloroforme, ce qui a pour effet de tuer la majeure partie des microorganismes de l'échantillon qui est ensuite mis à incuber. La différence de minéralisation du carbone ou de l'azote avec un contrôle non traité au chloroforme est proportionelle à la biomasse des microorganismes du sol (Fig. 4.9).

Il existe de nombreuses variantes de cette méthode qui portent sur:

• Le substrat minéralisé mesuré: CO2, NH3, azote total extractible.

• L'utilisation d'une incubation ou d'une extraction directe après fumigation.

• La réinoculation éventuelle du sol traité au chloroforme.

• Les méthodes utilisées pour tuer les microorganismes: méthodes de fumigation ou autres (traitement au four micro-ondes par exemple).

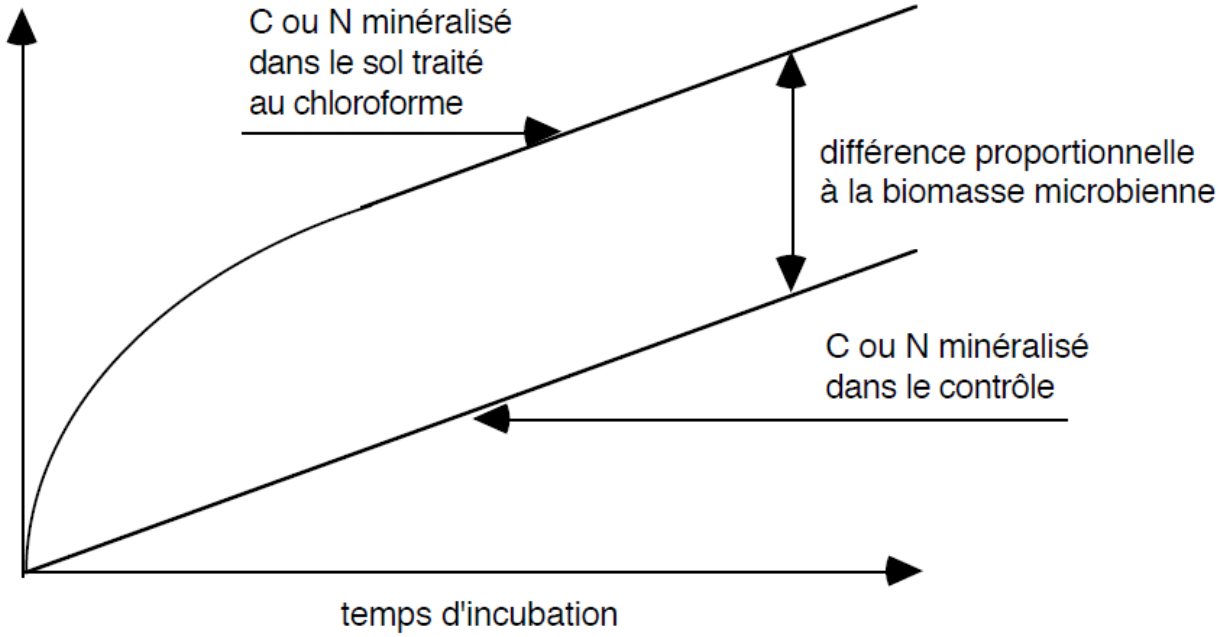


Figure 4. 9 Principe de la détermination de la biomasse microbienne par fumigation-incubation

4.4. MESURES D'ACTIVITE (EXEMPLES)

Nous donnons ci-après trois exemples de principes de mesures d'activités microbiennes dans les sols. Bien évidemment il en existe de nombreuses autres. La liste des groupements fonctionnels du Tableau 2.12 fournit indirectement une liste non exaustive des activités qui peuvent être mesurées.

4.4.1. Respirométrie

La mesure de l'oxygène consommé ou du CO2 produit par un sol exondé (aérobie) fournit une indication sur l'activité microbiologique globale de ce sol. La méthode n'est pas valable pour les sols submergés dans lesquels les activités sont en grande partie anaérobies.

Différents dispositifs ont été utilisés pour mesurer la respiration des sols. Ils peuvent s'appliquer à des échantillons de taille moyenne ou de petite taille (respiromètre Gilson) (Fig 4.10)

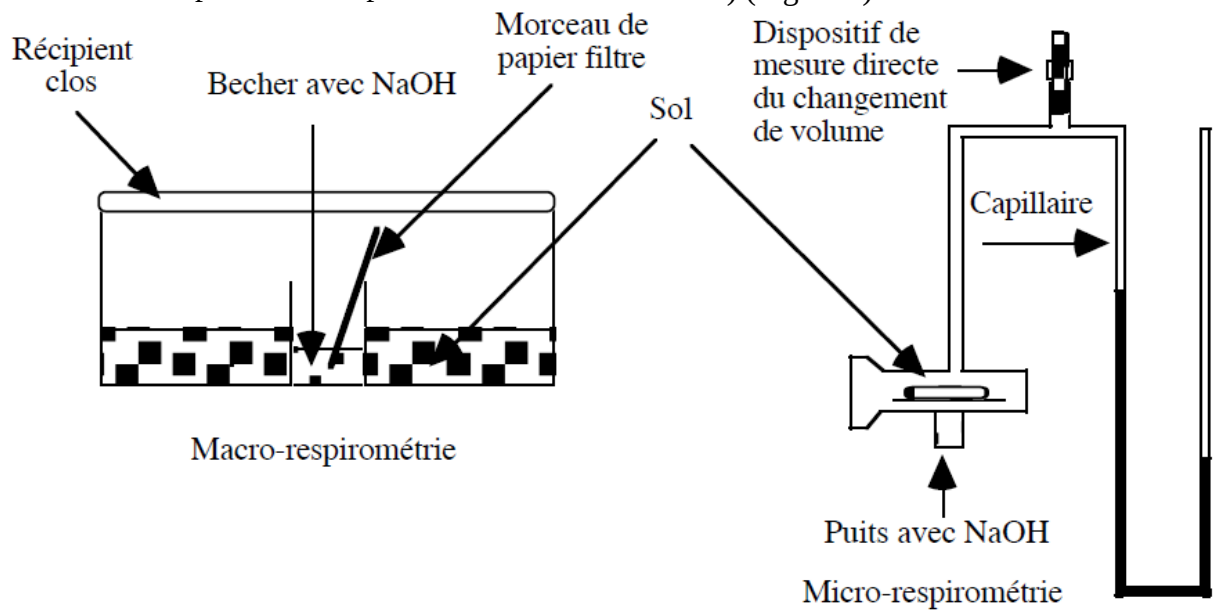


Figure 4. 10 Mesure de la production de CO2 par le sol

4.4.2. Fixation de N2, mesure de la réduction de l'acétylène

4.4.2.1. Principe de la méthode

La nitrogénase, qui réduit l'azote moléculaire en ammoniaque,

$$N \equiv N + 3H_2 \rightarrow 2\ NH_3$$

peut également réduire d'autres substrats, parmi lesquels:

l'acétylène	$HC\equiv CH$	->	$H_2C=CH_2$
l'allène	$H_2C=C=CH_2$	->	$H_3C\text{-}CH=CH_2$
l'ion cyanure	$[C\equiv N]^-$	->	$CH_4 + NH_3$
le cyanogène	$N\equiv C\text{-}C\equiv N$	->	CH_4
l'azide	$N\equiv N\text{-}N$	->	$N_2 + NH_3 + N_2H_4$
l'oxyde nitreux	$N\equiv N\text{-}O$	->	$N_2 + NH_3$
l'ion hydrogène	$H+$	->	H_2

L'acétylène est un substrat plus compétitif que l'azote pour la nitrogénase. Pour cette raison,
lorsqu'on place un organisme fixateur d'azote au contact d'une atmosphère contenant de l'acétylène, l'acétylène est réduit en éthylène et le taux de réduction n'est pas affecté par la présence d'azote si l'acétylène est en quantité saturante pour l'enzyme. Ceci est généralement obtenu pour des teneurs d'acétylène dans l'air de 5 à 15 %.
La valeur théorique du rapport acétylène réduit / azote fixé est de 3/1:

$$N\equiv N \rightarrow 2\ NH_3$$
$$HC\equiv CH \rightarrow H_2C=CH_2$$

Pour la mesure, le système (culture, sol, carottes de sol, racines, système racinaire de plante, etc.) est mis en contact d'acétylène (10 à 15 % en volume du gaz) et l'atmosphère est échantillonnée à des intervalles de temps réguliers pour y mesurer la quantité d'éthylène produite (Fig. 4.11)
Plusieurs techniques ont été mises au point pour la mesure de l'activité fixatrice de systèmes solplantes *in situ* (cloches, sacs plastiques). Ces dispositifs, n'étant pas clos, nécessitent l'utilisation d'un gaz traçeur (propane) pour estimer les fuites durant l'incubation (Fig 4.12)

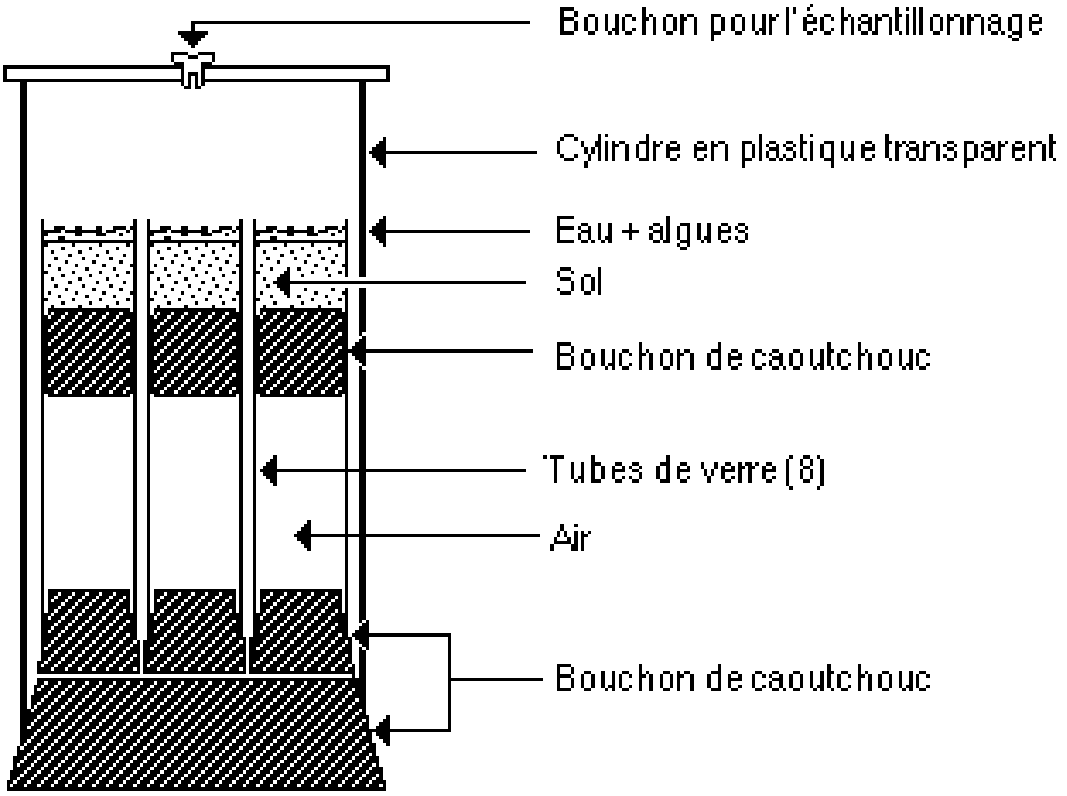


Figure 4. 11 Dispositif pour la mesure de l'ARA sur des carottes de sol de rizière

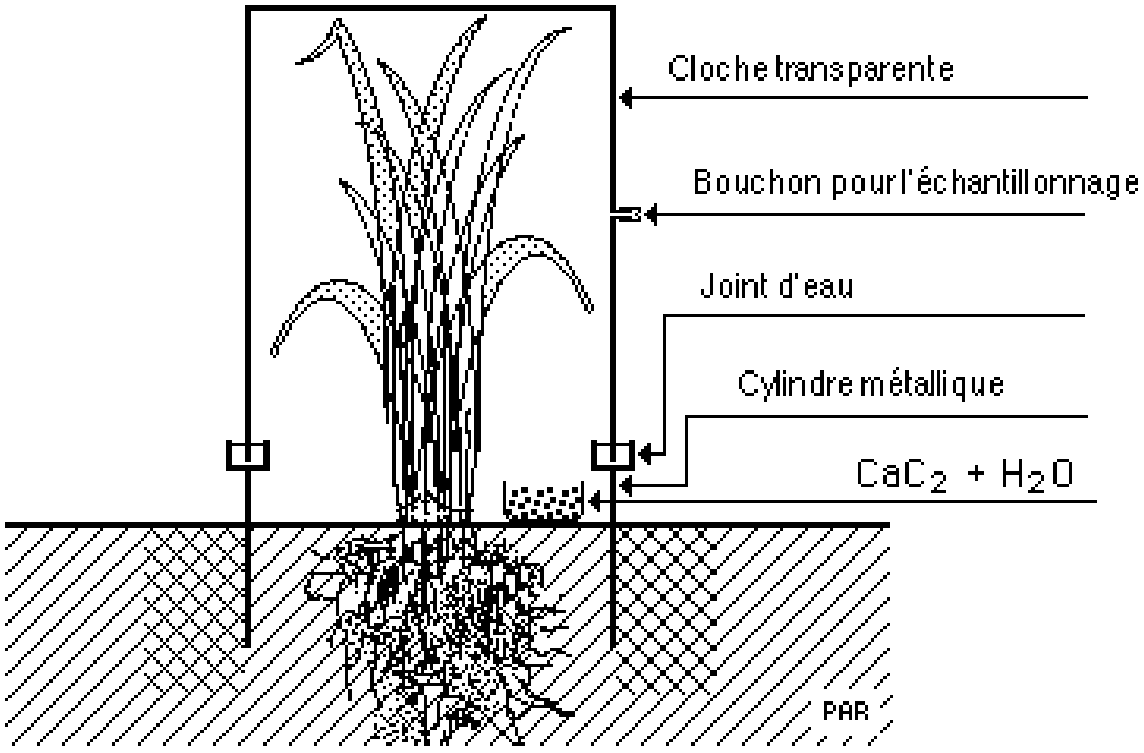


Figure 4. 12 Dispositif pour la mesure de l'ARA *in situ*.

4.4.2.2. Limitations de la méthode

• Dans la cellule, l'ammoniaque produit est rapidement converti en amides et acides

aminés, cette incorporation nécessitant des squelettes carbonés. En conditions limitantes en carbohydrates, ces composés carbonés sont également utilisés comme source d'énergie, et l'incorporation peut être moins rapide que la réduction de l'azote en ammoniaque. L'augmentation du pool d'ammoniaque peut alors réprimer la synthèse de la nitrogénase, dont le niveau est ainsi régulé dans la cellule.

Une longue exposition à l'acétylène peut abaisser le niveau du pool d'ammoniaque. Il en résulte une dérépression de la nitrogénase, donc une mesure par excès de l'activité fixatrice du système.

• L'éthylène est à la fois une phytohormone puissante et un inhibiteur de la croissance de certaines bactéries fixatrices libres.

• L'éthylène peut être produit dans le sol en absence d'acétylène, à partir de la matière organique, ou par les plantes sénescentes ou endommagées.

• L'éthylène peut être oxydé par les méthanotrophes.

• L'acétylène est 50 fois plus soluble que l'azote dans l'eau. Dans les sols submergés, cette différence de solubilité peut entraîner une surestimation de l'activité fixatrice.

• Lors de mesures à la lumière, le fait d'incuber les échantillons dans une enceinte close entraîne rapidement une augmentation importante de la température par effet de serre et une inhibition de l'activité fixatrice.

• La nitrogénase ayant également une fonction hydrogénase, le rapport acétylène réduit / azote fixé est souvent supérieur à 3.

Toutes ces réserves étant faites, la méthode donne une estimation de l'activité fixatrice d'autant plus fiable que le système est moins perturbé par l'échantillonnage et que les conditions expérimentales permettent un accès de l'acétylène à l'organisme fixateur similaire à celui de l'azote dans les conditions naturelles.

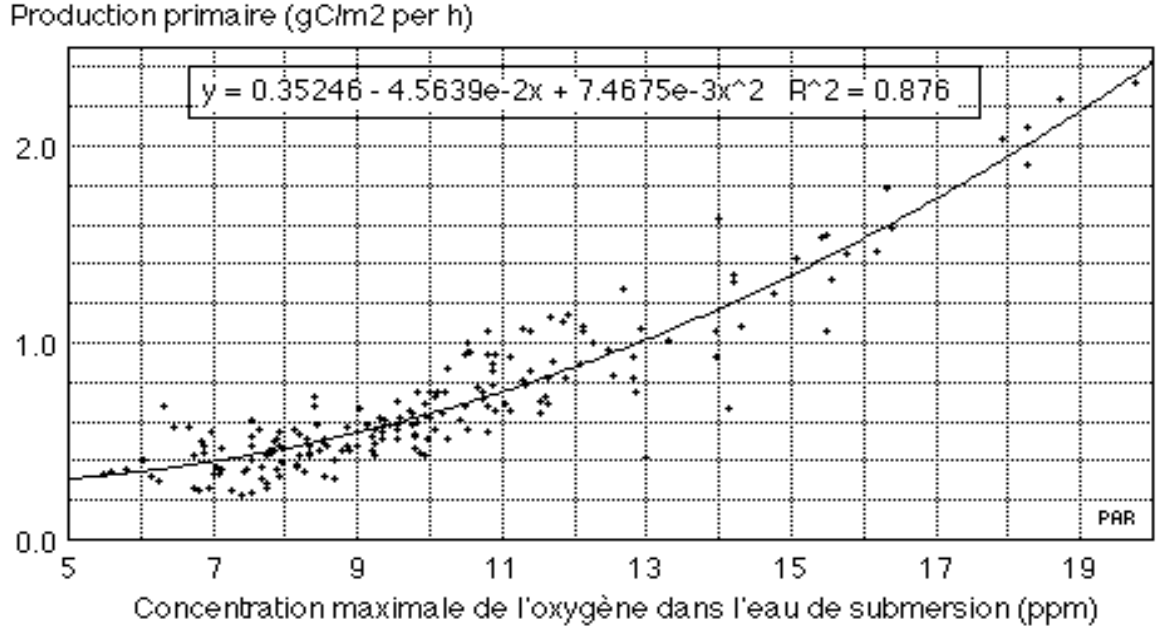


Figure 4. 13 Corrélation entre la concentration maximale de l'eau de submersion et la production primaire dans l'eau d'une rizière

4.4.3. Mesure de la production primaire apparente des microalgues

Cette méthode est présentée comme un exemple de la possibilité de substituer à une mesure rigoureuse mais fastidieuse, une mesure moins précise mais nettement plus rapide.

Une méthode classique d'estimation de la production primaire apparente (g C m-2 h-1) par les algues dans l'eau d'une rizière consiste à mesurer pendant 24 h les variations horaires de la concentration en oxygène de l'eau de submersion et de sa température. L'oxygène consommé par la respiration et les divers processus d'oxydation dans le sol est estimé par les mesures nocturnes. La production primaire apparente est calculée en fonction de la profondeur de l'eau et des variations diurnes corrigées en fonction des variations nocturnes.

Dans la pratique, on s'aperçoit, que pour un écosystème donné, il existe une assez bonne corrélation entre la production primaire et la teneur en oxygène de l'eau de submersion mesurée en milieu de journée lorsque l'activité photosynthétique est maximale (Fig. 4.13). On peut donc remplacer une série de mesures sur 24 h par une mesure unique.

4.5. PROBLEMES D'ECHANTILLONNAGE ET ANALYSE STATISTIQUE DES MESURES

Les distributions des populations de microorganismes dans les sols sont très fréquemment assimilables à des lois log-normales (les logarithmes des valeurs mesurées sont répartis suivant une loi normale). Il en est de même pour leurs activités. Dans la pratique cela se traduit par:

1. des histogrammes de distribution dissymétriques et non en cloche (Fig. 4.14; voir aussi Fig. 3.14).
2. des répétitions susceptibles de varier dans de très larges limites. Par exemple: pour cinq répétitions de mesures d'activité fixatrice de N2 on peut parfaitement obtenir les valeurs suivantes exprimées en mmol d'acétylène m-2 h-1: 10, 14, 25, 26, 412. La valeur 412 n'est pas un artéfact expérimental ou une erreur technique et doit être prise en compte dans l'analyse des résultats.

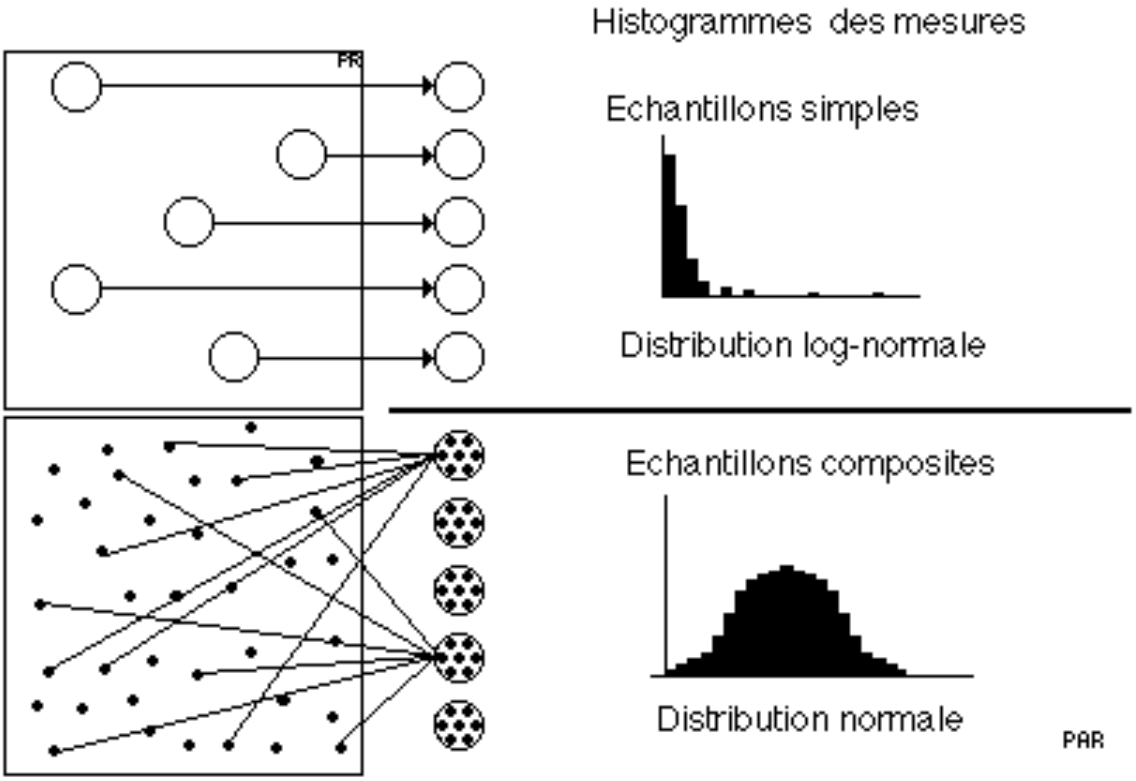


Figure 4. 14 Effet de l'utilisation d'échantillons composites sur la distribution des mesures en microbiologie du sol

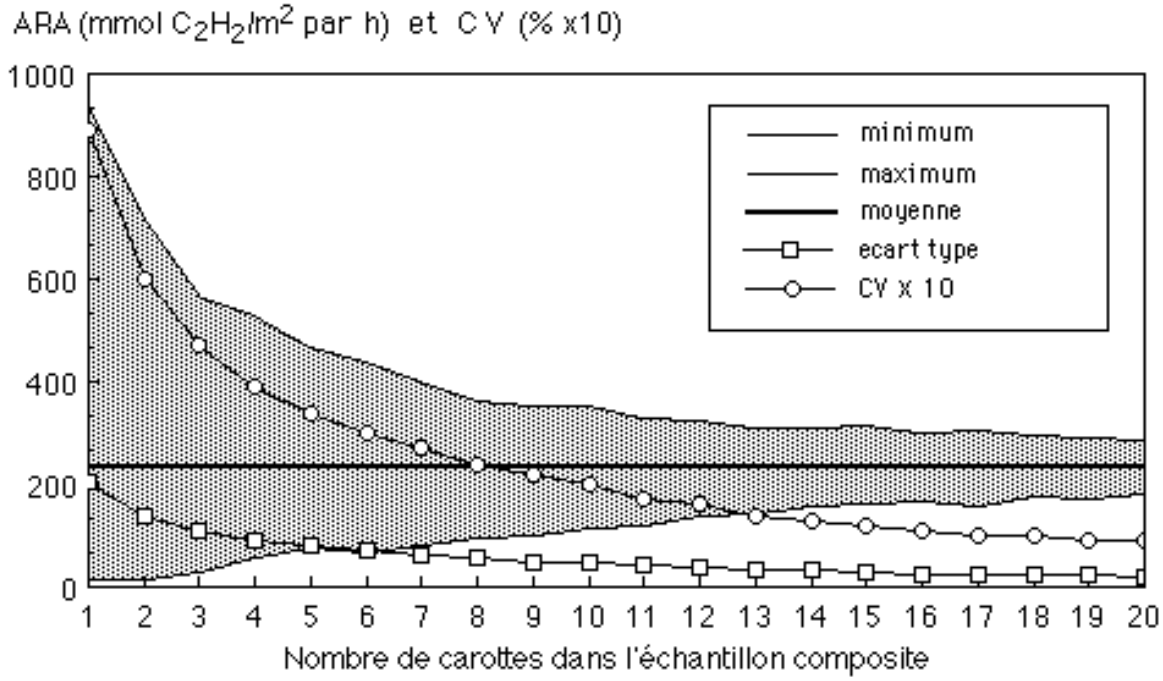


Figure 4. 15 Moyennes, maxima, minima, écart-types et coefficient de variation (CV) de groupes de 230 estimations de la fixation de l'azote (ARA) dans une parcelle de 16 m2 , calculés à partir du choix au hasard de 2 à 20 valeurs parmi 25 mesures ponctuelles dans la parcelle (valeurs 2 à 20 de l'axe des x). Les 25 valeurs individuelles correspondent à la valeur 1 de l'axe des x.

• des mesures pour lesquelles la moyenne n'est pas indépendante de la variance. Ceci est particulièrement important pour l'analyse statistique des données car l'utilisation de méthodes statistiques paramétriques nécessite que la moyenne soit indépendante de la variance.

Les implications de la distribution log-normale des populations et des activités microbiennes dans les sols sont les suivantes:

• On a intérêt à travailler sur des échantillons composites afin d'atténuer les variations entre répétitions.

La figure 4.14 donne une représentation schématique des effets d'un échantillonnage composite sur la distribution des données. La figure 4.15 montre l'effet du nombre de sous-échantillons sur la représentativité de mesures de fixation d'azote.

• Il faut vérifier le type de distribution des données afin de pouvoir leur faire subir la transformation mathématique adéquate pour les normaliser avant d'effectuer des tests statistiques paramétriques. De très nombreux auteurs négligent ce point important. Leurs calculs de moyenne, écart type et intervalle de confiance ne sont pas valables, de même que les interprétations correspondantes de la signification de différences observées entre populations ou activités microbiennes.

Le paragraphe suivant résume la méthode de transformation permettant de normaliser les données.

La non-normalité de la distribution des organismes dans les environnements terrestres ou aquatiques se traduit par une corrélation linéaire entre les moyennes et les variances de groupes de répétitions de mesures. Les points (m; s2) (m = moyenne; s2 = variance) portés sur un graphique en échelle log-log se répartissent suivant une droite (Fig. 4.16).

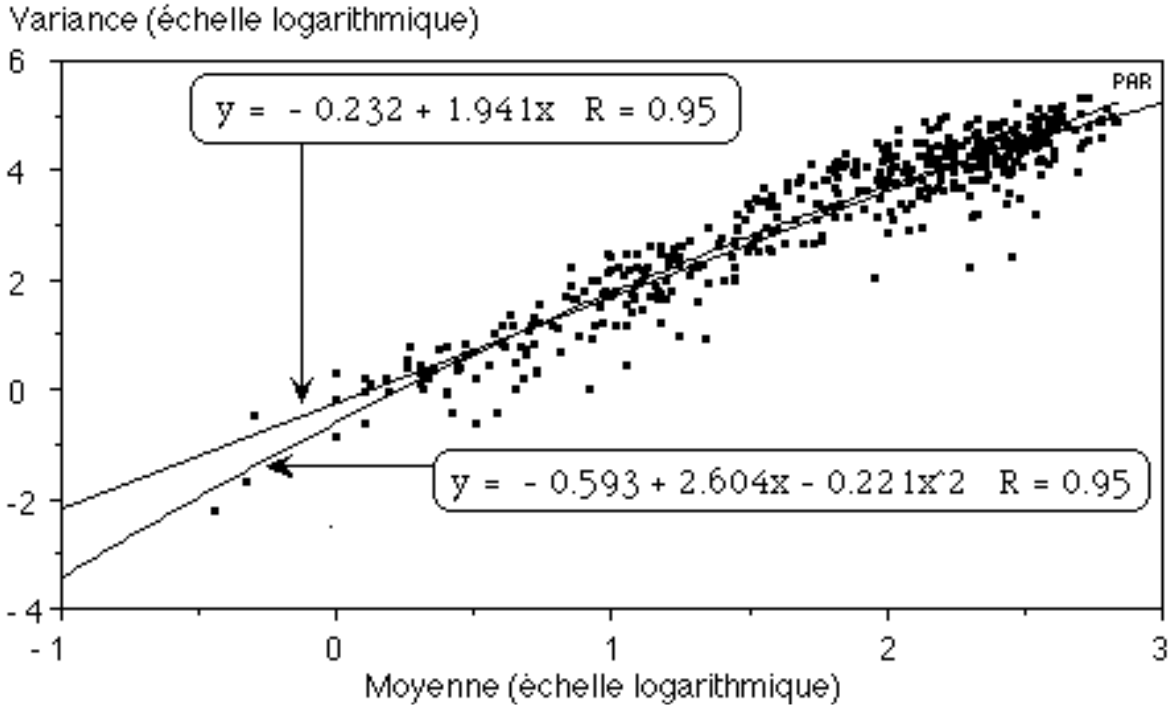


Figure 4. 16 Corrélation entre moyennes et variances de groupes de cinq mesures de réduction d'acétylène *in situ*.

Chaque groupe de mesures correspond à cinq parcelles de 16 m2 constituant les répétitions d'un même traitement. Chaque mesure dans une parcelle a été effectuée en utilisant le dispositif de la figure 4.12, c'est-à-dire un échantillon composite de 8 carottes de sol.

Ceci indique que la variance est fonction de la moyenne (loi de Taylor).

$$s^2 = a\, m^b$$

soit

$$\log s^2 = \log a + b \log m$$

La pente de la droite de régression (b) est caractéristique du type de distribution et permet de calculer la transformation qui normalise les données.

• une pente (b) voisine de 1 caractérise les distributions de Poisson qui sont normalisées par la transformation:

$y = x^{1/2}$

• une pente (b) comprise entre 1 et 2 caractérise les distributions binomiales qui sont normalisées par la transformation:

$y = x^{1-(b/2)}$ ou $y = \log_{10}(x + x_0)$

(x0 est une constante que l'on peut déterminer par une méthode graphique)

• une pente (b) de 2 caractérise les distributions log-normales qui sont normalisées par la transformation:

$y = \log 10x$

ou $y = \log_{10}(x+1)$ si certaines valeurs sont nulles**.**

Dans la pratique, les distributions avec une pente comprise entre 1,7 et 2,4 peuvent être considérées comme log-normales. Ces distributions sont caractérisées par un écart-type voisin de la moyenne et un coefficient de variation voisin de 100%. La figure 4.17 montre comment la transformation logarithmique normalise la distribution de comptages de cyanobactéries dans des sols de rizière. On peut bien entendu éviter la transformation en utilisant des tests statistiques non paramétriques fondés sur le rang des valeurs et non les valeurs elle-mêmes.

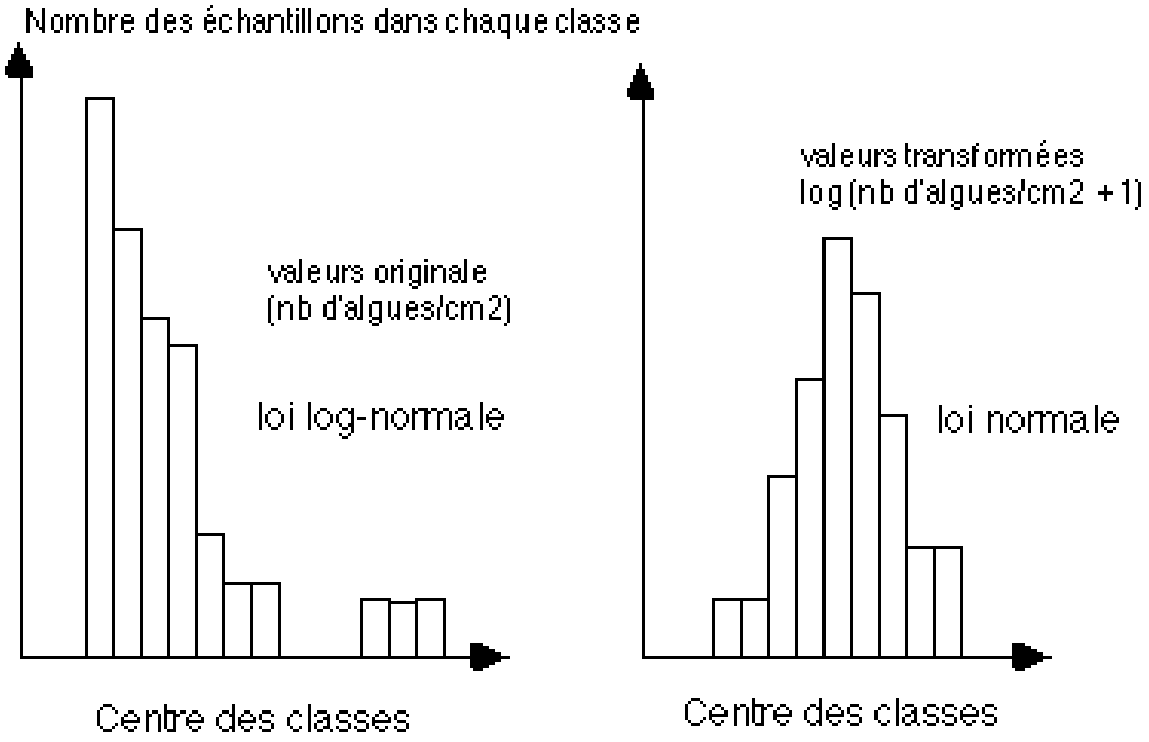


Figure 4. 17 Histogrammes de comptages de cyanobactéries dans 40 sous-parcelles d'une rizière (valeurs originales et transformées)

4.6. METHODES MOLECULAIRES

Au cours des dernières années les méthodes moléculaires ont fait des progrès considérables qui ouvrent de nouvelles perspectives en écologie microbienne du sol et devraient en particulier permettre aux microbiologistes de s'affranchir de la limitation due à la notion de bactéries cultivables.

En microbiologie du sol le principal problème est celui de l'extraction de l'ADN du sol et l'obtention d'un matériel suffisamment pur représentatif qualitativement et quantitativement de la microflore du sol

4.6.1. Extraction de l'ADN du sol.

Deux approches sont utilisées pour extraire l'ADN du sol : (1) l'extraction indirecte qui consiste en l'extraction des cellules du sol, suivie de leur lyse puis de la récupération de l'ADN et (2) l'extraction directe qui consiste à lyser les cellules dans l'échantillon de sol avant d'en extraire l'ADN.

4.6.1.1. Extraction indirecte.

Les techniques courantes d'extraction des cellules microbiennes du sol consistent à mélanger ce dernier avec un tampon d'extraction sous agitation mécanique dans un mixeur du type Waring Blender. On peut également utiliser l'ultrasonication des échantillons. Les particules de sol sont ensuite sédimentées et les cellules microbiennes sont purifiées et concentrées par centrifugations successives. Une des limites de cette technique est la lyse des cellules si la durée et l'amplitude de la sonication ne sont pas contrôlées. Leur optimum doit être déterminé pour chaque type de sol. Après extraction on peut dénombrer les cellules en microscopie en utilisant des techniques de coloration telle que l'acridine orange ou de dénombrer spécifiquement un microorganisme par immunotluorescence.

L'ADN est extrait ensuite par lyse des cellules soit chimique (SDS) soit enzymatique (lysozyme). Cette méthode

d'extraction permet d'obtenir un haut degré de pureté de l'ADN extrait à partir d'une préparation relativement propre de cellules. Mais, seuls les petits échantillons peuvent être traités et ce procédé est long par rapport à la lyse directe des cellules dans le sol. Ceci est à considérer lorsqu'un grand nombre d'échantillons doivent être analysés. De nombreuses étapes d'agitation et de centrifugation sont requises, multipliant les risques de contamination par de l'ADN étranger susceptible de fausser le résultat lors de la détection par une technique moléculaire.

4.6.1.2. Extraction directe de l'ADN du sol.

L'extraction directe peut être réalisée par lyse chimique ou par lyse physique. Cette technique extrait l'ADN bactérien, mais aussi celui des champignons, algues, protozoaires et autres organismes présents dans l'échantillon.

Les traitements peuvent combiner une lyse chimique (SDS à 70°C) et une lyse mecanique avec des billes de verre ou un traitement au lysosyme suivi de chocs thermiques ou une lyse au lysosyme suivi d'un broyage avec des billes de verre. Certains protocoles sont fondés uniquement sur des traitements physiques (agitation, chocs thermiques, microondes, ultrasonication) appliqués seuls ou combinés.

La lyse physique semble être le protocole le plus approprié pour un travail de routine.

Le nombre réduit de manipulations limite le risque de contamination et permet de travailler sur un grand nombre d'échantillons. La lyse directe présente l'inconvénient de co-extraire avec l'ADN un certain nombre de composés phénoliques et humiques du sol. Ces composés, inhibiteurs de la Taq polymérase et des enzymes de restriction, imposent une étape de purification des extraits d'ADN pour poursuivre l'analyse par une technique moléculaire.

4.6.2. Purification de l'ADN extrait du sol.

Les acides humiques et les composés phènoliques du sol sont des éléments difficiles à éliminer des extraits d'ADN. Le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) est un produit qui adsorbe les acides humiques et les impuretés phénoliques. Son ajout au tampon d'extraction améliore donc le degré de pureté de l'extrait d'ADN. Les composés du sol se solubilisant mieux dans les milieux basiques, un pH neutre ou légèrement acide du tampon d'extraction donne également une meilleure pureté de l'extrait.

Différentes techniques de purification, plus ou moins efficaces, ont été développées. Celles utilisant les colonnes Elutip d, l'électroélution , le gradient sur chlorure de césium ou les colonnes de Sephadex G-200 paraissent efficaces. Les extraits d'ADN ainsi purifiés peuvent être hybrides, digérés ou amplifiés. Cependant, la purification doit comporter un nombre réduit d'étapes afin de limiter les risques de contamination. Pour cette raison, les techniques utilisant les colonnes Elutip d ou de Sephadex G-200 paraissent plus adaptées, la purification pouvant être réalisée en conditions stériles.

4.6.3. Quantification de l'ADN du sol.

Une fois extrait du sol, avant ou après l'étape de purification, la quantification de l'ADN peut être requise. La teneur en ADN total est une caractéristique du sol. Après purification, la connaissance de la concentration en ADN de la solution purifiée permet un contrôle lors de l'application de différentes techniques moléculaires.

L'ADN peut être quantifié par fluorimétrie. Le colorant de Hoechst 33258 (2-[2-(4 hydroxyphenyl)- 6-benzimidazolyl]-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazaol.3HCl) est utilisé en tant que fluorochrome fluorescent . Il présente un maximum d'excitation à 356 nm et un maximum d'émission à 492 nm.

Lorsque l'ADN se complexe au colorant une augmentation de fluorescence à 458 nm est enregistrée pour une excitation à 356 nm. Le colorant de Hoechst est utilisé comme un fluorochrome d'ADN, aucune interférence avec des protéines ou des ARN n'ayant été mise en évidence à ce jour. La mithramycine permet également de doser l'ADN par fluonmétrie. Elle se complexeà la guanine de l'ADN double brin et peut alors être détectée par fluorescence.

Il est également possible de doser une solution d'ADN purifiée par spectrophotométrie (une unité de densité optique à 260 nm correspond à une concentration de 50 ~g d'ADN/ml. Cependant, lorsque les extraits d'ADN du sol, renferment des composés humiques et phénoliques, ce dosage est impossible, car le spectre d'absorption de ces composés interfère avec celui de l'ADN.

Les extraits d'ADN du sol peuvent être dosés par spectrophotométrie après réaction colorimétrique avec la diphénylamine. La diphénylamine se complexe au désoxyribose de l'ADN, et développe une réaction colorimétrique, dosée à 600 nm. Malgré un temps d'incubation de 18 à 24 h, cette technique permet le dosage d'un grand nombre d'échantillon et est reproductible pour des temps d'incubation identiques.

5. INTERACTIONS ENTRE MICROORGANISMES DANS LE SOL

Lorsque plusieurs microorganismes cohabitent dans le même milieu, ils forment une association microbienne dans laquelle la croissance de chaque espèce est plus ou moins influencée par celle des autres. On distingue 6 catégories de relations entre microorganismes (Fig. 5.1).

5.1. NEUTRALISME

Les deux populations se multiplient sans aucune interaction. Il y a peu d'exemples de neutralisme en microbiologie du sol; en effet il est difficile pour 2 microorganismes de se développer de façon indépendante à la même place.

5.2. COMPETITION

Les deux populations sont en compétition pour un même substrat ou pour un même habitat.

En culture non renouvelée la densité des deux populations sera, en fin de croissance, inférieure à la densité obtenue en culture pure.

En culture continue, le microorganisme ayant le taux de croissance le plus faible sera éliminé.

Dans le sol, la compétition peut intervenir au niveau du substrat énergétique, d'ions minéraux nécessaires à la croissance (phosphate, magnésium) ou d'oligoéléments (cobalt, fer).

5.3. MUTUALISME

Les deux populations ont une influence bénéfique l'une sur l'autre, éventuellement l'association est nécessaire à la survie des deux espèces. Ce type d'association est fréquent dans le sol, en raison des liens trophiques entre plusieurs groupements fonctionnels: fixateurs d'azotes et bactéries photosynthétiques, cellulolytiques et algues, sulfato-réductrices et sulfo-oxydantes, bactéries syntrophes avec bactéries méthanogènes ou sulfato-réductrices. La densité des deux populations en fin de culture sera supérieure à la densité obtenue en culture pure.

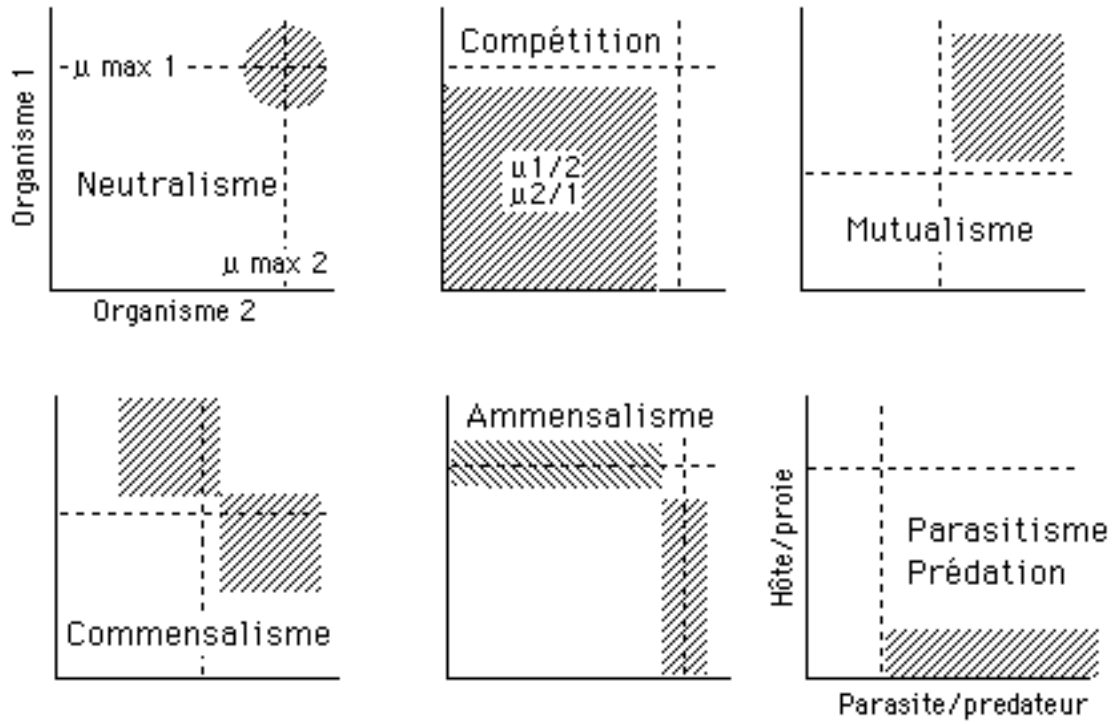


Figure 5. 1 Taux de croissance de populations mixtes en fonction du type d'association

*La zone hachurée correspond à l'ensemble des points ayant comme coordonnées le taux individuel maximum de croissance de chacun des deux organismes de la culture. Les droites en pointillé indiquent le taux maximum de croissance de chaque partenaire en culture axénique.

5.4. COMMENSALISME

L'une des populations est bénéfiquement influencée par l'autre, la seconde n'étant pas affectée. On trouve des exemples de commensalisme entre certaines algues qui favorisent la croissance de bactéries sans que leur propre taux de croissance soit modifié par la présence de la bactérie. Cette observation est confirmée par le fait que l'extrait acellulaire d'algue possède le même effet favorable.

5.5. AMMENSALISME

L'une des populations est inhibée, l'autre non affectée. Un exemple classique est l'inhibition de la croissance d'une espèce par une substance antibiotique sécrétée dans le milieu par une autre. Ces antibiotiques sont en général libérés dans le milieu en fin de phase exponentielle. Une association de type ammensalisme existe quand les métabolites excrétés par une espèce inhibent la croissance d'autres espèces: c'est le cas des ions SH-- formés par les bactéries sulfato-réductrices qui inhibent la croissance de nombreux microorganismes.

5.6. PARASITISME OU PREDATION

Il n'y a pas de frontière nette entre parasitisme et prédation: l'ingestion d'un petit organisme par un plus gros est appelé prédation, la destruction d'un gros organisme par un petit est le parasitisme.

Le parasitisme existe entre certaines bactéries dans le sol, par exemple entre les *Bdellovibrio* qui se fixent sur la membrane d'autres bactéries, pénètrent dans leur cytoplasme, s'y multiplient et font éclater la cellule hôte en libérant des bactéries filles. Tous les virus sont des parasites obligatoires.

La plupart des protozoaires du sol sont des prédateurs de bactéries. Cette prédation

joue certainement un rôle dans l'équilibre entre les groupes de microorganismes dans les sols.
De nombreux invertébrés de petite taille sont des prédateurs des micro-algues. Leur rôle est sans doute modeste dans les sols exondés, par contre il devient important dans les sols submergés et en particulier dans les rizières irriguées tropicales où la prédation des algues par le zooplancton est un facteur important du recyclage des éléments nutritifs et de la fertilité du sol.
Le taux de croissance d'un prédateur est fonction de la concentration de la proie dans le milieu.
Dans les rizières on observe généralement un pic de zooplancton quelques jours après le développement maximum des algues vertes unicellulaires qui se multiplient après l'application des engrais azotés et phosphorés dans l'eau de la rizière.

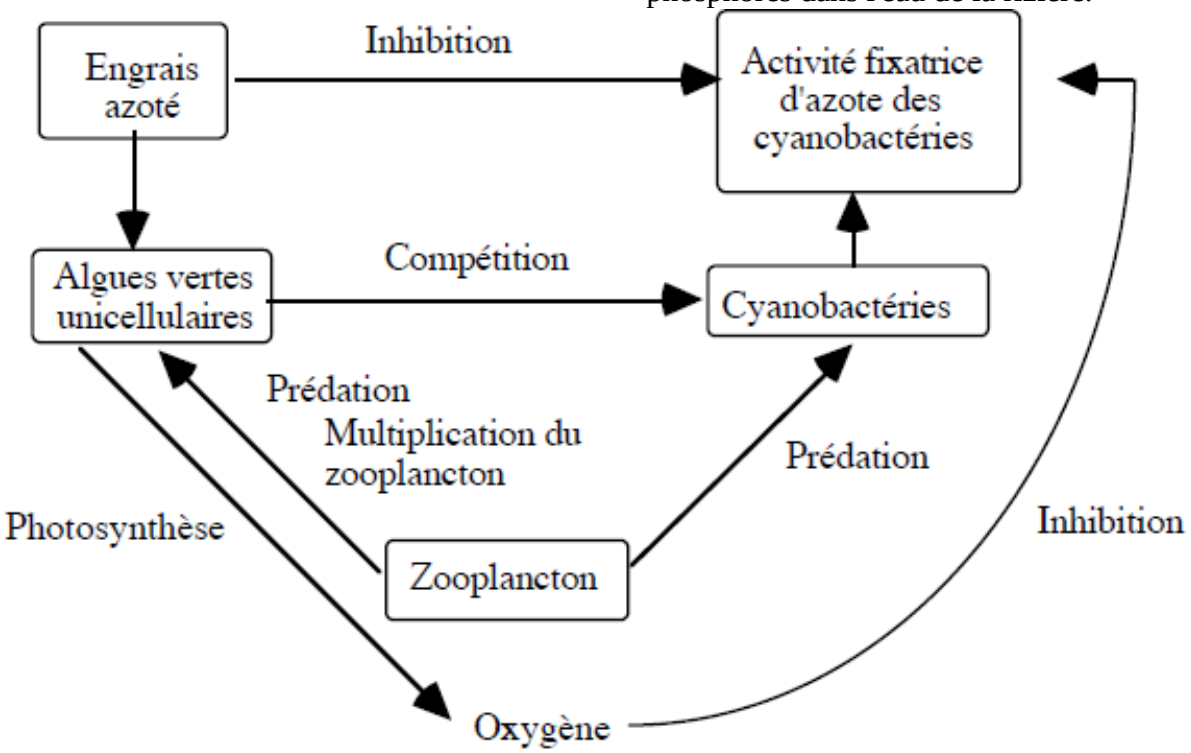


Figure 5. 2 Relations de compétition et de prédation impliquées dans l'inhibition directe et indirecte des cyanobactéries fixatrices d'azote par les engrais azotés

6. RELATIONS ENTRE LES MICROORGANISMES ET LE SOL

La composition et l'activité des populations de microorganismes qui colonisent le sol, en surface et en profondeur, dépendent de ses propriétés physico-chimiques, qui sont-elles mêmes influencées par les facteurs de l'environnement et en particulier les facteurs climatiques.
En retour, les microorganismes exercent leurs effets sur la nature et la forme des composés organiques du sol ainsi que sur certaines de ses propriétés physico-chimiques, en particulier la structure, le pH, et le potentiel d'oxydo-réduction.

6.1. EFFETS DES PROPRIETES DU SOL SUR LA DISTRIBUTION DES MICROORGANISMES

L'étude des relations entre les propriétés physico-chimiques des sols et les différents microorganismes ou groupes de microorganismes telluriques qui les peuplent constitue l'un des aspects principaux de l'écologie microbienne.
Le sujet est trop vaste pour être couvert dans ce cours. Nous ne présentons ci-après que deux exemples caractéristiques.

Le premier résume les relations existant entre les principales propriétés physico-chimiques des sols de rizière d'une part, et les populations d'algues, de cyanobactéries fixatrices d'azote d'autre part (Tableau 6.1).

Le but de cet exemple est de faire ressortir que l'existence d'une corrélation, même hautement significative, entre l'abondance d'une population et une propriété du sol n'implique généralement pas une relation étroite entre les deux variables mais indique plus simplement une tendance.

L'étude des populations de microorganismes phototrophes dans des sols de rizière (Tableau 6.1) montre que les algues eucaryotes sont abondantes dans les sols riches en matière organique (corrélation positive avec les teneurs en C et en N) et que les cyanobactéries fixatrices de N2 sont favorisées par des sols alcalins riches en phosphore assimilable.

Les figures 6.1 et 6.2 montrent clairement que ces corrélations doivent être interprétées comme des tendances et non comme des relations mathématiques. En particulier, pour le pH du sol (Fig. 6.1) la corrélation est nette pour les sols ayant un pH inférieur à 6,5 et disparait aux valeurs supérieures.

Dans le cas du phosphore, la corrélation est due principalement aux sols ayant des valeurs très élevées de P assimilable alors qu'aux valeurs faibles la corrélation est beaucoup moins nette.

Tableau 6.1. Corrélations entre les propriétés physico-chimiques de 102 sols de rizière et les populations de cyanobactéries et d'algues eucaryotes

	C	N	C/N	P	CEC	pH	Total Algues+ cyanob.	Cyanob. fixatrices de N_2	Rapport Total/ fixatrices
Carbone	**1**	+ +	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+ +	n.s.	+ +
Azote		**1**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+ +	n.s.	+
C/N			**1**	- -	n.s.	n.s.	n.s.	-	+
P assimilable				**1**	n.s.	n.s.	n.s.	+ +	n.s.
CEC					**1**	+ +	n.s.	+ +	n.s.
pH						**1**	n.s.	+ +	- -

n.s. : non significatif

+ + / + / - - / - / : Corrélations positives ou négatives à 1% et 5% respectivement.

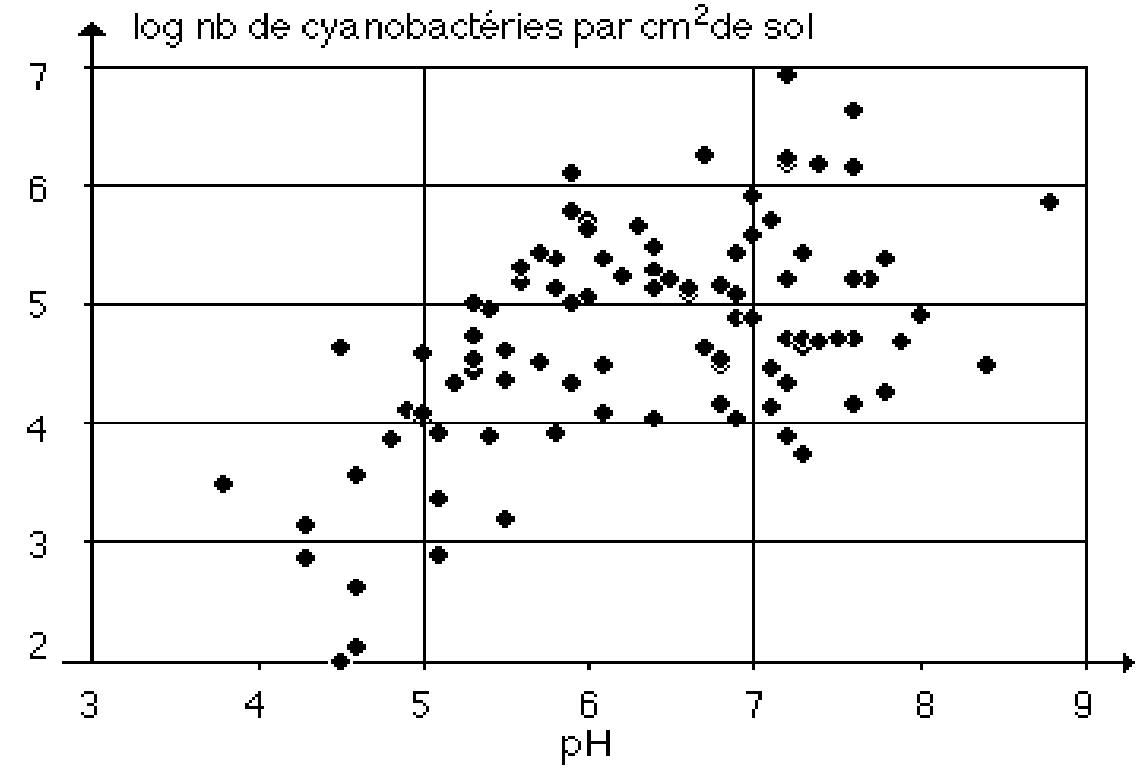


Figure 6. 1 Corrélation entre la densité des populations de cyanobactéries fixatrices de N2 et le pH dans 102 sols de rizières

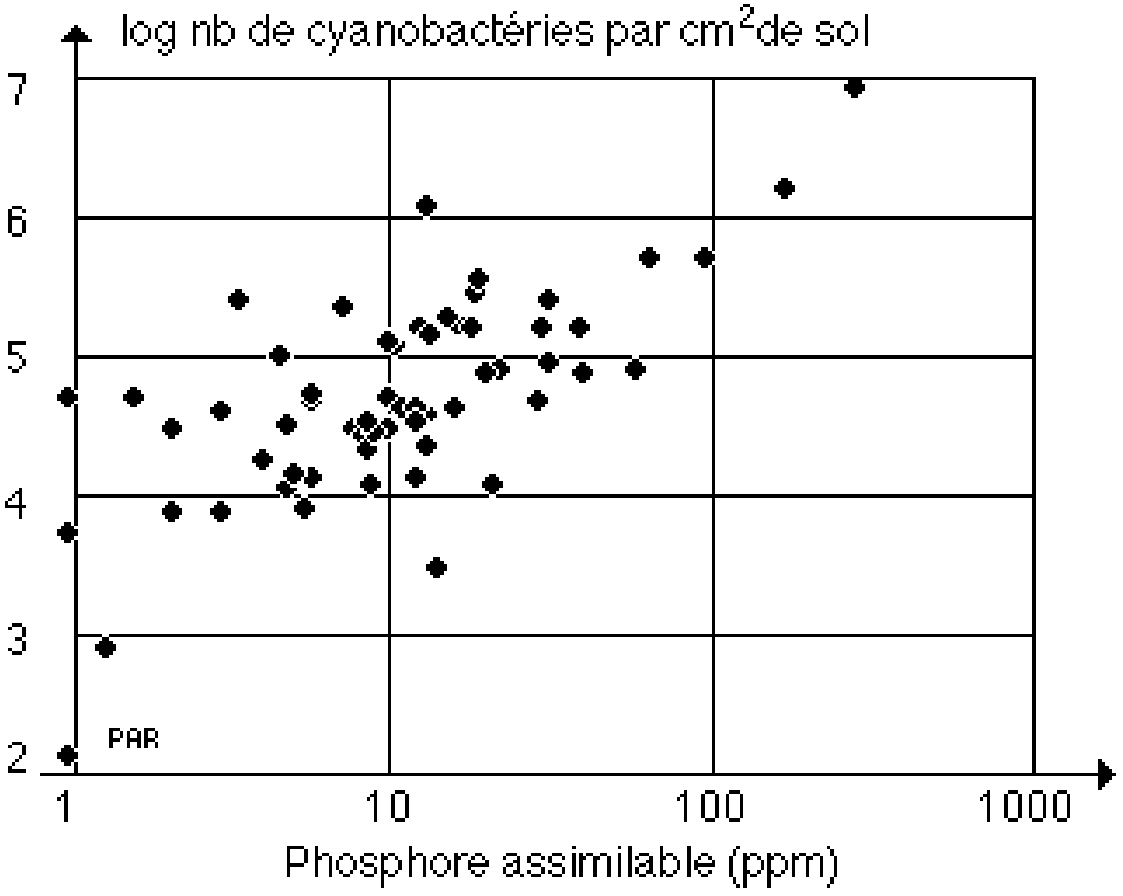


Figure 6. 2 Corrélation entre la densité des populations de cyanobactéries fixatrices de N2 et la teneur en phosphore assimilable dans 102 sols de rizières

Tableau 6.2. Corrélation entre les propriétés physico-chimiques et les populations de bactéries méthanogènes dans 29 sols de rizière.

	log nb méthanogènes par g de sol	log de la production potentielle de méthane[a]
Argile (%)	- 0.488 **	- 0.524
Limon (%)	- 0.227	- 0.145
Sable (%)	+ 0.491 **	+ 0.486 **
Capacité d'échange (dS/m)	- 0.543 **	- 0.384 *
pH 7 jours aprés submersion	+ 0.589 **	+ 0.522 **
Eh 7 jours aprés submersion (mV)	- 0.661 **	- 0.646 **
Carbone (%)	- 0.067	- 0.071
Azote total (%)	+ 0.044	+ 0.192
C/N	- 0.299	- 0.400 *
SO_4^{2-}[avant submersion] (mg/kg)	- 0.437 *	- 0.265
NO_3^- [avant submersion] (mg/kg)	- 0.235	+ 0.005
Cl^- [avant submersion] meq/100g)	- 0.496 **	- 0.358
Nb de bactéries dénitrifiantes	+ 0.305	+ 0.153
Dénitrification potentielle[b]	- 0.637 **	- 0.509 **
Nb de sulfato-réducteurs	- 0.144	- 0.071
Indice de sulfato-réduction[c]	- 0.257	- 0.227
Croissance du riz[d]	+ 0.321	+ 0.473 **

[a]méthane produit pendant une incubation anérobie du sol à 37oC entre 8 et 12 jours après submersion;
[b]dénitrification de 100 mg/kg N-NO3 (KNO3) à 30ºC;
[c] % de pieds de riz tués dans des conditions de croissance standardisées favorisant la sulfato-réduction;
[d] poids sec de grain produit dans des expériences en pot;
* et ** : corrélation significative à 1 et 5% respectivement (les données ont été transformées avant analyse).

Le deuxième exemple est celui d'une étude des relations entre la microflore méthanogène de 29 sols de rizière du Sénégal avec un certain nombre de propriétés physico-chimiques, agronomiques et microbiologiques de ces sols (Tableau 6.2). Cet exemple est choisi pour montrer les limitations des études qui ne considérent que des corrélations simples. Les résultats montrent, entre autres, une corrélation négative entre les teneurs en Cl- avec les densités de méthanogènes. Par contre, on n'observe pas de corrélation entre le carbone du sol et la méthanogénèse, ce qui va à l'encontre d'autres expériences qui indiquent une corrélation positive entre teneur en carbone total et méthanogénèse dans les sols de rizière submergés. En fait, l'échantillon de sols choisi comportait un nombre important de sols salés dont la présence masque l'effet du carbone. Si l'on élimine les données correspondant aux sols salés, la corrélation entre teneur en carbone du sol et populations de bactéries méthanogènes devient significative.
Les caractéristiques du biotope se retrouvent souvent dans les caractères physiologiques des souches qui en sont isolées: résistance à la dessiccation des souches provenant de sols des régions tropicales sèches, optimum de température plus élevé pour les nitrifiants des sols tropicaux.

Les facteurs climatiques influent directement ou indirectement (par leur action sur le sol) sur la distribution des microorganismes.
Quantitativement, on peut penser que la température étant un paramètre essentiel de la croissance des microorganismes, leur nombre sera plus important en zone tropicale qu'en zone tempérée. En effet, si l'humidité est favorable, on multiplie par 5 l'activité microbienne du sol en augmentant la température de 11°C (température moyenne en France) à 25°C (moyenne courante en zone tropicale). Mais la pluviométrie, qui conditionne l'état hygrométrique du sol, joue un grand rôle dans les régions tropicales en limitant le développement des microorganismes par excès ou par manque d'eau.
Qualitativement, on note l'augmentation du nombre des actinomycètes des régions tempérées vers les régions chaudes, alors que les champignons sont plus abondants dans les zones froides. Le nombre absolu et relatif des bacilles diminue avec la latitude et l'altitude. Si la microfaune du sol est en général ubiquiste, cette règle présente des exceptions chez les champignons et même les bactéries: c'est ainsi que les *Beijerinckia* (bactéries fixatrices d'azote) sont limitées aux régions tropicales.

