



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

École Doctorale RP2E

Université Henri Poincaré
Faculté des sciences et techniques
UFR Sciences et Techniques
Matières et Procédés (STMP)

Université de Cocody, Abidjan
Faculté des sciences
UFR Sciences de la Terre et des
Ressources Minières (STRM)
22 BP 582 Abidjan 22

THÈSE en Co-tutelle

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

en SCIENCE DU SOL Option: Géomicrobiologie

Par

Affi Jeanne BONGOUA DEVISME

Implications des communautés bactériennes ferri-réductrices et des paramètres environnementaux dans le fonctionnement et la qualité des sols de rizières (Thaïlande et Côte d'Ivoire)

Soutenue publiquement le 10 Juillet 2009

Membres du Jury:

Rapporteurs :	MM. Pierre RENAUD	<i>Directeur de Recherche à l'INRA, Avignon, FRANCE</i>
	Jean Charles MUNCH	<i>Professeur, Technical University of Munich , ALLEMAGNE</i>
Examineurs:	MM. Albert YAO-KOAME	<i>Professeur, Université de Cocody, UFR STRM , CÔTE D'IVOIRE (Co-directeur de thèse)</i>
	Roland POSS	<i>Directeur de Recherche à l'IRD, Montpellier, FRANCE (Président)</i>
	Sitapha DIATTA	<i>Chercheur Principal , Centre du riz pour l'Afrique (ADRAO), CÔTE D'IVOIRE (invité)</i>
	Christian MUSTIN	<i>Chargé de recherche au CNRS-UHP –LIMOS, Nancy 1, FRANCE (Co-directeur de thèse)</i>
	Jacques BERTHELIN	<i>Directeur de Recherche au CNRS-UHP-LIMOS, Nancy 1, FRANCE (Directeur de thèse)</i>
	Réné Gballou YORO	<i>Directeur de recherche au CNRA (LSEP), CÔTE D'IVOIRE (Co-directeur de thèse)</i>



LIMOS

Laboratoire des Interactions Microorganismes
Minéraux Matières Organiques dans les Sols
UMR 7137, CNRS-UHP Nancy Université,
Faculté des sciences et Techniques, BP 70239
54506 Vandoeuvre -Lès Nancy Cedex (France)



Laboratoire central Sols, Eaux, Plantes
BP 602 Gagnoa (Côte d'Ivoire)

Remerciements

Cette thèse a pu se réaliser grâce à la bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique du Gouvernement de la République de Côte d'Ivoire. Merci d'avoir rendu possible ce travail.

Tout a commencé à notre arrivée (n'est pas Emile !!) au DEA National de Science du sol à Nancy avec deux mois de retard. Tous les cours étaient pratiquement achevés. Les responsables du DEA se demandaient s'il fallait nous accepter et participer aux examens ou attendre une nouvelle année universitaire. A ce niveau, j'exprime toute ma reconnaissance à M. Jacques Berthelin, mon directeur de thèse, pour avoir insisté auprès de ses collègues afin qu'ils nous acceptent malgré notre retard. Donc merci beaucoup M. Jacques Berthelin de m'avoir accordé cette chance. Mes remerciements s'adressent aussi à mon co-directeur de thèse, Christian Mustin qui m'apprit l'essentiel sur la microbiologie dont je n'avais aucune notion à mon arrivée. Merci à vous deux de m'avoir fait confiance en me proposant cette thèse et de l'aide que vous m'avez apporté pendant tout ce travail.

Ma reconnaissance va aussi aux présidents des Universités de Cocody Abidjan-Côte d'Ivoire et de l'Université Henri Poincaré de Nancy I, pour avoir ratifié la convention de co-tutelle, au Professeur BIEMI Jean, Doyen de l'UFR STRM, pour m'avoir permis d'effectuer la thèse en co-tutelle à l'UFR STRM, à Feu Professeur Pothin Kablan et à l'ensemble des enseignants qui m'ont encadrée en me gratifiant d'une formation de qualité tout au long de mon cursus universitaire.

Ma très grande gratitude va à feu professeur ASSA Ayémou, Directeur de ma thèse à l'Université de Cocody, de m'avoir recommandé pour ce DEA, puis d'avoir été l'un des artisans de la co-tutelle mais qui, malheureusement, nous a quittés quelques mois avant de voir ce travail achevé. Son amour pour la pédologie m'a poussée, dès la première année à l'Université, à m'orienter dans cette voie. Que la terre lui soit légère. Mes remerciements s'adressent aussi à M. Albert Yao-Kouamé qui lui a succédé en tant que professeur et co-directeur de cette thèse.

Je remercie également, Corinne Leyval, directrice du LIMOS, pour m'avoir très gentiment accueillie au sein de son laboratoire et mis à ma disposition les équipements ainsi que les compétences de son équipe.

J'adresse mes remerciements au Directeur Général du CNRA, Dr YO Tiémoko, pour avoir accepté le projet de convention entre le CNRA et LIMOS-CNRS, qui m'a permis de réaliser une partie de mes travaux au sein de la structure qu'il dirige.

Je remercie aussi très sincèrement et chaleureusement Dr YORO Gballou René, Directeur du Laboratoire Central Sols, Eaux, Plantes du CNRA à Gagnoa, d'avoir codirigé cette thèse. Il a toujours su être un maître du conseil, d'une grande disponibilité lors de la réalisation de mes travaux de terrain à Gagnoa, en Côte d'Ivoire.

Je suis très honorée que les professeurs Jean Charles Munch et Pierre Renault, aient accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je tiens également à remercier M. Roland Poss d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et d'y représenter l'IRD malgré son temps déjà très occupé. Je suis particulièrement reconnaissante à M. Sitapha Diatta pour ses nombreuses et pertinentes remarques, et pour sa disponibilité malgré l'éloignement. J'en profite aussi pour vous exprimer toute ma gratitude.

Mes remerciements vont aussi au Directeur des programmes d'Appui au Développement du CNRA, Dr ADIKO Amoncho, qui a été d'un appui important pour la réalisation de la thèse en co-tutelle. Je remercie également Emmanuel Kassin grâce à qui la mission à Gagnoa a été une réussite. Je suis également redevable envers Aurélie Cébron dont les compétences en biologie moléculaire et l'anglais savant ont été une aide précieuse au travers de tous ces articles et expériences. Tu m'as permis de découvrir et de comprendre la "biomol". Je tiens également à remercier vivement Dr. KELI Zagbahi Jules, Directeur de recherche et Directeur régional du CNRA de Man, pour ses conseils.

J'adresse mes sincères remerciements à toute l'équipe de l'IRD et à celle de Land Department and Development (Bangkok) dans le cadre du projet TICA (Thailand International Cooperation Agency) qui ont effectué la plupart des mesures et les prélèvements des échantillons de sol de Thaïlande.

Je rends hommage à toutes les personnes qui m'ont aidé, de près ou de loin, pour la prise des mesures et la mise en œuvre de mes expériences : Jojo, Christine, David, Hervé, Géraldine, Nadim, Emmanuelle Montarges ainsi que Jafar (pour la magie de l'infiniment petit). Un coucou à mon seul frère de Nancy, Emile Bolou Bi, reste toujours serviable et beaucoup de courage dans ta rédaction de thèse.

Au cours de ces 5 années, je n'oublierai jamais ma deuxième famille, celle du « labo », avec laquelle j'ai partagé les bons comme les mauvais moments : Chanchan (pour sa gentillesse), Thierry (et ses blagues), Jojo, Christine, Colette (merci pour tes corrections et tes remarques constructives apportées). Un grand merci à tous mes collègues de travail devenus des amis : Zaz, Paul olivier, Arsène, Emile, Clarisse, Brice, Elsa, Goshia, Cecile, Babou. J'ai vécu de bons moments au sein du LIMOS, grâce à tous ceux déjà cités et bien d'autres : Anne, Patrik, Sylvie Dousset, Dominique, Sylvie Desobry, Jean Pierre, Fabien, je garderai des souvenirs inoubliables de cette époque.

Je n'oublie pas non plus mes sœurs et frères : Alika, Mado, Léa, Janine, Marc, Yolande, Chantal ainsi que ma belle-mère Assoh Marie que je remercie infiniment pour leur soutien et prières. Je tiens également à remercier Lucie Kablan, mon amie et sœur. On a tellement traversé des choses ensemble que ma joie sera immense lorsque tu achèveras ta thèse. Merci pour ton soutien sans faille. Un coucou à Yann, Nestor, Etienne, Aloïs, François, Sévérine, Ernest et Irebé Roland (pour ton aide financière et tes conseils).

Un Merci tout particulier à ma famille adoptive : Mémé, Pépé, Maman Simone, Céline, Daniel, Martine, Gigi, Christine, Adeline, Hélène, pour m'avoir adopté comme leur fille ou sœur.

Je remercie toute la communauté ivoirienne de Nancy et agglomération (CINA) : Moyamed, Mariam, Elise, Mamadou, Fanta, Nadège, Adou, Abou, Isabelle, Assielou, ... et tous ceux dont j'ai omis le nom. Un merci particulier à Nadège pour ton aide précieuse, tu as permis que je termine cette thèse en me gardant Simon. Merci beaucoup.

Merci aux cadres d'Andé en particulier M. FAITAI Aney et ASSOUMOU Méa, pour l'aide financière qu'ils m'ont apporté et qui m'a permis de me rendre à Nancy. Mes pensées vont aussi à l'endroit de M. TCHICOU Antoine, mon professeur de Mathématiques (6^{ème} à 3^{ème}), devenu un père pour moi, Merci de m'avoir toujours soutenue.

Je ne peux conclure cet avant-propos sans remercier celui qui m'a toujours soutenu et épaulé dans les galères. Olivier, j'aimerais te dire tout simplement : merci d'être entré dans ma vie. C'est à toi, mon autre, que cette thèse est dédiée...

Un Coucou à Mon bébé Simon qui, déjà très petit, a rédigé une thèse. Ta gentillesse et ton calme m'ont permis d'achever la rédaction de la thèse. Je te remercie et je te la dédie.

Dédicaces

Je dédicace cette thèse en Mémoire :

- ❖ des Professeurs ASSA Ayémou et Pothin KABRAN trop tôt disparus, je leur rends hommage pour leur soutien dès mon arrivée à l'université de Cocody, mais qui, malheureusement, n'ont pas pu voir ce travail achevé.
- ❖ de mon père ASSOUMOU Bongoua et de ma mère ASSA Dassoh Suzanne: vous avez toujours eu confiance en moi et m'avez encouragé à poursuivre dans cette voie. J'aurai aimé que vous soyez là aujourd'hui.

Listes des figures et des tableaux

Figures

Figure 1. 1 : Schéma général de l'écosystème des sols de rizières d'après Roger (1996)	18
Figure 1.2 : Schéma réactionnel des oxydes de fer, états et propriétés d'échange. Les traits verticaux représentent la surface d'un oxyde de fer avec des charges : positives (+) en milieu acide (a), neutres (O) au point isoélectrique à pH 8-9 (b) et négatives (-) en milieu alcalin (c) d'après Herbillon, (1994), Berthelin et al., (2005)	24
Figure 1.3 : Diagramme de Pourbaix (Eh, pH, Fer et O ₂) d'après Charlot (1983) et McBride (1994)	30
Figure 1.4 : Différents compartiments présents dans les sols de rizières d'après Liesack et al.,(2000)	32
Figure 1.5 : Coupe transversale d'une toposéquence montrant le mouvement du fer et le processus de réduction d'après ADRAO (2002)	33
Figure 1.6 : A- Zone de résurgence de la nappe souterraine à la lisière du bas-fond, là où l'eau stationnaire et l'eau de la pente se rencontrent. Noter à la surface du sol, la couleur rougeâtre du fer ferrique devenant plus pâle sous le processus de réduction ; B-Oxydation du fer à la surface des eaux ; C- Toxicité ferreuse au niveau des feuilles (brunissement) dans les rizières de la région de Gagnoa en Côte d'Ivoire.....	34
Figure 1. 7 : Principaux faciès des sols salins d'après Loyer et al., (1989)	36
Figure 1.8 : Différentes parties du plant de riz d'après Monty (1995)	41
Figure 1.9 : Présentation schématique de la transformation de l'azote dans les zones oxydées et réduites de la rhizosphère du riz d'après Reddy & Patrick (1986)	43
 Figure 2.1: A-Présentation des sites d'étude de Thaïlande où les parcelles présentes des zones salines. C : carte de conductimétrie. B et D: Parcelles rizicoles (L14 et L25) avec des zones salines (S) et non salines (NS) selon le mode de gestion (Quantin et al., 2004).....	48
Figure 2.2: A- Site d'étude (en Côte d'Ivoire) ; B- casiers rizicoles ; C- brunissement des feuilles dû à la toxicité ferreuse ; D- oxydation du fer à la surface des eaux des casiers rizicoles.....	51
Figure 2.3 : Microplaques révélant les activités bactériennes ferri-réductrices avec les différents changements de couleur du milieu correspondant à la réduction-dissolution de l'oxyde utilisé (goethite).	54
Figure 2.4 : Appareil de dégazage : Anoxomat avec la jarre. Sols incubés en Batch (flacon)	55

Figure 3.1 : Carte de conductivité électrique (mS.m^{-1}) dans la partie superficielle des sols. L14S : parcelle non amendée et saline ; L14NS : parcelle non amendée et non saline ; L25S : parcelle amendée et saline ; L25NS : parcelle amendée et non saline (Quantin et al., 2008).....	73
Figure 3.2 : Quantité de fer des solutions de sols dans quatre parcelles de sol de Thaïlande à 10, 25 et 45cm de profondeur après repiquage du riz. (Quantin et al., 2008).	77
Figure 3.3 : Description des profils dans les casiers rizicoles plantés ou non en riz (site station de recherche de Gagnoa).....	78
Figure 3.4 : Caractères morphologiques des sols le long de la toposéquence de la station CNRA de Gagnoa	80
Figure 3.5 : Caractères morphologiques des sols le long de la toposéquence de Guéssihio.....	81
Figure 3.6 : Teneurs en cations majeurs (mmol.l^{-1}) des eaux prélevées aux différents points : Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp) sur les sites de Gagnoa (GAG) et de Guéssihio (GUES).....	97
Figure 3.7 : Teneurs en anions majeurs (mmol.l^{-1}) des eaux prélevées aux différents: Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp) sur les sites de Gagnoa (GAG) et de Guéssihio (GUES).....	98
Figure 3.8: Teneurs (mg.l^{-1}) des différents acides organiques et du carbone organique dissout (COD) des eaux prélevées aux différents points : Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp) sur les sites de Gagnoa (GAG) et de Guéssihio (GUES).....	99
Figure 3.9: Evolution des teneurs en éléments majeurs (mg.l^{-1}) des eaux prélevées aux différents points : Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp) durant la grande saison sèche (0 (novembre 2007) à 120 (mars 2008) jours) et la grande saison de pluies (120 (mars) à 240 (juillet 2008) jours) sur le site de Gagnoa (GAG)	100
Figure 3.10: Evolution des teneurs en éléments majeurs (mg.l^{-1}) des eaux prélevées aux différents points: Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp) durant la grande saison sèche (0 (novembre 2007) à 120 (mars 2008) jours) et la grande saison de pluies (120 (mars) à 240 (juillet 2008) jours) sur le site de Guéssihio (GUES)	101
Figure 3.11: Analyse corrélative linéaire entre le fer ferreux et le sulfate en (mg.l^{-1}) des eaux prélevées à Guéssihio (GUES) aux différents points de prélèvement (Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp). Matrice de corrélation de Pearson à $p < 5\%$ et $n=7$	102
Figure 4.1 : Présentation des parcelles étudiées. L14 : parcelle non amendée ; L25 : parcelle amendée. NS : zone non saline ; S : zone salin. Amendements organiques (M.O.)	109
Figure 4.2 : Effet de l'amendement organique sur les communautés bactériennes cultivables. L14 : parcelle non amendée, L25 : parcelle amendée. IRB : Bactéries ferri –réductrices ; SRB : Bactéries sulfato –réductrices. NPP (nombre de bactéries le plus probable).....	110

Figure 4.3 : Effet de la rhizosphère sur les communautés bactériennes cultivables. S (zone saline) ; NS (zone non saline). L14 : parcelle non amendée ; L25 : parcelle amendée. IRB : Bactéries ferri – réductrices ; SRB : Bactéries sulfato–réductrices ; Aé : aérobie ; Anaé : anaérobie. R : rhizosphérique ; NR : non rhizosphérique. NPP (nombre de bactéries le plus probable) Lettres (a,b): différence significative entre les moyennes des bactéries dénombrées sur sol rhizosphérique (R) et sol non rhizosphérique (NR) (Test de Student à $P_r < 5\%$)..... 111

Figure 4.4 : Effet de la salinité sur les communautés bactériennes cultivables. Aé : aérobie ; Anaé : Anaérobie ; IRB : bactéries ferri-réductrices. L14 : parcelle non amendée, L25 : parcelle amendée. S: salin ; NS : non salin ; + : addition de $8g.l^{-1}$ NaCl. NPP (nombre de bactéries le plus probable) Lettres (a,b): différence significative entre les moyennes des bactéries dénombrées sur le milieu sans ajout de sel et avec ajout de sel (Test de Student à $P_s < 5\%$) 112

Figure 5.1 : Différentes communautés bactériennes cultivables dénombrées sur les parcelles **plantées (Plté)** en riz (F1,G1) et **non plantées (N Plté)** en riz (A15,G1') du site de Gagnoa (GAG) et du site de Guéssihio (GUES). Totale : Aérobie + Anaérobie ; Ferri= IRB + BrFe; SRB (Bactéries sulfato réductrices). a,b,c : groupes homogènes entre les différentes communautés bactériennes selon le test de Student de Newman- Keuls, avec $p < 0,05\%$ 170

Figure 5.2 : Evolution des paramètres (pH, Eh, **acétate ou glucose** consommé) du milieu BrFe en fonction du temps d'incubation (jours) en présence des consortia bactériens (F1 et G1) (biotique) et dans les témoins (abiotique)..... 172

Figure 5.3: Fer solubilisé (fer réduit et fer total) en fonction du temps d'incubation (jours) par les consortia bactériens (F1 et G1) dans le milieu BrFe avec le **glucose** (Glu) ou l'**acétate** (Acé). 173

Figure 5.4: Corrélations entre le fer ferreux et le pH du milieu BrFe avec acétate ou glucose au cours de 30 jours d'incubation à $p < 0,001$ 175

Figure 5.5 : Corrélation linéaire entre le fer ferreux et le Eh du milieu BrFe avec acétate ou glucose au cours de 30 jours d'incubation à $p < 0,001$ 176

Figure 5.6 : Corrélation linéaire entre le fer ferreux et la source de carbone (glucose ou acétate) consommée pendant 30 jours d'incubation à $p < 0,001$ 176

Figure 5.7 : Gels de TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) montrant les différents profils, des consortia bactériens (F1 et G1) isolés sur les parcelles plantées en riz, obtenus par la technique de PCR-TTGE sur l'ADNr 16S, après 30 jours de culture dans le milieu Bromfield (BrFe), avec, soit du glucose (BrFe+Glu), soit de l'acétate (BrFe+Acé) 178

Figure 6.1: Analyse corrélative linéaire entre la solubilisation du fer sous forme ferreuse (Fe^{2+}) et la minéralisation des matières organiques au cours des incubations des traitements biotiques. 193

Figure 6.2: Gel de TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) montrant les différents profils moléculaires des échantillons de sols incubés sans apport de nutriments au début (t=0 jour) et à la fin (t=30 jours) de l'incubation. Bandes 1 à 19 : espèces identifiées.	194
Figure 6.3 : Gel de TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) montrant les différents profils moléculaires de l'échantillon de sol L14NS sols incubé sans apport de nutriment et du consortium bactérien isolé (S8) sur milieux spécifiques avec du glucose et de l'acétate au début (t=0 jour) et à la fin (t=30 jours) de l'incubation. Bandes 1 à 8 : espèces identifiées.	196
Figure 6.4 : Gel de TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) montrant les différents profils moléculaires de l'échantillon de sols L14S sol incubé sans apport de nutriment et des consortia bactériens isolés (S2 et S6) sur milieux spécifiques, avec du glucose et de l'acétate, au début (t=0 jour) et à la fin (t=30 jours) de l'incubation. Lettres : espèces identifiées.....	196
Figure 6.5: Gel de TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) montrant les différents profils moléculaires de l'échantillon de sols L25S incubés sans apport de nutriments et du consortium bactérien isolé (S1) sur milieux spécifiques avec du glucose et de l'acétate au début (t=0 jour) et à la fin (t=30 jours) de l'incubation. Bandes 1 à 6 : espèces identifiées.	197
Figure 6.6: Gel de TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) montrant les différents profils moléculaires de l'échantillon de sols F1total et du consortium bactérien isolé (F1) sur milieux spécifiques, avec du glucose et de l'acétate au début (t=0 jour) et à la fin (t=30 jours) de l'incubation. Chiffres et lettres: espèces identifiées.....	198
 Figure 1 : Arbre phylogénétique basé sur des alignements des séquences de l'ADNr 16S pour les espèces bactériennes identifiées sur les sols de rizières de Thaïlande et Côte d'Ivoire et référencées dans Genbank et choisies selon l'arbre phylogénétique global des <i>Thiobacillus prosperus</i> . Les valeurs de Bootstrap de l'analyse (n=100) sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures 60%. La méthode neighbor-joining a été utilisée avec le logiciel PHYLIP 3,65. Les barres représentent 10% des variations de séquences.	208
Figure 2 : Schéma de Synthèse générale des mécanismes impliqués dans la dynamique du fer dans les sols de rizières de Thaïlande	212
Figure 3 : Schéma de Synthèse générale des mécanismes impliqués dans la dynamique du fer dans les sols de rizières de Côte d'Ivoire.....	213

Planches

Planche 3.1 : Observation (MET) et analyse spectroscopique (EDS) des échantillons de sol du sommet (C1)	94
Planche 3.2 : Observation (MET) et analyse spectroscopique (EDS) des échantillons de sol étudiés : Mi- versant (C5).....	95

Planche 3.3 : Observation (MET) et analyse spectroscopique (EDS) des échantillons de sol de bas-fond (F1,G1).....	96
--	----

Tableaux

Tableau 1.1 : Concentration du fer dans les différentes roches mères d'après Coughtrey & Thorne (1983)	19
Tableau 1.2 : Propriétés générales des principaux oxydes et oxyhydroxydes de fer d'après Cornell & Schwertmann, (1996) avec $pFe = -\log[Fe]$	21
Tableau 1.3 : Comparaison des processus de fermentation et de respiration d'après Fenchel et al., (1998)	27
Tableau 1.4 : Processus de réduction bactérienne se produisant dans un sol engorgé d'après Yoshida (1976); Berthelin (1982)et Berthelin & DE Giudici (1991)	31
Tableau 2.1 : Protocole d'extractions séquentielles réalisées sur les échantillons de sols pour 100 mg de sol sec	63
Tableau 3.1 : Analyse élémentaire organique et Anions hydrosolubles à l'eau (rapport sol/solution : 1/10) sur les échantillons (0-20cm) de sols de Thaïlande.	73
Tableau 3.2 : Analyse élémentaire des échantillons de sol des parcelles de Thaïlande. L14: parcelle non amendée ; L25 : parcelle amendée ; S : zone saline ; NS : zone non saline. Eléments totaux après fusion alcaline. Pf : Perte au feu. Eléments hydrosolubles (extraits à l'eau ; rapport sol/solution : 1/10)	74
Tableau 3.3 : Analyse des différentes formes de fer présent dans les échantillons de sol des parcelles de Thaïlande. L14: parcelle non amendée ; L25 : parcelle amendée ; S : zone saline ; NS : zone non saline. Fe_{hydro} : Fe hydrosoluble extrait à l'eau ; $Fe_{éch}$: Fe échangeable extrait par KCl (1M); Fe_{acido} : Fe acidosoluble extrait par HCl (0,5N); Fe_{Tamm} : Fe extrait par l'oxalate d'ammonium ; Fe_{CBD} : Fe extrait par le Citrate –Bicarbonate-Dithionite ; Fe_{pyro} : Fe extrait par le pyrophosphate de sodium (0,1M) ; Fe_{total} : Fe total dosé après fusion alcaline	76
Tableau 3.4 : Rapports des différentes formes du fer. L14: parcelle non amendée ; L25 : parcelle amendée ; S : zone saline ; NS : zone non saline.	76
Tableau 3.5 : Caractères morphologiques du profil du casier rizicole cultivé (F1)	78
Tableau 3.6 : Caractères morphologiques du profil du casier rizicole non cultivé (A15)	79
Tableau 3.7 : Caractéristiques physiques des horizons de sols de Côte d'Ivoire échantillonnés le long d'une toposéquence sur les deux sites d'étude. (A: argiles; Lf: limons fins ; Lg: limons grossiers; Sf: sables fins; Sg: Sables grossiers). ^(a) Granulométrie déterminée par la méthode de la pipette Robinson-Köln.	82

Tableau 3.8 : Caractéristiques chimiques des horizons de sols de Côte d'Ivoire échantillonnés le long d'une toposéquence sur les deux sites d'étude (Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz ; A15 et G1' : Parcelles non plantées.	83
Tableau 3.9 : Analyses des éléments solubles à l'eau (rapport sol/ solution, 1/10) des horizons de sols de Côte d'Ivoire échantillonnés le long d'une toposéquence sur les deux sites d'études. Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz.....	84
Tableau 3. 10 : Analyse élémentaire des horizons de sols de Côte d'Ivoire échantillonnés le long d'une toposéquence sur les deux sites d'étude. Eléments totaux extraits par fusion alcaline. Pf : Perte au feu. Soufre (S) total par combustion sèche. NA : Non Analysé ; Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz.....	85
Tableau 3.11 : Répartition des différentes formes de fer dans les horizons de sols de Côte d'Ivoire échantillonnés le long d'une toposéquence sur les deux sites. Fe_{hydro} : Fe hydrosoluble extrait à l'eau ; $Fe_{éch}$: Fe échangeable extrait par KCl (1M); Fe_{acido} : Fe acidosoluble extrait par HCl (0,5N); Fe_{Tamm} : Fe extrait par l'oxalate d'ammonium ; Fe_{CBD} : Fe extrait par le Citrate –Bicarbonate-Dithionite ; Fe_{Pyro} : Fe extrait par le pyrophosphate de sodium (0,1M) ; Fe_{total} : Fe total obtenu après fusion alcaline. Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz.....	88
Tableau 3.12 : Répartition des différentes formes d'aluminium dans les horizons de sols de Côte d'Ivoire échantillonnés le long d'une toposéquence sur les deux sites. Al_{hydro} : Al hydrosoluble extrait à l'eau ; $Al_{éch}$:Al échangeable extrait par KCl (1M); Al_{acido} : Al acidosoluble extrait par HCl (0,5N); Al_{Tamm} : Al extrait par l'oxalate d'ammonium ; Al_{CBD} : Al extrait par le Citrate –Bicarbonate-Dithionite ; Al_{Pyro} : Al extrait par le pyrophosphate de sodium (0,1M) ; Al_{total} : Al total obtenu après fusion alcaline ; Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz.....	89
Tableau 3.13 : Rapports entre des différentes formes du fer. Fe_{Tamm} : fer extrait par l'oxalate d'ammonium ; Fe_{CBD} : fer extrait par le Citrate –Bicarbonate-Dithionite ; Fe_{Pyro} : fer extrait par le pyrophosphate de sodium (0,1M) ; Fe_{total} : fer total obtenu après fusion alcaline. Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz.....	91
Tableau 3.14 : Rapports entre des différentes formes de l'aluminium. Al_{acido} : Al acidosoluble extrait par HCl (0,5N); Al_{Tamm} : Al extrait par l'oxalate d'ammonium ; Al_{CBD} : Al extrait par le Citrate –Bicarbonate-Dithionite ; Al_{Pyro} : Al extrait par le pyrophosphate de sodium (0,1M) ; Al_{total} : Al total obtenu après fusion alcaline. Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz	92
Tableau 3.15 : Microanalyse MET. Composition élémentaire (% Atomique).....	96
Tableau 4.1 : Quantités de fer réduit solubilisé (Fe^{2+}) par les consortia bactériens en présence ou absence de sel (répétitions n=3) et d'oxyde de fer.....	114
Tableau 4.2 : Espèces identifiées en conditions salines ou non. (+) : présence ; (-) : absence. Bactéries reconnues comme ferri-réductrices (C) ou non connues (NC) à la ferri- réduction:	115

Tableau 5.1: Différentes communautés bactériennes cultivables dénombrées sur les parcelles **plantées (Plté)** en riz (**F1**) et **non plantée (N Plté)** en riz (**A15**) du site de **Gagnoa** et sur les parcelles plantées en riz (**G1**) et non plantée en riz (**G1'**) du site de **Guéssihio**. Nombre de bactéries. $10^5 \text{ g}^{-1} \text{ sol sec}$. IRB (bactéries ferri-réductrice); BrFe (bactéries fermentaires ferri-réductrices sur milieu Bromfield); SRB (Bactéries sulfato réductrices). P : écarts significatifs entre les moyennes des dénombrements de la parcelle plantée et non plantée selon le test de comparaison de moyenne de Statistica. 168