6.2. EFFETS DES MICROORGANISMES SUR LES PROPRIETES DU SOL

6.2.1. Action sur la structure du sol

La structure d'un sol résulte du type de disposition de ses particules élémentaires les unes par rapport aux autres. Ces particules, agglomérées par un ciment d'origine minérale (argile, oxyde de fer, silice amorphe) ou organique (polysaccharides, substances humiques), forment des unités structurales de petite taille (agrégats) réunies en unités plus importantes (macro-agrégats) dans l'édifice structural (sol).
Les microorganismes ont un rôle important dans la genèse et la dégradation de la structure.

6.2.1.1. Genèse de la structure du sol par les microorganismes

La formation des agrégats dans le sol résulte de l'action de composés chimiques produits ou résultant de l'activité microbienne et d'une action mécanique directe des organismes filamenteux.

6.2.1.1.1. Polysaccharides bactériens.

De nombreux microorganismes telluriques (bactéries, algues), et en particulier les bactéries se développant au contact des racines, sont capables de produire des polysaccharides, longues chaines de sucres, parfois branchées. Leur influence sur l'agrégation a été montrée directement, en ajoutant ces composés isolés à partir de bactéries, ou indirectement, soit en favorisant la croissance bactérienne par des apports de matière organique fraiche, soit en ensemençant le sol par des suspensions de bactéries produisant des polysaccharides (*Agrobacterium, Arthrobacter*).
L'agrégation par les polysaccharides pourrait résulter de la formation de liaisons hydrogène ou ioniques avec les particules du sol.

6.2.1.1.2. Substances humiques

Les substances humiques produites par l'action des microorganismes, agissent soit en agrégeant les particules, comme dans le cas des polysaccharides, soit en réduisant la mouillabilité, ce qui favorise la stabilité des agrégats en formation.

6.2.1.1.3. Rôle des champignons et des algues

Le rôle des champignons est direct, les hyphes ou filaments fongiques pouvant emballer les particules élémentaires comme un filet. La longueur des hyphes est en effet très importante dans un sol, elle peut atteindre 10 km par cm3 de sol. Certaines espèces (*Cladosporium,*

Penicillium, Trichoderma) ont des propriétés agrégatives plus nettes.
Certaines algues interviennent de la même façon dans les premiers centimètres des sols sableux, à la fois par une action mécanique (algues filamenteuses) mais également par la production de polysaccharides (algues à gaine mucilagineuse) qui contribuent à la formation d'agrégats.

6.2.1.2. Facteurs écologiques influençant la génèse microbienne de la structure

6.2.1.2.1. Apport de matière organique

Les polysaccharides microbiens étant facilement dégradés dans le sol, leur renouvellement nécessite un apport de matière organique. *In vitro,* le saccharose est le précurseur le plus efficace pour l'agrégation, cependant qu'*in situ* les résidus végétaux à rapport C/N élevé favorisent davantage la genèse de la structure.

6.2.1.2.2. Influence de certains ions

Le calcium, qui a un effet stabilisant sur la matière organique, favorise l'agrégation d'origine microbienne. D'autres cations (NH4, Al, Fe) qui forment des ponts entre polysaccharides et argile ont également un effet stabilisant, mais le fer et l'aluminium, qui créent aussi des liaisons entre les molécules de polysaccharides, peuvent diminuer le pouvoir d'agrégation en réduisant le nombre de sites actifs pour les particules solides.

6.2.1.2.3. Influence de la végétation

La croissance des bactéries qui produisent des polysaccharides semble être nettement favorisée par la présence de la racine, l'effet rhizosphère étant plus marqué que pour les autres bactéries du sol. Par exemple, 95 % des espèces isolées dans le proche voisinage de racines de graminées sont productrices de substances agrégatives, contre 65 % dans le sol nu. L'action des microorganismes permet de transformer une partie des substances excrétées par les racines en polysaccharides hydrosolubles de poids moléculaire compris entre 25 000 et 70 000 et suceptibles de jouer un rô1e important dans l'agrégation des particules du sol.

6.2.1.3. Destruction de la structure

La destruction de la structure du sol en relation avec l'activité microbienne peut résulter de:
• la stimulation de l'activité de la microflore (à la suite de "coupe blanche" de forêt, dénudation, ou brûlis,) sans apport compensateur de matière organique;
• la production de substances hydrofuges ou colmatantes qui entraîne un colmatage des pores, un mauvais drainage et un ralentissement des activités microbiennes.

6.2.2. Action sur le pH

L'activité des microorganismes a généralement pour conséquence une acidification du milieu de croissance; dans le sol cette acidification est compensée par le pouvoir tampon du complexe absorbant.
L'influence de la microflore sur le pH du sol est donc fonction de ce pouvoir tampon et des processus métaboliques acidifiants.

6.2.2.1. Acidification

6.2.2.1.1. Par production de gaz carbonique

L'oxydation aérobie des composés organiques (respiration des microorganismes) produit du
CO2 très soluble qui est en équilibre avec l'acide carbonique (acide faible). Le pH d'une solution saturée en équilibre avec l'atmosphère est de 5,5 , et le pouvoir tampon, par formation de carbonates, est suffisant pour que l'acidification du sol soit limitée.
En fait, l'acidification due à la production de gaz carbonique par la microflore n'est mesurable que dans un milieu très peu tamponné.
Par exemple, dans l'eau de submersion des rizières, la respiration consomme de

l'oxygène et produit du gaz carbonique à un taux pratiquement constant le jour et la nuit, mais la photosynthèse qui produit l'oxygène et consomme le gaz carbonique ne se produit que pendant le jour. On observe alors pendant la nuit une baisse du pH liée à l'augmentation de la teneur en CO2 et une baisse de la concentration en oxygène dissous (Fig 6.3.).

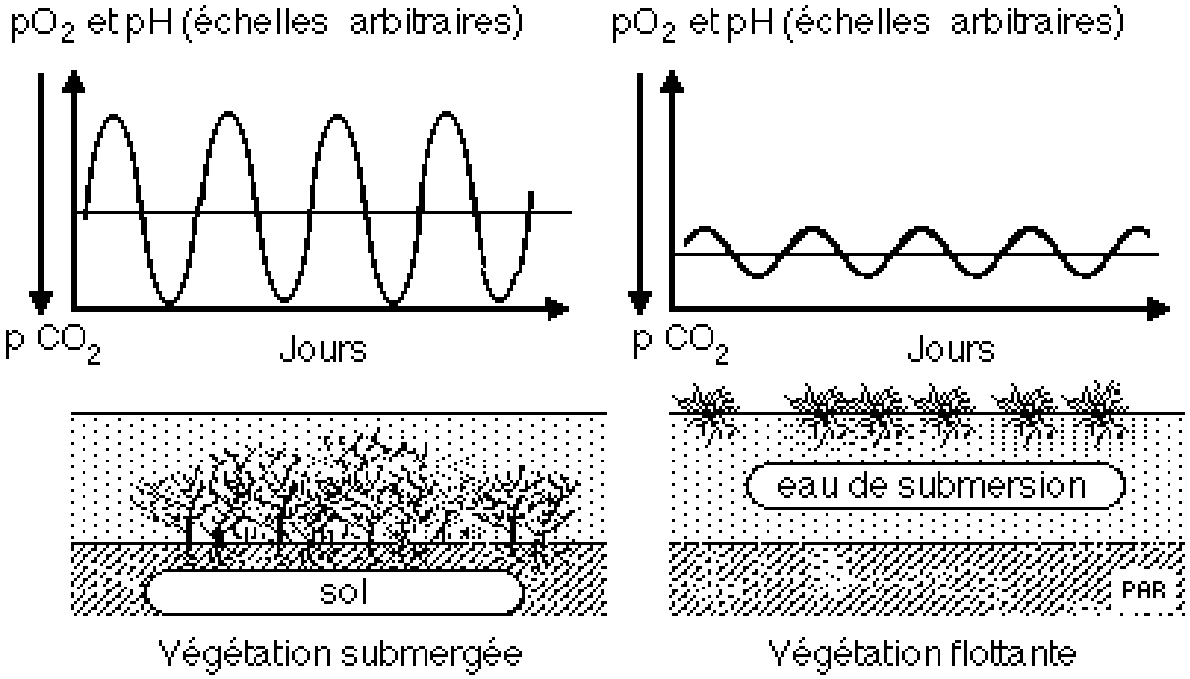


Figure 6. 3 Variations journalières du pH dans l'eau des rizières en fonction du type de végétation

6.2.2.1.2. Par nitrification

La nitrification, c'est-à-dire l'oxydation de l'ammonium en nitrate, produit des ions H+

NH4+ + 2 O2 ---> NO3- + 2 H+ + H2O et l'acidification du sol sera d'autant plus importante que l'on apporte des engrais ammoniacaux et que la microflore nitrifiante est active. Par exemple, un apport de 400 ppm d'ammonium provoque après 5 mois d'incubation aérobie un abaissement du pH de 2 unités dans un sol à faible complexe absorbant.

L'activité des microorganismes nitrifiants est influencée par l'aération, elle diminue en présence d'ions Na+ donc dans des sols salés.

6.2.2.1.3. Par production d'acides organiques

Différents acides (formique, acétique, butyrique, lactique) sont produits par oxydation de la matière organique ou fermentation dans le sol. Ces acides faibles n'ont que peu d'influence sur le pH du sol, sauf dans certains sols particuliers comme les podzols. L'incorporation de grandes quantités de matière organique fraîche (engrais verts) dans certains sols agricoles peut toutefois se traduire par une baisse sensible du pH.

6.2.2.1.4. Par sulfo-oxydation

Dans les sols contenant beaucoup de soufre total (par exemple les sols formés à partir d'alluvions fluvio-marines dans les deltas où la teneur en soufre total peut atteindre 3,5 %) l'activité des microorganismes du cycle du soufre, et en particulier des bactéries sulfooxydantes, est très importante dans la pédogénèse (formation de sulfures à partir des sulfates du sédiment, oxydation des sulfures).

Si le sol est maintenu en conditions drainantes aérobies, ce qui est parfois réalisé dans le but d'éliminer les sels avant

un aménagement rizicole, l'abaissement du pH par production d'acide sulfurique peut être très important et empêcher finalement toute utilisation agronomique. On a observé dans des polders du delta de la Casamance des pH de 2,8 , entraînant une destruction de la structure et la stérilisation du sol.
Dans les conditions naturelles de la mangrove (formation végétale spécialisée des vases fluviomarines), le pH peut varier d'une unité entre la saison sèche et la saison des pluies par oxydation d'une partie du stock de sulfures.

6.2.2.2. Alcalinisation

6.2.2.2.1. Par ammonification

La décomposition des composés organiques produit des ions NH4+, c'est-à-dire une augmentation du pH plus ou moins importante dans le sol suivant la richesse en azote de la matière organique fraîche qui se décompose.

6.2.2.2.2. Par sulfato-réduction

La réduction des sulfates ou du soufre élémentaire, dans des sols riches en soufre total, peut aboutir à la formation de sulfure de sodium ou de calcium si la teneur en fer est faible. Ces sulfures hydrolysés donnent des bases:

$$Na2S + 2\ H20 \longrightarrow H2S + 2\ NaOH$$

qui se combinent avec le gaz carbonique d'origine microbienne pour former des carbonates. Cette augmentation du pH par sulfato-réduction dans des sols inondés riches en matière organique est à l'origine de la formation de sols à alcalis, où le pH peut atteindre 9,5.

6.2.3. Action sur le potentiel d'oxydoréduction

Le potentiel d'oxydo-réduction exprime le pouvoir oxydant ou réducteur du sol, il est mesuré par la différence de potentiel qui s'établit entre le sol et une électrode de référence.
Dans le sol, le potentiel d'oxydo-réduction est sous la dépendance de la teneur en oxygène de l'atmosphère et de la concentration en oxygène dissous dans l'eau.

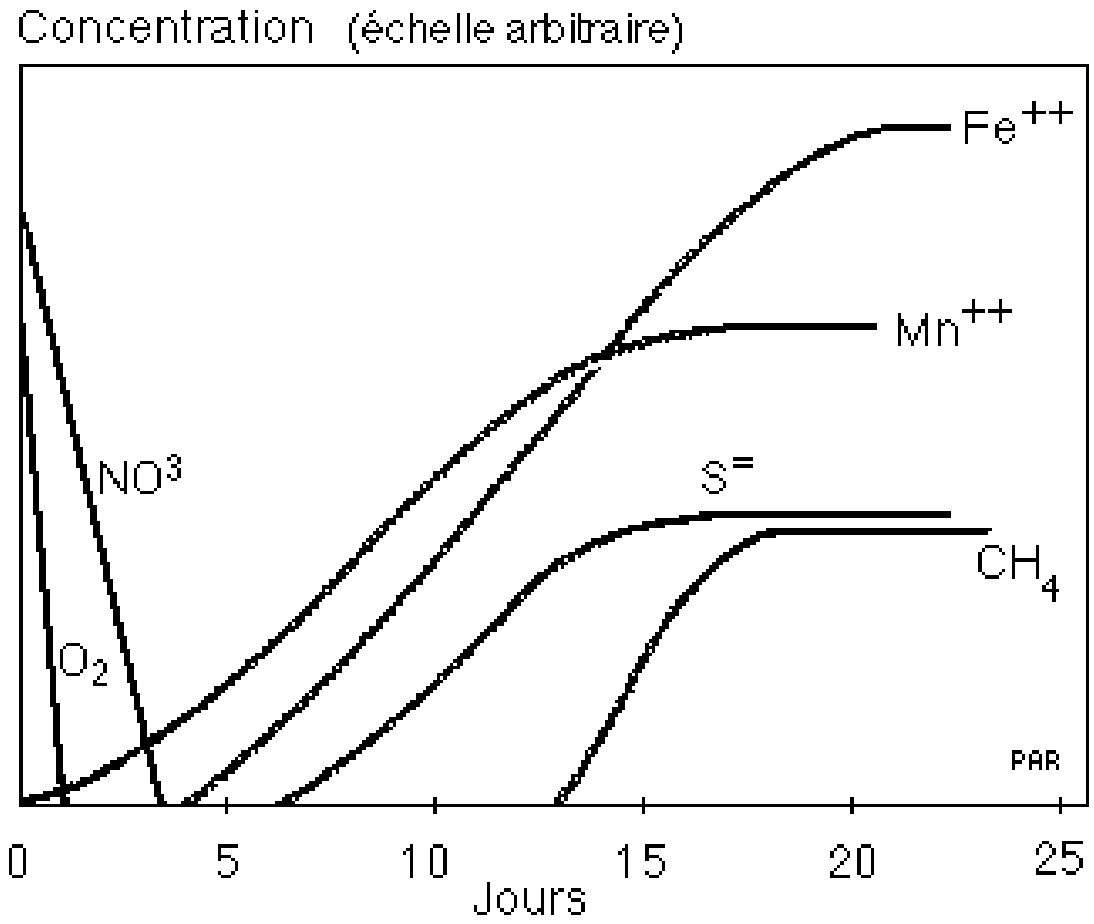


Figure 6. 4 Etapes de l'établissement de conditions réductrices après submersion d'un sol de rizière

La respiration des microorganismes aérobies a donc pour effet d'abaisser le potentiel redox, d'autant plus que le sol est engorgé. Par exemple, le potentiel d'un sol de rizière passe de + 300 mV avant la submersion à -100 mV après 15 jours d'inondation. Cet abaissement est associé avec la réduction successive d'une série de substrats incluant l'O2, les nitrates, le fer et le manganèse, les sulfates, pour aboutir finalement à la formation de méthane (Fig. 6.4).

La réduction est plus rapide si le sol est riche en matière organique.

Le potentiel du sol est également sous l'influence de l'état d'équilibre de certains systèmes redox, en particulier des oxydes de fer et de manganèse:

Fe2+ <=> Fe3+ + e-

Mn2+ <=> Mn4+ + 2e

Ces équilibres peuvent être modifiés par certains microorganismes, par exemple des bactéries

chimiolithotrophes qui tirent leur énergie de l'oxydation de composés minéraux réduits, comme *Thiobacillus ferrooxydans*. Le développement de ces microorganismes influence alors le potentiel d'oxydo-réduction dans le sol.

Le dégagement d'oxygène dû à l'activité photosynthétique des cyanobactéries et des microalgues crée des conditions oxydantes dans les eaux de rizière pendant la journée, la concentration en O2 pouvant atteindre une sursaturation de plus de 100% avec des valeurs supérieures à 20 ppm. La respiration nocturne en absence de photosynthèse peut abaisser la teneur en oxygène à des valeurs inférieures à 2 ppm. Ces variations se répercutent sur le potentiel d'oxydo-réduction et le pH de la couche superficielle du sol.

7. RELATIONS NON SYMBIOTIQUES ENTRE PLANTES ET MICROORGANISMES DU SOL

L'influence de la végétation sur la microflore s'exerce soit directement par les apports de substances énergétiques, stimulantes ou inhibitrices, soit indirectement par modification du microenvironnement.

Inversement, la microflore agit directement ou indirectement sur la nutrition de la plante, et sur son environnement.

7.1. INTERACTIONS AU NIVEAU DE LA RACINE: RHIZOSPHERE

On appelle rhizosphère la partie du sol influencée par la présence de la racine (Fig. 7.1). On distingue en général trois zones dans la rhizosphère:

(1) la rhizosphère *sensu stricto*, mince couche de sol qui adhère fortement à la racine mais qui peut en être détachée par lavage et agitation modérée dans l'eau,

(2) le rhizoplan, dont la microflore est extraite par agitation vigoureuse des racines déjà traitées comme indiqué en 1,

(3) l'endorhizosphère représentée par les espaces intercellulaires du cortex colonisés par les microorganismes.

Dans la rhizosphère, la microflore est profondément modifiée sous l'effet des exsudats de la racine, des résidus cellulaires, ainsi que des actions de la racine sur l'environnement (modification des conditions d'oxygénation, de concentration saline, etc). En retour, l'activité des microorganismes est importante pour la plante : mise à disposition ou compétition pour les éléments nutritifs, action sur la morphologie de la racine. C'est l'ensemble de ces interactions qui est appelé "effet rhizosphère".

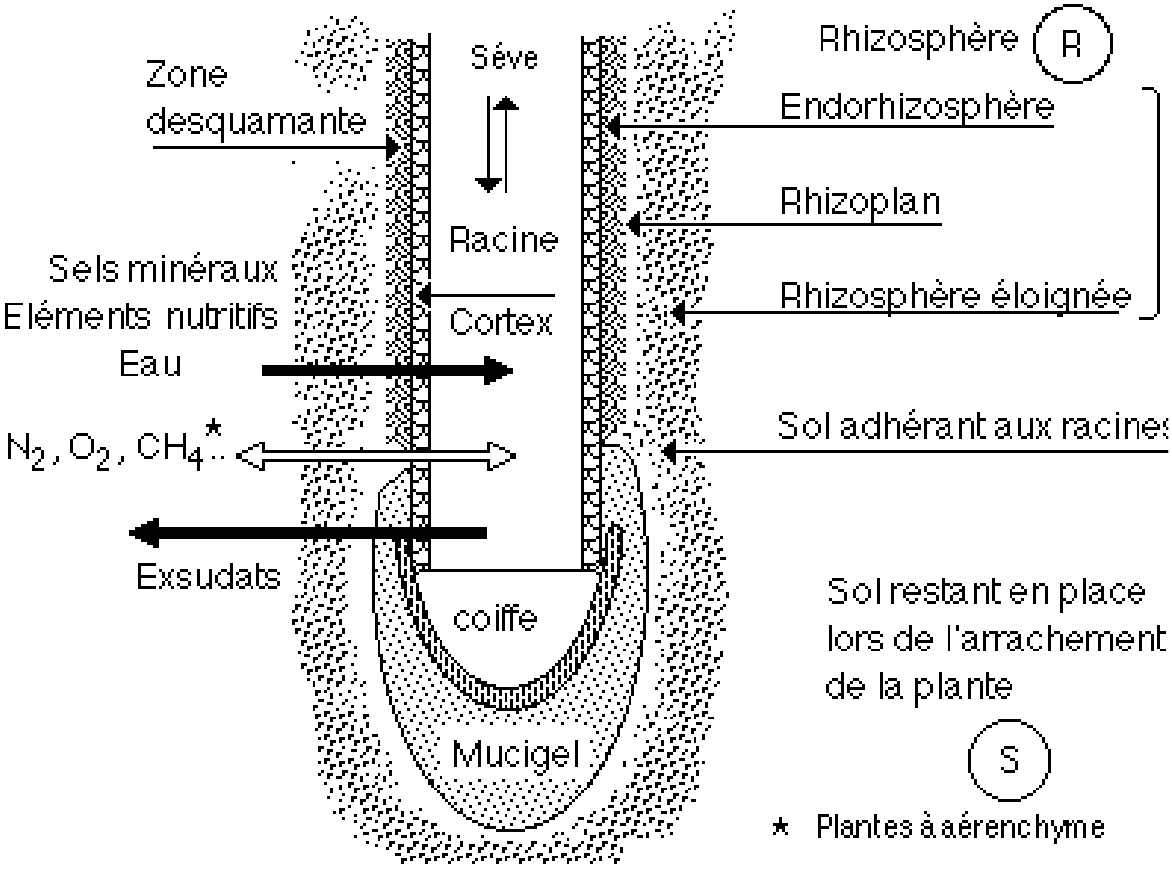


Figure 7. 1 Schéma de la rhizosphère

7.1.1. Anatomie de la racine

D'une façon schématique, la racine est constituée par un méristème apical produisant des cellules dans deux directions:

- vers l'apex (extrémité) de la racine, les cellules de la coiffe qui se détachent continuellement et sont remplacées par le méristème;
- vers l'arrière, des cellules qui formeront la racine proprement dite, différenciées en cylindre central, cortex et épiderme.

Les cellules du cylindre central sont organisées en un réseau vasculaire, bordé par un endoderme compact de cellules parfois lignifiées. Le cortex est au contraire formé de grandes cellules en tissu lâche, les espaces intercellulaires pouvant être assez vastes et résulter de la lyse de certaines cellules.

La longévité du cortex est variable suivant les plantes. Pour les monocotylédones, le cortex est entièrement d'origine primaire (c'est à-dire qu'il provient du méristème apical) alors que pour les autres plantes, des divisions ultérieures donnent naissance à un cortex secondaire. Les cellules de l'épiderme forment la surface qui est tortueuse et crevassée, à tel point qu'il est parfois difficile de suivre sur des coupes microscopiques le tracé de la surface externe de la racine.

Enfin, la surface est recouverte par le mucilage, polysaccharide hydraté d'un poids moléculaire élevé formé par différenciation de la paroi de certaines cellules de l'épiderme ou par excrétion. Le mucilage est particulièrement épais (plusieurs mm) au niveau de la coiffe.

Les poils absorbants, structures très fragiles qui ne restent fonctionnelles que quelques semaines ou même quelques jours, assurent le prélèvement des aliments de la plante. Ils se forment à partir d'une cellule épidermique, leur diamètre (5-15 μ) et longueur (80-1500 μ) varient suivant les plantes.

7.1.2. Influence de la racine sur le développement des microorganismes

7.1.2.1. Nombre de microorganismes

On mesure l'effet de la racine sur la microflore (effet rhizosphère) par le rapport R/S entre la densité microbienne dans la rhizosphère (en général *sensu lato*, rhizosphère, rhizoplan et endorhizosphère) et dans le sol éloigné des racines. Ce rapport peut présenter des valeurs très différentes suivant les espèces ou groupes de microorganismes :

Organismes	**R /S**
Bacteries totales	23
Actinomycetes	7
Champignons	12
Protozoaires	2
Algues	0,2

Chez les bactéries, l'effet rhizosphère est particulièrement important pour les dénitrifiants, les
sulfatoréducteurs et les ammonifiants. La proportion de bactéries halo-intolérantes est plus forte dans la rhizosphère que dans le sol éloigné, ce qui peut s'expliquer par l'existance d'un gradient de salinité au voisinage de la racine où la concentration est minimale. L'effet rhizosphère est aussi plus marqué pour les espèces bactériennes externes que pour les espèces internes aux agrégats.

7.1.2.2. Modifications du microenvironnement par la racine

La racine modifie son environnement immédiat par apport de substrats énergétiques (exsudats, mucigel) favorisant le développement microbien et par consommation ou libération d'oygène.

7.1.2.2.1. Exsudats racinaires

Ce sont principalement des sucres, des acides organiques et des acides aminés. L'exsudation
varie suivant les espèces végétales, le rythme nycthéméral, l'âge de la plante, son état physiologique, etc. Les exsudats peuvent assurer la croissance bactérienne.

On le vérifie en associant une culture avec une racine en milieu minéral minimum: la croissance des hétérotrophes est alors dépendante des exsudats organiques. De nombreuses observations montrent que l'activité des microorganismes de la rhizosphère est influencée par les exsudats. Par exemple, l'exsudation augmentant quand la plante est en mauvais état physiologique (sécheresse, attaque parasitaire, coupe des parties aériennes), l'activité microbienne augmente alors dans la rhizosphère. La fixation d'azote par les bactéries rhizosphériques augmente avec l'éclairement qui favorise la photosynthèse.

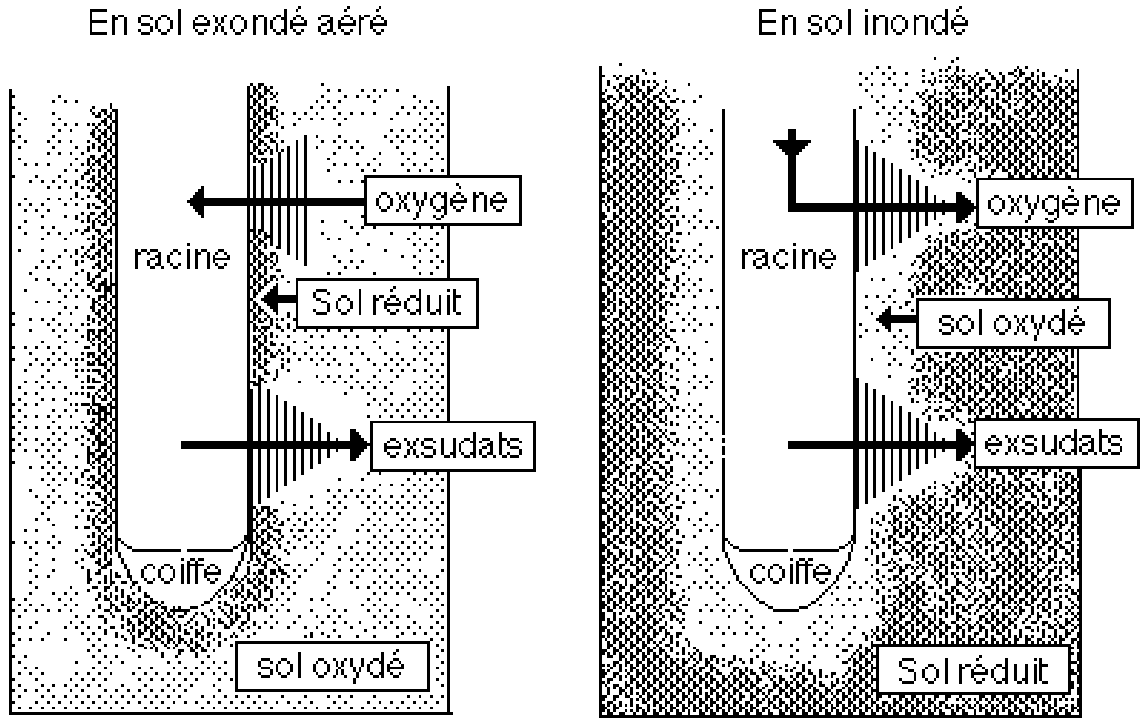


Figure 7. 2 Schéma des gradients d'exsudats et d'oxygène dans la rhizosphère en sol exondé et en sol submergé

7.1.2.2.2. Mucigel

Dans l'endorhizosphère, des relations trophiques encore plus étroites existent entre les bactéries et la racine. Le mucigel secrété par la racine est utilisé par la microflore rhizosphérique pour la synthèse de polysaccharides de faible poids moléculaire intervenant dans la genèse de la structure du sol.

7.1.2.2.3. Potentiel d'oxydoréduction

Suivant les conditions hydriques du sol, la racine a des effets opposés en ce qui concerne l'oxygénation de la rhizosphère.
En sol exondé, la respiration de la racine crée un gradient centrifuge d'exsudats racinaires et centripète d'oxygène (fig.7.2 à gauche). L'oxygène est activement consommé par les racines et le rhizoplan présente des conditions réductrices.
En sol inondé, les plantes, adaptées à la submersion, possèdent des canaux aérifères qui permettent un transport inactif des gaz entre l'atmosphère et la rhizosphère. Ce phénomène est particulièrement net dans le cas du riz inondé, l'oxygène et l'azote étant transportés vers les racines et le méthane produit dans la rhizosphère étant transporté vers l'atmosphère. On observe alors un gradient centrifuge d'exsudats racinaires et d'oxygène (fig.7.2 à droite) et un rhizoplan oxydé.

7.1.2.3. Un exemple d'effet rhizosphère: la sulfato-réduction rhizosphérique

Les bactéries sulfatoréductrices trouvent dans la rhizosphère une niche écologique

favorable en raison de la disponibilité de substrats organiques excrétés par la racine. L'analyse des exsudats montre que certains des acides organiques excrétés sont des substrats utilisables par des cultures pures de bactéries sulfatoréductrices. L'effet rhizosphère pour les bactéries sulfato-réductrices (mesuré par le rapport R/S) est particulièrement net chez le riz inondé, mais il a été également décrit pour d'autres plantes (fève, maïs, luzerne).

La sulfato-réduction rhizosphérique résulte d'un déséquilibre du cycle du soufre qui se manifeste lorsque le rapport entre les populations de bactéries sulfatoréductrices et sulfooxydantes (thiobacilles aérobies) augmente. Il se produit alors une accumulation de sulfures toxiques pour la plante. Le seuil de toxicité décroît avec l'âge de la plante. Pour le jeune pied de riz, ce seuil est d'environ 10 ppm. Il est atteint dans certains sols après quelques jours de germination ou de développement des jeunes racines.

Celles-ci s'entourent d'une gaine noire de sulfure de fer, qui limite les échanges sol-plante. On observe alors des pertes au semis pouvant atteindre 50% ou des maladies physiologiques ("akagare" ou "akiochi" au Japon, "bronzing" à Ceylan , etc).

L'intensité de la sulfato-réduction dépend de la concentration en sulfate et en matière organique

dans le sol, des conditions d'oxydo-réduction (granulométrie, d'engorgement), et de l'exsudation racinaire. La sulfato-réduction est plus importante quand l'exsudation est stimulée par la lumière, la coupe des parties aériennes, une attaque parasitaire, la dessiccation, etc.

7.1.3. Effet des microorganismes de la rhizosphère sur la croissance de la plante

Les microorganismes de la rhizosphère agissent sur la plante en mettant à sa disposition des

molécules organiques absorbables par la racine (acides aminés, auxines, vitamines, antibiotiques) ou en améliorant sa nutrition minérale par solubilisation ou minéralisation d'éléments. Enfin la microflore de la racine modifie le développement du système racinaire, même si des structures spécialisées (nodules, mycorhizes) ne sont pas visibles.

7.1.3.1. Influence directe des métabolites microbiens

Les plantes absorbent par leurs racines de nombreuses substances organiques, provenant de l'activité de la microflore, des résidus végétaux (éléments solubles de la litière) ou des apports extérieurs (pesticides). Ces composés, bien qu'absorbés en faible quantité, jouent un rôle important en inhibant ou stimulant des activités métaboliques de la plante.

Les principales substances produites par les microorganismes et susceptibles d'influer sur le développement des plantes sont :

• des auxines, en particulier l'acide indol-acétique (AIA), synthétisé par de nombreuses bactéries;

• des acides aminés qui peuvent être excrétés soit après synthèse à partir de composés minéraux soit après décomposition des protéines;

• des vitamines ou des cofacteurs;

• des antibiotiques qui agissent directement en influant sur le développement ou indirectement en protégeant la racine contre l'invasion par des microorganismes pathogènes.

Certains composés (acide indol acétique ou indol lactique, gibbérelline, kinétine) produits par la bactérie fixatrice d'azote *Azospirillum brasilense* dans la rhizosphère des graminées augmentent le nombre des racines et la densité des poils absorbants. Une action identique a été montrée pour des plantes inoculées par la bactérie et des plantes cultivées stérilement en présence de ces composés. Il est donc possible que les bactéries de la rhizosphère augmentent la productivité de la plante à la fois par une stimulation hormonale et par

l'apport d'azote résultant de leur activité fixatrice.

7.1.3.2. Influence indirecte sur la nutrition

Par biodégradation de substances biologiquement actives vis-à-vis des plantes, les microorganismes ont un rôle détoxifiant très important.

Par exemple la coumarine qui est libérée lors de la dégradation des litières est décomposée par de nombreuses espèces bactériennes.

La toxicité de nombreux acides aminés ne peut en général pas s'exprimer dans le sol car ces composés sont très rapidement dégradés par les microorganismes.

Les bactéries méthanogènes, en utilisant directement (acétate, formate) ou en contribuant à la dégradation (cométabolisme) des acides organiques produits par d'autres groupes dans les sols inondés, contribuent à la détoxification de ces sols, certains acides organiques étant inhibiteurs de la croissance des plantes.

Le rôle des microorganismes dans la minéralisation, la solubilisation ou l'immobilisation des éléments nutritifs minéraux sera étudié avec les autres activités microbiennes dans les cycles de l'azote, du carbone, du phosphore, du soufre et du fer.

7.2. INTERACTIONS AU NIVEAU DE LA GRAINE: SPERMOSPHERE

On appelle spermosphère le lieu privilégié créé dans le sol par une graine en germination.

L'influence de la graine est alors due principalement à la diffusion dans le sol de substances qui peuvent stimuler ou inhiber la croissance de certains microorganismes.

Inversement, le développement des microorganismes peut favoriser ou gêner la germination.

Deux groupes de microorganismes semblent avoir une certaine importance par leurs interactions avec la graine: les bactéries sulfatoréductrices et les algues.

7.2.1. Sulfato-réduction spermosphérique

La sulfato-réduction spermosphérique est un phénomène identique à celui observé dans la rhizosphère. Elle se manifeste lorsque deux conditions sont réunies: anaérobiose et teneur en sulfates ou soufre élémentaire élevées.

L'anaérobiose se produit quand le sol est engorgé et que la structure étant mauvaise, la densité apparente est élevée. Un seuil critique (d =1,5) a été déterminé pour un sol alluvial salin de Tunisie.

Une teneur en sulfate supérieure à 200 ppm est également nécessaire, le seuil pour le soufre élémentaire n'est pas connu.

Les bactéries sulfatoréductrices peuvent alors se développer en utilisant les composés organiques exsudés par la graine en germination (la sulfato-réduction ne se produit pas dans un sol non planté).

La teneur en sulfures solubles peut atteindre des valeurs élevées (56 ppm en Camargue), toxiques pour la jeune plantule. La toxicité des ions sulfure est directe, ou indirecte par effet de barrière de diffusion pour l'oxygène ou les ions minéraux nécessaires au moment de la germination (Fig 7.3) .

Si l'activité des bactéries sulfatoréductrices est compensée par l'activité des bactéries sulfooxydantes, il n'y a pas accumulation de sulfure donc pas de toxicité.

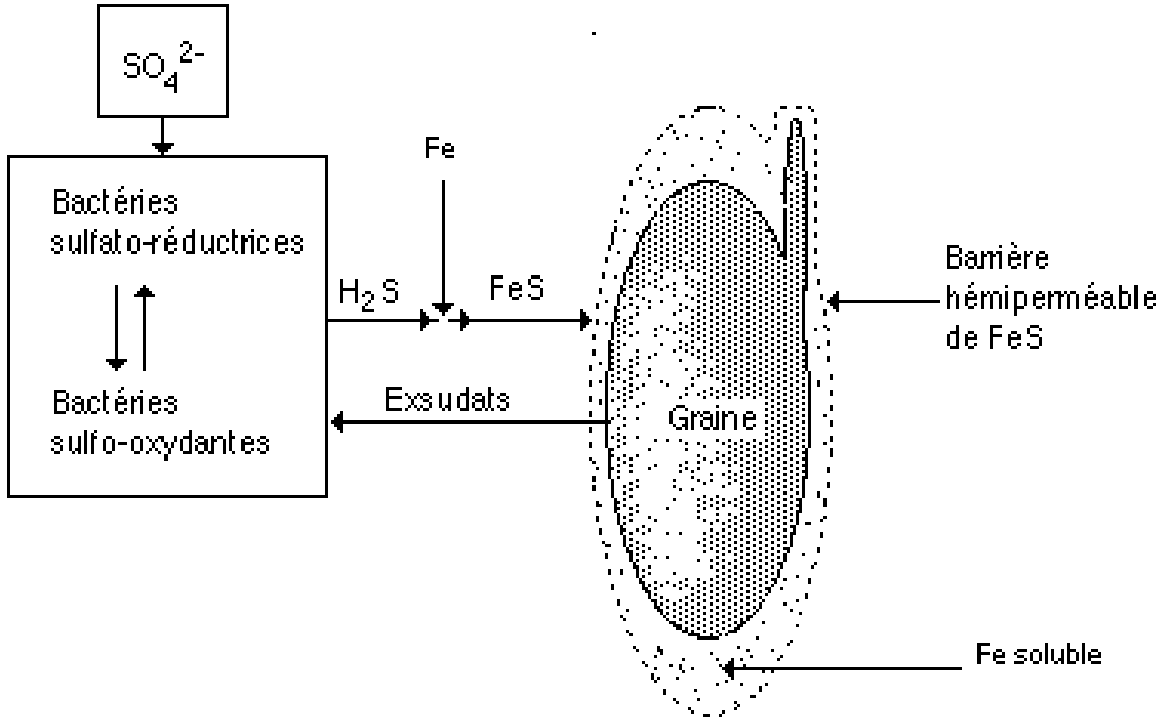


Figure 7. 3 Schéma de la sulfato-réduction spermosphérique

7.2.2. Germination du riz en présence de cyanobactéries

Ces microorganismes photosynthétiques se développent rapidement lors de la mise en eau des rizières inondées, et pourraient influencer la germination du riz par deux actions:

• par une oxygénation du milieu qui contribuerait à limiter le développement des bactéries anaérobies au contact de la graine, et donc à diminuer la sulfato-réduction,

• par production d'auxines qui stimulent la croissance de la plantule de riz et donc augmentent sa résistance à la sulfato-réduction. Toutefois la production d'auxines par les cyanobactéries est hypothétique et n'a pas encore été démontrée.

7.3. LITIERES

Lorsqu'ils meurent, les organes aériens des plantes tombent au sol et forment la litière. Celle-ci fournit à la microflore hétérotrophe des quantités de substrat énergétique parfois considérables : plus de 5 t de carbone ha-1 an-1 sous forêt tropicale.

La composition qualitative et quantitative de la litière est très variable suivant le type de couvert végétal. L'apport d'azote par la litière est estimé à 30 kg ha-1 an-1 sous hêtraie en France et 220 kg sous forêt tropicale humide au Congo.

Trois aspects sont importants dans les relations directes ou indirectes entre litières et microoganismes

7.3.1. Redistribution des cations dans le profil

Les litières ont des teneurs élevées en cations (par exemple 2% de calcium, soit un apport de 200 kg ha-1 an-1 sous forêt tropicale) qui s'accumulent donc en surface. Sous l'action des pluies ces cations migrent ensuite vers la profondeur avec des vitesses variables: le calcium lentement, le fer plus rapidement, et l'aluminium encore plus vite. Une redistribution verticale des cations dans le profil peut alors modifier les conditions physico-chimiques de croissance des microorganismes dans le sol.

7.3.2. Décomposition de la litière par les microorganismes

Les différents composés organiques des litières sont dégradés à des vitesses variables. On constate que les sucres (formant environ 15 % de la matière organique de la litière) ont totalement disparu au bout d'un an, la cellulose et l'hémicellulose (5 %) en 2 ou 3 ans, la lignine (40 %) en 7 ans, les phénols (5 %) en 15 ans. Ces vitesses sont également variables suivant le type de litière, en raison des effets inhibiteurs (allélopathie) ou stimulants sur la croissance des microorganismes .

7.3.3. Inhibition ou stimulation de la croissance par la litière

La composition chimique des différentes litières végétales étant très variable, il en est de même pour leur influence sur le développement des différents groupes de microorganismes. Par exemple, la densité bactérienne dans l'horizon de surface sous litière de bouleau est deux fois plus forte que sous litière d'Epicea, alors que les champignons sont deux fois moins nombreux.

Une litière de chêne a un effet inhibiteur sur la croissance de *Bacillus megaterium*, alors que la litière de hêtre stimule sa croissance. Certaines bactéries fixatrices d'azote (*Beijerinckia*) ou nitrifiantes sont inhibées par les litières de forêts tropicales humides, mais stimulées par des litières tropicales sèches (*Acacia albida*).

8. SYMBIOSES

8.1. INTRODUCTION

Les symbioses sont des associations à bénéfice réciproque entre une plante et un microorganisme.

Certaines symbioses se manifestent par la formation d'organes spécialisés comme les nodules et les mycorhizes.

Les nodules varient par leur taille (de quelques mm à plusieurs cm), leur forme, leur implantation (sur la racine, la tige ou la feuille), et le type de microorganisme responsable.

Les nodules fixateurs d'azote sont les plus étudiés. Ils sont induits par deux types de microorganimes: les *Rhizobium* qui produisent la formation de nodules sur les racines et tiges des légumineuses et les *Frankia* (actinomycètes), qui produisent la formation de nodules sur les racines de certains arbres qualifiés d'actinorhiziens.Des espèces bactériennes du genre *Phyllobacterium* (*P. rubiacearum* et *P. myrsinacearum*) sont capables d'induire la formation de nodules sur les feuilles de certaines plantes tropicales appartenant aux familles des Myrsinacées, Rubiacées, Myrtacées et Dioscoréacées, telles les espèces *Ardisia crispa* et *Pavetta zimmermanniana.* Ces bactéries sont des bâtonnets Gram-négatif, mobiles, aérobies et chimioorganotrophes qui appartiennent à la famille des Rhizobiacées. Les nodules foliaires ne fixent pas l'azote atmosphérique.

Certaines symbioses ne donnent pas naissance à la formation de structures spécialisées visibles.C'est le cas pour les cyanobactéries symbiotiques *d'Azolla* ou de champignons (Lichens).Le tableau 8.1. présente les principaux types de symbioses entre microorganismes et végétaux.

Tableau 8.1. Principaux types de symbioses végétales

Plante	**Microorganisme**	**Stucture spécialisée**	**Remarques**
Légumineuse	*Rhizobium* *Bradyrhizobium*	Nodule racinaire	Symbiose fixatrice de N2

Légumineuse	*Azorhizobium*	Nodule caulinaire (primordium de racine)	Symbiose fixatrice de N2
8 familles d'Angiospermes non-légumineuses	*Frankia* Voir Tableau 8.	Nodule actinorhizien	Symbiose fixatrice de N2
Gymnospermes Angiospermes	Champignon (Basidio-, Asco-, ePhycomycètes)	Ectomycorhize. Modification de la racine	
Bryophytes Pteridophytes Gymnospermes Angiospermes	Champignon (Phycomycètes)	Endomycorhize. Stuctures internes à la racine: arbuscules et vésicules	Aussi appelées VAM (vesicular-arbuscular mycorrhyza)
Gymnospermes Angiospermes	Champignon (Basidio-, et Ascomycètes)	Ectoendomycorhizes	
Azolla (fougère aquatique)	Cyanobactérie hétérocystée	Cavité foliaire	Un symbiote:*Anabaena azollae.* Symbiose fixatrice de N2
Hépatiques (Anthoceos, Blasia)	*Cyanobactérie hétérocystée*		Symbiose fixatrice de N2
Gymnosperme (Cycas, Macrozamia.)	Cyanobactérie hétérocystée	Racine coralloïde	Symbiose fixatrice de N2
Angiosperme (Gunnera)	Cyanobactérie hétérocystée		Symbiose fixatrice de N2
Champignon	Algues		Lichens non fixateurs de N2
Champignon	Cyanobactérie hétérocystée		Lichens fixateurs de N2

8.2. LEGUMINEUSES

8.2.1. Les symbiontes

La plupart des espèces de légumineuses et une seule plante non-légumineuse (*Parasponia*) possèdent sur leurs racines, des nodules contenant des bactéries fixatrices d'azote, les rhizobium *sensu lato*. Un certain nombre d'espèces appartenant aux genres *Sesbania* et *Aeschynomene* peuvent former des nodules caulinaires qui sont des nodules aériens, formés sur les tiges, à l'emplacement d'un primordium de racine.

Les rhizobium symbiontes des légumineuses appartiennent à la famille des Rhizobiaceae. Plusieurs genres ont été décrits en fonction de leur taux de croissance, de leur flagellation et de leur hôte (Tableau 8.2). On distingue trois grands groupes:

- les *Rhizobium*, à croissance rapide et flagellation péritriche qui nodulent les légumineuses des pays tempérés;
- les *Bradyrhizobium*, à croissance lente et flagellation polaire ou subpolaire qui nodulent les légumineuses des pays tropicaux;
- les *Azorhizobium* à croissance intermédiaire et flagellation péritriche qui nodulent les tiges de légumineuses aquatiques tropicales comme *Sesbania rostrata*. Les *Azorhizobium* sont les rares rhizobium capables de fixer l'azote *in vitro*.

Tableau 8.2. Taxonomie de la famille des Rhizobiaceae

Genre I: ***Phyllobacterium***
Forment des nodules non fixateurs d'azote sur les feuilles de certaines espèces tropicales.

Genre II: ***Agrobacterium***
Certaines souches induisent la formation de cals déformants non fixateurs d'azote.

Genre III: ***Rhizobium***
Forment des nodules fixateurs d'azote sur les racines de Légumineuses tempérées. Ont une croissance rapide et une flagellation généralement péritriche.

- *R. leguminosarum* biovar trifolii: nodule *Trifolium*: le trèfle cultivé.
  biovar phaseoli: nodule *Phaseolus*: haricot cultivé.
  biovar viceae: nodule *Vicia*: la vesce cultivée.
- *R. meliloti* nodule *Medicago* (alfalfa), *Melilotus*, et *Trigonella*.
- *R. loti* souches à flagellation subpolaire nodulant *Lotus* et *Lupinus*.
  souches à croissance rapide nodulant *Cicer*, *Sesbania*, *Leucaena*, et *Mimosa*.
- *R. fredii* nodule *Glycine* (soja) (*Sinorhizobium*).
- *R. galegae* flagellation subpolaire.

Genre IV: ***Azorhizobium***
Ont une flagellation péritriche.

- *A. caulinodans* croissance rapide - forme des nodules fixateurs d'azote sur les tiges de *Sesbania rostrata* et *Aeschinomene*; fixation asymbiotique d'azote et croissance sous de faibles tensions d'oxygène.

Genre V: ***Bradyrhizobium***
Forment des nodules fixateurs d'azote sur les racines de Légumineuses tropicales. Croissance lente, flagellation polaire ou subpolaire

- *B. japonicum* nodule *Glycine* (soja), *Lotus* et *Vigna* (cowpea);
  comprend les souches à croissance lente nodulant *Cicer*, *Sesbania*, *Leucaena*, *Mimosa*, et *Acacia*.
- *B. lupini* nodule *Lupinus* et *Lotus*.
- *B. parasponiae* nodule *Parasponia* et *Vigna* (cowpea).

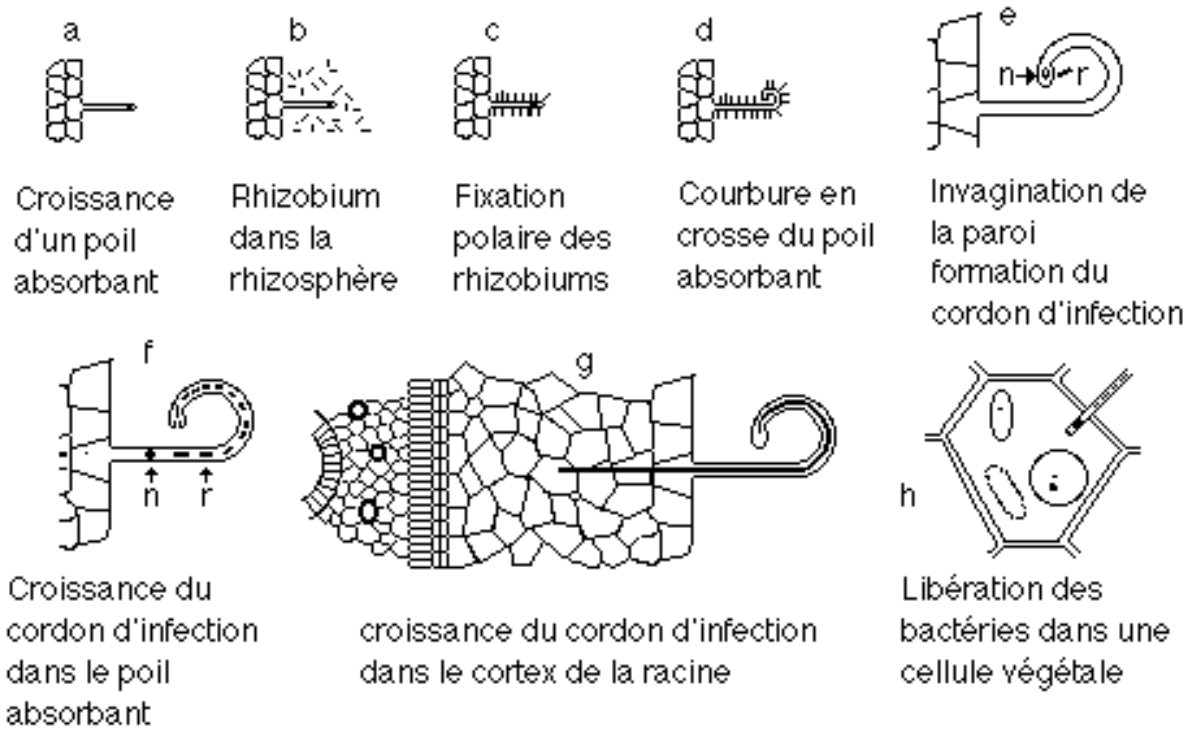


Figure 8. 1 Etapes de la nodulation par poils absorbants (d'aprés Shaw et coll. 1982)

b, bactérie ou bactéroide; c, cortex; dc, cellule en cours de division; e, épiderme; en, endoderme; if, cordon d'infection; n, noyau; p, phloéme; pe, péricycle; r, Rhizobium; rh, poil absorbant; x, xylème.
Les rhizobium sont des bactéries hétérotrophes et ne sont pas des symbiotes obligatoires. Ils

peuvent se multiplier dans le sol ou s'y maintenir sans fixer l'azote (ou en fixant l'azote dans le cas des *Azorhizobium*). La plupart des sols contiennent de nombreuses variétés de rhizobium formant des nodules peu ou non fixateurs sur des plantes sauvages.

8.2.2. Nodules des légumineuses

Dans ces structures, les bactéries et la plante forment une association symbiotique, la plante fournissant les substrats carbonés et la bactéries l'azote combiné. Le parasitisme peut s'établir quand l'alimentation carbonée fournie par la plante diminue.

8.2.2.1. Formation des nodules

La formation des nodules racinaires ou caulinaires est induite par la bactérie.
On distingue trois étapes dans la formation des nodule racinaires (Fig.8.1):
- Quand une bactérie se trouve à proximité d'une racine, cette dernière excrète du tryptophane qui est transformé en acide indol-acétique par la bactérie. Ce composé induit une déformation caractéristique d'un poil absorbant de la racine et la synthèse par la plante d'une enzyme solubilisant la membrane de la cellule végétale au contact de la bactérie.
- A ce point faible plusieurs bactéries pénêtrent dans la racine par un tube à paroi cellulosique produit par la plante: le cordon d'infection. Ce dernier pénètre ainsi jusqu'à la partie centrale du poil absorbant, où il induit la formation d'une cellule polyploïde qui se divise alors en cellules de type indifférencié. Cette petite masse de cellules constitue le jeune nodule.
- Le cordon d'infection se lyse en libérant les bactéries dans les cellules indifférenciées, les bactéries s'y divisent puis subissent des modifications structurales aboutissant au stade "bactéroïde" avec des formes en Y et en massue. Lorsque l'on coupe transversalement un nodule actif, une coloration rose apparaît qui traduit la présence d'une protéine synthétisée par la plante pour oxygéner le nodule, l'hémoglobine. Pour un même système plante-rhizobium, le nombre de nodules formés varie en fonction du nombre de rhizobium contenu dans le sol.
L'attraction des rhizobium par les légumineuses fait intervenir des substances spéciales: les lectines, synthétisées par la plante, et les nodulines, synthétisées par les bactéries.
Chez les légumineuses à nodules caulinaires, les nodule sont formés au niveau d'un primordium de racine.

8.2.2.2. Fixation par les nodules

Les plantes non nodulées sont incapables de fixer l'azote, de même que les rhizobium isolés en milieu artificiel (à l'exception d'*Azorhizobium* qui présente une fixation asymbiotique *in vitro*). La fixation n'intervient donc qu'en symbiose. Ce sont les nodules jeunes qui fixent l'azote; dans les nodules âgés, les bactéroïdes sont lysés et leurs constituants sont absorbés par la cellule végétale.
La part de l'azote fixé par les nodules dans l'alimentation de la plante est très variable (20-70%) suivant les plantes, les conditions culturales et la souche de Rhizobium (voir § 12.2.4.1). La quantité d'azote fixé par rapport au poids sec du nodule (efficience du nodule) est fonction, pour une plante, de la souche de rhizobium infestante. L'un des objectifs des recherches sur la symbiose chez les légumineuses est d'augmenter cette efficience.

8.2.2.3. Transfert de l'azote fixé par le nodule dans la plante

L'azote fixé dans le nodule migre rapidement dans le reste de la plante: il suffit de quelques heures pour que l'azote marqué au 15N se retrouve dans les tissus aériens. On admet que le site de fixation est situé à la surface du bactéroïde et que l'azote migre sous forme d'amino acides.

8.2.3. Aspects agronomiques

Les légumineuses sont des plantes cultivée de grande importance agro-alimentaire. En raison de leur teneur élévée en protéines elles sont utilisées pour l'alimentation humaine et animale. Leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique et le développement important du système racinaire de certaines espèces en font des plantes privilégiées pour la régénération de la fertilité des sols, en particulier grâce à leur utilisation comme engrais vert.

La pratique de l'inoculation artificielle des légumineuses cultivées par des souches de rhizobium choisies pour leur efficience est déjà ancienne. Cette pratique permet des augmentations de rendement significatives chez certaines espèces, mais ne permet pas la supression de l'utilisation des engrais azotés en culture intensive (soja).

L'inoculation de la légumineuse tropicale aquatique *Sesbania rostrata* par l'espèce *Azorhizobium caulinaudans* formant des nodules aériens sur les tiges, initiée par l'ORSTOM au Sénégal, a permis d'accroître la formation de nodules sur cette plante et par là même, d'augmenter la production de matériel végétal (canopée). L'utilisation de cette plante comme engrais vert cultivé entre deux cultures de riz et enfoui avant le semis ou le repiquage, permet, en parcelles expérimentales, de doubler le rendement en riz sans apport d'engrais azoté. L'adoption de cette pratique par les riziculteurs, en Afrique et en Asie, se heurte cependant à de nombreux facteurs limitants qui sont principalement socio-économiques.

L'inoculation doit tenir compte de la compétitivité des souches sélectionnées face aux souches sauvages se trouvant déjà dans le sol, compétitivité et efficience étant deux caractères distincts. La différence de compétitivité entre souches traduit en fait, une différence dans l'adsorption de la bactérie à la surface de la racine. L'étude de la compétition nécessite donc une meilleure connaissance des phénomènes impliqués dans l'adsorption des rhizobium sur la surface racinaire.

L'inoculation présente surtout un intérêt dans des sols carencés en azote recevant pour la première fois une légumineuse. Dans des sols dans lesquels on cultive une légumineuse depuis de nombreuses années, l'inoculation se heurte au problème de la compétitivité des souches améliorées face aux souches souvages préexistantes et cela, même dans les sols carencés en azote. C'est en particulier le cas de l'arachide, plante pour laquelle l'inoculation n'augmente généralement pas les rendements.

Tableau 8.3. Non-légumineuses fixatrices de N2 associées à Frankia

Ordre	Famille	Genres
Casuarinales	Casuarinacées	*Casuarina*
Myricales	Myricacées	*Myrica* *Comptonia*
Fagales	Bétulacées	*Alnus*
Rhamnales	Elaeagnacées	*Elaegna* *Hippophae* *Shepherdia*
	Rhamnacées	*Trevoa* *Ceanothus* *Colletia* *Discaria* *Kentrothamnus* *Talguenea*
Coriariales	Coriariacées	*Coriaria*
Rosales	Rosacées	*Rubus* *Dryas* *Purshia* *Cercocarpus* *Cowania* *Chamaebatia*
Pariétales	Datiscacées	*Datisca*

8.3. SYMBIOSES ACTINORHIZIENNES

8.3.1. Les symbiontes

Les actinomycètes du genre *Frankia* forment des nodules avec environ 150 espèces de plantes appartenant à 17 genres et 8 familles et en particulier certains arbres et arbustes dits actinorhiziens appartenant à différents ordres de dicotylédones (Tableau 8.3) .

8.3.2. Nodules actinorhiziens

Ce sont des racines modifiées se formant à partir du péricycle d'une racine mère. Le symbionte, un actinomycète du genre *Frankia*, forme des hyphes, des sporanges asexués et des vésicules, siège de la fixation d'azote dans le cortex racinaire, qui devient anormalement développé.

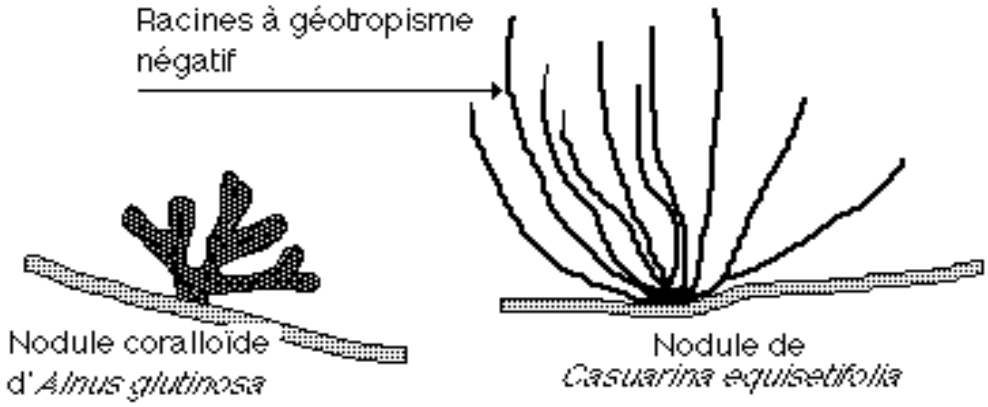


Fig. 8.2. Nodules actinorhiziens

Dans le cas de l'aulne, le méristème apical se divise de façon dichotomique, donnant une forme coralloïde au nodule. Dans le cas de Myrica et de Casuarina, l'apex de chaque nodule produit une racine à croissance géotropique négative (vers le

haut) qui facilite le transfert de l'azote atmosphérique vers le nodule (Fig. 8.2).
On a récemment découvert des nodules aériens sur certains filaos de la Réunion.

8.3.3. Aspects agronomiques

Les symbioses actinorhiziennes se développent dans des environnements qui vont des régions arctiques aux régions tropicales; et des régions semi-arides aux forêts tropicales humides. Elles jouent, dans les environnements naturels, un rôle aussi important que les légumineuses dans les sols cultivés.
Casuarina est un genre dont les espèces arborescentes présentent un intérêt économique dans de nombreux environnements tropicaux. Certaines espèces constituent une source importante de bois de chauffage et sont utilisées pour la reforestation de sols sableux ou très pauvres, pour fixer les dunes et pour recoloniser des sols pollués par l'extraction minière.
L'inoculation de pépinières de Casuarina avec des broyats de nodules prélevés sur des arbres adultes s'est révélée utile pour améliorer la croissance des jeunes plants.
Le tableau 8.4 présente une comparaison entre les symbioses Légumineuse-rhizobium et les symbioses actinorhiziennes.
Les différences principales portent sur les plantes hôtes, les microorganismes concernés et certains aspects du fonctionnement. Par contre, les potentialités fixatrices d'azote (kg ha-1 an-1) sont similaires ainsi que les principaux facteurs limitants.

Tableau 8.4 . Comparaison entre les symbioses Légumineuse-rhizobium et les symbioses actinorhiziennes

	LEGUMINEUSES	PLANTES ACTINORHIZIENNES
Endophyte	Rhizobium	Frankia
Plante-hôte	Légumineuses + Ulmacée (Parasponia)	8 familles de non-Légumineuses
Infection		
• site d'infection	Poil absorbant (en crosse) ou primordiun de racine sur la tige (nodules caulinaires)	Poil absorbant
• étapes de nodulogénèse	Une seule étape	Deux étapes: (1) prénodule, (2) primordium racinaire et lobes
• localisation des cellules infectées	Entre les faisceaux vasculaires	A l'extérieur des faisceaux vasculaires
Fonctionnement de la symbiose		
• hémoglobine	Leghémoglobine	Hémoglobine
• protection de la nitrogénase	Enzymatique: H_2-ase + SOD	Physique: vésicules
• facteurs limitants	Déficience en P, excès d'azote combiné	Déficience en P, excès d'azote combiné
Fixation de N_2 in situ (kg /ha/an)	Jusqu'à 300-400	Jusqu'à 300-400
Association avec les mycorhizes	Endomycorhizes (VAM)	Endomycorhizes (VAM) et ectomycorhizes

Tableau 8.5. Taxonomie et distribution géographique d'*Azolla*.

Espèce	Distribution géographique
Section *Azolla*	
A. filiculoides Lamarck	Amérique du Nord et du Sud
A. mexicana Presl	Amérique du Nord et du Sud
A. microphylla Kaulfuss	Amérique du Nord et du Sud
A. caroloniana Willdenow	Amérique du Nord et du Sud
A. rubra R. Brown	Asie, Australie
Section Rhizosperma	
A. pinnata R. Brown	
var. pinnata R. Brown	Australie, Afrique
var. imbricata Roxburgh	Asie
A. nilotica DeCaisne	Afrique

8.4. AZOLLA

Azolla est une symbiose entre une fougère aquatique de petite taille (1-10 cm) et une cyanobactérie fixatrice de N2 (Fig. 8.3). *Azolla* se développe dans des mares d'eau peu profondes, des rizières et des cours d'eau calmes.

L'identification de la nature symbiotique d'*Azolla* et du symbiote fixateur de N2 remontent au 19ème siècle. Par contre, les progrès concernant l'amélioration des souches pour une utilisation agronomique, et en particulier l'hybridation sexuelle et la recombinaison, sont très récents.

8.4.1. Les symbiontes

La symbiose implique d'une part une espèce de cyanobactérie (*Anabaena azollae*) et d'autre part l'une des sept espèces connues d'*Azolla* (Tableau 8.5).

8.4.2. Fonctionnement de la symbiose

La cyanobactérie endophyte se développe dans une cavité située à la base du lobe dorsal de chaque feuille d'*Azolla* (Fig. 8.3). On trouve également des cellules de la cyanobactérie dans le mégasporocarpe de la plante
(gamétophyte). Ce sont ces cellules qui recontaminent la jeune plante au moment où elle sort du sporocarpe pour reformer un sporophyte.