Tableau 5.2 : Comparaison des communautés bactériennes dénombrées sur les parcelles **plantées (Plté)** en riz (**F1**) et **non plantée (N Plté)** en riz (**A15**) du site de **Gagnoa** et sur les parcelles plantées en riz (**G1**) et non plantée en riz (**G1'**) du site de **Guéssihio**. IRB (bactéries ferri-réductrice); BrFe (bactéries fermentaires ferri-réductrice sur milieu Bromfield); SRB (Bactéries sulfato réductrices). Ferri : communautés bactériennes totales réductrices du fer (IRB+BrFe). $P_{\text{To,Fe,Ferri}}$: écarts significatifs entre les moyennes des communautés aérobies et anaérobies; ferri réductrices et fermentaires et ferri réductrices et anaérobies des parcelles plantées et non plantées selon le test de comparaison de moyenne de Statistica..... 169

Tableau 5.3 : Fer réduit hydrosoluble (HYDRO) et acidosoluble (ACIDO) après 30 jours d'incubation par les consortia bactériens (F1 et G1) dans le milieu BrFe avec, soit de l'acétate (Acé) soit du glucose (Glu). 173

Tableau 5.4 : Acides organiques présents dans le milieu BrFe avec du glucose ou de l'acétate en présence des consortia bactériens isolés F1 et G1, après 30 jours d'incubation 174

Tableau 6.1 : Echantillons de sols étudiés. En **Thaïlande** : NS: Non Salin ; S: Salin ; L14: Parcelle non amendée en matières organiques; L25: Parcelle amendée. En **Côte d'Ivoire** : C1, C6 et F1 : Profils ; A₁₁, B₂, B_g, BC, C: Horizons..... 184

Tableau 6.2: Evolution du pH et Eh des suspensions de sols incubés. En **Thaïlande** : NS: Non Salin ; S: Salin ; L14: Parcelle non amendée en M.O. ; L25: Parcelle amendée en M.O.. En **Côte d'Ivoire** : C1, C6 et F1 : Profils. A₁₁, B₂, B_g, BC, C: Horizons. 185

Tableau 6.3: Evolution des quantités de carbone minéralisées (C-CO₂) et solubles (COD) et de l'ammonium (NH₄⁺) dans les solutions de sols incubés. En **Thaïlande** : NS: Non Salin ; S: Salin ; L14: Parcelle non amendée ; L25: Parcelle amendée. En **Côte d'Ivoire** : C1, C6 et F1 : Profils. A₁₁, B₂, B_g, BC, C: Horizons. Abiotique (abio), Biotique (Bio), Initial (0 jours), Final (30 jours). 188

Tableau 6.4: Evolution des anions minéraux formés ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$) dans les solutions de sols incubés. En **Thaïlande** : NS: sol non salin ; S: sol salin ; L14:Parcelle non amendée ; L25: Parcelle amendée. En **Côte d'ivoire** : C1, C6 et F1 : Profils. A₁₁, B₂, B_g, BC, C: Horizons. Biotique (Bio), Initial (0 jours), Final (30 jours). 189

Tableau 6.5 : Evolution des acides organiques formés ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$) dans les solutions de sols incubés. En **Thaïlande** : NS: Non Salin ; S: Salin ; L14: Parcelle non amendée ; L25: Parcelle

amendée. En Côte d'Ivoire : C1, C6 et F1 : Profils. A ₁₁ , B ₂ , B _g , BC, C: Horizons. Biotique (Bio), Initial (0 jours), Final (30 jours).....	189
Tableau 6.6: Evolution des éléments majeurs et du fer ferreux solubilisé ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$) dans les solutions de sols incubés. En Thaïlande : NS: Non Salin ; S: Salin ; L14: Parcelle non amendée ; L25: Parcelle amendée. En Côte d'Ivoire : C1, C6 et F1 : Profils. A ₁₁ , B ₂ , B _g , BC, C: Horizons. Abiotique (abio), Biotique (Bio), Initial (0 jours), Final (30 jours).	191
Tableau 6.7 : Minéralisation de la matière organique et solubilisation du fer ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$) des échantillons de rizières de bas-fond incubés. En Thaïlande : NS: sol non salin ; S: sol salin ; L14:Parcelle non amendée ; L25: Parcelle amendée. En Côte d'Ivoire : C1, C6 et F1 : Profils. A ₁₁ , B ₂ , B _g , BC, C: Horizons.	192
Tableau 6.8 : Espèces cultivables ou non présentes dans les sols de rizières. Matières organiques du sol (M.O.S.), Milieux synthétiques (milieu avec source de carbone glucose ou acétate).	201

Table des matières

Listes des figures et des tableaux
Remerciements

Introduction Générale.....	12
PREMIERE PARTIE:	16
Etat des connaissances, Problématique, Dispositifs utilisés et Milieux étudiés	16
Chapitre 1: Etat des connaissances et Problématique	18
1.1. Introduction.....	18
1.2. Fer dans les sols	19
1.2.1. Importance et réactivité du fer.....	19
1.2.2. Oxydes et oxyhydroxydes du fer, leurs places et leurs réactivités dans les sols.....	21
1.2.3. Piégeage des métaux	24
1.2.4. Influence des paramètres physico-chimiques des sols sur la mobilité et la solubilité du fer	25
1.2.5. Réduction bactérienne du fer ferrique	26
1.3. Sols en milieu tropical humide et cas particulier des sols de rizières	28
1.3.1. Organisation et fonctionnement des sols tropicaux en climat humide	28
1.3.2. Sols de rizières	29
1.4. Mobilité du fer et toxicité ferreuse dans les rizières	32
1.5. Salinité.....	35
1.6. Matière organique.....	39
1.7. Rhizosphère du riz	40
Conclusion et problématique de recherche	44
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes.....	46
2.1. Principe de l'étude	46
2.2. Présentation des sites d'étude, Echantillonnage des sols et des solutions de sols	47
2.2.1. Site d'étude de Thaïlande	47
2.2.2. Site d'étude de Côte d'Ivoire.....	50
2.3. Dispositifs d'étude des activités et des communautés bactériennes.....	53
2.3.1. Principe de l'étude.....	53
2.3.2. Conditions expérimentales	56
2.3.3. Milieux de culture	56
2.3.4. Préparation des inoculums et ensemencement des microplaques.....	57
2.3.5. Isolement des consortia bactériens	58
2.3.6. Recherche de la microflore halophile	58
2.3.7. Témoins abiotiques	59
2.3.8. Caractéristiques de l'oxyde de fer utilisé dans les dispositifs de culture.....	59
2.4. Méthodes d'analyses	59
2.4.1. Granulométrie	60
2.4.2. Mesure du pH _{eau} et pH _{KCl}	60
2.4.3. Cations échangeables (Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , et K ⁺) et Capacité d'Echange Cationique (CEC)	60
2.4.4. Dosage du phosphore total (P ₂ O ₅ total) et du phosphore assimilable (P ₂ O ₅ ass).....	60
2.4.5. Dosage du Soufre (S) total par combustion sèche	61
2.4.6. Dosage du carbone et de l'azote organique	61
2.4.7. Dosage des éléments minéraux totaux	61

2.4.8.	Etude des transferts et des répartitions des éléments le long d'une toposéquence	61
2.4.9.	Analyse minéralogique.....	64
2.4.10.	Analyse des solutions	64
2.4.11.	Analyse de la phase gazeuse des flacons d'incubation (dosage du CO ₂)	66
2.4.12.	Techniques d'identification moléculaire des bactéries	66
2.4.13.	Expression des résultats.....	69
2.4.14.	Analyse statistique des données.....	70
Chapitre3 : Propriétés des sols de rizières et de leurs solutions		72
3.1	Introduction.....	72
3.2	Sols et eaux des rizières de Thaïlande	72
3.2.1	Sols.....	72
3.2.2	Solutions du sol	76
3.3	Sols et eaux des rizières de Côte d'Ivoire.....	77
3.3.1	Sols.....	77
3.3.2	Solutions de sols.....	96
3.4	Discussion.....	102
3.5	Conclusion	104
DEUXIEME PARTIE:.....		106
Etudes des communautés bactériennes impliquées		106
Chapitre 4 : Communautés cultivables, activités ferri- réductrices et identification de populations bactériennes impliquées dans des sols de rizières affectés par la salinité (Thaïlande)		108
4.1.	Introduction.....	108
4.2.	Conduite de l'expérience	109
4.2.1.	Site et échantillon de sol.....	109
4.3.	Résultats et discussion	110
4.3.1.	Effet de différents paramètres (amendement, rhizosphère et salinité) sur la prolifération des communautés bactériennes.	110
4.3.2.	Espèces bactériennes impliquées.....	114
4.4.	Conclusion	116
Projet d'article : Iron reducing bacterial communities as factor of soil quality in paddy fields affected by salinity (Thailand)		117
Projet d'article: Effect of salinity on activity and population dynamic during iron – reduction by bacterial consortia isolated from rice fields.....		141
Chapitre 5 : Communautés cultivables, activités ferri- réductrices et identification de populations bactériennes impliquées dans des sols de bas-fonds affectés par la toxicité ferreuse (Côte d'Ivoire).....		167
5.1.	Introduction.....	167
5.2.	Protocoles d'études	167
5.2.1.	Sites et échantillons de sol.....	167
5.2.2.	Procédures expérimentales	168
5.3.	Résultats.....	168
5.3.1.	Dénombrement des communautés bactériennes cultivables.....	168
5.3.2.	Activités des consortia bactériens isolés des sols plantés en riz (F1 et G1) dans le milieu Bromfield avec glucose ou acétate	170
5.3.3.	Identification des espèces bactériennes présentes dans les consortia	177

5.4.	Discussion.....	179
5.5.	Conclusion	182
Chapitre 6 : Etude des activités et de la dynamique des communautés bactériennes ferri réductrices au cours de la biodégradation des matières organiques des sols (MOS) de rizières.....		183
6.1.	Introduction.....	183
6.2.	Conduite de l'expérience	184
6.2.1.	Site et échantillons de sol	184
6.2.2.	Procédure expérimentale	184
6.3.	Résultats.....	185
6.3.1.	Evolution des paramètres du milieu	185
6.3.2.	Relation entre la biodégradation anaérobie des matières organiques des sols (M.O.S) et la réduction bactérienne du fer dans les rizières de bas fond (L14S, L14NS, L25S, F1)	192
6.3.3.	Identification des populations bactériennes impliquées dans la biodégradation des MOS et la réduction du fer en conditions anaérobies	194
6.4.	Discussion.....	198
6.5.	Conclusion	202
Discussion Générale, Conclusion et Perspectives.....		204
Discussion générale.....		206
Conclusion et perspectives		214
Références bibliographiques.....		218
Annexes.....		232

Introduction Générale

Introduction Générale

Le sol, partie superficielle et meuble de l'écorce terrestre, par ses fonctions biologiques et biogéochimiques, joue un rôle fondamental dans les cycles géochimiques des éléments (C, N, Fe, S, P,...) ; il assure la qualité des eaux, de l'air et des productions végétales. Le sol est le support de la majorité des activités humaines ainsi que des écosystèmes terrestres et est considéré, avec les océans, comme l'un des deux compartiments essentiels de la vie terrestre.

Le sol est soumis à des processus physiques, chimiques et biologiques de formation, de remaniement et d'évolution, sous la dépendance de divers facteurs dont les activités humaines.

Dans les régions tropicales humides, les couvertures pédologiques sont caractérisées en toposéquences par:

- des sols ferralitiques (ferralsols) à l'amont, sur les plateaux et les hauts versants dont la végétation dominante est la forêt ;
- des sols hydromorphes ou colluvio-alluviaux ou gleysols (**FAO, 1998**) à l'aval dans le bas versant et les bas fonds, où, dans certaines régions, se développent des cultures dominantes comme la riziculture.

Dans les sols hydromorphes, la saturation temporaire ou permanente en eau crée des conditions d'anaérobioses et favorise le développement des bactéries anaérobies ou aéro-anaérobies, qui peuvent utiliser certains éléments (Mn, Fe, S) comme accepteurs directs ou indirects d'électrons, pour leur respiration (**Dommergues & Mangenot, 1970; Lovley, 1991; Lovley & Donald, 1995; Lovley & Woodward, 1996; Madigan et al., 1996; Lovley, 1997**) ou comme puits d'électrons durant des activités de fermentation (**Berthelin, 1982; Ehrlich, 1996; Bousserhine et al., 1999**). Ces processus contribuent à la formation de métabolites organiques ou minéraux. En condition d'anaérobiose, les réactions de dénitrification dissimilative, de réduction du manganèse, du fer, des sulfates, vont se succéder si ces composés sont biodisponibles. Ces phénomènes sont sous le contrôle d'interactions "microorganismes – minéraux – matières organiques" mais aussi de caractéristiques chimiques et physiques des sols, qui peuvent avoir pour origine des activités humaines (salinisation, fertilisation,...).

Diverses études (**Bousserhine et al., 1999; Quantin et al., 2001; Stemmler & Berthelin, 2003**) ont montré que l'inhibition de l'activité bactérienne diminue significativement la réduction du fer ferrique. De même, de plus fortes dissolutions du fer ont été observées dans les milieux plus riches en matière organique. Certains de ces résultats ont bien mis en évidence une corrélation positive entre le cycle du carbone et la dynamique du fer (**Stemmler & Berthelin, 2003**). Le taux de matière organique, tout comme celui du fer, apparaît aussi comme le principal facteur limitant la réduction du soufre (**Jacq, 1975; Sow, 2003**).

Les sols hydromorphes (gleysols) de bas-fonds, comme ceux des rizières, sont le siège d'alternances de conditions d'oxydation et de réduction. Ces processus d'oxydoréduction jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement des sols, en particulier dans les sols tropicaux où des quantités d'oxyhydroxydes et oxydes de fer sont importantes.

Dans les rizières tropicales, on assiste à des phénomènes de réduction du fer favorisant le passage du fer en solution par changement d'état de valence et de phase (Fe^{3+} solide $\rightleftharpoons$ Fe^{2+} soluble), mais aussi à des phénomènes d'acidification associés à des réactions de complexation et de protonation. Ces phénomènes de mobilisation, solubilisation et transfert du fer vers les solutions et les plantes, d'immobilisation (dépôt-concentration) du fer et d'éléments associés, dépendent de la persistance de l'anaérobiose, mais aussi des caractères des horizons dans lesquels se produisent ces processus (richesse en matière organique, pH, nature de l'oxyde,...), du contexte géologique et climatique, et de l'action de bactéries ferri réductrices très ubiquistes (*Berthelin et al., 2006*).

Ces milieux tropicaux sont aussi soumis à des problèmes environnementaux : salinité, alcalinité, forte acidité ou présence de quantités relativement importantes de matière organique, qui vont modifier d'une part, les activités bactériennes, en particulier ferri-réductrices, et d'autre part, la mobilité ou la disponibilité du fer et des éléments associés. Dans certaines situations (surtout dans les sols calcaires et alcalins), il peut se manifester une faible disponibilité du fer ou d'éléments nutritifs, causant des problèmes de carences chez le riz. Dans d'autres cas, on peut observer, chez le riz cultivé, des problèmes de toxicité ferreuse (Côte d'Ivoire), de toxicité sulfurique (Sénégal) ou de toxicité aluminique (Madagascar, Cambodge) sous l'effet de conditions réductrices et /ou acides fortes.

Ces situations peuvent présenter une contrainte majeure pour la culture du riz, et mettre en danger la production dans les pays tropicaux, en particulier ceux d'Asie et d'Afrique où le riz occupe une place importante dans l'alimentation des populations (*FAO, 2004*).

L'influence des activités bactériennes, en particulier ferri-réductrices et des différents facteurs environnementaux sur la mobilité et la disponibilité du fer et des éléments associés n'est pas toujours bien établie. Dès lors, il apparaît nécessaire de mieux comprendre dans des situations bien définies, les mécanismes et paramètres impliqués. Cette amélioration des connaissances devrait conduire à la mise en œuvre de méthodes qui permettront à la fois d'exploiter durablement les rizières et d'améliorer la production du riz, en vue d'atteindre la sécurité alimentaire, et bien sûr, maintenir le bon "fonctionnement des sols".

Pour ce travail de thèse, deux situations où la réduction bactérienne du fer paraît impliquée fondamentalement ont été retenues : l'une en Thaïlande où les apports de matières organiques favorisent les conditions réductrices mais maintiennent ou restaurent des conditions favorables à la culture du riz, l'autre en Côte d'Ivoire où les conditions réductrices entraînent des toxicités ferreuses.

Pour ces deux types de problématique, il s'agira de :

- caractériser les paramètres du milieu qui régulent les phénomènes de réduction du fer et autres éléments associés dans les sols de rizières ;
- rechercher les communautés bactériennes cultivables ou non, présentes dans ces sols, en déterminant d'une part, le rôle de la rhizosphère, de l'amendement organique et de la salinité et d'autre part, leur capacité à dissoudre les oxydes de fer en milieu salin ou non ;
- identifier les communautés bactériennes cultivables ou non présentes au cours des activités ferri-réductrices et de biodégradation des matières organiques des sols (MOS) de rizières, en cherchant à préciser l'évolution de leur structure.

Cette thèse s'articule autour de deux parties. La **première partie** débute par une revue bibliographique (**chapitre 1**) visant à faire le point sur l'état des connaissances concernant le fer dans les sols, particulièrement dans les rizières : sources du fer, disponibilité, paramètres de régulation de sa mobilité,... Elle se poursuit par la description des matériels, méthodes et dispositifs expérimentaux utilisés tout au long de ce travail (**chapitre 2**) et s'achève par la caractérisation des sites d'études: eaux et sols de rizières (**chapitre 3**).

La **deuxième partie** comprend trois chapitres (**4, 5, 6**) et est consacrée à l'étude des communautés bactériennes et des activités ferri réductrices dans les sols de rizières. Dans le **chapitre 4**, l'effet de la rhizosphère, de la salinité et de l'amendement organique dans les sols de rizières de Thaïlande est étudié par le dénombrement des communautés cultivables et les activités ferri-réductrices, en conditions salines ou non salines. Des consortia bactériens isolés sont étudiés pour leur activité et les espèces bactériennes impliquées ont été identifiées. Le **chapitre 5** traite des populations bactériennes et des activités ferri réductrices d'une part, de l'identification des espèces bactériennes impliquées dans les sols de rizières de bas fonds affectés par la toxicité ferreuse (Côte d'Ivoire) d'autre part. Le **chapitre 6** est focalisé sur l'étude des activités ferri-réductrices et des communautés bactériennes au cours de la biodégradation des matières organiques des sols (MOS) de rizières, et vise à préciser la nature des populations impliquées.

Enfin, une discussion générale, les conclusions et perspectives clôturent ce manuscrit.

PREMIERE PARTIE:
Etat des connaissances, Problématique,
Dispositifs utilisés et Milieux étudiés

Chapitre 1 : Etat des connaissances et Problématique

Chapitre 2 : Matériels, méthodes et dispositifs expérimentaux utilisés

Chapitre 3 : Caractérisation des eaux et des sols de rizières des sites d'étude

Chapitre 1: Etat des connaissances et Problématique

1.1. Introduction

Les sols de rizières sont des milieux particuliers où se développent des phénomènes d'oxydo-réduction concernant les cycles du carbone, de l'azote, du fer, du soufre, du manganèse,... (Figure 1.1). Ces processus sont en majeure partie, régulés ou sous contrôle de communautés bactériennes aérobies, aéro-anaérobies et anaérobies dont les activités sont associées aux phases d'hydromorphie, à la forme et à la disponibilité des matières organiques et des éléments impliqués directement ou indirectement dans ces réactions d'oxydo-réduction.

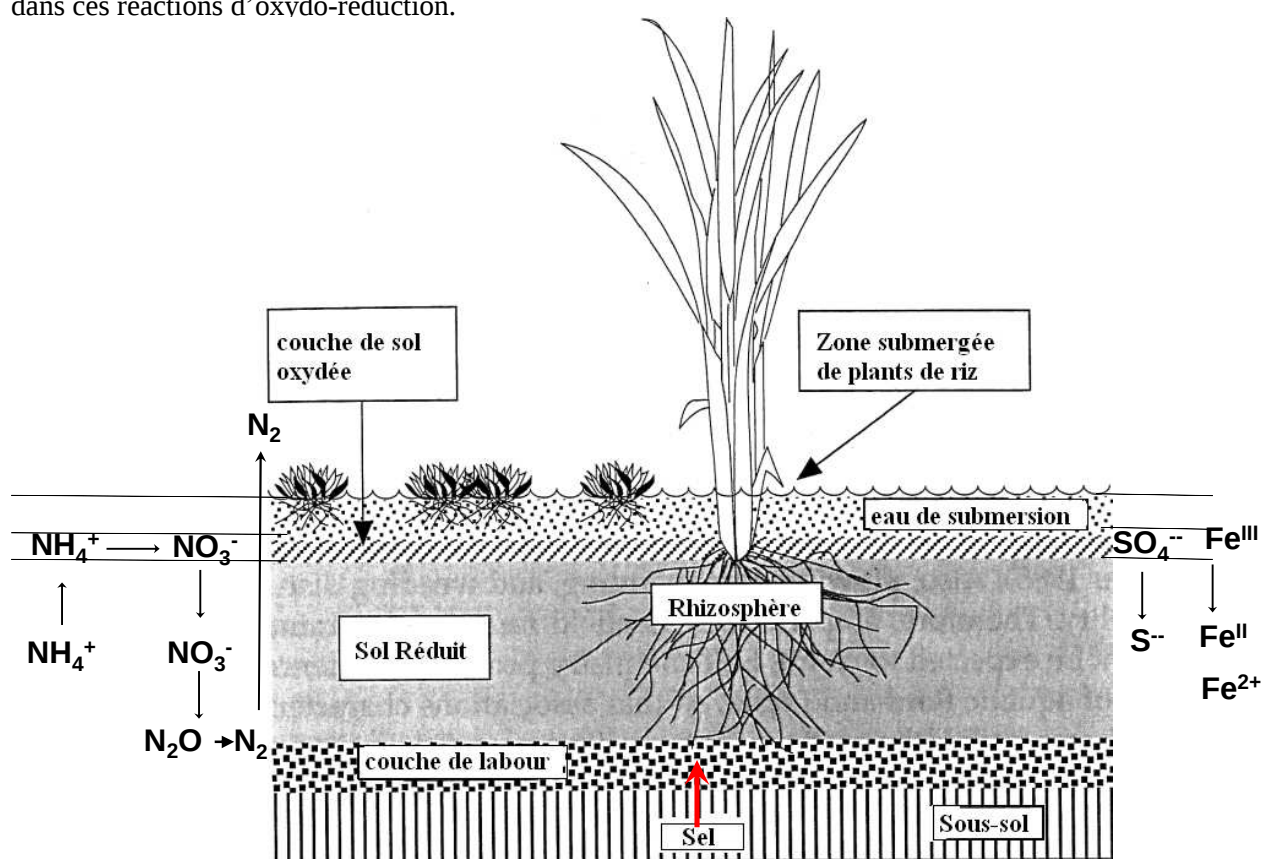


Figure 1.1 : Schéma général de l'écosystème des sols de rizières d'après Roger (1996)

Dans l'étude que nous avons engagée, les cycles les plus concernés sont d'abord ceux du carbone et du fer et de leurs interactions, puis en second lieu ceux de l'azote, du soufre et des éléments minéraux associés aux phénomènes d'oxydo-réduction étudiés. Les paramètres impliqués dans le fonctionnement de ces cycles biogéochimiques dans les sols de rizières, et dont la connaissance a un caractère prioritaire, sont soit biotiques soit abiotiques. Les bactéries ferri-réductrices (IRB: Iron Reducing Bacteria) associées à la biodégradation des matières organiques du sol et aux matières organiques apportées comme amendement jouent, sans aucun doute, un rôle fondamental et sont, en étant associées ou non à la rhizosphère du riz, les acteurs principaux.

Toutefois, leurs activités vont être sous la dépendance de paramètres comme la salinité, la disponibilité du fer et des matières organiques dont l'impact doit être clarifié.

1.2. Fer dans les sols

1.2.1. Importance et réactivité du fer.

Le fer, quatrième élément le plus abondant, représente 5% en masse de la croûte terrestre, et deuxième métal après l'aluminium (*Crichton & Pierre, 2001*) est un oligoélément essentiel. On le trouve à l'état ferreux ou ferrique dans des minéraux spécifiques, ou dans d'autres minéraux où il se substitue au magnésium et à l'aluminium. Au cours des processus d'altération, il se trouve sous forme d'oxydes et d'hydroxydes dans les sols, ou dans les argiles où il se substitue à l'aluminium. Il participe aussi aux associations organo-minérales.

Dans la roche mère, les concentrations en fer total varient de 4 à 100 mg.g⁻¹ (*Tableau 1.1*). Cependant, la partie extractible, en comparaison est généralement très faible, de l'ordre de 0,01 à 0,50 mg.g⁻¹, ce qui conduit à une très faible concentration dans la solution du sol (*Coughtrey & Thorne, 1983*).

La solubilité du fer est fortement influencée par le potentiel d'oxydo-réduction, le pH et les processus microbiens. Selon Lopez et Graham (*1972*), les facteurs susceptibles de diminuer la disponibilité du fer dans les sols sont : les pH élevés, les fortes teneurs en argiles, le drainage, et de faibles teneurs en matière organique ou une faible activité biologique.

Tableau 1.1 : Concentration du fer dans les différentes roches mères d'après *Coughtrey & Thorne (1983)*

Roches mère	Concentration moyenne (mg.g ⁻¹)
Roches magmatiques	35,4
Roches ignées	56,3
Roches Acides	25
Grès	9,8-30,7
Roches Basiques	100
Calcaire	3,8
Roches sédimentaires	35
Charbon	10,9-19,2

Le fer est un élément essentiel au fonctionnement des milieux naturels et des organismes vivants, grâce à sa réactivité chimique (formes oxydées, réduites ou complexées) et à sa participation aux réactions métaboliques des organismes vivants. Il est impliqué dans le transport, le stockage et

l'activation de l'oxygène moléculaire, dans la photosynthèse, la réduction de l'azote, la respiration et dans le transfert des électrons via divers transporteurs (**Crichton, 2001**).

Ce métal peut atteindre parfois des concentrations de 300 mg.kg^{-1} de matière sèche (MS) dans les plantes. Mais, sa carence ou son excès dans les végétaux posent d'énormes problèmes pour les productions agricoles.

Dans les sols, les pédologues distinguent deux grandes familles de forme de fer : le fer lié aux réseaux cristallins des silicates, dit "fer silicaté", et le fer non lié aux silicates, dit "fer libre" (**Mc Keague & Day, 1966; Segalen, 1971; Jeanroy, 1983**). Le fer est dit "libre" ou fer "extractible" ou encore fer mobilisable, car il est extrait par des agents chimiques acides, complexants, réducteurs définissant une mobilité potentielle (**Mc Keague & Day, 1966; Jensen & Thamdrup, 1993; Golden et al., 1994**).

Dans les sols tropicaux où l'altération est forte, la distinction du fer "libre" s'avère nécessaire. On distingue quatre formes de fer dit "libre" (**Jeanroy, 1983; Jeanroy et al., 1991**), en fonction des agents chimiques d'extraction (**Mathieu & Pieltain, 2003**):

- le fer échangeable par le chlorure de potassium, noté Fe_{ech} , qui ne concerne que le fer ferreux (Fe^{2+}).
- le fer lié à la matière organique du sol, extrait par le pyrophosphate de sodium en conditions alcalines noté Fe_{pyro} .
- le fer peu ou mal cristallisé, dit "fer amorphe", extrait par l'oxalate d'ammonium, noté Fe_{ox} ou Fe_{tamm} (**Bonneau & Souchier, 1994**)
- le fer inclus dans les oxydes bien cristallisés, peu solubles, extrait par le dithionite ou la solution citrate bicarbonate dithionite, noté Fe_{ed} ou Fe_{CBD} (**Bonneau & Souchier, 1994**)

Dans ces environnements tropicaux altérés, riches en latérites, la fraction du fer oxyde est la plus importante. Elle comprend soit des oxydes, des hydroxydes ou des oxyhydroxydes (qui sont les oxydes présentant des liaisons -O et/ou -OH).

La dissolution des oxydes, des hydroxydes ou des oxyhydroxydes de fer peut se faire par voie biologique, grâce aux bactéries réductrices, et par voie chimique (acides forts, composés réducteurs et/ou complexants), dans des milieux spécifiques (**Lefebvre-Drouet & Rousseau, 1995; Bousserhine et al., 1999**).

1.2.2. Oxydes et oxyhydroxydes du fer, leurs places et leurs réactivités dans les sols

1.2.2.1. Différents types d'oxydes et oxyhydroxydes

Parmi les différents oxyhydroxydes et oxydes de fer présents dans l'environnement terrestre, six sont plus fréquents : l'hématite, la goethite, la lépidocrocite, la ferrihydrite, la maghémite, la magnétite. L'hématite, la magnétite et la maghémite font partie du groupe des oxydes, alors que la goethite, la lépidocrocite, la ferrihydrite sont des oxyhydroxydes et hydroxydes de fer.

Dans les sols, les oxyhydroxydes et oxydes de fer peuvent être soit sous forme bien cristallisée comme la goethite (λ -FeOOH) ou l'hématite (λ -Fe₂O₃), soit sous forme peu cristallisée comme la ferrihydrite (5Fe₂O₃, 9H₂O), la lépidocrocite (γ -FeOOH), soit sous forme mal cristallisée comme la magnétite (Fe₃O₄) ou la maghémite (γ -Fe₂O₃). Leur degré de cristallinité dépend de leur condition de formation et de stabilité (**Cornell & Schwertmann, 1996**).