Les filaments d'*Anabaena azollae* ont un pourcentage d'hétérocystes (20 - 30%) nettement plus élevé que celui observé chez les cyanobactéries hétérocystées libres. Ceci traduit une activité fixatrice d'azote élevée. La nutrition azotée de la fougère est assurée par l'excrétion de l'azote fixé par la cyanobactérie. Cette excrétion est favorisée par la répression de la glutamine-synthétase de la cyanobactérie. Les poils absorbants situés à l'intérieur de la cavité foliaire favorisent l'absorption des substrats azotés excrétés par la cyanobactérie symbiote.

La recombinaison des deux symbiotes n'a pas encore été réalisée et l'on ne sait pas encore cultiver *Anabaena azollae* en dehors de son hôte.

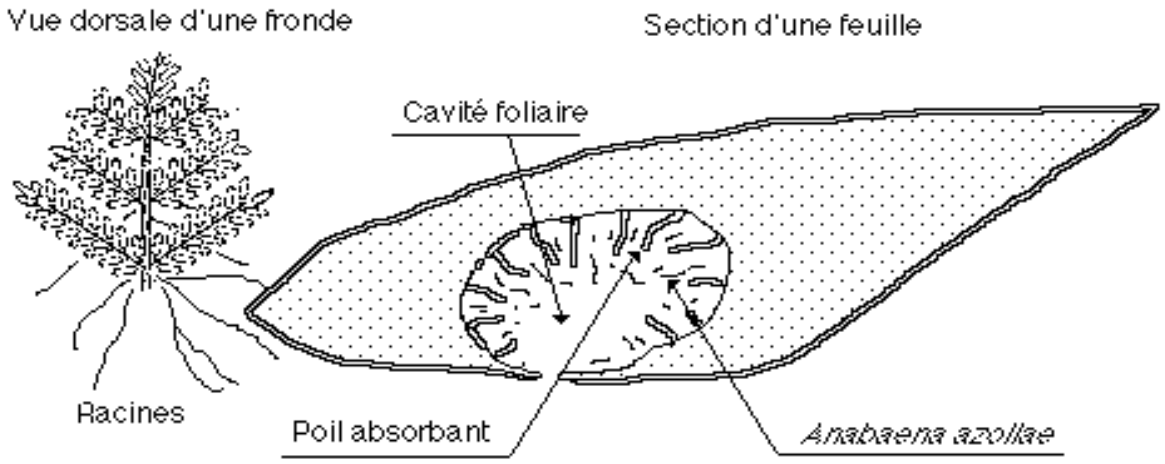


Fig 8.3. Morphologie d'une fronde d'*Azolla* (2-3 cm) et section de la feuille

8.4.3. Aspects agronomiques

L'utilisation d'*Azolla* comme engrais vert en riziculture remonte au 11ème siècle au Vietnam et au moins au 14ème siècle en Chine. La symbiose est cultivée dans la rizière avant et en même temps que le riz. La biomasse produite est ensuite enfouie et libère, en se décomposant, des éléments nutritifs (N,P,K) qui sont absorbés par le riz. Cette technique a permis des productions de 3-5 t ha-1 de riz sans apport d'engrais azoté.
La constitution d'une collection internationale d'*Azolla* a permis d'effectuer des criblages pour identifier les souches les plus adaptées à des conditions agro-climatiques données.
Des études récentes ont amélioré les connaissances sur la symbiose. Des hybrides ont été réalisés à partir de différentes espèces. Ils présentent des propriétés agronomique améliorées, combinant, par exemple, le niveau de fixation élevé d'une souche avec la résistance à des températures élevées d'une autre (Tableau 8.6).

Tableau 8.6. Biomasse, activité fixatrice de N2 et teneur en azote de deux espèces d'*Azolla* et de leur hybride cultivés pendant 28 jours à deux niveaux de températures

Espèce	température (° C)	Poids frais (g m^{-2})	ARA (μmol C_2H_2 $h^{-1}g^{-1}$)	N (%)
A. microphylla	37/29	1400	3.1	3,8
microphylla x *filiculoides*	37/29	1100	3.4	5,0
A. filiculoides	37/29	300	0.4	1,5
A. filiculoides	26/18	1800	4.6	5,2

8.5. LES MYCORHIZES ET LEUR POTENTIEL AGRONOMIQUE

Les mycorhizes (du grec: μυκεσ = champignon, ριζα = racine) sont des organes mixtes formés par des racines et des champignons symbiotes du sol.
Les champignons symbiotes peuvent former deux types d'associations:
- racine-champignon qu'on appelle mycorhize engendrés par les champignons mycorhizogènes.
• graine (protocorme)- champignon, spécifique aux orchidées. Elle permet aux graines qui n'ont pas suffisamment de réserves de se développer.

Presque toutes les plantes se développent en formant des mycorhizes. Il en existe plusieurs types, distincts par leur morphologie et par les champignons qui les engendrent.

Tableau 8.7. Différents types de mycorhizes

MYCORHIZES	PLANTES	CHAMPIGNONS
Ectomycorhizes		
	3 à 5% des espèces végétales: Espèces ligneuses exclusivement, surtout des forêts tempérées et boréales: • Pinacées: (pins, sapins, épiceas, cèdres, melèzes...) • Fagacées: (hètres, chênes, châtaigniers. ..) • Bétulacées: (bouleaux, charmes...) • Salicacées: (saules, peupliers...) • Myrtacées: (eucalyptus)	• Basidiomycetes: *Boletus* *Laccaria* *Amanita* *Lactarius* *Russula* • Ascomycètes: *Tubor* *Elaphomyces* (Truffe de cerf) • Zygomycètes: *Endogone*
Endomycorhizes		
Orchidoïdes	• Orchidacées: (goodyera, vanille, ophrys)	• Basidiomycètes: *Ceratobasidium* *Armilaria* *Thanatephorus* *Tulasnella*
Ericoïdes	• Ericacées: (callune, myrtille, rhododendron, azalée) • Empetracées • Epacridacées	• Ascomycètes: *Pezize//a ericae*
	80% des espèces végétales: • Ptéridophytes • Gymnospermes • Angiospermes	• Zygomycètes: *Glomus* *Gigaspora* *Acau/ospora* *Sclerocystis*...
Ectendomycorhizes		
Arbutoides	Arbutacées (arbousier) Pyrolacées (pyrole)	• Basidiomycètes (peuvent aussi former des ectomycorhizes) *Boletus*
Monotropoides	Monotropacées (monotrope)	*Laccaria* *Cortinarius*

N.B.: Certaines familles ne forment pas ou très rarement des mycorhizes: Joncacées, Chénopodiacées, Crucifères, Saxifragées, Protéacées (plantes tropicales), ce qui représente 5 à 10 % des espèces végétales.

Tableau 8.8. Caractéristiques des principaux types de mycorhizes
(d'après Paul et Clark, 1989)

Caractéristiques	Endo mycorhizes	Ecto mycorhizes	Ectendo mycorhizes	Mycor-rhizes arbutoides	Mycorhizes mono-tropoides	Mycorhizes éricoides	Mycor-rhizes des orchidées
Champignon septé	-	+	+	+	+	+	+
Champignon non septé	+	+	-	-	-	-	-
Hyphes pénétrant dans la cellule	+	-	+	+	+	+	+
Gaine mycélienne	-	+	+/-	+	+	-	-
Formation d'un réseau de Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Boucles intracellu-laires de mycélium	+	-	+	+	-	+	+
Haustoria dichotomique	+	-	-	-	-	-	-
Haustoria non dichotomique	-	-	-	-	+	-	+/-
Vesicules intra cellulaires	+/(-)	-	-	-	-	-	-
Taxon mycélien	Phyco	Basidio Asco Phyco	Basidio Asco	Basidio	Basidio	Asco (Basidio)	Basidio
Hôte	Bryophyte Pteridoph. Gymnosp. Angiosp.	Gymnosp. Angiosp.	Gymnosp. Angiosp.	Ericales	Monotro-pacées	Ericales	Orchidacées

8.5.1. Les différents types de mycorhizes

Le tableau 8.7 donne une idée de la variété des associations existantes et le tableau 8.8 des caractères utilisés pour la taxonomie des mycorhizes. Les mycorhizes les plus courantes sont les formes vésiculaires et arbusculaires (VAM) qui sont des endomycorhizes formées par des Zygomycètes.

En général, seuls les mycorhizes ectotrophes (externes) induisent une transformation morphologique et anatomique de la racine. L'infection par des endophytes cause simplement un épaississement du cortex et un développement irrégulier de la racine.

8.5.1. 1. Les ectomycorhizes

Les racines qui forment des ectomycorhizes sont visibles à l'oeil nu; on les distingue par leurs formes courtes et épaisses dues à un manchon mycélien sur leur surface.

Les ectomycorhizes produisent des structures variées: un seul hôte peut porter de nombreux types différents d'ectomycorhizes. Il est possible de distinguer certains champignons par la couleur du manchon fongique (par exemple noire: *Cenococcum graniforme;* blanche: *Scléroderma aurantium*; jaune: *Pisolithus tinctorius.* Par contre, plusieurs champignons peuvent être responsables de la couleur brune du manchon fongique (exemple *Lactarius*).

Les racines ectomycorhizées des gymnospermes, par exemple le pin, sont toujours très ramifiées, tandis que celles des angiospermes, par exemple le hêtre, ne le sont pas. Le champignon entoure les racines courtes d'un manchon mycélien épais et pénètre à l'intérieur de la racine. Il reste cependant intercellulaire, formant le réseau de Hartig. Il ne franchit jamais les parois des cellules vivantes . Ces transformations morphologiques peuvent être induites par des extraits acellulaires du champignon mycorrhizien.

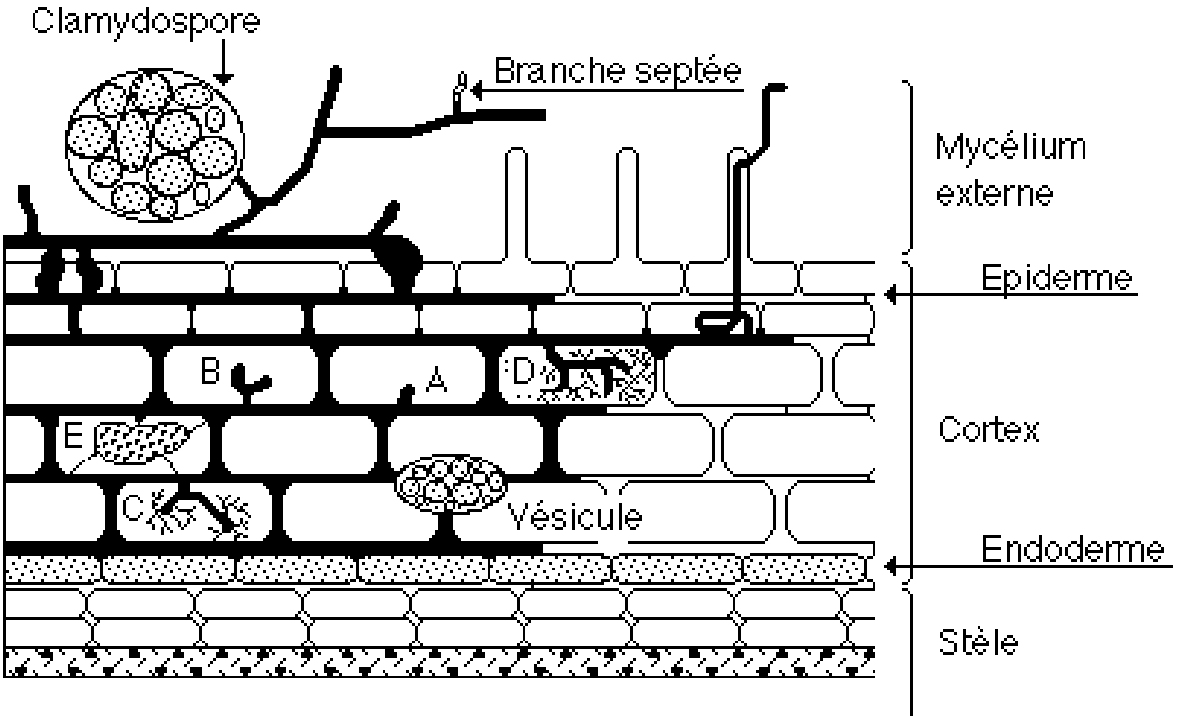


Fig. 8.4. Schéma d'une endomycorhize vésiculaire arbusculaire (VAM)*

* Les arbuscules sont schématisés à différents stades de développement (A à E). Pour faciliter la lecture du schéma, les parois cellulaires ne sont pas représentées lorsqu'elles sont contigues au mycélium.

8.5.1.2. Les endomycorhizes

Les endomycorhizes sont des champignons endogonés vésiculo-arbusculaires (VAM) pénétrant à l'intérieur des cellules racinaires en formant des structures caractéristiques en formes d'arbuscules et de vésicules (Fig.8.4). Ils ne peuvent se développer qu'en présence d'une plante hôte.

Contrairement aux ectomycorhizes, il n'y a pas formation de manchon mycélien autour des racines et on ne distingue pas les racines endomycorhizées à l'oeil nu. Il faut colorer le champignon, par exemple au bleu trypan, afin de le distinguer dans les tissus de la racine. Chez les endomycorhizes, le champignon pénètre à l'intérieur de la racine et se développe au niveau du parenchyme cortical . Il colonise l'intérieur des cellules du cortex en repoussant le plasmalemne sans toutefois le rompre. Il existe différents types d'endomycorhizes:

- Chez les endomycorhizes à pelotons (cas de beaucoup d'éricacées), les hyphes du champignon se développent en pelotons à l'intérieur des cellules de la racine. La morphologie des endomycorhizes des orchidées est très voisine de celle des éricacées.

• Chez les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VA), en général, le champignon se développe d'abord entre les cellules du cortex, puis dans les cellules de l'hôte, où il forme des suçoirs ou haustoria nommés arbuscules. Ce sont des structures très ramifiées de forme arborescente . Elles établissent une très grande surface de contact entre le champignon et la cellule hôte qui n'est pas endommagée par sa présence. Il se forme ainsi une structure très favorable aux échanges nutritifs qui se font entre les deux partenaires. Au cours de son développement, le champignon forme aussi des vésicules qui sont des renflements d'hyphes contenant des lipides. Les vésicules sont des organes de réserve pour le champignon. Les vésicules et les arbuscules peuvent coexister dans une même racine.

8.5.1.3. Les ectendomycorhizes

Il s'agit de formes intermédiaires entre les deux types précédents. Elles sont caractérisées par un manchon fongique entourant les racines et la pénétration du champignon à l'intérieur des cellules externes sous forme de peloton (arbutacées) ou d'hyphes très courts (monotropacées).

Plusieurs champignons peuvent être simultanément responsables de l'infection d'un même système racinaire.

Il est important de noter que les champignons mycorhizogènes n'entrent jamais dans les tissus du méristème apical, ni dans le cylindre central des racines.

Dans presque tous les types de mycorhizes, les champignons développent un important réseau mycélien externe, qui va prospecter le sol à des distances parfois importantes de la racine. Ce réseau mycélien externe assure une très grande surface de contact entre le sol et la racine.

8.5.1.4. Les champignons mycorhizogènes

L'identification des champignons mycorhizogènes se fait grâce à leurs fructifications et à leurs spores.

Les fructifications peuvent être formées à la surface du sol, elles sont dites épigées, ou dans le sol et elles sont dites hypogées.

- Les fructifications épigées sont:
  - généralement macroscopiques, il s'agit de carpophores.

ex.: *Boletus edulis* - cèpe de Bordeau ; *Amanita muscaria* - Amanite tue mouche; *Hebeloma sp.* - Hebelome; *Laccaria laccata* - Laccaire; *Lycoperdon* - Vesse de loup.

  - rarement microscopiques.

ex.: *Glomus epigaeum* .

- Les fructifications hypogées peuvent être:
  - des sporocarpes macroscopiques

ex.: *Tuber melanosporum* - Truffe ,

  - des sporocarpes microscopiques.

ex.: *Glomus mosseae*,

  - des spores individuelles.

ex.: *Glomus sp.*.

Dans le cas des champignons formant des mycorhizes VA, les spores sont le plus souvent libres dans le sol. Elles ont généralement un diamètre compris entre 50 et 350 µm . Dans le cas des champignons ectomycorhiziens, les spores des ascomycètes ont une taille de 20 à 40 µm (ex. *Tuber melanosporum*), alors que celles des basidiomycètes sont plus petites, d'un diamètre de 5 à 10 µm.

Tableau 8.9. Biomasse de mycorhizes dans quelque plantes

Champignon	Hôte	% du poids des racines	Méthode de mesure	% d'infection des racines
Glomus fasciculatum	*Centrosema pubescens*	14	Chitine	95
Glomus mosseae	*Centrosema pubescens*	7	Chitine	100
Acaulospora laevis	*Centrosema pubescens*	5	Chitine	95
Glomus mosseae	*Vicia faba*	6	Microscopie	60
Glomus mosseae	*Allium porum*	10	Estimation	65
Glomus fasciculatum	*Glycine maximum*	16	Chitine	70
Glomus fasciculatum	*Sorghum bicolor*	3	Chitine	50
Ectomycorhizes	*Abies amabilis* 23 ans 180 ans	 12 3	Echantillonnage	nd
Ectomycorhizes	*Pseudotuga menziesii*	15	Microscopie + récolte	nd

8.5.2. Fonctionnement de la mycorhize

Les mycorhizes constituent une association symbiotique bénéfique aux deux partenaires.
Dans cette symbiose, le champignon est généralement incapable d'utiliser les polysaccharides complexes qui sont les principales sources de carbone dans le sol; il utilise au contraire, les glucides excrétés ou produits par les cellules végétales, cette production étant d'ailleurs fortement stimulée par les auxines que libère le champignon.
La plante mycorrhizée profite de l'association par l'augmentation de son système racinaire. La biomasse des mycorhizes représente entre 3 et 15% de la biomasse racinaire (Tableau 8.9). La fonction d'organe d'absorption et de translocation de la mycorhize a été montrée en particulier pour le phosphore.
Alors que de nombreux travaux anciens ont étudié et démontré l'importance des mycorhizes pour la nutrition de nombreuses plantes cultivées, et en particulier la nutrition phosphorée, les travaux récents privilégient l'étude de leur rôle dans la production de régulateurs de croissance des plantes.
Les champignons mycorhizogènes permettent à la plante de mieux utiliser certains composants du sol difficilement accessibles aux racines. Les plantes autotrophes synthétisent les éléments carbonés et vitaminiques qu'elles transfèrent aux champignons. Dans le cas de certaines plantes hétérotrophes mycorhizées (monotrope, orchidées, pyrole), les composés carbonés nécessaires à la plante sont fournis par le champignon à partir de la matière organique du sol.

Composés carbonés, Vitamines
---------->
Plantes autotrophes Champignons
<----------
P, N, H2O, hormones
Vitamines
---------->
Plantes hétérotrophes Champignon
<----------
Composés carbonés

Certains champignons mycorhizogènes responsables de la formation d'ectomycorhizes, ou d'endomycorhizes à pelotons (éricoides et orchidoides) peuvent être isolés et cultivés sur milieu synthétique sans la plante. Exemple: *Pezizella ericae* . On peut ainsi étudier leur physiologie. Ces champignons ont généralement un besoin en sucres simples pour leur croissance. Ils utilisent difficilement les composés carbonés complexes du sol tels que la cellulose ou la lignine.
Les champignons mycorhizogènes responsables de la formation d'endomycorhizes VA ne peuvent être cultivés en culture pure sans la plante hôte.
La plante tire avantage de l'association mycorhizienne. Dès qu'on détruit dans le sol les champignons mycorhizogènes par une fumigation chimique, par la chaleur ou par application de fongicide, beaucoup de plantes montrent des difficultés de croissance. Ces difficultés peuvent être compensées par l'introduction d'un ou plusieurs champignons mycorhizogènes appropriés. Certaines plantes supportent mieux que d'autres l'absence de mycorhize. La réponse différente de la plante à l'effet du champignon se nomme «dépendance mycorhizienne».
Les plantes qui forment des mycorhizes éricoides et celles qui forment des ectomycorhizes ont une dépendance mycorhizienne importante.
Les plantes qui forment des endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VA) présentent des

dépendances mycorhiziennes variables selon les espèces.
L'effet mycorhizien sur la croissance de la plante varie aussi en fonction du champignon associé aux racines .

Tableau 8.10: Processus physiologiques améliorés par la mycorhization

Processus physiologiques	Type de mycorhizes
Nutrition phosphatée	VA, éricoide, orchidoide, ectomycorhize
Nutrition azotée	VA, éricoide, ectomycorhize
Nutrition carbonée	Orchidoide
Absorption d'oligoéléments	VA, ectomycorhize
Tolérance aux métaux lourds	VA, éricoide, ectomycorhize
Tolérance au calcaire	Ectomycorhize
Absorption d'eau	VA, ectomycorhize
Production d'hormones	VA, ectomycorhize
Fixation biologique de l'azote par le Rhizobium	VA, ectomycorhize
Résistance à certains pathogènes du sol (champignons, nématodes)	VA, ectomycorhize

8.5.3. Effet physiologique des mycorhizes sur la plante

Bien que nombreuses observations démontrent que les champignons mycorhizogènes aident la plante à mieux se développer, les mécanismes impliqués sont complexes et l'on peut énumérer toute une série de processus physiologiques qui sont améliorés grâce à l'association mycorhizienne (Tableau 8.10).
Le l'effet principal des mycorhizes, quel qu'en soit le type, est d'assurer une meilleur nutrition minérale de la plante. Généralement, c'est l'absorption des éléments minéraux solubles présents en faible concentration et peu mobiles dans la solution du sol qui est surtout favorisée par l'association mycorhizienne (par exemple: phosphates, ammonium, certains oligoéléments tels le cuivre, le zinc).
L'influence des mycorhizes sur la nutrition peut être partiellement expliquée par les modifications morphologiques de la racine induites par le champignon: augmentation du diamètre de la racine et du nombre de branchements. Toutefois, la meilleure absorption d'éléments minéraux par les racines mycorhizées est essentiellement due à la forte capacité qu'ont les champignons mycorhizogènes à prélever ces éléments dans le sol et à les transférer ensuite vers les racines de la plante. Le réseau d'hyphes externes, qui émane des mycorhizes et se développe dans le sol confère aux racines mycorhizées une surface plus importante pour l'absorption des éléments minéraux. On observe que les plantes dont les racines sont pauvres en poils absorbants (oignon, citrus) ont la plus forte réponse à l'inoculation par des mycorhizes endogènes. L'action directe des hyphes fongiques a été démontrée pour le phosphore: le phosphate marqué par 32P absorbé par l'hyphe dans une zône non colonisée par la racine est transporté vers la racine et transmis à la plante.

8.5.3. 1. Nutrition phosphatée

La présence de mycorhizes permet l'absorption de phosphore soluble à la fois bien au-delà de la zone d'épuisement et en quantité suffisamment élevée pour la plante, même lorsque cet élément n'est présent dans le sol qu'à de très faibles concentrations. On ignore encore si les associations mycorhiziennes jouent un rôle important dans la mobilisation des phosphates peu ou non solubles (phosphates naturels, apatite, phytine) et difficilement utilisables directement par la plante. Cependant, les champignons des ectomycorhizes et des endomycorhizes éricoides peuvent, en culture pure, dégrader des formes de phytate. La mise en évidence d'une importante activité phosphatase dans les mycorhizes indique que l'association symbiotique augmente également la minéralisation du phosphore organique dans le sol .

L'analyse minérale des plantes mycorhizées révèle généralement une teneur en phosphore plus élevée que celle des plantes sans mycorhize. L'apport d'engrais phosphaté aux plantes sans mycorhize entraine une croissance comparable à celles des plantes mycorhizées sans engrais, par exemple dans le cas du *Citrus*.

8.5.3. 2. Nutrition azotée

Alors que les endomycorhizes VA ont pour effet principal l'amélioration de la nutrition phosphatée des plantes, les ectomycorhizes et les endomycorhizes éricoides jouent un rôle aussi important au niveau de la nutrition azotée que phosphatée.

Les ectomycorhizes et les endomycorhizes éricoides aident la plante notamment à mieux absorber les composés azotés solubles sous forme minérale (notamment ammonium) ou organiques (acides aminés) qui sont toujours présents en très faible concentration dans les sols organiques typiques des forêts et des landes. Cela se traduit souvent par un enrichissement en azote de la plante mycorhizée. Il semble que dans certaines conditions, les endomycorhizes VA puissent favoriser l'absorption d'ammonium. Par exemple chez *Pinus strobus,* on constate un accroissement de 86% de la teneur en azote des plants inoculés par rapport aux plants témoins non infectés.

8.5.3.3. Absorption d'oligoé-éments et tolérance aux métaux lourds

Les mycorhizes permettent également une meilleure absorption d'oligo-éléments peu mobiles dans le sol (Cu, Zn). Paradoxalement, lorsque ces éléments sont présents en trop grande quantité et ont un caractère polluant (pollution par les métaux lourds), les mycorhizes peuvent alors jouer un rôle de protection de la plante, probablement par une forte rétention de ces éléments au niveau des racines mycorhizées. Les plantes mycorhizées sont capables de se développer en présence de concentration en métaux lourds plus élevée que les plantes sans mycorhizes.

8.5.3.4. Tolérance au calcaire

On a constaté que les jeunes pins non mycorhizés d'espèces réputées calcicoles présentent des difficultés de croissance sur terrain calcaire, alors que les plants mycorhizés ont un développement normal sur ce type de milieu. Jusqu'à présent, on ne connait pas le(s) mécanisme(s) physiologique(s) expliquant cette tolérance, cependant, on suspecte une meilleure absorption et réduction du nitrate (forme d'azote minéral prédominante en sol calcaire) par les racines mycorhizées et la précipitation de calcaire sous forme de cristaux d'oxalate sur la surface externe des ectomycorhizes.

8.5.3.5. Absorption d'eau

Les plantes ayant des ectomycorhizes ou des endomycorhizes VA résistent mieux que les plantes sans mycorhize à un déficit hydrique du sol. Les mécanismes physiologiques par lesquels les mycorhizes

interviennent dans l'alimentation en eau de la plante sont mal connus. Si pour les endomycorhizes cela s'explique surtout par une meilleure nutrition phosphatée des plantes, pour les ectomycorhizes les hyphes externes permettent une meilleure exploitation de l'eau du sol.

8.5.3.6. Interaction avec les microorganismes pathogènes

A cause d'interaction entre les champignons mycorhizogènes et les pathogènes des racines , la formation des mycorhizes peut rendre la plante plus résistante ou tolérante à certains pathogènes comme les nématodes ou les champignons tels que*Fusarium* et *Pythium.* Cet effet protecteur dépend du champignon mycorhizogène, du type de plante hôte et des conditions du milieu. Dans le cas des ectomycorhizes, cette influence pourrait s'expliquer par la barrière mécanique du manchon mycélien, par une sécrétion de substances antibiotiques ou par la stimulation des mécanismes de défense de l'arbre. Pour les endomycorhizes, la protection, plus complexe, et dûe à l'intervention de plusieurs facteurs tels que la lignification, et l'augmentation de la production de métabolites par la plante.

8.5.3.7. Interaction avec les microorganismes fixateurs d'azote

Les légumineuses peuvent héberger simultanément dans leurs racines deux types de symbiotes: une bactérie fixatrice d'azote du genre *Rhizobium* et un champignon endomycorhizogène. La nodulation 100 par le *Rhizobium* est fortement augmentée chez les légumineuses en présence de champignons endomycorhizogènes dans les racines d'autant plus que le sol est pauvre en phosphore. La double inoculation avec le *Rhizobium* et un champignon endomycorhizogène augmente le taux de fixation de l'azote, ce qui se traduit par une meilleure croissance de la plante.

8.5.3.8. Production de substances de croissance

On a constaté chez certaines plantes mycorhizées une augmentation des quantités de substances hormonales telles que gibberellines, auxines, cytokinines. D'autre part, on a démontré que les champignons mycorhizogènes peuvent produire des substances apparentées aux hormones végétales.

Chez les ectomycorhizes, l'influence de ces hormones se traduit par une prolifération des ramifications des racines mycorhizées.

8.5.4. Influence de l'environnement sur les mycorhizes

Les mycorhizes sont localisées dans le sol. Aussi leurs caractéristiques propres ainsi que les facteurs externes susceptibles de les modifier, influencent-ils les mycorhizes.

8.5.4.1. Facteurs climatiques

Lumière: Son rôle au niveau de l'activité photosynthétique est essentiel. Une activité photosynthétique importante augmente la concentration en glucides dans la racine, nécessaire à la croissance du champignon mycorhizogène. Ces conditions permettent un bon développement de l'infection mycorhizienne.

Température: L'optimum de température permettant le développement des champignons mycorhizogènes et l'établissement de la symbiose, varie en fonction du type de partenaire. Dans le cas des endomycorhizes VA, les champignons des zones tropicales peuvent se développer à des températures plus élevées (30°C) que ceux provenant des zones tempérées. On a isolé une souche de champignon ecto-mycorhizogène qui peut se développer normalement à 34°C : *Pisolithus tinctorius.*

Saison: En période estivale, l'activité des mycorhizes est fortement ralentie lorsqu'il y a manque d'eau. Il en est de même en

hiver, surtout pendant les périodes de grands froids. Les deux périodes probablement les plus favorables à l'activité des mycorhizes sont le printemps et l'automne. En automne, dans le cas des espèces fongiques à ectomycorhizes il y a surtout transfert de matière carbonée au champignon. ce qui permet le développement des fructifications.

8.5.4. 2. Facteurs du sol

- **pH:** Il peut avoir une influence importante sur le développement des mycorhizes car il existe des espèces fongiques qui ne se développent pas à certains pH. Par exemple: *Glomus mosseae* est inhibé par des pH acides, *Acaulospora laevis* est inhibé par des pH neutres et alcalins. Par contre, on peut trouver des espèces adaptées à des variations importantes de pH. Exemple: *Suillus granulatus, Lactarius deliciosus, Glomus caledonium.*
- **Matière organique:** Elle améliore la structure du sol et par voie de conséquence peut favoriser le développement des mycorhizes. On ne connait pas encore de façon précise l'effet de la matière organique sur les mycorhizes.
- **Eau:** Les effets de l'eau sur le développement des mycorhizes sont complexes. L'excès ainsi qu'un manque d'eau sont préjudiciables à leur bon développement. Il existe toutefois des champignons adaptés aux sols hydromorphes comme ceux qui sont associés par exemple à des plantes en bordure de rivière.
- **Sols bouleversés:** La restauration d'une végétation sur des sols qui ont subi des bouleversements (exploitation de mines, aménagements divers) est source de difficultés. En effet, ces terrains présentent souvent des pH extrêmes, un taux de matière organique très faible, une grande pauvreté en éléments chimiques indispensables, ou un niveau élevé en éléments toxiques. Le potentiel mycorhizogène de ces sols est inexistant. L'utilisation de champignons mycorhizogènes appropriés doit permettre l'installation de plantes sur de tels sols.

8.5.4.3. Pratiques culturales

- **Fertilisation**: De nombreuses expériences ont mis en évidence une diminution de l'intensité de la mycorhization lorsque la disponibilité en phosphore et en azote augmente dans le sol. Cependant cet effet varie selon la plante et le champignon mycorhizogène impliqué. Une concentration élevée en ces éléments conduirait à une diminution de la disponibilité en sucres solubles au niveau de la racine, d'où une réduction du taux de mycorhization.
- **Rotation des cultures**: Les plantes de la famille des Crucifères (par exemple le colza) ou celles des Chénopodiacées (par exemple la betterave) ne forment généralement pas de mycorhizes. Leur culture durant plusieurs années sur un même sol peut entrainer une forte diminution ou la disparition des champignons trouvent pas de plante hôte qui leur convienne. Aussi, afin de préserver le potentiel mycorhizogène d'un sol, est-il souhaitable de prévoir l'alternance de plantes formant et ne formant pas de mycorhizes.
- **Utilisation des pesticides**: Les effets des pesticides sont difficiles à généraliser. Ils dépendent dela nature et de la quantité du produit, de son mode d'application (foliaire ou au sol), ainsi que du type de mycorhize.

Fongicides :Les thiazoles (benomyl, thiabendazole) sont particulièrement actifs sur les
Zygomycètes (donc les endomycorhizes VA) et ont moins d'effet sur les Ascomycètes ou les
Basidiomycètes (donc les ectomycorhizes et les endomycorhizes éricoides). Les dicarboximides (captafol, captan) ne semblent pas inhiber la mycorhization. Les dithiocarbamates (manèbe, thirame, zirame) ne sont généralement inhibiteurs de la mycorhization aux doses d'utilisation normales. Ils peuvent le devenir à des concentrations plus élevées.
Herbicides: En général, ils ont peu d'effet sur la mycorhkation. Certains ont des effets néfastes (paraquat, trifluraline) alors que d'autres peuvent même la stimuler (simazine).
Insecticides et nématicides: En général, ils ont peu d'effet, toutefois certains stimulent la mycorhization (aldicarb, DBCP). Si l'influence des pesticides sur la formation des mycorhizes est connue, leur effet sur la physiologie de ces associations symbiotiques reste à préciser.

- **Désinfection des sols:** La nécessité d'obtenir des plants exempts de pathogènes (notamment pour l'exportation) oblige souvent les pépiniéristes à désinfecter le sol. Les traitements utilisés éliminent les pathogènes, mais aussi les champignons mycorhizogènes. Les biocides les plus nocifs sur les mycorhizes sont le bromure méthyle, les mélanges bromure de méthyle-chloropicrine, le dazomet, l'azide de sodium et le methan-sodium (Vapan).Ces traitements peuvent se traduire par un rabougrissement des plantes variable selon les espèces et pouvant aller jusqu'à la mort des plantes.
- **Production de plantes in vitro:** En horticulture, de plus en plus de plantes sont produites par culture de méristème et micro-propagation permettant d'obtenir des plantes uniformes et exemptes de maladies. Mais ces plantes qui ont poussé sur un milieu riche en éléments nutritifs et stérile peuvent subir lors de la transplantation un choc dû à des phénomènes de compétition et d'attaque par des agents pathogènes. Des expériences sur cultures fruitières ont montré que les plants inoculés avec des champignons endomycorhizogènes après leur sortie des tubes de culture ont une croissance nettement supérieure à celle des plants témoins non inoculés dans le milieu d'enracinement.
- **Production de plantes sur substrat:** L'horticulteur utilise fréquemment des substrats de repiquage qui ne contiennent pas de champignon mycorhizogène (substrats désinfectés ou inertes). Il s'agit donc de rechercher le substrat le mieux adapté à la fois au champignon et à la plante.

8.5.5. Aspects appliqués

L'inoculation avec des ectomycorhizes a un potentiel agronomique ou sylvicole dans les environnements où l'on ne peut, pour des raisons économiques, appliquer des engrais phosphorés. Les résultats expérimentaux ne sont toutefois pas toujours significatifs en raison des compétitions avec les souches indigènes.
La mycorrhization est nécessaire pour implanter certains arbres dans de nouveaux environnements.
C'est dans les pépinières, où le sol a été "décontaminé" (par des traitements à la vapeur ou des composés gazeux) et débarrassé des souches indigènes, que les effets de la mycorrhization sont les plus nets.

Les recherches dans le domaine des mycorhizes sont encore récentes. Si les caractères anatomiques et cytologiques sont connus dans leur ensemble, il convient de poursuivre les études physiologiques.
De meilleures connaissances permettront d'utiliser efficacement les possibilités de la mycorhization en agriculture, horticulture et sylviculture.

8.5.5.1. Exemples d'application

Des avances importantes d'applications ont été réalisées dans plusieurs domaines:

8.5.5.1.1. Production de plants truffiers

Jusqu'à ces dernières années, la truffe relevait d'activités de cueillette. Toutefois, entre le début du siècle et les années 1970, la quantité récoltée en France était tombée de 2 000 tonnes à moins de 100 tonnes par an; aussi a-t-on cherché à la cultiver.
Les études de l'I.N.R.A. ont abouti à la mise au point d'une méthode de trufficulture rationnelle basée essentiellement sur l'inoculation du sol à l'aide de plants préalablement mycorhizés exclusivement et abondamment par la Truffe. Diverses entreprises proposent maintenant la vente de jeunes plants truffiers (chênes, noisetiers).
Les plantations se font à forte densité (400 à 600 arbres par hectare, en lignes espacées de 5 à 6 mètres et à des distances de 3 à 4 m sur la ligne). La domestication a porté sur les meilleures espèces:
Tuber melanosporum - Truffe noire du Périgord et *Tuber uncinatum* - Truffe de Bourgogne.
La présence d'un arbre truffier se remarque par l'existence du brûlis autour ou à proximité du tronc. Ce phénomène s'expliquerait par l'action herbicide du mycélium et par sa capacité à monopoliser les réserves en eau du sol aux dépens des autres plantes. La truffe elle-même secréterait dans le sol une marasmine. La récolte se pratique à l'aide d'animaux dressés: chien, cochon ou à défaut à la mouche.
Avec les plants mycorhizés, les premiers brûlis sont apparus deux ans après plantation et les
premières truffes se sont formées deux ans plus tard. Jusqu'à 70 % de noisetiers producteurs de truffes sont obtenus après 3 ans et demi de plantation avec 3 kg de truffes récoltés/an pour 100 plants.

8.5.5.1.2. Pépinières forestières

Actuellement, il n'existe pas réellement d'inoculation commerciale de champignons mycorhizogènes en pépinières forestières (exception du Chêne et du Noisetier par *Tuber melanosporum).* Cependant, des résultats expérimentaux ont été obtenus depuis une cinquantaine d'années à l'étranger et en France.
Par exemple, le Centre National de Recherches Forestières de Nancy a étudié sur l'Epicéa et le Douglas l'inoculation à partir de culture pure d'*Hebeloma cylindrosporum.* L'effet sur la croissance est plus importante pour l'Epicéa que pour le Douglas. Après deux ans, les gains par rapport à la microflore normale de la pépinière sont de 100 % pour l'Epicéa et de 65 % pour le Douglas. Les résultats s'expliquent:
- par la présence de pathogènes dans le sol non désinfecté
- par une microflore fongique naturelle peu efficace et un niveau d'inoculum très faible pour les sols expérimentés *(Thelephora terrestris),*
- par une très grande rapidité d'infection du champignon introduit: I'introduction *d'Hebeloma cylindrosporum* permet d'utiliser convenablement les éléments minéraux du sol et d'améliorer la croissance même à un niveau de fertilité chimique élevé.

8.5.5.1.3. Plantations forestières

Dans le cas du pin, le succès de l'introduction dans des sols sableux qui n'ont jamais été plantés peut dépendre de l'inoculation; on montre alors que c'est la

nutrition phosphorée qui est le plus améliorée par la présence des mycorhizes (+ 200 % par rapport au témoin) suivie par le potassium (+ 120 %) et l'azote (+ 85 %). La réponse au phosphate de plants de *Pinus radiata* cultivés en sol déficient en phosphore est augmentée par l'inoculation par *Boletus ranulatus*, champignon mycorhizien ectotrophe de l'arbre. Des expériences de l'INRA dans l'Esterel sur pin maritime mycorhizé ou non au départ par *Pisolithus tinctorius* ont montré un effet positif initial de la mycorhization sur la croissance des arbres qui s'est maintenu pendant au moins 5 ans.

Une mycorhization avec un symbiote efficace au stade de la pépinière peut se traduire par une supériorité des plants mycorhizés, même en conditions de compétition avec d'autres champignons symbiotiques (conditions de reboisement normales en zone tempérée).

Les travaux effectués dans le Sud-Est des Etats-Unis en zone normale de reboisement, ont montré que quelles que soient les conditions du sol, l'effet de la mycorhization artificielle chez le pin par *Pisolithus tinctorius* est toujours supérieur à celui obtenu par *Thelephora terrestris* deux ans après la plantation.

8.5.5.1.4. Production de fruits

L'utilisation des endomycorhizes a permis le succès de la production d'agrumes dans le Sud-Ouest des Etats-Unis. L'obligation de désinfecter les sols pour des raisons phytosanitaires a obligé les pépiniéristes à recourir à une inoculation artificielle des sols par des champignons endomycorhizogènes afin d'obtenir une production normale des agrumes qui sont très dépendantes des mycorhizes pour un développement normal, même en présence d'un niveau de fertilisation élevé.

En Nouvelle Zélande, l'inoculation dirigée de champignons endomycorhizogènes a permis la production intensive de *Vaccinium corymbosum* - Myrtille géante.

8.5.5.2. Production d'inoculum:

8.5.5.2.1. Ectomycorhizes

Depuis plus d'un demi-siècle, on sait cultiver certains champignons ectomycorhizogènes sur milieu artificiel. L'avenir de la mycorhization contrôlée des pépinières et des plantations est liée à la mise au point d'un procédé industriel de production d'inoculum, bon marché, facile à conserver, à transporter et à manipuler.

Deux procédés font l'objet de recherches:

- La culture sur milieu solide (tourbe, vermiculite, etc...). Des coûts excessifs de production et une pureté du produit difficile à maitriser ont contraint en 1982 la société américaine qui s'était lancée dans la production industrielle d'inoculum à abandonner.
- La culture en milieu liquide aéré en fermenteur avant conditionnement. Les recherches sont poursuivies par le C.N.R.F. de Nancy qui tente d'inclure le mycélium dans un gel d'alginate de calcium accompagné de diverses charges minérales. Les produits préparés: granulés humides, poudre partiellement sèche se sont révélés efficaces en pépinière.

8.5.5.2.2. Endomycorhizes éricoides

Comme pour les champignons ectomycorhizogènes, on peut produire de l'inoculum en milieu liquide aéré en fermenteur. Cependant, un procédé industriel reste à développer.

8.5.5.2..3. Endomycorhizes VA

On n'a pas encore réussi à cultiver et multiplier en milieu stérile les champignons endomycorhizogènes VA en l'absence de la plante hôte. Pour une utilisation de ces champignons en pratique culturale, il se pose donc le problème de la production d'inoculum en grande quantité et exempt d'agents pathogènes.

La méthode la plus courante de production d'inoculum consiste à multiplier les champignons sur une plante hôte cultivée sur sol ou substrat désinfecté dans de grands conteneurs en serre. Ce type de production exige des contrôles phytosanitaires fréquents et n'est rentable que pour une utilisation sur de petites surfaces (serres, pépinières). Cette méthode est utilisée par les pépiniéristes du Sud-Ouest des Etats-Unis pour la production d'inoculum pour les cultures d'agrumes.

8.5.5.3. Techniques d'inoculation:

Le succès d'une inoculation dépend de plusieurs facteurs: fertilité du sol, dépendance mycorhizienne de la plante impliquée, population des champignons mycorhizogènes indigènes, efficacité de l'inoculum introduit à coloniser les racines et à améliorer la croissance de la plante hôte.

8.5.5.3.1. Ectomycorhizes

L'étude du processus d'infection mycorhizienne montre que l'inoculation retardée, deux à trois mois après le semis, lorsque les racines courtes réceptives sont nombreuses, était théoriquement la meilleure méthode. Pour des motifs d'ordre pratique, les recherches actuelles portent sur l'incorporation de l'inoculum au sol avant semis. Le substrat utilisé doit être dépourvu de tout champignon ectomycorhizogène pouvant entrer en compétition avec la souche introduite. Les meilleurs résultats sont obtenus en mélangeant de façon homogène inoculum et substrat. Des études engagées devraient permettre d'exprimer la dose optimale d'inoculum en nombre de propagules vivantes par unité de volume de substrat pour une situation donnée.

8.5.5.3.2. Endomycorhizes VA

Bien que l'on ne sache pas encore prodire d'inoculum sans plante hôte, il est possible d'envisager certaines méthodes d'inoculation du sol en utilisant soit des spores ou du sol préalablement infecté par le champignon choisi, soit un mélange des deux. Diverses techniques d'application sont possibles:

- mélange d'inoculum au sol directement avant la plantation,
- enrobage de graines avec un inoculum sous forme de spores ou de sol,
- infection préalable de plantes avant repiquage.

Suite aux travaux récents menés par l'INRA de Dijon, il est maintenant possible d'analyser préalablement des sols afin de dépister la nécessité d'une inoculation dirigée de champignon mycorhizogène VA pour une culture donnée.

8.6. ASSOCIATIONS MULTIPLES

Une plante hôte peut réagir avec plusieurs microorganismes, fournissant à chacun son habitat spécifique. Ainsi, plusieurs types d'infections peuvent se produire sur la même racine, mais elles ne sont jamais mélangées. Par exemple, les légumineuses peuvent être infectées par des champignons mycorhiziens, mais ceux-ci ne colonisent pas les nodules à rhizobium. Cependant, en raison de la spécificité des plantes hôtes, des nodules à rhizobium et à actinomycète ne peuvent pas coexister sur la même plante.

9. RELATIONS MICROORGANISMES-FAUNE DU SOL

La faune du sol peut affecter la microflore de façon directe ou indirecte.
Elle l'affecte de façon directe:

• par la prédation (zooplancton des rizières);
• en hébergeant des microorganismes spécifiques (microorganismes ligninolytiques de l'intestin des termites); et

• en favorisant la multiplication de certains groupes microbiens dans leur intestin (oligochaetes terrestres et aquatiques).

Elle affecte la microflore de façon indirecte par:

• la translocation des composés organiques et minéraux dans le profil de sol (oligochaetes); et

• les modifications qu'elle apporte à la structure physique du sol, ce qui a pour effet de modifier l'intensité des mouvements d'éléments nutritifs, d'eau et de gaz.

La figure 9.1 présente l'exemple des effets des oligochaetes aquatiques des rizières qui se déplacent dans les 20-30 centimètres supérieurs du sol et affectent, par la translocation d'éléments nutritifs, la microflore du sol ainsi que le phytoplancton et le zooplancton de l'eau de submersion.

En particulier, ces organismes augmentent les populations de sulfato-réducteurs qui sont plus nombreux dans leurs féces que dans le sol ingurgité. L'ensemble de ces activités se traduit par un effet de "feed-back" qui favorise la multiplication de ces invertébrés.

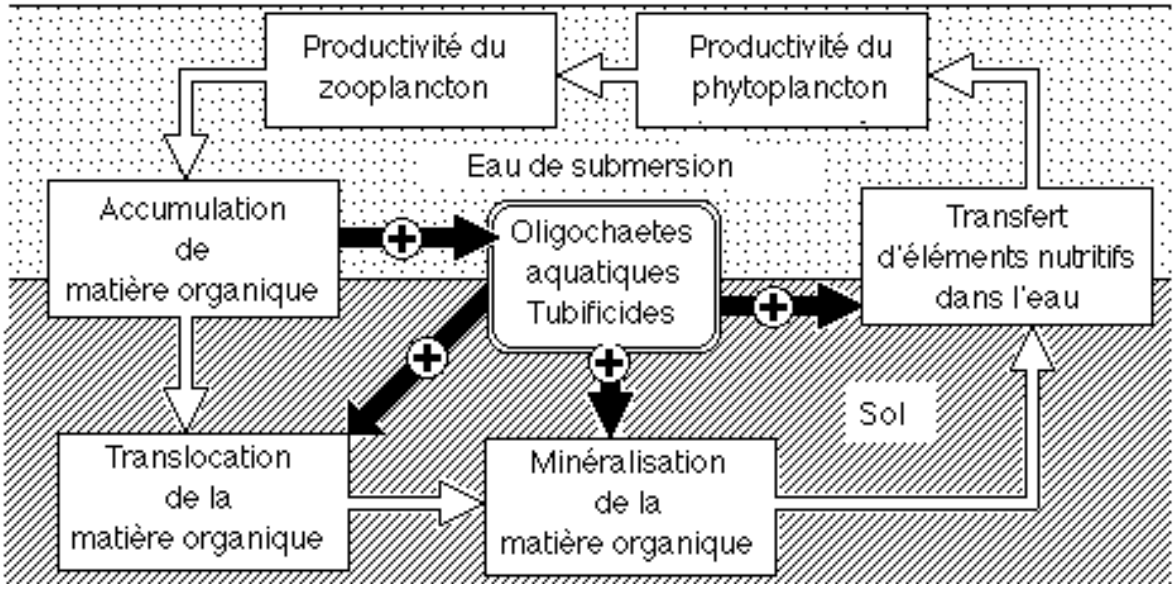


Fig. 9.1 Effet de "feed-back" des oligochaetes aquatiques dans les sols de rizière

10. CYCLE DU CARBONE

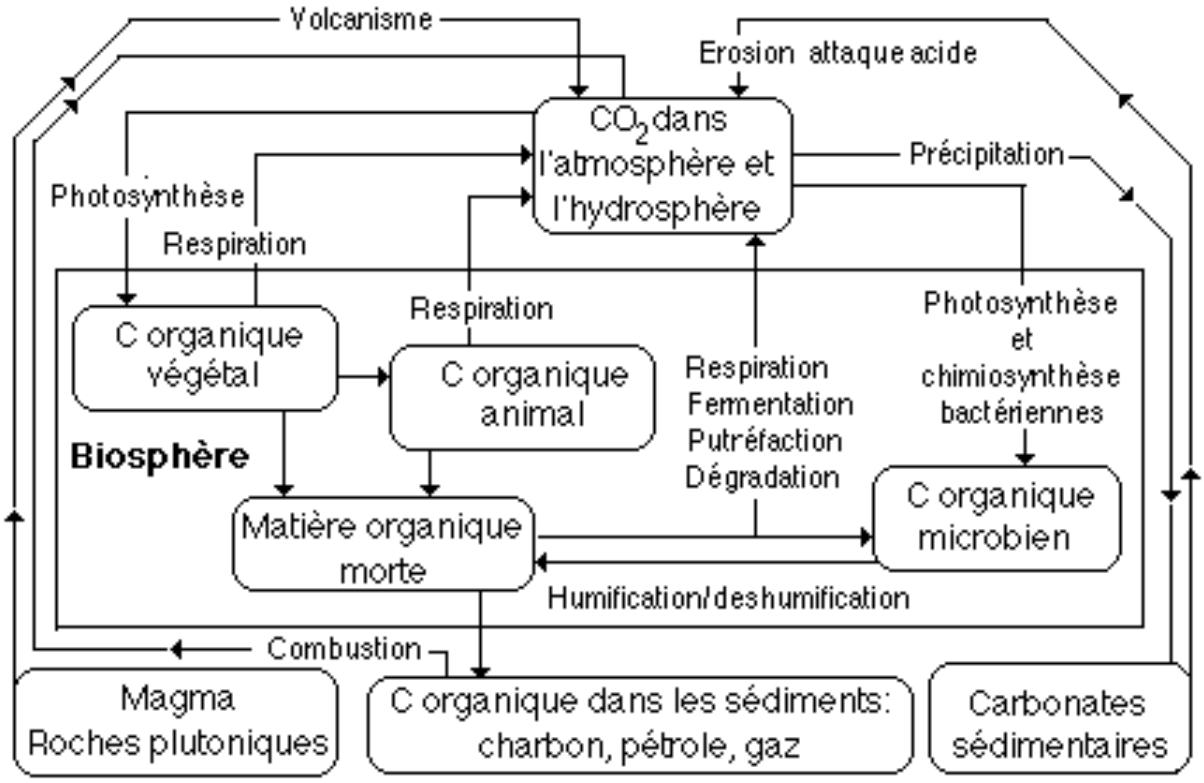


Fig. 10.1. Cycle du carbone dans la biosphère

10.1. GENERALITES

L'existence d'organismes au sein d'un écosystème suppose l'apport d'énergie nécessaire à l'absorption des éléments nutritifs, à l'entretien, à la croissance et à la reproduction.

Dans l'écosystème sol-végétation, l'énergie est principalement fournie par le rayonnement solaire.

Elle est convertie en énergie chimique par la composante phototrophe de l'écosystème. Au cours de la photosynthèse, l'énergie lumineuse est utilisée pour réduire la molécule de CO2 en "unités carbonées réduites", avec oxydation de la molécule d'eau en oxygène. L'énergie stockée sous forme de liaisons chimiques dans les composés carbonés est transférée sous cette forme dans tous les constituants de l'écosystème (Fig. 10.1; voir également Fig. 1.1). Le carbone qui est à la base de l'élaboration de la matière organique dans les êtres vivants est donc aussi le véhicule de l'énergie.

Les activités d'entretien, de croissance et de reproduction entraînent une dissipation d'énergie sous forme de chaleur, la perte d'un certain nombre d'unités carbonées par respiration sous forme de CO2, et la réduction de l'oxygène en molécule d'eau. Cycle du carbone, de l'oxygène et f1ux d'énergie sont donc intimement liés dans l'écosystème sol-végétation (Fig. 10.2).

L'importance des microorganismes dans ces cycles est évidente: la totalité du carbone utilisable par les plantes, c'est-à-dire le gaz carbonique de l'atmosphère, serait épuisé en 20 ans sans leur intervention dans la minéralisation de la matière organique. La Fig. 10.3 schématise, selon WAREMBOURG (1977) la circulation du carbone dans un écosystème prairial.

Un aspect important du cycle du carbone est celui des changements intervenant au niveau des différents compartiments (Tableau 10.1). En particulier, l'activité anthropique cause une augmentation de la concentration du CO2 et du CH4 dans l'atmosphère qui, par effet de serre,

augmente la température de la biosphère. Les effets possibles de ce réchauffement ont été amplement commentés par les média.

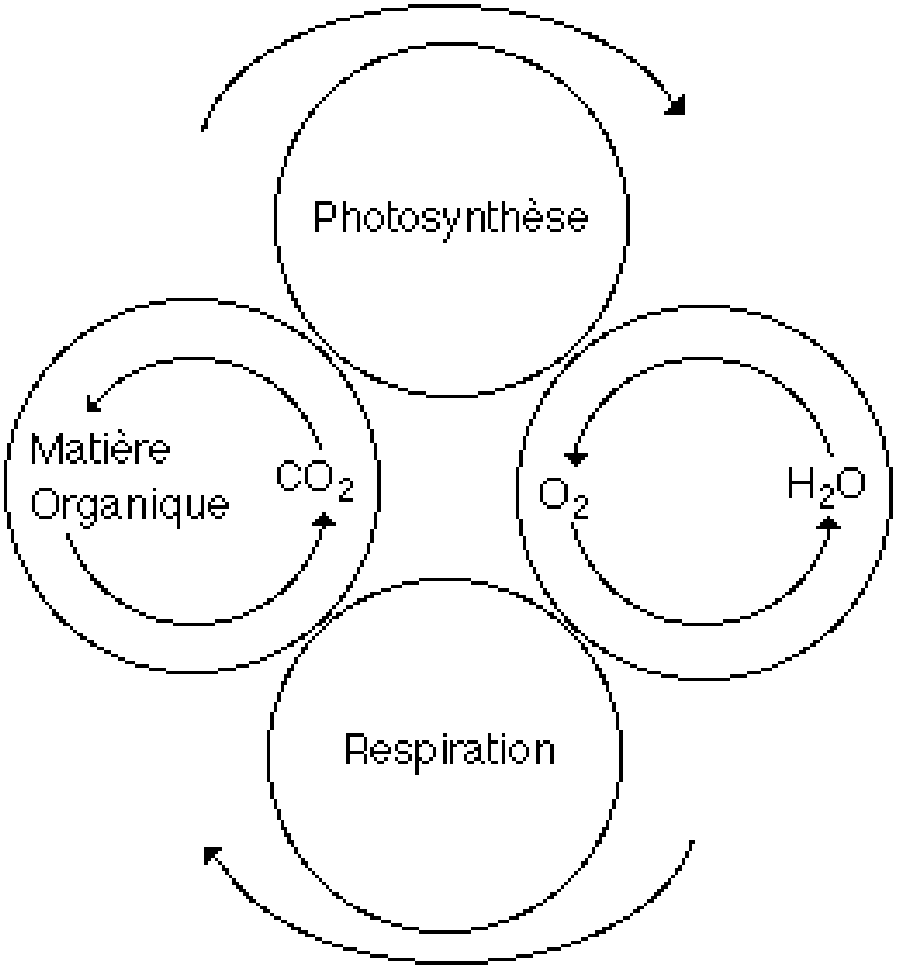


Fig. 10.2. Cycle du carbone, de l'oxygène et f1ux d'énergie dans l'écosystème sol-végétation

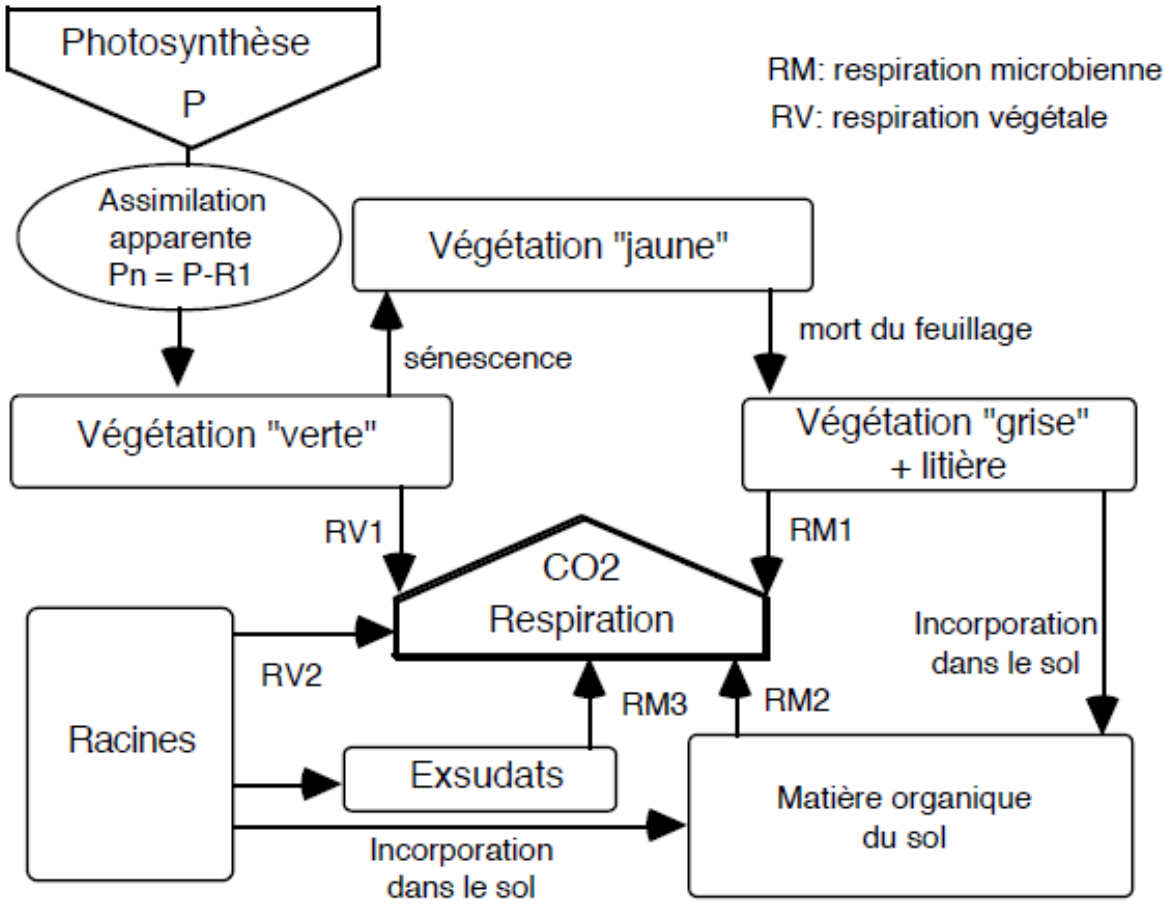


Fig. 10.3. Schéma de la circulation du carbone dans un écosystème prairial

Tableau 10.1. Réservoirs et des flux de carbone mondiaux (d'après Paul et Clark, 1989)

Réservoirs	**ppm**	**10^9 tonnes de carbone**
Atmosphère (CO_2, CH_4)		
1850	260	560
1890	290	630
1986	360	760
Océans		
Carbonates		20×10^6
C organique dissous		600
C organique particulaire et sédimentaire		3 000
Continents		
Biosphère		500
Humus		1 500
Combustibles fossiles		10 000
Sources et flux annuels estimés en 1987		
Combustion de sources d'énergie fossiles		+7
Brulis de forêts		+3
Abattage de forêts et décomposition		+6
Croissance des forêts		-4
Immobilisation dans les océans (diffusion)		-3
Flux annuel		**+9**

10.2. FIXATION DU CO2 PAR LES MICROORGANISMES AUTOTROPHES

Dans les sols exondés, les plantes supérieures sont les principaux agents de la fixation du gaz carbonique de l'atmosphère, et la contribution des microorganismes (algues, bactéries photosynthétiques vertes ou rouges, bactéries chimioautotrophes) reste généralement faible.

La contribution relative des algues et des bactéries photosynthétiques augmente dans les sols submergés. Dans les rizières, elle peut représenter 10% de la production primaire du riz (Fig. 10.4). Dans les océans, au contraire, ce sont les microorganismes planctoniques qui constituent l'élément le plus important pour la production primaire.

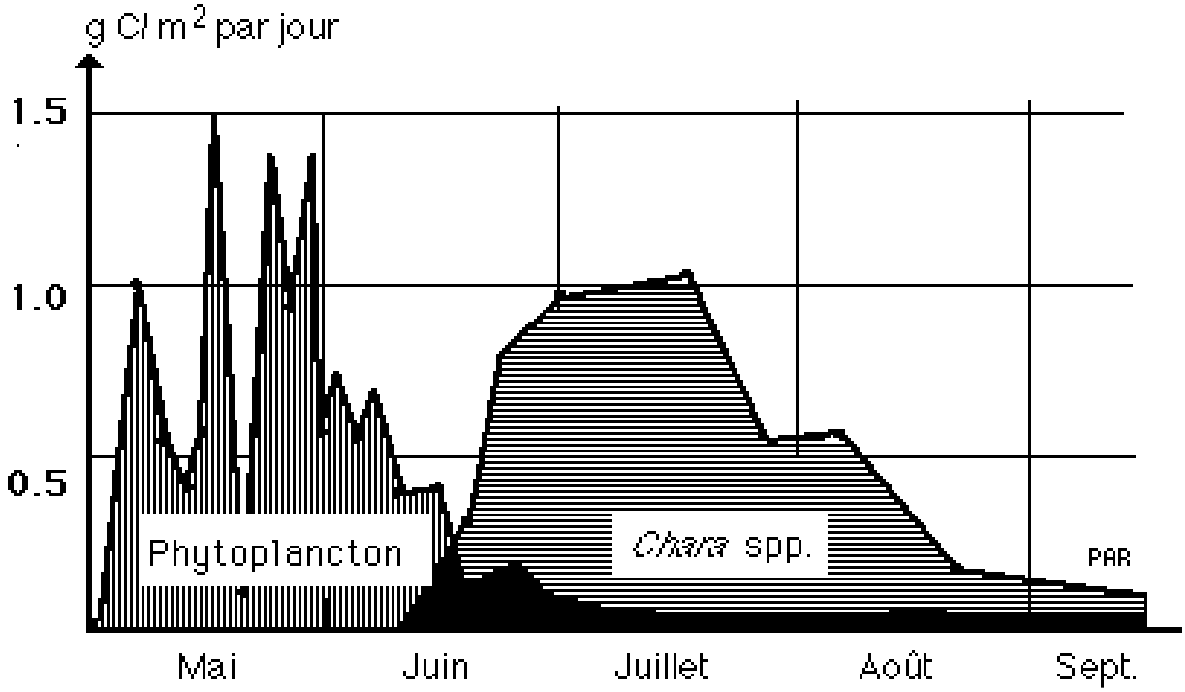


Fig. 10.4. Production primaire apparente dans une rizière de Camargue (d'après Vaquer, 1984)

10.3. UTILISATION DES EXSUDATS RACINAIRES PAR LES MICROORGANISMES

L'effet rhizosphère d'une plante est attribué en partie à l'exsudation par la racine, de composés organiques utilisables par la microflore hétérotrophe (cf. chapitre 5). Lors d'un marquage de plantes par du carbone radioactif 14C, on observe un premier pic de production de CO2 marqué, dû à la respiration racinaire, et un deuxième pic provoqué par la dégradation d'exsudats marqués. Ce deuxième pic est observé uniquement en présence d'une microflore rhizosphérique. Le mucigel, polysaccharide à haute valeur énergétique, est synthétisé par la racine principalement au niveau de la coiffe, mais à cet endroit les microorganismes sont pratiquement absents. Par contre à mesure que l'on s'éloigne de l'apex, le mucigel est moins abondant mais fortement colonisé par les microorganismes. Ces observations suggèrent que le mucigel est en fait le principal exsudat utilisé par la microflore rhizosphérique, son attaque au niveau de la coiffe étant différée par une "protection" attribuée, soit à des substances toxiques, soit à sa constitution fibrillaire.