La lépidocrocite et la ferrihydrite ont des produits de solubilité plus élevés que ceux de la goethite et de l'hématite et sont donc moins stables dans le sol (*Tableau 1.2*).

La goethite et l'hématite sont l'oxyhydroxyde et l'oxyde de fer dominants des sols étudiés dans cette thèse.

Tableau 1.2 : Propriétés générales des principaux oxydes et oxyhydroxydes de fer d'après **Cornell & Schwertmann, (1996)** avec $pFe = -\log[Fe]$.

Nom de l'oyde	Formule	Produit de solubilité (Kso) = $pFe + 3OH$	Système Cristallographique
Hématite	λ -Fe ₂ O ₃	42-43	Trigonal
Maghémite	γ -Fe ₂ O ₃	40	Cubique ou Tétragonal
Magnétite	Fe ₃ O ₄	-	Cubique
Goethite	λ -FeOOH	40-44	orthorhombique
Lépidocrocite	γ -FeOOH	~42	orthorhombique
Ferrihydrite	5Fe ₂ O ₃ , 9H ₂ O	38-39	hexagonal

Goethite (λ -FeOOH)

La goethite, de couleur brun jaunâtre, est l'oxyde le plus représentatif des sols. C'est pourquoi elle est synthétisée et plus utilisée dans les expériences en laboratoire (**Schwertmann & Cornell, 2000**). Elle cristallise dans le système orthorhombique et participe à la coloration des sols. On la rencontre sous tous les climats et dans tous les sols, mais surtout dans les sols de bas versant. Elle résulte d'une hydrolyse lente aux dépens d'ions ferriques et en présence de matières organiques complexantes. Si l'hydrolyse se fait rapidement, on assiste à la formation de ferrihydrite ou d'hématite (**Herbillon, 1994**). Elle se présente sous forme de cristaux généralement aciculaires et allongés.

Hématite (λ -Fe₂O₃)

Comme la goethite, l'hématite est très répandue, surtout dans les sols de plateau. De couleur rouge vive, elle cristallise dans le système Triclinique. On la trouve dans les milieux neutres à saisons contrastées et chaudes. Contrairement, à la goethite, l'hématite résulte d'une cristallisation rapide des oxydes de fer altérés par l'eau ou par l'eau riche en matières organiques. Néanmoins, le passage d'une forme à l'autre s'observe surtout dans les sols ferralsols (**FAO, 1998**) ou ferrugineux résultant soit de la déshydratation de la goethite, soit de la déferrification de l'hématite (**Cornell & Schwertmann, 1996**).

Lépidocrocite (γ -FeOOH)

La lépidocrocite, de couleur orangée, est présente fréquemment dans les sols hydromorphes et provient de l'oxydation d'hydroxydes ferreux. Elle est plus soluble que la goethite et peut aussi se transformer en goethite (**Schwertmann & Cornell, 2000**).

Ferrihydrite (5Fe₂O₃, 9H₂O)

Quant à la ferrihydrite, de couleur brun rougeâtre, elle se trouve surtout dans les eaux de drainage des sols hydromorphes acides et riches en matières organiques.

La lépidocrocite et la ferrihydrite ont été fréquemment observées dans les sols de bas-fonds (**Schwertmann & Cornell, 2000**).

Magnétite (Fe_3O_4) et **Maghémite** ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

Ce sont deux oxydes ferromagnétiques non observés (magnétite) ou plus rarement (maghémite) dans ces travaux.

La magnétite, de couleur noire, provient de l'altération des roches volcaniques ou basiques. On la trouve dans les andosols, les ferralsols (**FAO, 1998**); mais, elle se transforme très souvent en goethite par dissolution.

La maghémite, de couleur brun rougeâtre, fréquente sous les climats tempérés, cristallise dans le système cubique et provient soit des roches ignées basiques, soit de l'oxydation de la magnétite en condition aérée, soit de la déshydratation de la lépidocrocite, soit enfin de la transformation de certains oxydes en présence de matières organiques (**Schwertmann & Cornell, 2000**).

1.2.2.2. Propriétés de surface

Dans les sols, les oxydes, hydroxydes et oxyhydroxydes de fer sont en général plus abondants que les oxydes d'aluminium, et jouent un rôle très actif dans la pédogénèse en participant à l'assemblage des argiles en agrégats. Ils peuvent se comporter comme des colloïdes à charges électropositives et assurer un rôle de support d'adsorption ou de ponts entre la matière organique et les argiles. Par leur nature chimique et leurs propriétés de surface, les oxydes de fer influencent la structure et la formation des sols (**Herbillon, 1994**).

A l'état amorphe, quand ils sont fixés sur les argiles, ils jouent un rôle spécifique dans l'insolubilisation de la matière organique et la formation de l'humine. A l'état ionique, ils interviennent dans le comportement physico-chimique du complexe d'altération et, peuvent, dans certain cas, influencer la capacité d'échange.

Dans les profils de sols tropicaux, la distribution des oxydes de fer (en particulier de la goethite et de l'hématite) se fait selon la topographie et l'hydromorphie du milieu. Ainsi, l'hématite, de couleur rouge vive, abonde plus dans les sols de plateau, bien drainants, que dans les sols de bas de versant où domine la goethite. L'hématite peut se dissoudre en priorité, contribuant au jaunissement des sols. Elle va pouvoir reprécipiter dans les horizons plus profonds, à proximité des nappes, participant à la formation d'horizon d'accumulation (plinthite) (**Tardy, 1993; Quantin et al., 1997**).

Par les différentes couleurs de leurs pigments, les oxydes de fer sont responsables de la coloration des sols, surtout dans les milieux pauvres en matières organiques. Les variations de couleurs liées à la nature, à la répartition des oxydes dans les horizons des sols sont indicatrices de l'origine, de

l'évolution des sols, et jouent un rôle important dans leur dénomination et classification (*Schwertmann & Taylor, 1977*).

Les oxydes de fer sont des minéraux de très petites tailles, pouvant atteindre quelques centaines d'Angström. Ils présentent une grande surface spécifique de 60 à 600 m²g⁻¹ (*Herbillon, 1994*). La substitution isomorphe du fer est l'une des raisons de la stabilité des oxydes.

Ainsi, comparativement à une goethite pure, une diminution de la quantité du fer libéré est observée dans la goethite substituée (par Mn-; Co- ; Al-) (*Jeanroy et al., 1991; Bousserrhine et al., 1999*).

Tout comme les oxydes d'aluminium, les oxydes de fer sont amphotères, c'est-à-dire capables de porter une charge positive jusqu'à leur point isoélectrique (pH 7 ou 8) et une charge négative au delà de pH 8 ou 9.

Ce sont des colloïdes à charges variables impliquées dans les phénomènes d'adsorption spécifique de cations (Cu²⁺, Zn²⁺, Cr³⁺, Cd²⁺, Co²⁺,...), d'anions (phosphates, sulfates, anions organiques,...) ou de molécules neutres (*Figure 1.2*). Ces charges sont liées aux paramètres de la solution (pH, nature et concentration en électrolytes) avec laquelle ils s'équilibrent. Les réactions d'échanges, et surtout d'adsorption spécifique à la surface des oxydes de fer, jouent un rôle important dans la nutrition minérale des plantes et dans la dépollution. Ce qui fait des oxydes de fer des épurateurs efficaces des solutions de sols.

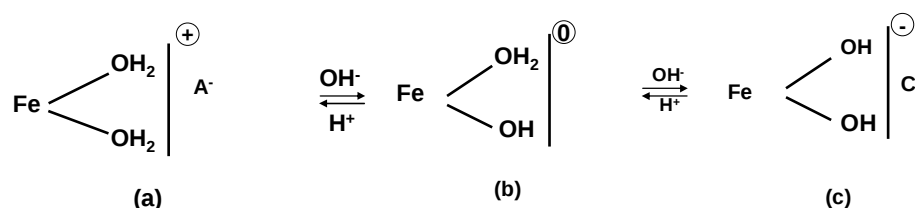


Figure 1.2 : Schéma réactionnel des oxydes de fer, états et propriétés d'échange. Les traits verticaux représentent la surface d'un oxyde de fer avec des charges : positives (+) en milieu acide (a), neutres (O) au point isoélectrique à pH 8-9 (b) et négatives (-) en milieu alcalin (c) d'après *Herbillon, (1994), Berthelin et al., (2005)*

1.2.3. Piégeage des métaux

Comme les oxydes de manganèse, les oxydes de fer sont parmi les meilleurs réservoirs des métaux (*Quantin et al., 2001*), ils exercent un contrôle sur la concentration et la disponibilité des éléments en trace dans la solution du sol (*Bruemmer et al., 1988; Becquer et al., 1995; Bousserrhine et al., 1998; Bousserrhine et al., 1999*).

Le plus important mécanisme qui justifie la fixation des éléments en trace par les oxydes de fer est l'adsorption spécifique, qui dépend fortement du pH et de la force ionique du milieu. Les métaux lourds peuvent se fixer sur la surface externe des oxydes de fer puis migrer vers les sites internes ou s'adsorber directement dans les sites internes de l'oxyde de fer (**Bruemmer et al., 1988**).

Lorsqu'ils sont fixés à la surface externe des oxydes de fer, ils sont facilement mobilisables par des acides forts et des agents complexants, ou par l'acidification du milieu. Diverses études ont été réalisées et montrent par exemple, comme celle de Bousserhine *et al.*, (1998), que la mobilisation de l'aluminium en substitution résulterait d'une part, de la réduction bactérienne de la goethite qui le libère de sa maille cristalline, et d'autre part, de l'acidification du milieu. Dans les milieux anoxiques, une forte désorption du cadmium a été observée lors de la dissolution de la goethite, en présence de desferrioxamine B (DFOB) et d'acide oxalique (**Mustafa et al., 2004**). Schwertmann et Cornell (2000) synthétisent des goethites substituées en manganèse, chrome, cobalt et en aluminium justifiant le rôle de piégeage de métaux par les oxydes de fer.

1.2.4. Influence des paramètres physico-chimiques des sols sur la mobilité et la solubilité du fer

Même si le fer joue un rôle primordial dans le métabolisme des plantes et des microorganismes, il est le plus souvent peu disponible. Sa mobilité et sa disponibilité sont influencées par trois mécanismes qui dépendent du pH, du potentiel redox, de la présence de ligands, mais aussi des activités microbiennes qui les modifient en permanence. Les réactions (1), (2), (3) résument ces processus :

- la protonation : $\text{FeOOH} + n\text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{OH})_{(3-n)}]^{n+} + (n-1)\text{H}_2\text{O}$ (1)
- la complexolyse : $\text{FeOOH} + n\text{L}^- + 3\text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{FeLn}]^{3-n} + 2\text{H}_2\text{O}$ (avec L=ligand) (2)
- la dissolution réductrice : $\text{FeOOH} + e^- + 3\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O}$ (3)

En milieu oxygène, lorsque le pH est près de la neutralité (pH = 7) ou alcalin, le fer se trouve majoritairement sous la forme oxydée Fe^{3+} , peu soluble et moins disponible pour les plantes. Ces conditions conduisent à la formation de dépôts d'hydroxydes et oxyhydroxydes ferriques ou à des dépôts de sulfates et phosphates ferriques (Equation 1). Dans ces conditions et en présence de substances organiques complexantes (comme les sidérophores, les acides organiques) produites par des bactéries ou champignons, on peut observer une solubilisation du fer ferrique (Equation 2) (**Watteau & Berthelin, 1994; Kraemer et al., 1999; Reichard et al., 2007**). En revanche, en condition réductrice, la forme oxydée se réduit en Fe^{2+} (Equation 3). Le fer ferreux formé devient relativement disponible pour les plantes. La disponibilité du fer augmente lorsque le pH du milieu décroît. Par contre, si le pH est trop acide (pH < 4), le fer devient trop disponible, il peut prendre la place des éléments nutritifs essentiels dans le métabolisme de la plante et ainsi, l'affecter grandement (**De Dordodot et al., 2005**).

Les études menées par Lefebvre-Drouet et Rousseau (1995) sur la dissolution de différents oxyhydroxydes de fer par voie chimique (avec HCl, l'acide citrique ou l'acide lactique) indiquent que l'oxyde amorphe se dissout plus facilement que l'hématite et la goethite. La goethite se dissout plus difficilement que l'hématite avec HCl.

1.2.5. Réduction bactérienne du fer ferrique

En général, la solubilité des oxydes de fer est extrêmement faible dans l'eau pure (Schwertmann & Cornell, 2000). Mais, leur dissolution peut être facilitée par les acides forts, la réduction bactérienne ou les agents complexants (Bousserhine, 1995; Cornell & Schwertmann, 1996).

En milieu naturel, la réduction bactérienne du fer ferrique est un phénomène bien connu. Elle est considérée comme le principal facteur de la dissolution des oxydes (Munch & Ottow, 1980; Berthelin, 1982; Munch & Ottow, 1983; Bousserhine et al., 1999; Ehrlich, 2002) et influence les cycles biogéochimiques de plusieurs éléments. La réduction bactérienne du fer entraîne sa solubilisation et sa mobilité sous forme de Fe^{2+} , mais aussi celle du phosphate, des éléments en trace associés aux oxyhydroxydes, et affecte les propriétés des sols ainsi que la croissance des plantes. Ce phénomène est aussi défini comme la réduction dissimilative du fer(III) où des composés organiques et minéraux peuvent jouer le rôle d'accepteur ou de donneur d'électron (Lovley, 1991). A l'inverse, la réduction assimilative ne concerne qu'une petite quantité de fer réduit (Fe^{2+}) qui est absorbé dans les membranes chloroplastiques et mitochondriales. Dans ce cas, le fer est acheminé dans les constituants cellulaires tels que les protéines transporteurs d'électrons (cytochrome, peroxydases, ferritines,...) sous l'action des sidérophores (Expert et al., 2004). La réduction assimilative a un faible effet sur les cycles biogéochimiques.

Selon l'hypothèse de Scholes et Mitchell (1970), les processus de réduction dissimilative sont en fait des mécanismes de translocation de protons suivant des chaînes de transports d'électrons. Les réductions dissimilatives du Fer (III) sont associées à des processus de respiration, de fermentation ou de photosynthèse de divers groupes de microorganismes.

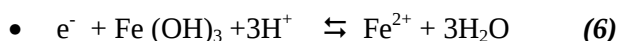
La réduction par respiration anaérobie est un mécanisme dans lequel les donneurs d'électrons sont des composés organiques (glucose, acétate,...) ou des produits minéraux (H_2 , FeS_2 ,...), et les accepteurs d'électrons, des composés minéraux (Fe^{3+} , NO_3^- , Mn(IV) , SO_4^{2-} , CO_2). Par contre, si les accepteurs et les donneurs d'électrons ne sont que des composés organiques issus du métabolisme de l'organisme, il s'agit de la fermentation (Tableau 1.3).

Tableau 1.3 : Comparaison des processus de fermentation et de respiration d'après **Fenchel et al., (1998)**.

Fermentation	Respiration
Pas d'accepteur d'électrons externes	Accepteur d'électrons externes
Transformation des molécules du substrat	Système de transport d'électron : cytochromes, ubiquinone
Processus anaérobie	Processus aérobie ou anaérobie
Substrat organique	Substrat organique ou inorganique

Plusieurs travaux (**Berthelin, 1982; Lovley, 1991; Lovley & Donald, 1995; Lovley & Woodward, 1996; Bousserhine et al., 1999**) ont montré que certaines bactéries, pour leur croissance, sont capables de conserver de l'énergie provenant de l'oxydation des composés aromatiques, des acides organiques et/ou du di-hydrogène (H₂) pour réduire le Fe (III).

En effet, les bactéries qui "respirent le fer" vont totalement ou partiellement oxyder des substrats organiques (*Equation 4*) ou aussi inorganiques (H₂ ou S⁰) (*Equation 5*) dans le but de transférer directement les protons aux métaux oxydés (*Equation 6*) dont le fer (III).



C'est le cas de *Geobacter* (*Geobacter metallireducens*), *Geovibrio* (*Geovibrio ferrireducens*), *Schewanella*, *Geothrix fermentans*, et *Ferribacterium limneticum* qui, en conditions anaérobies facultatives ou strictes, couplent l'oxydation des substrats carbonés, dont l'acétate, à la réduction du Fe (III) (**Francis et al., 2000; Lovley & Coates, 2000; Pham et al., 2003**).

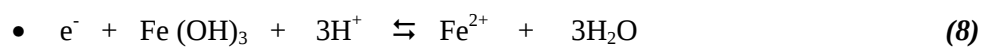
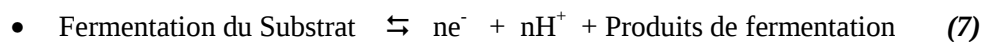
Myers et Nealson (**1990**) ont observé qu'en condition anoxique, *Schewanella putrefaciens*, au cours de son métabolisme respiratoire, réduit le Fe (III) en l'utilisant comme donneur d'électrons lors de l'oxydation du fumarate. *Schewanella putrefaciens* peut aussi oxyder partiellement le pyruvate.

Certaines bactéries anaérobies facultatives de la famille des *Enterobacter*, comme *Pantoea agglomerans* SP1 (**Francis et al., 2000**), sont aussi capables d'assurer leur croissance en couplant l'oxydation de l'acétate ou de l'hydrogène avec la réduction du Fe (III).

Tebo et Obratzsova (**1998**) expliquent que l'activité enzymatique de *Desulfotomaculum reducens*, pendant la réduction des sulfates, peut engendrer une activité ferri-réductrice importante. En fait, le fer associé aux sulfates est libéré et réduit au cours de ce métabolisme. De même Dobbin et al., (**1999**) ont constaté que de nombreuses réductions du fer (III) par respiration sont observées en

présence de l'espèce *Geobacter* et de *Desulfuromonas palmitatis*, lorsque l'acétate est additionné dans les milieux de cultures. Des bactéries thermophiles comme *Thermoterrabacterium ferriducens* utilisent le Fe (III) comme accepteur d'électrons en condition anaérobie et en présence du fumarate dans les milieux de culture (*Khijniak et al., 2005*).

La réduction par fermentation est le fait que les bactéries fermentaires, en excluant de leur membrane cytoplasmique les protons provenant de l'oxydation des composés organiques (*Equation 7*) lors de leur métabolisme, vont intervenir indirectement dans la réduction des métaux oxydés (*Equation 8*). Dans ce cas, le métal est considéré comme puits d'électrons.



Beaucoup d'études de processus fermentaires (*Lovley, 1991; Bousserhine et al., 1999; Lovley et al., 2000*) ont été réalisées sur la réduction bactérienne du fer (III) en cultures anaérobies.

Des bactéries fermentaires non photosynthétiques, comme *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter aerogenes* (*Bousserhine et al., 1999; Dobbin et al., 1999*) et même photosynthétiques, comme *Rhodobacter sphaeroides* (*Jeong et al., 2008*), utilisent le Fe (III) comme puits de protons pendant l'oxydation de divers substrats organiques (glucose, lactate, glutamate).

Il existe dans les milieux naturels dont les sols, une diversité de bactéries impliquées dans la réduction ferrique. Toutefois, les oxydes de fer peuvent être réduits indirectement par les phénomènes abiotiques faisant intervenir des composés organiques comme les acides humiques ou fulviques, ou des métabolites microbiens, en modifiant le pH et le potentiel redox (Eh) du milieu.

1.3. Sols en milieu tropical humide et cas particulier des sols de rizières

1.3.1. Organisation et fonctionnement des sols tropicaux en climat humide

Dans la zone tropicale humide, les sols et les paysages intègrent et reflètent les variations climatiques, la roche mère et la situation stationnelle sur de longs termes. Plusieurs types de sols peuvent se distribuer de manière régulière dans le paysage alors que les roches mères demeurent homogènes. Ces successions ordonnées et systématiques de sols en fonction de la pente topographique constituent des toposéquences typiques (*Bocquier, 1971*). Dans les paysages des régions tropicales, les sols s'organisent en toposéquence de couleur (*Rajot, 1992; Diatta et al., 1998a*):

- en amont, sur les plateaux et les hauts versants, on trouve des sols rouges ou rouges-jaunâtres, gravillonnaires, sablo-argileux, profonds et des sols cuirassés. Les conditions de drainage sont bonnes et les cultures arbustives sont dominantes (cacaoyers, caféiers) ;
- dans le bas versant où les sols sont temporairement inondés, sont localisés des sols hydromorphes sableux, gris et profonds. La culture du riz est associée à celle de manioc, maïs, igname. On peut y voir des vergers.
- dans les bas-fonds, où les sols sont en permanence inondés en saison des pluies et beaucoup lessivés, les sols sont colluvio-alluviaux, hydromorphes, gleysols (**FAO, 1998**) sablo-limoneux à sablo-argileux blancs. La culture dominante est la riziculture.

Les sols tropicaux humides sont soumis à des saisons contrastées et subissent d'intenses processus d'altérations physiques et chimiques, de remaniement, sous l'influence des activités biologiques, du climat et de la topographie. Cependant, l'altération est généralement plus lente sur les plateaux que dans les bas-fonds hydromorphes où on assiste à un blanchiment dû à la dissolution des oxydes de fer (**Rajot, 1992**). Les minéraux dissous à l'amont s'accumulent à l'aval dans la zone de battement de la nappe (**Tardy, 1993**).

Les sols sont généralement acides, complètement ou moyennement désaturés en bases par l'altération. Ils sont riches en quartz, en oxydes et oxyhydroxydes de fer et d'aluminium (goethite, hématite, gibbsite) et renferment tous les principaux groupes de microorganismes qui jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement des cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote, du soufre, du fer, du phosphore, du manganèse (**Dommergues & Mangenot, 1970; Berthelin & DE Giudici, 1991**). Les oxyhydroxydes de fer et les matières organiques sont les constituants les plus réactifs de ces systèmes. En effet, dans les sols tropicaux sous forêt, c'est l'appauvrissement qui domine.

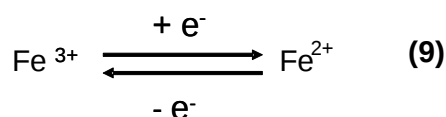
Dans ces milieux, le carbone apporté principalement par la production végétale est décomposé et minéralisé plus rapidement en amont qu'en aval dans les bas-fonds par les microorganismes présents (**Vizier, 1990**). En effet, cette rapide décomposition et minéralisation des matières organiques en amont est due en partie à l'oxygénation du milieu, qui favorise une biodégradation rapide et meilleure de la matière organique par les microorganismes (**Dommergues & Mangenot, 1970**). Selon Tardy (**1993**) l'activité biologique est le facteur nécessaire de l'évolution du paysage morpho-pédologique, mais elle est beaucoup influencée par l'état hydrique des sols.

1.3.2. Sols de rizières

Les rizières sont des milieux hydromorphes où un déficit plus ou moins prolongé en oxygène, dû à une saturation temporaire ou permanente des pores par l'eau, se manifeste. La submersion favorise des conditions d'aéro-anaérobioses ou anaérobioses, et provoque des réactions d'oxydation et/ou

réduction de divers éléments métalliques, en particulier le fer. Elle modifie les propriétés physico-chimiques et pédogénétiques du sol, ralentit le développement et l'activité des microorganismes qui interviennent dans le fonctionnement des cycles biogéochimiques.

Dans les sols de rizières, les oxydes, hydroxydes ou oxyhydroxydes de fer peuvent subir des réactions d'oxydo-réduction suivant les conditions d'aération du milieu, la composition et l'état des solutions du sol, ou la présence des microorganismes qui interviennent directement ou indirectement par ces minéraux. Les états du fer oscillent entre deux phases Fe^{2+} (de couleur verte, plus mobile) et Fe^{3+} (de couleur rouille, peu mobile). Le passage d'une forme à l'autre est contrôlé principalement par les réactions d'oxydo-réduction ci-dessous (équation, 9).



Il est possible d'établir des diagrammes de l'état du fer en solution selon les conditions d'aération et les paramètres du milieu: le pH et le potentiel redox (Eh), et pour une concentration donnée (**Charlot, 1983; McBride, 1994**) (Figure 1.3).

Ainsi, en présence d'oxygène (O_2) ($800 < \text{Eh} < 1500$ mV), les réactions d'oxydation sont dominantes. Le fer se trouve majoritairement sous forme insoluble (Fe^{3+}), et dans le sol, sous forme d'hydroxyde dont une grande partie à l'état colloïdal en milieu alcalin. La décroissance de l'oxygène (O_2), à $-450 < \text{Eh} < 800$ mV et des milieux acides, créent des conditions réductrices et favorise le transfert d'électrons vers des accepteurs Fe^{III} en solution ou sur la phase solide. A $\text{pH} > 7$, la présence de Fe^{2+} permet la précipitation des hydroxydes ferro-ferriques verts $\text{Fe}_3(\text{OH})_8$ ou noirs $\text{Fe}_4(\text{OH})_{10}$. A $-450 < \text{Eh} < -1000$ mV, le milieu devient plus réducteur. On peut observer la formation de sulfure de fer (FeS_2) par la réduction des sulfates et de sidérite (FeCO_3) quand le milieu est riche en matières organiques.

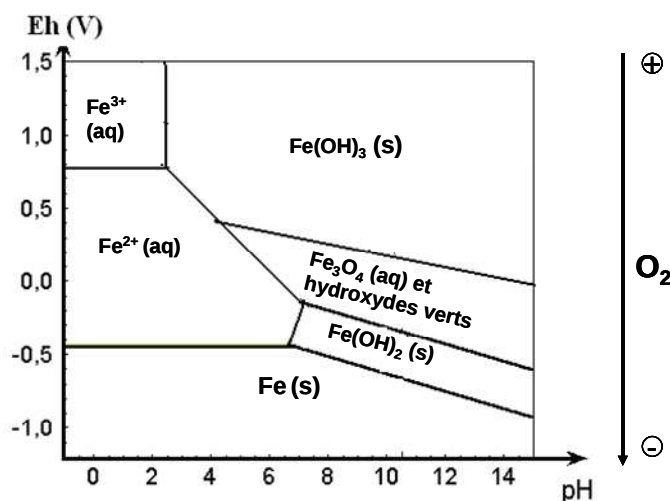


Figure 1.3 : Diagramme de Pourbaix (Eh, pH, Fer et O_2) d'après **Charlot (1983) et McBride (1994)**.

Selon l'état hydrique des sols, trois types d'hydromorphie peuvent se distinguer en fonction du potentiel redox des sols et du comportement des bactéries (**Dommergues & Mangenot, 1970; Berthelin, 1982; Berthelin & DE Giudici, 1991**) :

- l'hydromorphie non réductrice, caractérisée par des potentiels redox élevés et une teneur en oxygène suffisante pour la prolifération de la microflore aérobie ;
- l'hydromorphie moyennement réductrice, correspondant à des faibles potentiels redox et une présence d'oxygène favorisant le développement de la microflore aéro-anaérobie et pour certaines phases anaérobie. Le riz s'y développe parfaitement ;
- l'hydromorphie très réductrice, caractérisée par des potentiels redox très faibles et des milieux dépourvus d'oxygène ne provoquant que le développement des bactéries anaérobies strictes.

Divers travaux (**Dommergues & Mangenot, 1970; Berthelin, 1982; Berthelin & DE Giudici, 1991; Liesack et al., 2000; Yin et al., 2002**) révèlent qu'en cas de submersion d'un sol entraînant l'anaérobiose, le nitrate est le premier accepteur d'électron à être réduit très rapidement, suivi du Mn(IV), du Fe(III), du SO_4^{2-} et de CO_2 (Tableau 1.4).

Les sols de rizières se définissent comme un système à trois compartiments très complexes: oxique, anoxique et rhizosphérique (**Liesack et al., 2000**) (Figure 1.4), qui se distinguent l'un de l'autre par les paramètres physico-chimiques, l'activité et la distribution spatiale des différents groupes microbiens fonctionnels.