10.4. MINERALISATION DES RESIDUS ORGANIQUES : CELLULOLYSE,

LIGNINOLYSE

L'oxydation des composés carbonés contenus dans les résidus végétaux ou animaux est réalisée par la combinaison des activités métaboliques de nombreux groupes microbiens. Ces constituants organiques doivent être digérés et les produits de cette digestion oxydés par des organismes capables d'utiliser ces produits. De nombreux aérobies mènent à bien cette oxydation jusqu'au stade final (CO2 et H2O), le gaz carbonique retournant à l'atmosphère. La concentration actuelle du CO2 dans l'atmosphère (0,03 %) est le résultat de l'équilibre entre la photosynthèse, la minéralisation (naturelle et anthropique) et le piégeage du CO2 sous forme de carbonates dans les océans, qui constituent un réservoir de gaz carbonique très important.

La composition des plantes varie dans les limites suivantes:

- Cellulose 15 - 20%
- Hémicellulose 10 - 30%
- Lignine 5 - 30%
- Protéines 2 - 15%
- Hydrosolubles (sucres, acides aminés, acides organiques) 10 %

Nous examinerons deux exemples de minéralisation : celle de la cellulose et celle de la lignine.

10.4.1. La Cellulolyse

La cellulose est un polyoside végétal qui représente environ 40 % des résidus végétaux. Elle est formée d'unités glucopyranose réunies en chaînes (Fig. 10.5) elles-mêmes groupées en fibrilles. La cellulose est dégradée en glucose suivant un ensemble de réactions enzymatiques que l'on peut schématiser ainsi :

1 2 3

cellulose insoluble -> cellulose soluble -> cellobiose -> glucose

1 = enzymes "C1", coupant les chaînes en morceaux plus courts (exocellulases)
2 = enzymes "Cx" réalisant la rupture de liaisons latérales (endocellulases)
3 = cellobiase, transformant le cellobiose en glucose

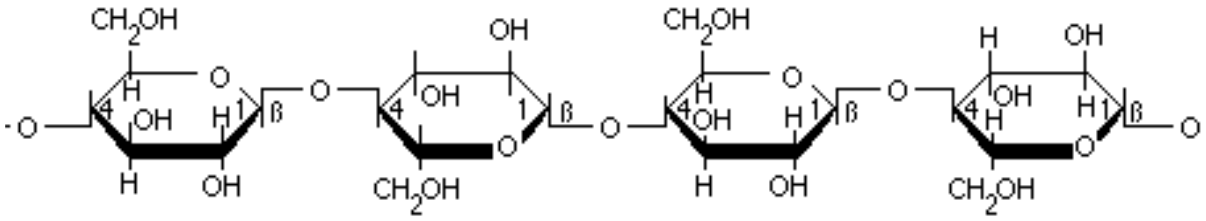


Fig. 10.5 Structure de la cellulose

Certains microorganismes (cellulolytiques vrais) possèdent l'ensemble de ces enzymes et peuvent donc transformer la cellulose en glucose, d'autres n'effectuent qu'une partie de ces transformations, mais leurs associations permettent également d'aboutir au glucose.

10.4.1.1. Cellulolyse aérobie

Dans le sol, le groupe le plus actif, étudié par WINOGRADSKY, est représenté par le genre *Cytophaga*. Ces bactéries filamenteuses s'attachent parallèlement aux fibrilles de la cellulose qui est attaquée par des enzymes exocellulaires. La cellulose est le seul substrat utilisable par *Cytophaga* en tant que source de carbone et d'énergie. Les *Cytophaga* sont des germes mésophiles (optimum 30° C) et acidotolérants. La cellulolyse aérobie est aussi le fait d'actinomycètes et de champignons (*Trichoderma*).

10.4.1.2. Cellulolyse anaérobie par les bactéries libres

La décomposition anaérobie de la cellulose est moins active dans le sol que la décomposition aérobie, elle est cependant réalisée par certaines bactéries (*Clostridium, Bacteroides*) associées, dans les sols réducteurs, à des bactéries méthanogènes ou fixatrices d'azote. Ces associations présentent aujourd'hui un grand intérêt pour la production de méthane à partir de matière verte cellulosique: l'énergie solaire captée par photosynthèse peut alors être transformée en énergie chimique directement utilisable.

10.4.1.3. Cellulolyse par les associations symbiotiques

Protozoaires ciliés des termites. Les protozoaires ciliés qui vivent dans l'intestin des termites peuvent constituer 1/3 du poids de l'insecte. Ils sont responsables de la digestion de la cellulose par le termite, l'insecte non infecté en étant incapable. Ces protozoaires ciliés sont eux-mêmes les hôtes de bactéries intracellulaires produisant des cellulases.

Bactéries du rumen. Contenant une très forte densité de microorganismes, le rumen (estomac des animaux ruminants) est le siège d'un grand nombre d'activités biochimiques ayant pour effet la décomposition de la cellulose en acides organiques (acétique, propionique, butyrique) et gaz (méthane, gaz carbonique). Comme dans le cas des termites, cette microflore symbiotique est responsable de la décomposition de la cellulose dans le tractus intestinal des ruminants, donc de la minéralisation du carbone ingéré sous forme organique.

Les animaux monogastriques comme l'homme sont incapables d'assimiler la cellulose qui sert de lest intestinal.

10.4.2. La ligninolyse

Moins abondante que la cellulose, la lignine est un polymère de composés phénoliques en C6 avec des chaînes en C3 (Fig. 10.6). Les monomères sont des unités diversement substituées de composition proche des "noyaux" humiques.

La dépolymérisation est effectuée principalement par des champignons (basidiomycètes), les bactéries jouant un rôle moins important. Les monomères peuvent ensuite être dégradés en CO2 et H2O (décomposition totale de la lignine) ou constituer les blocs précurseurs de l'humus (décomposition partielle).

La décomposition de la lignine étant un processus lent dans le sol, on utilise la lignine comme matrice d'inclusion d'engrais azotés (N-lignine), l'azote étant libéré progressivement au rythme de la ligninolyse (engrais retard).

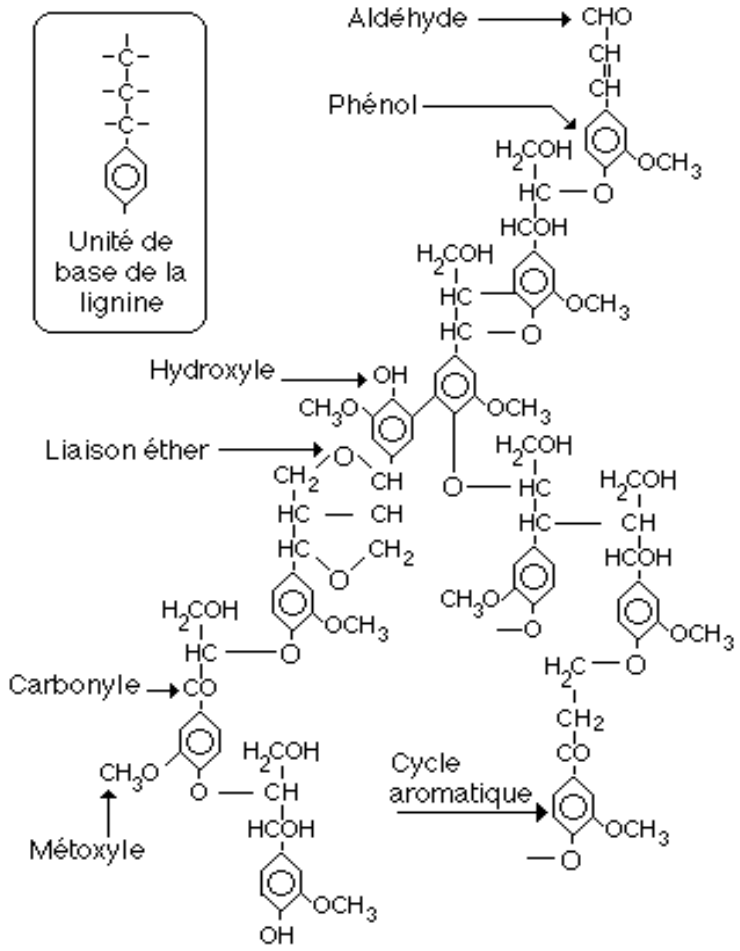
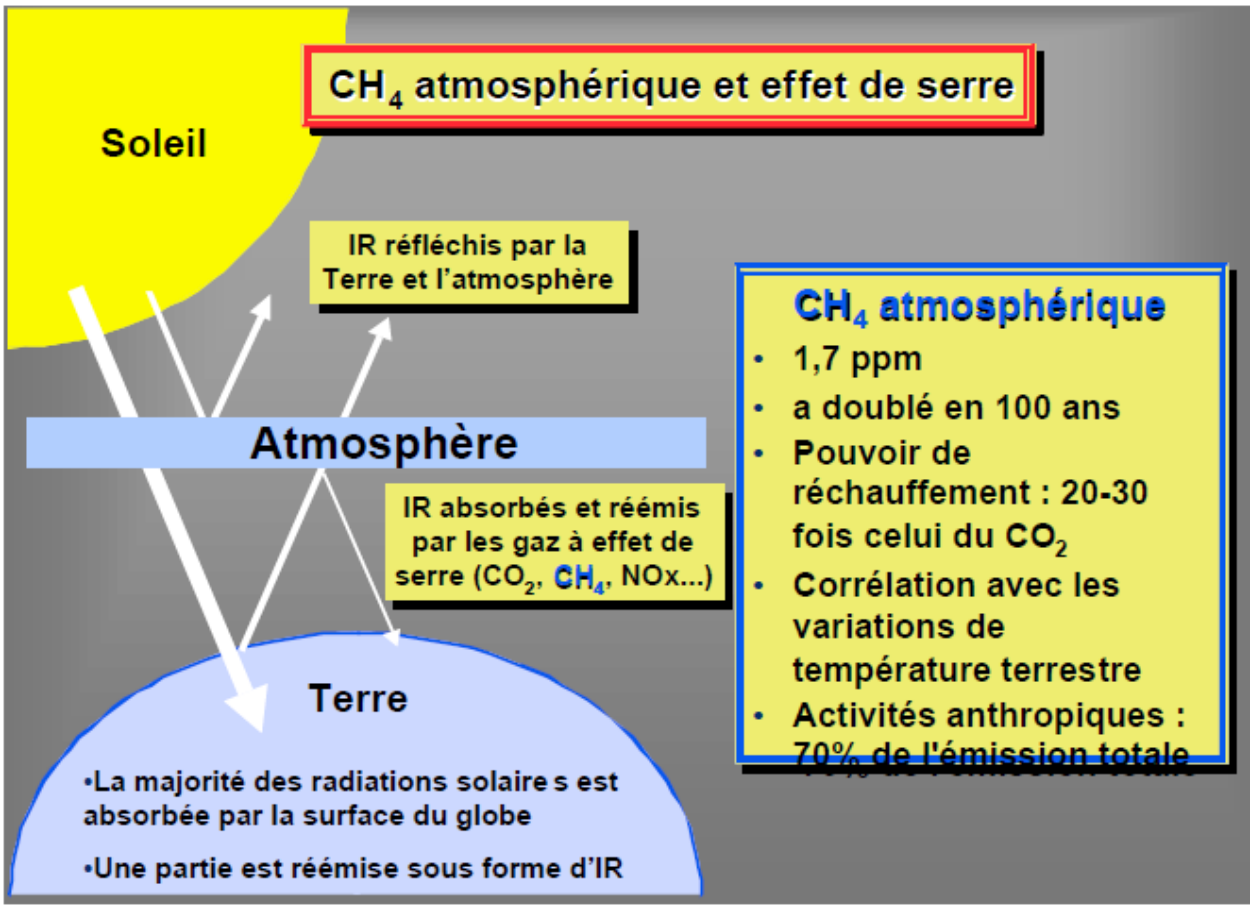


Fig.10.6. Représentation composite de lignine indiquant les principaux groupes fonctionnels

10.5. METHANOGENESE, METHANOTROPHIE, EMISSION ET CONSOMMATION DE CH4 PAR LES SOLS

10.5.1. Préambule: implications agronomiques et écologiques de la méthanogénèse et de la methanotrophie



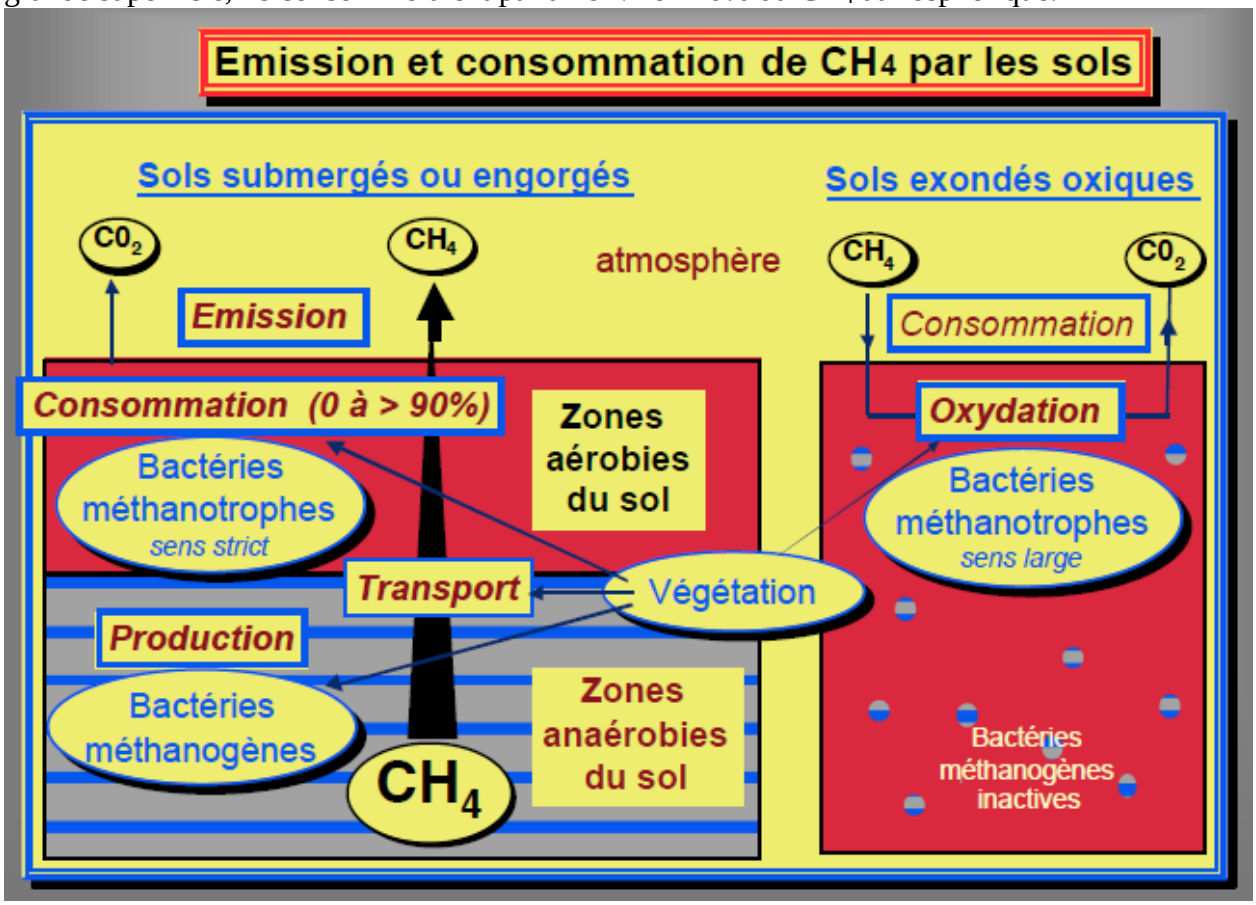
Le CH4 a une concentration moyenne de 1,7 ppm et un temps de résidence d'environ 10 ans dans l'atmosphère. Sa forte capacité à absorber les infrarouges lui donne un pouvoir de réchauffement 20 à 30 fois supérieur à celui du CO2. Il est considéré, après le CO2 et les CFCs, comme le troisième gaz responsable du réchauffement du globe. Des carottages dans la calotte glaciaire ont montré une augmentation de la concentration atmosphérique du CH4 liée aux activités anthropiques et ont permis d'estimer les émissions à 180 Tg/an au 15ème siècle (1 Tg = 1012 g) et 200 Tg/an au début du 18ème.

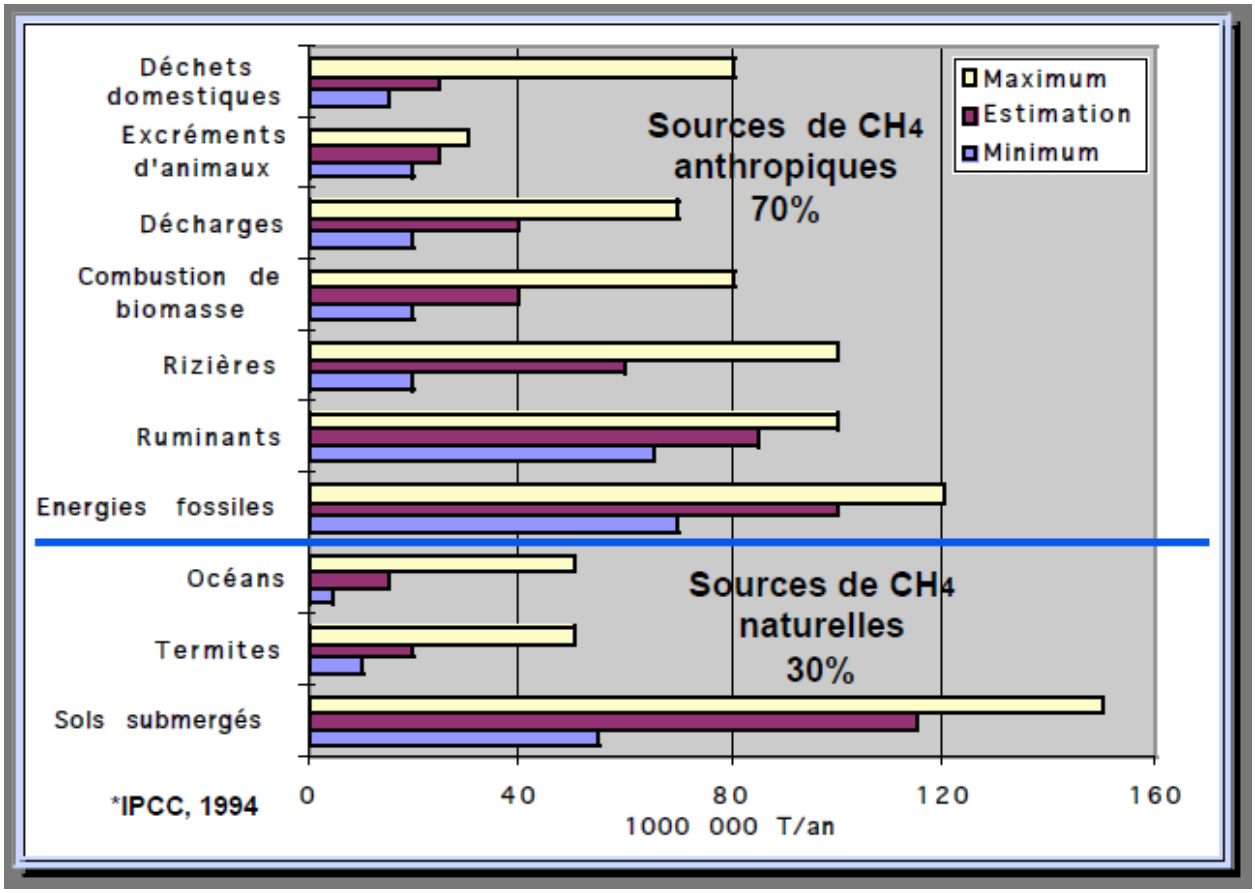
Les estimations de l'IPCC pour 1994 sont de 535 Tg CH4 avec une accumulation de 37 Tg.

Le CH4 atmosphérique est pour 70-80% d'origine biologique. Il est produit lors de la digestion anaérobie de la matière organique. Son émission par les sols résulte d'activités microbiennes antagonistes mais interdépendantes: la production dans des zones anaérobies par les méthanogènes et la reoxydation en CO2 dans des zones aérobies par les méthanotrophes.

Les sols inondés sont la principale des sources naturelles de CH4, responsables d'environ 30% de l'émission totale. Environ 70% des émissions de CH_4 sont d'origine anthropique. Les ruminants domestiques et les rizières responsables de 20 à 50% des émissions totales, font de l'agriculture la principale source de CH_4 anthropique. En raison de son importance économique et de son fort potentiel d'émission de CH_4, la rizière est l'écosystème le plus étudié. Sur la base d'une émission annuelle de 60 Tg de CH_4 par les rizières, la production d'un kg de riz correspond à l'émission de 120g de CH_4.

Le principal puits de CH_4 est la troposphère où il est éliminé par oxydation par les radicaux hydroxyles. Il réagit aussi avec le chlore provenant des CFCs dans la stratosphère. Les sols oxiques constamment exondés, exposés à des concentrations atmosphériques de CH_4, sont le second puits de CH_4 atmosphérique; la méthanotrophie y est faible mais en raison de leur grande superficie, ils consommeraient par an environ 10% du CH_4 atmosphérique.





10.5.2. Méthanogénèse

La minéralisation des polymères biologiques dans les environnements anoxiques se fait par fermentation méthanique et conduit à la libération de CH4 et de CO2. Cette transformation, résumée par la réaction: C6H12O6 --> 3CO2 + 3 CH4, nécessite les actions successives de quatre populations microbiennes (Fig. 10.7):

1. une microflore hydrolytique aérobie, anaérobie facultative ou stricte qui transforme des polymères en monomères (glucides, acides gras, acides aminés);
2. une microflore fermentaire acidogène anaérobie facultative ou stricte qui produit des acides gras volatils et organiques, des alcools, de l'H2 et du CO2 à partir des monomères et des intermédiaires de fermentation
3. une microflore syntrophique ou homoacétogène qui produit de l'acétate à partir de certains de ces métabolites, et
4. la microflore méthanogène sensu stricto qui nécessite une anaérobiose stricte et de faibles potentiels d'oxydo-réduction (Eh < -200 mV) et utilise un petit nombre de substrats simples (H2 + CO2, acétate, formate, méthanol, méthylamines, diméthylsulfure et des alcools) pour produire du CH4.

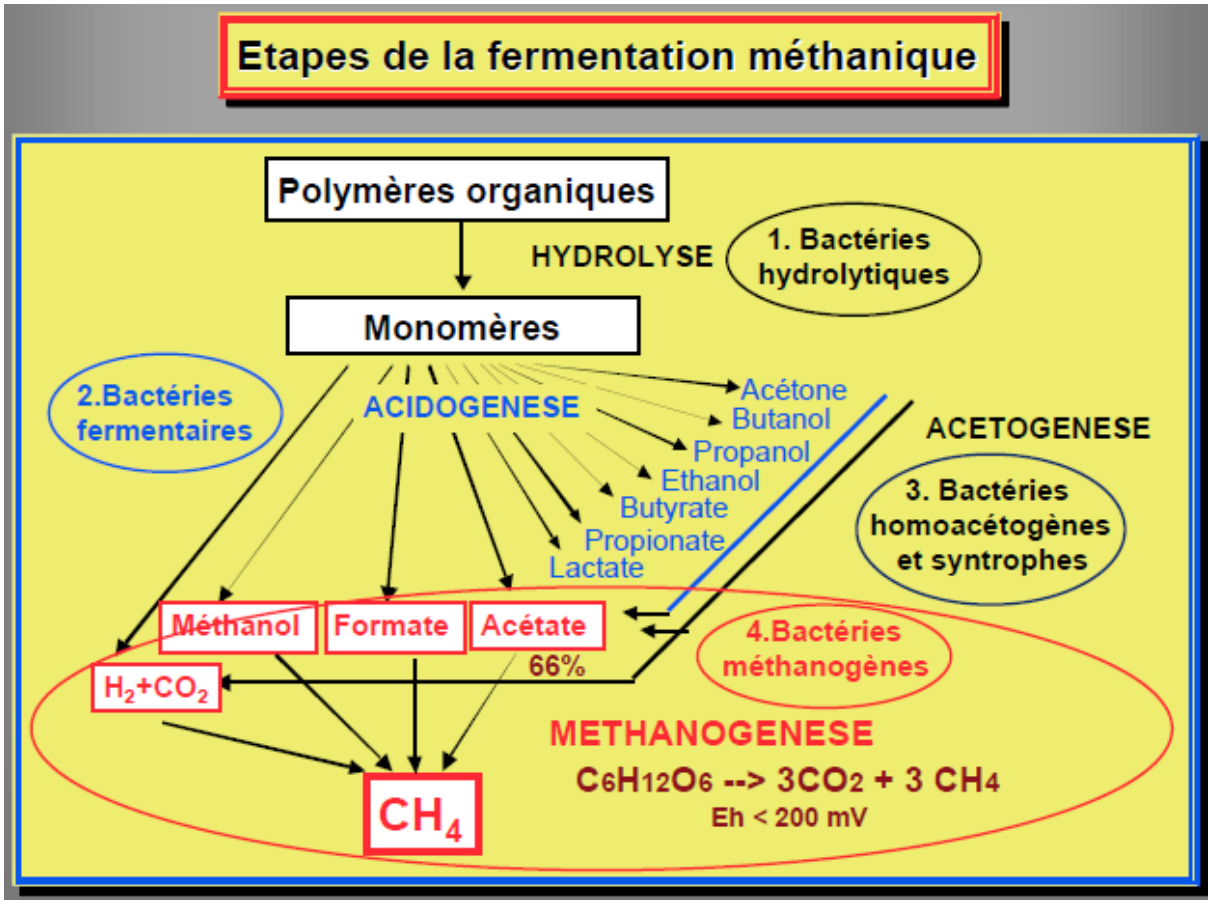


Fig. 10.7. Etapes de la fermentation méthanique

Dans les sols et les sédiments, environ 66% du CH4 est produit à partir de l'acétate. Le reste résulte de la réduction du CO2 par H2 et éventuellement du méthanol issu de la dégradation des pectines des algues.

Les méthanogènes sont probablement ubiquistes dans les sols. La méthanogénèse peut être rapidement initiée dans les sols de forêt et les sols arables par submersion. Dans les rizières, les densités de méthanogénèse ne semblent que peu affectées par les alternances dessiccation-submersion et varient peu au cours du cycle cultural

L'action détoxifiante des bactéries méthanogènes a été étudiée dans les sols de rizière. En inhibant l'activité des méthanogènes dans le sol par l'acétylène, on observe une accumulation d'acides organiques toxiques: les bactéries méthanogènes participent donc à leur élimination dans les zones les plus réductrices où ils ne peuvent pas être oxydés par la microflore hétérotrophe aérobie ou dénitrifiante.

Un aspect plus récent de l'étude de la méthanogénèse est lié à la quantification de l'émission de ce gaz dans différents écosystèmes et sa contribution à l'effet de serre mondial.

Tableau 10. 3 a et b Groupes trophiques de bactéries méthanogènes

Groupes trophiques de bactéries méthanogènes (26 genres > 60 spp)

	Cocci (15)	Bâtonnets (9)	Bâtonnets engainés (1)	Sarcines (1)
Hydrogénotrophes ($H_2 + CO_2$)	majorité	majorité	aucun	peu
Formatotrophes (Formate)	*Tous les formatotrophes sont hydrogénotrophes* plusieurs	plusieurs	aucun	aucune
Acétotrophes (Acétate)	2 espèces	aucun	tous	toutes
Méthylotrophes (Composés méthylés)	4 genres	aucun	aucun	toutes
Alcoolotrophes (2-butanol, 2-propanol...)	*Pas de formes strictes* peu	peu	aucun	peu

1. **Hydrogénotrophes**
   Utilisent H_2 + $C0_2$ et selon les espèces, le formate
   ex. *Methanobacterium, Methanobrevibacter, Methanothermus, Methanopyrus, Methanococcus, Methanomicrobium, Methanolacinia, Methanoculleus, Methanogenium, Methanocorpusculum, Methanospirillum, Methanoplanus, Methanoplasma*
2. **Acétoclastes**
   Utilisent acétate et selon les espèces, H_2 + $C0_2$, formate, méthanol et méthylamines
   ex. *Methanosarcina, Methanothrix-Methanosaeta*
3. **Méthylotrophes**
   Utilisent méthanol et méthylamines
   ex. *Methanolobus, Methanococcoides, Methanohalophilus, Methanohalococcus, Methanohalobium*
4. **Hydrogénométhylotrophes**
   Utilisent exclusivement H_2 + méthanol
   ex. *Methanosphaera*
5. **Alcoolotrophes**
   Utilisent le CO_2 et des alcools secondaires (2-propanol, 2-butanol, éthanol)
   ex. *Methanobacterium, Methanospirillum , Methanogenium, Methanocorpusculum*

Les bactéries méthanogènes appartiennent au nouveau groupe bactérien des archéobactéries (Fig.2.1) dont la définition s'appuie sur la détermination directe des séquences de l'ARN ribosomique 16 S.
Le groupe des archaebactéries regroupe les bactéries méthanogènes et des bactéries extrêmophiles telles des halobactéries, qui exigent des concentrations é1evées en sel, et des bactéries thermoacidophiles, que l'on rencontre dans les sources d'eau chaude sulfureuse (température voisine de 100°C, pH voisin de 1,0).
Les bactéries méthanogènes hydrogénophyles, anaérobies strictes capables de réduire le CO2 en méthane grâce à l'hydrogène, ont un métabolisme qui convenait parfaitement au type

d'atmosphère qui régnait primitivement sur la terre: beaucoup de CO2, un peu d'H2 et pratiquement pas d'O2.
Le nom d'archéobactéries implique que ces organismes dominaient la biosphère primitive. Avec l'évolution des conditions d'environnement et l'apparition de la photosynthèse, donc de l'oxygène, les méthanogènes ont été reléguées dans leurs niches écologiques actuelles.
Plusieurs caractères biochimiques sont en faveur d'une telle classification:
• L'absence de peptidoglycane et d'acide muramique, caractéristiques de la paroi des Eubactéries.
• L'absence de transporteurs d'électrons comme les cytochromes, les flavines et les quinones.
• La présence de composés de remplacement originaux comme le coenzyme M (acide 2-mercaptoéthane-sulfonique), les coenzymes F420 et F430 (un composé tétrapyrolique avec nickel), la méthanoptérine. Le coenzyme F420 développe une fluorescence bleu-verte intense en lumière ultraviolette ce qui permet de détecter facilement en épifluorescence les bactéries méthanogènes dans une culture mixte.
• Des lipides de la paroi cellulaire différents de ceux des Eubactéries; les phospholipides habituels, esters de glycérol et d'acide gras à longue chaîne, sont remplacés par des éthers de glycérol et d'alcools gras à longue chaîne poly-isopropanoïques et des lipides apolaires (squalène).

Tableau 10.2. Taxonomie et habitats principaux des bactéries méthanogènes
Methanobactériales

Methanobactériales	
Methanobacteriaceae	
Methanobacterium (13)*:	habitats dulçaquicoles, rizières (1 sp.) .
Methanobrevibacter (3):	rumen, eaux d'égouts, boues d'épuration, intestins d'animaux, arbres
Methanosphaera (2):	féces, intestins d'animaux
Methanothermaceae	
Methanothermus (2):	thermophiles extrêmes des sources volcaniques
Methanococcales	
Methanococcaceae	
Methanococcus (8):	organismes marins ou côtiers
Methanomicrobiales	
Methanomicrobiaceae	
Methanomicrobium (1)	boues d'épuration, digesteurs anaérobies
Methanolacinia (1) :	sédiments marins
Methanogenium (7)	sédiments marins, digesteurs anaérobies
Methanospirillum (1):	souches mésophiles provenant d'environnements variés
Methanoculleus (3):	sédiments marins, digesteurs anaérobies
Methanocorpusculaceae	
Methanocorpusculum (5):	boues d'épuration, sédiments lacustres
Methanoplanaceae	
Methanoplanus (2):	symbiontes de ciliés marins, sédiments dulçaquicoles
Methanosarcinaceae	
Methanosarcina (7):	sédiments marins et dulçaquicoles, rumen, lagunes d'épandage, digesteurs anaerobies, rizières (1 sp.).

Genres non assignés à une Famille (isolés principalement de milieux saumâtres ou salés)
Methanolobus (3), *Methanococcoides* (2), *Methanohalophilus* (4), *Methanohalococcus* (2), *Methanohalobium* (1), *Methanothrix -Methanosaeta* (3), et *Methanopyrus* (2).

*Les nombres d'espèces sont indiqués entre parenthèses. Total: 20 genres et 72 espèces.

On connaît actuellement plus de 70 espèces de bactéries méthanogènes appartenant à près de 20 genres (Tableau 10.2). Leur morphologie est très variée: bacilles de taille et forme variables, cocci, spirilles, filaments et sarcines. *Methanosarcina* présente, par exemple, une forme si spécifique qu'une simple observation microscopique suffit à la mettre en évidence.

Les méthanogènes présentent un spectre nutritionnel très limité (Tableau 10.3 a et b).

La réduction du CO2 en CH4 en présence d'H2 (hydrogénotrophie) est, quantitativement, la réaction de formation du méthane la plus importante; c'est égalemnt la plus énergétique.

Le formate est converti en méthane par de nombreuses méthanogènes hydrogénotrophes.

Le méthanol qui est un produit commun de la dégradation des pectines et des méthylamines, est utilisé par les méthylotrophes. Bien qu'environ 70% du méthane provienne de l'acétate, peu d'espèces méthanogènes capables d'utiliser ce substrat (acétoclastes) ont été isolées jusqu'à présent.

Le mélange H2-CO2 et l'acétate sont les produits ultimes les plus courants de l'acidogénèse. Ces deux substrats ont des potentiels énergétiques très différents: la réaction de méthanogénèse à partir de CO2+H2 est quatre fois plus énergétique que celle à partir de l'acétate. Ceci explique la différence de temps de division sur les deux substrats (quelques heures à partir de H2+CO2 et plusieurs jours à partir de l'acétate), et le fait que la majorité des méthanogènes connues aient été isolées sur H2+CO2.

10.5.3. Méthanotrophie

Il existe deux formes d'oxydation du CH4 dans les sols. La première, dite de forte affinité, a lieu à des concentrations en CH4 voisines de celles de l'atmosphère. Elle est apparemment ubiquiste dans les sols oxiques n'ayant pas été exposés à de fortes concentrations de NH_4^+. Cette activité est faible et s'exprime en g CH4 ha-1 jour-1. Les populations bactériennes responsables ne sont pas identifiées.

La seconde forme d'oxydation, dite de faible affinité, a lieu à des concentrations en CH4 supérieures à un seuil de 11- 40 ppm. Elle est le propre des bactéries dites méthanotrophes dans les sols dont le pH est supérieur à 4,4 et qui utilisent le CH4 comme seule source de C et d'énergie.

La disponibilité en O2 est le facteur limitant leur activité. Dans les sols submergés, les méthanotrophes se développent dans l'horizon oxydé du sol, dans la rhizosphère aérobie des plantes à aérenchyme , à l'intérieur des racines et à la base des tiges des plantes aquatiques dont le riz. La méthanotrophie de faible affinité se développe in situ dans les sols méthanogènes (rizières, tourbières, décharges..) où la concentration du CH4 dans l'eau intersticielle ou dans l'atmosphère des zones aérobies (premiers centimètres du sol) est supérieure au seuil de 11- 40 ppm. Cette activité se développe également dans les sols oxiques incubés sous une atmosphère artificiellement enrichie en CH4. Les activités méthanotrophes de faible affinité portent sur des concentrations en CH4 très supérieures à la concentration atmosphérique, sont élevées et s'expriment en kg CH4 ha-1 jour-1

10.5.4. Relations entre méthanogènes et méthanotrophes

Méthanogènes et méthanotrophes sont ubiquistes dans les sols de rizière et probablement dans la majorité des sols. Leurs populations se maintiennent en conditions défavorables, lors d'à-secs pour les méthanogènes anaérobies et lors de submersions pour les méthanotrophes aérobies. Méthanogènes et méthanotrophes coexistent dans les rizières où leurs densités sont corrélées. Les densités des

méthanotrophes cultivables et la méthanotrophie potentielle sont généralement supérieures aux densités de méthanogènes cultivables et à la méthanogénèse potentielle.

Dans les sols submergés (rizières et marécages), un très fort pourcentage du CH4 produit dans les zones anaérobies est réoxydé dans les zones aérobies et les variations d'émission sont attribuées majoritairement aux variations de méthanotrophie. Dans les rizières, suivant la période du cycle cultural et les conditions d'irrigation, entre 0 et 97% du CH4 produit est réoxydé par les méthanotrophes. L'oxydation rhizosphérique est quantitativement la plus importante et varie selon le stade de développement du riz. Environ 80 à 90% du CH4 diffusant à travers l'interface oxydé sol-eau est consommé par les méthanotrophes. Au moment des pics de production et sous irrigation continue, environ 70 % du CH4 produit est oxydé.

10.5.5. Le transfert du méthane du sol à l'atmosphère

Dans les sols submergés non végétalisés, le transfert du CH4 vers l'atmosphère se fait par diffusion et sous forme de bulles. Dans les sols végétalisés et en particulier dans les rizières, ces mécanismes deviennent minoritaires et la majeure partie du CH4 s'échappe à travers les plantes dont les lacunes aérifères au niveau des feuilles, des tiges et des racines permettent les échanges gazeux entre le sol et l'atmosphère. L'émission vers l'atmosphère se fait par transfert passif au niveau de micropores sur les feuilles. Elle diffère avec les variétés de riz sans doute à cause de différences morphologiques de l'aérenchyme et de la porosité des racines. Similairement, dans les marécages des zones tempérées, les plantes aquatiques à aérenchyme sont responsables d'environ 90% du transfert du CH4 vers l'atmosphère. Des variations nycthémérales de l'émission peuvent être observées en relation soit avec l'ouverture des stomates (*Scirpus* sp.), soit avec des phénomènes de convection liés à la température (*Phragmites* sp., *Oryza sativa*).

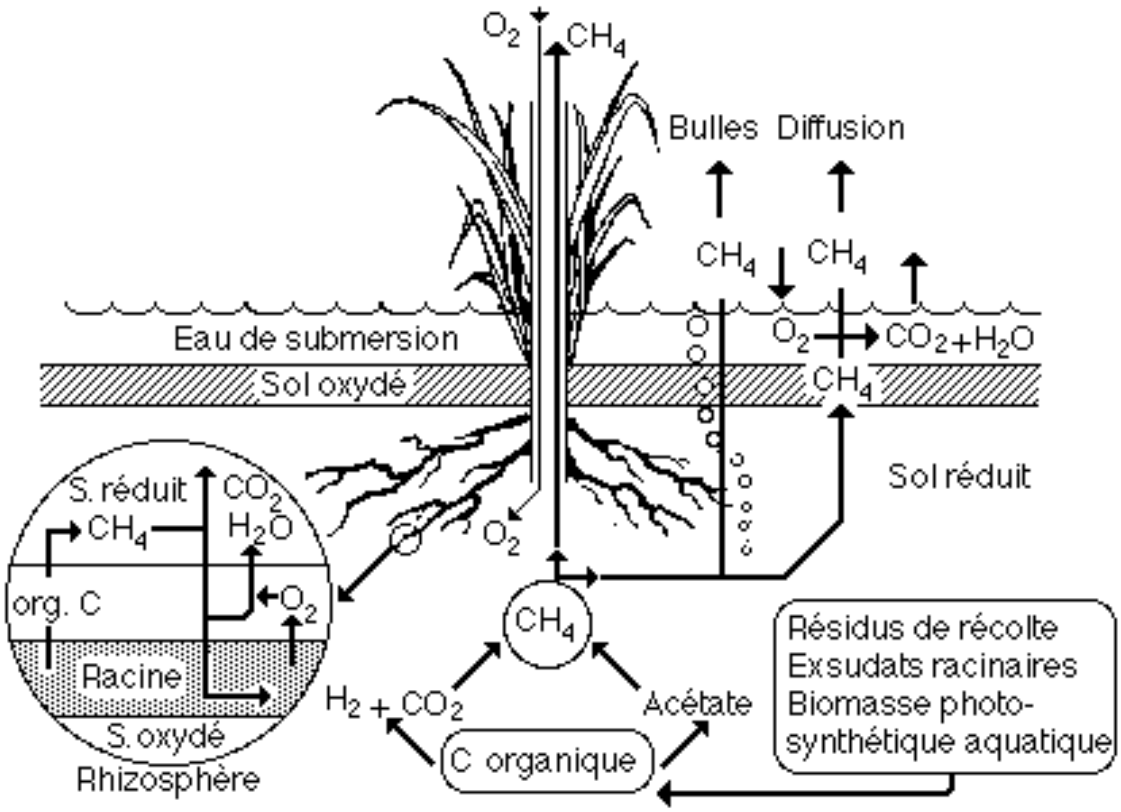


Fig. 10.9. Emission du méthane par les rizières

10.5.6. Estimations des activités dans différents types de sols

10.5.6.1. Méthodologies

La production de CH4 est généralement estimée à partir de sol incubés en anaérobiose. La consommation de CH4 in situ est généralement estimée en chambre close statique. Il existe d'autres méthodes telles que l'utilisation du radon comme traceur et celle du méthylfluoride (CH3F) qui inhibe l'oxydation du CH4 et permet de quantifier in situ production et consommation. Le potentiel méthanotrophe est estimé par incubation dans un dispositif clos sous atmosphère enrichie en CH4 (20% V/V). L'interprétation des mesures de méthanotrophie nécessite la connaissance des conditions d'incubation car la préincubation du sol sous atmosphère enrichie en CH4 induit une augmentation exponentielle de cette activité. On observe des rapports de 10 à 200 entre les activités de sols de rizière réhumectés après dessication et préincubés à des concentrations en CH4 de quelque ppmv (forte affinité) et ceux préincubés à des concentrations supérieures (faible affinité).

L'émission in situ de CH4 par un sol est généralement estimée par la méthode de la chambre close statique. Une alternative est celle de la chambre "ouverte" dans laquelle on fait circuler un courant gazeux de composition connue.

La forte variabilité des mesures est un problème majeur. Les résultats doivent être relativisés en fonction des échelles spatiales et temporelles et de la sensibilité des méthodes, surtout pour les mesures de CH4 aux concentrations atmosphériques.

Une forte variabilité spatiale est caractéristique des activités microbiennes telluriques. Dans le cas de l'émission de CH4, la variabilité est accrue par l'hétérogéneité des voies de diffusion. Les mesures de flux de CH4 dans des sols temporairement inondés ont des coefficients de variations de 166 à 1787 %. Une revue bibliographique de Minami (1995) présente 127 estimations

d'émission de CH4 par des rizières (36 références). Les valeurs vont de 0 à 80 mg CH4 m-2 h-1. L'étude des données montre une distribution log-normale (cv = 94%) avec une médiane de 9,6 mg CH4 m-2 h-1 et un intervalle de confiance à 95% de -27% et +37%.

L'émission de CH4 présente des variations journalières parfois très importantes. La concentration de CH4 dans l'air au-dessus d'une rizière peut passer de 23 ppmv en début de journée à 1.75 ppmv en cours de journée. Au cours du cycle cultural du riz, l'émission varie avec la disponibilité des substrats, l'Eh du sol, les pratiques culturales et la croissance du riz. On observe des pics (1) après incorporation de MO, (2) durant la phase de reproduction en relation avec une exsudation accrue, (3) à la fin du cycle en relation avec la sénescence et l'exfoliation racinaire accrue et (4) après la récolte lorsque la dessiccation du sol et la formation de fentes de retrait libère le CH4 piégé sous forme de bulles. Le plus souvent, l'émission de CH4 est plus élevée durant la seconde moitié du cycle.

Les estimations de flux de CH4 nécessitent donc un nombre de répétitions élevé et des mesures intégrées à des intervalles de temps rapprochés. Pour obtenir in situ une précision de 10% sur des estimations de flux gazeux supérieurs à 0.15 mg m-2 jour-1 (CO2 ou CH4) avec la méthode de la chambre statique, entre 7 et 452 dispositifs sont nécessaires suivant les sites.

10.5.6.2. Estimations

Les estimations présentées dans cette section sont obtenue à partir de données collectées dans 57 références présentant des valeurs individuelles ou aggrégées.

Méthanogénèse. Les données sur la production de CH4 concernent principalement des mesures sur de petits échantillons de sols de rizière (n = 45) dont les valeurs sont comprises entre 0 et 78 kg CH4 ha-1 jour-1. Dans les sols de rizière enrichis en paille (n=22), ces valeurs montent jusqu'à 128 kg CH4 ha-1 jour-1. Les données sur les marécages et tourbières (n=5) sont comprises entre 0 et 50 kg CH4 ha-1 jour-1.

Méthanotrophie. Les valeurs correspondant à une méthanotrophie de forte affinité, mesurée dans des sols exondés, ont des médianes inférieures à 10g CH4 ha-1 jour-1. Les sols de forêt sont probablement les puits de CH4 les plus efficaces; leur activité méthanotrophe parfois élevée peut en partie s'expliquer par une activité méthanogène significative à partir des litières. Les valeurs les plus faibles sont obtenues dans les sols cultivés (Tableau 10.3).

Les sols qui ont le potentiel le plus élevé pour la méthanotrophie sont originaires de sites fréquemment inondés ou engorgés et où une activité méthanogène significative est ou a pu se mettre en place et a engendré une activité méthanotrophe de faible affinité qui se chiffre parfois en kg CH4 ha-1 jour-1. Il s'agit de sols de rizière, de tourbière et de décharge. Ces sols sont généralement des sources de CH4 malgré leur fort niveau de méthanotrophie.

Tableau 10.3. Méthanotrophie dans différents types de sols (g CH4 ha-1 jour-1)

Environnement	Nb de données	Mini	Maxi	Médiane
Sols cultivés	13	0,00	866	5,5
Sols de prairie	7	1,75	485	6,5
Sols exondés non cultivés	6	0,10	228	8,3
Sols de forêt	17	0,16	1659	9,9
Sols submergés	9	0	7 x 105	172
Sols de couverture de décharge	3	7 x 104	1,7 x 106	4,5 x 105

Tableau 10.4: Emission de CH4 dans différents types de sols (g CH4 ha-1 jour-1)

Environnement	Nb de données	Mini	Maxi	Médiane
Sols exondés temporairement engorgés	5	0	216	3
Environnement dulçaquicoles non végétalisés	5	0	10 x 103	3 x 103
Environnements marécageux	11	0	17 x 103	720
Tourbières	4	6	2 x 103	433
Rizières	23	1	29 x 103	3 x 103

Emission de méthane. Les émissions dans les sols exondés temporairement engorgés sont de l'ordre de quelque g CH4 ha-1 jour-1. Dans les sols submergés, les émissions les plus fortes (médiane: 3kg CH4 ha-1 jour-1) sont observées dans les rizières où la biomasse végétale importante fournit les substrats de la méthanogénèse et favorise le transfert du CH4, et dans les environnement dulçaquicoles non végétalisés où l'absence de végétation entraîne une méthanotrophie réduite et une émission importante sous forme de bulles. Dans les environnement marécageux, on observe des émissions dont la médiane est de 700 g CH4 ha-1 jour-11. Les émissions sont plus faibles dans les tourbières acides (médiane: 700 g CH4 ha-1 jour-1) (Tab. 10.4).

10.5.6.3. Les facteurs qui affectent l'émission de méthane

Les facteurs qui influencent l'émission de CH4 par les sols sont ceux qui conditionnent (1) la
diffusion des gaz, et par suite les conditions d'oxydo-réduction (O2) et de transfert du CH4 , en particulier la teneur en eau, la nature des argiles et la végétation, (2) les activités microbiennes en général : température, pH, Eh, disponibilité du substat, propriétés physico-chimiques des sols, (3) la méthanogénèse , en particulier la compétition avec la dénitrification et la sulfato-réduction et (4) l'activité de la méthane-monooxygénase: teneurs en O2, CH4, ammonium, nitrate, nitrite et cuivre

10.6.5.3.1. Propriétés physico-chimiques des sols

Teneur en eau. L'engorgement permet la mise en place de la méthanogénèse dans les sols submergés et les horizons inférieurs des sols humides. Dans les zones humides, l'émissions de CH4 diminue rapidement avec la profondeur de la nappe phréatique et augmente avec l'abondance des plantes enracinées à aérenchyme. Les sols de prairie et des sols cultivés bien drainés peuvent, lorsqu'il sont temporairement engorgés, devenir des sources de CH4 .

Dans les sols exondés, la méthanotrophie augmente jusqu'à une valeur voisine de la capacité au champ puis diminue rapidement lorsque la teneur en eau du sol augmente et que les transferts gazeux diminuent. Les méthanotrophes conservant leur viabilité en anaérobiose, les sols alternativement submergés et exondés peuvent avoir une forte activité méthanotrophe une fois drainés.

Disponibilité en oxygène et Eh du sol : Dans les environnements méthanogènes la disponibilité en O2 est le principal facteur limitant la méthanotrophie car les méthanotrophes y sont toujours présentes à des densités peu affectées par l'état d'oxydation du sol. Les taux de méthanotrophie dans la rizière suivent l'ordre: rhizosphère, racines comprises > sol de surface > sol non rhizosphérique. Dans les marécages de Floride, la méthanotrophie est significative dans les sols de tourbière qui permettent une bonne diffusion des gaz, alors qu'elle est négligeable dans les sols compacts de marnière.

Une baisse de l'Eh favorise l'émission de CH4 (1) en augmentant la méthanogénèse, (2) en réduisant la méthanotrophie par diminution de la taille des racines et (3) en augmentant le transfert des gaz à travers les plantes en favorisant la formation d'aérenchyme; une diminution de l'Eh de -

200 à -300mV augmente de 10 fois la production et 17 fois l' émission de CH4 .

Teneur en matière organique. L'intensité des processus de réduction en sol submergé est liée à la teneur en matière organique (MO) et à la nature et la disponibilité des accepteurs d'électrons. L'Eh d'un sol de rizière riche en Fe actif et en MO peut atteindre -200 mV en moins de 15 jours. A condition de considérer des échantillons homogènes de sols (sols non salins, sols à fort potentiel méthanogène..) on observe trés généralement une corrélation positive entre le potentiel méthanogène et la teneur en MO du sol.

pH : L'activité des méthanogènes telluriques, optimale au voisinage de la neutralité est très sensible aux variations de pH du sol. Les méthanotrophes sont plus tolérantes aux variations de pH que les méthanogènes mais sont également sensibles à l'acidification du milieu. Une adaptation des deux activités aux milieux acides est possible. Production et consommation de CH4 dans des tourbières tempérées et subarctiques (pH 3,5 à 6,3) montrent des optima de 5,5 à 7.0 pour la méthanogènèse et de 5.0 à 6.5 pour la méthanotrophie. Les techniques d'écologie moléculaire employées dans des tourbières (pH < 4,7) montrent la présence de méthanotrophes acidophiles non cultivables sur les milieux classiques.

Texture et minéralogie du sol. Dans les sols submergés, la texture intervient sur (1) la mise en place de l'anaérobiose nécessaire à la méthanogénèse, (2) la protection de la MO vis-à-vis de la décomposition, (3) le transfert et le piégeage du CH4 produit dans le sol et (4) l'épaisseur du sol oxydé hébergeant les méthanotrophes.

Les sols argileux, mal drainés et aptes à l'anaérobiose, ne sont pas systématiquement les plus favorables à l'émission de CH4 car certaines argiles protègent la MO de la minéralisation et une forte teneur en argile, favorisant la rétention de bulles de CH4 dans le sol, diminue son émission. Les sols de rizière riches en argiles gonflantes sont plus favorables à la méthanogénèse que les sols sableux, limoneux ou riches en kaolinites. Dans ces derniers, la densité augmente après la submersion, ralentissant les variations de pH et de Eh et la décomposition de la MO. L'émission de CH4 est nettement plus forte dans un sable limoneux calcaire que dans un sol argileux. Dans les rizières sableuses du Texas, les émissions saisonnières de CH4 (15 à 36 g m-2) augmentent avec la teneur en sable (19% à 32 %).

Propriétés chimiques. Une forte teneur en Fe et Mn des sols, permettant une diminution rapide de l'Eh après submersion, favorise la méthanogénèse alors qu'un forte teneur en P assimilable favorise la méthanotrophie. Dans les sols de rizière sulfatés et sulfatés acides, la compétition entre méthanogènes et sulfato-réducteurs pour l'H2, et la plus faible productivité du riz, sont la cause d'une émission de CH4 dix fois plus faible (2-4 mg m-2 h-1) que dans des sols non sulfatés (20-30 mg m-2 h-1). La salinité affecte plus la méthanotrophie que la méthanogénèse.

10.6.5.3.2. Facteurs climatiques

Méthanogènes et méthanotrophes ont des optima de température entre 30 et 40°C. La diminution de la température du sol réduit rapidement l'activité des méthanogènes et des autres bactéries impliquées dans la fermentation méthanique. La méthanotrophie montre des tolérances plus étalées à la température que la méthanogénèse.

Dans les sols submergés des régions froides et tempérées, les variations saisonnières d'émission de CH4 sont corrélées avec la température du sol. L'émission de CH4 par des marécages et tourbières du Canada augmente de 6,6 fois entre 10 et 23 °. Toutefois on observe encore des émissions significatives (3 à 49 mg CH4 m-2 jour-1) dans des environnements engorgés sous la neige.

Dans les sols exondés de forêt tempérée, la méthanotrophie ne montre pas de variations entre 10 et 30°C , elle peut être affectée entre - 5 et 10 ° C mais ne s'annule pas à des températures moyennes inférieures à 1°C.

10.6.5.3.3. Rôle de la végétation dans les sols submergés

Dans les rizières, la présence de riz augmente de 4 à 5 fois l'émission de CH4. La quantité de CH4 émise au cours du cycle cultural est corrélée positivement avec la biomasse végétative aérienne et les paramètres du rendement. Le C émis sous forme de CH4 correspond respectivement à environ 3% et 4,5% du C photosynthétique chez les variétés de riz à faible ou fort potentiel d'émission de CH4.
Dans les zones marécageuses, les plantes à aérenchyme favorisent l'émission en permettant le transfert du CH4 alors que les plantes sans aérenchyme réduisent son émission, en partie par oxydation rhizosphérique. Dans les zones colonisées par une végétation enracinée, la proportion de CH4 dans le biogaz est plus faible (42-45%) que dans les zones sans végétation (60%), et les émissions de CH4 sont de 3 à 30 fois inférieures à celle des zones végétalisées adjacentes, ce qui confirme le rôle de la rhizosphère dans l'oxydation du CH4. Dans des tourbières, avec une nappe phréatique à -20 cm, on
observe une faible consommation de CH4 dans les zones de broussailles et une émission dans les zones colonisées par des plantes à aérenchyme. De même, dans les toundras engorgées on n'observe pas d'émission de CH4 en l'absence de végétation vasculaire, montrant le fort potentiel méthanotrophe de la couche aérobie supérieure de ces sols.
Les variations saisonnières de l'émission de CH4 dans les écosystèmes tempérés submergés ou engorgés sont liées aux cycles végétatifs des plantes à aérenchyme et de la végétation flottante non enracinée qui affecte l'oxydation du CH4. Dans ces environnements, l'éclairement, en permettant une photosynthèse benthique, augmente l'épaisseur du sol oxydé, donc l'oxydation du CH4. Dans les sols submergés, l'émission de CH4 est corrélée positivement avec la productivité végétale nette dont environ 3% est réémis sous forme de CH4. L'augmentation de la concentration du CO2 atmosphérique, en augmentant la productivité des écosystèmes, devrait également augmenter l'émission de CH4 par les écosystèmes méthanogènes.

10.6.5.3.4. Pratiques culturales

Effet de la gestion de l'eau dans les rizières. La riziculture sous eau est la plus développée car plus productive (jusqu'à 10 t ha-1) qu'en sol exondé (0,5 à 4 t ha-1). De nombreuses études montrent une diminution de 60% à plus de 90% de l'émission de CH4 quand les rizières sont drainées une ou plusieurs fois au cours du cycle cultural. De courts drainages induisent la formation de sulfate et de fer ferrique qui entraînent une compétition pour l'H2 entre méthanogènes d'une part et les sulfatoréducteurs et ferro-réducteurs d'autre part, et qui se traduit par une inhibition persistante de la méthanogénèse aprés resubmersion. La gestion de l'eau entre cultures est aussi un facteur important.
Une rizière laissée en jachère sèche émet moins de CH4 pendant la culture suivante qu'une jachère inondée.
Fertilisants organiques. Dans les rizières, la majorité des études montrent qu'un apport de MO multiplie l'émission de CH4 par des facteurs de <2 à >9. La production et l'émission de CH4 diminuent avec le C/N du matériel incorporé.
Dans des sols cultivés oxiques et des sols de forêt, l'incorporation d'engrais vert peut réduire la méthanotrophie de 40%. Par contre les expériences de longue durée (140 ans) de la station de Rothamsted (UK) ne montrent pas d'effet inhibiteur à long terme d'une fertilisation à base de fumier.

Fertilisants minéraux. Dans les rizières, la fertilisation minérale, en augmentant la biomasse du riz, augmente l'émission de CH4. Les effets dépendent ensuite du type d'engrais, de la quantité utilisée et du mode d'application. L'apport de nitrates et de sulfates provoque une compétition en défaveur des méthanogènes. En présence de sulfates, H2 et l'acétate sont utilisés préférentiellement par les bactéries sulfato-réductrices. En présence de nitrates, H2 est utilisé préférentiellement par les bactéries dénitrifiantes. Par rapport à une rizière non fertilisée, l'augmentation d'émission de CH4 résultant de l'augmentation de la biomasse du riz par les engrais minéraux est maximale avec de l'urée, intermédiaire avec du nitrate de potassium et minimale avec du sulfate d'ammonium. De nombreuses expériences indiquent que le sulfate d'ammonium diminue les émissions de 20 à 60% par rapport à l'urée. La combinaison engrais organique-sulfate d'ammonium permet de réduire de 58% l'émission observée avec un engrais organique utilisé seul et augmente les rendements de 32%.

Une émission plus marquée lorsque les fertilisants azotés sont épandus en surface peut être due en partie à une inhibition de la méthanotrophie par l'ammonium.

Le sulfate de calcium utilisé pour restaurer la fertilité de sols de rizière salins ou alcalins, diminue l'émission de CH4 de 30 à - 70% pour des apports de 1 à 10 t ha-1. Cette inhibition semble être indépendante de la fertilisation azotée et s'observe dans des rizières recevant de l'urée ou un engrais vert. Par contre, l'addition de sulfate peut se révéler néfaste pour le riz, en favorisant la sulfatoréduction.

Dans les sols exondés, l'application d'azote minéral se traduit souvent par un effet inhibiteur de l'oxydation du CH4 atmosphérique. L'inhibition varie en fonction de la nature des engrais

Une inhibition partielle ou totale par l'ammonium est rapportée par de nombreux auteurs, dans des sols cultivés, des sols de forêt et des sols de décharge. Cette inhibition agit par compétion entre le CH4 et l'ammonium et par accumulation de nitrite toxique. Elle persiste après l'arrêt de la fertilisation.

Dans les sols de forêt, on observe également une corrélation négative entre l'oxydation du CH4 et la teneur en N assimilable. L'urée, qui est ammonifiée, exerce aussi des effets inhibiteurs significatifs, par exemple de 5 à 20 fois dans des sols de pinède. Dans des sols de tourbière drainés et fertilisés, on observe une inhibition rapide de la méthanotrophie avec un effet plus marqué du NH4Cl que du KNO3 et de l'urée. Dans les sols cultivés, une fertilisation à base de nitrates ne semble pas affecter l'oxydation du CH4 atmosphérique.

Les expériences de longue durée de la station expérimentale de Rothamstead (UK) permettent de classer le potentiel méthanotrophe des sols cultivés dans l'ordre forêt > paturages > sols cultivés, montrant une corrélation négative avec l'intensité de la fertilisation azotée minérale. Une comparaison de 13 sols d'origine identique sous forêt ou mis en culture montre que la mise en culture a diminué le potentiel d'oxydation du CH4 d'environ 60%.

Autre pratiques culturales. Dans des sols cultivés exondés, le semis direct sans travail du sol augmente de 6 à 8 fois l'oxydation du CH4 atmosphérique par rapport au sol labouré (Hutsch 1998) alors que le compactage du sol par les engins agricole peut la réduire de moitié (Hansen et coll 1993). La réduction de la consommation de CH4 des sols exondés mis en culture peut résulter de la destruction de niches microaérophiles et de l'horizon de surface enrichi en MO qui se développent dans les sols non cultivés.

10.5.7. Les voies de réduction possibles

10.5.7.1. Sols méthanogènes cultivés (rizières)

Les stratégies de réduction de l'émission de CH4 par les rizières peuvent s'orienter vers (1)
l'inhibition de la méthanogénèse, (2) la stimulation de l'oxydation du CH4 et (3) la limitation du transport du CH4 par la plante. Les techniques potentielles font appel à la gestion de l'eau et des nutriments, à la sélection variétale et éventuellement à des inhibiteurs sélectifs.
Le drainage répété des parcelles au cours du cycle cultural est la méthode la plus efficace pour réduire l'émission de CH4. Bien conduite, cette pratique n'affecte pas le rendement en riz. Des à-secs de quelques jours favorisent l'ancrage des jeunes pieds de riz en début de cycle, la croissance lors du tallage et la minéralisation de l'azote du sol. Ils diminuent l'accumulation de composés toxiques dans le sol au cours du cycle et aident à contrôler le développement des vecteurs de maladies humaines. Des extrapolations indiquent que l'introduction d'à-secs dans 33% des rizières mal drainées de Chine réduirait de 10% les émissions agricoles de CH4 (9.9 +/- 3.0 Tg) de ce pays. Par contre, cette pratique consomme 2 à 3 fois plus d'eau que la submersion continue. Elle augmente les taux de nitrification et les pertes d'azote par dénitrification et favorise l'émission de N2O, gaz à effet de serre, lors de la remise en eau. Enfin cette pratique nécessite un bon planage des sols et une maitrise de l'eau qui ne
sont disponibles que dans un pourcentage modeste des rizières submergées.
Les pratiques de fertilisation aptes à réduire l'émission de CH4 et adoptables par les riziculteurs sont: (1) la combinaison des engrais organiques avec de l'engrais azoté; (2) l'utilisation préférentielle d'engrais sulfatés lorsqu'ils ne risquent pas de générer une sulfato-réduction toxique pour le riz et (3) l'enfouissement des engrais, qui combine de nombreux autres avantages tels que la diminution des pertes d'azote par volatilisation, la non inhibition de la fixation d'azote photo-dépendante et la diminution des populations de vecteurs de maladies humaines.
Le fait que l'acétylène apporté sous forme de carbure de calcium encapsulé, augmente les rendements en riz de 30% par son effet inhibiteur sur la nitrification mais diminue également de 35% l'émission de CH4, offre des perspectives intéressantes pour une utilisation pratique.
Des différences variétales d'émission de CH4 de près de 500% ont été observées. Toutefois certaines des caractéristiques variétales aptes à réduire l'émission de CH4 (faible exsudation, biomasse racinaire réduite, aérenchyme peu développé) sont à l'opposé de celles souhaités pour favoriser la fixation d'azote associée au riz et son aptitude à croître et utiliser l'azote du sol en conditions de submersion.