Tableau 1.4 : Processus de réduction bactérienne se produisant dans un sol engorgé d'après **Yoshida (1976); Berthelin (1982) et Berthelin & DE Giudici (1991)**

Transformations observées	Eh initial du sol (mV)	Processus biochimiques
Disparition O_2	-	Respiration aérobie
Disparition des NO_3^-	$500 < \text{Eh} < 600$	Respiration anaérobie
Formations de Mn^{2+}	$400 < \text{Eh} < 600$	Respiration anaérobie
Formations de Fe^{2+}	$300 < \text{Eh} < 600$	Respiration anaérobie
Formation de S^{2-}	$0 < \text{Eh} < -190$	Respiration anaérobie
Formation de H_2	$-150 < \text{Eh} < -220$	Fermentation
Formation de CH_4	$-150 < \text{Eh} < -190$	Fermentation

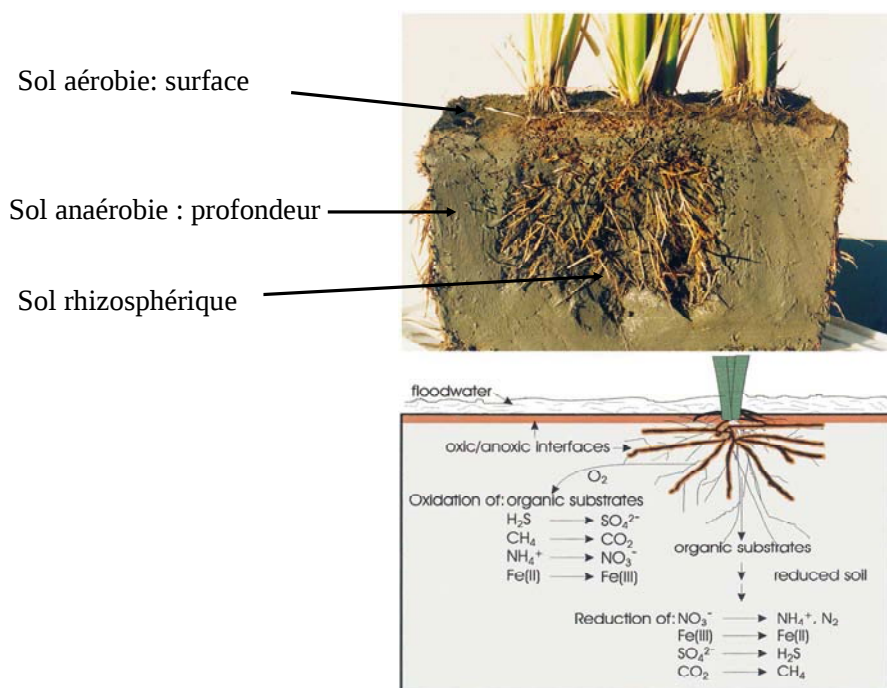


Figure 1.4 : Différents compartiments présents dans les sols de rizières d'après **Liesack et al.,(2000)**

Contrairement aux travaux menés dans les sédiments (**Canfield et al., 1993**) montrant une diminution de l'oxygène en profondeur, les sols de rizières présentent deux sources d'oxygène : la surface et la rhizosphère (**Liesack et al., 2000**). Ainsi, comme l'oxygène, le nitrate, le manganèse, le sulfate, le carbone, les profils du Fe(III) et Fe(II) seront modifiés dans chaque zone.

Dans ces milieux hydromorphes où les bactéries disposent de suffisamment de matières organiques métabolisables (**Berthelin & DE Giudici, 1991**) des activités sulfato-réductrices (SRB) et méthanogènes peuvent se développer. Roy et Conrad (**1999**), puis Yao et Conrad (**1999**) considèrent ces milieux comme la principale source de production de méthane atmosphérique.

1.4. Mobilité du fer et toxicité ferreuse dans les rizières

La toxicité ferreuse se manifeste dans les rizières lorsque d'importantes quantités de fer (Fe^{2+}) sont mobilisées et accumulées dans la solution du sol, notamment au niveau du bas-fond. Ce fer peut provenir de la mise en solution in situ, dans le bas-fond lui-même, ou du transfert de fer solubilisé des pentes adjacentes du bas-fond.

Dans les sols tropicaux de plateau, biens drainés, bien aérés, les teneurs en fer sont extrêmement faibles. Toutefois, des travaux ont mis en évidence l'influence que peut avoir la couverture végétale

sur les processus de migrations du fer (**Boquel & Suavin, 1974**). Les litières peuvent libérer, directement ou par biodégradation, des acides organiques susceptibles de former des complexes organo-métalliques qui rendent possible la migration du fer vers des milieux comme les rizières où il précipiterait ensuite sous forme d'hydroxydes.

Par ailleurs, le fer peut-être entraîné dans le bas-fond par des transferts verticaux ou par le ruissellement et l'érosion, ou être présent dans les bas-fonds où il sera transformé en fer ferreux soluble (**Diatta & Siband, 1998; ADRAO, 2002**) qui peut reprécipiter sous forme de complexes ferriques ou ferreux, ou sous forme d'hydroxydes ferriques (*Figure 1.5*) selon les paramètres physico-chimiques du milieu.

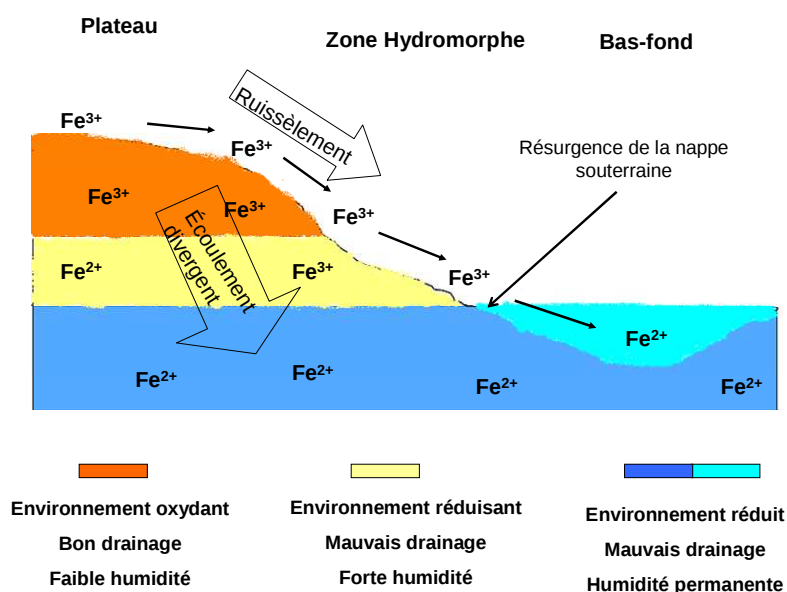


Figure 1.5 : Coupe transversale d'une toposéquence montrant le mouvement du fer et le processus de réduction d'après **ADRAO (2002)**

La mobilité du fer peut aussi être facilitée par des pH relativement bas (**Majerus et al., 2007a**) et ce d'autant plus que dans les milieux acides l'activité réductrice ne nécessite pas un potentiel d'oxydo-réduction très bas (**Jacq et al., 1987**).

Dans les sols saturés en eau comme ceux des rizières tropicales, **Prade et al., (1990)**, considèrent que la solubilité et la disponibilité du fer ferreux peuvent être régies par plusieurs facteurs, à savoir :

- la réduction du fer, avec l'intervention des microorganismes. Dans ce cas, elle dépend à la fois de la saturation du sol en eau, de la durée et de la continuité de l'engorgement, de la nature et de la teneur des matières organiques et du degré de cristallinité des minéraux contenant du fer ferrique ;

- la solubilité des composés ferreux, liée à la nature des constituants du sol, à la présence ou non d'anions organiques complexes et aux mécanismes de sorption et de désorption ;
- les propriétés hydrodynamiques du sol, qui diffèrent selon que l'eau évolue par ruissellement en milieu ouvert ou par infiltration en milieu fermé.

L'intervention simultanée de tous ces facteurs peut être à l'origine de la grande disponibilité du fer ferreux, parfois observée dans certains sols de rizières, et qui provoque la toxicité ferreuse chez les plants de riz. Les ions ferreux en solution occasionnent un déséquilibre en élément de la solution du sol qui se répercute au niveau de la plante. Outre les symptômes caractéristiques du "bronzing" ou du "yellowing" des feuilles, la toxicité ferreuse se traduit également par une réduction de la croissance du riz (hauteur et tallage) et par une augmentation du taux de stérilité des panicules. La productivité peut ainsi diminuer de 10 à 100% selon la concentration en Fe^{2+} dans la solution et la tolérance du cultivar utilisé (*Masajo et al., 1986; Abifarin, 1988, 1989*).

La toxicité ferreuse constitue l'une des contraintes majeures des rizières d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud. C'est un désordre nutritionnel associé à de fortes concentrations de fer pouvant atteindre 500 mg l^{-1} (*De Dorlodot et al., 2005*) dans la solution du sol. Au niveau du sol, des taches qui ressemblent aux taches d'hydrocarbure ou d'huile à la surface de l'eau indiquent la richesse en fer du milieu (*Figure 1.6*).



Figure 1.6 : A- Zone de résurgence de la nappe souterraine à la lisière du bas-fond, là où l'eau stationnaire et l'eau de la pente se rencontrent. Noter à la surface du sol, la couleur rougeâtre du fer ferrique devenant plus pâle sous le processus de réduction ; B-Oxydation du fer à la surface des eaux ; C- Toxicité ferreuse au niveau des feuilles (brunissement) dans les rizières de la région de Gagnoa en Côte d'Ivoire

Divers travaux (*Jacq et al., 1987; Vizier, 1988; Jacq et al., 1990; Prade et al., 1990; Vizier, 1990*) estiment que de multiples déficiences nutritionnelles peuvent être la cause majeure de la toxicité ferreuse observée chez les plants de riz. En effet, les symptômes de toxicité ferreuses sont apparus quand le riz présentait des carences en potassium et en zinc (*Benckisser et al., 1984*) ou d'autres toxicités chimiques (aluminique, manganique...) ou encore des attaques bactériennes ou virales (panachure jaune, helminthosporiose). Ceci est en accord avec l'observation faite par Vizier (*1988*) qui affirme qu'une forte absorption de fer s'accompagne d'une carence de certains éléments (Mn^{2+} , K^+ , P^+ , Mg^{2+}). Par ailleurs, des sulfures ou du méthane produits par la microflore associée au système racinaire du riz (*Jacq et al., 1987; Prade et al., 1990; Buri et al., 2000*) ainsi que la nature de la fraction argileuse des sols (kaolinite, smectite) peuvent y contribuer. En fait, les sols argileux (60%) sont très lourds et très asphyxiants, et, de ce fait, sont a priori plus favorables au développement des microflores réductrices. Il faut également noter que les rizières propices à la manifestation de la toxicité ferreuse sont caractérisées par une capacité d'échange faible.

En l'état actuel des connaissances il semble que les risques de la toxicité ferreuse dépendent de la relation existant entre l'état général de la plante ou de la somme des éléments absorbés et la concentration en fer ferreux de la solution du sol (*De Dorlodot et al., 2005*).

1.5. Salinité

Plus de deux cents millions d'hectares de sols sont affectés par la salinité dans le monde ; ce qui correspondrait à environ 20% des surfaces cultivables (*Funakawa et al., 2000*). L'origine des sels responsable de la salinité est diverse (*Imaizumi et al., 2002*) :

- salinisation primaire ou naturelle est due aux sels se formant lors de l'altération des roches ou par des apports naturels externes : remontée d'une nappe phréatique salée, inondations périodiques par de l'eau de mauvaise qualité ;
- salinisation secondaire induite par l'activité humaine, liée à des pratiques agricoles inappropriées.

Les sols affectés par les problèmes de salinité présentent des concentrations excessives en sels solubles : Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} , NO_3^- , (sols salins ou sols salic), en sodium adsorbé (sols sodic ou alcalins) ou les deux (sols alcalino-salins) (*Dommergues & Mangenot, 1970*). Les fortes concentrations salines s'expriment à la surface des sols sous diverses formes (poudres, croûtes, efflorescences) (*Grünberger et al., 2008*).

Selon la nature et la quantité relative d'anions, les conditions d'oxydo-réduction (Eh) et du pH, Loyer *et al.*, (1989) et Loyer (1991a) identifient six faciès de sols salins (Figure 1.7) et trois domaines de pH de sols :

- le faciès salin chloruré : acide à très acide, d'origine de mangroves, $3 < \text{pH} < 5$, avec présence de sulfate de fer (jarosite) et de goethite ;
- le faciès salin chloruro-sulfaté neutre: solutions chlorurées affectées par la présence de gypse d'origine sédimentaire ;
- le faciès salin sulfaté neutre : d'origine continentale ;
- le faciès salin sulfaté acide : domaine hyperacide ($\text{pH} < 3,5$), d'origine fluvio-marine, avec acidolyse et précipitations directes de sels à partir de la solution du sol. Présence de sels d'aluminium, de fer ou magnésium très solubles. Ce sont des sols salins très acidifiés par l'oxydation microbienne des sulfures ;
- le faciès salin carbonato-sulfaté alcalin qui constitue le domaine alcalin à hyperbasique ($\text{pH} > 8,5$), et est d'origine continentale. Il est caractérisé par la présence de bases fortes qui élèvent le pH ;
- le faciès carbonaté hyperbasique : milieu continental mal drainé, anaérobie, très riche en matière organique, en H_2S et en bicarbonates. Il est caractérisé par la dissolution de la matière organique par alcalinolyse

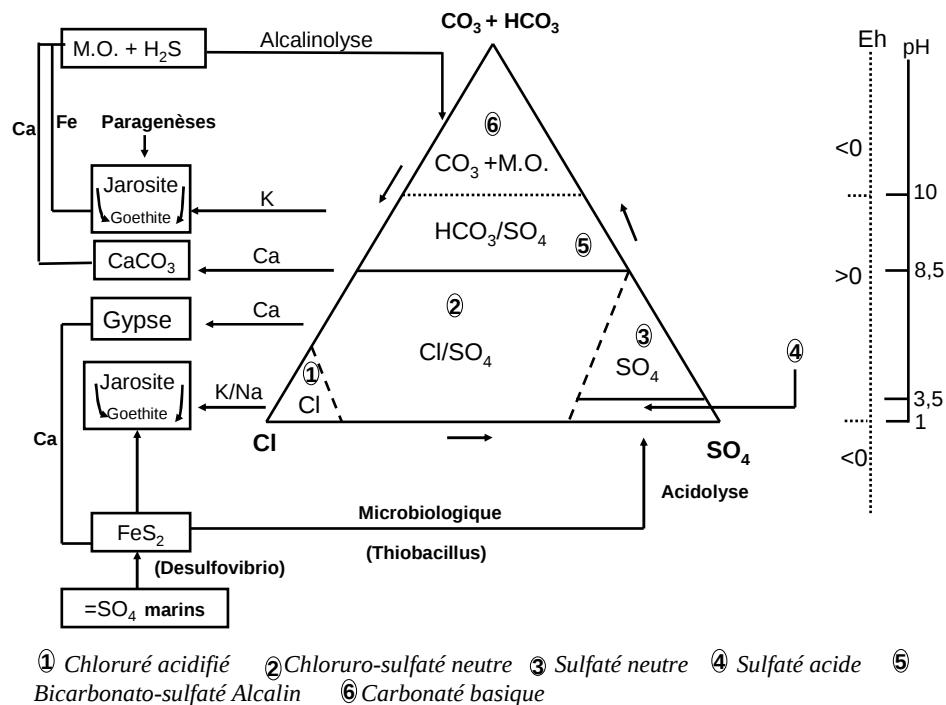


Figure 1. 7 : Principaux faciès des sols salins d'après Loyer *et al.*, (1989)

Les trois premiers faciès (salin chloruré, salin chloruro-sulfaté neutre et salin sulfaté neutre) constituent le domaine des sels neutres (chlorures et sulfates de sodium, calcium et magnésium), avec $3,5 < \text{pH} < 8,5$.

Sur les plans climatiques et hydriques, de vastes zones favorables à la riziculture restent inoccupées à cause des problèmes de salinité qui empêchent leur utilisation. La présence de sel dans ces milieux est, entre autre, liée à la qualité des eaux d'irrigation qui peuvent être généralement des eaux usées, des eaux marines ou des effluents urbains, et à des remontées salées de la nappe. Les conséquences de l'utilisation incontrôlée des eaux d'irrigation sur la salinisation et l'alcalinisation des sols sont bien connues (**Loyer, 1991a; Grünberger et al., 2008**). Selon Loyer (**1991b**), les eaux du fleuve Sénégal apportent environ $500 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de sel pour une dose de $10\,000 \text{ m}^3$ d'eau d'irrigation. Pour Cary et Trolard (**2006**), l'irrigation en Camargue facilite la dissolution des carbonates de calcium et de magnésium, et même des oxydes de fer. Il en est de même pour les eaux de rizières sulfatées acides de Basse Casamance, situées en bordure des marigots dont les nappes sont salées suivant la pluviométrie et où la toxicité ferreuse a été observée (**Prade et al., 1990**).

La présence de sels affecte les propriétés physiques des sols (porosité, disponibilité hydrique,...) : ce qui rend les sols asphyxiants. Dans les sols salins, la présence excessive de sels solubles neutres flocule la fraction argileuse, mais les maintient stable, alors que dans les sols alcalins, un excès en sodium échangeable favorise la dispersion de l'argile et rend la structure du sol instable (**Loyer, 1991a, b**).

Les sels constituent un obstacle physique à l'enracinement à cause de la diminution de la disponibilité en eau et de l'instabilité structurale du sol. Ils sont aussi à l'origine des déséquilibres nutritionnels observés chez les plantes (**Maillard, 2001**), en particulier le riz, et qui entraînent des toxicités d'ions (Na, Cl, B, Mo, Fe...). Des toxicités ferreuses ont été observées dans les rizières salines en basse Casamance (**Prade et al., 1990**).

Des études menées par Liu et Millero (**2002**) sur la solubilité du fer dans les eaux de mer et dans une solution de NaCl à pH 8 révèlent une plus forte solubilité du fer dans les eaux de mer, due à la présence d'acides organiques, que dans la solution de NaCl, et montrent un changement de spéciation du Fe (III) à $6 < \text{pH} < 7$, avec la transformation de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ en FeOOH (**Liu & Millero, 1999**).

Les recherches menées au laboratoire sur les sols salins de rizières de Taiwan indiquent que la forte concentration en P, K, Ca, et Mg peut être la cause des carences en fer chez le riz et, inversement (**Quijano-Guerta & Kirk, 2002**). Ce qui suggère un système interactif qui pourrait être à l'origine des

toxicités. Toutefois, le riz est, parmi toutes les céréales, modérément sensible à la salinité (**Quijano-Guerta & Kirk, 2002**).

Les milieux salins sont aussi défavorables pour de nombreux microorganismes du sol en raison du pH trop basique, de la tension osmotique trop élevée et de la structure asphyxiante du sol. Toutefois, des expériences ont montré que la salure exerce des effets différents sur la microflore tellurique de sorte que certains microorganismes sont peu sensibles alors que d'autres sont inhibés (**Dommergues & Mangenot, 1970**). Les champignons (sauf les *Penicillium* et *Aspergillus*) et les algues, comme les diatomées, sont sensibles aux fortes teneurs en sel. Par contre, les bactéries sont capables de vivre dans des milieux extrêmement variés, car elles possèdent des systèmes de protection efficaces contre les différents stress osmotiques qu'elles peuvent rencontrer. Lorsqu'une bactérie subit un stress osmotique, dû à une forte augmentation de la concentration en sel dans son milieu, elle accumule dans le cytoplasme des molécules protectrices, appelées solutés compatibles, qui permettent le rétablissement de l'équilibre osmotique à l'intérieur de la bactérie.

Les bactéries qui sont peu touchées par la salure sont des bactéries halotolérantes ou halophiles. Par contre, celles qui sont plus sensibles sont des bactéries non halotolérantes.

Les bactéries halophiles sont des archéobactéries qui se développent dans des milieux hyper salés dont la concentration en chlorure de sodium dépasse celle de l'eau de mer, c'est-à-dire supérieure à environ 3,5%. Ainsi, dans les écosystèmes marins comme dans les systèmes aquatiques hyper salins, des archéobactéries tels : *Halomonas*, *Halobacterium*, *Haloferax* et *Haloarcula* ont pu être isolées. La concentration optimale en sel pour *Halobacterium salinarum* et les espèces proches est de 4,6 mol.l⁻¹, près de dix fois celle de l'eau de mer. Elle est donc proche de la saturation qui intervient vers 5,2 mol.l⁻¹, environ 300 g.l⁻¹, selon la température. Leur spécificité est liée à leur capacité à modifier significativement la structure de leurs protéines et de leurs membranes plasmiques (**Caton et al., 2004; Kraegeloh et al., 2005; Sokhansanj et al., 2005; Rafiee et al., 2007**) plutôt que d'augmenter la concentration intracellulaire des solutés comme le font les bactéries non halotolérantes et halotolérantes: *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Océanobacillus*, *Virgibacillus*, *Halobacillus*, *Salibacillus*, qui acceptent des concentrations modérées de sel (environ 10g.l⁻¹).

De tous les processus biologiques, la nitrification est la plus sensible à la salure. Un taux élevé en sodium ralentit la minéralisation du stock d'azote organique du sol. Cependant, cette toxicité est moins marquée si le sel est un carbonate de calcium qui a un effet stimulant (**Dommergues & Mangenot, 1970**) sur la nitrification. Dans les sols de rizières, en zone méditerranéenne, il semble que les sols salés soient plus sensibles à la sulfato-réduction (exemple des sols alluviaux salins de Tunisie). En zone tropicale, la sulfato-réduction est aussi, généralement, plus intense dans les rizières salées. Il est

possible que la sulfato-réduction survienne plus facilement quand les plantes souffrent de la présence, à doses élevées, de chlorure de sodium. En milieu riche en fer, ces conditions très réductrices entraînent la formation de sulfure de fer. Ces milieux asphyxiants sont à priori, favorables aux microflores ferri-réductrices (*Prade et al., 1990; Loyer, 1991a*).

1.6. Matière organique

Dans les environnements anaérobies, particulièrement dans les sols de rizières, trois importantes réactions redox interviennent dans la décomposition de la matière organique des sols (MOS) : oxydation de la matière organique avec réduction du fer, oxydation de la matière organique avec réduction des sulfates et conversion de la matière organique en dioxyde de carbone et en méthane (*Lu et al., 2002*), qui servent de source de carbone et d'énergie pour les microorganismes et leurs activités.

L'évolution de la fraction organique est différente de celle des milieux aérés. Dans les sols de rizières, l'hydromorphie bloque l'évolution de la matière organique, qui s'accumule en surface sous une forme moins décomposée. L'évolution particulière de la matière organique, avec la formation de composés peu polymérisés dans ces sols, à fort pouvoir réducteur et complexant, facilite la réduction et la mobilisation des éléments minéraux comme le fer. Des travaux (*Yao & Conrad, 1999; Chidthaisong & Conrad, 2000*) ont aussi montré qu'en milieu moyennement réducteur, on observait une importante production d'alcools et d'acides organiques grâce à la transformation du saccharose, de la cellulose pure et aussi de la paille de riz. Alors qu'en milieu très réducteur, on avait une forte production de méthane (*Berthelin, 1982*) et de sulfures, due à la décomposition de la cellulose qui est le constituant majeur des pailles de riz.

Les effets du manque d'oxygène sur la dégradation de la matière organique ont souvent été abordés dans divers travaux. Selon Holmer (*1999*) et Sun *et al.* (*1997*), la biodégradation de certains détritiques organiques réfractaires et de macromolécules complexes, comme les lipides, est plus lente sous conditions anoxiques. Ainsi, un taux de matières organiques élevé est très souvent maintenu sous ces conditions. Ce qui favorise, pour Kristensen *et al.* (*1995*), l'accumulation de matières organiques dissoutes (MOD), qui est accompagnée très souvent d'une faible production de CO₂. Cette accumulation des MOD dans les pores des sols contribuera à préserver les matières organiques (*Henrichs, 1995*).

La désorption des matières organiques du sol (MOS) est l'un des mécanismes susceptibles de participer à la mobilité et à la disponibilité du fer dans les sols. La présence de charges négatives sur les matières organiques provoque l'adsorption des composés inorganiques (métaux,...) à leurs surfaces. Cette adsorption varie en fonction de la nature des matières organiques et du pH du milieu.

Diverses études (**Gerringa et al., 2007; Gerringa et al., 2008**) révèlent que dans l'eau, la concentration des substances complexantes organo-ferriques est en partie responsable du potentiel de solubilité des oxydes de fer. En effet, comme 99% du fer dissout sont liés aux ligands organiques, elles estiment que la complexation chimique *sensu stricto* est plus réactive et plus importante que la réduction bactérienne des oxyhydroxydes. Toutefois, la réduction bactérienne serait la phase initiale d'altération et dissolution (**Stemmler & Berthelin, 2003**).

Différentes communautés bactériennes capables de produire des agents complexants ou chélatants, comme les acides organiques et les sidérophores, pourraient jouer un rôle important dans la solubilisation et le transport du fer. Les sidérophores (chélateurs du fer), molécules de faibles masses dont la taille peut atteindre environ 1200 daltons, sont produites par les bactéries, les champignons et certaines graminées pour "capturer" le Fe (III) dans leur environnement et, ainsi, de le rendre disponible, puis assimilable aux organismes qui l'on produit grâce à des mécanismes de transports spécifiques. Les sidérophores ou les bactéries sont en plus fortes concentrations dans les milieux carencés en fer. Ainsi *Frankia sp.* produit des sidérophores nommés frankobactines (composés hydroxamiques) afin d'obtenir le fer nécessaire pour la fixation de l'azote (**Boyer et al., 1999**).

Les substances humiques avec leurs groupements fonctionnels acides (carboxyliques, phénoliques) constituent la principale source de ligands de métaux dans les milieux continentaux. Elles peuvent servir, avec leurs groupements quinoniques, d'accepteurs finaux d'électrons pour les bactéries ferri-réductrices (**Lovley & Coates, 2000**). La capacité des bactéries, comme *Schewanella alga* et *Geobacter metallireducens*, à transférer les électrons aux substances humiques pourrait avoir un rôle important dans le cycle des métaux. Une fois réduits, ces composés humiques vont réduire chimiquement les oxydes, en particulier ceux du fer présent dans le milieu (**Francis et al., 2000**). Aussi, les quinones, principales accepteurs d'électrons présents sur les substances humiques, peuvent-elles intervenir dans des réactions d'oxydo-réduction. A l'état oxydé, les quinones participent à la chaîne respiratoire en agissant comme des accepteurs terminaux d'électron. Sous forme réduite, elles s'oxydent en utilisant le Fe (III) comme puits d'électron.

1.7. Rhizosphère du riz

Strictement, la rhizosphère est la région du sol qui est directement en contact avec les racines. Elle est qualifiée comme la zone d'intense activité (**Dommergues & Mangenot, 1970**) entourant les racines, en raison de la présence de microorganismes, bactéries et champignons et de leurs prédateurs. La rhizosphère inclut aussi la surface des racines (rhizoplan) et l'intérieur de celles-ci (endorhizosphère). Le fonctionnement de la rhizosphère varie avec les paramètres physico-chimiques du sol, l'espèce

végétale, l'état physiologique de la plante, les productions d'exsudats racinaires, la rhizodéposition et les microorganismes présents à l'interface racine-sol.

Le riz est une plante monocotylédone, de la famille des poacées. La tige du plant de riz est dressée ou rampante. La hauteur varie entre 0,5 et 1,5m. Le système racinaire est de type fasciculé (*Figure 1.8*) et comporte un aérénchyme qui permet à la plante de transférer de l'oxygène des parties aériennes vers les racines, créant ainsi une deuxième source d'approvisionnement en oxygène pour les microorganismes en condition anoxique (*Liesack et al., 2000; De Dorlodot et al., 2005*). Le maintien d'une rhizosphère oxydée est vital pour le riz, car il prévient l'absorption de substances réduites en trop fortes quantités par la plante (*Vizier, 1988*).

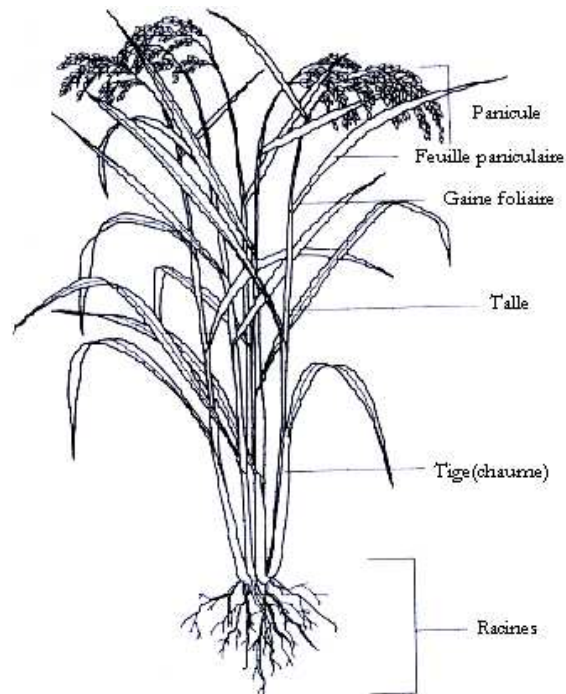


Figure 1.8 : Différentes parties du plant de riz d'après *Monty (1995)*

Le riz peut:

- oxyder le fer(II) en Fe(III) grâce à l'oxygène transporté vers les racines par l'aérénchyme, causant des précipitations d'oxydes et d'hydroxydes ferriques à la surface des racines. Selon *De Dorlodot et al., (2005)*, c'est une stratégie de protection qu'adopte certaines variétés de riz comme *Oryza sativa* (sensible à la forte concentration d'ions ferreux en solution) et d'autres espèces aquatiques ;
- expulser le fer hors de l'endorhizosphère par discrimination (*Nozoe et al., 2004; Majerus et al., 2007a*) ;

- activer, face au stress oxydatif, comme pour l'espèce *Oryza glaberrima*, des mécanismes antioxydatifs (**Majerus et al., 2007a**) ou accumuler le fer sous forme de dépôts non toxiques dans les vacuoles, les mitochondries, le plasme et dans l'apoplasme où la faible acidité favorise d'excellentes conditions de dépôt de fer (**Dos Santos & De Oliveira, 2007**) ou aussi le chélater en synthétisant des protéines de type ferritines. Dans ce cas, les plantes, bien que possédant davantage de fer, se comportent comme si elles se trouvaient en manque de fer. Il en résulte une activation des systèmes de transport racinaire qui enrichit les plantes non seulement en fer mais également en métaux indésirables (**De Dorlodot et al., 2005; Majerus et al., 2007a; Majerus et al., 2007b**).