10.5.7.2. Sols cultivés exondés

Les sols exondés sont des puits potentiels de CH4. L'apport direct ou indirect d'ammonium dans les sols cultivés, de prairie et de forêt y produit une inhibition persistante de la capacité à oxyder le CH4 atmosphérique. Il serait donc souhaitable d'y utiliser préférentiellement une fertilisation organique et/ou à base de nitrates qui n'affectent pas le potentiel méthanotrophe des sols.

10.5.7.3. Sols non cultivés

Les sols méthanogènes non cultivés sont pratiquement des «sites orphelins». D'une façon générale, les mesures aptes à diminuer l'émission de CH4 dans les environnements méthanogènes naturels ou à favoriser la consommation de CH4 dans les sols exondés non cultivés ne peuvent être prises en charge que comme effet secondaire d'une mesure ayant un impact économique plus significatif à court terme.
Par exemple, l'assainissement de marais impaludés ou le drainage et mise en culture de tourbières diminuent l'émission

de CH4. La revégétalisation par fertilisation de landes acides infertiles, à activité méthanotrophe négligeable, peut augmenter cette activité par le développement d'une végétation herbacée. Bien évidemment les techniques destinées à réduire la concentration de CH4 atmosphérique qui sont adoptables dans les sols cultivés submergés et exondés, doivent se traduire par un bilan positif pour l'agriculteur, ce qui limite considérablement la portée pratique des méthodes potentielles.

10.5.8. Un bilan dans les sols ?

Les bilans d'émission de gaz à effet de serre par les sols sont confrontés à (1) la très grande variabilité spatiale, journalière, saisonnière et annuelle des mesures, (2) les difficultés méthodologiques dans la mesure in situ de consommation ou de production aux faibles concentrations de ces gaz, (3) l'imprécision des estimations quantitatives des différents types d'environnements et (4) l'absence d'estimations dans certains types d'environnements.

C'est sans doute ce qui explique que les estimations des bilans globaux d'émission de méthane par les sols et les principales sources n'ont que peu varié au cours des dix dernières années et que les fourchettes d'estimation ne se sont pas réduites (Tab. 3).

Tableau 3: Estimations d'émissions et de consommation de méthane (Tg/an) pour des environnements sélectionnés.

Auteurs	Cicerone et Oremland,1988	Tyler 1991	Reeburg et coll 1993	Lelieveld et coll 1993	IPCC 1994
Milieux submergés naturels	115 (100 - 200)	(120 - 200)	115	130 (60 - 200)	115 (55 - 150)
Rizières	100 (60 - 170)	(70 - 170)	100	95	60 (20 - 100)
Ruminants	80 (65 - 100)	(80 - 100)	80	80 (60 - 100)	85 (65 - 100)
Termites	40 (10 - 100)	(25 - 150)	20	10 (5 -15)	20 (10 - 50)
Décharges	40 (30 - 70)	(5 - 70)	40	50 (25 - 75)	40 (20 - 70)
Sols exondés	Non estimé	Non estimé	-10	-30 (-5 -55)	

Tableau 4: Estimation grossière des productions journalières moyennes dans les sols français*

	Surface	Activité médiane	Bilan
Sols exondés	km^2	g CH_4 ha^{-1} j^{-1}	t CH_4 j^{-1}
Total terres cultivées fertilisées	180500	-5,5	-99
Prairies et paturages permanents	115000	-6,5	-75
Terre agricoles non cultivées	35810	-8,3	-30
Forêts	127850	-9,9	-127
TOTAL	639660		-330
Sols inondées hors zones maritimes			
Rizières	166	3000	50
Marais maraichers	80	720	6
Roselières	300	730	22
Tourbières	300	433	13
Sols humides à engorgement temporaire			
Prairies humides	10000	3	3
Landes humides	200	3	0,06
Boisements humides	2500	3	0,75

* Les activités sont celles des tableaux 1 et 2. Les estimations de surfaces sont tirées de l'Encyclopedia Universalis et de Barnaud 1998.

Une estimation extrêmement grossière du bilan de CH4 sur les sols en France (Tab. 4) montre que les sols cultivés (-274 t CH4 j-1) et l'ensemble des sols (236 t CH4 j-1) sont un puits de méthane qui ne consomme toutefois qu'un faible pourcentage du méthane anthropique résultant des activités agricoles (élevage) et industrielles.

10.6. IMMOBILISATION DU C SOUS FORME ORGANIQUE: HUMIFICATION

La matière organique du sol est principalement formée de substances relativement résistantes à la décomposition, appelées globalement humus, qui constituent un réservoir de carbone organique.

10.6.1. Différentes formes de la matière organique du sol

On peut classer la matière organique du sol en trois catégories, les limites entre les différentes classes étant assez arbitraires car il existe de nombreux intermédiaires entre les classes:

• Matière organique fraîche, non décomposée

Ce sont les feuilles mortes, tiges, racines mortes, exsudats racinaires, cellules microbiennes mortes, cadavres d'animaux.

• Matière organique non humifiée = matière organique labile

Fraction légère à rapport C/N élevé, facilement biodégradable, pouvant être séparée des argiles.

• Matière organique humifiée = humus *sensu stricto*

Fraction dense, à rapport C/N voisin de 10, plus ou moins résistante à la biodégradation, liée aux argiles. Ce sont les acides fulviques, les acides humiques, les humines. En plus de l'humus proprement dit, cette fraction comprend des composés chimiquement définis: protides, glucides, cires, tannins, résultant d'une transformation de la matière organique fraîche ou des synthèses microbiennes.

10.6.2. Formation de l'humus à partir de la lignine

Les monomères de la lignine sont des noyaux phénoliques substitués. Ces noyaux peuvent être oxydés par certains microorganismes (basidiomycètes) avant de former, par polymérisation chimique, les polyphénols de l'humus. Les processus d'humification sont donc influencés par la teneur en lignine des résidus végétaux.

10.6.3. Humification des composés carbonés non aromatiques

Certains champignons (*Aspergillus*) ou bactéries (*Azotobacter*) peuvent synthétiser des précurseurs de l'humus à partir de composés carbonés simples, comme par exemple le glucose : glucose + asparagine -> acides humiques

Les précurseurs néoformés subissent ensuite une polymérisation chimique similaire à celle des précurseurs provenant de la lignine.

10.6.4. Humification directe

Les composés phénoliques de la matière organique fraîche peuvent aussi former des substances humiques par condensation catalysée par des enzymes végétales: cette voie non microbienne est quantitativement moins importante.

10.6.5. Maturation de l'humus

La formation de l'humus est principalement un processus biochimique faisant intervenir des oxydases microbiennes et végétales, et des réactions chimiques aboutissant :

• dans un premier stade à l'oxydation de composés phénoliques, suivie d'une condensation;

• dans un second stade à la réaction de ces phénols oxydés avec des groupements NH2 ou SH, faisant intervenir des acides aminés d'origine microbienne.

Mais cet humus frais subit une lente maturation dans le sol. Le datage au carbone radioactif permet d'attribuer aux fractions "jeunes" un âge moyen de 50 à 250 ans, à l'humine quelque 2000 ans. La

figure 10.10 schématise la formation des composés humiques à partir des résidus végétaux.

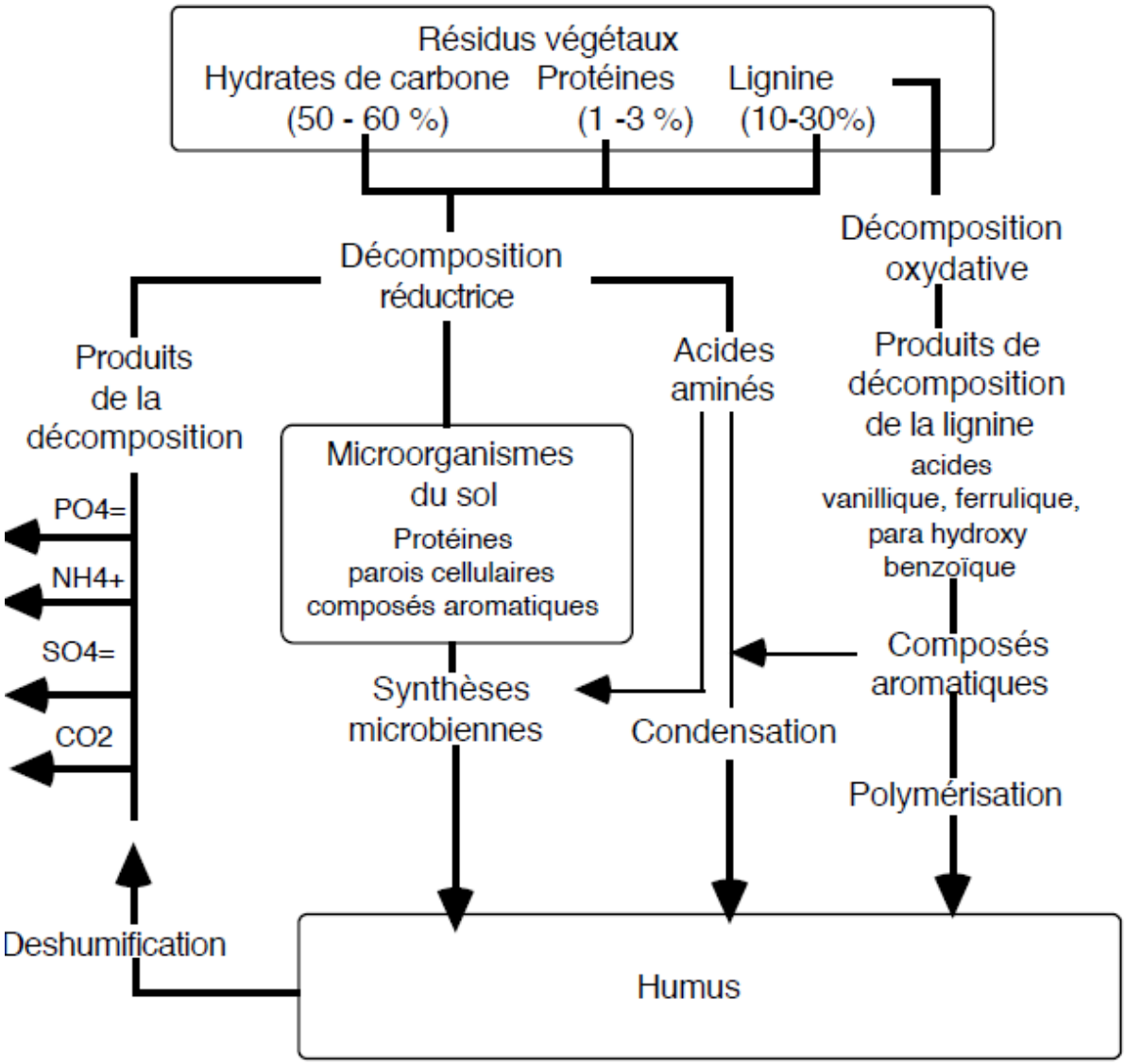


Figure 10.10. Formation des composés humiques à partir des résidus végétaux

10.6.6. Déshumification

Le carbone et l'azote immobilisés sous forme de composés humiques sont recyclés, sous une forme utilisable par l'ensemble de la microflore et les plantes, sous l'action d'associations microbiennes complexes qui sont seules capables de catalyser l'attaque des nombreux types de liaisons présentes dans l'humus.

La résistance à la biodégradation est très variable suivant les formes d'humus, la nature du complexe argileux, le pH, l'aération. Par exemple, le broyage des macroagrégats (qui entraîne une augmentation de l'oxygénation et la mise au contact de la microflore avec la matière déposée dans les pores les plus fins) provoque une intense décomposition de la matière organique correspondant à un dégagement de CO2.

La minéralisation de l'humus est ralentie par certains types d'argiles (allophanes) ou par des substances végétales (tannins).

11. CYCLE DE L'AZOTE

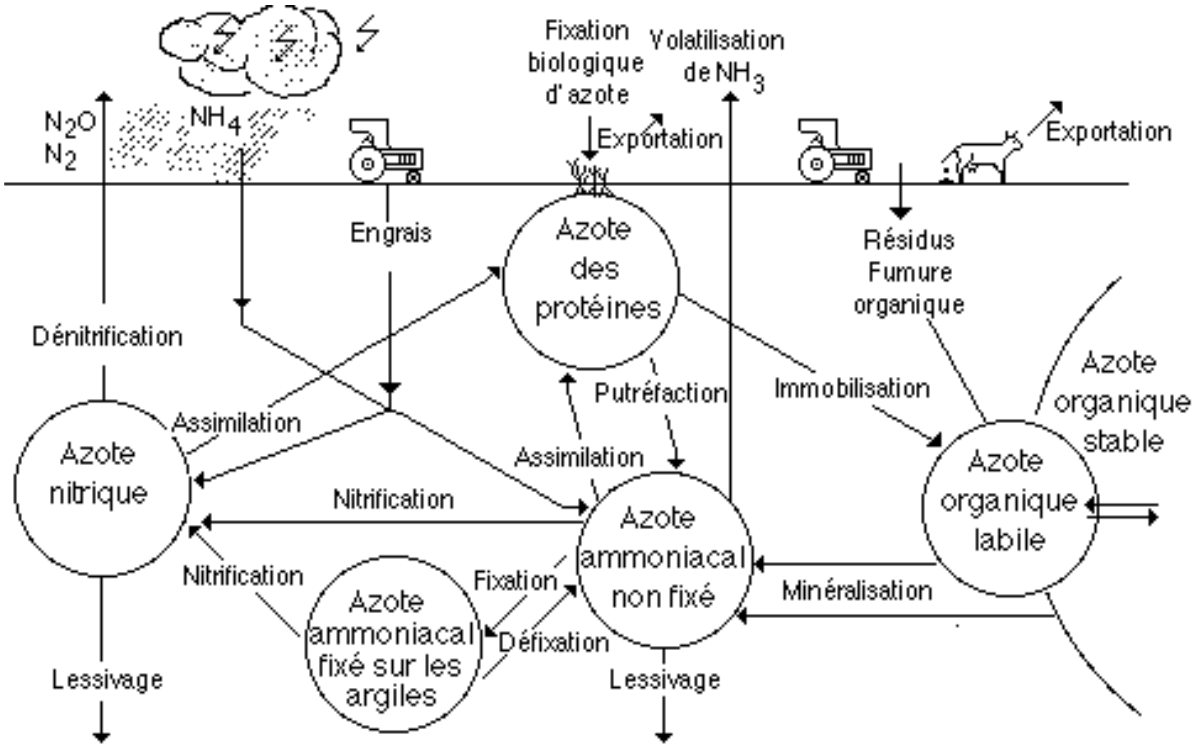


Fig. 11.1. Cycle de l'azote

11.1. GENERALITES

L'azote est l'élément constitutif de la plante le plus important après le carbone. Il constitue très fréquemment le facteur limitant principal pour la production végétale agricole.

La réserve principale d'azote terrestre est la lithosphère (98% de l'azote total) et non l'atmosphère.

Cependant la concentration des formes assimilables (ammonium, nitrate, composés organiques simples) est souvent limitante pour la croissance de la très grande majorité des êtres vivants.

L'azote moléculaire, constituant majeur de l'atmosphère mais chimiquement inerte, n'est utilisable que par certains microorganismes libres ou symbiotiques appelés fixateurs d'azote.

Dans l'écosystème sol-plante, les transformations microbiennes des composés azotés les plus importantes pour la production végétale concernent:

• l'équilibre entre formes assimilables et formes non assimilables par la plante (minéralisation de l'azote organique, immobilisation de l'azote minéral);

• les apports d'azote par fixation biologique d'azote moléculaire; et

• les exportations ou pertes par nitrification-dénitrification et volatilisation de l'ammoniaque.

La figure 11.1 schématise le cycle de l'azote dans l'écosystème sol-plante et les principales activités microbiennes impliquées dans ce cycle.

11.2. APPORTS D'ORIGINE MICROBIENNE: FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

11.2.1. Introduction

Il y a plus de 150 ans que l'on a constaté que le sol contenait plus d'azote que la roche mère et qu'il existait donc une importante source d'azote inexpliquée. Le rôle des microorganismes dans ce phénomène a été reconnu en constatant que des plantes stériles étaient incapables d'incorporer l'azote moléculaire. La découverte de la fixation de l'azote par les bactéries libres est dûe à BEIJERINCK, en

1901. Depuis, de nombreux genres bactériens ont été reconnus comme fixateurs (Tableau 11.1).

La fixation d'azote n'est présente que chez des procaryotes, qui peuvent être libres ou symbiotiques.

Tableau 11.1. Exemples des différents types de microorganismes fixateurs de N2

Microorganismes libres	
• Aérobies	
• Hétérotrophes	*Azotobacter spp.; Klebsiella pneumoniae; Beijerinckia indica; Azospirillum lipoferum*
• Phototrophes: Cyanobactéries	
• Hétérocystées	*Nostoc; Anabaena; Calothrix; Tolypothrix*
• Homocystées	*Trichodesmium; Oscillatoria*
• Unicellulaires	*Gloeothece; Gloeocapsa*
• Anaérobies	
• Hétérotrophes	*Clostridium pasteurianum; Desulfovibrio vulgaris; Desulfotomaculum* spp. ; *Methanobacterium* spp.
• Phototrophes	*Rhodospirillum rubrum; Rhodobacter capsulata; Chromatium vinosum*
Microorganismes symbiotiques	
• Légumineuses	
• à nodules racinaires	*Rhizobium meliloti; Rhizobium leguminosarum Bradyrhizobium japonicum; Sinorhizobium fredii*
• à nodules caulinaires	*Azorhizobium caulinodans*
• Symbioses actinorhiziennes	*Frankia*
• Symbioses à cyanobactéries	
• *Azolla*	*Anabaena azollae*
• Cycas	*Anabaena cycadeae*
• Lichens	*Nostoc*
• Mousses et hépatiques	*Nostoc*

11.2.2. Mécanismes de la fixation biologique de l'azote

L'enzyme impliqué dans la fixation de N2, est la nitrogénase qui réduit l'azote moléculaire en ammoniac:

$$N \equiv N + 3H_2 \rightarrow 2\ NH_3$$

La nitrogénase n'est pas spécifique de l'azote et peut réduire de nombreux substrats possédant une triple liaison (N N) :

l'acétylène	$HC\equiv CH$	->	$H_2C=CH_2$
l'allène	$H_2C=C=CH_2$	->	$H_3C-CH=CH_2$
l'ion cyanure	$[C\equiv N]^-$	->	$CH_4 + NH_3$
le cyanogène	$N\equiv C-C\equiv N$	->	CH_4
l'azide	$N\equiv N-N$	->	$N_2 + NH_3 + N_2H_4$
l'oxyde nitreux	$N\equiv N-O$	->	$N_2 + NH_3$

Cette propriété est utilisée pour évaluer l'activité de la nitrogénase avec la méthode de réduction de l'acétylène.

Avant d'être l'enzyme de la fixation de l'azote, la nitrogénase aurait pu être un enzyme de détoxification des cyanures, abondants dans l'atmosphère primitive de la planète.

La nitrogénase est irréversiblement inactivée par l'oxygène et les organismes aérobies fixateurs de N2 ont développé différents mécanismes de protection contre l'oxygène (Tableau 11. 1). En particulier, fixation aérobie d'azote et photosynthèse productrice d'O2 sont deux processus qui ne peuvent intervenir simultanément dans la même cellule. Chez les cyanobactéries hétérocystées, l'hétérocyste est le seul site de fixation d'azote en conditions aérobies. Il procure un site de protection pour la nitrogénase en perdant le photosystème II (responsable de la fixation du CO2 et de la production d'O2), mais possède la nitrogénase et le photosystème I qui procure l'énergie pour l'hétérocyste. Les hétérocystes fixent N2 en ammoniaque qui est ensuite transformé en glutamine et cédé aux cellules végétatives qui, en retour, assurent la nutrition carbonée des hétérocystes.

Tableau 11. 2. Mécanismes de protection de la nitrogénase contre l'oxygène chez les fixateurs de N2 aérobies

Hétérotrophes: protection contre l'oxygène de l'air	
Azotobacter	Consommation élevée d'oxygéne et formation de colonies avec une zone centrale anaérobie.
Azospirillum	Respiration, aérotaxis, conformation de la N-ase, pseudocystes.
Rhizobium	Nodule + protection enzymatique (H_2-ase + SOD).
Frankia	Vésicules (protection physique).
Phototrophes: protection contre l'oxygène de l'air et de la photosynthèse	
Cyanobactéries hétérocystées	Séparation de la photosynthèse et de la fixation de N_2 dans deux types de cellules. Protection physique dans l'hétérocyste.
Cyanobactéries homocystées filamenteuses	Agrégation en faisceaux et séparation de la photosynthèse et de la fixation de N_2 entre les filaments de la périphérie et ceux du centre des faisceaux protégé de l'oxygène (*Trichodesmium*).
Cyanobactéries unicellulaires	Alternance dans le temps des deux activité. Colonies mucilagineuses.

L'activité nitrogénasique est inhibée partiellement ou totalement par les formes d'azote inorganique (nitrates, ammonium) L'inhibition directe de la nitrogénase par les formes d'azote assimilable inorganique est généralement totale ou très marquée dans des cultures *in vitro*.

Par contre, *in situ*, cette inhibition est généralement partielle, car la concentration de l'azote minéral est susceptible de varier très fortement au niveau du micro-environnement. Par

exemple, dans un champ où l'on a épandu de l'engrais azoté, les microorganismes fixateurs seront plus fortement inhibés dans le sol non rhizosphérique, où l'azote minéral persiste plus longtemps, que dans la rhizosphère, où il est rapidement absorbé par les racines.
On s'aperçoit également que l'inhibition des organismes fixateurs *in situ* par les engrais azotés ne résulte pas seulement de l'inhibition de la nitrogénase mais aussi de compétitions entre organismes fixateurs et non fixateurs, et dans certains cas, de phénomènes complexes combinant inhibition, compétition et prédation. C'est en particulier le cas des cyanobactéries des rizières inondées.
La figure 11.2. présente un exemple de différents niveaux d'inhibition du développement des cyanobactéries fixatrices de N2 dans des rizières expérimentales, en fonction de la quantité et du mode d'application des engrais azotés. Les mécanismes schématisés à la figure 5.2 font intervenir la compétition avec les algues eucaryotes, la prédation par le zooplancton et l'inhibition directe de la nitrogénase qui, dans ce cas, n'est sans doute qu'une composante mineure de l'inhibition observée.
Le Tableau 11. 3. montre que si l'on considère un très grand nombre d'expériences *in situ*, l'inhibition de la fixation d'azote photodépendante par les engrais azotés est d'environ 60% pour les engrais épandus, mais n'est pas totale, alors que les fixateurs photosynthétiques libres seraient totalement inhibés en culture pure par des concentrations d'azote équivalentes à celles obtenues avec les apports d'engrais azoté utilisés pour ces expériences.

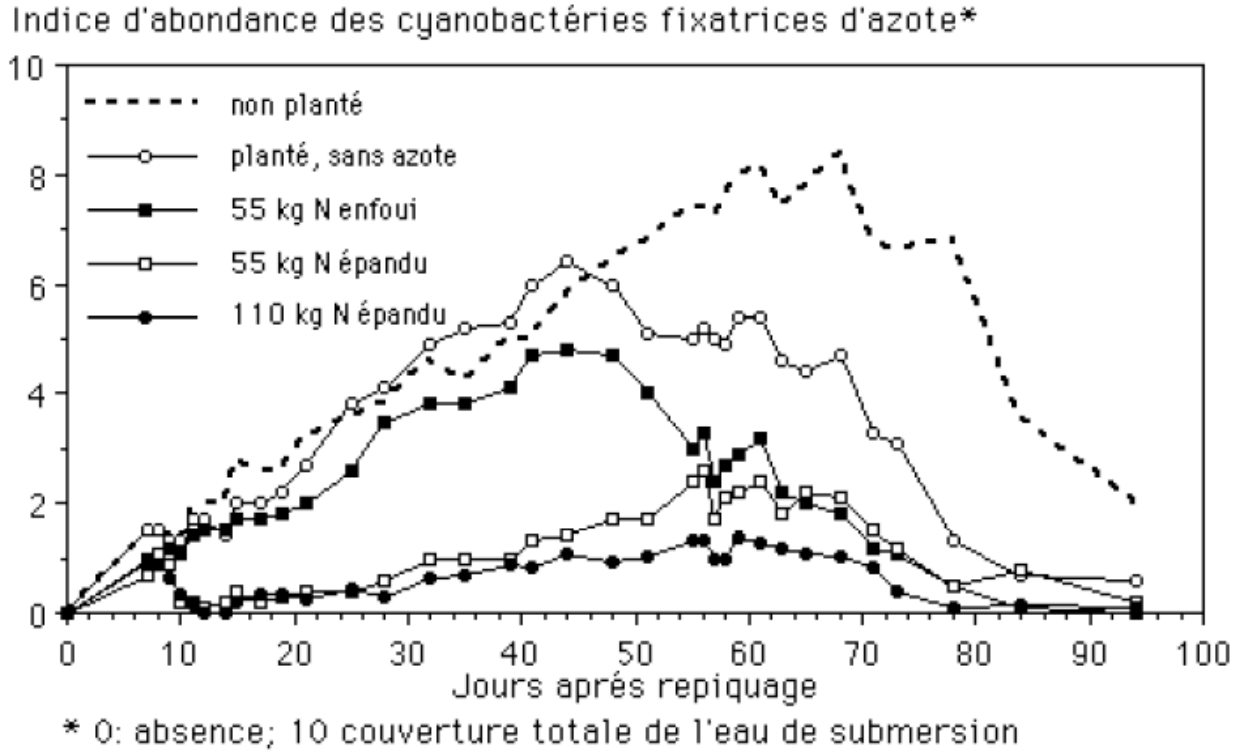


Fig. 11.2. Dynamique de la population de cyanobactéries fixatrices de N2 au cours d'un cycle cultural en fonction de la méthode de fertilisation azotée

Tableau 11. 3. Valeur moyenne de l'activité réductrice d'acétylène au cours d'un cycle cultural du riz en fonction de la fertilisation azotée (urée).

Traitement (moyenne de 60 expériences)	ARA moyenne (μmol C_2H_2 m^{-2} h^{-1})	Rendement en grain (t ha^{-1})
Contrôle sans azote	195 ± 14	4.08 ± 0.10
38 kg N ha^{-1} épandu au repiquage +17 kg N ha^{-1} à l'initiation paniculaire	80 ± 13	4.82 ± 0.12
55 kg N ha^{-1} enfoui (super-granules) au repiquage	116 ± 16	5,78 ± 0.09

11.2.3. Méthodes de mesure de l'activité fixatrice

11.2.3.1. Mesure directe de l'azote accumulé

Cette méthode est utilisée principalement pour des études de laboratoire où l'on estime l'accumulation d'azote par des cultures de microorganismes sur milieu dépourvu d'azote.

Elle peut également être utilisée *in situ* suivant le principe des bilans (mesure du changement de teneur en azote d'un sol au cours d'une période de temps donnée et mesure simultanée des quantités d'azote importées et exportées). Toutefois, cette méthode est relativement imprécise et demande que les mesures soient effectuées sur des périodes de temps les plus longues possibles (minimum 1 à 2 cycles culturaux, si possible plusieurs années).

La valeur du bilan de l'azote dans un sol correspond grossièrement à la différence entre la fixation et les pertes par différents mécanismes tels que la percolation, la dénitrification et la volatilisation de l'ammoniaque. C'est donc le plus souvent une sous-estimation de la quantité d'azote fixé.

Le tableau 11.4 présente les résultats d'une étude bibliographique du bilan de l'azote dans les sols de rizière. Ces résultats montrent un effet positif de l'exposition du sol à la lumière et de la présence du riz sur le bilan (et donc la fixation) de l'azote, ainsi qu'un effet inhibiteur de l'engrais azoté.

11.2.3.2. Réduction de l'acétylène

11.2.3.3. Incorporation d'1 5N2

Les mesures d'incorporation d'15N2 sont utilisées pour des incubations de courte durée dans des systèmes clos. Elles ont été utilisées principalement pour démontrer l'activité fixatrice de microorganismes en culture, ou de systèmes plus complexes tels que des symbioses ou des échantillons de sol. Ces incubations sont également utilisées pour établir le rapport "acétylène réduit/azote fixé" dans les mesures de réduction d'acétylène.

11.2.3.4. Dilution isotopique

Cette méthode est fondée sur l'utilisation d'un sol préalablement marqué à l'15N, dans lequel on fait pousser une plante fixatrice et une plante du même type non fixatrice. En fin de croissance, la concentration en 15N est supérieure dans la plante non fixatrice qui obtient tout son azote du sol, alors que la plante fixatrice obtient son azote à la fois du sol et de l'air.

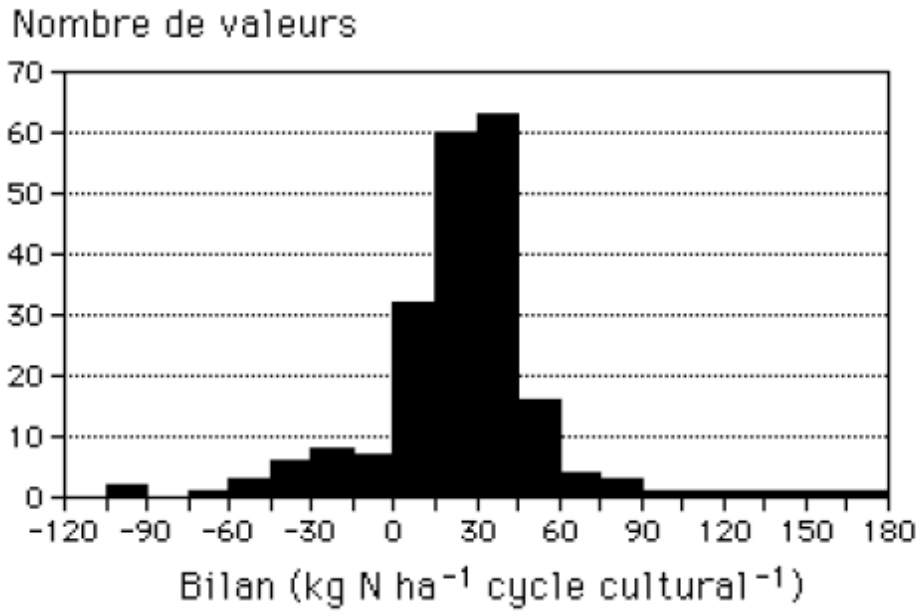
Cette méthode est utilisée pour déterminer le % d'azote fixé dans les plantes (Ndfa).

Tableau 11.4. Etude bibliographique du bilan de l'azote dans les sols de rizière*

1a. Caractéristiques statistiques de l'ensemble des données:

Nombre de valeurs: 211	Unité: kgN ha^{-1} par cycle cultural
Minimum: -102	Maximum: 171
Moyenne: 24,2	Médiane: 27.0
Ecart-type: 33,1	Coefficient de variation: 136 %

1 b. Histogramme des valeurs.



1 c. Effet de différents facteurs sur le bilan de l'azote

Facteur	Nombre d'observations	Moyenne (kgN/ha par cycle)	Ecart type	Niveau de signification de la différence
Application d'engrais azoté				
-	166	29,7	25,4	1%
+	45	4,0	47,6	
Présence de riz				
+	193	26,5	30,7	1%
-	18	-0,5	46,2	
Exposition du sol à la lumière (ensemble de toutes les données)				
+	197	25,0	33,9	non significatif
-	14	13,2	13,8	
Exposition du sol à la lumière (sols sans application d'engrais azoté)				
+	152	31,2	25,7	1%
-	14	13,2	13,8	

1 d. Corrélation entre la quantité d'engrais azoté apportée dans le sol et le bilan de l'azote:

Engrais azoté de synthèse:	r = - 0,320 (significatif à 1%)
Engrais azoté organique:	r = - 0,157 (significatif à 1%)
Engrais azoté de synthèse et organique:	r = - 0,365 (significatif à 1%)

* D'après Roger & Ladha (1992). Les valeurs analysées proviennent de travaux *in situ* et en vase de végétation. Les valeurs obtenues dans des expériences en pot ont été extrapolées en kg N ha^{-1} cycle $cultural^{-1}$ sur la base de la surface du sol dans les pots.

11.2.3.5. Abondance isotopique naturelle (delta 1 5N)

Cette méthode utilise le fait que l'abondance isotopique relative de l'15N (delta 15N) de la matière organique du sol est supérieure à celle de l'air. Ceci résulte d'une sélection isotopique naturelle, l'15N étant moins facilement perdu par la matière organique du sol que l'14N.

On a essayé d'utiliser cette différence pour estimer le % d'azote dérivé de la fixation de N2 dans les plantes. La méthode demande des mesures très fines et est soumise à de nombeux aléas. En particulier elle demande un sol parfaitement homogène sur toute la zone exploitée par le système racinaire de la plante. La précision de cette méthode est faible.

11.2.4. Fixation symbiotique

Les systèmes symbiotiques fixateurs d'azote comprennent trois grands groupes:

- les associations Légumineuse-Rhizobium (au sens large);
- les symbioses actinorhiziennes, association entre une plante et un actinomycète du genre *Frankia*.;
- les symbioses à cyanobactéries.

11.2.4.1. Légumineuses

Rappelons que la fixation par les nodules n'intervient que lorsque la symbiose est établie: les plantes non infectées sont incapables de fixer l'azote, de même que les bactéries isolées (sauf quelques souches mutées et *Azorhizobium*).

Cependant, en fractionnant un nodule (sous atmosphère exempte d'O2) en bactéroïdes, membranes et fraction soluble, on constate que les extraits acellulaires de bactéroïdes peuvent fixer l'azote en présence d'un donneur d'électrons et d'un système producteur d'ATP, le produit final étant l'ammoniaque. La plante intervient en participant à la synthèse des enzymes de la fixation et en créant, dans le nodule, les conditions nécessaires à la protection de la nitrogénase vis à vis de l'oxygène.

La fixation par les nodules de légumineuses est un processus très efficace, l'apport pouvant atteindre 200 kg d'azote ha-1 an-1 chez les légumineuses à nodules racinaires et plus du double chez les légumineuses à nodules de tiges (caulinaires), en conditions expérimentales (Tableau 11.5). La mesure de l'activité nitrogénasique par la méthode de réduction de l'acétylène a permis de comparer l'efficience de différents nodules, par exemple des nodules de trèfle ou de soja qui sont deux fois plus efficients que les nodules du pois.

Tableau 11.5. Estimation de l'azote fixé par deux légumineuses à nodules caulinaires cultivées en sol submergé

Longueur des jours	Nb de jours de culture	Ndfa* %	N fixé (kg/ha)	Méthode de mesure	Référence
Sesbania rostrata					
long	56	38	-	^{15}N dil.	Rinaudo et al. 1988
long	60	36-51	83-109	^{15}N dil.	Ndoye & Dreyfus 1989
long	56	88	175	ARA/$^{15}N_2$	Becker et al. 1990
court	56	83	70	---	---
long	25	76	10	^{15}N dil.	Pareek et al. 1990
long	45	88	140	---	---
long	65	94	458	---	---
court	25	53	7	---	---
court	45	71	100	---	---
court	65	86	324	---	---
Aeschynomene afraspera					
long	56	77	145	ARA/$^{15}N_2$	Becker et al. 1990
court	56	68	105	---	---
Moyenne		**70**			

* % de l'azote total dérivé de la fixation de N_2 (Ndfa = Nitrogen derived from the air)

L'influence de l'éclairement est également importante, l'activité nitrogénasique variant suivant le rythme nycthéméral. De même, la teneur en azote du soja cultivé sous un éclairement réduit, est deux fois inférieure à celle d'une plante témoin bien éclairée.

Les mesure de dilution isotopique artificielle ou naturelle ont montré que le pourcentage d'azote dérivé de la fixation biologique pouvait varier dans de larges limites. Le tableau 11.5 fournit un exemple de la variabilité de l'azote fixé par des légumineuse à nodules caulinaires en fonction (1) de la longueur des jours durant la période de croissance et (2) de la durée de la culture.

11.2.4.2. Symbioses actinorhiziennes

Les symbioses actinorhiziennes se développent dans des environnements qui vont des régions arctiques aux régions tropicales, et des régions semi-arides aux forêts tropicales humides. Elles jouent dans les environnements naturels un rôle aussi important que les légumineuses dans les sols cultivés.

Les Casuarina jouent un rôle essentiel en foresterie tropicale, comme producteurs de bois d'œuvre et de combustible, et comme éléments régénérateurs ou protecteurs des sols.

Il n'existe que peu de données quantitatives sur la fixation d'azote par les symbioses actinorhiziennes.

L'activité nitrogénasique (réductrice d'acétylène) des nodules de l'aulne est comparable à celle des nodules de légumineuses.

Des gains d'azote de 30 à 149 kg N ha-1 ont été rapportés pour des plantations d'*Hippophae rhamnoides* agées respectivement de 0-3 et 13-16 ans.

11.2.4.3. Symbioses à cyanobactéries

Parmi les nombreux types de symbioses à cyanobactéries, seule la symbiose avec *Azolla* a une importance économique en agriculture. Les quantités d'azote fixé par *Azolla* ont été le plus souvent estimées à partir de mesures de biomasses et l'hypothèse que la majeure partie de l'azote provenait de la fixation biologique. Des résultats récents confirment cette hypothèse et montrent qu'en moyenne

74% de l'azote d'*Azolla* provient de la fixation de N2. Cette valeur est identique en présence ou en absence d'engrais azoté. Des résultats similaires (Ndfa de 59 à 99%

) ont été obtenus avec la mesure de l'abondance isotopique naturelle.

Un essai international en vraie grandeur, conduit pendant 4 ans dans 37 sites et 10 pays, a montré que la biomasse maximale d'*Azolla* cultivée avant et après repiquage du riz varie entre 5 et 25 t ha-1 poids frais (moyenne 15 t) soit 10-50 kg N ha-1 (moyenne 30 kg N). L'incorporation d'*Azolla* comme engrais vert a permis des augmentations de rendements de 20 à 40% (Tableau 11.6).

Tableau 11.6. Résultats d'essais internationaux (1979-1980) de l'utilisation d'*Azolla* dans 37 sites de 10 pays rizicoles

Traitement	Rendement (t/ha)	% du contrôle
Contrôle sans azote	3.00	100 c
30 kg N/ha en 3 applications	3.65	121 b
60 kg N/ha en 3 applications	4.24	141 a
Azolla incorporée avant repiquage	3.73	124 b
Azolla incorporée après repiquage	3.67	122 b
Azolla inoculée après repiquage mais non incorporée	3.61	120 b
Combinaison des traitements 2 et 4	4.15	138 a
Combinaison des traitements 2 et 5	4.07	135 a
Azolla incorporée avant et après repiquage	4.09	136 a

Tableau 11.7. Principaux groupes de fixateurs libres

Famille	Genre	Espèces
Microorganismes photosynthétiques anaérogènes		
Chlorobiaceae	*Chlorobium*	*limicola, phaebacteroides, thiosulphatophilum*
	Pelodictyon	*luteum*
	Amoebobacter	*roseus*
Chromatiaceae	*Chromatium*	*gracile, minus, minutissimus, vinosum, violascens, warmingii, weissei*
	Ectothiorhodospira	*shaposhnikovii*
	Thiocapsa	*pfennigii, roseopercina*
	Thiocystis	*violacea*
Rhodospirillaceae	*Rhodomicrobium*	*vannielii*
	Rhodopseudomonas	*acidophila, capsulata, gelatinosa, globiformis, palustris, spaeroides, viridis*
	Rhodospirillum	*fulvum, molischianum, photometricum, rubrum, tenue*
Microorganismes photosynthétiques aérogènes (cyanobactéries)		
Cyanobactéries	Hétérocystées	
	Homocystées	
	Unicellulaires	
Microorganismes hétérotrophes		
Azotobacteriaceae	*Azomonas*	*insignis, macrocytogenes*
	Azotobacter	*beijerinckia, chroococcus, halophilus, miscellus, paspali, vinelandii*
	Azotococcus	*agilis*
	Beijerinckia	*derxii, fluminensis, indica, mobilis*
	Derxia	*gummosa*
	Xanthobacter	*autotrophicus, flavus*
Bacillaceae	*Bacillus*	*macerans, polymixa*
	Clostridium	*acetobutyricum, beijerinckia, butyricum, felsinium, kluyverii, lactoacetophilum, madisonii, pasteurianum, pectinovorum, saccharobutyricum, tetanomorphum*
	Desulfotomaculum	*orientis, ruminis*
Corynebacteriaceae	*Arthrobacter*	*fluorescens*
Enterobacteriaceae	*Citrobacter*	*freundii*
	Enterobacter	*aerogenes, agglomerans, cloacae*
	Erwinia	*herbicola*
	Escherichia	*intermedia*
	Klebsiella	*aerogenes, oxytoca, pneumoniae*
Methanomonadaceae	*Methylobacter*	*capsulatus*
	Methylococcus	*capsulatus*
	Methylocystis	*parvus*
	Methylosinus	*trichosporium*
Propionibacteriaceae	*Propionibacterium*	*petersonii, shermanii*
Spirillaceae	*Aquaspirillum*	*fasciculatus, peregrinum*
Thiobacteriaceae	*Thiobacillus*	*ferrooxydans*
	Desulfovibrio	*desulfuricans, gigas, vulgaris*

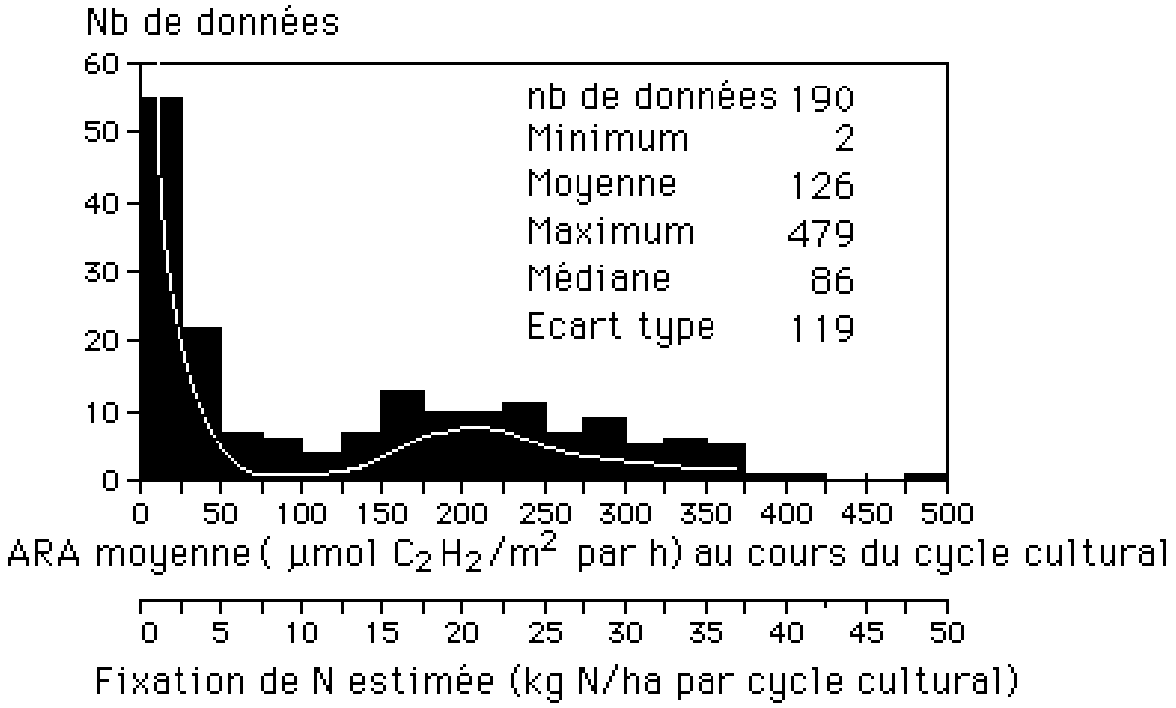


Fig. 11.3. Distribution de 190 estimations de la valeur moyenne de l'ARA et de l'azote fixé durant un cycle cultural par les organismes phototrophes dans des rizières soumises à 26 pratiques culturales différentes

Chaque valeur est la moyenne de 13 mesures journalières au cours du cycle cultural, chaque mesure étant effectuée sur 13 carottes comprenant le premier centimètre de sol et l'eau de submersion. La partie gauche de l'histogramme correspond principalement à des parcelles avec épandage d'engrais azoté; la partie droite correspond principalement à des parcelles sans application d'azote ou avec enfouissement de l'azote.

11.2.5. Fixateurs libres

11.2.5.1. Organismes responsables de l'activité fixatrice non symbiotique

Plus de 100 espèces bactériennes appartenant à 12 familles sont fixatrices d'azote moléculaire
(Tableau 11.7). On les trouve dans tous les milieux (sol, eaux), et leurs caractéristiques physiologiques sont très variées: Gram-négatif ou Gram-positif, aérobies stricts, microaérophiles, anaérobies stricts ou facultatifs, phototrophes ou hétérotrophes.

11.2.5.2. Activité fixatrice

La fixation d'azote par les bactéries associées à la matière organique du sol est le plus souvent de l'ordre de quelque kilogramme d'azote ha-1 an-1. Elle peut dépasser 10 kg ha-1 an-1 dans les sols cultivés recevant des fumures organiques (paille, compost...).
La fixation d'azote par les bactéries de la rhizosphère se chiffre le plus souvent en kilogrammes d'azote ha-1 an-1 et exceptionnellement en dizaines de kg. Chez les plantes cultivées, les activités les plus élevées ont été observées chez la canne à sucre, le riz et le blé.
La fixation de N2 par les cyanobactéries constitue un apport d'azote significatif, en valeur absolue ou relative, dans certains écosystèmes naturels ou cultivés: croûtes algaires des sols arides et de certains sols tempérés, et fleurs d'eau des rizières. Elle est fortement influencée par l'apport d'engrais azoté. En sols non fertilisés elle est de l'ordre de 20-30 kg N ha-1 an-1 mais tombe à quelques kg N ha- 1 an-1 dans les sols fertilisés (Fig 11.3).

Tableau 11.8. Fixation biologique de l'azote dans différents environnements

Surface concernées		Azote fixé	
Type d'utilisation	surface (10^6 ha)	kg ha^{-1} an^{-1}	Tg an^{-1}
Cultures de légumineuses	250	140	35
Rizières	135	30	4
Autres plantes cultivées	1015	5	5
Prairies et landes permanentes	3000	15	45
Forêts et zones forestières	4100	10	40
Surfaces non cultivées	4900	2	10
Zones couvertes de glace	1500	0	0
Surface totale des terres	14900		139
Océans et mers	36000	1	36
Total	51000		175

11.2.6. Contribution de la fixation biologique au budget mondial de l'azote

Parmi les différents environnements du globe, les terres cultivées plantées en légumineuses et en riz sont celles où l'activité fixatrice moyenne est la plus élevée (Tableau 11.8).

11.2.6. 1. Activité fixatrice en région tempérée

Une expérimentation conduite depuis 1843 à la station agronomique de Rothamsted (Angleterre) a permis de mettre en évidence un gain moyen d'azote par fixation biologique de 30 kg N ha-1 an-1 dans une parcelle n'ayant jamais reçu d'engrais azoté. Les quelques légumineuses sauvages présentes ne peuvent pas être à l'origine de cette fixation, qui est dûe en grande partie à la croûte algale de la surface du sol. Durant l'été, après de fortes pluies, l'activité fixatrice peut atteindre 1 à 2 kg N ha-1; elle se maintient pendant la nuit à environ 15% de sa valeur diurne.

Sous forêt de pins aux USA, la fixation non symbiotique a été évaluée à 23 kg N ha-1 an-1 pendant 10 ans; sous prairie sans légumineuses 183 kg d'azote ha-1 ont été fixés en 3 ans. L'activité fixatrice augmente très rapidement dans un sol de prairie par apport de sucres, ce qui suggère que les substrats carbonés sont limitants pour la fixation non symbiotique.

Les deux systèmes fixateurs non symbiotiques les plus efficients en région tempérée sont les bactéries de la rhizosphère des dicotylédones et de certaines monocotylédones, et les cyanobactéries de la couche d'algues à la surface du sol.

11.2.6. 2. Activité fixatrice en région tropicale Associée aux graminées

La plupart des graminées tropicales ont une activité fixatrice notable, associée à la photosynthèse. On a montré que cette activité est fortement stimulée par addition de sucre, sans augmentation du nombre de bactéries fixatrices, ce qui indique que la fixation non symbiotique est limitée par la concentration en substrats carbonés. Cette activité fixatrice n'est pas distribuée uniformément sur les racines, mais concentrée dans certaines zones où les cellules corticales sont abondemment infectées par des bactéries. Cette localisation intraracinaire (endorhizosphère) peut expliquer le fait que l'activité n'est pas diminuée par un simple lavage des racines. La graminée tropicale, *Paspalum notatum* stimule spécifiquement la croissance d'une bactérie fixatrice libre *Azotobacter paspali*. Les mesures sur des plantes entières ont montré que l'activité fixatrice est conservée sous une pression d'oxygène correspondant à la pression atmosphérique,

indiquant que le système sol-plante maintient une tension d'oxygène compatible avec la fixation biologique. Cette fixation peut atteindre la valeur exceptionnelle de 100 kg N ha-1 an-1.

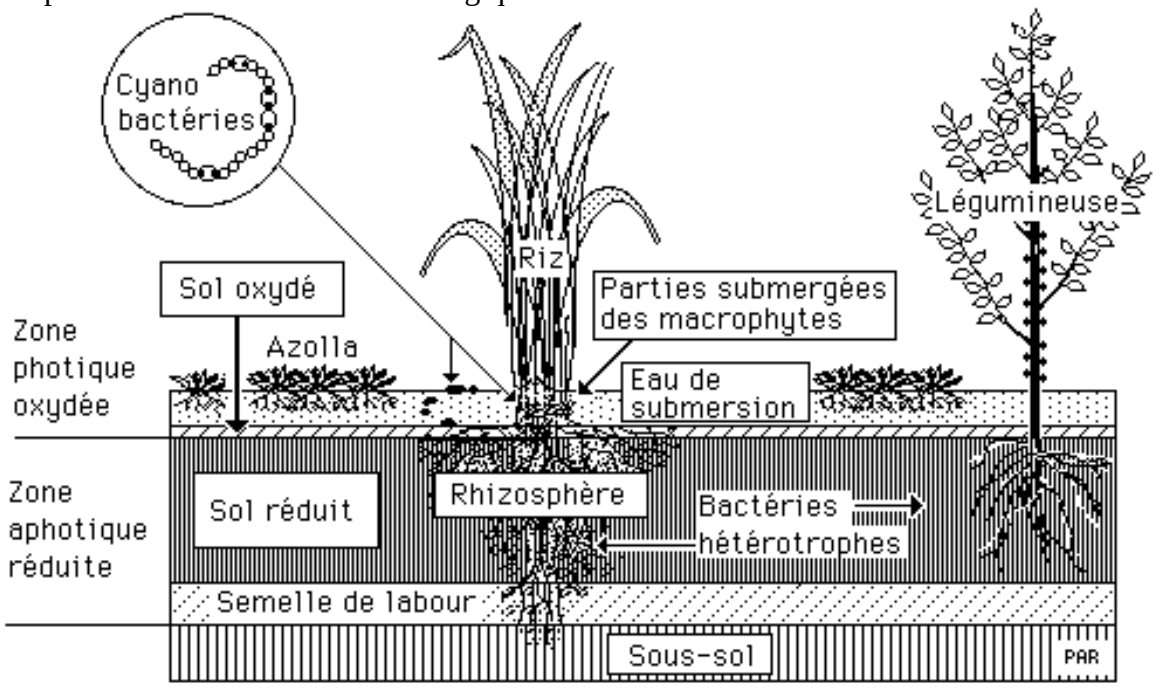


Fig. 11.4. Schéma synthétique des principaux macro-environnements d'une rizière submergée et des principaux organismes fixateurs de N2 Associée au riz inondé

Les rizières traditionnelles inondées (non fertilisées) sont caractérisées par une productivité stable à long terme. A l'opposé des autres céréales, pour lesquelles la monoculture continue en sol exondé aboutit rapidement à une diminution de la fertilité du sol et des rendement, la monoculture du riz a pu être pratiquée pendant des siècles, en obtenant des rendements modestes (1-2 t ha-1) mais constants et sans effets néfastes sur les sols. Un bilan d'azote montre que le déficit entre les gains connus autres que la fixation de N2 et les exportations atteint 70 kg ha-1 an-1, ce qui devrait épuiser le stock d'azote du sol (2800 kg) en 40 ans. En fait, ce stock se maintient grâce à la fixation biologique de l'azote.

La submersion des sols de rizières conduit à la formation de macro et micro-environnements qui diffèrent par leur potentiel redox, leurs propriétés physiques, leur éclairement et leurs propriétés trophiques (Fig. 11.4). Ceci permet à tous les groupes d'organismes fixateurs de N2 de trouver des niches favorables à leur développement dans les rizières. Ces organismes comprennent: (1) les bactéries photosynthétiques et les cyanobactéries, organismes indigènes qui se développent dans la zone photique de la rizière (eau de submersion, interface sol-eau et parties submergées du riz et des macrophytes aquatiques), (2) les bactéries hétérotrophes indigènes dans le sol et la rhizosphère du riz et (3) *Azolla* et les légumineuses, symbioses fixatrices de N2 introduites comme engrais vert.

La contribution mesurée et le calcul des valeurs maxima théoriques des différents systèmes fixateurs présents dans les rizières sont présentés au tableau 11.9.

Le système fixateur sol-riz a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in situ* qui ont mis en évidence l'influence de plusieurs paramètres sur la fixation non symbiotique dans les rizières. On constate, par exemple, que le gain d'azote est deux fois plus important en rizière inondée qu'en rizière non inondée, et que des plantes cultivées sous ombrage ont une activité fixatrice réduite par rapport aux plantes cultivées sous 30 000 lux. En inoculant le système racinaire de jeunes plantules avec des bactéries fixatrices isolées à partir de la rhizosphère de riz de la même variété, il est possible de maintenir une croissance pendant 4 semaines dans un milieu totalement dépourvu d'azote combiné, les plantes témoins non inoculées ne pouvant pas se

développer. L'activité fixatrice varie pour une variété avec la microflore rhizosphérique associée, et pour un sol donné avec la variété de riz, ce qui suggère le caractère génétique de la fixation rhizosphérique potentielle.

Tableau 11.9. Fourchette des estimations de l'azote fixé par différents organismes dans les rizières (kg N ha-1 cycle cultural -1) et maximum théorique

Organisme	Valeurs rapportées	Maximum théorique et hypothèses de calcul
Fixation associative dans la rhizosphère du riz	1-7 kg N ha^{-1} par cycle cultural	40 kg N ha^{-1} par cycle cultural • Toutes les bactéries rhizosphériques sont fixatrices, • Le flux de C dans la rhizosphère est de 1 t ha^{-1} par cycle cultural et 40 mg N sont fixés par g de C
Fixation hétérotrophe associée avec la décom--position des pailles	2-4 kg N par tonne de paille	35 kg N ha^{-1} par cycle cultural • application de 5 tonnes de paille par ha • 7 mg N sont fixés par gramme de paille.
Fixation hétérotrophe totale	1-31 kg N ha^{-1} par cycle cultural	60 kg N ha^{-1} par cycle cultural • La totalité du flux de carbone dans le sol (2 t par cycle cultural) est utilisée par des fixateurs de N_2.
Cyanobactéries	0-80 kg N ha^{-1} par cycle cultural	70 kg N ha^{-1} par cycle cultural • La biomasse photosynthétique aquatique est composée uniquement de cyanobactéries fixatrices (C/N = 7) et la production primaire est de 0,5 t C ha^{-1} par cycle cultural
Azolla	20-140 kg N ha^{-1} par cycle cultural (études en parcelles expérimentales) 10-50 kg N ha^{-1} par cycle cultural (études in situ, en vraie grandeur)	224 kg N ha^{-1} par cycle cultural • la biomasse maximale d'une culture d'*Azolla* correspond à 140 kg N ha^{-1}, • deux cultures d'*Azolla* sont effectuées par cycle cultural de riz • 80% de l'azote d'*Azolla* est de l'azote fixé
Légumineuses utilisés en engrais vert	20-260 kg N ha^{-1} par cycle cultural	260 kg N ha^{-1} en 55 jours • *Sesbania rostrata* est utilisée comme engrais vert • 290 kg N ha^{-1} sont accumulés en 50-60 jours • 90% de l'azote de *Sesbania* est de l'azote fixé

Tableau 11.10. Principaux facteurs limitant la fixation symbiotique de N2 par les légumineuses et moyens possibles pour diminuer les effets des facteurs limitants

- **Stress hydrique**
  - irrigation [coût élevé]
  - selection de cultivars et de souches résistant à la sécheressse
  - stimulation de l'infection par les endomycorhizes (VAM) [technologie imparfaitement au point]
- **Acidité du sol et toxicité associées**
  - chaulage [coût élevé]
  - apport de matière organique (fumier, engrais vert, compost) [coût élevé]
  - sélection de souches de Rhizobium résistantes à l'acidité [établissement]
- **Déficience en P et autres déficiences minérales**
  - apport d'engrais phosphoré [coût élevé]
  - stimulation de l'infection par les endomycorhizes (VAM) [technologie imparfaitement au point]
  - détermination des autres déficiences et correction [technologie au point]
- **Inadéquation des populations natives de Rhizobium**
- **Compétition entre souches natives et introduites**
  - inoculation avec des souches de Rhizobium sélectionnées pour leur effectivité, leur compétition et leur persistance [établissement]
- **Nématodes et autres parasites et maladies**
  - traitements nématicides [coût élevé]
  - lutte biologique [technologie imparfaitement au point]
  - lutte intégrée [technologie imparfaitement au point]
  - selection de variétés résistantes

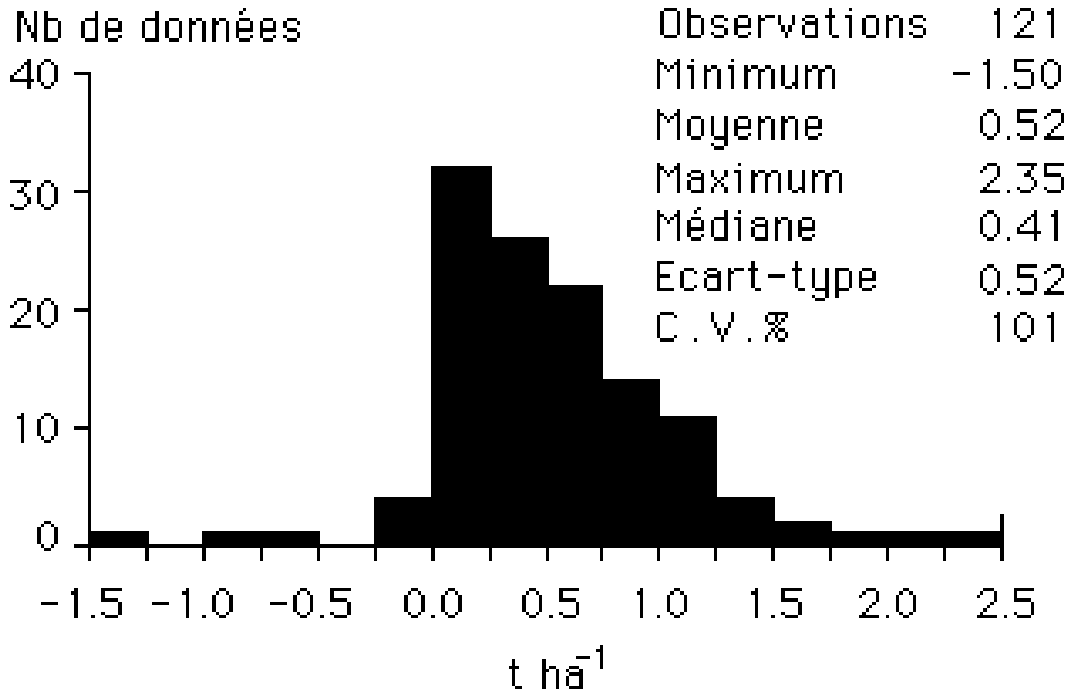


Fig. 11. 5. Histogramme des différences entre rendements en riz obtenus avec et sans inoculation avec des bactéries hétérotrophes (étude bibliographique).

11.2.7. Problèmes posés par l'utilisation pratique de la fixation biologique de N2

11.2.7.1. Cas des légumineuses

Le tableau 11.10 présente les principaux facteurs limitant la fixation symbiotique de N2 par les légumineuses. On s'aperçoit que si les options théoriques pour diminuer les effets de ces facteurs sont nombreuses, les possibilités pratiques sont en fait relativement limitées.

11.2.7.2. Cas des rizières inondées

La somme des valeurs de fixation d'azote maximales mesurées *in situ* pour les différents systèmes fixateurs de N2 présents dans les rizières (Tableau 11.9), bien que souvent très inférieure à la valeur potentielle théorique, serait plus que suffisants pour assurer des rendements élevés en riz sans le moindre apport d'engrais azoté.

Malheureusement, l'utilisation pratique des systèmes fixateurs d'azote dans une riziculture à forte productivité se heurte à de nombreux problèmes technologiques et socio-économiques.

Dans le cas des fixateurs libres hétérotrophes, un potentiel azoté bas ou modéré ainsi que des problèmes technologiques, en particulier l'absence d'établissement des souches inoculées, empêchent l'utilisation de ce système fixateur.

Une analyse de 210 essais d'inoculation bactérienne du riz rapportés dans 23 articles, montre que de nombreux résultats comparant les rendements sont fréquemment présentés sans analyse statistique et doivent donc être interprétés avec précaution. La distribution des différences de rendement entre parcelles inoculées et parcelles non inoculées est dissymétrique (Fig. 11.5). Elle montre une quasi absence de valeurs négatives, un mode correspondant à la première classe positive et une forme générale correspondant à la moitié droite d'une distribution gaussienne centrée sur le zéro! Ceci suggère que les essais infructueux d'inoculation *in situ* n'ont généralement pas été rapportés et invite à une certaine prudence quant à l'interprétation des expériences effectuées jusqu'à présent.

Les effets bénéfiques de l'inoculation bactérienne peuvent être attribués à quatre processus:

(1) fixation de N2 accrue dans la rhizosphère

(2) production de régulateurs de croissance qui améliorent la croissance du riz

(3) disponibilité accrue d'éléments nutritifs due à leur solubilisation par les bactéries inoculées

(4) compétition entre les bactéries inoculées avec des pathogènes dans la rhizosphère.

L'importance relative de ces différents processus n'a pas encore été déterminée. En particulier, il n'existe pas de résultats expérimentaux démontrant une augmentation significative et durable de la fixation de N2 dans des parcelles ou des pots inoculés permettant d'expliquer une augmentation significative de rendement. Généralement, les souches inoculées disparaissent rapidement et ne se multiplient pas.

En conclusion, l'intérêt agronomique de l'inoculation bactérienne du riz reste encore à démontrer.

Dans le cas des fixateurs libres phototrophes (cyanobactéries) l'inoculation a permis d'augmenter les rendements en riz, mais cette augmentation est très modeste et les effets de l'inoculation sont imprévisibles.

L'analyse de 634 expériences *in situ* publiées dans des revues scientifiques et dans les rapports de différents organismes de recherche montre que l'histogramme des différences de rendement entre parcelles inoculées et non inoculées présente une dissymétrie marquée qui provient en grande partie de l'absence de données dans les classes négatives (Fig. 11.5). Cela indique que les expériences n'ayant pas montré d'effet positif n'ont généralement pas été publiées. La forme de l'histogramme suggère donc que le mode (200 kg ha-1) est une valeur plus réaliste que la moyenne pour estimer le

potentiel moyen de l'inoculation avec des cyanobactéries pour augmenter les rendements en riz. Les différences observées ne sont significatives que dans 17 % des cas.

En fait, les résultats récents indiquent que les cyanobactéries sont ubiquistes dans les rizières et que ce n'est généralement pas leur absence qui limite la fixation d'azote photodépendante dans les rizières, mais des facteurs de l'environnement parmi lesquels les carences en phosphore, la prédation par les invertébrés et l'inhibition par les engrais azotés sont prépondérants. Les pratiques culturales qui diminuent l'effet de ces facteurs limitant (chaulage, apport de P, contrôle des prédateurs) ne sont généralement pas économiquement viables, à l'exception de l'enfouissement des engrais azotés.

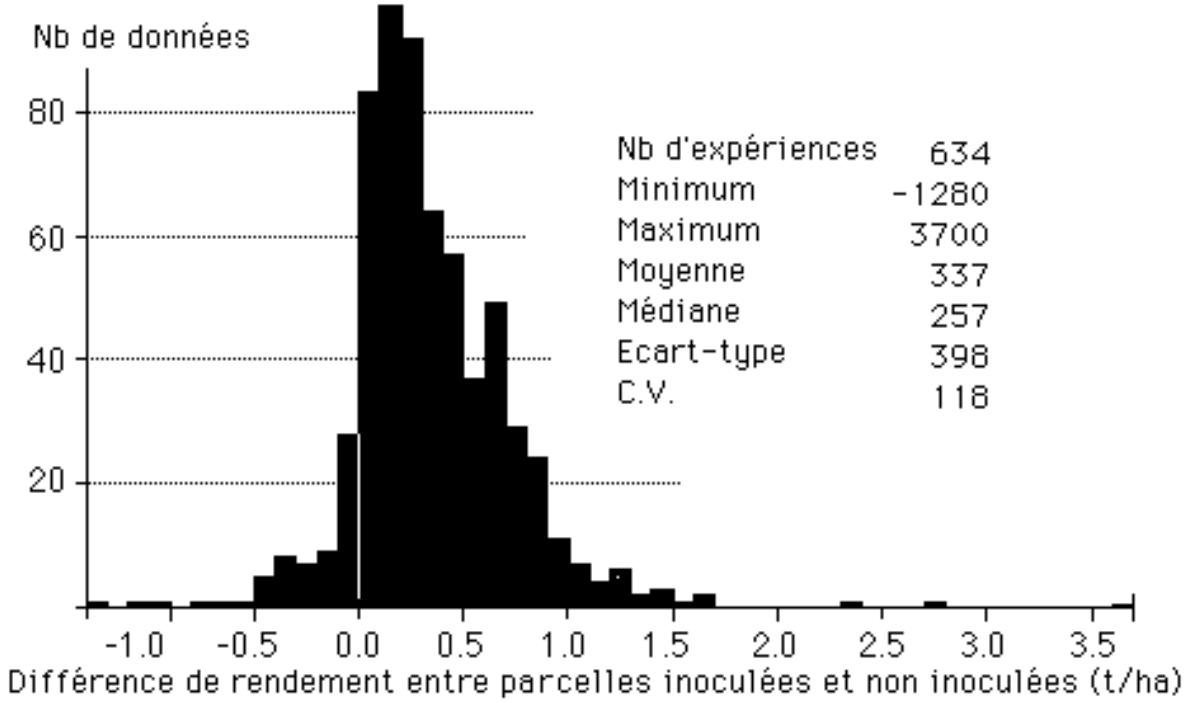


Fig. 11.6. Histogramme de 634 différences de rendement (t ha-1) entre rizières inoculées et non inoculées avec des cyanobactéries

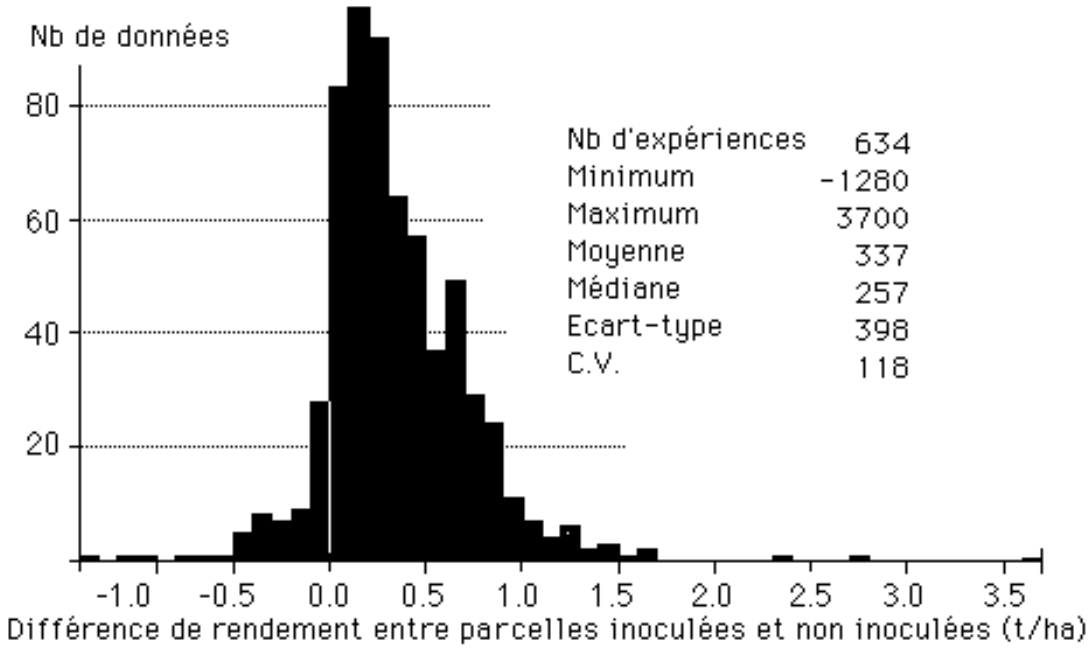


Tableau 11.11. Importance des surfaces cultivées avec utilisation d'*Azolla* en riziculture

• Pays où *Azolla* est ou a été utilisée de façon significative:

Chine:	avant 1978: > 6.5 million ha	(FAO 1978)
	avant 1979: 1.34 million ha	(Liu Chung Chu 1979)
	avant 1980 : 0.7 million ha	(Lumpkin & Plucknett 1982)
	1987: diminution de l'utilisation comme engrais vert, recherches pour l'utilisation comme aliment du bétail	(Liu Chung Chu 1987)
Vietnam:	en 1980: environ 500 000 ha	(Roger & Watanabe 1986)
	depuis 1980: l'utilisation a continuellement diminué	
Philippines:	en 1981: adoption sur 5,000 ha	(Kikuchi et al. 1984)
	en 1986: 84,000 ha	(*Azolla* Workshop , IRRI 1987)
	depuis 1986: l'utilisation a constamment diminué	

• Pays ou les possibilités d'utilisation d'*Azolla* ont été ou sont en cours d'étude:
Brésil, Inde, Italie, Pakistan, Sénégal, Sri Lanka, Thailande.

•En 1990 l'utilisation d'*Azolla* concerne moins de 1% des surfaces cultivées en riz.

Dans le cas des engrais verts (*Azolla* et légumineuses), le potentiel azoté des systèmes est suffisant mais leur utilisation est sévèrement restreinte par des facteurs socio-économiques.
Après une utilisation sur plusieurs millions d'hectares de rizières en Chine et au Vietnam, l'emploi d'*Azolla* a constamment diminué au cours des dix dernières années et cette technique ne s'est pas répandue dans les pays qui ont testé son utilisation. Le tableau 11.11 résume cette évolution.
Cependant, les techniques d'utilisation d'*Azolla* sont au point. On dispose d'une collection mondiale permettant de sélectionner les souches adaptées à un environnement donné. Au cours des dernières années, les études de la recombinaison de différents partenaires (fougère et cyanobactérie) et de l'hybridation interspécifique ont montré qu'il est possible d'améliorer les propriétés des souches en combinant, par exemple, le potentiel fixateur de N2 élevé d'*A. filiculoides* avec la résistance à la chaleur d'*A. microphylla* (cf Tableau 8.6).
Les principaux facteurs qui limitent l'utilisation d'*Azolla* sont socio-économiques. Les méthodes traditionnelles utilisées au Vietnam et en Chine demandent énormément de travail. L'utilisation d'*Azolla* nécessite la maitrise de l'eau et des réseaux de conservation et distribution de l'inoculum. Son adoption par les riziculteurs dépend de décisions politiques pour l'établissement de tels réseaux. Enfin *Azolla* ne peut se développer sans apport de phosphore. Les études économiques ont montré que le seuil de rentabilité était dépassé lorsque le coût de la journée de travail était supérieur à deux dollars ou lorsqu'il fallait appliquer des insecticides pour contrôler les parasites d'*Azolla*.
Malgré un potentiel azoté élevé, l'utilisation des légumineuses comme engrais verts en riziculture a également diminué continuellement au cours des dernières décades.
Durant les années 80, la Chine a été le seul pays où les engrais verts étaient utilisés de façon notable et leur utilisation n'a cessé d'y décroître (Figure 11.7). Dans les autres pays, leur utilisation est devenue pratiquement inexistante.
Les aspects technologiques qui ont limité l'utilisation des légumineuses en engrais vert incluent le manque de main d'oeuvre et de matériel pour l'incorporation d'une biomasse volumineuse. La teneur en azote des légumineuses est de 0,2 à 0,6% du poids frais et l'apport de 50 kg N demande l'incorporation de 10 à 26 t d'engrais vert.
Les facteurs limitants socio-économiques sont les plus importants. Les engrais verts sont peu attrayants pour les riziculteurs car ce ne sont ni des cultures vivrières ni des cultures de rapport, et le bilan économique de leur utilisation est rarement avantageux.

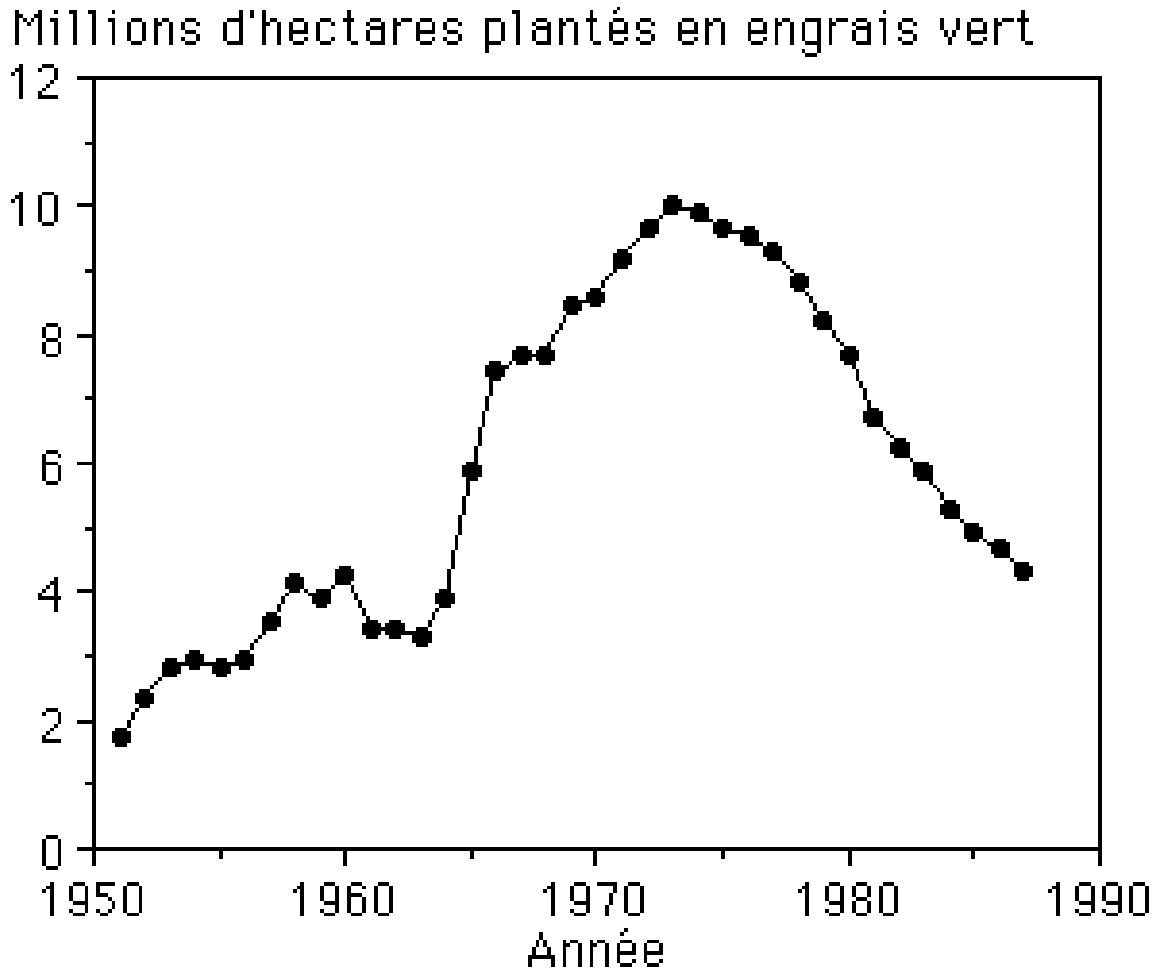


Fig. 11. 7. Evolution de l'utilisation des légumineuses comme engrais verts en Chine

Dans les régions où l'engrais azoté est disponible, son prix par rapport à celui du riz est généralement favorable pour le paysan en raison des politiques gouvernementales de subvention de l'engrais. Par contre, le coût des semences de légumineuses, de préparation du sol et d'incorporation, comparé à l'augmentation de rendement obtenue, n'est pas favorable. Le plus souvent, une culture vivrière dérobée ou de rapport est plus avantageuse pour le paysan qu'un engrais vert.

Dans les régions où l'engrais azoté n'est pas disponible, la riziculture est de type autarcique, les exploitations sont de petite taille et le paysan ne peut utiliser sa terre pour cultiver un engrais vert au détriment d'une culture vivrière.

11.3. MINERALISATION DE L'AZOTE ORGANIQUE

La plus grande partie du stock d'azote se trouve dans le sol sous forme organique, plus ou moins labile (voir fig. 11.1). Sous cette forme il n'est pas, pour l'essentiel, assimilable directement par les microorganismes ou les plantes.

Les constituants azotés des débris végétaux ou animaux, ou des microorganismes morts, sont décomposés par la microflore avec libération d'acides aminés et de bases azotées. Ces composés plus simples sont à leur tour attaqués par fermentation ou oxydation. La décomposition anaérobie (putréfaction) ne produit pas en général d'ammoniaque, mais des amines, qui sont ensuite oxydées avec production de CO_2 et d'ammoniaque. L'ammonification aérobie est le processus le plus important dans le sol.

11.3.1. Protéolyse

Les protéines sont des chaînes d'acides aminés constituées par un nombre plus ou moins grand de "résidus", leur poids moléculaire varie de 103 à 106 daltons environ. L'hydrolyse par des exoenzymes microbiens provoque la coupure en tronçons plus courts (peptides) puis en acides aminés libres. Ceux-ci sont pour environ 4/5 utilisés par la microflore pour la synthèse des constituants cellulaires.

11.3.2. Ammonification

L'ammonification est une fonction banale de la microflore bactérienne et fongique, intervenant à des conditions très variées de pH, d'humidité ou de température. Par exemple, l'optimum de pH étant la neutralité, l'ammonification reste active entre pH 3,5 et 9,5, donc dans une gamme de pH couvrant la majorité des sols. De même, l'ammonification se produit aux très basses teneurs en eau (pF < 4,9): dans les sols arides il peut en résulter une accumulation d'ammoniaque, la nitrification étant plus ralentie. Aux premières pluies se produit alors une intense nitrification, et une perte importante d'azote par lessivage (voir fig. 11.12).

Les bactéries ammonifiantes les plus connues ce trouvent dans les genres *Bacillus, Proteus, Micrococcus, Pseudomonas*. Les champignons (*Aspergillus*) semblent jouer un rôle important dans les sols tropicaux acides. Les germes ammonifiants sont très abondants, ils peuvent former 20% de la microflore totale du sol.

11.3.3. Putréfaction

C'est un processus anaérobie dû à des bactéries sporulantes (*Clostridium)* qui se produit dans une masse compacte de matière organique. La putréfaction est moins importante dans le sol que l'ammonification des résidus végétaux, même s'il y a un apport de cadavres de petits animaux, car ceuxci sont dispersés et mélangés avec des résidus végétaux donc subissent une ammonification.

Le rapport C/N des substances qui peuvent putréfier est plus faible que celui des résidus végétaux.

Il se forme des composés malodorants: acides gras (acide butyrique), mercaptans, indol. Une faible production d'acide indol-acétique par putréfaction peut avoir une influence sur la croissance des plantes, ce composé étant un facteur de croissance. Le stade ultime est encore l'eau, le CO2 et l'ammoniaque.

11.3.4. Devenir de l'azote ammoniacal dans le sol

L'azote ammoniacal non fixé, produit par ammonification ou putréfaction ou apporté sous forme d'engrais, est un composé intermédiaire dans le cycle de l'azote dans le sol (voir fig. 11.1). Il a plusieurs destins possibles:

11.3.4.1. Assimilation

Une partie de l'azote ammoniacal est consommé par la microflore pour ses synthèses: la forme ammoniacale est en effet préférée à la forme nitrique. Il en est de même pour les racines des plantes, qui absorbent davantage l'azote ammoniacal que nitrique. Cette différence est due en particulier au caractère électronégatif des cellules jeunes de la racine. Dans les sols acides, au contraire, il semble que la forme nitrique soit absorbée plus facilement, les cellules portant une charge positive.

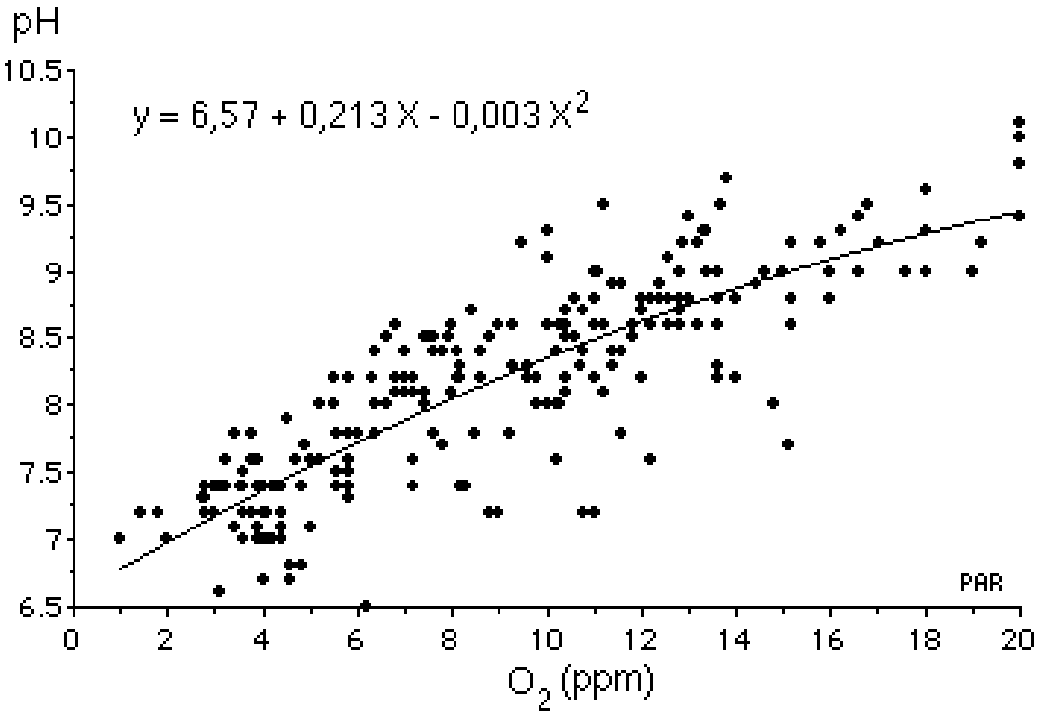


Fig.11.8. Relation entre l'activité photosynthétique et le pH dans l'eau des rizières

11.3.4.2. Lessivage et volatilisation

Les pertes sont généralement faibles en sol exondé, l'ammonium libre étant rapidement fixé ou adsorbé. Par contre, dans les sols des rizières inondées, les pertes d'azote par volatilisation de l'ammoniac peuvent être extrêmement élevées et représenter jusqu'à 70% de l'engrais azoté épandu.

L'apport d'engrais dans l'eau des rizières se traduit par une prolifération des algues vertes unicellulaires dont l'activité photosynthétique augmente le pH de l'eau de submersion (Fig. 11.8). A des pH supérieurs à 9,5, une forte proportion de l'ammoniaque dans l'eau de submersion passe sous la forme gazeuse (ammoniac) et est entrainée par le vent. Les pertes par volatilisation, auxquelles viennent s'ajouter des pertes, moins importantes, par dénitrification (cf § 11.5) et lessivage, expliquent la faible utilisation par la plante de l'engrais azoté épandu (Fig 11.9). L'enfouissement de l'engrais azoté diminue de façon importante les pertes par volatilisation de l'ammoniaque.

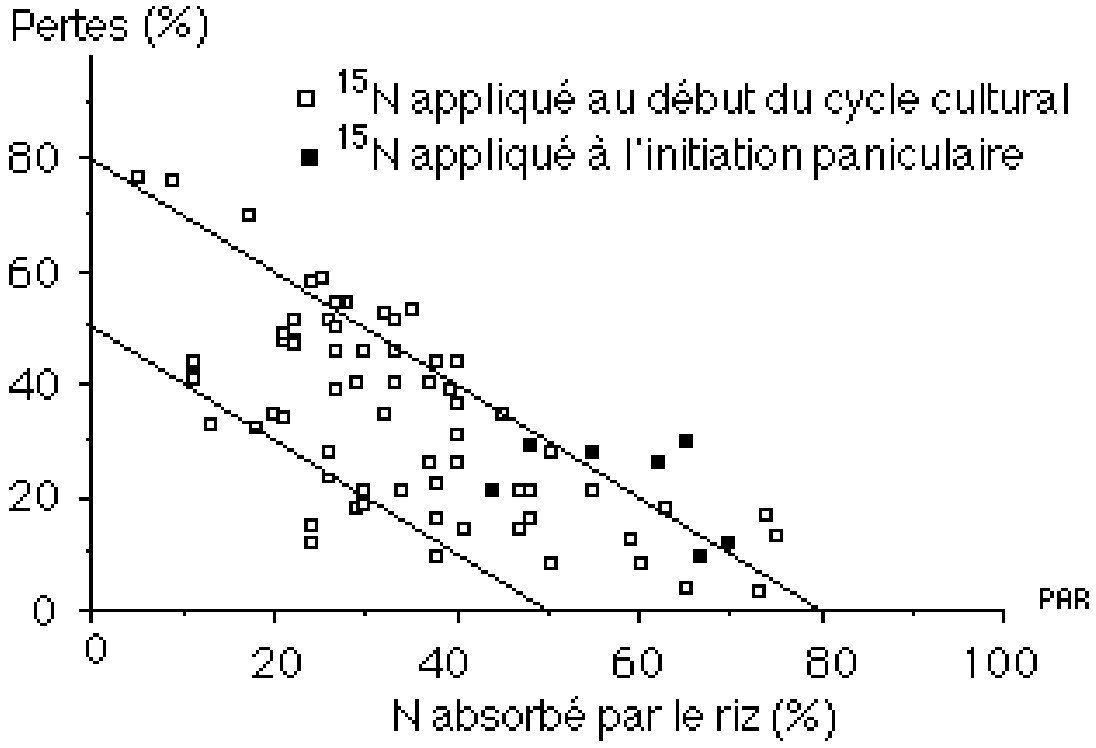


Fig. 11.9. Importance des pertes de l'engrais azoté épandu dans l'eau des rizières

11.3.4.3. Fixation par les argiles

L'ammonium fixé entre les feuillets d'argile, devient inaccessible pour l'assimilation ou la nitrification. Au contraire, l'ammonium adsorbé à la surface de l'argile est nitrifié plus activement que l'ammonium de la solution du sol.

11.3.4.4. Immobilisation sous forme organique

L'ammonium peut être combiné sous forme organique dans les noyaux aromatiques précurseurs des substances humiques. L'azote ainsi fixé, par exemple sur la lignine, est beaucoup moins assimilable par les plantes ou les microorganismes. Cet effet est utilisé pour préparer la N-lignine, un engrais "retard" qui permet une libération progressive de l'azote, liée à la dégradation de la matière organique dans laquelle il est fixé.

11.4. NITRIFICATION

La nitrification, c'est-a-dire l'oxydation de l'ammonium en nitrate, est réalisée en deux étapes par deux groupes distincts de bactéries autotrophes qui utilisent le CO2 comme seule source de carbone et respectivement l'ammoniaque et le nitrite comme source d'énergie.
L'intervention des hétérotrophes, et en particulier des champignons, est certaine mais il est difficile d'établir leur rôle quantitatif dans le sol.

$$NH_4^+ \xrightarrow{1} NH_2OH \xrightarrow{1} NO_2^- \xrightarrow{2} NO_3^-$$

1: nitrosation 2: nitratation

11.4.1. Oxydation de l'ammonium en nitrite: nitrosation

La taxonomie des espèces oxydant l'ammonium est encore controversée, certains caractères
morphologiques n'étant observables que dans des conditions particulières de culture. On distingue principalement les genres *Nitrosomonas, Nitrosocystis, Nitrosococcus, Nitrosospira et Nitrosolobus* qui ont été isolés du sol comme des eaux douces et marines. De façon schématique, le premier intermédiaire de l'oxydation est l'hydroxylamine, qui est ensuite oxydée en nitrite sans qu'un composé intermédiaire avant le nitrite ait été mis en évidence de façon certaine :

11.4.2. Oxydation du nitrite en nitrate: nitratation

Le principal germe responsable est *Nitrobacter*, mais d'autres genres ont été également décrits (*Nitrospira* , *Nitrococcus*). Ces bactéries sont aérobies strictes et hétérotrophes facultatives, mais la croissance sur carbone organique est plus lente que sur CO2. Ces microorganismes sont difficiles à isoler et nécessitent l'utilisation de cultures d'enrichissement. On ne connaît donc que peu d'espèces de bactéries oxydant le nitrite dans le sol.

11.4.3. La nitrification dans le sol

Les germes nitrifiants ne sont jamais très abondants dans le sol, ce qui est probablement dû à leur faible taux de croissance et à leur exigence pour des quantités importantes d'ammonium ou de nitrite comme source d'énergie. Ils sont alors peu compétitifs par rapport à la microflore hétérotrophe contingente qui, bien que moins active, peut jouer un certain rôle dans la nitrification dans le sol.
Les conditions optimales pour l'activité et la croissance des bactéries nitrifiantes sont aussi celles qui favorisent la croissance des plantes: bonne aération, pH voisin de la neutralité, apports d'azote: il a donc été envisagé d'utiliser comme indice de fertilité le nombre de bactéries nitrifiantes du sol.
En culture pure, le pH optimum est voisin de 7, mais la nitrification est encore active dans un sol à pH 5, en raison de l'hétérogénéité du milieu : *in situ*, certaines microniches dans les aggrégats peuvent avoir un pH plus élevé que le pH moyen mesuré sur la pâte. Aux pH alcalins, l'oxydation du nitrite est proportionnellement plus ralentie que l'oxydation de l'ammonium, ce qui peut entraîner une accumulation de nitrite très toxique pour les plantes.
Les bactéries nitrifiantes sont aérobies strictes, la nitrification se produit donc surtout dans les sols bien aérés. En rizière submergée, l'oxygène dégagé par photosynthèse des algues ou excrété dans la rhizosphère du riz permet une nitrification des engrais ammoniacaux, donc une perte eventuelle d'azote par lessivage ou dénitrification (Fig 11.10).

11.4.4. Devenir du nitrate dans le sol

Comme pour l'ammonium, une fraction du nitrate produit par nitrification est réutilisée par la microflore pour ses synthèses ou absorbée par les racines des plantes. Mais l'azote sous forme nitrique est également exporté par deux autres processus. Le nitrate est facilement lessivé hors du sol, alors que l'ammonium est plus adsorbé sur les argiles donc retenu dans le sol. Egalement, si des conditions anaérobies succèdent aux conditionc aérobies favorables à la nitrification, et dans certaines microniches anaérobies d'un sol bien aéré, la réduction du nitrate en azote gazeux par dénitrification provoque une perte d'azote nitrique. En conséquence, il a été envisagé de limiter ces pertes d'azote en inhibant la nitrification par des inhibiteurs spécifiques. Mais l'utilisation d'inhibiteurs dans le sol est souvent décevante, les composés efficaces étant plus ou moins rapidement dégradés par la microflore.

11.5. DENITRIFICATION

Découverte à la fin du siècle dernier, la dénitrification est un processus respiratoire anaérobie. Le nitrate (ou d'autres composés oxygénés minéraux de l'azote) est utilisé comme accepteur final d'électrons en remplacement de l'oxygène, pour l'oxydation de composés carbonés. Les composés oxygénés de l'azote étant réduits finalement en gaz (N2O ou N2), la dénitrification aboutit à une perte de l'azote présent initialement sous forme nitrique ou apporté par les engrais. De très nombreux travaux ont été effectués pour mettre en évidence les étapes intermédiaires de la dénitrification et pour préciser l'influence de certains paramètres physico-chimiques sur le processus dans le sol.

11.5.1. Etapes intermédiaires et germes responsables

Les études enzymologiques sur plusieurs genres bactériens ont montré que le nitrate est réduit en azote en plusieurs étapes :

NO3- -> NO2- -> NO -> N2O -> N2

Chez les bactéries aérobies, la dénitrification est une voie respiratoire alternative qui permet éventuellement en l'absence d'oxygène, de transférer les électrons au nitrate (ou aux autres composés intermédiaires). Cependant, en présence d'oxygène (et même si le nitrate est lui aussi présent), la respiration se fait uniquement au dépens de l'oxygène, les enzymes de la dénitrification étant réprimés par l'oxygène, bien que l'on ait démontré tout récemment l'existence de bactéries capables de dénitrifier en présence d'air. Quelques souches anaérobies facultatives fermentaires appartenant au genre *Bacillus* ont été décrites comme dénitrifiante.

11.5.1.1. Réduction du nitrate

La réduction dissimilatrice du nitrate (par opposition à la réduction assimilatrice de ce composé) est une propriété commune à de nombreuses espèces de bactéries appartenant à divers groupes de la classification (Tableau 11.12). Seul un petit nombre conduit la réduction du nitrate jusqu'au stade de l'azote, les autres nitrato-réducteurs accumulant le nitrite dans le milieu.

L'enzyme responsable est la nitrate-réductase. On en connaît actuellement 5 types:

• Nitrate-réductase A; elle est particulaire et utilise le chlorate comme substrat.

• Nitrate-réductase B; elle est soluble, n'utilise pas le chlorate et est inhibée par ce composé.

• Chlorate-réductase C; elle n'utilise pas le nitrate.

• Nitrate-réductase D; c'est celle que l'on rencontre dans les mitochondries des eucaryotes. Elle présente les mêmes caractéristiques que l'enzyme A.

• Nitrate-réductase E; elle est particulaire, n'utilise pas le chlorate, mais n'est pas inhibée par ce composé.

Les méthodes de dosage enzymatique utilisent soit la réaction colorimétrique de GRIESS pour doser l'apparition du nitrite, soit la méthode manométrique de PICHINOTY en respiromètre de WARBURG, qui met en jeu une consommation d'hydrogène par une hydrogénasse exogène via le benzyl-viologène comme transporteur exogène d'électrons.

Tableau 11.12. Genres de bactéries contenant des souches rapportées comme nitrato-réductrices

Actinobacillus	*Escherichia*	*Peptococcus*
Actinomyces	*Eubacterium*	*Photobacterium*
Aeromonas	*Flavobacterium*	*Planobispora*
Agrobacterium	*Fusobacterium*	*Planomonospora*
Alcaligenes	*Geodermatophilus*	*Plesiomonas*
Arachnia	*Haemophilus*	*Propionibacterium*
Arthobacter	*Halobacterium*	*Proteus*
Bacilllus	*Halococcus*	*Pseudomonas*
Bacterionema	*Hyphomicrobium*	*Rhizobium*
Bacteroides	*Hyphomonas*	*Rothia*
Beneckea	*Klebsiella*	*Salmonella*
Bortetella	*Lactobacillus*	*Selenomonas*
Branhamella	*Leptothrix*	*Serratia*
Brucella	*Listeria*	*Shigella*
Campylobacter	*Lucibacterium*	*Simonsiella*
Cellulomonas	*Microbispora*	*Spirillum*
Chromobacterium	*Micrococcus*	*Sporosarcina*
Citrobacter	*Micromonospora*	*Streptomyces*
Clostridium	*Moraxella*	*Streptosporangium*
Corynebacterium	*Mycooacterium*	*Thiobacillus*
Cytophaga	*Neisseria*	*Thiomicrospira*
Dactylosporangium	*Nocardia*	*Veillonella*
Enterobacter	*Paracoccus*	*Vibrio*
Erwinia	*Pasteurella*	

11.5.1.2. Réduction du nitrite, de l'oxyde nitrique et de 1'oxyde nitreux

Seules les bactéries dénitrifiantes possèdent l'équipement enzymatique complet pour réduire le nitrate en azote, mettant en jeu une nitrite-réductase, une oxyde nitrique-réductase et une oxyde nitreux réductase.

Cependant, par la méthode des cultures d'enrichissement, on a pu isoler des espèces incapables de réduire le nitrate, mais réduisant le nitrite et/ou le NO et le N2O en azote, ne réalisant donc que certaines des étapes intermédiaires de la dénitrification. Il existe donc certains microorganismes qui ne possèdent que quelques-unes des enzymes de la dénitrification.

11.5.2. Dénitrification dans le sol

L'ensemble des dénitrifiantes présentes dans le sol peut ainsi mener à son terme la réduction en azote du nitrate, certains groupes étant spécialisés dans une ou plusieurs étapes du processus. Le traitement par taxonomie numérique des résultats d'isolements de souches réduisant le nitrate dans les sols a permis de mieux se rendre compte de l'importance de certaines espèces parmi la grande variété de microorganismes susceptibles de participer au processus dans le sol (Tableau 11.13).

Plusieurs espèces dénitrifiantes du genre *Pseudomonas* semblent particulièrement abondantes, mais on note également une variété de bactéries Gram-négatives, mobiles comme certaines autotrophes strictes du genre *Alcaligenes*. Dans la plupart des sols, on trouve 10 fois plus de bactéries réduisant le nitrate en nitrite que de dénitrifiants vrais, réduisant le nitrate en N2. Il existe une corrélation positive entre la température optimale de croissance des isolats dénitrifiants et la température moyenne de leur habitat.

L'activité dénitrifiante du sol dépend essentiellement des facteurs physico-chimiques, en particulier de la tension d'oxygène, du degré d'humidité et de la teneur en carbone organique. A pH 5,1, la

dénitrification ne se produit qu'en dessous de Eh 338 mV.

Les sols submergés tels que ceux des rizières, constituent donc un milieu favorable à la dénitrification. Les nitrates formés par nitrification des engrais ammoniacaux dans la zone aérobie de surface, en contact avec l'eau de submersion et qui reste oxydée par suite de la production d'oxygène par les phototrophes, diffusent en profondeur où ils peuvent être réduits par la microflore dénitrifiante

(Fig.11.9). La succession submersion-assèchement crée également des conditions favorables à la dénitrification (Fig. 11.10) La perte d'azote peut être de 20 à 50 % de l'engrais épandu.

Tableau 11.13. Organismes capables de dénitrification

A.Phototrophic bacteria	
1. *Rhodopseudomonas sphaeroides* (Satoh et al., 1976)	Denitrification is strain-dependent; also capable of N_2 fixation
B. Gliding bacteria	
2. *Cytophaga johnsonae* (Stanier, 1947)	Denitrification is strain-dependent-
3. *Lysobacter antibioticus* (Christensen and Cook, 1978)	of 16 strains studied, 4 reduce NO to NO_2^-; of these, one reduces NO2- to a gaseous product
4. *Simonsiella muelleri* (Kuhn and Gregory, 1978)	Of 18 strains studied, 9 reduce NO_3; of these, 4 reduce NO_2^- with or without production of visible gas
C. Budding bacteria	
5. *Hypomicrobium* spp. (Hirsh, 1974)	Denitrifies as a methylotroph
D.Spiral and curved bacteria	
6. *Aquaspirillum itersonii* (Krieg and Hylemon, 1976)	Produces N_2O as an end product of denitrification
7. *Aquaspirillum psychrophilum* (Krieg and Hylemon,1976)	Produces visible gas as an end product of denitrification
8. *Aquaspirillum dispar* (Krieg and Hylemon, 1976)	Does not produce gas as an end product of denitrification
9. *Azospirillum lipoferum* (Neyra et al., 1977)	Denitrification is strain-dependent; some strains produce N_2O as an end product of denitrification; capable of nitrogen fixation
10. *Campylobacter sputorum* (Loeshe et al., 1965)	
E0. Gram-negative bacteria	
11. *Pseudomonas aeruginosa* (Stanier et al., 1966)	
12. *Pseudomonas fluorescens* (Stanier et al., 1966)	Some strains produce N_2O as the end product of denitrification
13. *Pseudomonas chlororaphis* (Stanier et al., 1966)	Some strains produce N_2 as the end product of denitrification
14. *Pseudomonas aureofaciens* (Palleroni and Doudoroff, 1972)	
15. *Pseudomonas stutzeri* (Stanier et al., 1966)	Some strains grown on N_2O as electron acceptor
16. *Pseudomonas mendocina* (Palleroni et al., 1970)	
17. *Pseudomonas mallei* (Stanier et al.,1966)	An animal pathogen
18. *Pseudomonas pseudomallei* (Stanier et al.,1966)	An animal pathogen
19. *Pseudomonas caryophylli* (Palleroni et al.,1970)	A plant pathogen
20. *Pseudomonas lemoignei* (Pichinoty et al.,1977a)	
21. *Pseudomonas solanacearum* (Palleroni et al.,1970)	A plant pathogen
22. *Pseudomonas pickettii* (Ralston et al., 1973)	Some strains grow on N_2O as electron acceptor (Garcia et al., 1977)
23. *Pseudomonas pseudoflaua* (Auling et al., 1978)	A facultative chemolithotroph (hydrogen bacterium)
24. *Pseudomonas denitrificans* (Doudoroff et al., 1974)	
25. *Pseudomonas perfectomarinus* (Zobell and Upham, 1944)	A marine bacterium
26. *Pseudomonas nautica* (Baumann et al., 1972)	A marine bacterium
27. *Gluconobacter* spp. (Focht and Joseph, 1974)	
28. *Alcaligenes faecalis* (Hendrie et al., 1974)	Some strains reduced NO_2- to gas but are unable to reduce NO_3- to NO~ (Youatt, 1954; Chatelain, 1964)
29. *Alcaligenes eutrophus* (Davis et al., 1969)	A facultative chemolithotroph (H_2 bacterium)
30. *Agrobacterium tumefaciens* (Pichinoty et al., 1977a)	A plant pathogen—some strains grow on N_2O as electron acceptor
31. *Agrobacterium radiobacter* (Pichinoty et al., 1977a)	Some strains grow on N_2O as electron acceptor
E1. Gram-negative facultatively anaerobic bacteria	
32. *Chromobacterium uiolaceum* (Sneath, 1956)	Visible gas usually not produced from NO_2 or NO_2^- (Buchanan and Gibbons, 1974)
33. *Chromobacterium lividum* (Sneath, 1956)	Visible gas usually not produced from NO_2 or NO_2^- (Buchanan and Gibbons, 1974)
34. *Flavobacterium* spp. (Pichinoty et al., 1976a)	Some strains unable to reduce

E2. Gram-negative cocci and coccobacilli

35. *Neisseria sicca* (Berger, 1961)	Able to reduce NO_2^- but not NO_3^-
36. *Neisseria subflava* (Berger, 1961)	Able to reduce NO_2^- but not NO_3^-
37. *Neisseria flavescens* (Berger, 1961)	Able to reduce NO_2^- but not NO_3^-
38. *Neisseria mucosa* (Véron et al., 1959)	Able to reduce NO_2^- and NO_3^-
39. *Neisseria animalis* (Berger, 1961)	Nitrate reduction is strain-dependent
40. *Neisseria cauie* (Berger, 1961)	Nitrate reduction is strain-dependent; visible gas usually not produced
41. *Neisseria denitrificans* (Berger, 1962)	Reduces NO_2^- but not NO_3^-
42. *Branhamella catarrhalis* (Berger, 1961)	Nitrate reduction is strain-dependent; may or may not produce visible gas
43. *Acinetobacter* spp. (Focht and Joseph, 1974)	
44. *Kingella denitrificans* (Snell and Lapage, 1976)	
45. *Paracoccus denitrificans* (Verhoeven et al., 1954)	N_20 and N_2 produced from nitrate (Buchanan and Gibbons, 1974) ; a facultative chemolithotroph (H_2 bacterium)
46. *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson & Gibbons,1952)	N_20 and N_2 produced from nitrate (Buchanan and Gibbons , 1974)

E3.Gram-negative chemolithotrophic sulfur bacteria

47. *Thiobacillus denitrificans*	Some strains reduce NO and N_2O to N_2 (Hutchison et al., 1967) (Baldensperger and Garcia, 1976)
48. *Thiomicrospira denitrificans*	Does not grow aerobically; apparently an (Timmer-Ten Hoor, 1975) obligate denitrifier
49. *Thermothrix thioparus* (Caldwell et al., 1976)	No visible gas produced from NO_3 but reduced NO_2, a thermophilic facultative chemolithotroph

F1. Gram-positive spore-forming bacteria

60. *Bacillus licheniformis* (Verhoeven, 1952)	
61. *Bacillus cereus* (Hackenthal, 1966)	
62. *Bacillus polymyxa* (de Barjac and Bonnefoi, 1972)	
53. *Bacillus macerans* (de Barjac and Bonnefoi, 1972)	
64. *Bacillus stearothermophilus* (Wolf and Barker, 1968; Garcia, 1977b)	
66. *Bacillus laterosporus* (de Barjac and Bonnefoi, 1972)	
66. *Bacillus pasteurii* (de Barjac and Bonnefoi, 1972)	
67. *Bacillus pantothenticus* (de Barjac and Bonnefoi, 1972)	
68. *Bacillus pulvifaciens* (de Barjac and Bonnefoi, 1972)	
59. *Bacillus nitrollens* (Delaporte, 1972)	
60. *Bacillus azotoformans* (Pichinoty et al., 1976b)	Isolated by N_2O enrichment
61. *Bacillus* sp. (Pichinoty et al. 1977)	NO_2^- tolerant bacteria

F2. Gram-positive non-spore-forming bacteria

62. *Corynebacterium nephridii* (Hart et al., 1965)	Only one strain known; produces N_20 as end product
63. *Propionibacterium acidi-propionici* (van Gent-Ruijters et al., 1975)	Denitrification is strain-dependent

G. Others

64. *Halobacterium* sp. (Werber and Mevarech, 1978)

La teneur en carbone organique détermine le taux maximum de dénitrification lorsque les composés oxygénés de l'azote ne sont pas limitants. Une correlation positive entre l'activité dénitrifiante potentielle et la teneur en matière organique du sol a pu être mise en évidence.
Le pH agit moins sur cette activité que sur l'accumulation des composés intermédiaires. Par exemple, le nitrite ne s'accumule pas en sol acide, où l'on note plutôt l'accumulation d'oxyde nitrique et d'oxyde nitreux. L'azote est le produit final majeur à la neutralité.
Enfin la dénitrification est moins active dans les sols salés.

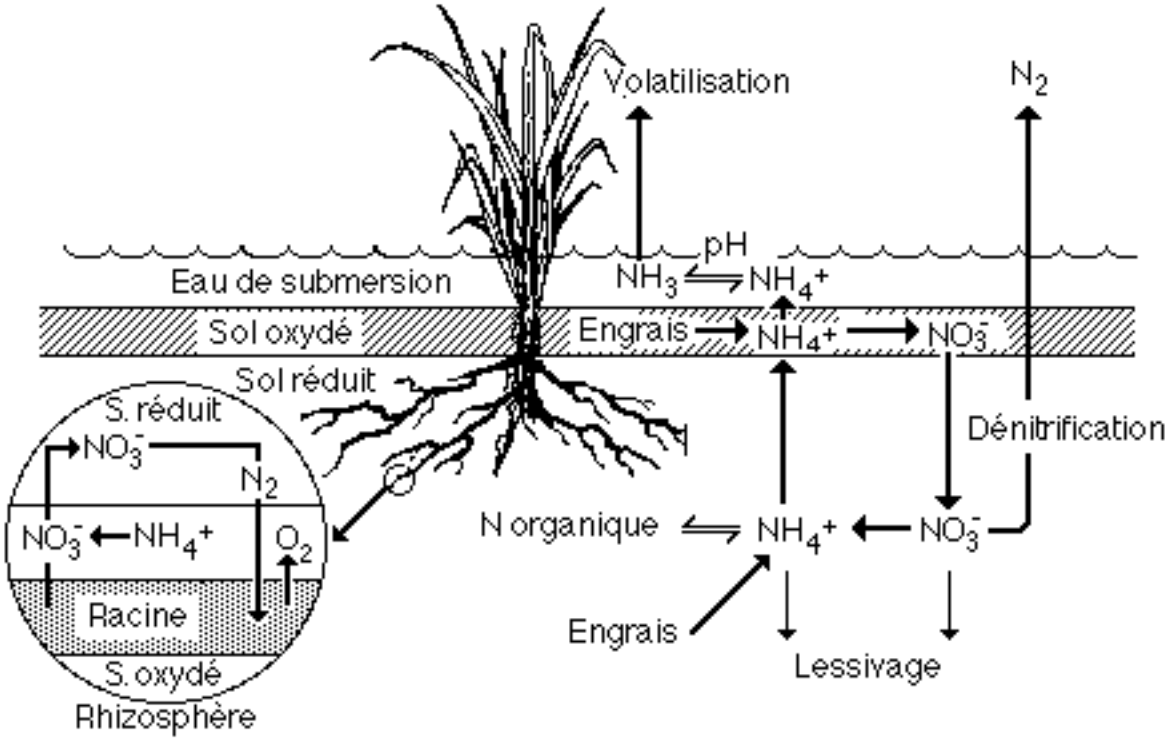


Fig. 11. 10. Pertes d'azote par volatilisation de l'ammoniac, dénitrification et lessivage dans les rizières submergées

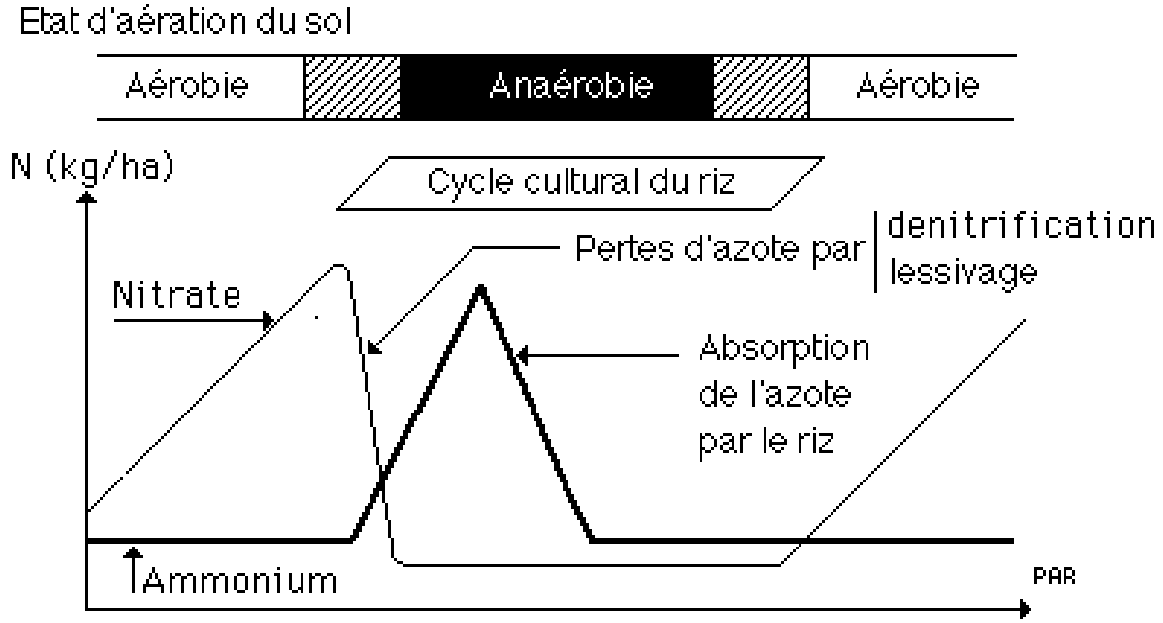


Fig. 11. 11. Pertes d'azote au moment de la remise en eau des sols de rizière

11.5.3. Effet rhizosphère sur la dénitrification

Dans le cas des sols inondés comme les rizières, les racines du riz exsudent de l'oxygène et de nombreux composés carbonés. L'activité dénitrifiante est alors en relation quantitative avec l'exsudation racinaire, l'effet rhizosphère étant d'autant plus marqué que le sol est plus pauvre en matière organique.

Dans la rhizosphère du riz, les zones anaérobies où l'activité dénitrifiante se manifeste avec une plus grande intensité que dans le sol non planté, sont situées

dans la partie externe de la rhizosphère (Fig.11.10).

Dans le cas des sols exondés, les racines des plantes comme le blé consomment avidemment l'oxygène. Les zones anaérobies, siège de la dénitrification, sont donc situées directement au contact des racines dans la rhizosphère proche.

On a cherché à réduire les pertes d'azote soit en inhibant la dénitrification (par des pesticides) soit en enfouissant l'engrais en profondeur : l'azote ammoniacal est alors moins nitrifié, et l'azote nitrique éventuellement produit peut être immobilisé sous forme organique sans être réduit en azote.

Cependant la microflore dénitrifiante de la rhizosphère peut avoir une action détoxifiante favorable pour le riz. Certains acides organiques toxiques produits par décomposition de la matière végétale peuvent être oxydés par respiration du nitrate même dans des conditions réductrices.

11.5.4. Réduction dissimilatrice du nitrate en NH4+

On ne connait, actuellement, que peu de bactéries capables de réaliser cette voie de réduction des nitrates. Ce sont essentiellement des bactéries anaérobies facultatives (*Escherichia coli*), anaérobies strictes (espèces du genre *Clostridium*, *Veillonella alcalescens* et *Propionibacterium pentosaceum*) ou aérobies (*Achromobacter fischeri*).

La fonction primaire de cette réaction n'est pas l'assimilation de l'azote du nitrate, du moins dans le cas des bactéries anaérobies facultatives. Plusieurs fonctions alternatives ont été proposées comme la détoxification et l'utilisation du nitrite comme accepteur accessoire d'électrons. On n'a pas encore d'indication concernant la production éventuelle d'ATP pendant cette réduction dissimilatrice qui apparait n'avoir qu'une incidence très faible sur l'environnement.

12. LE CYCLE DU SOUFRE

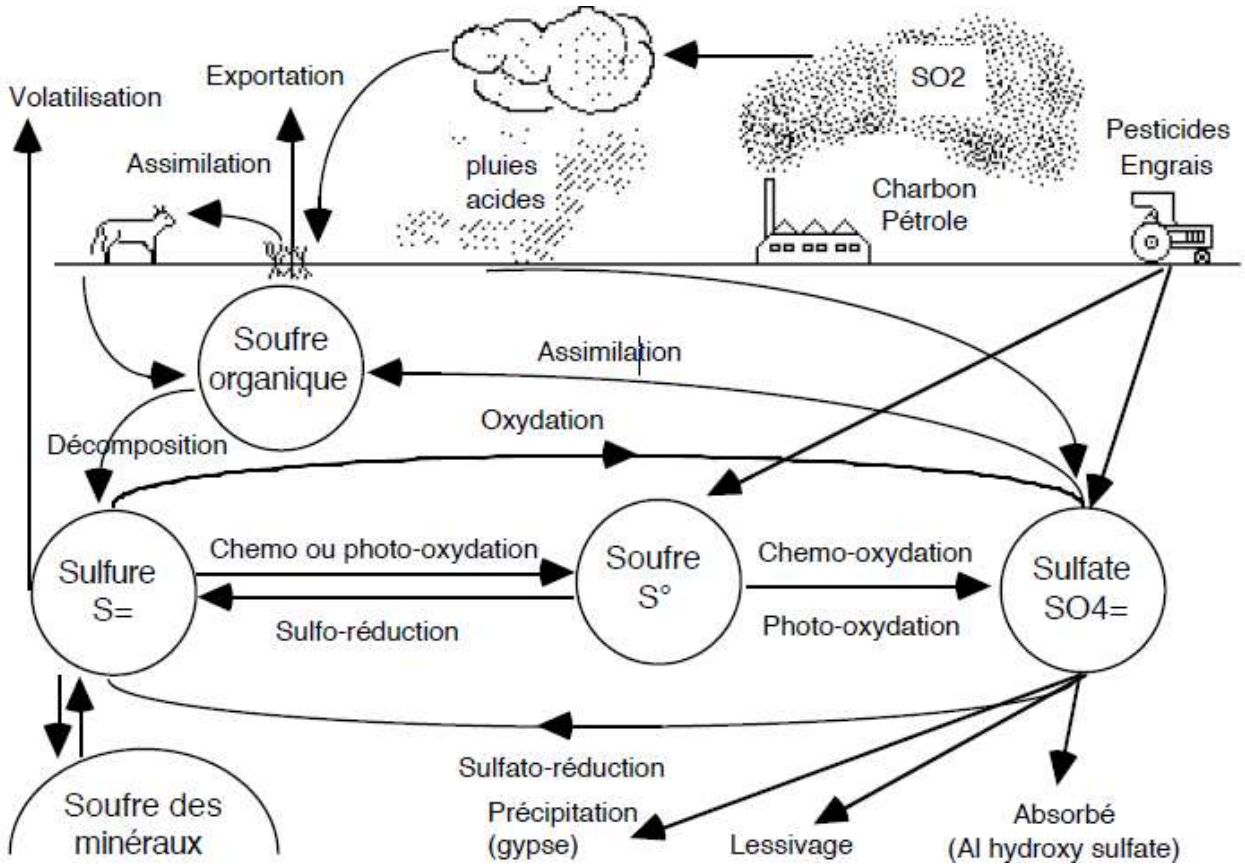


Fig.12 1. Cycle du soufre

12.1. Généralités

Le soufre existe dans la biosphère sous plusieurs états d'oxydation, depuis le soufre hexavalent oxydé +6 (dans H2S04 et ses dérivés) jusqu'au soufre réduit -2 (dans H2S, HS-, S= et les sulfures métalliques).On estime que la croûte terrestre contient en moyenne 0.06 % de soufre, mais sa distribution dans le sol est très variable, sa concentration pouvant varier de moins de 0,01%, dans des sols carencés, à plus de 0,3 % dans certains sols formés sur alluvions fluviomarines (mangroves). Il existe près de 2000 minéraux soufrés inorganiques. Le soufre est principalement présent dans les sols sous forme organique (acides aminés, polysaccharides soufrés, ester sulfates), une faible fraction seulement étant sous forme minérale (sulfate, soufre élémentaire ou sulfure). Dans les organismes vivants, le soufre est présent sous forme réduite dans des composés organiques essentiels tels que les protéines contenant des acides aminés soufrés (cystéine, cystine, méthionine), des coenzymes (coenzyme A, acide lipoïque, biotine, thiamine) ou certains métabolites (par exemple le glutathion, C1O H16 N3 O6 SH, et la glutamyl-cystéinyl-glycine). Il se trouve également sous forme oxydée (ester sulfates) dans des composés ayant un rôle structural tels que les polysaccharides sulfatés des parois cellulaires des algues. L'ensemble des processus métaboliques par lesquels ces différentes formes peuvent être interconverties constitue le cycle biologique du soufre. L'importance relative des flux de l'élément soufre dans le cycle global et le cycle biologique est conditionnée par

- l'état chimique des intermédiaires, c'est-à-dire la valence du soufre dans les différents composés et
- l'état physique des composés, qui détermine leur distribution entre phases solide, liquide et gazeuse.

Le cycle biologique est dépendant de l'aérobiose ou anaérobiose du biotope.

Le cycle du soufre (Fig. 12.1) présente des analogies avec celui de l'azote, toutefois une différence importante est le caractère autooxydable de la forme réduite S2- en présence d'oxygène ou d'ions métalliques, surtout en conditions acides. Du point de vue physique, tous les composés gazeux du cycle du soufre sont très solubles, ce qui limite leur concentration dans la phase gazeuse. Comme dans le cas du phosphore, les organismes vivants utilisent principalement le soufre à l'état dissous. Il n'en est pas de même pour les autres éléments majeurs (oxygène, carbone, azote) pour lesquels des composés gazeux peu solubles sont disponibles dans l'atmosphère pour les synthèses des organismes vivants. Comme pour les autres éléments, le microbiologiste du sol ne doit pas limiter son étude aux mécanismes des transformations microbiennes du soufre dans le sol, mais également considérer l'équilibre entre les différents processus. Suivant les conditions du milieu, certains intermédiaires du cycle peuvent s'accumuler, ce qui peut avoir des conséquences importantes sur l'écosystème sol-plante.

12.2. LE CYCLE GLOBAL DU SOUFRE DANS LA BIOSPHERE

Les différents flux de soufre entre les roches, les sols et les eaux continentales et marines sont estimés dans la Figure 12.2 en Tg an-1 (tera = 1012) c'est-à-dire en tonnes.106 an-1. Pour chaque flux est indiqué ce qui est imputable à l'activité humaine, principalement industrielle.

On constate que plusieurs de ces transferts ont été largement augmentés par l'activité anthropique et qu'ils se traduisent par une augmentation sensible de la concentration du soufre dans l'atmosphère. Les rendements agricoles élevés obtenus dans les régions industrielles à agriculture intensive sont probablement partiellement dus aux retours au sol du soufre émis par l'industrie, qui ont augmenté de 240 % depuis l'ère industrielle. Une diminution de ces émissions pourrait entraîner une carence en soufre dans les sols cultivés.

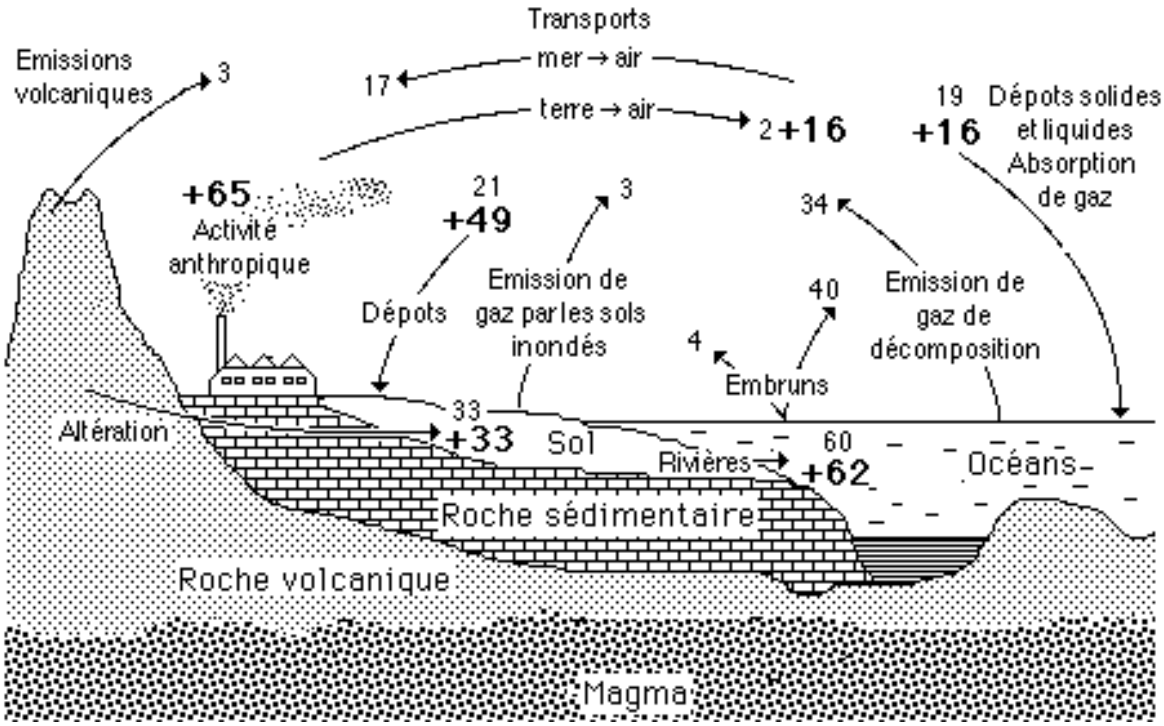


Fig. 12.2. Cycle global du soufre dans la biosphère

Estimations en Tg (millions de tonnes) par an.

Petits caractères: estimation du flux avant que l'activité anthropique n'ait une influence mesurable.

Caractères gras: estimation de l'augmentation de flux due à l'activité anthropique.

La balance du cycle global dans la pédosphère n'est possible que par le retour au sol de composés volatils réduits formés dans les zones océaniques, marines ou d'estuaires. En raison de la solubilité de ces composés, seule une faible partie de cette production (estimée à 840 T g an-1 pour les seules zones d'estuaires) retourne dans l'atmospère puis au sol, mais cette production d'origine microbienne est indispensable pour équilibrer le cycle global. En zône d'estuaire où les ions sulfate sont présents (2,7 g de SO42- par litre d'eau de mer), le facteur limitant la production de sulfure est l'apport de matière organique facilement décomposable. La pollution organique des zônes d'estuaires due à l'activité humaine peut avoir augmenté cette production de façon sensible.

Certains mécanismes du cycle biologique du soufre ont par conséquent une grande importance dans la balance du cycle global de cet élément dans la biosphère.

12.3. ASSIMILATION DU SULFATE

Les animaux peuvent trouver dans leur alimentation des composés réduits du soufre pour satisfaire leurs besoins en soufre héxavalent, car ils ont la possibilité d'oxyder les thiols organiques tels que la cystéine, en sulfate. Cependant ils sont incapables de réduire en thiols les sulfates, et généralement également incapables de synthétiser le squelette carboné de la méthionine. Ils dépendent donc d'un apport de soufre sous forme réduite pour leur croissance. Cet apport est obtenu par l'ingestion d'autres animaux et donc finalement des plantes et microorganismes qui sont seuls capables de réduire le sulfate en sulfure et d'incorporer le soufre ainsi réduit dans des composés organiques. La synthèse des thiols à partir du sulfate, c'est-à-dire l'assimilation du sulfate, est régulée dans les plantes et les microorganismes de telle sorte que ni le sulfure ni les thiols ne sont produits en excès et libérés dans le milieu. Le soufre alors combiné sous forme organique sera ensuite libéré à la mort de la cellule avant d'être repris dans le cycle biologique.

12.3.1. Incorporation du sulfate dans la cellule

A en juger par les carences en soufre parfois observées chez les plantes, il semble que les formes organiques qui prédominent dans le sol ne soient pas directement utilisables par les végétaux. Le soufre présent sous ces formes organiques doit donc être préalablement converti en sulfate ou en composés simples comme la cystéine ou la méthionine.