Face donc aux stress biotiques et abiotiques, la plante de riz développe plusieurs stratégies de survie. Par contre, si cette régulation n'a pas pu être assurée par la plante, on pourra observer, soit une chlorose ferrique correspondant à une absorption déficitaire, soit une toxicité ferreuse.

De plus, des toxicités sulfuriques par des accumulations de monosulfure ferreux (FeS) insolubles et noires ont été observées dans la spermosphère et la rhizosphère du riz en Tunisie, en milieu salin (**Jacq, 1975; Jacq et al., 1990**). Cela peut être lié aux conditions de ce milieu et à la présence d'exsudats organiques qui favorisent l'activité des bactéries sulfato-réductrices (SRB) (**Jacq, 1975**) présentes dans les sols soumis à des phases d'hydromorphie.

La rhizosphère du riz constitue une source importante d'azote dans les sols de rizières (**Rinaudo, 1977; Dommergues, 1979; Mengel et al., 1986**). En effet, plusieurs travaux (**Roger & Watanabe, 1986; Yanni et al., 1997**) ont montré que la rhizosphère de poacées, comme le riz, héberge de nombreuses bactéries fixatrices d'azote (aérobies : *Azotobacter*, *Beijerinckia* ; microaérophiles : *Spirillum*, *Derxia* ; anaérobies facultatives : *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* ; anaérobies strictes : *Clostridium sp.*, *Desulfovibrio sp.*) qui produisent plus de 50kg d'azote par hectare et par cycle cultural (**Traoré, 1985; Roger & Ladha, 1992; Stolfus et al., 1997**). Indirectement, le riz est capable d'utiliser pour sa nutrition l'azote fixé par ces bactéries. Mais, selon Dommergues (**1979**) et Rinaudo (**1977**), cette fixation peut être limitée par la quantité de la source d'énergie disponible et aussi par le caractère génétique de la plante. De même, pour Webster *et al.*, (**1997**) ces bactéries peuvent soit utiliser une grande partie de l'azote fixé pour leur croissance, soit coloniser seulement la surface des racines et rester vulnérables aux autres microorganismes de la rhizosphère ; ce qui limiterait la fixation biologique de l'azote.

La rhizosphère du riz est aussi un milieu favorable pour la dénitrification. En effet, un grand nombre de bactéries dénitrifiantes est observé aussi bien dans la rhizosphère du riz que dans le sol non rhizosphérique, malgré la présence de la zone oxydée autour des racines. La dénitrification pourrait

être aussi assimilative et non pas seulement respiratoire (dissimilative) (**Garcia, 1974**). Par ailleurs, la présence des deux zones distinctes dans la rhizosphère (*Figure 1.9*) peut favoriser le développement simultané de la nitrification dans la zone oxydée et de la dénitrification dans la zone réduite (**Reddy & Patrick Jr, 1986**).

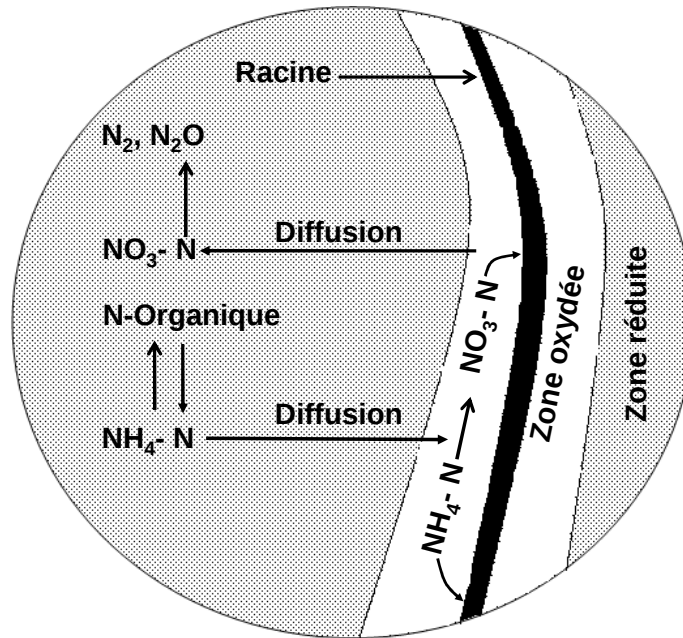


Figure 1.9 : Présentation schématique de la transformation de l'azote dans les zones oxydées et réduites de la rhizosphère du riz d'après **Reddy & Patrick (1986)**

Conclusion et problématique de recherche

Dans les pays tropicaux, en particulier ceux d'Asie et d'Afrique, le riz occupe une place importante dans l'alimentation des populations (*FAO, 2004*). Cependant, avec l'essor de la croissance démographique et de l'économie de plantation, la forêt est remplacée par les cultures économiquement plus rentables (caféier, cacaoyer, bananier, ignames). Cette déforestation a modifié les conditions climatiques locales, la dynamique du cycle de l'eau, et favorisé l'assèchement. De telles modifications affectent les pratiques culturelles et la culture du riz, pratiquée intensivement dans les bas-fonds (*N'Dabalishle, 1995; N'Guessan, 2002*). Mais, dans ces sites de bas-fond ou de bas de toposéquence, peuvent apparaître et se développer des conditions défavorables comme la toxicité ferreuse et la salinité, qui sont devenues des problèmes importants, contribuant à la diminution des rendements du riz irrigué (*Sahrawat & Sika, 2002*).

De plus, les exploitations plus intenses et l'apport décroissant des engrais minéraux diminuent graduellement la fertilité des sols de rizières qu'il faut absolument "reconstituer" pour garantir une production durable. Face à ces problèmes et difficultés, les agriculteurs proposent et appliquent des remèdes, pas toujours bien expliqués, comme l'apport de matières organiques pour lutter contre la salinité en Thaïlande, qui a aussi un effet sur les conditions réductrices du milieu.

Dans les sols de rizières qui sont de vastes agrosystèmes à condition spécifiques, le cycle du fer joue un rôle important, soit directement sur la production de riz, soit indirectement comme indicateur de qualité des rizières. En effet, des déficits ou des excès de fer sont souvent à l'origine de désordre nutritionnel observé chez les plants de riz (*Neue et al., 1998; Sahrawat et al., 2001*) et engendrent des baisses importantes de la production.

Des observations et mesures de terrain montrent dans des rizières de Thaïlande et de Côte d'Ivoire, des phénomènes de réduction intenses évaluées par de fortes teneurs de fer ferreux en solution (*ADRAO, 2002; Grünberger et al., 2008; Quantin et al., 2008*). Ces teneurs en fer ferreux sont aussi stimulées par des apports de matières organiques (Thaïlande). De telles constatations suggèrent l'intervention de communautés bactériennes réductrices de fer, qui peuvent être à l'origine de ces solubilisations.

L'hypothèse centrale de cette étude repose sur l'effet "positif" des activités bactériennes sur la disponibilité du fer dans les sols de rizières et sur l'amélioration ou la dégradation de leur qualité productive. Pour valider cette hypothèse, deux situations, un peu extrêmes, ont été abordées par une approche de terrain et de laboratoire. Deux sites de références où les problèmes de toxicité ferreuse (Côte d'Ivoire) et de salinité traitée par les apports de matières organiques (Thaïlande) se manifestent, ont été sélectionnés.

Dans ce jeu d'interactions complexes participant à la solubilisation et à la disponibilité du fer dans ces sols de rizières, nous nous sommes attelés à répondre à différentes questions :

- Comment les microorganismes contrôlent-ils les flux du fer et des éléments majeurs et en traces responsables de la qualité et de la fertilité des sols, de la nutrition des plantes et de la qualité des solutions du sol ?
- Quel est l'impact d'actions anthropiques (apport de matières organiques par dans les sols de rizières) et du contexte géologique du milieu (salinité) sur ces processus et principalement sur les communautés bactériennes ferri réductrices?
- Quelle est l'influence des paramètres du milieu (pH, salinité, aération, nature et disponibilité des matières organiques) sur les activités bactériennes ferri-réductrices?
- Quel est l'impact des interactions entre les différents paramètres et leur manifestation dans la rhizosphère de plants de riz?

Cette étude intitulée *"implications des communautés bactériennes ferri-réductrices et des paramètres environnementaux dans le fonctionnement et la qualité des sols de rizières (Thaïlande et Côte d'Ivoire)* a donc été axée sur l'amélioration des connaissances des facteurs biotiques et abiotiques régulant la dynamique et la disponibilité du fer dans les sols de rizières. D'un point de vue socio-économique, elle vise aussi à améliorer la production du riz en vue d'atteindre la sécurité alimentaire et le niveau de vie des paysans.

Les phénomènes d'oxydo-réduction essentiellement du fer seront donc étudiés dans une situation où ils apparaissent bénéfiques (cas de la Thaïlande) et dans une situation où ils sont néfastes (cas de la Côte d'Ivoire) pour les rizières.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

2.1. Principe de l'étude

L'étude des mécanismes et des paramètres impliqués dans la dynamique et la disponibilité du fer dans les eaux et les sols de rizières a mis en œuvre deux types d'approches :

- une approche de terrain pour permettre de caractériser les propriétés physiques, chimiques, biologiques (recherche des communautés bactériennes autochtones) des eaux et des sols de rizières afin de mieux définir les facteurs majeurs impliqués *in situ* ;
- une approche expérimentale en laboratoire pour distinguer l'impact des processus chimiques et bactériens ainsi que celui des conditions du milieu sur la mobilité du fer

Les mesures ont porté sur les caractéristiques abiotiques (pH, Eh, EC, teneur en éléments majeurs, matières organiques,...) et biotiques (activités et populations bactériennes) et ont été conduites conjointement en Thaïlande et en Côte d'Ivoire. En Thaïlande, les mesures de terrain ont été effectuées par l'IRD et le Land Department and Development (Bangkok), dans le cadre du projet TICA (Thailand International Cooperation Agency). Elles ont été complétées par des analyses conduites au LIMOS (Laboratoire des Interactions Microorganismes Minéraux et Matières organiques dans les Sols) à Nancy en France. En Côte d'Ivoire, les travaux de terrain ont été réalisés en collaboration avec le Centre National de Recherche Agronomique (CNRA). Une partie des analyses granulométriques et chimiques des échantillons de sol a été effectuée au laboratoire des sols et des végétaux de l'Institut National Polytechnique Felix Houphouët-Boigny (INPFH-B) de Yamoussoukro.

L'étude des différentes formes de fer dans les sols, les analyses des phases hydro et acido-solubles, des fractions gazeuses, des acides organiques issus de la biodégradation des matières organiques et des activités ferri-réductrices, ont été réalisées au LIMOS. Le rôle des bactéries dans ces processus a été suivi par des dénombrements, des isolements, des purifications des consortia bactériens sur milieux spécifiques et par des études de métabolisme au LIMOS.

L'identification des consortia bactériens cultivables ou non cultivables a été réalisée au LIMOS par les techniques de biologie moléculaire.

L'analyse minéralogique simple des échantillons de sols de Thaïlande et de Côte d'Ivoire, pour la recherche des différents types d'oxydes et des minéraux dominants a été réalisée au LEM (Laboratoire Environnement Minéralurgie) à Nancy.

La fraction carbonée hydrosoluble (COD) a été déterminée par analyse TCM Total Organic Carbon DohrmannTM DC190, au SARM, CRPG (Centre de Recherche de Pétrographie et Géochimie du CNRS de Nancy).

2.2. Présentation des sites d'étude, Echantillonnage des sols et des solutions de sols

Deux sites de rizières ont été retenus pour cette étude: l'un en Thaïlande, affecté par la salinité et ayant reçu comme traitement des apports de matières organiques (résidus végétaux, fumiers) conduisant à distinguer des sites avec ou sans apport de M.O. et des sites avec ou sans salinité, soit quatre types de conditions environnementales.

L'autre, en Côte d'Ivoire, est affecté par des problèmes de toxicité ferreuse. Son étude a été abordée en considérant plus particulièrement une toposéquence de sols en zone rizicole.

2.2.1. Site d'étude de Thaïlande

2.2.1.1. Problématique et objectifs

En Asie, plus de 20 millions d'hectares de sols, principalement des sols de rizière, sont affectés par la salinité. Au Nord-Est de la Thaïlande, un bon nombre des terres cultivables sont confrontées à ce problème. Les sols risquent principalement une dégradation par alcalinisation et sodisation en raison de la teneur en sels des eaux. On assiste d'une part, pendant la saison sèche, à la formation de croûtes de sels à la surface du sol et, d'autre part, à la forte salinisation des solutions des sols pendant la période humide.

Dans les sols de rizières, les pratiques agricoles génèrent des alternances de submersion et de drainage, et donc des périodes aérobies et anaérobies. Dans ces milieux à fortes contraintes, les processus d'oxydo-réduction peuvent, en particulier lorsque les sols contiennent des formes réductibles ou oxydables du fer ou du soufre, avoir des impacts marqués sur la mobilisation et l'immobilisation des éléments minéraux, et affecter, avec la salinité, la croissance du riz, principale ressource alimentaire de la population. Ces processus d'oxydo-réduction sont sous la dépendance d'activités bactériennes qui elles mêmes, sont liées aux conditions du milieu.

Quatre sites ont été retenus pour étudier les processus d'oxydo-réduction, et en particulier la dynamique du fer en milieu salin ou non, en considérant l'impact des apports de matières organiques, de la salinité et de la rhizosphère.

2.2.1.2. Choix du site d'étude et localisation

Deux parcelles rizicoles de Pra Yun, situées environ à 30km au Sud-Ouest de Khon Kaen (*Figure 2.1*), au Nord-Est de la Thaïlande (16°21'12,7''Nord et 102°36'29,8''Est), ont été choisies par l'IRD en collaboration avec le Land Department and Development (LDD) de Bangkok (Thaïlande), pour y effectuer des études biogéochimiques des solutions et des sols de rizières.

Les deux parcelles diffèrent par leur mode de gestion. La première, dite amendée, est notée L25, et reçoit des matières organiques sous formes d'apports " non contrôlés". La seconde, dite non amendée

(L14), ne reçoit aucun soin particulier. Dans ces deux parcelles, des zones salines (S) et non salines (NS) ont été distinguées pour définir l'impact de la salinité (Figure 2.1 –D).

Le climat est de type tropical et les précipitations moyennes annuelles sont de 1200 mm, réparties de mai à octobre.

Les sols de type Solontchaks ou solonchaks (**Duchaufour, 1997; FAO, 1999**) sont principalement composés de sédiments du mésozoïque et de dépôts du quaternaire. Ils reposent sur la formation du crétacé de Maha Sarakham (**Imaizumi et al., 2002; Montoroi et al., 2005; Grünberger et al., 2008**) constituée de dépôts d'origine clastique et d'argiles schisteuses intercalées de deux à trois couches de roches salines (halite, gypse, anhydrite, carnallite et sylvite).

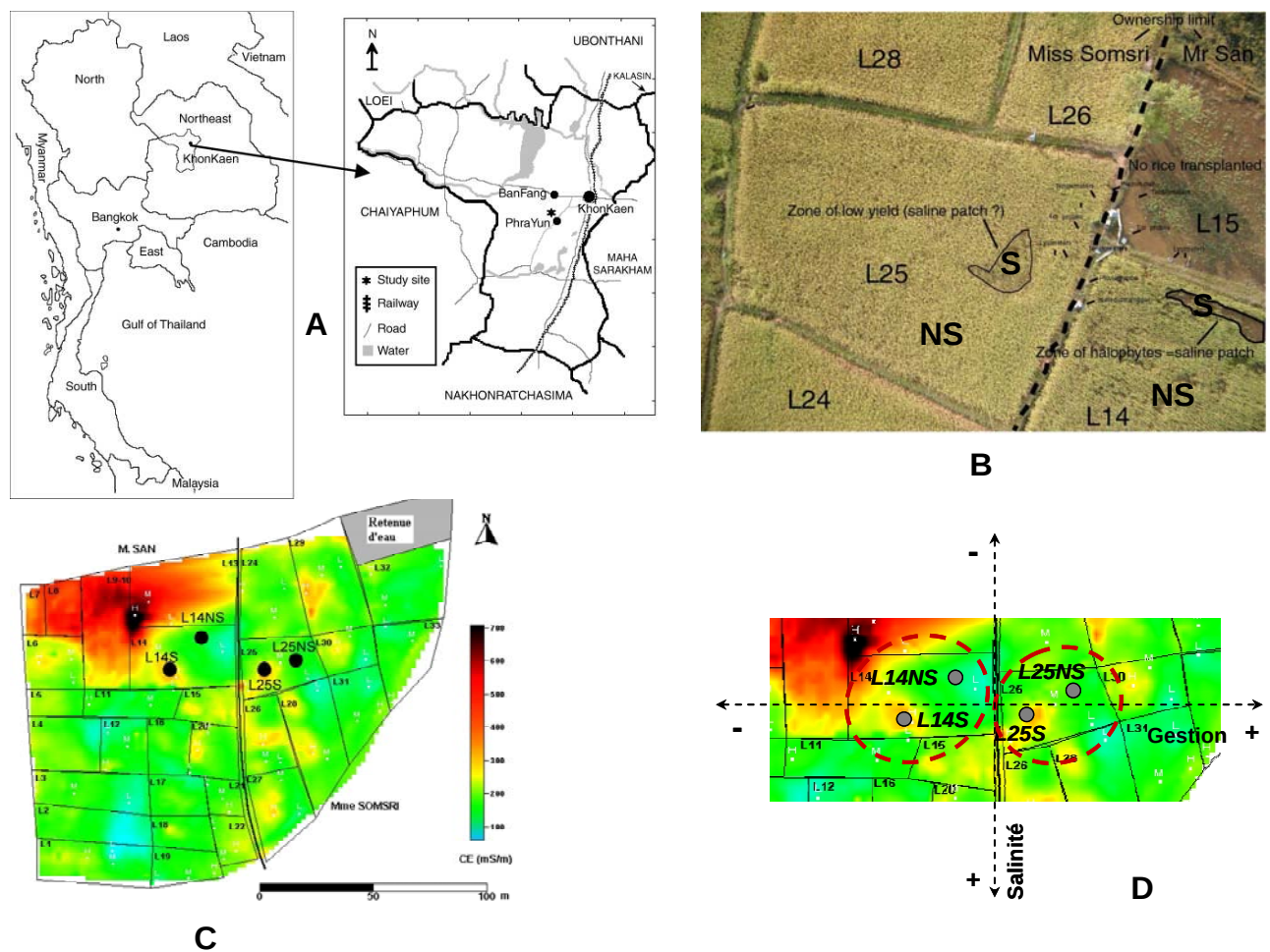


Figure 2.1: A-Présentation des sites d'étude de Thaïlande où les parcelles présentent des zones salines. B et D: Parcelles rizicoles (L14 et L25) avec des zones salines (S) et non salines (NS) selon le mode de gestion (**Quantin et al., 2004**)

2.2.1.3. Prélèvements des échantillons d'eaux

Plusieurs études de caractérisations des eaux et des sols de ces parcelles rizicoles (**Montoroi et al., 2005; Grünberger et al., 2008; Quantin et al., 2008**) ont été conduites par l'équipe de recherche de l'IRD –Land Development Department (LDD) de Bangkok (Thaïlande):

- des échantillons de solution de sol ont été prélevés chaque semaine ou chaque deux jours, dans les zones salines et non salines des deux parcelles, décrites ci-dessus, à 10 ; 25 et 45cm de profondeur dans les différents piézomètres installés sur le terrain, dans les tubes en polypropylène, grâce à une seringue, conservés fermés pour éviter l'entrée d'oxygène. Une partie a été acidifiée pour l'analyse des cations majeurs et du carbone organique dissous. L'autre partie a été conservée au réfrigérateur pour le dosage des anions organiques ;
- durant toute la saison des pluies, l'eau de la nappe phréatique, la solution du sol et l'eau inondant les rizières ont été prélevées pour analyse ;
- des mesures périodiques ont été réalisées *in situ* dans les zones salines et non salines des différentes parcelles. Le fer (II) a été dosé par spectrophotométrie avec une solution d'orthophénantroline (0,5%). Les sondes du potentiel redox (Eh) ont été installées à 10 et 25 cm de profondeur huit jours après avoir replanté le riz. Le Eh et le pH ont été suivis dans les zones salines et non salines des deux parcelles durant toute la période de culture: la mesure est réalisée chaque heure dans la parcelle amendée et une fois par semaine dans celle non amendée ;
- la salinité des différentes parcelles (L25 et L14) a été mesurée à l'aide d'un conductimètre électromagnétique : l'EM38 (Geonics Ltd.) à la fin de la saison sèche, *in situ* dans les zones salines et non salines.

2.2.1.4. Echantillonnage des sols

Pour étudier les communautés et les activités bactériennes, quatre types d'échantillons de sol provenant des horizons de surface (0-20cm) ont été prélevés, respectivement, dans les zones salines (S) et non salines (NS) des deux parcelles retenues (L25 et L14). Ce sont les échantillons L25S ; L25NS ; L14S et L14NS.

Pour étudier l'effet rhizosphérique, des échantillons de sol rhizosphérique (R) et de sol non rhizosphérique (NR) ont été distingués lors du prélèvement. Les sols rhizosphériques sont ceux qui adhèrent fortement aux racines. Au total, huit échantillons de sols (L25S R ; L25S NR ; L25NS R ; L25 NS NR ; L14S R ; L14S NR ; L14NS R et L14 NS NR) ont été utilisés.

2.2.2. Site d'étude de Côte d'Ivoire

2.2.2.1. Problématique et objectifs

En Afrique de l'Ouest, la toxicité ferreuse est une des contraintes édaphiques majeures des bas-fonds. C'est un désordre nutritionnel, très répandu, affectant la croissance des cultures, et particulièrement celle du riz. Tous les types de bas-fond (mangrove, irrigué, pluvial) peuvent être touchés par cette contrainte; avec ou sans maîtrise de l'eau (**Audebert et al., 2006**). Les conditions du développement de ce problème sont de mieux en mieux identifiées (**Diatta & Siband, 1998; ADRAO, 2002**). La toxicité ferreuse est présente lorsque d'importantes quantités de fer (Fe^{2+}) sont mobilisées et accumulées dans la solution du sol au niveau du bas-fond. Ce fer peut avoir deux origines : d'une part, provenir de la mise en solution in situ dans le bas-fond et, d'autre part, du lessivage et du ruissellement de l'eau le long des pentes adjacentes. Sous l'effet réducteur du milieu, certaines bactéries du sol mettent en place une respiration anaérobie (synthèse d'ATP) entraînant la mise en solution de grandes quantités d'ions ferreux (Fe^{2+}). Ces ions ferreux occasionnent un déséquilibre des éléments de la solution du sol qui se répercute au niveau de la plante. Outre les symptômes caractéristiques du "bronzing" ou du "yellowing" des feuilles, la toxicité ferreuse se traduit également par une réduction de la croissance du riz (hauteur et tallage), et par une augmentation du taux de stérilité des panicules. La productivité peut ainsi chuter de 10 à 100% selon la concentration en Fe^{2+} dans la solution et la tolérance du cultivar utilisé (**Masajo et al., 1986; Abifarin, 1988, 1989**).

Le but de cette étude est de rechercher les paramètres physico-chimiques et biologiques responsables de la mobilisation d'ion ferreux (Fe^{2+}) en se focalisant sur la spécificité, la nature des oxydes de fer et en examinant le rôle des bactéries présentes dans les sols de rizières.

2.2.2.2. Choix du site d'étude et localisation

Pour mieux appréhender cette problématique, deux sites ont été choisis en Côte d'Ivoire, dans la région du centre Ouest, à Gagnoa (*Figure 2.2*) où se manifestent des toxicités ferreuses qui nuisent à la production du riz cultivé dans les bas-fonds.

Deux toposéquences incluant des zones de bas-fond rizicole ont été retenues. Il s'agit du site du "bas-fond" de la station de recherche de Gagnoa, situé à 5km de la ville de Gagnoa, sur l'axe Gagnoa-Oumé, (06°08'06,9'' Nord et 05°53'52,7'' Ouest) et du site du "bas-fond" de Guéssihio, un village de la sous préfecture de Gagnoa (06°07'16,6'' Nord et 06°01'14,5'' Ouest), situé à 3km de Gagnoa.

Le climat est de type subéquatorial à faciès attién. Le régime pluviométrique est bimodal: deux saisons humides (réparties, respectivement, de mars à début juillet, et de fin septembre à novembre) et

deux saisons sèches (réparties, respectivement, de novembre à mars, et de juillet à début septembre) par an, avec une pluviométrie moyenne annuelle de 1320 mm.

Les sols reposent sur des formations du précambrien, constituées de micaschistes, de gneiss, de granites et de granodiorites à migmatiques. Ils sont principalement issus de roches quartzistes et sont de la classe des sols ferrallitiques fortement désaturés en bases, ferralsols en zone drainée (plateau) ou de la classe des sols hydromorphes à gleys en zone mal drainée (bas-fond) selon la classification FAO (FAO, 1998).

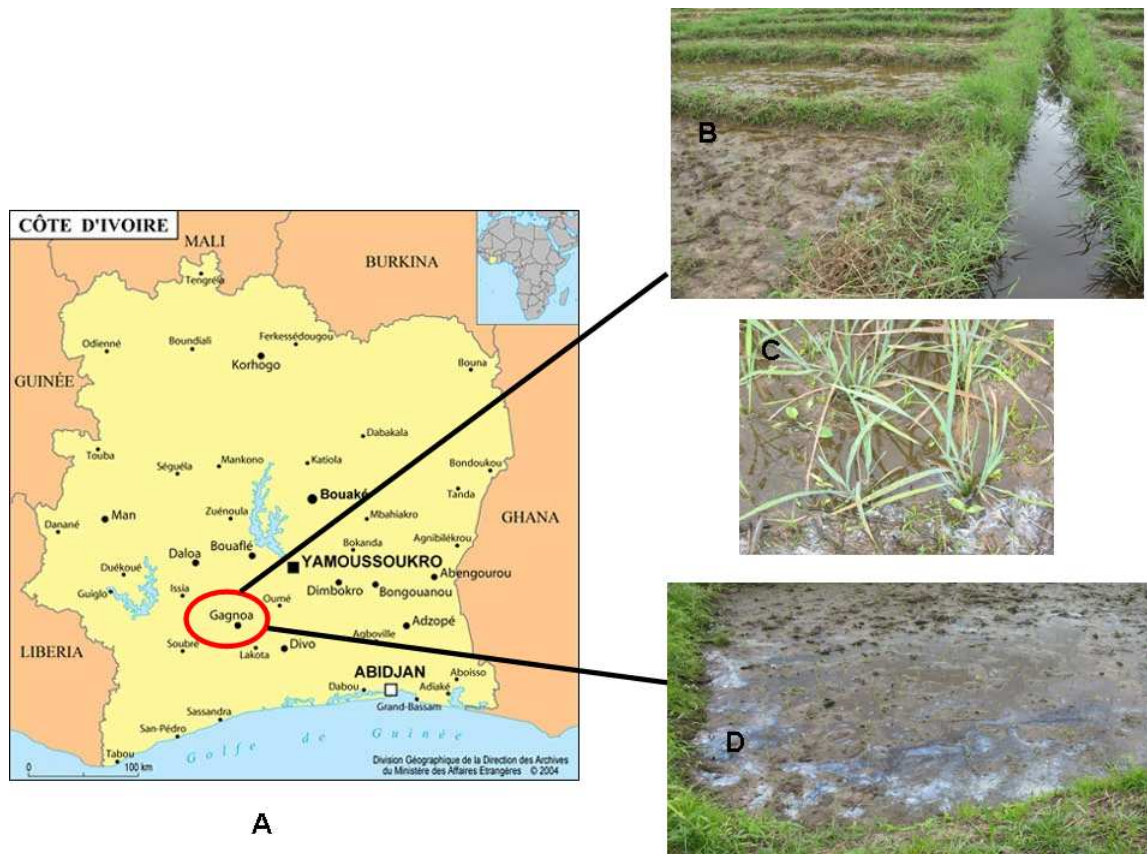


Figure 2.2: A- Site d'étude (en Côte d'Ivoire) ; B- casiers rizicoles ; C- brunissement des feuilles dû à la toxicité ferreuse ; D- oxydation du fer à la surface des eaux des casiers rizicoles

2.2.2.3. Prélèvement des échantillons d'eau

Les prélèvements d'échantillons d'eau en Côte d'Ivoire ont été réalisés sur les deux sites : la toposéquence des bas-fonds aménagés pour la riziculture de Guéssihio et la toposéquence de la station de recherche CNRA de Gagnoa.

Deux séries d'analyses ont été effectuées sur les solutions des sols : les unes ponctuelles et plus complètes au moment des prélèvements de sol et les autres moins nombreuses sur une année, pour caractériser certains paramètres fonctionnels (Fe^{2+} ; SO_4^{2-} ; NO_3^- , NH_4^+ ,...).