Dans le cas des microorganismes, l'absorption active du sulfate a été démontrée pour les bactéries, les algues et les champignons. Ces systèmes de transport actif du sulfate de la solution vers l'intérieur de la cellule sont sensibles à la température et fortement inhibés par le thiosulfate, le sulfite et, en général, par tout composé de forme XO42- comme par exemple Cr XO42-. Bien qu'aucune étude n'ait été faite sur cette question, on peut donc concevoir qu'il existe dans la rhizosphère une compétition pour la nutrition en sulfate entre la plante et la microflore, responsable de certaines carences.

12.3.2. Mécanismes enzymatiques de l'assimilation du sulfate

12.3.2.1. Activation par l'ATP

L'étape initiale commune aux plantes et aux microorganismes est la réaction avec l'ATP, catalysée par l'ATP sulfurylase

(1) ATP4- + SO42- + H+ <=> APS2- + PPi3- E°' = -0,06 V

L'importance de cette première étape réside dans le fait que les agents réducteurs physiologiques (par exemple le NADPH, E0' = - 0,32V) sont trop électropositifs pour réduire le sulfate lui-même

(2) SO42- + 2H+ + 2e- <=> S032- + H20 E°' = -0,48 V

12.3.2.2. Réduction de l'APS

Le devenir de l'APS ainsi formé est variable suivant les organismes. La partie sulfonate peut être transférée à un transporteur physiologique puis réduite en sulfite chez les algues et les végétaux.

Chez les bactéries, l'APS réagit avec une autre molécule d'ATP pour former la phosphoadénosine phosphosulfate (PAPS) qui peut alors être réduite en sulfite par les réducteurs physiologiques (NADPH). De nombreux thiols peuvent également servir de donateurs d'électrons pour la réduction du PAPS en sulfite.

12.3.2.3. Réduction du sulfite

Chez tous les organismes assimilant le sulfate, la réduction du sulfite en sulfure qui met en jeu 6 électrons est catalysée par des sulfite-réductases en présence de donateurs d'électrons convenables sans formation de composé intermédiaire.

Il est intéressant de noter que toutes ces sulfite-réductases assimilatrices peuvent aussi catalyser la réduction du nitrite en ammonium, ce qui correspond également à un transfert de 6 électrons :

SO32- + 6 e- + 8 H+ <=> H2S + 3 H2O

NO2- + 6 e- + 7 H+ <=> NH3 + 2 H2O

bien que ces activités soient physiologiquement distinctes *in vivo*.

12.4. INCORPORATION DU SOUFRE ORGANIQUE DANS LA FRACTION ORGANIQUE DU SOL

Quand les résidus des plantes, des animaux ou des microorganismes morts retournent au sol et sont dégradés par la microflore, une partie seulement du soufre organique de ces résidus est minéralisée jusqu'au stade sulfure ou sulfate (voir plus loin § 5), la plus grande partie restant sous forme organique, soit en tant que fraction libre soit combinée à l'humus.

La concentration du soufre organique libre dans le sol est généralement faible: on ne trouve dans le sol non planté que très peu d'acides aminés soufrés, parfois légèrement plus dans le sol rhizosphérique. Cette différence semble due à l'excrétion par les racines: on sait en effet que les exsudats racinaires contiennent des sucres,

des acides aliphatiques et des acides aminés (pour le riz, on a mesuré une excrétion de 0,1 µ g de cystéine jour-1 plante-1). Mais ces composés organiques soufrés simples sont rapidement minéralisés par les microorganismes du sol (voir § 5) et ne s'y accumulent pas. On retrouve au contraire une importante fraction du soufre des résidus sous forme de sulfates organiques, tels que phénol sulfate, choline sulfate, ester sulfates de carbohydrates ou de lipides. Une autre fraction semble être directement liée au carbone: dans un sol canadien on trouve 58 % du soufre total sous forme de liaison C-S qui se forment surtout par réaction entre les quinones et les thiols. Les composés phénoliques qui sont synthétisés par les microorganismes lors de la décomposition de la lignine sont oxydés en quinones qui réagissent avec les amines pour former des complexes colorés en brun. Les thiols réagissent également avec les sucres réducteurs en donnant les liaisons C-S. La stabilité du soufre organique lié au carbone dans les substances humiques à haut poids moléculaire est alors beaucoup plus grande que celle des composés soufrés simples.

12.5. MINERALISATION DU SOUFRE ORGANIQUE

La conversion du soufre organique en soufre minéral est réalisée par les microorganismes du sol, qui utilisent une fraction du sulfure ou du sulfate produit pour leurs synthèses (voir § 3), le reste étant utilisable par les plantes. Les mécanismes du processus de minéralisation ne sont pas clairement élucidés, mais il semble que de nombreux microorganismes interviennent dans la chaîne des réactions.

Les produits finaux diffèrent suivant les conditions du sol, en particulier les conditions d'oxydoréduction (sol exsondé ou sol submergé).

Par exemple en sol exsondé on a pu reconnaître à partir de la cystéine les étapes suivantes:

cystéine -> cystine -> cystine disulfoxide -> acide cystéine sulfinique -> acide cystéique -> sulfate

En sol submergé la décomposition de la méthionine produit principalement des composés volatils, tels que H2S, méthylmercaptan (CH3 SH) et diméthylsulfure ((CH3)2 S).

Plusieurs facteurs influent sur la libération dans le sol des composés minéraux à partir du soufre organique. En particulier, la richesse relative en soufre de la matière organique semble être importante: si le rapport C/S est inférieur à 200, le sulfate est libéré dans le sol, si ce rapport est supérieur à 400 il n'y a pas de libération de sulfate.

Cette rétention du soufre minéral est également mise en évidence en comparant les rapports N/S dans les résidus avant l'incubation et dans les formes minérales de l'azote et du soufre après l'action des microorganismes; ces rapports sont en général très différents.

On montre également un effet rhizosphère positif sur la minéralisation du soufre organique, mais cet effet n'est pas spécifique et résulte de l'augmentation générale de l'activité microbienne au contact des racines. Comme pour les autres activités biologiques dans le sol, la minéralisation du soufre est influencée par la température et l'humidité.

12.6. RESPIRATION ANAEROBIE DES COMPOSES OXYGENES DU SOUFRE

12.6.1. Réduction dissimilatrice du sulfate (sulfato-réduction)

12. 6.1.1. Les bactéries sulfato-réductrices

Les bactéries sulfato-réductrices se distinguent de tous les autres organismes vivants par leur

capacité à utiliser les composés minéraux du soufre comme accepteurs d'électrons pour l'oxydation des composés carbonés. Le sulfate ou le soufre élémentaire sont

alors réduits en sulfure, dont la plus grande part est excrétée dans le milieu extérieur. Cette respiration du sulfate ou du soufre élémentaire
est particulièrement active dans les biotopes riches en matière organique, tels que le fond des mares, étangs, cours d'eau, dans les sédiments fluvio-marins, les zônes d'estuaire. On estime qu'environ la moitié de la matière organique décomposée dans ces biotopes est oxydée anaérobiquement par sulfatoréduction, avec une forte production de sulfure.

Les deux premiers genres de bactéries sulfatoréductrices à avoir été isolés sont des vibrios
(*Desulfovibrio*) et des bâtonnets sporulés (*Desulfotomaculum*), qui ne peuvent utiliser que quelques composés carbonés en C3 (lactate, CH3CH2COOH; pyruvate, CH3COCOOH) ou l'hydrogène moléculaire comme donneurs d'électrons. Quelques souches peuvent également se développer sans sulfate, les électrons provenant du pyruvate ou du fumarate (COOHCH-CHCOOH) étant utilisés pour réduire les ions H+ avec formation d'hydrogène moléculaire. Dans tous les cas, l'oxydation de ces composés s'arrête à l'acétate (CH3COOH) qui n'est pas dégradé.

Cette limitation du nombre de substrats utilisables par les 2 genres connus de bactéries sulfatoréductrices et leur incapacité à oxyder l'acétate jusqu'au C02 avait conduit les microbiologistes à formuler des hypothèses variées quant aux associations nécessaires entre la respiration du sulfate et d'autres processus de dégradation de la matière organique dans les biotopes réducteurs. Une hypothèses associait la cellulolyse anaérobie produisant des composés en C3 ou C4, les sulfatoréducteurs utilisant ces composés pour former l'acétate; les bactéries sulfo-réductrices (voir 6.2) oxydant anaérobiquement l'acétate en C02, et les bactéries méthanogènes réduisant le CO2 en CH4.

Les études ultérieures ont montré qu'il existe en fait une grande variété de bactéries sulfatoréductrices, qui peuvent oxyder anaérobiquement tous les acides organiques depuis C1 (acide formique) jusqu'à C14 (acide myristique) inclus (Tableau 12.1b). Certaines espèces peuvent également oxyder des composés cycliques (benzoate) ou réaliser la déchloration de composés aromatiques (*Desulfomonile tidjei*). Il est maintenant évident que la respiration du sulfate est un processus métabolique permettant la dégradation d'un grand nombre de composés carbonés jusqu'au stade final du C02.

La diversité des formes (coques, bâtonnets plus ou moins allongés, bactéries filamenteuses) et du Gram, indiquent que les bactéries sulfato-réductrices n'ont pas de parenté phylogénique étroite, la réduction dissimilatrice du sulfate étant, comme la réduction des composés oxygénés de l'azote, partagée par des genres bactériens très éloignés les uns des autres. Le genre *Desulfotomaculum* est classé dans le groupe des *Bacteria* Gram positif à faible GC% tandis que les sulfato-réducteurs
mésophiles non sporulés sont regroupés dans la sous-classe delta des Protobactéries à Gram négatif. Le genre *Thermodesulfobacterium* représente, quant à lui, une lignée des branches basses du domaine des *Bacteria*, distincte des autres lignées de sulfato-réducteurs et des *Archaea* hyperthermophiles du genre *Archeoglobus*.

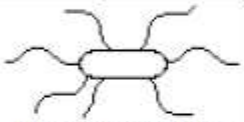
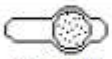
Les tableaux 12. 1a,b résument les caractéristiques morphologiques et nutritionnelles des
bactéries sulfatoréductrices qui sont classées en deux grands groupes:

• Le groupe 1 comprend des homoacétogènes utilisatrices de lactate n'effectuant qu'une
oxydation incomplète de leur substrat en acétate.

• Le groupe 2 comprend les espèces qui effectuent une oxydation complète du

substrat et utilisent des acids gras ou aromatiques. d'autres composés comme les

Tableau 12.1a. Bactéries sulfato-réductrices du premier groupe:homoacétogènes utilisatrices de lactate (s'arrètent à CH3COOH)

Genres		Espèces (exemples)	Donneurs d'électrons et source de carbone			Sulfite - réductase
			Ethanol	Lactate	Acétate	
Desulfovibrio	Utilise H_2+CO_2, éthanol, lactate, pyruvate pour former de l'acétate. Cytochrome c	*africanus* *baculatus* *desulfuricans* *gigas* *salexigens* *thermophilus* *vulgaris*	+ + + + + + +	+ + + + + + +	- - - - - - -	Desulfo-viridine
Desulfobotulus	Décompose les acides gras à longue chaîne	*sapovorans*	+	+	-	?
 *Desulfotomaculum*	 Sporulé Cytochrome b	*nigrificans* *ruminis*	+ -	+ +	- -	P 582
Desulfomicrobium		*apsheronum* *baculatum*	±	+	-	?
Desulfomonile	Peut déchlorer le cycle benzénique. Important pour la dépollution.	*tiedjei*	-	-	-	Desulfo-viridine
Desulfohalobium	Hyperhalophile (150 g/l NaCl)	*retbaense*	+	+	-	Désulfo-rubidine
Thermo-desulfobacterium	Thermophile	*commune* *mobile*	-	+	-	Désulfo-fuscidine

Les autres caractéristiques des bactéries sulfato-réductrices, dont certaines sont utilisées pour la taxonomie des souches, incluent:

La présence de

Cytochromes b,c, c3,

Ferrédoxines I et II,

Flavodoxines, Rubrédoxines, Rubrérythrines ou Ménaquinone (marqueur taxonomique);

La nature des hydrogénases (responsables du processus de transfert interspecifique de H2)

les hydrogénases à [Fe] et à [Ni, Fe] sont périplasmiques, situées sur la paroi cellulaire

les hydrogénases à [Ni, Fe, Se] sont cytoplasmiques, liées à la membrane cytoplasmique.

Tableau 12.1b. Bactéries sulfato-réductrices du deuxième groupe: effectuent une oxydation complète du substrat et utilisent les acides gras

Genres		Espèces (exemples)	Donneurs d'électrons et sources de carbone						Sulfite-réductase
			H_2 CO $_2$	For-mate	Acé-tate	Propi -onate	Ac. gras (n)	Ben-zoate	
Desulfobacter	Flagellation - ou polaire. Cytochrome b,c	*curvatus* *postgatei*	-	-	+	-	2	-	Désulfo-rubidine
Desulfobacterium		*auto-- trophicum* *phenolicum*	±	±	+	±	±	-	?
Desulfococcus	Cytochrome b,c	*biacutus* *multivorans*	-	+	+	+	1-14	+	Desulfo-viridine
Desulfoarculus		*baarsii* *versutus*	-	+	+	+	3-18	-	?
Desulfotomaculum	Représenté également dans le groupe 1 Cytochrome c	*acetoxidans* *sapo-mandens*	-	-	+	-	2,4, 5	-	P 582
Desulfonema	déplacement par glissement Cytochrome b,c	*limicola* *magnum*	+ -	+ -	+ +	+ +	1-12 1-10	- +	Desulfo-viridine P 582
Desulfosarcina		*variabilis*	+	+	+	+	1-14	+	?
Desulfobulbus	Citriforme Flagellation - ou polaire Cytochrome b,c	*elongatus* *propionicus*	-	-	-	+	3	-	Désulfo-rubidine
Archaeoglobus	Archaea	*fulgidus* *profundus*	+	±	±	-	-	-	?

Le tableau 12.1c reporte la liste exhaustive des genres et espèces de sulfato-réducteurs décrites à ce jour et la Figure 12.3 leur répartition phylogénétique.

Tableau 12.1c. Les deux groupes de bactéries sulfato-réductrices

Groupe 1

Desulfovibrio
aespoeensis *indonensis*
acrylicus *inopinatus*
africanus *litoralis*
alcoholivorans *longreachensis*
aminophilus *longus*
burkinensis *oxyclinae*
carbinolicus *piger*
cuneatus *profundus*
desulfuricans *salexigens*
fructosivorans *senezii*
furfuralis *simplex*
gabonensis *sulfodismutans*
giganteus *termitidis*
gigas *vietnamensis*
halophilus *vulgaris*
zosterae

Desulfobotulus
sapovorans

Desulfotomaculum
aeronauticum *nigrificans*
antarticum *orientis*
australicum *putei*
guttoideum *ruminis*
luciae

Desulfomicrobium
apsheronum *escambium*
baculatum *norvegicum*

Desulfomonile
tiedjei

Desulfohalobium
retbaense

Desulfobulbus
Elongatus *marinus*
propionicus

Desulfofustis
glycolicus

Desulfonatronovibrio
hydrogenovorans

Thermodesulfobacterium
commune *mobile*

Thermodesulfovibrio
yellowstonii

Desulfosporosinus *orientis*

Groupe 2

Desulfobacter
curvatus *postgatei*
hydrogenophilus *vibrioformis*
latus

Desulfobacterium
anilini *macestii*
autotrophicum *niacini*
catecholicum *oleovorans*
cetonicum *phenolicum*
indolicum *vacuolatum*

Desulfococcus
biacutus *multivorans*

Desulfoarculus
baarsii

Desulfobacca
acetoxidans

Desulfocapsa
rhabdoformis *sulfoexigens*

Desulfotomaculum
acetoxidans *thermoacetoxidans*
geothermicum *thermobenzoicum*
kuznetsovii *thermosapovorans*
sapomandens

Desulfonema
limicola *magnum*

Desulfosarcina
variabilis

Desulfobacula
toluolica

Desulfacinum
infernum

Desulforhabdus
amnigenus

Desulfocella
halophila

Desulforhopalus
vacuolatus

Desulfocapsa
thiozymogenes

Thermodesulforhabdus *norvegicus*

Archaea

Archaeoglobus
fulgidus
lithotrophicus
profundus

Fig. 12. 3. Répartition phylogénétique des bactéries sulfato-réductrices

Ces bactéries ont longtemps été considérées comme des compétitrices des bactéries méthanogènes, en étant l'une des causes de l'inhibition de la méthanogénèse en présence de sulfate. En effet, cette inhibition peut être levée par l'addition d'H2 ou d'acétate dans le milieu, ce qui suggère que ces deux substrats peuvent être compétitivement utilisés par les deux populations bactériennes. Cependant l'importance trophique et l'activité métabolique des bactéries sulfato-réductrices (BSR) dans les environnements en l'absence de sulfate, reste à établir. Il semble exister une relation mutuelle avec les méthanogènes dans le cadre du transfert interespèce d'hydrogène; ces dernières, en éliminant l'hydrogène produit par les BSR, remplacent le sulfate comme accepteur d'électrons et rendent la réaction thermodynamiquement possible. Mais seul un nombre restreint d'espèces de BSR est capable de réaliser ce transfert; elles appartiennent toutes au genre *Desulfovibrio*, avec une exception pour le genre *Desulfohalobium* .

12. 6.1.2.Mécanismes enzymatiques de la réduction dissimilatrice de SO42 -

La sulfato-réduction est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs étapes.

12. 6.1.2.1. Activation du sulfate par l'ATP

Cette première étape implique deux enzymes différentes:

(1) ATP sulfurylase: S042- + ATP <=> APS2- + PPi

(2) Pyrophosphatase: PPi + H20 -> 2 Pi

La réduction du sulfate dépend donc de l'action de la pyrophosphatase qui permet la formation d'APS dans la réaction 1.

12. 6.1.2.2. Réduction de l'APS

La réduction de l'APS en S032- est ensuite réalisée par l'APS-réductase, l'hydrogène étant utilisé comme donateur d'électron:

(3) APS réductase APS2- + H2 -> AMP2- + 2H+ + S032-

Comme le potentiel du couple redox APS/S032-, AMP est de -0,06 V, l'APS réductase peut
également fonctionner *in vitro* en formant de l'APS à partir de sulfite et d'AMP, en présence d'un accepteur d'électrons de potentiel plus électropositif (par exemple le ferricyanure ou l'oxygène);

(4) AMP + 2H+ + S032- -> APS + H2

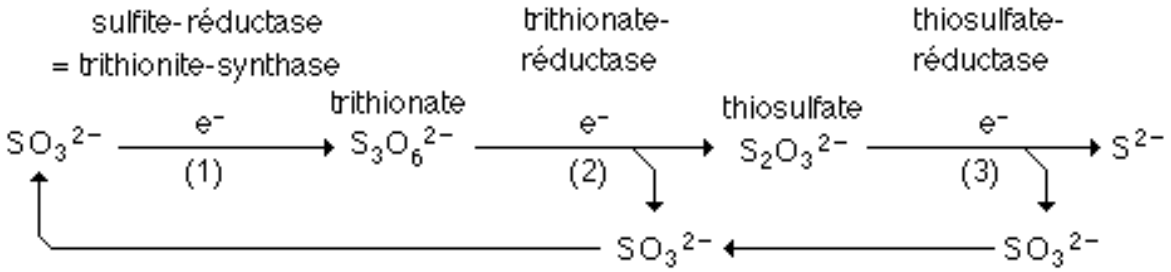
c'est le rôle physiologique de l'APS réductase dans les bactéries sulfo-oxydantes que nous étudierons
plus loin (voir § 7) .

12. 6.1.2.3. Réduction du sulfite en sulfure

Si la réduction dissimilatrice était identique à la réduction assimilatrice (§ 3)

3H2 + SO32- -> S2- + H20

on devrait toujours trouver un rapport de 3 entre l'hydrogène oxydé et le sulfite réduit. En fait il n'en est rien, ce rapport varie au cours des étapes de la purification enzymatique. On se trouve en fait en présence d'un processus complexe comportant plusieurs étapes. La réduction dissimilatrice du sulfite en sulfure se fait suivant la chaîne de réactions suivante:



Il faut donc 3 protéines différentes pour parvenir à l'hydrogène sulfuré:

- une sulfite réductase (ou trithionate synthase)
- une trithionate réductase

- une thiosulfate réductase

La respiration du sulfate nécessite donc un minimum de 6 protéines, alors que chez les eucaryotes, par exemple, la respiration de l'oxygène se fait à l'aide d'une seule, la cytochrome oxydase.

L'explication de cette complexité se trouve dans le système énergétique particullier à ces microorganismes: l'activation du sulfate en APS consommant un ATP, ils ne peuvent se développer sur le lactate (qui ne fournit qu'un seul ATP lors de son oxydation) qu'à la condition que de l'ATP soit aussi formé au cours du transfert des électrons par la chaîne respiratoire. Or seule l'étape de réduction du trithionate en thiosulfate est susceptible de fournir un saut énergétique suffisant pour former de l'ATP.

12.6.2. Réduction dissimilatrice du soufre élémentaire (sulfo-réduction)

Un genre bactérien, *Desulfuromonas* , capable de respirer le soufre élémentaire a été isolé à partir d'échantillons de boues riches en sulfures. Ces bactéries en forme de petit bâtonnet à flagelle latéral sont capables d'utiliser l'acétate comme seule source de carbone et d'énergie, les électrons étant transférés au soufre élémentaire avec formation de sulfure:

CH3COOH + 2H2O + 4 S° -> 2 CO2 + 4 H2S

Cette respiration d'un nouveau genre confirme l'hypothèse de VAN NIEL (1932) qui postulait l'équivalence de H20 et H2S en tant que donateurs d'électrons dans la photoassimilation du C02 par les algues et les bactéries vertes du soufre (voir § 7). Cette équivalence entre l'eau et le sulfure, l'oxygène et le soufre s'applique également aux systèmes transporteurs d'électrons générateurs d'énergie: respiration aérobie de l'oxygène produisant de l'eau, respiration anaérobie du soufre produisant du sulfure (Fig. 12.4).

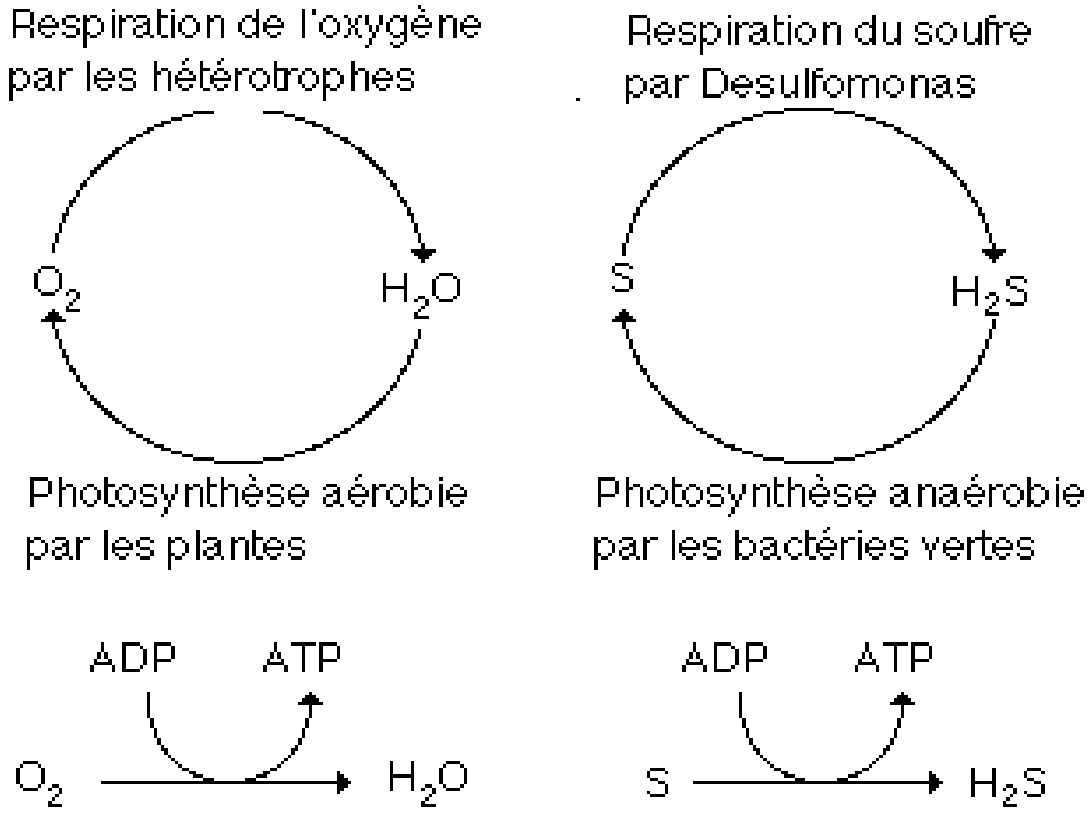


Fig. 12. 4. Equivalence entre oxygène et soufre, et eau et sulfure

Tableau 12.2. Bactéries sulforéductrices

Sulforéducteurs obligatoires

Eubactéries

Desulfuromonas (*acetoxidans, acetexigens*)
Desulfurella
Desulfurococcus (*mobilis, mucosus*)

Archaebactéries

Pyrodictium
Thermoproteus (*tenax, neutrophilus*)
Acidianus

Sulforéducteurs facultatifs

Desulfovibrio sp.
Wolinella
Pseudomonas (1 sp.)
Alteromonas (1 sp.)
Beggiatoa
Thermosipho (Eubactérie hyper-halophile)
Thermotoga (Eubactérie hyper-thermophile)
Oscillatoria (Cyanobactérie)
Chromatiaceae (à l'obscurité, métabolisme de maintenance)
Chlorobiaceae
Thermodiscus
Thermofilum
Pyrodictium
Campylobacter
Vibrio succinogenes

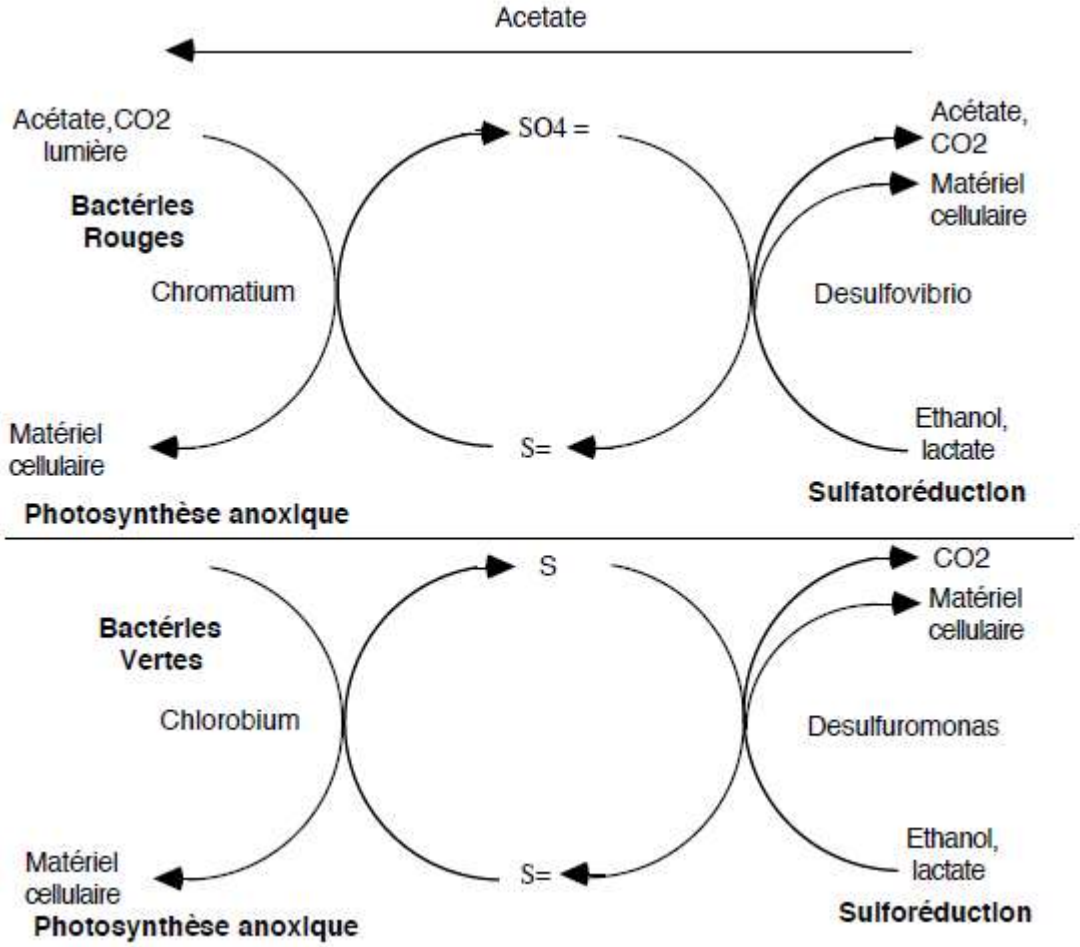


Fig. 12.5. Associations synthrophiques entre bactéries photosynthétiques et bactéries sulfatoréductrices ou sulfooxydantes

Cycle 1: Lorsque le sulfate est continuellement ajouté au système, une partie du S accumulé dans les bactéries rouges quitte le cycle et se dépose (ex/ lacs de Cyrénaïque au nord de la Lybie). Cycle 2: Le soufre excrété par les bactéries vertes est réduit en sulfite par les bactéries sulforéductrices.

Dans le grand cycle de la matière de la biosphère aérobie, la respiration utilisant l'oxygène est associée à la formation d'oxygène par la photosynthèse utilisant l'énergie solaire; de la même façon dans le petit cycle de la matière intervenant dans les niches écologiques anaérobies exposées à la lumière, la respiration du soufre élémentaire est associée à sa formation par la photosynthèse des bactéries vertes sulfureuses (Fig. 12.5).

Suivant l'hypothèse de PECK (1967), ce cycle anaérobie associant les bactéries sulfo- et sulfatoréductrices et les bactéries photosynthétiques du soufre dans de véritables syntrophies, est l'image des formes primitives de la respiration et de la photosynthèse qui existait sous l'atmosphère primitive réductrice, avant l'émergence de la photodissociation de l'eau qui entraîna l'augmentation de la concentration de l'oxygène atmosphérique.

La datation des dépôts de soufre par le rapport des isotopes S32/S34 (l'enrichissement en S34, dû à l'activité microbienne, est proportionnel à l'âge du dépôt) indique que le processus de sulfato-réduction est vieux de plus de 3,5 milliards d'années, ce qui est très proche de l'apparition des premiers êtres vivants et en tout cas bien antérieur à l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère (qui date de 2 milliards d'années).

La comparaison de la séquence des acides aminés dans certains pigments bactériens (cytochromes, ferrédoxines) permet en fait, de supposer que les bactéries vertes sulfureuses sont encore plus anciennes que les bactéries sulfatoréductrices.

De nombreux autres genres de bactéries sulforéductrices ont été découverts et plus particulièrement dans des milieux extrêmes thermophiles; ils appartiennent pour la plupart au domaine des *Archaea* (Tableau 12. 2). De nombreuses espèces du genre *Desulfovibrio* sont également capables de réduire lensoufre élémentaire.

12.6.3. Réduction dissimilatrice du thiosulfate (thiosulfato-réduction) par les procaryotes non sulfatoréducteurs

Le thiosulfate $S_2O_3^{2-}$ peut être produit spontanément par l'oxydation chimique des sulfures dans de nombreux environnements. On peut donc le trouver dans les écosystèmes anaérobies en présence de concentrations variées en oxygène, et plus particulièrement en conditions micro-aérophiles. Il n'est donc pas étonnant d'isoler des procaryotes spécialisés dans la réduction de ce composé oxygéné du soufre. La réduction du thiosulfate serait importante dans le cycle géochimique du soufre, dans les environnements anaérobies chauds tels que les sources chaudes volcaniques faiblement acides ou neutres, et pourrait être également impliquée dans l'activation de la biocorrosion en milieu pétrolier.

Les premières études portant sur les thiosulfato-réducteurs thermophiles ont révélés les propriétés métaboliques suivantes en présence de thiosulfate: oxydation de H_2, des peptides, acides aminés et hydrates de carbone et production de L-alanine lors de la fermentation du glucose.

L'étude de l'oxydation de H_2 en présence de thiosulfate dans le genre *Thermoanaerobacter* a permis d'identifier deux groupes bactériens: un 1er groupe qui oxyde activement H_2 en présence d'extrait de levure (ex.: les trois sous-espèces de *Thermoanaerobacter brockii* (*brockii*, *finnii*, et *lactiethylicus*)) et un 2e groupe

qui oxyde faiblement H2 en présence d'extrait de levure et de glucose (ex.: *T. ethanolicus* et*T. Thermohydrosulfuricus*). Ces bactéries, en utilisant le thiosulfate pour oxyder H2, facilitent la minéralisation de la matière organique dans les biotopes. D'autre part, les espèces du genre *Thermoanaerobacter* utilisent une plus grande gamme de peptides et d'acides aminés en présence de thiosulfate ou en association avec des méthanogènes hydrogénotrophes (transfert interespèce d'hydrogène).

L'étude de l'oxydation des hydrates de carbone en présence de thiosulfate dans le genre *Thermoanaerobacter* a révélé que *Thermoanaerobacter brockii* subsp.*finnii* produit lactate, acétate, H2 et CO2 par fermentation du glucose ou du xylose, l'éthanol étant le métabolite majeur. En présence de thiosulfate, l'oxydation du glucose et du xylose est modifiée: l'acétate devient le principal métabolite. Cette déviation de métabolisme accroît fortement le rendement et la croissance cellulaire de la bactérie.

La production de L-alanine lors de la fermentation du glucose par les *Thermotogales* thiosulfatoréductrices permet de diviser cet ordre en deux groupes distincts: les thermophiles du group I (*Fervidobacterium islandicum, Thermosipho africanus, Thermotoga elfii* et *T. hypogea*) qui produisent plus de 0.2 mol de L-alanine par mol de glucose consommé et les hyperthermophiles du groupe II (*Thermotoga neapolitana* et *T.* maritima) qui produisent moins de 0.2 mol de L-alanine par mol de glucose consommé. Dans le groupe I, la concentration en L-alanine décroît fortement tandis que la concentration en acétate s'accroît en présence de thiosulfate, tandis que dans le groupe II, il n'y a pas de changement significatif de production de L-alanine et d'acétate en présence de thiosulfate, indiquant ainsi une possible implication de la phosphorylation oxydative dans le métabolisme du glucose. Des études de phylogénie et de physiologie ont démontré que deux microorganismes des branches les plus basses de l'arbre phylogénétique étaient étroitement reliés: *Thermotoga maritima*, du domaine des *Bacteria* et *Pyrococcus furiosus*, du domaine des *Archaea*. Ces deux procaryotes produisent de la L-alanine lors du métabolisme des sucres; cette production pourrait être considérée comme un métabolisme ancestral développé par les premiers organismes vivants. Hypothèse: les *Thermotogales* thiosulfato-reductrices seraient issues de membres du domaine des *Archaea* à une période d'évolution où le thiosulfate, produit chimiquement à partir du sulfure, était abondant, consécutivement à l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère. La diversité des procaryotes thiosulfato- non sulfato-réducteurs est reportée dans le tableau 12.3.

D'autres procaryotes anaérobies thiosulfato-réducteurs non sulfato-réducteurs ont été récemment isolés d'habitats variés tels que les sols de rizière, les digesteurs, les sources thermales et les puits de pétrole. Leur diversité apparaît maintenant plus largement répandue qu'on ne le pensait. La répartition phylogénétique des procaryotes thermophiles thiosulfato-réductrices est reportée figures 12.6 et 12.7.

Tableau 3. Diversité des thiosulfato- non sulfato-réducteurs

Domaine *Bacteria*	Domaine *Archaea*
Fam. Thermoanaerobiaceae	Règne Crenarchaeota
Thermoanaerobacter	Ordre Igneococcales
Thermoanaerobacterium	Fam. Pyrodictiaceae
Fam. Thermotogataceae	*Pyrodictium*
Thermotoga	*Pyrolobus*
Fervidobacterium	Fam. Desulfurococcaceae
Thermosipho	*Stetteria*
Petrotoga	Ordre Thermoproteales
Fam. Thermodesulfo-	Fam. Thermoproteaceae
bacteriaceae	*Thermoproteus*
Coprothermobacter	*Pyrobaculum*
Mésophiles	Règne Euryarchaeota
Dethiosulfovibrio	*Ferroglobus*
Fusibacter	*Archaeoglobus*
Spirochaeta	
Haloanaerobium	
Orenia	
Clostridium	

Dans les environnements pétroliers, le thiosulfate peut résulter de l'oxydation de l'H2S souvent présent dans ces écosystèmes, par suite d'entrée accidentelle d'oxygène lors d'opérations d'extraction du pétrole. Plusieurs souches de bactéries anaérobies non sulfato-réductrices, mais thiosulfatoréductrices ont été isolées: *Dethiosulfovibrio peptidovorans*, bactérie mésophile isolée d'une eau de gisement pétrolier, présente une activité corrosive égale, voire plus importante que celle reportée pour les bactéries sulfato-réductrices dans des expériences similaires.

Ces bactéries thermophiles thiosulfato-réductrices possèdent de nombreux enzymes thermostables qui peuvent avoir une application industrielle. Et il est maintenant possible d'obtenir des quantités importantes de biomasse de thiosulfato-réducteurs par simple addition de thiosulfate dans le milieu de culture. Il serait également intéressant de développer des sondes spécifiques pour détecter ces microorganismes dans des environnements variés et démontrer ainsi leur implication dans la dégradation anaérobie de la matière organique.

Fig. 12.6. Répartition phylogénétique des bactéries thermophiles thiosulfato-réductrices

Fig. 12.7. Répartition phylogénétique des *Archaea* thiosulfato-réductrices

12.7. OXYDATION DES COMPOSES INORGANIQUES DU SOUFRE: SULFOOXYDATION

La plus grande partie du sulfure produit dans la biosphère est rapidement oxydée en sulfate, mais une certaine quantité peut également être bloquée sous forme de sulfures insolubles ou de soufre élémentaire pendant de longues périodes. Le soufre élémentaire se forme soit par oxydation chimique spontanée de H2S à l'air, soit par oxydation microbienne. L'oxydation microbienne est principalement dûe, dans les biotopes banaux pauvres en soufre, à l'action contingente de la microflore hétérotrophe.

On sait en effet, que de nombreuses bactéries peuvent oxyder les composés inorganiques du soufre sans en tirer de l'énergie, cette oxydation contingente correspondant probablement à un processus de détoxication. Les processus métaboliques mis en jeu demeurent inconnus, de même que l'importance quantitative du phénomène dans les sols.
Par contre, dans les biotopes riches en soufre, l'oxydation des composés du soufre est principalement dûe à une microflore spécialisée, les bactéries sulfo-oxydantes, dont on distingue 2 grands groupes tous deux généralement autotrophes (c'est-à-dire utilisant le C02 comme source de carbone):
- les bactéries chimiotrophes incolores, aérobies strictes ou dénitrifiantes facultatives. Elles utilisent le transfert des électrons depuis les composés soufrés jusqu'à l'oxygène (ou le nitrate pour les espèces dénitrifiantes) comme source d'énergie;
- les bactéries photosynthétiques rouges ou vertes, utilisant la lumière pour oxyder les composés du soufre uniquement en anaérobiose.
Les tableaux 12.4 et 12.5 décrivent les genres appartenant à ces deux groupes de bactéries sulfooxydantes.

12.7.1. Oxydation par les bactéries chimiotrophes incolores

12.7.1.1. Thiobactéries

A une exception près, les espèces décrites sont chimiotrophes strictes, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent tirer leur énergie que de l'oxydation des formes minérales du soufre. La plupart sont également autotrophes strictes, mais certaines espèces peuvent utiliser des composés organiques comme source de carbone (mais pas d'énergie).
Le métabolisme du soufre par les thiobacilles a fait l'objet de très nombreuses études mais n'est pasclairement élucidé. La chimie du soufre est en effet complexe, et de nombreux composés intermédiaires peuvent réagir chimiquement entre eux. Par exemple, l'oxydation du thiosulfate peut s'accompagner de la formation de soufre élémentaire dans le milieu, mais le soufre élémentaire n'est pas obligatoirement un intermédiaire physiologique normal dans cette oxydation. Il n'est d'ailleurs jamais accumulé à l'intérieur des cellules, contrairement aux bactéries filamenteuses du soufre (voir plus loin § 7.1.2.).
Le schéma du métabolisme du soufre par les thiobacilles, proposé par SIEGEL (1975), est présenté à la **Fig. 12.8**. Dans ce schéma RSH représente un thiol lié à une particule qui peut être remplacé *in vitro* par le glutathion (C10H16N306SH). Le bilan de l'oxydation du sulfure ou du soufre s'établit ainsi :

S2- + 4 H2O -> SO42- + 8 H+ + 8 e

et

S° + 4 H2O -> SO42- + 8 H+ + 6 e-

On voit donc que l'oxydation des composés du soufre s'accompagne d'une forte production d'ions H+, donc d'une acidification du milieu dont les conséquences peuvent être importantes dans le biotope
Le pH optimum de croissance varie suivant les souches aérobies de pH 6.8 à pH 5, mais certaines espèces (*Acidithiobacillus thiooxidans*) peuvent encore se développer à un pH très acide (environ une solution normale d'acide sulfurique, soit pH 0,85). L'oxydation anaérobie par l'espèce dénitrifiante facultative *Thiobacillus denitrificans* ne s'accompagne pas de cette baisse de pH, les OH- produits par la réduction du NO32- en N2 compensant l'acidification due à la sulfo-oxydation.

12.7.1.2. Oxydation par les bactéries filamenteuses

Ce sont des bactéries aérobies strictes que l'on trouve dans les cours d'eau, lacs ou eaux marines proches d'une source continue de sulfure (soit d'origine géologique, soit d'origine biologique). Elles forment alors un revêtement

caractéristique sur les surfaces immergées. Les filaments contiennent des réserves de soufre sous forme de granules de soufre élémentaire; ces granules disparaissent si les cellules sont maintenues dans un milieu dépourvu de sulfure. Ces bactéries ont été étudiées en détail par WINOGRADSKY, et ont conduit cet auteur à énoncer le concept de chimiotrophie, c'est-à-dire la possibilité pour certains organismes d'utiliser l'oxydation de composés minéraux comme source d'énergie. Nos connaissances n'ont pratiquement pas progressé depuis. Il semble que H2S soit le seul composé soufré utilisable; comme il est autooxydable en présence d'air qui est également nécessaire à la bactérie, il est très difficile de reproduire *in vitro* un milieu de culture convenable. Les études ont donc surtout porté sur l'écologie des genres *Sulfolobus*, *Thiothrix* et *Beggiatoa*, seuls genres ayant été obtenus en culture pure jusqu'à présent.

Tableau 12. 4. BACTERIES SULFO-OXYDANTES NON COLOREES

- Genre *Thiobacillus* : la plupart des espèces peuvent croître en autotrophie; beaucoup sont organotrophes et quelques unes respirent NO_3^- ou NO_2^- (*T. denitrificans*).
- Genre *Acidithiobacillus* : *A. ferrooxidans* utilise les ions ferreux et les formes réduites du soufre comme source d'énergie tandis que *A. thiooxidans* n'utilise que les formes réduites du soufre.
- Genre *Halothiobacillus* : halophiles qui tirent leur énergie des formes réduites du soufre (ex.: *H. neapolitanus*).
- Genre *Thermithiobacillus* : modérés thermophiles qui tirent leur énergie des formes réduites du soufre (ex.: *H. tepidarius*).
- Genre *Sulfolobus* : archaea cocciforme croissant à bas pH (2,0) et haute température (60°C) aux dépens du soufre élémentaire aussi bien que de divers composés organiques; oxyde également les ions Fe++.
- Genre *Thiomicrospira* : spirilles mobiles par un flagelle polaire, montrant une physiologie semblable à celle des Thiobacilles. Une espèce dénitrifiante.
- Genre *Beggiatoa* : longs filaments mobiles par glissement.

7 autres genres sont oxydants du sulfure obligatoires, ce qui rend l'utilisation de milieu solide impossible en raison de l'auto-oxydabilité de H_2S. Elles existent uniquement par leur reconnaissance morphologique .

- Genre *Achromatium* : cellules sphériques ovoides ou cylindriques de grande taille, présentant de grosses inclusions de $CaCO_3$ mélées à des globules de soufre plus petits.
- Genre *Macromonas* : identiques aux précédentes, mais ciliées.
- Genre *Thiobacterium* : bâtonnet non mobile avec inclusions de soufre formant des masses gélatineuses.
- Genre *Thiospira* : spirille avec inclusions de soufre et touffe de cils polaires.
- Genre *Thiovulum* : grosse cellule ovoide avec inclusions de soufre et flagelles péritriches parfois.

12.7.2. Oxydation par les bactéries photosynthétiques

Ces organismes possèdent un ensemble de caractères ne leur permettant de se multiplier que dans des biotopes bien définis, qui doivent être aquatiques, anaérobies, riches en H2S et éclairés. Malgré leur confluence écologique, les bactéries rouges et vertes sont en fait très différentes.

Les bactéries rouges (Chromatiaceae) sont mobiles et de morphologie variée. A la lumière, elles oxydent plusieurs composés minéraux réduits (H2S, mais aussi S°, S203) en anaérobiose mais elles peuvent également se développer hétérotrophiquement à l'obscurité sans composés soufrés, les composés carbonés étant alors utilisés comme source d'énergie. La croissance à la lumière est autotrophe, le C02 étant assimilé suivant le cycle de Calvin comme pour la plupart des procaryotes et les eucaryotes. Les systèmes photosynhétiques (contenant des bactériochlorophylles) sont situés dans des membranes intracytoplasmiques de formes très diverses pour chaque espèce et l'oxydation de H2S aboutit à l'accumulation de soufre élémentaire à l'intérieur de la cellule. Le soufre élémentaire ainsi accumulé peut être utilisé par les bactéries rouges si le milieu extérieur s'appauvrit en soufre.

Les bactéries vertes (Chlorobiaceae) sont immobiles, de morphologie homogène. Elles sont incapables de se développer à l'obscurité sans composés minéraux oxydables et sont autotrophes strictes, le C02 étant assimilé suivant une voie métabolique différente du cycle de Calvin. Les pigments photosynthétiques sont disposés au contact de la paroi extérieure, l'oxydation du sulfure aboutissant à la formation de granules de soufre élémentaire à l'extérieur de la cellule. Le soufre ainsi excrété n'est plus utilisable par les bactéries vertes. Elles possèdent des vacuoles de gaz qui permettent aux cellules de flotter entre deux eaux ou en surface.

Dans certaines conditions, les bactéries rouges ou vertes peuvent se développer massivement, colorant les eaux en rouge ou vert (avec dans ce dernier cas une opalescence dûe au soufre élémentaire excrété par les bactéries vertes. L'optimum de concentration en sulfure est différent pour les deux groupes qui préfèrent des eaux à pH neutre. Le maximum d'absorption de la lumière par les pigments photosynthétiques est également différent, ce qui explique les associations en strates horizontales que l'on observe parfois dans des eaux calmes. Ce pic maximum est situé à 670 nm (rouge visible) pour les algues vertes, vers 730 nm (rouge sombre pour les bactéries vertes sulfureuses) et vers 880 nm (infra rouge) pour les bactéries rouges sulfureuses (**fig. 9**).

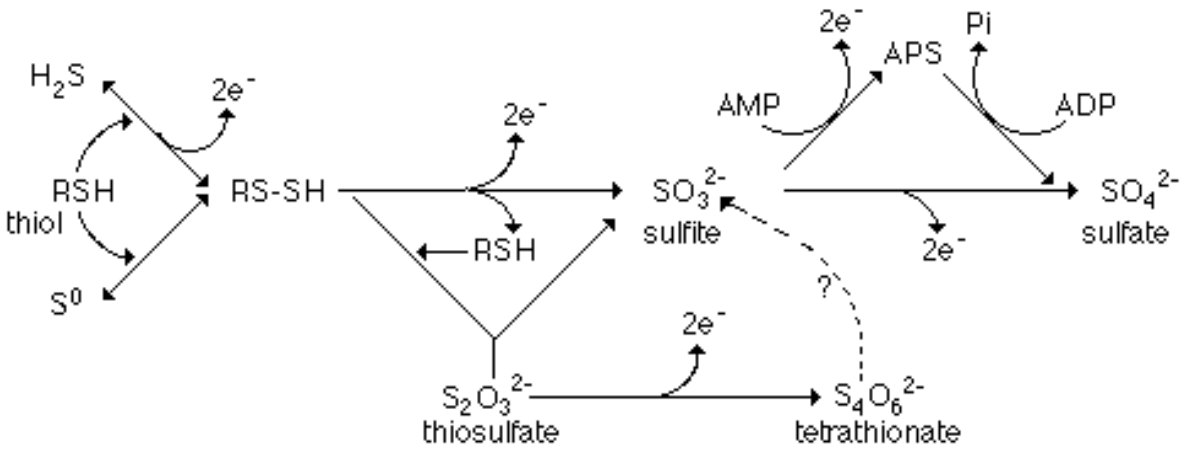


Fig 12.8. Schéma du métabolisme du soufre par les thiobacilles (Siegel, 1975)

Tableau 12.5. BACTERIES SULFO-OXYDANTES COLOREES

1 - Bactéries vertes (famille Chlorobiacées)	2 -Bactéries pourpres (famille Chromatiacées)	
• *Chlorobium*	• *Amoebobacter*	• *Rhodopseudomonas*
• *Chlorochromatium*	• *Chromatium*	• *Rhodothalassium*
• *Chloroherpeton*	• *Allochromatium*	• *Halorhodospira*
• *Pelodictyon*	• *Isochromatium*	• *Roseospira*
• *Pelochromatium*	• *Halochromatium*	• *Thiococcus*
• *Prosthecochloris*	• *Marichromatium*	• *Thiocapsa*
	• *Rhabdochromatium*	• *Thiocystis*
	• *Ectothiorhodospira*	• *Thiohalocapsa*
	• *Lamprobacter*	• *Thiorhodococcus*
	• *Lamprocystis*	• *Thiorhodovibrio*
	• *Rhodovibrio*	• *Thiospirillum*
	• *Rhodovulum*	• *Thiodycton*
		• *Thiopedia*

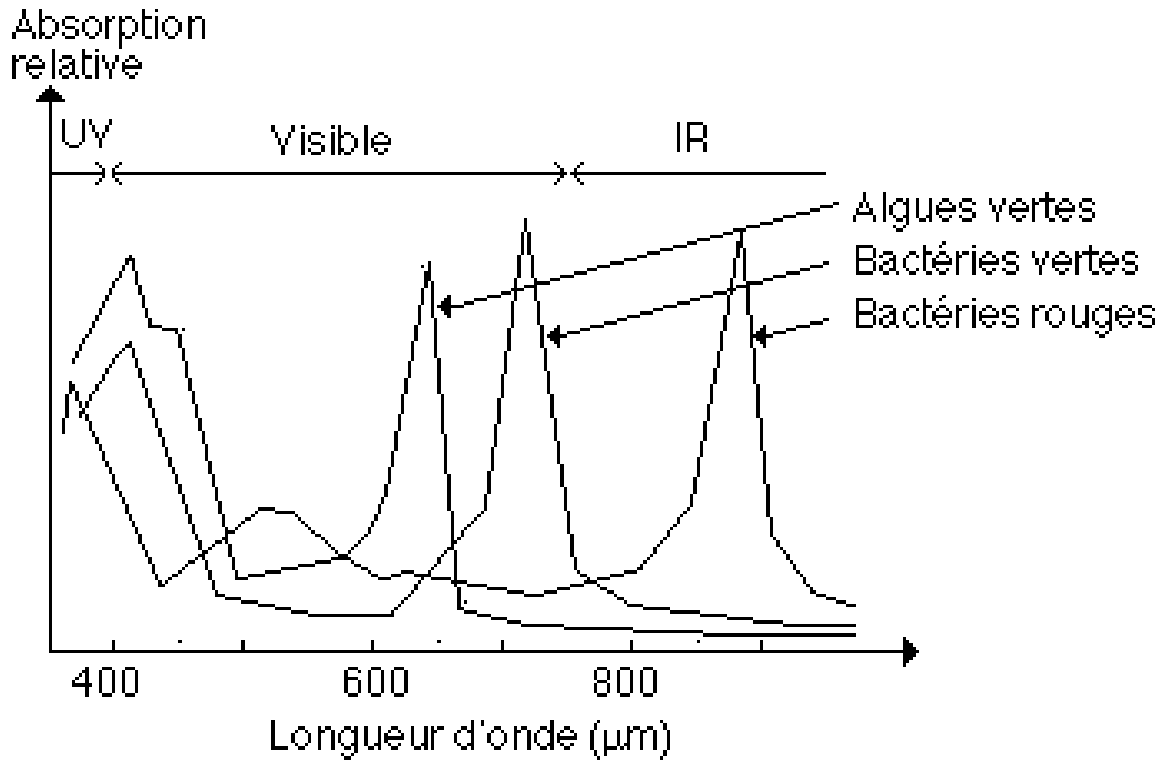


Fig. 12. 9. Spectre d'absorption de la lumière par les algues vertes et les bactéries sulfureuses photosynthétiques

A la surface d'un sol de rizière enrichi en sulfate, les bactéries rouges sulfureuses apparaissent après le développement des bactéries sulfatoréductrices, qui succèdent elles-même aux algues vertes.

Cette succession dans le temps correspond également aux observations *in situ* dans les eaux lagunaires. Les " crises distrophiques " des étangs du Languedoc sont la conséquence du développement successif de ces différentes populations microbiennes.

12.7.3. Oxydation chimique

Suivant les caractéristiques physicochimiques du biotope, l'oxydation chimique du sulfure ou du soufre élémentaire peut y être rapide ou lente.

Aux pH acides par exemple, les ions de métaux lourds catalysent ces oxydations. Etant donné le nombre des études sur la physiologie des thiobacilles et l'intérêt provoqué par la morphologie particulière des bactéries rouges ou vertes, il est possible que la contribution réelle des microorganismes dans l'oxydation des composés du soufre soit en fait surestimée dans de nombreuses études écologiques. Il est en effet très difficile d'évaluer *in situ* la part relative des deux processus. Nous verrons au paragraphe suivant que l'oxydation biologique est cependant très active dans certains biotopes.

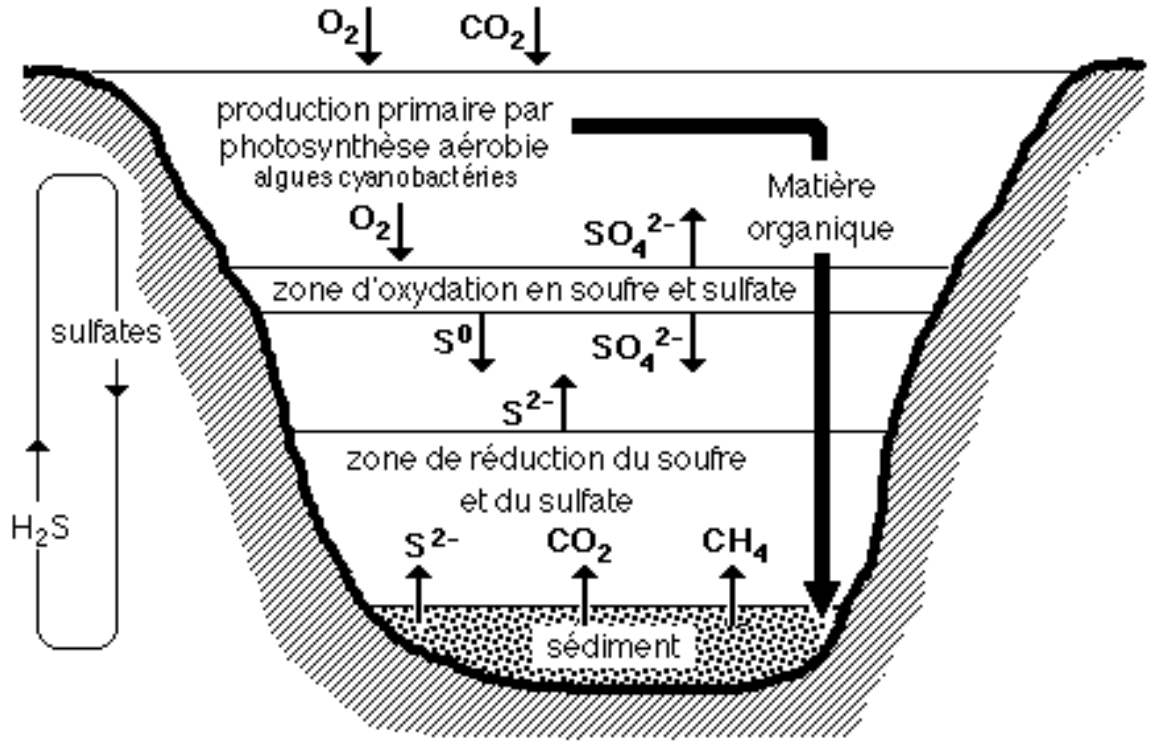


Fig 12.10. Transport du pouvoir oxydant de la matière organique par le sulfate en milieu aquatique

12. 8. QUELQUES PROBLEMES PARTICULIERS LIES AU CYCLE DU SOUFRE

12.8.1. Le biotope d'estuaire

Cet environnement est particulièrement favorable pour le développement des microorganismes du cycle du soufre, en raison de la disponibilité conjointe de matière organique apportée par les eaux continentales et du sulfate contenu dans l'eau de mer. Le sulfate joue alors un rôle très important dans le transport du pouvoir oxydant vers la profondeur (**Fig. 12.10**) A raison de 2,7 g par litre en moyenne, ce pouvoir oxydant correspond à environ 200 fois celui de l'oxygène à saturation.

Suivant les conditions de température, de profondeur, etc…, le turn-over du soufre dans le système eau-vase est plus ou moins rapide. Cette notion de turn-over est d'une grande importance, la numération des organismes impliqués et la mesure des concentrations des différents métabolismes ne suffisant pas à précier la dynamique du système. En effet, il est possible qu'un métabolite soit consommé aussi vite qu'il est produit: sa concentration dans le milieu est alors voisine de zéro.

Cependant le groupe microbien qui utilise ce composé peut être particulièrement abondant et actif. La connaissance des flux de matière, des taux de croissance et de mort des différents composants du système est alors nécessaire pour en comprendre le fonctionnement.

12. 8.2. Les eaux douces sulfureuses

Dans certains biotopes aquatiques riches en soufre d'origine organique fonctionne un écosystème qui met en jeu certaines bactéries du cycle du soufre reparties dans deux zones suivant les conditions du potentiel Redox (Fig. 10). Cette stratification peut s'établir par différence de densité entre eaux chaudes et eaux froides. Les différents groupes microbiens (algues vertes, bactéries photosynthétiques sulfureuses) utilisent alors des longueurs d'onde différentes dans le spectre solaire, comme nous l'avons vu plus haut.

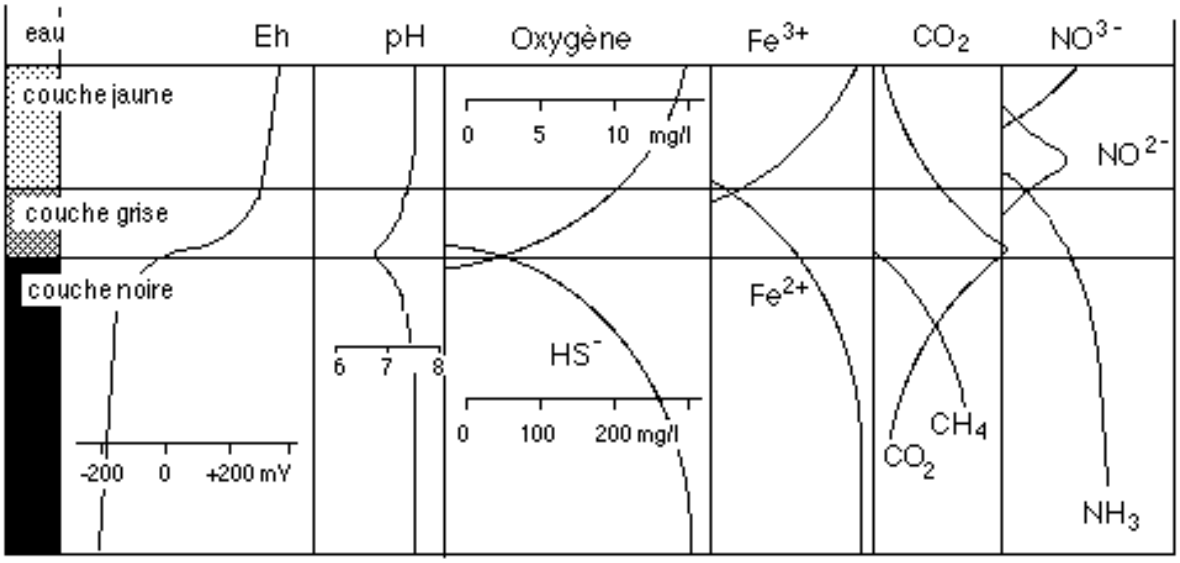


Fig. 12.11. Variation verticale des propriétés physico-chimiques à la surface d'un sédiment

12.8.3. La zone réductrice sous l'interface eau-sédiment

L'existence d'une zone réductrice noire située à quelques millimètres en dessous de l'interface eau-sédiment est très générale: cette couche a été décrite sous toutes les latitudes, elle se forme dans des sédiments de granulométrie variée. Elle se caractérise par une discontinuité du potentiel redox (DPR).

L'individualisation, l'épaisseur de la DPR dépendent de l'équilibre entre l'apport d'oxygène et l'apport d'éléments nutritifs. Quand l'oxygène devient limitant, d'autres accepteurs finaux des électrons provenant de l'oxydation de la matière organique sont alors utilisés par différents groupes microbiens au fur et à mesure de l'abaissement du potentiel. La Figure 12.11 (d'après FENCHEL et RIEDL,1970) indique la succession de ces processus aboutissant en quelques jours à la mise en place de la zone de discontinuité à l'interface eau-sédiment et schématise les variations du Eh, pH et des concentrations d'oxygène, de Fer, CO2, NO3-, NO2- et NH3 dans la DPR.

12.8.4. Activité des bactéries du cycle du soufre en rizière

On trouve dans le sol submergé de la rizière un exemple de synergie entre groupes bactériens différents. Dans ce biotope anaérobie sont en effet associées les bactéries cellulolytiques anaérobies, sulfato- et sulfo-réductrices et méthanogènes, dans des échanges de métabolites qui aboutissent à 1a décomposition de la matière organique végétale en CO2 et CH4. Après quelques jours de submersion, le potentiel " moyen" est assez reducteur (-250 mV) pour que les bactéries sulfato-réductrices, sulforéductrices et méthanogènes interviennent dans la minéralisation de la matière organique suivant les concentrations en composés soufrés (Fig. 12.12). Dans le sol, la densité des

différents groupes bactériens impliqués dans le cycle du soufre varie au cours de la saison rizicole.