4 points de prélèvement ont été choisis par site, à savoir :

- la source principale de retenue d'eau, noté SP ;
- le canal principal d'irrigation des casiers rizicoles, noté CP ;
- le casier planté en riz, noté Cp
- le casier non planté, noté Cnp

Par point de prélèvement, deux échantillons d'eau sont prélevés grâce à une seringue et filtrés à 0,22µm dans deux flacons hermétiques et étanches. Le premier flacon, d'indice o (exemple **SP_o**), ne reçoit aucun additif. Cet échantillon est utilisé pour le dosage des anions, des acides organiques et du carbone organique dissout (COD). Le second flacon, d'indice a (exemple **SP_a**), reçoit quelques gouttes (100µl pour 25 ml) d'acide nitrique (HNO₃ 65% RP Normapur) afin d'éviter toute précipitation d'éléments (en particulier le fer) pendant le transport. Les cations majeurs y ont été dosés. Trois répétitions sont réalisées par point de prélèvement.

2.2.2.4. Etude pédologique et Prélèvements des échantillons de sols

L'étude pédologique s'est faite en deux phases sur deux années. La première année : deux parcelles rizicoles ont été sélectionnées dans le bas-fond de la station de recherche CNRA de Gagnoa : une plantée en riz: F1, ayant pour coordonnées (06°08'02,8''Nord et 05°53'39,5'' Ouest), et l'autre, non plantée : A15 (06°08'07,3''Nord et 05°53'51,1'' Ouest). La seconde année, un second site, Guéssihio, a été ajouté (06°07'15,9''Nord et 06°01'17,9'' Ouest).

Sur les deux sites différents d'études (Gagnoa et Guéssihio), des profils ont été sélectionnés le long d'une toposéquence de 220m, allant du sommet de l'interfluve au bas-fond, afin de caractériser la dynamique de l'altération, et, en particulier, l'évolution du fer.

Cette étude pédologique s'est faite par segment topographique le long des toposéquences installées par site, perpendiculairement aux courbes de niveaux, selon la méthode morpho-pédologique (**Eschenbrenner & Badarello, 1978**), du sommet de l'interfluve au bas-fond, pour déterminer l'origine du fer observé dans les bas fonds.

Les toposéquences ont été réalisées grâce à une boussole et un clinomètre, dans le sens de la plus grande pente. La mesure de la pente a été faite à chaque rupture de versant. Les points d'observation ont été placés au sommet, en haut de versant, mi-versant, bas de versant et dans le bas-fond.

Six (6) fosses pédologiques de 150cm de profondeur ont été ouvertes le long de la toposéquence sur chaque site, et leur description a été faite selon les paramètres suivants : l'épaisseur de l'horizon, la

couleur, le drainage, la texture, la nature et le taux des éléments grossiers. Après la description, des échantillons de sol ont été prélevés, en commençant des horizons sous-jacents vers les horizons de surface, pour éviter de contaminer les échantillons issus des horizons de profondeur.

Les échantillons de sol prélevés sont séchés à l'air libre dans une salle bien aérée, broyés et tamisés à l'aide d'un tamis à mailles carrées de 2mm. La fraction <2mm a ensuite été envoyée au Laboratoire des Sols et des Végétaux de l'Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny (INPFH-B) à Yamoussoukro, pour analyse. Des prélèvements de sol ont été également effectués dans les casiers rizicoles plantés et non plantés pour les analyses microbiologiques.

Sur le site de la station de recherche de Gagnoa, des sept fosses pédologiques ouvertes (C1 ; C2 ; C3 ; C4 ; C5 ; C6 ; F1), seulement quatre profils représentatifs ont été choisis le long de la toposéquence : les profils C1, C5, C6 et F₁ pour des caractérisations plus complètes. Quatre profils représentatifs ont été choisis le long de la toposéquence sur le site des bas-fonds aménagés de Guéssihio pour les études plus détaillées: G6, G4, G2 et G1.

2.3. Dispositifs d'étude des activités et des communautés bactériennes

2.3.1. Principe de l'étude

L'étude de la disponibilité, de la mobilité et de l'immobilisation du fer dans les rizières a fait appel à la caractérisation des phases solides impliquées, des propriétés physiques et chimiques des sols et des solutions de sols d'une part, et à la définition des paramètres et mécanismes essentiellement bactériens impliqués dans ces processus d'autre part. Pour ces travaux, des dispositifs expérimentaux d'incubation en batch (flacon) et en microplaques ont été utilisés.

2.3.1.1. Microplaques

L'étude de différentes communautés bactériennes anaérobies et aérobies totales, ferri et sulfato-réductrices présentes sur les deux sites (Côte d'Ivoire et Thaïlande) a été réalisée en microplaques sur milieu liquide, en utilisant la technique des suspension-dilutions.

La recherche des communautés halophiles et l'isolement des consortia bactériens ont aussi été effectués avec cette méthode. Les plaques stériles de 96 puits permettent de réaliser simultanément un plus grand nombre de répétitions (24 répétitions) et de vérifier l'effet de plusieurs paramètres du milieu (Figure 2.3). Cette méthode présente l'inconvénient de ne disposer que d'une faible quantité de milieux dans les puits pour effectuer des analyses.

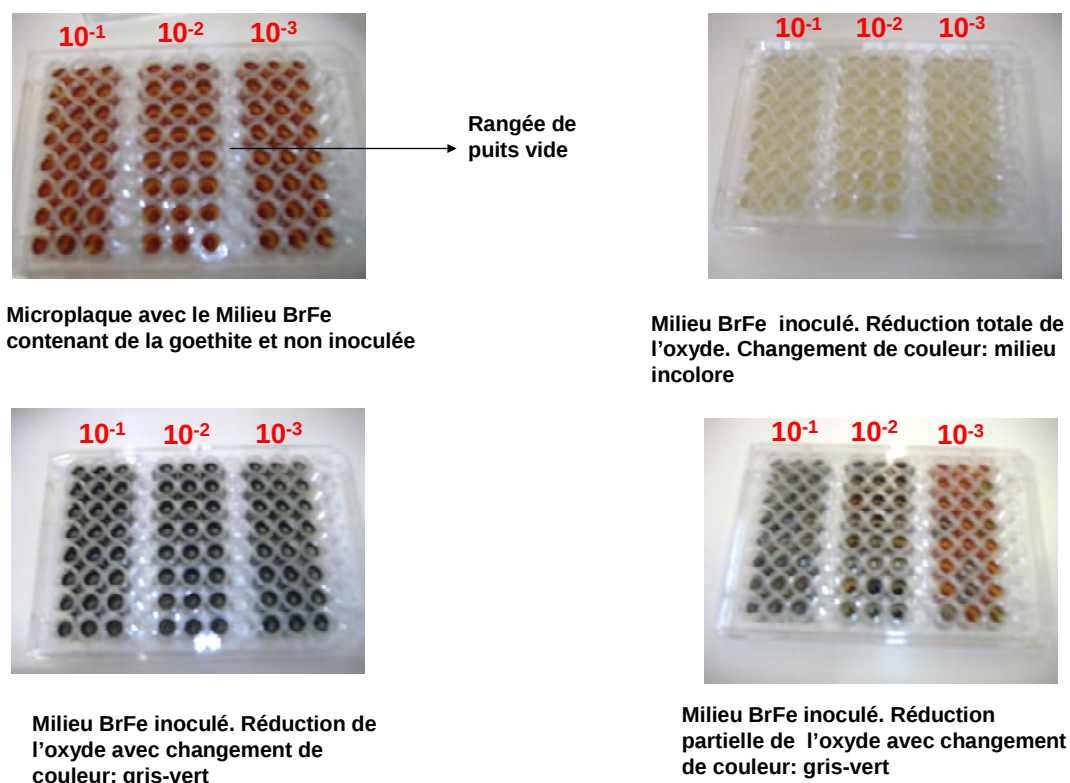


Figure 2.3 : Microplaques révélant les activités bactériennes ferri-réductrices avec les différents changements de couleur du milieu correspondant à la réduction-dissolution de l'oxyde utilisé (goethite).

2.3.1.2. Culture en "Batch"

Pour suivre en continu l'évolution des paramètres de la réduction bactérienne du fer, soit pour un oxyde de fer placé dans le milieu, soit avec un échantillon de sol, des expérimentations ont été menées en "Batch" (Figure 2.4) dans des flacons sérums (250 ou 500ml) ou dans des tubes de centrifugeuses stérilisées. C'est un système simple et étanche qui permet de maintenir les conditions anaérobies et la pression du milieu. L'avantage est que l'on dispose d'une quantité de milieu de culture suffisante pour les différentes analyses et de la possibilité d'étudier de nombreux paramètres. Trois types d'expérimentations ont été menés en "batch" :

- expérience en flacon sérum de 250ml avec l'oxyde de fer (goethite). Dans ce cas, 50ml de chaque milieu de culture sont mis dans les flacons sérums contenant chacun 0,0875g Fe₂O₃, 2H₂O Prolabo (pour avoir 1g l⁻¹ de Fe ou 50 mg de Fe par flacon). Chaque flacon est stérilisé et dégazé, puis ensemencé par 5 ml d'une suspension de consortia bactériens isolés, pour obtenir 10⁶ bactéries par ml de suspension bactérienne, soit 5.10⁶ bactéries par flacon.

- expérience en tubes de centrifugeuses stérilisées en polypropylène de 50ml avec l'oxyde pour l'identification des consortia bactériens : 50ml de chaque milieu de culture sont placés dans les tubes contenant chacun 25mg Fe_2O_3 , $2\text{H}_2\text{O}$ Prolabo (pour avoir 286 mg.l^{-1} de Fe ou 14,3mg de fer par tube). Les tubes sont stérilisés, dégazés et ensemencés par 5 ml de consortia bactériens isolés (10^6 bactéries. ml^{-1} de suspension).
- expérience en flacon sérum de 500ml avec les sols pour estimer la capacité réductrice des sols de rizières : on introduit 30g de sol sec dans les flacons sérums de 500 ml et on humidifie le milieu en ajoutant 3ml d'eau ultra pure et stérile. Les échantillons sont laissés au repos pendant 24h. Cette étape a pour but de réhumecter le milieu pour réactiver les bactéries qui s'y trouvent. Après 24h, on ajoute dans chaque flacon, soit 300ml d'eau ultra pure stérile (pour les échantillons biotiques), soit 300ml d'une solution de merthiolate de sodium ($\text{C}_9\text{H}_9\text{HgO}_2\text{SNa}$) à 1g.l^{-1} pour les échantillons abiotiques (témoins).

Pendant et à la fin d'incubation, différentes mesures sont réalisées dans les phases gazeuses, liquides et solides des dispositifs d'incubation.

Dans la phase liquide, les mesures effectuées concernent : le Eh (initial et final) ; le pH, le carbone organique dissout (COD) pour les traitements biotiques, l'ammonium (NH_4^+), et, enfin, le fer (ferreux et total) à 2, 4, 8, 10, 15 et 30 jours d'incubation. En fin d'incubation (30 jours), les acides organiques et anions majeurs (Cl^- ; SO_4^{2-} ; PO_4^{3-} ; NO_3^-) sont déterminés par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC), et les cations (Fe; Mn; Al; Si) sont dosés par spectrométrie d'émission ICP–AES. L'ammonium et le fer ferreux sont dosés par colorimétrie au spectrophotomètre.

Dans la phase gazeuse, la minéralisation des matières organiques du sol (MOS) est complétée par des mesures du dégagement de CO_2 .

Sur la phase solide, la détermination des espèces bactériennes, cultivables ou non, impliquées dans ces processus de dissolution et de réduction a été réalisée à partir de l'extraction de l'ADN total qui est ensuite amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction) de l'ADNr 16S, suivie d'une analyse par TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophosis).



Expérience en batch: Flacon



Anoxomat

Figure 2.4 : Appareil de dégazage : Anoxomat avec la jarre. Sols incubés en Batch (flacon)

2.3.2. Conditions expérimentales

Tout au long de ces travaux, les flacons et les milieux de cultures ont été préalablement stérilisés par autoclavage à 110 °C et incubés à 28 °C, à l'obscurité pendant 4 à 7 jours, pour le dénombrement bactérien, et pendant au maximum 30 jours pour les cultures en "Batch".

Les essais sont conduits seulement sous agitation pour les essais en "Batch".

A l'exception des expérimentations faites sur le dénombrement des bactéries aérobies, tous les essais sont conduits en condition anaérobie. Les dénombrements en condition aérobie ont été réalisés dans des sacs plastiques alors que ceux en condition anaérobie ont été faits dans des jarres hermétiques.

Les conditions anaérobies sont mises en place grâce au système automatique anoxomat (MART® WS 80) qui permet de générer, dans les jarres, de manière contrôlée et reproductible, une atmosphère exempte d'oxygène et contenant soit 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ soit 100% N₂ (Figure 2.4). Les jarres contenant les flacons ou les microplaques sont dégazées par l'anoxomat qui vérifie à la fois l'étanchéité de la jarre et la qualité du catalyseur employé. Les milieux sont dégazés avant et après autoclavage. Toutes les expériences sont effectuées en triplicats par échantillon.

2.3.3. Milieux de culture

2.3.3.1. Milieux de culture pour les dénombrements et isolements bactériens en microplaques

La recherche des communautés aérobies et anaérobies totales et ferri ou sulfato - réductrices est conduite, respectivement, sur trois milieux de cultures spécifiques :

- le milieu Nutrient Broth (NB), composé de 8 g Nutrient Broth (NB) Difco™ et de 1000 ml d'eau ultra pure, utilisé pour la culture des bactéries aérobies et anaérobies;
- le milieu pour les Bactéries Réduisant le Fer (IRB) (**Mustin-Deneux, 2003**) constitué, par litre d'eau ultra pure, d'extrait de levure (Difco) (1g), de peptone (Difco) (1,5g), KH₂PO₄ (0,5g), NaCl (0,10g), CaCl₂ (0,10g), NaHCO₃ (2,5g), acétate de sodium (1g), solution d'oligoéléments¹ (10ml), solution vitaminée² (10x) (10ml), citrate de fer (III) (10g). La préparation de ce milieu est très délicate. Il est préférable de dissoudre en premier les cristaux de citrate de fer dans 400 ml d'eau ultra pure.

Pour améliorer la dissolution et réduire le caractère abrasif des cristaux de citrate, il faut dissoudre lentement le citrate en chauffant légèrement à 60°C (maintenir la

¹ Solution oligoéléments : Nitrilotriacetic acid (NTA) (1,5g) ; MgSO₄·7H₂O (3g) ; MnSO₄·2 H₂O (0,5g) ; NaCl (1g) ; FeSO₄·7 H₂O (0,1g) ; CoSO₄·7 H₂O (0,180g) ou CoCl₂·6 H₂O (0,1g) ; CaCl₂·2 H₂O (0,1g) ; ZnSO₄·7 H₂O (0,100g) ; CuSO₄·5 H₂O (0,01g) ; KAl(SO₄)₂·12 H₂O (0,01g) ; H₃BO₃ (0,010g) ; Na₂MoO₄·2 H₂O (0,010g) ; NiCl₂·6 H₂O (0,025g) ; Na₂SeO₃·5 H₂O (0,3mg) (facultatif) ; Eau ultra pure (1l)

² Solution vitaminée : BEM solution de vitamines prête à l'emploi : Diluer la solution mère (x100) dix fois pour obtenir une solution fille (x10). Stériliser la solution fille par filtration (0.2 µm) et stocker en tube de 10 ml au congélateur à -20°C

température à 60°C pendant toute la dissolution). On ajoute progressivement 100 ml de NaOH (1N) durant la dissolution, cette étape est longue (3 à 4 heures). Ensuite, il faut dissoudre les autres composés dans 500 ml d'eau. Après la dissolution du citrate de fer, les deux solutions sont mélangées et ajustées.

- La recherche des Bactéries Réduisant le Sulfate (SRB) est réalisée sur le milieu SRB comportant deux solutions : solution A composée d'extrait de levure (1g), de peptone (1,5g), KH_2PO_4 (0,5g), NaCl (0,10g), CaCl_2 (0,10g), NaHCO_3 (2,5g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,225g), DL- Lactate Na (50%) (1,5ml), solution d'oligoéléments (10ml), 10ml de solution vitaminée 10x, eau ultra pure (900ml), et la solution B composée de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,5g), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1g) et d'eau ultra pure stérile (100ml). Dans un premier temps, la solution A est préparée et stérilisée par autoclavage. Ensuite, dans un flacon contenant 100ml d'eau ultra pure stérile et dégazée, on ajoute $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ qui, après mélange, est dégazé une seconde fois. On ajoute le dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) et on le redégaze. Le mélange des deux solutions se fait selon le rapport 1/10 (1ml de B filtré à 0,22 μm /10ml de A). Une fois le mélange fait, la solution doit être répartie rapidement dans les flacons ou microplaques pour éviter une oxygénation du milieu.

2.3.3.2. Milieux pour les cultures en batch

La capacité des différents consortia bactériens isolés à réduire et à solubiliser le fer des oxydes a été étudiée en batch dans des flacons contenant deux types du milieu de culture Bromfield, notée BrFe (**Bousserrhine et al., 1999**) qui ont la même composition de base, mais se différencient par la source de carbone apportée (glucose ou acétate).

La composition du milieu par litre d'eau ultra pure est : extrait de levure (Difco) (0,15g), KH_2PO_4 (0,5g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1g), CaCO_3 (0,067g) et D-Glucose (11g) pour les bactéries fermentaires ou acétate de sodium (1 ou 22,6g) pour les non fermentaires. Le pH des milieux de culture est ajusté à 6,5, soit par de l'acide chlorydrique, soit par de la soude (0,5N). Les flacons sont stérilisés par autoclavage et dégazés grâce à l'anoxomat avant et après inoculation.

Dans la recherche de la capacité bactérienne ferri-réductrice des sols, les échantillons de sols (0-2mm) sont mis en suspension dans de l'eau ultra pure sans source de carbone ajouté, dans un rapport sol-solution : 1/10.

2.3.4. Préparation des inoculums et ensemencement des microplaques

Les inoculums des échantillons de sol sont obtenus à partir de la suspension initiale du sol, dans un rapport sol/solution (1/10: g/ml). Des dilutions successives de sol de 10^{-1} à 10^{-6} sont réalisées pour

ensemencer les microplaques. Chaque microplaque (96 puits) contenant le milieu de culture reçoit trois dilutions (10^{-1} à 10^{-3}), à raison d'une dilution pour trois séries de 24 puits. Chaque série de dilution est séparée par une rangée de puits vides afin d'éviter les contaminations croisées. Les puits contiennent 200 μ l de milieu de culture et 20 μ l de suspension - dilution de sol (*Figure 2.3*).

Après incubation, un lecteur de microplaque est utilisé pour compter le nombre de puits positifs, la mesure de la densité optique à 620nm, correspondant, soit à l'apparition d'un trouble bactérien, soit d'un changement de couleur du milieu (*Figure 2.3*). Cette méthode considère que les puits positifs obtenus avec la dilution la plus faible correspondent au développement d'une seule unité bactérienne.

2.3.5. Isolement des consortia bactériens

L'isolement des consortia bactériens des différents échantillons de sol s'est fait en deux étapes : une préculture et une culture par enrichissement.

2.3.5.1. Préculture

Cinq millilitres d'une dilution 10^{-2} de la suspension initiale (10^{-1}) de sol, dans un rapport sol/solution 1/10 (g/ml), sont utilisés pour ensemencer les flacons contenant 50ml du milieu de culture NB stérile. Les flacons sont incubés après dégazage à 28 °C pendant 48h.

2.3.5.2. Culture d'enrichissement

Après deux jours d'incubation, une série de dilutions (10^{-1} à 10^{-3}) de chaque préculture est faite et 20 μ l de chaque préculture diluée est transférée dans les puits des microplaques contenant 200 μ l de milieu nutritif Nutrient Broth (NB). Les microplaques sont dégazées et incubées dans des jarres en condition anaérobie pendant 4 jours, à 28 °C, à l'obscurité.

Après incubation, les puits positifs obtenus avec la dilution la plus faible de chaque échantillon de sol sont prélevés, glycerinés (4000 μ l d'inoculum et 1500 μ l de glycérol) et conservés en chambre froide à -80°C. Huit consortia bactériens ont été isolés des huit échantillons de sol retenus pour cette étude, pour déterminer leur capacité à dissoudre les oxydes de fer, ainsi que la nature et la dynamique des populations impliquées.

2.3.6. Recherche de la microflore halophile

Pour évaluer l'effet salinité des sols de rizières et déterminer la présence de communautés bactériennes halotolérantes ou halophiles, trois types d'approches ont été menées : (1) 8 g l⁻¹ NaCl ont été ajoutés aux milieux NB (pour les bactéries aérobies et anaérobies) et IRB (pour les bactéries ferri

réductrices) pour la recherche et le dénombrement des communautés bactériennes présentes dans les différents échantillons de sol ; (2) des cultures de bactéries provenant ou présentes dans les dilutions des échantillons de sols ont été effectuées sur le milieu NB, avec des concentrations de NaCl allant de 0 à 120g/l en condition anaérobie, pour la recherche des différents groupes de bactéries halophiles. La croissance des bactéries a été mesurée par la densité optique à 620nm ; (3) des cultures des consortia bactériens isolés des sols ont été effectuées avec des teneurs de 0, 15, 30, 60 et 90 g/l NaCl ajoutées dans le milieu BrFe pour vérifier leur capacité à dissoudre les oxydes de fer en milieu salin. Les deux premières approches ont été conduites en microplaques, alors que la dernière a été faite en flacons sérums ou en tubes.

2.3.7. Témoins abiotiques

Dans les incubations en batch avec des suspensions de sols et pour distinguer les processus bactériens des processus physico-chimiques, des essais de témoins sont conduits en conditions abiotiques (témoins stériles) obtenus en ajoutant du merthiolate de sodium ($C_9H_9HgO_2SNa$) à 1gl^{-1} . Ce puissant antiseptique provoque une inhibition des activités biologiques. La stérilisation des témoins n'a pas été réalisée par autoclavage des flacons sérums, car cette méthode modifie la solubilité des éléments que l'on souhaite doser.

Dans le cas des expérimentations de dissolution de l'oxyde de fer par des consortia bactériens, les échantillons abiotiques (témoins stériles) sont ceux qui ne reçoivent pas d'inoculum.

2.3.8. Caractéristiques de l'oxyde de fer utilisé dans les dispositifs de culture

Le choix de l'oxyde s'est porté sur la goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$), car c'est l'oxyde le plus représentatif des sols étudiés et, par ailleurs, de l'ensemble des sols et sédiments. Il a d'ailleurs été beaucoup utilisé dans les expériences en laboratoire (*Schwertmann & Cornell, 2000*).

Pour ces travaux, nous avons choisi une goethite de synthèse (goethite : $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Prolabo).

2.4. Méthodes d'analyses

Dans le cadre de cette étude, les méthodes d'analyses de la phase solide ne concernent que les échantillons de sols de Côte d'Ivoire dont la caractérisation a été faite lors de cette thèse. En revanche, tous les sols de Thaïlande avaient été déjà caractérisés, à l'exception des différentes formes du fer, de l'analyse élémentaire totale, des anions et cations hydrosolubles, extraits à l'eau, et de l'analyse élémentaire organique, par l'équipe de recherche de l'IRD, associée au Land Development Department (LDD) de Bangkok (Thaïlande). Enfin, tous les travaux impliquant des techniques microbiologiques ont aussi été effectués dans cette thèse.

2.4.1. Granulométrie

L'analyse granulométrique a été réalisée par la méthode à la pipette de ROBINSON-KÖLN (**Rouiller, 1993**). Elle permet de déterminer la texture du sol en séparant les fractions granulométriques : les limons grossiers (20 à 50 μm) et fins (2 à 20 μm) ; les argiles (0 à 2 μm), les sables fins (50 -200 μm) et grossiers (200-2000 μm)).

Dans les sols ferrallitiques ou ferralsols, les oxydes de fer et les substances organiques assurent des liaisons avec les argiles. Pour mieux estimer la répartition de chaque fraction il est primordial de détruire ces liaisons. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur la méthode Robinson décrite par Delaune *et al.* (**1991**) qui consiste tout d'abord à détruire la matière organique à l'eau oxygénée (H_2O_2) et à disperser l'argile par l'hexamétaphosphate de sodium.

2.4.2. Mesure du pH_{eau} et pH_{KCl}

La valeur du pH_{eau} (acidité effective) et du pH_{KCl} (acidité de réserve) des échantillons de sols de Côte d'Ivoire a été obtenue par la méthode électrométrique au pH-mètre avec une électrode en verre (Tacussel PHN 81, Choffel Electronique, Remiremont, France). La détermination des différents pH a été réalisée sur des prises différentes, dans un rapport sol/solution 1/2,5 et en triplicats (**Mathieu & Pieltain, 2003**). Le protocole adopté est le suivant: dans un bécher, 10g de sol sec (<2mm) sont ajoutés à 25ml soit d'eau ultra pure, soit de KCl (1N), puis agités pendant une heure et centrifugés à 7500tr/min pendant 20min à 20°C. Après avoir laissé reposer pendant 2h, la mesure des pH est effectuée dans le surnageant.

2.4.3. Cations échangeables (Ca^{++} , Mg^{++} , et K^+) et Capacité d'Echange Cationique (CEC)

Les cations échangeables et la CEC sont mesurés par échange avec le chlorure d'ammonium NH_4Cl (0,5N). Ils sont déterminés par spectrophotométrie d'adsorption atomique pour Ca^{++} et Mg^{++} , et par photométrie de flamme pour K^+ et Na^+ .

2.4.4. Dosage du phosphore total ($\text{P}_2\text{O}_5_{\text{total}}$) et du phosphore assimilable ($\text{P}_2\text{O}_5_{\text{ass}}$)

L'extraction du phosphore total et du phosphore assimilable s'est faite par attaque perchlorique à chaud. Le dosage est effectué par colorimètre en présence du vanado-molybdate. Le phosphore assimilable a été déterminé par la méthode Olsen-Dabin décrite dans Bonneau et Souchier (**1994**).

2.4.5. Dosage du Soufre (S) total par combustion sèche

L'échantillon est soumis à combustion à une température d'environ 1400°C en présence d'un catalyseur d'oxydation et d'oxygène. Le soufre lié à la fraction organique ou minérale (sulfates ou sulfures) est transformé en dioxyde (SO₂) et mesuré par spectrométrie infra rouge.

La prise d'essai est de 1g d'échantillon broyé à 250 µm. L'analyse a été réalisée au laboratoire d'analyse des sols d'ARRAS (France).

2.4.6. Dosage du carbone et de l'azote organique

Le dosage de l'azote et du carbone organique des échantillons de sols de Côte d'Ivoire et de Thaïlande a été réalisé à l'aide d'un autoanalyseur CHN Flash EA 1112. Les échantillons finement broyés subissent une combustion à 900°C en présence de l'oxygène. Les produits obtenus (CO₂, H₂O) sont détectés par conductivité thermique. L'azote organique est dosé simultanément au carbone organique avec l'analyseur CHN Flash EA 1112. La teneur en matière organique a été calculée en multipliant la valeur du carbone obtenu par 1,72.

2.4.7. Dosage des éléments minéraux totaux

La détermination de la teneur en éléments minéraux des échantillons de sol a été faite après fusion alcaline. Dans un creuset en graphite, 100mg d'échantillon finement broyés sont mélangés à 1g de fondant alcalin (métaborate de lithium BLiO₂ et tétraborate de Lithium B₄Li₂O₇, respectivement dans un rapport 2/3 et 1/3) puis sont portés, dans un premier temps, dans un four à moufle oxydant à 600°C, pendant 30min, dans le but d'éliminer les matières organiques afin d'éviter la formation de carbures. Ils sont ensuite portés dans un autre four à haute fréquence (HT Hermann Moritz) à 1000°C pendant 5min (**Rouiller, 1993**). La perle obtenue est dissoute dans une solution aqueuse d'acide nitrique (HNO₃) à 1%, et les éléments y sont dosés par spectrométrie d'émission plasma (ICP-AES), Jobin Yvon 2038. La perte au feu est déterminée sur une autre prise d'essai de sol de 100mg d'échantillon finement broyé qui est aussi portée à 1000°C, pendant 3h, dans un creuset réfractaire. Le poids de l'échantillon est noté avant et après le passage au four.

2.4.8. Etude des transferts et des répartitions des éléments le long d'une toposéquence

Dans le but de déterminer la répartition et d'éventuels transferts verticaux ou horizontaux d'éléments, en particulier le fer, le long d'une toposéquence, du sommet de l'interfluve au bas-fond, une extraction séquentielle des différentes formes de fer et éléments associés a été mise en œuvre. Les méthodes

d'extraction employées sont adaptées de celles proposées par Rouiller (1993), Quantin *et al.*, (2002), Mathieu et Pielain (2003) et Paskiewicz (2006). Sur une même prise d'essai de 100mg d'échantillon de sol sec vont être effectuées les différentes étapes de l'extraction (Tableau 2.1). La fraction liée à la matière organique est extraite séparément sur une autre prise d'essai de 100mg de sol sec.

La caractérisation des formes du fer et de l'aluminium présentes dans ces sols a été effectuée par des extractions séquentielles. Les réactifs eaux, solutions de KCl et HCl sont destinés à extraire toutes les formes du fer et de l'aluminium facilement disponibles dans les phases hydrosoluble (Fe et Al_{Hydro}), échangeable (Fe et Al_{KCl}) et acidosoluble (Fe et Al_{HCl}) du sol.

L'oxalate d'ammonium à pH 3 est supposé dissoudre les produits dits amorphes (mal ou pas cristallisés) du fer et de l'aluminium inorganiques et organiques (Fe et Al_{Tamm}). Tandis que le réactif CBD extrait toutes les formes de fer (hématite, goethite) et d'aluminium oxydes et oxyhydroxydes cristallines (Fe et Al_{CBD}). Le pyrophosphate de sodium utilisé séparément, est destiné à n'extraire que le fer et l'aluminium liés à la matière organique (Fe et Al_{pyro}). Les rapports entre les différentes formes de fer fournissent des indications sur les formes facilement mobilisables par rapport aux teneurs totales ou par rapport à des formes bien cristallisées.

Tableau 2.1 : Protocole d'extractions séquentielles réalisées sur les échantillons de sols pour 100 mg de sol sec

Etapes	Fraction	Réactifs	Volume du réactif	Conditions
1	Hydrosoluble (Hydro)	Eau ultra pure	25ml	1h d'agitation rotative à 20°C, 30min centrifugation à 7500tr/min
2	Echangéable (Ech)	KCl (0,1M)	25ml	1h d'agitation rotative à 20°C, 30min centrifugation à 7500tr/min
3	acidosoluble (Acido)	HCl (0,5N)	25ml	1h d'agitation rotative à 20°C, 30min centrifugation à 7500tr/min
4	Oxydes de fer mal cristallisés (Ox _{Tamm})	10,92g.l ⁻¹ C ₂ O ₄ H ₂ .2H ₂ O + 16,11g.l ⁻¹ C ₂ O ₄ (NH ₄) ₂ .H ₂ O	25ml	4h d'agitation rotative à 20°C et à l'obscurité, 30min centrifugation à 7500tr/min
5	Oxydes de fer bien cristallisés (Ox _{CBD})	78,4g.l ⁻¹ Na ₂ -citrate + 9,34g.l ⁻¹ NaHCO ₃ et Na ₂ S ₂ O ₄	25ml	30min de bain marine sous agitation à 80°C, 30min centrifugation à 7500tr/min
hors de la séquence	fer lié aux matières organiques (Ox _{py})	Na ₄ P ₂ O ₇ .10H ₂ O (0,1M)	25ml	16h d'agitation rotative à 20°C et à l'obscurité, 30min centrifugation à 18000tr/min

2.4.9. Analyse minéralogique

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer la composition minéralogique des échantillons de sol étudiés : la microscopie électronique à transmission (MET) et la diffraction des rayons X (DRX).

La diffraction des rayons X a été mise en œuvre pour l'identification des principaux minéraux des sols, en particulier des oxydes de fer (hématite, goethite ou autres) et des argiles (kaolinite, illite,...) et a été effectuée sur poudres fines (fraction < 2mm et broyée).

La microscopie électronique à transmission (MET) permet d'observer les agrégats ou les particules très fines à l'échelle microstructurale, afin de préciser l'organisation des fractions minérales et/ou organo-minérales. Elle a été réalisée sur des poudres fines (fraction < 2mm et broyée). Les observations au MET sont couplées à la microanalyse (rapport atomique) pour déterminer la composition élémentaire de certaines particules ou agrégats observés à l'aide d'un spectromètre à dispersion d'énergie (EDS). Ces spectres EDS complètent les images afin d'identifier des particules bien cristallisées du type oxyde de fer (hématite, goethite).

2.4.10. Analyse des solutions

2.4.10.1. In situ (sur le terrain)

Des mesures mensuelles ont été effectuées sur le terrain dans les différents points de prélèvement cités ci-avant, grâce aux différents kits d'analyse. Le pH est mesuré grâce au kit Aquamerck 08027, le fer ferreux en solution grâce au kit de colorimétrie Merckoquant 10004, l'ammonium (NH_4^+) grâce aux deux kits de colorimétrie Merck TM qui correspondent à deux gammes de références : Aquamerck 11117 pour les teneurs 0,5 à 10 mg/l et Merckoquant 10024 pour les teneurs de 10 à 400 mg/l et le nitrate grâce au kit Merckoquant 10020 pour les teneurs de 1 à 500 mg/l. Le phosphate, le manganèse et le sulfate sont respectivement dosés en utilisant les kits Aquaquant 14449 (1-40 mg/l), Merckoquant 10080 (2-100 mg/l) et Aquaquant 14411 (25-300 mg/l).

2.4.10.2. Au laboratoire

Le dosage du fer réduit (Fe^{2+}) est effectué par spectrophotométrie (Shimadzu ® UV -1205), avec la méthode Aquamerck Eisen-Test 8023 (Merck⁻¹), basée sur la formation d'un complexe rose – rouge foncé très stable entre le Fe^{+2} et la bipyridine-2,2'. La solution est filtrée à 0,22µm et les densités optiques (DO) sont mesurées à 523 nm, puis converties en mg.l^{-1} à l'aide d'une gamme étalon.

L'ammonium (NH_4^+) en solution est dosé par colorimétrie avec le kit Spectroquant 14752 (coloration verte en présence d'ammonium). L'absorbance est mesurée à 690 nm et convertie en mg l^{-1} à l'aide d'une gamme étalon.

Les éléments majeurs (Fe; Ca; K; Mg; Na; Si,...) en solution sont dosés par spectrométrie d'émission Plasma ICP–AES Jobin Yvon 2038 sur la solution filtrée à 0,22 μm et stabilisée par ajout d'une goutte d'acide chlorhydrique (36N). Les anions majeurs (F^- ; Cl^- , SO_4^{2-} ; PO_4^{3-} ; NO_3^- ; ...) sont analysés par chromatographie ionique d'échange anionique (EG-KOH DIONEX, colonne AS11-HC (4*250mm)).

Le Carbone Organique Dissout (COD) dans les solutions d'incubation est dosé dans la solution filtrée à 0,22 μm par l'analyseur TCM DohrmannTM DC190 Total Organic Carbon Analyseur au laboratoire SARM, CRPG (Centre de Recherche de Pétrographie et Géochimie, Vandoeuvre) du CNRS.

Le glucose restant en solution est dosé par spectrophotométrie à 500nm grâce au Kit GOD-PAD (BIOLABO), méthode enzymatique basée sur l'oxydation du glucose en acide gluconique. Sous l'action de la peroxydase, l'eau oxygénée libérée au cours de la réaction réagit avec le phénol et l'amino-4-phénazone pour former un complexe rose. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose. L'absorbance mesurée est convertie en mg l^{-1} à l'aide d'une gamme étalon.

L'acétate en solution est déterminé par spectrophotométrie grâce au kit SEPPAL qui est une méthode enzymatique basée sur la transformation de l'acétate en acétyl–CoA. L'absorbance est mesurée à 340nm et convertie en mg l^{-1} à l'aide de la gamme étalon établie.

Les acides organiques formés lors des incubations de sol et présents dans les eaux de rizières sont analysés à l'aide de deux méthodes:

- chromatographie ionique, avec un appareil DIONEX (ICS 3000) sur colonne AS (Anion Separator) 11-HC (4*250mm). L'élution se fait en gradient de 0,9 à 60 mmol.l^{-1} de KOH pendant 55 min avec 5 min de stabilisation, et la détection par conductimétrie à 210 nm. La température est maintenue à 30°C, avec un débit de 1,3 ml.min^{-1} d'éluant. Le volume d'injection est de 25 μl et l'ordre d'élution est fonction du nombre d'atomes de carbone des acides ;
- Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC) en utilisant la colonne échangeuse de cations Aminex HPX-87 (300*7.8mm, Bio-Rad laboratoire, Marnes, France), appareil multi constructeur. L'élution est réalisée en 28 min, en condition isocratique, avec comme éluant H_2SO_4 (5 mmol.l^{-1}) et la détection en UV à

210 nm. La température est maintenue à 50°C avec un débit de 0,5ml.min⁻¹. 25µl de l'échantillon à analyser sont acidifiés à pH 2 par H₂SO₄ pour que tous les acides soient majoritairement sous forme protonée. Ce dosage concerne les expériences d'incubation avec l'oxyde de fer. L'ordre d'élution se fait selon le pKa de l'acide (du plus faible au plus élevé)

2.4.11. Analyse de la phase gazeuse des flacons d'incubation (dosage du CO₂)

L'analyse de CO₂ émis dans l'atmosphère des flacons incubés en batch, et indicateur d'activité bactérienne, est effectuée en prélevant les gaz à travers des bouchons hermétiques, à l'aide d'une seringue. La mesure exprimée en mg.l⁻¹ est faite par spectrophotométrie IR, avec l'appareil BINOS 1004 (Infra-Red Gaz analyser, Rosemont, Allemagne). Le CO₂ absorbe les radiations IR à 2325,6cm⁻¹. La concentration de CO₂ mesurée est convertie soit par quantité de CO₂ produite par gramme de sol sec (µg CO₂/g sol sec), soit en taux de minéralisation C- CO₂ en ‰.

2.4.12. Techniques d'identification moléculaire des bactéries

Pour mieux identifier et suivre l'évolution des communautés en fonction des paramètres physico-chimiques impliquées dans la mobilité du fer des sols de rizières, des méthodes d'identification moléculaire ont été appliquées. Elles sont fondées sur des extractions d'ADN à partir de sols incubés ou de consortia bactériens isolés et cultivés dans diverses conditions de milieux.

Deux couples d'amorces spécifiques aux bactéries, 968f-GC/1401R, ont été utilisés pour amplifier par PCR (Polymerase Chain Reaction) les fragments d'ADN, et ces fragments amplifiés sont analysés par électrophorèse à gradient temporel de température (TTGE : Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis). Après découpage et ré-amplification des bandes TTGE, celles-ci ont été séquencées et comparées aux bases de données GenBank pour leur affiliation.

2.4.12.1. Extraction de l'ADN

❖ Extraction de l'ADN à partir des cultures de consortia bactériens

L'ADN total des consortia bactériens a été extrait par une méthode de Bead Beating (FastDNA[®] Kit, Q-Biogène) sur le culot des bactéries centrifugé à 15000 tr/min pendant 10min, selon un protocole développé lors de ce travail. En effet, la forte quantité d'oxyde de fer apportée dans les milieux de culture (1,75gl⁻¹ d'oxyde de fer) a posé des problèmes pour l'extraction de l'ADN et son amplification.

Pour y remédier, nous avons cultivé des consortia bactériens sur quatre milieux de même composition de base, mais différant par la quantité d'oxyde apportée (0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1gl^{-1} d'oxyde de fer). L'extraction de l'ADN a été efficace pour les milieux contenant 0,25 et $0,5\text{gl}^{-1}$ d'oxyde de fer, après 1 à 2 jours d'incubation, pour tous les consortia bactériens et pour les milieux contenant 0,75 et 1gl^{-1} d'oxyde de fer après 7 à 14 jours selon les consortia bactériens.

Pour optimiser le rendement d'extraction d'ADN, le protocole de culture retenu est le suivant: les consortia bactériens ont été cultivés dans les milieux contenant $0,5\text{gl}^{-1}$ d'oxyde de fer, soit moins de $300\text{mg}\text{l}^{-1}$ de Fe et leur ADN a été extrait grâce au kit d'extraction FastDNA[®] Kit, Q-Biogène (les étapes de l'utilisation du kit sont données dans l'annexe 1). Avant l'utilisation du kit, le culot d'inoculum additionné à $200\mu\text{l}$ d'eau physiologique est prétraité avec $20\mu\text{l}$ de lysozyme ($10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) pendant 30min à 37°C en agitation, puis avec $20\mu\text{l}$ de Protéinase K (1%) pendant 30min à 70°C au bain marie.

❖ Extraction de l'ADN à partir du sol

L'extraction de l'ADN total des sols issus des rizières de Thaïlande et de la Côte d'Ivoire a été réalisée par un protocole basé sur celui de Norini (2007) pour extraire l'ADN des sols contaminés en HAP. Il est donné en Annexe 2. L'extraction a été effectuée sur les sols incubés dans de l'eau ultra pure stérile en condition anaérobie à 28°C .

2.4.12.2. Amplification de l'ADN : PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est réalisée à partir de $1\mu\text{l}$ d'extrait de l'ADN dans un volume réactionnel final de $50\mu\text{l}$. le mix PCR ($49\mu\text{l}$ par réaction) est composé comme suit :

- Pour les consortia bactériens : $5\mu\text{l}$ de 10*Tampon (Buffer) ; $1,5\mu\text{l}$ MgCl_2 (50mM); $1\mu\text{l}$ d'NTP (0,2mM) ; $1\mu\text{l}$ de chaque amorce (968F-GC ($10\mu\text{M}$) et 1401 R ($10\mu\text{M}$)) ; $0,25\mu\text{l}$ Taq polymérase ($5\text{U}/\mu\text{l}$) et $39,25\mu\text{l}$ d'eau ultra pure stérile filtré à $0,22\mu\text{m}$.
- Pour les sols : $2\mu\text{l}$ BSA ; 1,5 DMSO ; $5\mu\text{l}$ de 10*Tampon (Buffer) ; $1,5\mu\text{l}$ MgCl_2 (50mM); $1\mu\text{l}$ d'NTP (0,2mM) ; $1\mu\text{l}$ de chaque amorce (968F-GC ($10\mu\text{M}$) et 1401 R ($10\mu\text{M}$)) ; $0,25\mu\text{l}$ Taq polymérase ($5\text{U}/\mu\text{l}$) et $35,75\mu\text{l}$ d'eau ultra pure stérile filtrée à $0,22\mu\text{m}$.

Le programme d'amplification par PCR de l'ADN ribosomique 16S se déroule en trois étapes :

- la dénaturation qui permet la lyse cellulaire par choc thermique comprenant 1 cycle de 5min à 94°C ;
- l'amplification des séquences cibles, constituée de 38 cycles comprenant chacun 1 cycle de 30s à 94°C, 1 cycle de 45s à 56°C et 1 cycle de 45s à 72°C ;
- l'élongation finale, qui permet de terminer les réactions de polymérisation constituée d'un 1 cycle de 7 min à 72°C

La quantité et la qualité des produits PCR obtenus sont ensuite vérifiées par électrophorèse à 120V dans un gel d'agarose 1%, avec 5µl de produit PCR et 1µl de bleu de méthylène. L'ADN est révélé par un bain de bromure d'éthidium (BET, 0,5 mg.l⁻¹, Biorad) pendant 15min.

2.4.12.3. Identification et séquençage par TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

La TTGE est une technique permettant de séparer les brins d'ADN de même taille amplifiés par PCR dans un gel d'acrylamide dont le pouvoir résolutif est meilleur que celui sur les gels d'agarose.

Le gel d'acrylamide est composé de 12,6g d'urée (6M) ; 600 µl de Glycérol ; 750µl de TAE (Tris Acétate EDTA, 50X) ; 6ml d'un mélange acrylamide-bisacrylamide ; 300µl d'APS (Ammonium PerSulfate 10%) ; 30µl de TEMED (N,N,N',N' Tetraméthyle Ethylène Diamine) et 30ml d'eau. Il s'obtient de la manière suivante : l'urée est préalablement dissoute au bain marie dans 20ml d'eau distillée. Ensuite le glycérol, le TAE et la solution d'acrylamide&bisacrylamide y sont ajoutés. Le volume de la solution obtenue est complété avec de l'eau distillée à 30ml et filtré à 0,45µm. Enfin, la solution filtrée, recevant le TEMED et l'APS, est coulée rapidement dans le système d'électrophorèse selon les recommandations du constructeur (Dcode, Universal Mutation system, Biorad). Le gel est placé dans un bain de tampon TAE 1X après la solidification du gel. Les produits PCR (8µl) additionnés à 8µl de bleu de bromophénol sont ensuite déposés dans les puits du gel pour migration. Les produits PCR migrent dans le gel pendant 5 h, dans un bain thermostaté dont la température passe de 57°C à 67°C (augmentation de 2°C/ h) à 100Volts. Cette élévation de température va permettre une séparation croissante des brins d'ADN. Ainsi, au fur et à mesure de la migration, les brins vont "s'ouvrir de plus en plus". Ce qui va entraîner une augmentation de l'encombrement stérique et un ralentissement de la migration dans le gel. Cette technique permet donc d'effectuer une séparation des brins d'ADN en fonction de leur taille, mais aussi en fonction de leur séquence (plus le pourcentage de G-C (G : guanine et C: cytosine) est élevé, plus l'ADN est stable).

Les gels sont révélés dans un bain SYBR Green ($0,1\text{ml.l}^{-1}$) sous UV, à l'aide de l'appareil Gel Doc Transilluminator (Bio-Rad) couplé au logiciel informatique Quantity One.

Les bandes TTGE majoritaires obtenues sont placées dans $100\mu\text{l}$ d'eau distillée stérile après avoir été découpées et sont amplifiées selon les mêmes conditions de PCR que celles utilisées avant la réalisation de la TTGE mais en remplaçant l'amorce 968F-GC par 968F. Les produits PCR réamplifiés sont ensuite purifiés grâce à la méthode adoptée avec le kit "High Pure PCR Product Purification" (Roche Diagnostic).

A partir de 75ng du produit de PCR purifié, les bandes sont séquencées par MWG Biotech et sont comparées aux bases de données GenBank (National Center for Biotechnology Informatic, NCBI). Leur affiliation est déterminée par BlastN (Basic Local alignment Search Tool).

Par le programme d'alignements multiples CIUSTAL W du logiciel BioEdit Séquence alignement Editor, l'analyse phylogénétique est réalisée et l'arbre phylogénétique est obtenu par le logiciel TREE VIEW.

2.4.13. Expression des résultats

2.4.13.1. Dénombrement de bactéries en microplaques

Les résultats des lectures en microplaques sont traités par un programme statistique déterminant le Nombre le Plus Probable (NPP) de bactéries présentes dans l'échantillon, basé sur la méthode de McCrady (**Huques & Plantat, 1983**) qui considère que les puits positifs obtenus avec la dilution la plus faible correspondent au développement d'une seule unité bactérienne et nous permet d'obtenir le nombre de bactéries g^{-1} de sol sec.

2.4.13.2. Comptage bactérien à la cellule Thomas

Le nombre de bactéries apportées dans l'inoculum lors des expérimentations est déterminé par comptage avec la cellule de Thomas. La lame de la cellule de Thomas est formée d'un quadrillage sur lequel ne sont comptées que les bactéries présentes dans le quadrillage. De plus, comme 1ml de solution remplit 4.10^6 petites cases, le nombre moyen (M) de bactéries dans chacune des cases de la lame permet d'estimer la population bactérienne (*Equation 11*):

$$[\text{Bactéries}] = M * 4.10^6 \text{ bact./ ml de suspension } (11)$$

2.4.13.3. Solubilisation des différents éléments minéraux

La quantité d'éléments solubilisés (Fe^{2+} et/ou Fe^{3+} et/ou Fe total) par les consortia bactériens, mesurée par spectrométrie, est estimée en élément pour 100g d'élément total apporté. Il est noté indice de dissolution (I_d).

$$I_d (\%) = \frac{[\text{Fe dosé}] \text{ en mg.l}^{-1} \times \text{Volume (milieu d'incubation) en ml}}{1000 \times (\text{Poids total de fer apporté par l'oxyde en mg})} \times 100 \quad (12)$$

Les quantités d'ammonium (NH_4^+), de nitrate (NO_3^-), CO_2 et COD issus de la minéralisation du carbone et de l'azote du sol, ainsi que l'évolution de la quantité d'un élément dans un compartiment géochimique sont exprimées en mg.g^{-1} sol sec de la manière suivante :

$$\text{mg (d'élément)} \times \text{g}^{-1} \text{ sol sec} = \frac{[\text{élément à doser}] \text{ en mg.l}^{-1} \times \text{Volume (milieu d'incubation) en ml}}{1000 \times \text{Poids du sol en g}} \quad (13)$$

Le taux de minéralisation (T) est la quantité de carbone minéralisée par rapport à la quantité de carbone organique total des sols :

$$\text{C-CO}_2 \text{ en } (\%_{\text{org total}}) = \text{CO}_2 (\text{ppm}) \times 42,86 \times \frac{\text{Volume atmos du flacon (ml)} \times M_C \times 100}{1000 \times 22400 \times \text{Qté de sol (g)} \times \text{C}_{\text{org total}} \text{ en } \%} \quad (14)$$

(où 42,86 est le facteur de dilution dû au mode de fonctionnement de l'appareil)

La concentration d'éléments présents dans les eaux de rizières et la concentration du glucose ou de l'acétate consommée sont exprimés en mg l^{-1} ou en mmol l^{-1} d'éléments.

2.4.14. Analyse statistique des données

Dans cette étude, les analyses statistiques ont été réalisées par les logiciels Statistica (7.1) et Excel stat. Afin d'estimer la validité et la "signification" des moyennes observées sur les différents traitements, les tests statistiques suivants ont été réalisés :

- les écart-types ont été estimés à partir des intervalles de confiance à 95% obtenus par le logiciel Most Probable Number Calculator, qui permet de calculer le Nombre le Plus Probable de bactéries (NPP) ;
- à partir des écart-types estimés, des tests de Student à $p < 0,05$ ont été utilisés pour définir la validité des résultats dans les expériences en microplaques grâce au logiciel Statistica (7.1);
- des Anovas multifactoriels, des matrices de corrélations et le test de Newman Keuls ont été appliqués pour définir les paramètres significatifs dans les incubations en flacons grâce au logiciel Excel stat ou Statistica (7.1).

Chapitre3 : Propriétés des sols de rizières et de leurs solutions

3.1 Introduction

Les caractérisations des sols et des solutions du sol ont été effectuées pour préciser les propriétés et les paramètres pouvant intervenir dans la mobilisation du fer des sols de rizières. Dans le cas des sols de Thaïlande, les sources et la dynamique du fer, la salinité, les matières organiques et les conditions d'oxydo-réduction ont été prises en considération. Pour les sols de Côte d'Ivoire, les sources et la dynamique du fer, les matières organiques et l'évolution des conditions d'oxydo-réduction ont été étudiées en y associant le fonctionnement de deux toposéquences.

Pour les sols et les solutions des sols de rizières de Thaïlande, une partie des travaux, comme indiqué précédemment au chapitre 2, a été effectuée par l'IRD et le Land Department and Development (LDD) de Bangkok (Thaïlande).

3.2 Sols et eaux des rizières de Thaïlande

3.2.1 Sols

3.2.1.1 Caractéristiques physiques des sols

Les sols des rizières de Thaïlande retenus pour cette étude sont de texture sablo-limoneuse grossière, pauvres en argiles, fortement altérés et riches en oxydes de fer.

En saison sèche, la salinisation se manifeste en surface par des accumulations de sels qui forment localement des zones discontinues et blanchâtres. La carte de conductivité électrique des sols (*Figure 3.1*) montre la présence de zones fortement salines, avec $EC > 250 \text{ mS.m}^{-1}$, et non salines ($EC=150 \text{ mS.m}^{-1}$) au sein des parcelles rizicoles.

Ces sols présentent un caractère acide avec un $4,8 < pH < 5,2$, ils sont majoritairement dominés par le sodium (Na^+), le chlore (Cl^-) et le sulfate (SO_4^{--}) et sont carencés en éléments majeurs, mais pauvres en matières organiques (*Tableau 3.1 et 3.2*).

L'analyse élémentaire (*Tableau 3.2*) des échantillons de sols des parcelles étudiées présente de très fortes teneurs en silicium, avec plus de 75 % SiO_2 . Les autres éléments majeurs sont moins de 1%. Les teneurs en fer sont voisines de 3 ‰ en Fe_2O_3 dans la parcelle non amendée (L14) et de 4 à 5 ‰ en Fe_2O_3 dans la parcelle amendée (L25). Les éléments les plus disponibles de la phase hydrosoluble sont très peu abondants et se répartissent de la manière suivante : $\text{Na} > \text{Al} > \text{K} > \text{Fe} > \text{Ca} > \text{Mg} > \text{Mn}$.

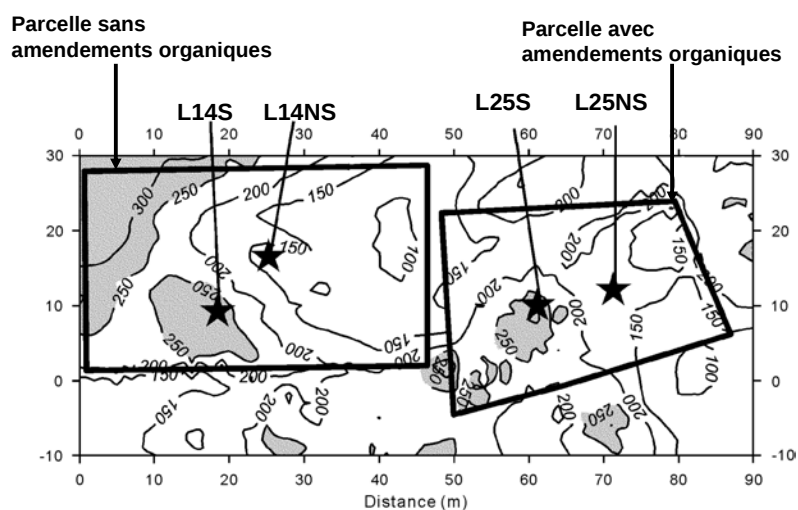


Figure 3.1 : Carte de conductivité électrique (mS.m^{-1}) dans la partie superficielle des sols. L14S : parcelle non amendée et saline ; L14NS : parcelle non amendée et non saline ; L25S : parcelle amendée et saline ; L25NS : parcelle amendée et non saline (Quantin et al., 2008)

Tableau 3.1 : Analyse élémentaire organique et Anions hydrosolubles à l'eau (rapport sol/solution : 1/10) sur les échantillons (0-20cm) de sols de Thaïlande.

Echantillons	Matière Organique (%)			pH_{eau}	Anions hydrosolubles ($\text{mmol.g}^{-1}\text{sol sec}$)		
	MO	C	C:N		Cl^-	SO_4^{2-}	NO_3^-
L14S	$0,30 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,00$	$8,48 \pm 0,52$	$4,9 \pm 0,02$	39,0	0,1	0,1
L14NS	$0,31 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$	$9,14 \pm 0,47$	$4,8 \pm 0,6$	7,0	0,03	0,02
L25S	$0,57 \pm 0,14$	$0,33 \pm 0,08$	$10,88 \pm 0,68$	$5,4 \pm 0,01$	23,0	0,04	0,02
L25NS	$0,64 \pm 0,05$	$0,37 \pm 0,03$	$11,20 \pm 0,33$	$5,2 \pm 0,1$	12,3	0,01	0,01

Tableau 3.2 : Analyse élémentaire des échantillons de sol des parcelles de Thaïlande. L14: parcelle non amendée ; L25 : parcelle amendée ; S : zone saline ; NS : zone non saline. Eléments totaux après fusion alcaline. Pf : Perte au feu. Eléments hydrosolubles (extraits à l'eau ; rapport sol/solution : 1/10)

Echantillons	Elements hydrosolubles (mmol.g ⁻¹ sol sec)						Eléments totaux (%)										
	Ca	Mn	K	Mg	Fe	Na	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO ₂	CaO	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅	TiO ₂	Pf
L14S	0,3 ± 0,03	0	0,5 ± 0,003	0,1 ± 0,004	0,5 ± 0,02	41 ± 0,2	84,3	0,85	0,33	0,05	0,04	0,07	2,26	1,52	0,2	1,28	1,3
L14NS	0,03 ± 0,003	0	1,3 ± 0,1	0,08 ± 0,004	0,3 ± 0,1	13 ± 0,4	82,3	0,84	0,31	0,05	0,04	0,07	1,95	1,13	0,19	1,23	1,3
L25S	1,8 ± 0,3	0,2 ± 0,02	1,3 ± 0,08	0,07 ± 0,04	0,5 ± 0,2	70,4 ± 0,6	87,63	1,05	0,43	0,06	0,06	0,08	2,73	0,82	0,28	1,21	1,3
L25NS	0,08 ± 0,03	0	0,8 ± 0,05	0,08 ± 0,004	0,4 ± 0,1	15,7 ± 0,3	76,82	1,3	0,52	0,05	0,04	0,09	0,92	0,49	0,26	1,29	1,6

3.2.1.2 Différentes formes du fer

La répartition des différentes formes de fer, réalisée selon le protocole décrit au chapitre 2, est présentée dans le *Tableau 3.3*. Sur les parcelles non amendées (L14S et L14NS), le fer est principalement lié aux matières organiques (Fe_{pyro}) et représente 34 % du Fe_{total} (*Tableau 3.4*). Il est ensuite contenu dans les oxyhydroxydes de fer bien cristallisés (Fe_{CBD}) qui constituent 24 % du Fe_{total} , et dans les oxyhydroxydes mal cristallisés (Fe_{Tamm}) représentant 19 % du Fe_{total} . Les fractions les plus disponibles (Fe_{Hydro} , $\text{Fe}_{\text{éch}}$, Fe_{acido}) sont peu abondantes.

Sur les parcelles amendées (L25S et L25NS), le fer provient principalement des oxyhydroxydes de fer bien cristallisés ($\text{Fe}_{\text{CBD}} \sim 22 \% \text{ Fe}_{\text{Total}}$), puis du fer associé aux matières organiques ($\text{Fe}_{\text{Pyro}} \sim 17 \% \text{ Fe}_{\text{Total}}$), et enfin, sous forme d'oxyhydroxydes mal cristallisés ($\text{Fe}_{\text{Tamm}} \sim 12 \% \text{ Fe}_{\text{Total}}$).