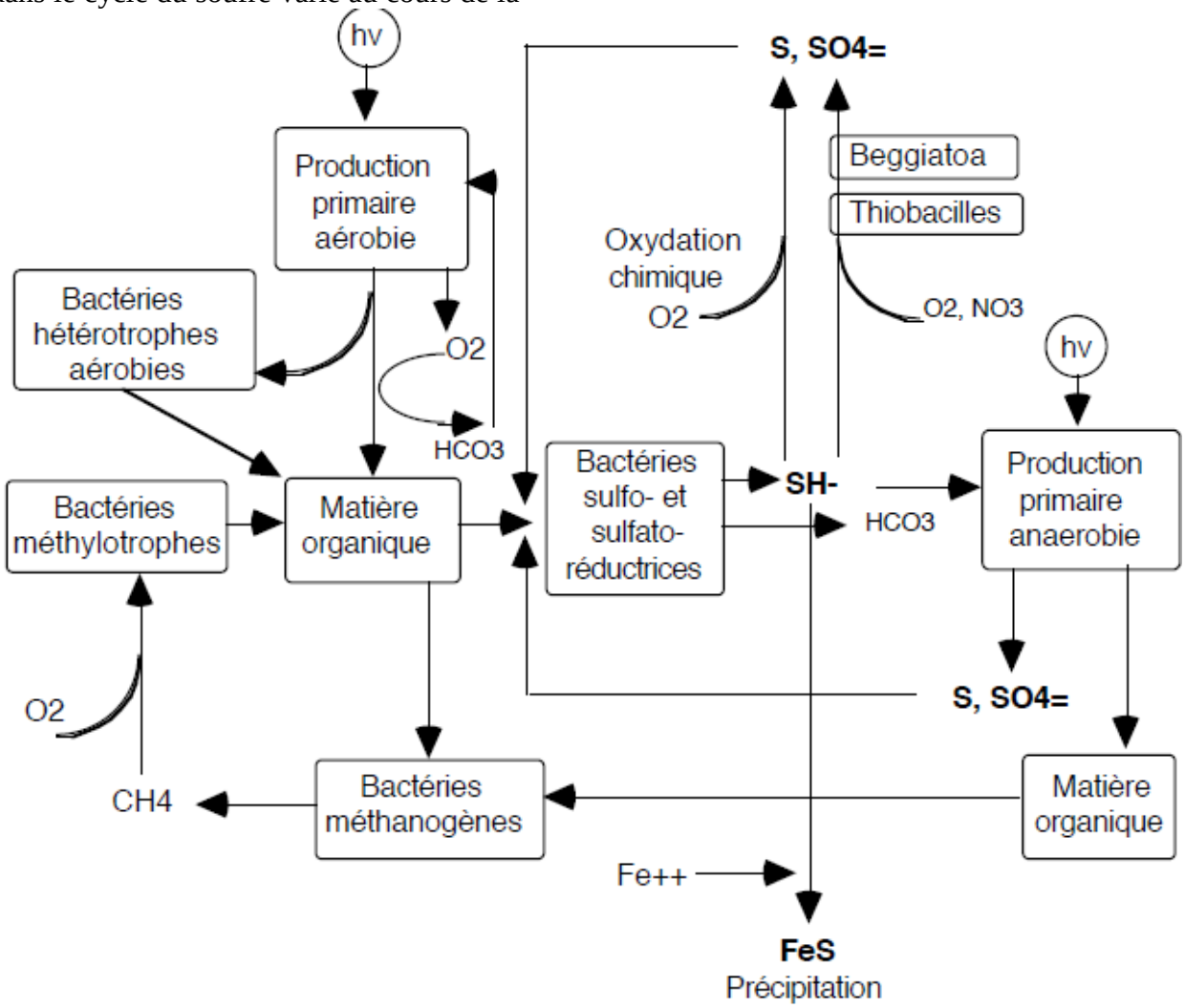


Fig. 12.12. Activité des bactéries sulfo- et sulfato-réductrices en sol submergé non planté

12.8.5. Sulfato-réduction spermosphérique et rhizosphérique

12.8.5.1. Sulfato-réduction rhizosphérique

Les bactéries sulfatoréductrices trouvent dans la rhizosphère une niche écologique favorable en raison de la disponibilité de substrats organiques excrétés par la racine. L'analyse des exsudats montre que certains des acides organiques excrétés sont des substrats utilisables par des cultures pures de bactéries sulfato-réductrices. L'effet rhizosphère pour les bactéries sulfato-réductrices (mesuré par le rapport R/S) est particulièrement net chez le riz inondé, mais il a été également décrit pour d'autres plantes (fève, maïs, luzerne).

La sulfato-réduction rhizosphérique résulte d'un déséquilibre du cycle du soufre qui se manifeste lorsque le rapport entre les populations de bactéries sulfato-réductrices et sulfo-oxydantes (thiobacilles aérobies) augmente. Il se produit alors une accumulation de sulfures toxiques pour la plante. Le seuil de toxicité décroît avec l'âge de la plante. Pour le jeune pied de riz, ce seuil est d'environ 10 ppm. Il est atteint dans certains sols après quelques jours de germination ou de développement des jeunes racines.

Celles-ci s'entourent d'une gaine noire de sulfure de fer, qui limite les échanges sol-plante. On observe alors des pertes au semis pouvant atteindre 50% ou des maladies physiologiques ("akagare" ou

"akiochi" au Japon, "bronzing" à Ceylan , etc).
L'intensité de la sulfato-réduction dépend de la concentration en sulfate et en matière organique dans le sol, des conditions d'oxydo-réduction (granulométrie, d'engorgement), et de l'exsudation racinaire. La sulfato-réduction est plus importante quand l'exsudation est stimulée par la lumière, la coupe des parties aériennes, une attaque parasitaire, la dessiccation, etc.

12.8.5.2. Sulfato-réduction spermosphérique

La sulfato-réduction spermosphérique est un phénomène identique à celui observé dans la rhizosphère. Elle se manifeste lorsque deux conditions sont réunies: anaérobiose et teneur en sulfates ou soufre élémentaire élevées.
L'anaérobiose se produit quand le sol est engorgé et que la structure étant mauvaise, la densité apparente est élevée. Un seuil critique (d =1,5) a été déterminé pour un sol alluvial salin de Tunisie.
Une teneur en sulfate supérieure à 200 ppm est également nécessaire, le seuil pour le soufre élémentaire n'est pas connu.
Les bactéries sulfato-réductrices peuvent alors se développer en utilisant les composés organiques exsudés par la graine en germination (la sulfato-réduction ne se produit pas dans un sol non planté).
La teneur en sulfures solubles peut atteindre des valeurs élevées (56 ppm en Camargue), toxiques pour la jeune plantule. La toxicité des ions sulfure est directe, ou indirecte par effet de barrière de diffusion pour l'oxygène ou les ions minéraux nécessaires au moment de la germination (Fig. 12.13).
Si l'activité des bactéries sulfato-réductrices est compensée par l'activité des bactéries sulfooxydantes, il n'y a pas accumulation de sulfure donc pas de toxicité.

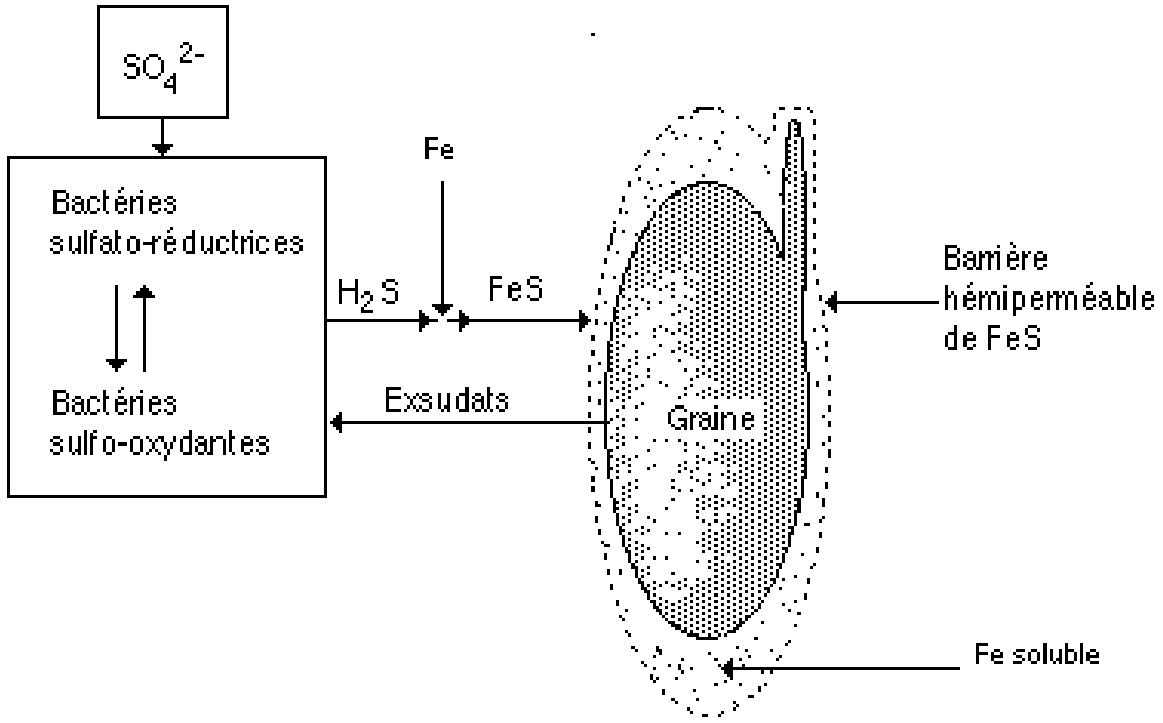


Fig. 12.13. Schéma de la sulfato-réduction spermosphérique

12.8.6. Toxicité des sulfures pour les nématodes phytoparasites

Si les sulfures d'origine microbienne sont toxiques pour les plantes, ils le sont aussi pour la faune du sol, et en particulier pour les nématodes phytoparasites des racines. Des observations *in situ* ont montré que les niveaux des populations de certains nématodes étaient fortement diminués par

une sulfato-réduction accidentelle ou provoquée. *In vitro*, l'action des sulfures d'origine microbienne a été démontrée.
En rizière, un système de submersion en contresaison, qui provoque une sulfato-réduction dans le sol pourrait être un moyen de lutte efficace contre les nématodes qui réduisent les rendements dans toutes les rizières africaines de près de 30%. Le traitement chimique est en effet, économiquement impossible (ce traitement s'effectue point par point au pal injecteur). Des expérimentations en parcelle expérimentale ont montré l'intérêt de ce type de lutte biologique.
Dans le cas des bananiers, on a constaté un effet très positif d'une submersion prolongée sur les rendements, qui sont là encore diminués par les nématodes.

12.8.7. Acidification des sols riches en sulfures par sulfo-oxydation aérobie

L'aménagement de certains sols d'alluvions fluviomarines se heurte parfois à des problèmes ayant pour origine un déséquilibre du cycle du soufre. Situés dans des vallées irrigables, ces sols organiques (en particulier les sols de mangrove) sont potentiellement de bons sols de rizière, mais doivent au préalable être dessalés. Les concentrations en sulfures insolubles et en soufre élémentaire y sont importantes (jusqu'à 0,3 % p/p) mais les activités microbiennes faibles et en équilibre. Lors des travaux d'aménagement rizicoles par poldérisation, ces concentrations baissent significativement avec une augmentation très importante de l'activité des différentes bactéries du cycle du soufre. L'effet d'un drainage de la surface est souvent catastrophique, l'oxydation aérobie du sulfure étant alors activée par l'aération. Dans les cas les plus défavorables, on aboutit à une chute de pH très importante (de pH 6,6 à pH 2,3 par exemple) qui rend le sol totalement impropre à toute culture. Cette acidification par sulfooxydation peut être atténuée en favorisant l'oxydation anaérobie des sulfures, ce qui est possible en maintenant le sol en percolation sous une couche d'eau douce avec un draînage profond.

12.8.8. L'alimentation en soufre de la plante

Nous avons vu que la source normale de soufre pour la plante était le sulfate de la solution du sol, l'équilibre entre la minéralisation et l'assimilation microbienne déterminant la concentration du sulfate dans l'eau du sol. Les besoins en soufre d'une culture intensive varient entre 9 et 39 kg ha-1 an-1. Ils sont donc comparables aux besoins en phosphore. Dans les zônes industrialisées, ces besoins peuvent être largement couverts par le retour au sol du soufre émis dans les fumées (combustion du pétrole et du charbon), bien que la concentration en S02 dans l'air reste faible du fait de sa solubilité. Les apports de soufre dans la pluie varient en effet de 168 ka ha-1 an-1 (à 2 km d'un site industriel) à 42 kg (zône urbaine) et 16 kg (zône rurale non polluée). Dans des sols pauvres en sulfate, plus de 50 % du soufre nécessaire à la plante est absorbé sous forme de S02 par les parties aériennes, certaines plantes (tabac) pouvant se développer uniquement à partir de soufre dans l'atmosphère. L'activité industrielle peut donc profondement modifier la nutrition soufrée des plantes cultivées, les carences en soufre étant de moins en moins observées.

12.8.9. Corrosion dûe aux bactéries du cycle du soufre

12.8.9.1. Rôle des bactéries sulfato-réductrices dans la corrosion du fer

La découverte du rôle des bactéries sulfato-réductrices dans la corrosion du fer et de l'acier est relativement récente, bien que ce phénomène revête une grande importance économique. Cette corrosion présente trois caractères particuliers :
- Elle n'intervient qu'en anaérobiose, mais l'alternance de conditions aérobies et anaérobies accélère le phénomène: des

objets métalliques sont attaqués plus rapidement si les conditions d'oxydo-réduction alternent.
-La corrosion est ponctuelle plutôt que régulière; elle a tendance à provoquer des trous localisés plutôt que de désintégrer l'ensemble de l'objet.
-La fonte laisse un résidu de carbone (graphitisation); l'acier et le fer produisent du sulfure de fer. Bien que l'hydrogène sulfuré en solution (acide sulfhydrique) puisse attaquer le fer, l'action corrosive des bactéries sulfato-réductrices est due à la dépolarisation de la pile électrolytique qui se forme entre le fer et l'eau :
(1) réaction anodique
4 Fe <=> 4 Fe2+ + 8 e-
(2) réactions cathodiques
8 H2O <=> 8 H+ + 8 OH-

8 H+ + 8 e- <=> 4 H2

Un film protecteur d'hydrogène est donc formé qui stoppe l'attaque électrolytique. En présence de bactéries sulfato-réductrices, une dépolarisation de la cathode est possible, qui permet à la réaction de se poursuivre :
(3) dépolarisation bactérienne
SO42- + 8 H+ + 8 e- <=> S2- + 4 H2O
(4) formation de sulfure
Fe2+ + SH2 -----> FeS + 2 H+
(5) formation d'hydroxyde de fer
3 Fe2+ + 6 OH- -----> 3 Fe(OH)2
la réaction globale s'écrit donc :

5 Fe + SH2 + SO4H2 + 2 H2O -----> 2 FeS + 3 Fe(OH)2 + H2

Bien que ce mécanisme soit le principal responsable de la corrosion du fer par les bactéries sulfatoréductrices, d'autres mécanismes peuvent également intervenir comme l'action du sulfure de fer ou du soufre élémentaire natif produit par oxydation chimique du sulfure, dans les conditions alternées d'anaérobiose-aérobiose.

12.8.9.2. Corrosion aérobie du ciment par les Thiobacilles

Les bactéries sulfo-oxydantes sont responsables de la corrosion aérobie du ciment, qui prend
parfois des proportions spectaculaires. Certaines espèces telles que *Acidothiobacillus thiooxidans* ou *Acidothiobacillus concretivorus* peuvent produire des quantités importantes d'acide sulfurique, et restent actives à des pH très bas (correspondant à une solution normale d'acide sulfurique). De telles concentrations en H2S04 peuvent dissoudre le ciment: placés dans une culture pure d'*Acidothiobacillus thiooxidans*, des échantillons de ciment sont totalement solubilisés après 100 jours d'incubation .
Ce phénomène d'attaque du ciment par les bactéries sulfo-oxydantes est particulièrement visible sur les fondations de certains ouvrages (piles des lignes à haute tension, barrages) placés dans des sols soumis à une alternance submersion dessiccation ou au contact d'eaux chargées en soufre. Dans une étude microbiologique des eaux du barrage d'AYAME en Côte d'Ivoire, MOURARET (1971) a mis en évidence le rôle des bactéries du soufre dans la corrosion des parties métalliques (turbines de l'ouvrage et du barrage lui-même). Il est alors pratiquement impossible de prévoir une protection efficace contre la corrosion microbienne.

13. CYCLE DU PHOSPHORE

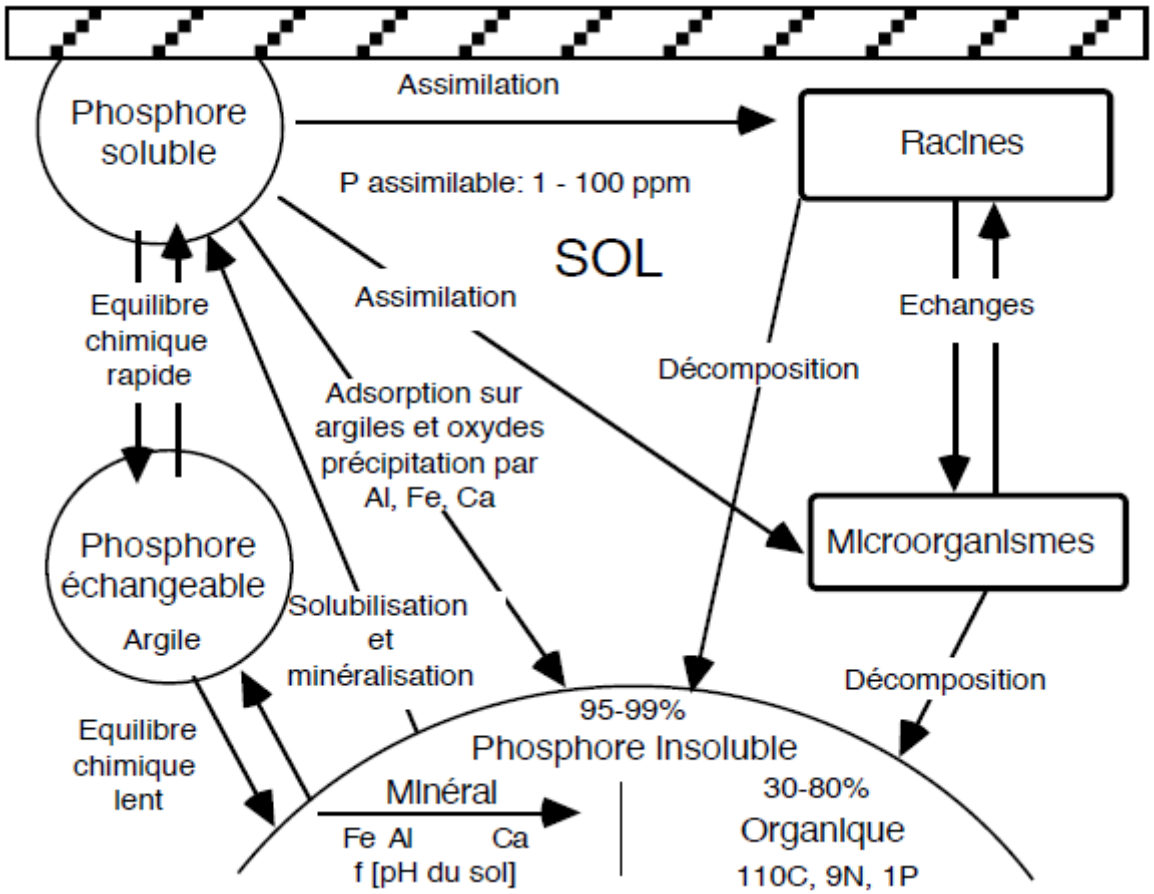


Fig. 13.1. Cycle du phosphore dans l'écosystème sol-plante

13.1. GENERALITES

Le phosphore est un élément majeur de la nutrition des plantes. Les microorganismes interviennent dans les processus de solubilisation, d'assimilation et d'immobilisation de cet élément. Sous un couvert végétal non exploité, et contrairement aux cycles du carbone et de l'azote, le cycle du phosphore dans l'écosystème sol-plante est un cycle fermé, les échanges avec l'atmosphère étant très réduits (Fig. 13.1).

L'étude de la distribution du phosphore dans un sol sous graminées a montré que les microorganismes contenaient au moins autant de phosphore que toute la végétation, et que seulement 1% du phosphore total de l'écosystème se trouvait dans la matière vivante .

13.2. FORMES DU PHOSPHORE DANS LE SOL

Pour une approche écologique ou agronomique, il convient de distinguer le phosphore soluble, directement assimilable par les plantes ou les microorganismes, et le phosphore insoluble, non utilisable directement.

Le phosphore insoluble, qui représente entre 95 et 99 % du phosphore total, est fixé sous forme minérale principalement par le fer et l'aluminium en sol acide ou le calcium en sol alcalin. Entre 30 et 85 % du phosphore insoluble se trouve sous forme organique, à raison de 110 carbone pour 9 azote pour 1 phosphore. Les fractions plus facilement minéralisables (acides nucléiques, phospholipides) sont moins abondantes que les formes humiques.

Le pool de phosphore soluble comprend les phosphates de la solution du sol, en équilibre chimique rapide avec le

phosphore échangeable, adsorbé sur l'argile. La capacité d'adsorption (ou d'échange) conditionne donc la concentration en phosphore de la solution, car l'équilibre chimique entre le phosphore échangeable et le phosphore insoluble est très lent.
Il semble acquis que l'assimilation par les plantes et les microorganismes se fassent uniquement ou principalement sous forme d'orthophosphate. La concentration de cette forme dans la solution du sol (environ 10-6 M) est souvent voisine de la concentration minimale permettant l'assimilation (entre 10-5 M et 10-7 M suivant les plantes). La concentration du phosphore dans la cellule (végétale ou microbienne) est plus de 1000 fois supérieure à la concentration dans la solution du sol, et le phosphore exporté par une seule récolte correspond à plusieurs centaines de fois la totalité du phosphore en solution dans le sol exploré par les racines.
La croissance des plantes est donc largement conditionnée par les processus qui maintiennent une concentration suffisante au contact des racines. Enfin, la diffusion étant plus lente que l'assimilation, il se crée un gradient négatif de concentration vers la racine, dans la zone également exploitée par les microorganismes rhizosphériques qui entrent ainsi en compétition avec la plante.

13.3. SOLUBILISATION DU PHOSPHORE MINERAL

13.3.1. Solubilisation par les acides organiques

C'est le processus de solubilisation le plus important. Les acides lactique, glycolique, oxalique ou citrique par exemple solubilisent le phosphate tricalcique, mais les acides de forme hydroxy ont un pouvoir solubilisant plus important en raison de l'effet chélateur sur le calcium qui s'ajoute à l'effet de l'acidité. Par exemple, à pH 4,4 ; l'acide oxalique solubilise davantage de P que l'acide gluconique.
De nombreux microorganismes du sol peuvent ainsi solubiliser les phosphates insolubles: la proportion de solubilisants est plus forte dans la rhizosphère (20 à 40 %) que dans le sol non planté (10 à 15 %). En fait l'action des microorganismes n'est profitable pour la plante que dans le sol rhizosphérique, car la diffusion est lente. Les acides organiques produits par la microflore hétérotrophe peuvent être adsorbés sur l'argile aux mêmes sites d'adsorption que le phosphore, ce qui contribue à augmenter la proportion de phosphate en solution. Une action identique est possible pour les acides organiques excrétés par la racine.

13.3.2. Solubilisation par les acides minéraux

Les bactéries chimiolithotrophes produisent des acides (nitrique, sulfurique) qui déplacent les ions phosphates des sels insolubles. Dans le procédé LIPMAN de fertilisation, l'acide sulfurique, produit par oxydation du soufre élémentaire par les thiobacilles, permet la solubilisation du phosphate tricalcique. Ce procédé est cependant peu utilisé car moins économique que les engrais habituels.

13.3.3. Solubilisation par le CO2

Bien qu'acide faible, le CO2 produit par respiration microbienne ou racinaire est parfois en forte concentration dans l'atmosphère du sol (plus de 1000 fois la concentration dans l'air). L'abaissement de pH qui en résulte peut augmenter la solubilisation des phosphates.

13.3.4. Solubilisation par l'hydrogène sulfuré

En sol submergé, la réduction dissimilatrice des sulfates par les bactéries sulfato-réductrices produit des ions HS- qui peuvent réagir avec le fer des phosphates de fer, en libérant de l'acide phosphorique.

On constate en effet, que dans ces sols la proportion de phosphore soluble par rapport au phosphore total est importante.

l'activité microbienne maintient le pool de phosphore soluble à un niveau très bas .

13.4. MINERALISATION DU PHOSPHORE ORGANIQUE

De nombreuses bactéries hétérotrophes et champignons sont capables de minéraliser le phosphore sous forme de phosphate pour leurs synthèses et d'en libérer dans le sol. Près de 50 % de la microflore totale du sol produit des phosphatases (glycérophosphatase, lécithinase, phytase, ribonucléase et désoxyribonucléase). Cependant dans le sol les composés organiques phosphorés (phytine par exemple) sont adsorbés sur les argiles et sont alors inaccessibles à ces enzymes, qui peuvent d'ailleurs elles-même être inactivées par adsorption sur le complexe argileux.

Il semble que pour la nutrition de la plante, l'action des phosphatases racinaires soit plus importante que celle des enzymes d'origine microbienne: l'inoculation des racines par des microorganismes actifs n'augmente pas l'activité phosphatase du système sol-plante. La minéralisation par les microorganismes intervient donc de façon générale dans le sol, mais ne profite pas ou peu à la nutrition des plantes.

13.5. IMMOBILISATION SOUS FORME ORGANIQUE

Dans l'écosystème sol-plante la microflore totale contient au moins autant de phosphore que la végétation. Le phosphore ainsi immobilisé est libéré et minéralisé à la mort de la cellule microbienne, mais il peut être recyclé par d'autres microorganismes sans profit pour les plantes. La concentration de phosphore dans la matière organique qui se décompose influe sur l'équilibre entre le recyclage par d'autres microorganismes (immobilisation sous forme organique) et la libération sous forme minérale accessible aux plantes (minéralisation) qui ne se produit que si la concentration en phosphore dépasse 0,2 %. Dans un sol sous forêt on constate par exemple que

13.6. OXYDATION ET REDUCTION DU PHOSPHORE

L'orthophosphate est la forme la plus oxydée du phosphore minéral. Certaines bactéries (*Clostridium butyricum*) peuvent réduire le phosphate (valence +5) en phosphite (valence +3) qui est lui-même assimilé et réoxydé en phosphate par d'autres hétérotrophes. Contrairement au cycle de l'azote, ces changements d'état d'oxydo-réduction dûs à l'action des microorganismes ont peu d'importance dans le cycle du phosphore dans le sol.

13.7. ROLE DES MICORHIZES DANS L'ASSIMILATION DU P PAR LA PLANTE

Les champignons, organismes symbiotiques colonisant les racines (voir § 8.5), utilisent les substrats organiques synthétisés par la plante en étendant leurs hyphes dans le sol avoisinant. On constate que les plantes mycorhizées ont une meilleure nutrition phosphorée que les plantes témoins non infectées.

13.7.1. Mycorhizes ectotrophes des arbres

Leur rôle dans le cycle du phosphore est vital. L'inoculation des graines par des champignons mycorhiziens est une pratique culturale qui peut remplacer l'apport d'engrais phosphorés, par exemple dans le cas du *Citrus*. Dans le cas du pin, le succès de l'introduction dans des sols sableux qui n'ont jamais été plantés peut dépendre de l'inoculation; on montre alors que c'est la nutrition phosphorée qui est le plus améliorée par la présence des mycorhizes (+ 200 % par rapport au témoin) suivie par le potassium (+ 120 %) et l'azote (+ 85 %). La réponse au phosphate de plants de *Pinus radiata*cultivés en sol déficient en phosphore est augmentée par l'inoculation

par *Boletus ranulatus*, champignon mycorhizien ectotrophe de l'arbre.
L'influence des mycorhizes sur la nutrition peut être expliquée par les modifications morphologiques de la racine induites par le champignon: augmentation du diamètre de la racine et du nombre de branchements. Mais l'action directe des hyphes fongiques a été démontrée pour le phosphore: le phosphate marqué par 32P absorbé par l'hyphe dans une zône non colonisée par la racine est transporté vers la racine et transmis à la plante.
Enfin la mise en évidence d'une importante activité phosphatase dans les mycorhizes indique que l'association symbiotique augmente également la minéralisation du phosphore organique dans le sol.

13.7.2. Endomycorhizes

Les endogènes, champignons mycorhiziens, infectent les racines de la plupart des plantes, y compris les graminées et les légumineuses cultivées. Dans les sols pauvres en phosphate, l'inoculation augmente l'assimilation du phosphore par la plante. Contrairement aux premières hypothèses, cette augmentation ne provient pas de l'utilisation par la plante mycorhizée de formes non assimilables par la plante non infectée, mais de l'augmentation du volume exploré par le système plante-champignon. On a montré que les hyphes mycorhiziens pouvaient transporter le phosphore marqué sur plus de 15 mm jusqu'à l'intérieur de la racine. Le système racinaire a alors accès à une zône moins dépourvue en phosphore soluble que la rhizosphère proche.
Enfin on observe que les plantes dont les racines sont particulièrement pauvres en poils absorbants (oignon, citrus) ont la plus forte réponse à l'inoculation par des mycorhizes endogènes.

14. CYCLE DU FER

14.1. GENERALITES

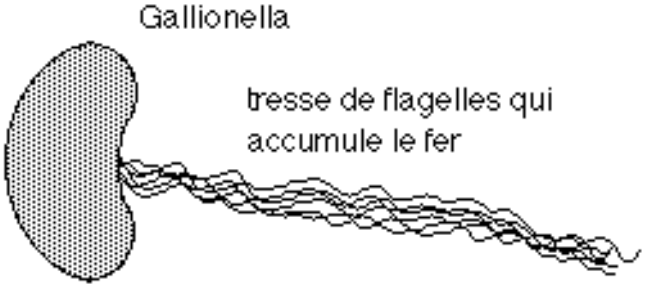
Contrairement au cycle du soufre, les études concernant le cycle microbiologique du fer dans l'écosystème sol-plante sont peu nombreuses, les microbiologistes hésitant à choisir ce difficile sujet.
En effet, si la croissance chimiotrophe a été démontrée pour la bactéries autotrophe aérobie acidophile *Thiobacillus ferrooxidans* qui tire son énergie de l'oxydation du Fe2+ en Fe3+ , elle est toujours douteuse pour certaines bactéries filamenteuses (*Sphaerotilus, Leptothrix, Gallionella*) rencontrées dans les biotopes riches en fer ferreux et dont les filaments contiennent des dépôts de fer ferrique. Ces organismes ont en effet un optimum de pH situé entre 6 et 8; dans ces conditions Fe2+ est facilement oxydable chimiquement et il est souvent impossible de savoir si ces bactéries contribuent effectivement à l'oxydation du fer, encore plus de déterminer si elles peuvent en tirer de l'énergie.

Quant à la réduction biologique de Fe3+ en Fe2+ , elle a été démontrée chez trois espèces sulfooxydantes, utilisant le fer ferrique comme accepteur final d'électrons dans l'oxydation du soufre élémentaire en sulfate. Dans le sol, la réduction du fer ferrique se produit en conditions de submersion, probablement par l'action combinée d'une microflore hétérotrophe :
Fe3+ + Matière organique réduite -> Fe2+ + Matière organique oxydée
Une relation entre la vitesse de la réduction du fer ferrique et le rapport des concentrations (N organique/ Fe3+) montre que les composés riches en azote jouent un rô1e essentiel.
Dans les sols riches en matière organique, le fer ferreux se trouve sous forme de complexe organique, en particulier avec certains acides (acide gallique, acide tannique). Ces composés sont également capables de réduire chimiquement le fer ferrique, il est donc très difficile d'évaluer l'importance de la réduction d'origine microbienne.

Très récemment, une nouvelle activité réductrice de fer ferrique obligée a été mise en évidence en anaérobiose; la microflore responsable est en cours d'identification, et de nouveaux genres ont été décrits. Cette réduction anaérobie du fer est cependant pratiquée de façon contingente par un grand nombre de bactéries fermentaires anaérobies facultatives (*Bacillus*...) ou strictes (*Clostridium, Anaerovibrio, Desulfovibrio*...).

14.2. LES BACTERIES A GAINE

Ces organismes filamenteux sont fréquemment rencontrés dans les eaux riches en Fe2+. Les études physiologiques récentes semblent indiquer que parmi les genres formant le groupe des " bactéries du fer" seul *Gallionella* mérite cette dénomination.



Les autres genres (*Sphaerotilus, Leptothrix)* sont en fait incapables d'utiliser l'énergie d'oxydation du fer ferreux en fer ferrique, il est même douteux que ces organismes participent effectivement à l'oxydation.

Ces "bactéries du fer" ont cependant une grande importance économique, par les floculats qu'elles produisent dans certaines conditions. Le fer ferreux formé dans un sol mal aéré riche en fer et en matière organique peut être entrainé par l'eau de pluie vers les systèmes de drainage. L'augmentation de l'aération au niveau du drain provoque une réoxydation qui s'accompagne d'un développement des bactéries filamenteuses. Un dépôt floconneux d'hydroxydes de fer, de filamenteux bactériens et de matière organique peut obstruer partiellement ou boucher totalement les drains. Le colmatage dû aux bactéries du fer peut également affecter les canalisations d'eau. Si la teneur en acides organiques est importante (par exemple sous filao ou eucalyptus) dans le sol de la zône de captage, une assez grande quantité de fer ferreux peut être complexée. Lors de la décomposition du gallate de fer par la microflore normale de l'eau de canalisation, le fer est libéré puis oxydé en Fe3+ , avec précipitations d'hydroxydes et dépôts de bactéries filamenteuses .

14.3. OXYDATION DU FER PAR THIOBACILLUS FERROXYDANS

14.3.1. Mécanisme enzymatique

Thiobacillus ferrooxydans est une bactérie chimioautotrophe acidophile qui utilise l'énergie dérivée de l'oxydation de Fe2+ avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons :

4 Fe2+ + O2 + 4 H+ -> 4 Fe3+ + 2 H2O

Toutes les souches oxydant le fer ferreux étant également capables d'oxyder le thiosulfate, le genre *Ferrobacillus* qui avait été décrit comme bactérie du fer sensu stricto n'a pas de signification réelle, l'ensemble des bactéries de ce type étant maintenant groupé dans la seuls espèce *Thiobacillus ferrooxydans*.

La réaction d'oxydation du fer débute par la réduction du cytochrome C (cytochrome réductase) les électrons étant ensuite transportés par la chaîne cytochromique :

Fe2+ -> cytochrome c -> cytochrome a -> oxygène

Bien que le couple Fe2+/ Fe3+ soit un agent réducteur particulièrement faible (E'o = + 780 mV), la réduction du cytochrome c'est possible probablement par chélation du fer: le potentiel d'oxydoréduction est en effet fortement diminué quand le fer est chélaté.

Le pH optimum de l'oxydation du Fe par les cellules entières est compris entre 2,5 et 2 , l'activité oxydante se maintenant dans une solution 0,25 N d'acide sulfurique. Cependant les cellules sont tuées dans une solution 0,44 N d'acide sulfurique, *Thiobacillus ferrooxydans* est donc moins acidophile que *Thiobacillus thiooxydans*. Un des caractères particuliers de la bactérie est sa résistance à des concentrations élevées d'ions de métaux lourds: Cu , Zn , Cd , Cr , Pb , n'ont pas d'effet à 10-3 mol , Hg et Ag étant inhibiteurs. Cette propriété permet l'utilisation de *Thiobacillus ferrooxydans* dans l'industrie minière dans les processus de biolixiviation (cf. § 14. 3. 3).

14.3.2. Pollution acide des eaux de draînage des résidus miniers

Ce problème écologique pose de graves problèmes, aux U.S.A. par exemple où les cours d'eaux souterrains peuvent être fortement pollués par l'acide sulfurique provenant de l'oxydation des résidus pyritiques des mines de charbon. Les études microbiologiques déjà anciennes ont mis en évidence le rôle de la bactérie ferrooxydante, l'attaque de la pyrite mettant en jeu deux types de réactions:

(1)

FeS2 -> Fe2+ + divers composés soufrés

C'est-à-dire une dissociation chimique de la pyrite avec formation de fer ferreux, et bactéries

(2)

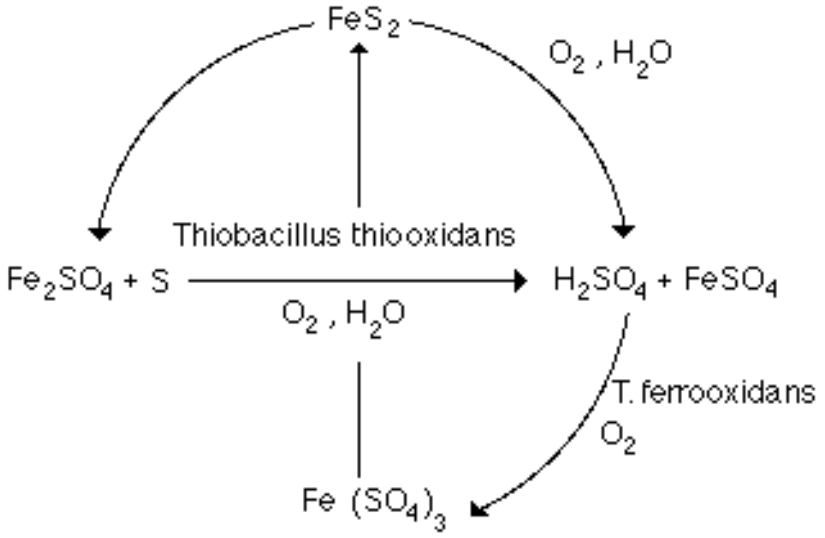
Fe2+ + O2 -> Fe3+

(3)

Fe3+ + FeS -> Fe2+ + SO42-

(réactions non équilibrées) une oxydation cyclique de la pyrite par Fe3+ produit par oxydation du fer ferreux (Fig. 14.1).

En l'absence de bactéries, l'oxydation chimique du fer ferreux par l'oxygène est le facteur limitant la vitesse de la réaction; l'oxydation acidifiante ne se poursuit que tant que l'oxygène est accessible dans le tas de résidus. Par contre, en présence de *Thiobacillus ferrooxydans* , cette oxydation peut se produire en anaérobiose, le soufre élémentaire étant alors utilisé comme accepteur final d'électrons.



$2FeS_2 + 2H_2O + 7O_2 \rightleftharpoons 2FeSO_4$ non biologique

$4FeSO_4 + O_2 + 2H_2SO_4 \rightleftharpoons 2Fe_2(SO_4)_3 + 2H_2O$ T. ferrooxidans

$Fe_2(SO_4)_3 + FeS_2 \rightleftharpoons 3FeSO_4 + 2S$ spontané

$3S + 3O_2 + 2H_2SO \rightleftharpoons 2H_2SO_4$ T. thiooxidans

Fig. 14.1. Cycle du fer et du soufre dans les mines de fer

En effet au cours de l'oxydation chimique de la pyrite une certaine quantité de soufre est libéré du cristal sous forme de soufre élémentaire qui peut être réduit par *Thiobacillus ferrooxidans*:

2 Fe2+ + S° -> 2 Fe3+ + S2-

réduit

oxydé

Métal-S + Fe3+ -> Métal-S04 + Fe2+

bactéries + O2

Fe2+ -> Fe3+

Le fer est utilisé comme piège à électrons, la bactérie comme pompe de transfert entre le fer et l'oxygène (ou le soufre élémentaire en anaérobiose) (Figs. 14.2 et 14.3)

14.3.3. Lixiviation des minerais de métaux par *Thiobacillus ferrooxydans*

Plusieurs procédés industriels ont été décrits pour extraire certains métaux de leurs minerais

sulfurés insolubles. Des travaux ont été réalisés sur les sulfures de nombreux métaux : Cu , Zn , Ni , Co , Cd , Ur, Pb , et le procédé industriel est actuellement utilisé pour le cuivre, l'uranium et le cobalt.

Le principe, schématisé à la figure 14.2, en est simple : les bactéries sont utilisées pour pomper les électrons fixés par le fer ferreux qui percole le minerai sulfuré :

Un fractionnement du minerai est nécessaire pour augmenter la surface de contact entre la

suspension bactérienne et le sulfure métallique, des déchets de fer (boites de conserve , etc.) servent de réservoir de fer. L'augmentation du prix de certains métaux (uranium, cuivre) a accru l'intérêt pour ce procédé d'extraction qui s'applique à des minerais à faible teneur : plus de 5 % du cuivre mondial est extrait par lixiviation bactérienne .

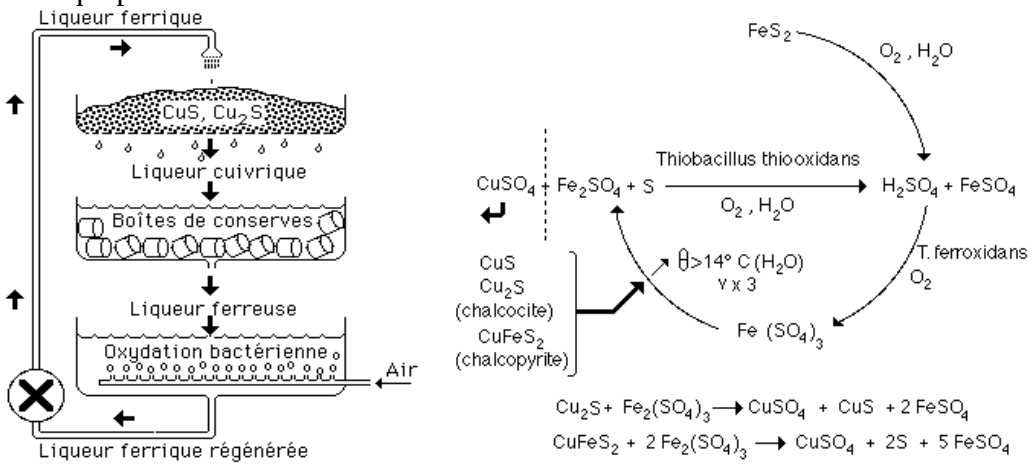


Fig. 14.2. Principe de l'extraction du cuivre par lixiviation bactérienne.

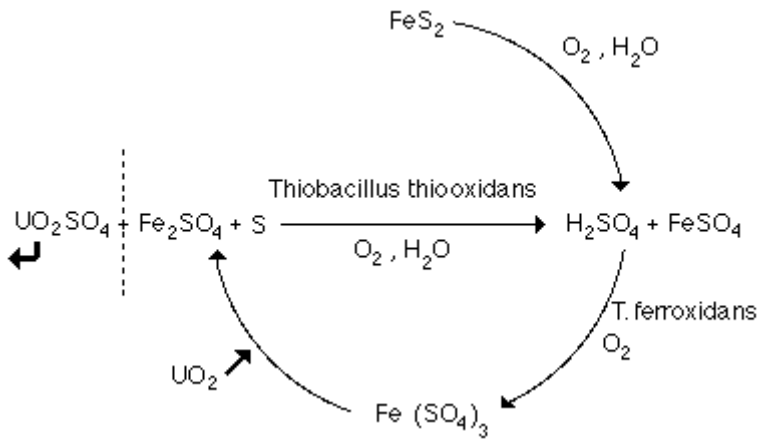


Fig 14.3. Lixiviation bactérienne de l'uranium.

15. LES PESTICIDES ET LES MICROORGANISMES DU SOL

15.1. GENERALITES

Le développement de l'emploi de produits organiques synthétiques pour combattre les adventices et les insectes, nématodes et microorganismes phytoparasites des plantes cultivées, date seulement d'une quarantaine d'années, après la découverte en 1939 de l'action insecticide du dichloro-diphényltrichloroéthane (DDT) et de l'action herbicide sélective contre les dicotylédones de l'acide 2-1- dichloro-phénoxy-acétique (2-4-D) (Fig. 15.1).

Dès cette époque, on avait remarqué que le 2-4-D persistait davantage dans un sol stérilisé que dans le témoin, ce qui suggèrait une intervention des microorganismes dans son élimination du sol. Des travaux ultérieurs sur la biodégradation des pesticides ont montré la dégradation du 2-4-D par de nombreux microorganismes, et d'une façon plus générale la grande variété des potentialités cataboliques des microorganismes envers les pesticides.

Au contraire le DDT s'est révélé être particulièrement stable et résistant à la biodégradation, et son usage intensif a mis en évidence de graves problèmes de pollution de l'environnement et de concentration dans les chaînes trophiques.

De nombreuses recherches portent donc sur le devenir des résidus de pesticides dans les plantes et les animaux.

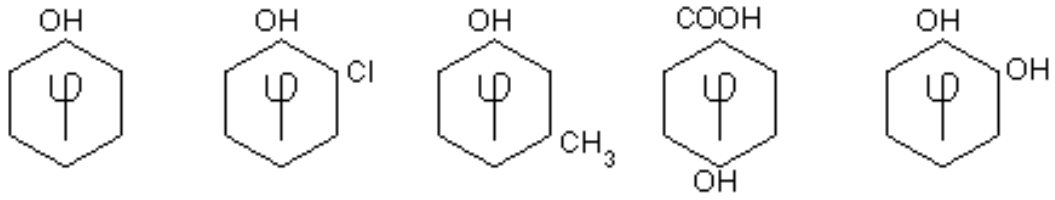
Nous ne considérons dans ce chapitre que l'action des microorganismes dans la décomposition des agents chimiques de protection des cultures, mais on ne doit pas oublier que ces substances peuvent également être éliminées et dégradées par d'autres mécanismes, comme le lessivage, la volatilisation, les oxydations chimiques ou photochimiques, et le métabolisme par les plantes ou les animaux. Enfin, malgré la diversité des activités microbiennes dans le sol, de nombreuses molécules organiques sont totalement résistantes à la biodégradation. On estime la persistance d'une substance par sa durée de demi-vie, c'est-à-dire par le temps nécessaire pour que sa concentration diminue de moitié. Certains pesticides ont des demi-vies de plusieurs années dans le sol.

15.2. METABOLISME MICROBIEN DES COMPOSES AROMATIQUES

De nombreux pesticides sont des composés aromatiques, c'est-à-dire dérivés du benzène ou de cycles hydrocarbonés voisins. L'ouverture du noyau benzénique est une réaction chimiquement difficile qui demande des réactifs puissants; il est frappant de constater qu'à l'inverse elle est facilement réalisée par les bactéries.

La décomposition des substances aromatiques par les microorganismes est un processus qui peut s'effectuer selon deux voies:

- en aérobiose, c'est la voie la plus efficace; les microorganismes comme les *Pseudomonas* ou les *Bacillus* procèdent par hydroxylation avant l'ouverture du noyau.
Le catéchol est un intermédiaire dans la décomposition du phénol et de l'acide benzoïque; il est ensuite dégradé par des oxygénases suivant deux voies métaboliques distinctes, selon les espèces microbiennes: par clivage en position *ortho* par la pyrocatéchase, et par clivage en position *meta* par la métapyrocatéchase.



Phénol — o-Chlorophénol — m-Crésol — Acide p-hydroxybenzoïque — Catechol

- en anaérobiose, l'ouverture du cycle aromatique est un processus réducteur relativement lent. La dégradation du benzoate procède selon six voies différentes:

1. Photométabolisme

Bactéries de la famille des Rhodospirillaceae

Composé aromatique + lumière ----------> CO2 + H2O

(*Rhodopseudomonas, Rhodomicrobium*)

2. Respiration du nitrate

Bactéries dénitrifiantes

Composé aromatique + NO3- ----------> CO2 + N2

(*Pseudomonas, Bacillus, Paracoccus, Alcaligenes*)

3. Réduction du fer ferrique

Bactéries réductrices du fer

Composé aromatique + Fe3+ ----------> CO2 + Fe2+

4. Respiration du sulfate

Bactéries sulfato-réductrices

Composé aromatique + SO42- ----------> CO2 + H2S

(*Desulfococcus, Desulfobacterium, Desulfosarcina, Desulfonema, Desulfotomaculum*)

5. Syntrophie

Bactérie syntrophique (*Syntrophus*)

Composé aromatique + H2O ----------> CO2 + CH4 (ou H2S)

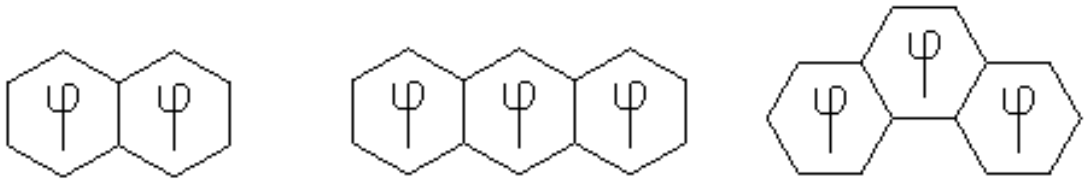
+ hydrogénotrophe (méthanogène ou BSR+SO42-)

6. Fermentation

Bactéries fermentaires inconnues

Composé aromatique + H2O ----------> CO2 + AGV

D'autres composés cycliques (naphtalène, phénanthrène) sont également oxydés, et leur décomposition a été étudiée. On constate par exemple que les composés portant des substituants "donneurs d'électrons" (OH, NH2) sont plus facilement oxydés que les composés portant des substituants " accepteurs d'électrons " (NO2-, SO3H2).



La dégradation des composés aromatiques complexes met en jeu des déshydratations, déshydrogénations, déchlorations, déméthylations, décarboxylations, désaminations... avant l'ouverture du cycle.

15.3. DECOMPOSITION DES PESTICIDES PAR LES MICROORGANISMES

En percolant une colonne de sol par une solution non renouvelée de 2-4-D (voir Fig. 4.1), on observe 3 phases dans la concentration du 2-4-D dans la solution. Tout d'abord une légère diminution qui est dûe à la rétention du produit par le sol, puis une longue phase stationnaire pendant laquelle la concentration ne change que très faiblement, enfin une phase exponentielle de disparition du 2-4-D qui correspond à la croissance d'une microflore adaptée, et qui se termine par la disparition du produit.

La vitesse de la consommation du 2-4-D par la microflore spécialisée dépend alors des paramètres habituels de la croissance microbienne : aération, température, pH , substrat , etc ...

Le mécanisme permettant l'adaptation de la microflore pendant la phase de latence n'est pas encore bien compris.

Cette adaptation peut se faire soit par mutation de certains individus soit par sélection d'organismes possédant l'équipement enzymatique nécessaire et induction de ces enzymes.

La dégradation du 2-4-D ajouté dans un sol ayant déjà reçu ce composé est plus rapide, ce qui indique que la microflore adaptée peut se maintenir pendant un certain temps.

Il est fréquent que le nombre d'atomes de chlore substitués ait une grande influence sur la résistance à la dégradation microbienne. Par exemple, si le 2-4-D est rapidement décomposé, le 2-4-5-T (acide trichlorophenoxyacétique) est extrèmement résistant. Il en est de même pour la nature de la chaîne en position 1 : le dérivé méthylé est décomposé 10 fois plus lentement que le 2-4-D.

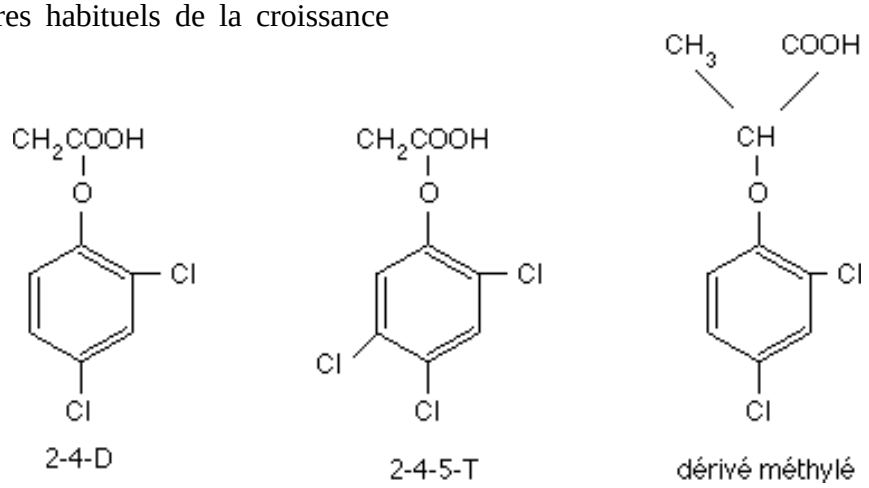
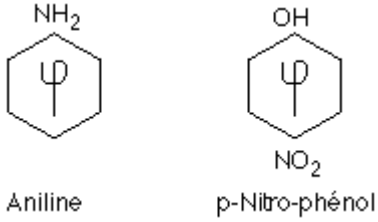


Fig. 15.1. Le 2-4-D et ses dérivés.

Le parathion, insecticide organophosphoré, est décomposé par de nombreux microorganismes du sol. En anaérobiose (sols submergés, rizières) il peut être hydrolysé en p-nitrophénol et phosphate ou réduit en p-aminoparathion. Le malathion (autre organophosphoré) est également dégradé par des bactéries

comme les *Rhizobium* ou des champignons tels que les *Trichoderma*.



Les phénylcarbamates, phénylurée et autres composés dérivés de l'aniline sont utilisés comme fongicides, herbicides ou insecticides. Ils sont dégradés par les microorganismes du sol avec libération de l'aniline et du chlore. Ces produits (Monuron, Linuron, Chloroxuron, Propham, Propanil, Solan , etc..) sont décomposés par une microflore spécialisée (*Achromobacter, Aspergillus, Penicillium, Pseudomonas* , etc....).

La décomposition microbienne des herbicides de contact (Paraquat, Diquat) est également assez rapide, en particulier par une levure (*Lipomyces starkeyi*) qui utilise ces composés comme source d'azote, ou par un *Pseudomonas* .

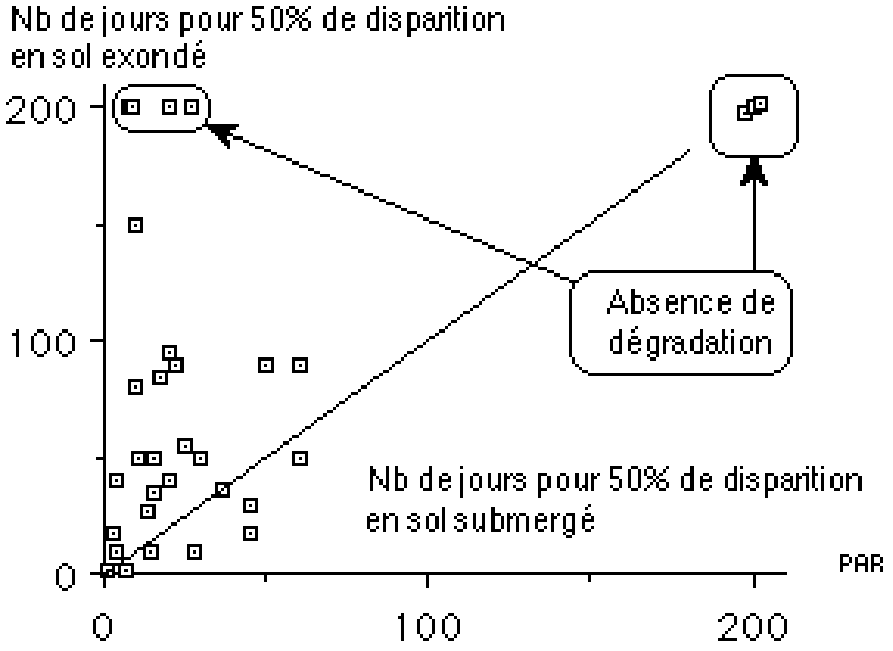


Fig. 15.2. Comparaison de la stabilité de pesticides en sol submergé et en sol exondé.

15.4. INFLUENCE DES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU SOL

La plupart des travaux ayant porté sur des sols exsondés en climat tempéré, on a longtemps considéré comme récalcitrants ou très résistants à la biodégradation certains composés organochlorés ayant une période de demi-vie très longue dans cet environnement. Il semble en fait que dans d'autres conditions (sol submergé, climat tropical) ces mêmes pesticides puissent être dégradés. On constate, d'une façon générale que de nombreux pesticides sont plus rapidement dégradés dans les sols submergés que dans les sols exondés (Fig 15.2).

Par exemple, le lindane qui est résistant en conditions aérobies est dégradé rapidement en anaérobiose par plusieurs bactéries qui utilisent ce composé comme seule source de carbone. La vitesse de la dégradation est alors fonction de la température, et de l'apport de matière organique fraîche. L'effet stimulant de la matière organique est plus marqué dans les sols initialement pauvres en matière organique. On montre enfin que l'oxygène, le nitrate ou l'oxyde de manganèse qui empêche la baisse du potentiel d'oxydoréduction dans le sol submergé, retardent la biodégradation du lindane.

Le cas du DDT est différent : cet organochloré persiste pendant plusieurs années en sol exondé, mais en conditions anaérobies il est déchloruré en DDD (dichloro-diphényl-dichloroéthane) qui s'accumule car ce composé est lui-même résistant à la dégradation. L'accumulation de DDD dans les sols inondés pose également de graves problèmes de pollution, le DDD étant toxique comme le DDT.

15.5. ROLE DU COMETABOLISME DANS LA DEGRADATION DES PESTICIDES

Une dégradation, au moins partielle, de certains pesticides peut également intervenir par le mécanisme du cométabolisme, c'est-à-dire par oxydation de ces composés s'ils sont des analogues structuraux de métabolites normaux .

Le terme de cométabolisme a été employé en premier par Foster qui étudiait l'oxydation des hydrocarbures par Nocardia. Ce protoactinomycète utilise l'hexadécane comme seule source de carbone et d'énergie, mais ne peut pas utiliser le méthylnaphtalène. Ce composé est pourtant oxydé par une culture sur hexadécane.

De la même façon, certains pesticides dont le 2 1-5-T ou l'acide 2,3,6 trichlorobenzoique peuvent être dégradés par cométabolisme par les bactéries utilisant le benzoate .

190

16. CONCLUSION

Si les microorganismes n'intervenaient pas dans l'écosystème sol-végétation, les composés carbonés photosynthétisés s'accumuleraient et on aboutirait à un blocage sous forme organique de la réserve planétaire de CO_2 et à un épuisement rapide des réserves minérales, d'où arrêt de toute vie végétale à la surface du globe. Les microorganismes sont responsables de 80 à 90 % de l'oxydation biologique totale.

Parallèlement à la décomposition, les microorganismes sont les agents d'activités spécifiques comme la fixation de l'azote ou diverses transformations des éléments minéraux. Ils facilitent aussi l'absorption des éléments nutritifs par les plantes: c'est en particulier le cas des mycorhizes.

Les processus biologiques du sol (surtout microbiens) sont aussi responsables de la formation et de la décomposition des fractions humiques, qui constituent les réserves organiques du sol.

Les microorganismes peuvent encore jouer un rôle important dans le contrôle des phytopathogènes et la dégradation des substances phytotoxiques du sol.

La fixation biologique de N_2 et la mycorhization, qui se manifestent de façon spontanée dans les environnements naturels et dans les systèmes de culture traditionnels, ont souvent permis des productions agicoles modeste mais constante à long terme, en particulier dans les systèmes culturaux incluant une jachère à base de légumineuses et les rizières tropicales. Par contre, l'utilisation des fixateurs de N_2 et des mycorhizes dans une agriculture à forte productivité se heurte souvent à des problèmes technologiques et socio-économiques.

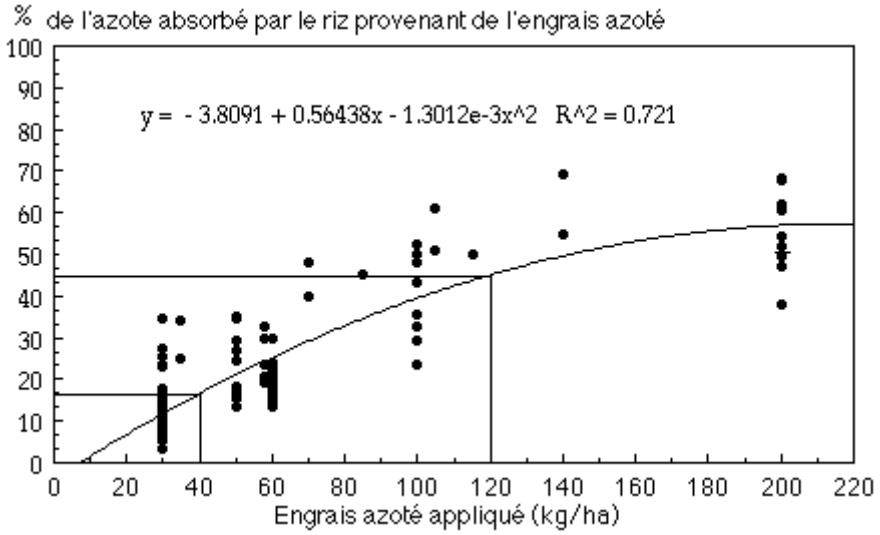


Fig. 16.1. Origine de l'azote absorbé par le riz à différents niveaux de fertilité azotée
(tracé à partir des valeurs publiées par Broadbent et al. 1989, IAEA 1970, John et al. 1989 et de résultats non publiés fournis par R. Buresh, IRRI)

Dans le cas des fixateurs libres (bactéries hétérotrophes et cyanobactéries), un potentiel azoté bas ou modéré ainsi que des problèmes technologiques (en particulier l'absence d'établissement des souches inoculées), empêchent le développement de méthodes technologiquement et économiquement rentables.

Dans le cas des engrais verts (Azolla et des légumineuses), le potentiel azoté est élevé mais son l'utilisation est souvent limitée par des facteurs socio-économiques, en particulier dans les pays tropicaux.

Le rôle des mycorhizes est maintenant relativement bien connu, toutefois les aspects appliqués sont encore relativement peu développés par rapport aux potentialités identifiées. Là encore, l'établissement des souches inoculées est un facteur limitant majeur. La production d'inoculum se heurte également à des problèmes pratiques pour les souches que l'on ne peut cultiver en l'absence de la plante hôte.

A l'origine, les recherches sur l'utilisation pratique des biofertilisants avaient pour but principal de mettre au point des méthodes bon marché pour remplacer les engrais de synthèse. A cet aspect est venu s'ajouter récemment la préoccupation de la conservation à long terme de la fertilité des sols. Aux niveaux de fertilisation employés en agriculture, la quantité d'azote absorbé par la plante qui provient du sol est supérieure à celle provenant de l'engrais (Fig 16.1). Il est donc possible que l'intensification culturale se traduise par une diminution à long terme de la fertilité du sol.

L'utilisation volontaire des microorganismes en agriculture et en sylviculture est actuellement limitée. Il faut toutefois garder présent à l'esprit que l'engrais azoté de synthèse provient de ressources non renouvelables et qu'à long terme, la mise au point de technologies moins perturbantes pour les écosystèmes cultivés et leur environnement que celles fondées sur l'utilisation élevée d'agrochimiques, deviendra une nécessité.

Cela nécessite la continuation de recherches multidisciplinaires, incluant les aspects microbiologiques, technologiques et économiques, sur: les systèmes fixateurs d'azote les mycorhizes. Les microorganismes producteurs de substances régulatrices de croissance les microorganismes solubilisant le phosphore les biopesticides

L'évaluation économique des technologies d'utilisation des biofertilisants doit prendre

en compte, dans la mesure du possible, les effets à long terme sur la fertilité des sols et sur l'environnement.

La réalisation des objectifs agronomiques du développement durable passe par la mise au point de méthodes de cultures qui combinent (1) les potentialités des systèmes biologiques des sols, en particulier celles des populations microbiennes, (2) l'utilisation des méthodes de contrôle intégrées des parasites et prédateurs et (3) une utilisation raisonnée des agrochimiques.

References

1. Alexander M (1977) Introduction to soil microbiology, 2nd edition. J. Wiley and Sons Inc. NY, 467pp.
2. Dirk van Elsas J, Trevors JT, Wellington EMH (eds.) (1997) Modern soil microbiology. M. Dekker pub. 684pp.
3. Dommergues Y (1968) La biologie des sols. "Que sais-je" n° 399. Presses Universitaires de France 127pp.
4. Dommergues Y, Mangenot F (1970) Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie. Paris. 796pp.
5. Hattori T (1973) Microbial life in soil, an introduction. Marcel Dekker Inc. 427pp.
6. Metting FB Jr (1992) Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental magement. Marcel Dekker Inc. NY. 646pp.
7. Paul EA, Clark FE (1989) Soil microbiology and biochemistry. Acad. Press Inc. San Diego 273pp.