Ces résultats suggèrent qu'une grande partie du fer de ces sols n'est pas associée aux réseaux des silicates et se retrouvent donc sous forme dite libre pour 44 à 82 % du fer total (*Tableau 3.3*). Cette forme de fer "libre" est en grande partie sous forme organo- minérale (fraction facilement mobilisable par les microorganismes) et aussi d'oxydes de fer bien cristallisés (réductibles).

Les valeurs du rapport $\text{Fe}_{\text{Tamm}} / \text{Fe}_{\text{CBD}} < 1$ indiquent relativement peu ou moins de formes mal cristallisées, alors que celles du rapport $\text{Fe}_{\text{Pyro}} / \text{Fe}_{\text{Tamm}} > 1$ révèlent qu'une grande partie du fer extrait par l'oxalate d'ammonium est sans doute sous forme organo-minérale. On note également que les résultats des extractions à l'oxalate et au pyrophosphate sont très voisins. Ces différents résultats suggèrent que ces sols renferment une fraction de fer mobilisable très importante. Toutefois, il est bien de noter que le fer peut être aussi issu de l'altération des silicates qui ne représenteraient que 18 à 56 % du fer total.

3.2.1.3 Analyse minéralogique

Les observations par Diffraction de Rayons X (DRX), effectués sur les sols de Thaïlande, révèlent la présence d'hématite, de quartz, d'halite et de cristobalite.

Tableau 3.3 : Analyse des différentes formes de fer présent dans les échantillons de sol des parcelles de Thaïlande. L14: parcelle non amendée ; L25 : parcelle amendée ; S : zone saline ; NS : zone non saline. Fe_{hydro} : Fe hydrosoluble extrait à l'eau ; $Fe_{éch}$: Fe échangeable extrait par KCl (1M); Fe_{acido} : Fe acidosoluble extrait par HCl (0,5N); Fe_{Tamm} : Fe extrait par l'oxalate d'ammonium ; Fe_{CBD} : Fe extrait par le Citrate –Bicarbonate-Dithionite ; Fe_{pyro} : Fe extrait par le pyrophosphate de sodium (0,1M) ; Fe_{total} : Fe total dosé après fusion alcaline

Parcelles	Formes du Fe ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$)							Fe libre / Fe Total
	Fe libre (extractible)						Fe _{total}	
	Fe Hydro	Fe éch	Fe acido	Fe Tamm	Fe CBD	Fe pyro		%
L14S	23 ± 1	0,5 ± 0,001	84 ± 5	433 ± 13	550 ± 40	800 ± 70	2310 ± 200	81,84
L14NS	18 ± 3	0,5 ± 0,001	64 ± 20	360 ± 50	570 ± 9	750 ± 200	2200 ± 500	80,11
L25S	25 ± 11	0,5 ± 0,001	178 ± 4	460 ± 20	650 ± 23	520 ± 30	3030 ± 20	60,51
L25NS	22 ± 7	0,5 ± 0,001	80 ± 1	430 ± 30	640 ± 20	422 ± 20	3610 ± 100	44,17

Tableau 3.4 : Rapports des différentes formes du fer. L14: parcelle non amendée ; L25 : parcelle amendée ; S : zone saline ; NS : zone non saline.

Parcelles	Rapport des différentes formes de fer				
	%				
	Fe_{CBD} / Fe_{total}	Fe_{Tamm} / Fe_{total}	Fe_{Pyro} / Fe_{total}	Fe_{Tamm} / Fe_{CBD}	Fe_{Pyro} / Fe_{Tamm}
L14S	24	19	34	0,8	1,83
L14NS	26	17	35	0,65	2,08
L25S	22	15	17	0,71	1,14
L25NS	18	12	12	0,68	0,99

3.2.2 Solutions du sol

La caractérisation de la solution des sols réalisée par l'équipe de l'IRD en collaboration avec le LDD (Quantin et al., 2008) conduit à souligner que :

- leur pH diffère selon les pratiques culturales et la profondeur. On observe des valeurs plus élevées dans la parcelle amendée que dans celle non amendée, mais plus fortes dans la zone non saline ;
- sur la parcelle amendée (L25) dans les zones saline (S) et non saline (NS), le potentiel redox (Eh) diminue rapidement après repiquage du riz (300 à -200mV) par rapport à

- la parcelle non amendée. De plus, le potentiel redox (Eh) est significativement plus élevé dans la zone saline que dans la zone non saline, à 10 et 25 cm de profondeur ;
- la conductivité électrique (EC) de la solution de sol est plus élevée dans les zones salines des deux parcelles. Hors de la zone saline, elle demeure relativement constante. Cependant, à l'exception de la parcelle non amendée saline (L14S), elle augmente avec la profondeur ;
- les quantités de Fe en solution montrent une plus forte teneur pour la parcelle amendée (L25) que pour la parcelle non amendée (L14). Cette réduction est plus élevée dans la zone non saline (NS), quelle que soit la profondeur (*Figure 3.2*).

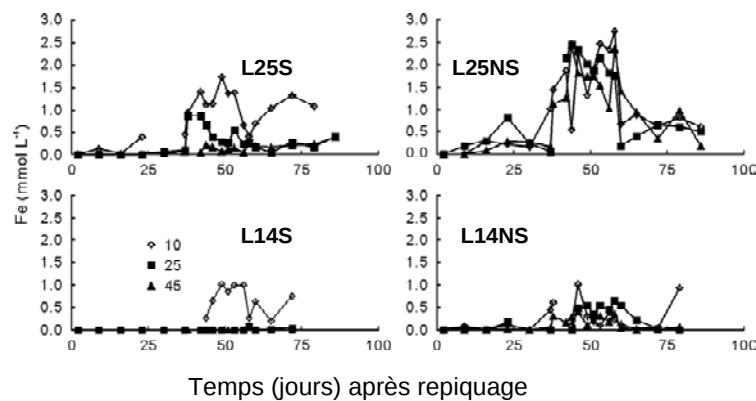


Figure 3.2 : Quantité de fer des solutions de sols dans quatre parcelles de sol de Thaïlande à 10, 25 et 45cm de profondeur après repiquage du riz. (Quantin et al., 2008).

3.3 Sols et eaux des rizières de Côte d'Ivoire

3.3.1 Sols

3.3.1.1 Descriptions et Caractères morphologiques des profils

Deux profils (F1 et A15) de bas-fond du site de la station de recherche de Gagnoa ont été étudiés et décrits (*Figure 3.3*). Le profil F1 comprend quatre horizons (*Tableau 3.5*) alors que le profil A15 comprend trois horizons (*Tableau 3.6*).

Chapitre 3 :

Propriétés des sols de rizières et de leurs solutions

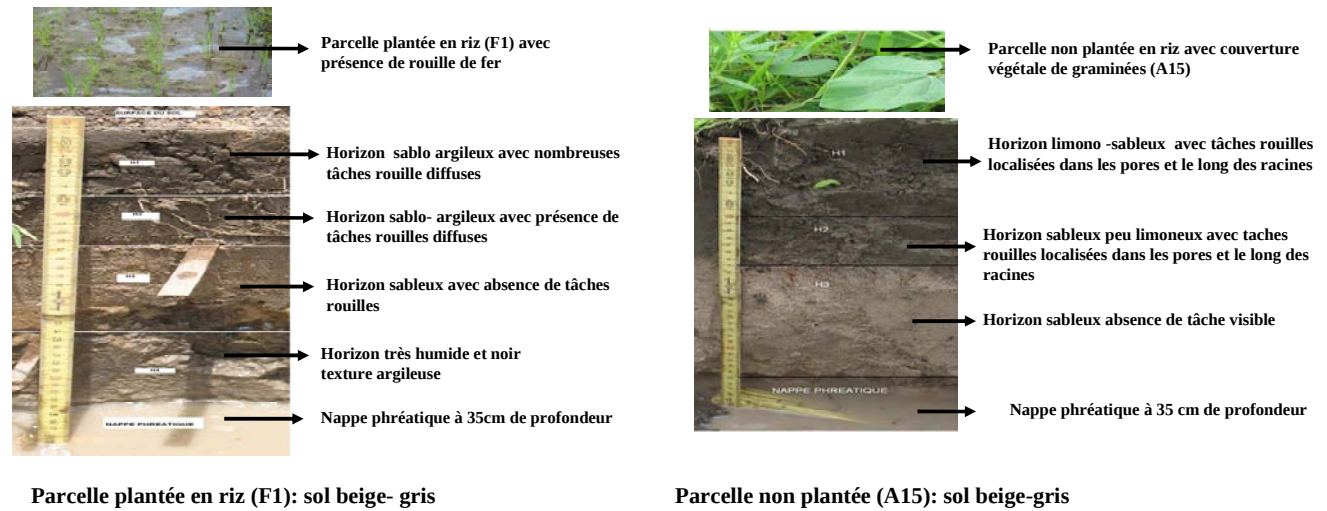


Figure 3.3 : Description des profils dans les casiers rizicoles plantés ou non en riz (site station de recherche de Gagnoa)

Tableau 3.5 : Caractères morphologiques du profil du casier rizicole cultivé (F1)

Horizons	Profondeur	Couleur	Taches	Texture	Structure
H1 (Meuble)	0-10 cm	10YR 3/2	taches rouilles diffuses racines fines subverticales	Sablo-argileuse	Grumeleuse grossière
H2 (Meuble)	10-15 cm	10YR 4/1	Taches rouille diffuses racines fines subverticales	Sablo peu argileuse	Fragmentaire polyédrique à éclat subanguleux
H3 (Boulant)	17-23 cm	2,5YR 5/2	Absence de tache visible et diffusion de la matière organique dans l'horizon sableux	Sableuse	Particulaire
H4 (Humide) Nappe	23-33 cm >35 cm	10YR 3/1	Absence de tache visible	Argileuse	Massive

Tableau 3.6 : *Caractères morphologiques du profil du casier rizicole non cultivé (A15)*

Horizons	Profondeur	Couleur	Taches	Texture	Structure
H1 (Meuble)	0-10 cm	10YR 3/2	Taches rouilles localisées dans les pores et le long des racines fines subverticales	Sablo-Limoneuse	Grumeleuse grossière
H2 (Meuble)	10-17 cm	10YR 4/1	Nombreuses taches rouilles localisées dans les pores et le long des racines fines subverticales	Sablo peu limoneuse	Fragmentaire polyédrique à éclat subanguleux
H3 (Boulant) Nappe	17-35 cm >35 cm	2,5 Y 7/3	Absence de tache visible	Sableuse	Particulaire

3.3.1.2 Caractéristiques des toposéquences

Quatre profils représentatifs ont été choisis le long des toposéquences faites sur le site de la station de recherche de Gagnoa et le site des bas-fonds aménagés de Guéssihio (*Figure 3.4 et 3.5*) pour des caractérisations plus complètes.

Sur le site de la station de recherche de Gagnoa (*Figure 3.4*), le profil C1 de 100cm de profondeur, représentatif du sommet, est constitué en majorité de nodules ferrugineux dont la teneur varie entre 20 et 70%. La texture est argilo-sableuse dans les 60 premiers centimètres et argileuse en profondeur. Le drainage interne est bien assuré. Il présente trois horizons jusqu'à l'horizon altéritique rouge (c) : l'horizon A₁ de couleur 5YR 4/6, riche en matière organique et en éléments ferrugineux jusqu'à 20cm de profondeur, l'horizon B₂ (2,5 YR 4/6) jusqu'à 60cm, enfin, l'horizon BC (10 R 4/4) jusqu'à 100 cm reposant sur l'horizon altéritique (C).

A mi-versant, les horizons A₁, B₂, BC et (C) du profil C1 se retrouvent dans la séquence du profil C5 qui est constitué de plus de 50% de nodules ferrugineux dans les 60 cm supérieurs. La texture est argilo-sableuse dans tous les horizons. Le drainage interne est bon.

Dans le bas du versant (profil C6) les quatre précédents horizons disparaissent et se développent en deux horizons A₁₁ de couleur gris foncé (10YR 3/2) et un horizon gris clair B_g (5 YR 7/2) complètement altérés. Le sol du bas de versant est sableux sur les 40 cm supérieurs et sablo-argileux dans les horizons sous-jacents. La nappe affleure à 60 cm.

Chapitre 3 :

Propriétés des sols de rizières et de leurs solutions

Dans le bas-fond (profil F1) on observe un horizon A_{11} (10YR 3/2), plus riche en matière organique et plus sableux situé au dessus de la zone de battement de la nappe. La nappe phréatique est proche de la surface. C'est un sol typiquement hydromorphe à gley.

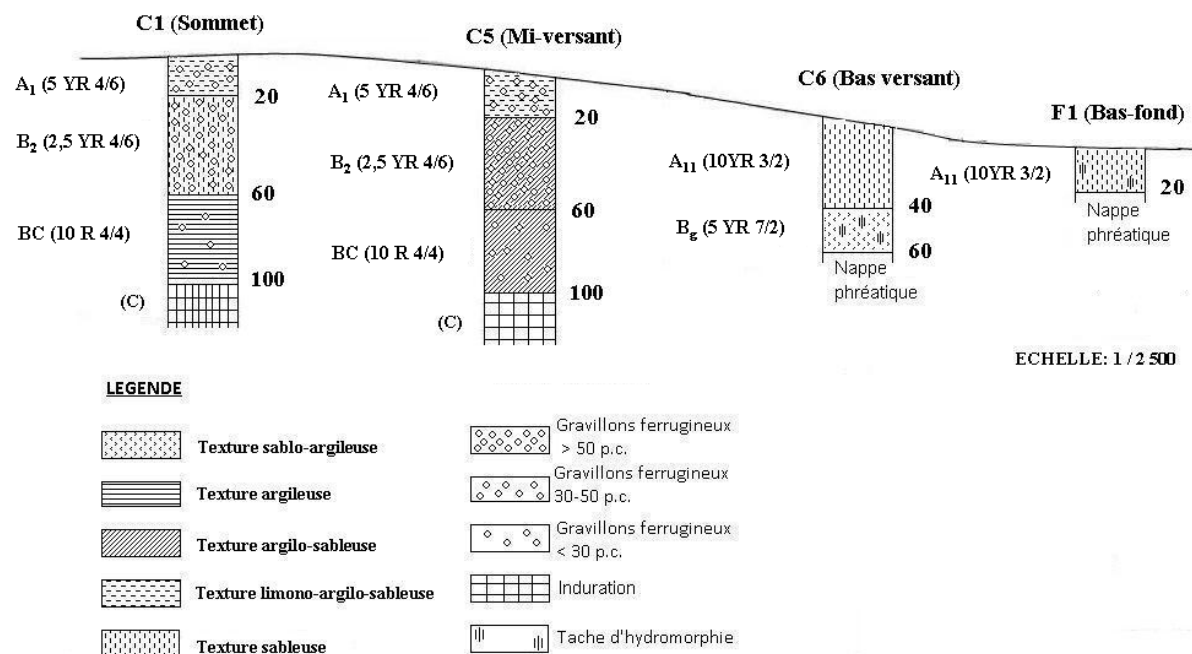


Figure 3.4 : Caractères morphologiques des sols le long de la toposéquence de la station CNRA de Gagnoa

Pour la toposéquence de Guéssihio (Figure 3.5), les sols de sommet (profil G6) sont profonds (>120 cm), bien drainants et gravillonnaires, avec un taux pondéral d'éléments grossiers, constitués en majorité de gravillons ferrugineux, inférieur à 50 %. La texture est argilo-sableuse dès la surface et argileuse en profondeur. Le profil G6 comprend trois horizons : un horizon A_1 , de couleur 5YR 4/6, riche en matière organique jusqu'à 20cm de profondeur, un horizon B_2 (2,5 YR 4/6) jusqu'à 40cm, puis un horizon BC (10 R 4/4) jusqu'à 120 cm.

A mi-versant, les trois horizons du profil G6 se retrouvent plus bas dans le profil G4 de 100cm de profondeur. Ce profil présente une induration (C) en profondeur dès 80cm et est composé en majorité de nodules ferrugineux dont le taux pondéral est inférieur à 50%. La texture est argilo-sableuse dès la surface et argileuse en profondeur. Le drainage interne est bien assuré.

En bas de versant (profil G2), les horizons des profils G6 et G4 disparaissent et donnent naissance à deux horizons sableux présentant un horizon A_{11} gris foncé (10YR 3/1) de 20cm d'épaisseur, et un horizon gris clair B_g (5 YR 7/2) de 40cm d'épaisseur. La présence de la nappe phréatique à cette profondeur n'a pas permis de poursuivre la description des horizons sous-jacents.

Dans le bas-fond, le profil G1 contient un horizon A_{11} de couleur noire, tourbeux (10YR 3/1) de 20cm d'épaisseur, en contact avec la nappe.

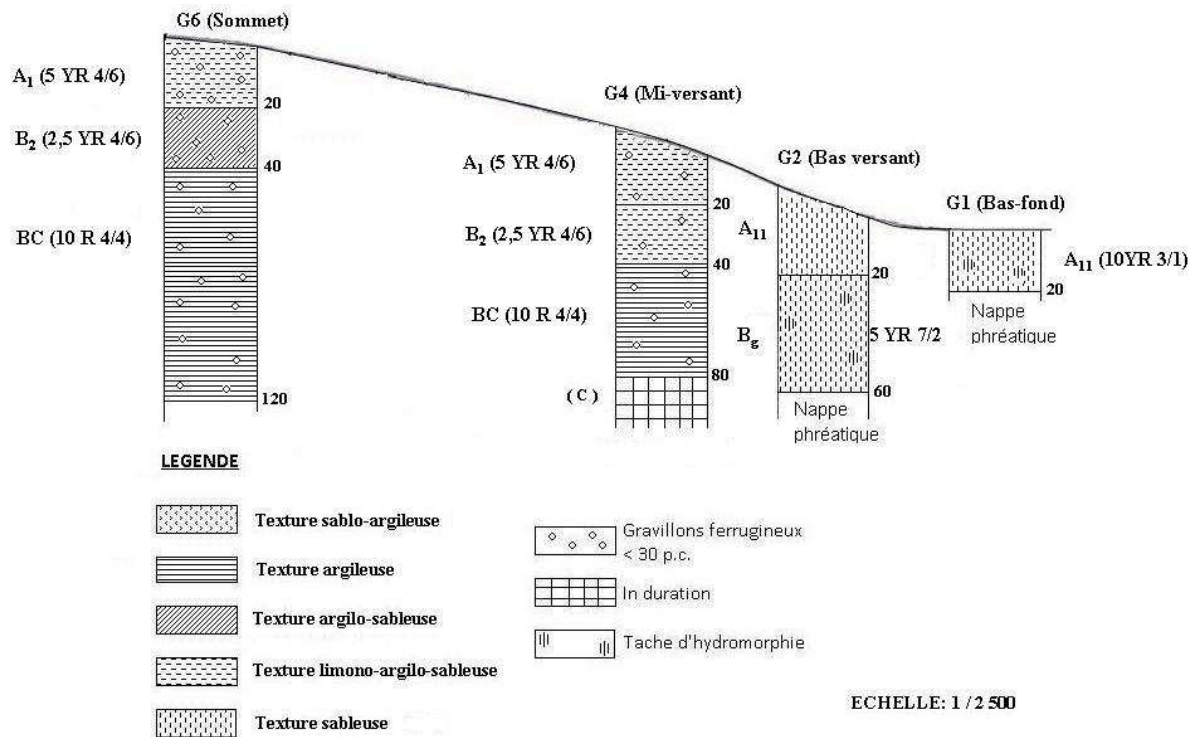


Figure 3.5 : Caractères morphologiques des sols le long de la toposéquence de Guéssihio

3.3.1.3 Caractéristiques physiques des sols

Les sols de Côte d'Ivoire sélectionnés pour cette étude ont en majorité une texture sablo-argileuse en surface à argilo-sableuse en profondeur (Tableau 3.7). Par contre, ils sont plus sableux dans les bas-fonds (plus de 60 % de sables) et sont dans l'ensemble pauvres en limons (moins de 15 %).

Les sols sont fortement acides ($4 < \text{pH}_{\text{eau}} < 5$; $3 < \text{pH}_{\text{KCl}} < 4$) quelle que soit la position topographique. Dans l'ensemble, ils ont une faible capacité d'échange cationique et sont faiblement saturés avec un taux de saturation compris entre 10 et 20. Les teneurs en azote sont supérieures à 0,1%. La teneur en phosphore total (P_t) est comprise entre 2 et 18 mmol.l⁻¹ mais celle en phosphore assimilable est faible (Tableau 3.8).

Dans les bas-fonds, les teneurs en matière organique (MO) des horizons de surface sont comprises entre 10 et 15 %, ce qui indique un apport important avec une minéralisation relativement faible et ceci malgré un rapport carbone/Azote (C/N) compris entre 10 et 15 suggérant une bonne biodégradabilité potentielle.

Tableau 3.7 : Caractéristiques physiques des horizons de sols de Côte d'Ivoire échantillonnés le long d'une toposéquence sur les deux sites d'étude. (A: argiles; Lf: limons fins ; Lg: limons grossiers; Sf: sables fins; Sg: Sables grossiers). ^(a) Granulométrie déterminée par la méthode de la pipette Robinson-Köln.

Sites d'étude	Positionnement		Profondeur (cm)	Granulométrie ^(a) %					
				A	Lf	Lg	Sf	Sg	
Gagnoa	Sommet	GAG C1	0 - 20 A ₁	34,3	3,6	5,5	17,2	39,3	
			20 - 60 B ₂	11,7	0,4	3,8	24,0	59,3	
			60 - 100 BC	60,5	1,3	4,7	8,4	24,6	
			100 -120 C	31,7	6,9	1,5	25,0	34,8	
	Mi- versant	GAG C5	0 - 20 A ₁	21,0	3,0	7,1	23,9	44,7	
			20 - 60 B ₂	39,3	1,9	5,5	16,4	36,4	
			60 - 100 BC	39,6	9,6	1,5	18,3	31,0	
	Bas- versant	GAG C6	0 - 40 A ₁₁	14,8	1,1	4,8	21,4	57,8	
			40 - 60 B _g	48,6	1,4	4,2	13,9	31,8	
	Bas- fond	F1	0 - 20 A ₁₁	11,3	0,3	4,1	34,2	49,1	
	Guéssihio	Sommet	GUE G6	0 - 20 A ₁	32,7	2,0	6,4	18,6	40,1
				20 - 40 B ₂	42,8	1,7	4,7	14,4	36,0
40 - 120 BC				57,2	0,2	2,4	11,0	29,0	
Mi-versant		GUE G4	0 - 20 A ₁	28,4	5,8	7,4	17,1	41,2	
			20 - 40 B ₂	34,3	3,9	7,3	18,9	35,2	
			40 - 80 BC	60,6	0,3	2,5	8,9	27,0	
			80 -100 C	32,2	0,4	4,5	15,7	47,2	
Bas-versant		GUE G2	0 - 20 A ₁₁	13,7	0,2	4,1	26,8	54,3	
			20 - 60 B _g	10,9	0,5	4,9	24,6	58,8	
Bas-fond		GUE G1	0 - 20 A ₁₁	23,2	8,3	4,6	25,7	37,9	

Tableau 3.8 : Caractéristiques chimiques des horizons de sols de Côte d'Ivoire échantillonnés le long d'une toposéquence sur les deux sites d'étude (Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz ; A15 et G1' : Parcelles non plantées.

Sites d'études	Profils	Profondeur (cm)	Cations échangeables (mEq.100g ⁻¹ sol)			CEC (mEq.100g ⁻¹ sol)	pH		Matières Organiques (M.O.)				Phosphore mmol.l ⁻¹		
			K	Ca	Mg		H ₂ O	KCl	C (%)	N (%)	C/N	MO (%)	P _t	P _{ass}	
Gagnoa (GAG)	Sommet	GAG C1	0 - 20	0,02	1,27	0,44	9,30	4,50	4,10	1,83 ± 0,7	0,20 ± 0,06	9,40 ± 1	3,20 ± 1,2	9,70	1,40
			20 - 60	0,01	0,43	0,03	1,30	4,90	4,30	1,40 ± 0,5	0,16 ± 0,07	9,10 ± 2	2,33 ± 0,9	5,06	0,70
	Mi versant	GAG C5	0 - 20	0,08	0,37	0,23	4,90	4,20	3,70	1,02 ± 0,3	0,12 ± 0,01	8,30 ± 1,5	1,80 ± 0,4	4,61	1,13
			20 - 60	0,03	0,39	0,16	8,50	4,20	3,50	0,52 ± 0,1	0,15 ± 0,02	3,53 ± 0,2	0,90 ± 0,1	5,06	0,81
	Bas versant	GAG C6	0 - 40	0,02	0,64	0,12	3,90	4,40	3,80	0,80 ± 0,2	0,14 ± 0,03	5,30 ± 1	1,30 ± 0,3	2,61	1,03
			40 - 60	0,02	0,35	0,07	4,00	5,00	4,10	0,20 ± 0,01	0,10 ± 0,02	2,23 ± 0,5	0,32 ± 0,01	5,06	1,10
	Bas-fond	GAG F1 GAG A15	0 - 20	0,01	1,70	0,20	10,60	4,00	3,70	8,50 ± 0,5	0,76 ± 0,14	11,50 ± 3	14,70 ± 0,8	2,61	2,03
			0 - 20	0,02	1,78	0,30	12,72	5,20	4,00	9,29 ± 1	0,89 ± 0,11	10,44 ± 2	16,02 ± 0,9	3,68	1,65
Guéssihio (GUE)	Sommet	GUE G6	0 - 20	0,03	0,47	0,61	6,00	4,50	3,50	1,70 ± 0,1	0,15 ± 0,03	12 ± 2,4	2,9 ± 0,1	6,00	0,61
			20 - 40	0,01	0,27	0,31	14,40	4,50	3,50	1,24 ± 0,03	0,10 ± 0,004	12,9 ± 0,7	2,13 ± 0,04	5,06	0,87
	Mi versant	GUE G4	0 - 20	0,22	1,38	1,27	9,10	4,80	3,40	1,90 ± 0,04	0,20 ± 0,003	10,2 ± 0,1	3,24 ± 0,1	6,00	1,45
			20 - 40	0,04	0,36	0,44	9,10	4,30	3,30	0,91 ± 0,02	0,10 ± 0,001	9,6 ± 0,04	1,6 ± 0,03	5,52	1,68
	Bas versant	GUE G2	0 - 20	0,07	0,32	0,24	4,30	4,00	3,60	0,86 ± 0,01	0,08 ± 0,001	11,4 ± 0,1	1,5 ± 0,02	8,74	1,77
			20 - 60	0,01	0,18	0,04	1,20	4,20	3,90	0,13 ± 0,002	0,02 ± 0,001	8 ± 0,3	0,21 ± 0,004	2,42	1,13
	Bas-fond	GUE G1 GUE G1'	0 - 20	0,04	1,72	0,53	18,60	4,20	3,60	11,10 ± 0,1	0,90 ± 0,01	12,8 ± 0,1	19,1 ± 0,2	5,06	3,06
			0 - 20	0,12	1,97	0,77	24,00	4,80	3,60	9,75 ± 0,5	0,65 ± 0,2	15,00 ± 2,5	16,81 ± 1	17,52	4,42

Chapitre 3 :

Propriétés des sols de rizières et de leurs solutions

L'analyse des éléments les plus disponibles de la phase hydrosoluble (*Tableau 3.9*) indique qu'elle est majoritairement dominée par l'aluminium et le fer et carencée, en manganèse. Cette solubilisation à l'eau est plus importante de l'amont (sommet) vers l'aval (bas-fond). On note aussi la solubilisation des éléments alcalins (Na^+ , K^+) et alcalino-terreux (Mg^{2+} , Ca^{2+}) mais en faible quantité.

L'analyse minérale élémentaire révèle que les matrices minérales sont principalement constituées de silice, aluminium et de fer (*Tableau 3.10*). Les autres éléments sont peu abondants. Le soufre élémentaire est présent avec de plus fortes teneurs dans les horizons de profondeur.

Tableau 3.9 : Analyses des éléments solubles à l'eau (rapport sol/ solution, 1/10) des horizons de sols de Côte d'Ivoire échantillonnés le long d'une toposéquence sur les deux sites d'études. Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz..

Sites d'étude	Positionnement	Profondeur (cm)	Eléments hydrosolubles (mg.kg ⁻¹ sol sec)								
			Ca	Mn	K	Mg	Al	Fe	Na		
Gagnoa	Sommet	GAG C1	0 - 20 A ₁	10 ± 0,1	0 ± 0	20 ± 1	5 ± 0,3	177,2 ± 6	73 ± 2,3	13 ± 3	
			20 - 60 B ₂	4 ± 1	0 ± 0	8 ± 1	2 ± 0,3	108 ± 3	74 ± 2	8 ± 1	
			60 - 100 BC	9 ± 1	0 ± 0	9 ± 1	3 ± 0,1	416 ± 16	269 ± 8,5	11 ± 1	
			100 - 120 C	12 ± 1,2	0 ± 0	5 ± 0,3	1 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0	8 ± 0,3	
	Mi- versant	GAG C5	0 - 20 A ₁	7 ± 2	0 ± 0	20,2 ± 2	2 ± 0,5	171 ± 29	98 ± 16,6	8 ± 0,6	
			20 - 60 B ₂	6 ± 2	0 ± 0	8 ± 0,3	1 ± 0,3	133 ± 29	75,7 ± 15,2	7 ± 1	
			60 - 100 BC	8,3 ± 1	0 ± 0	10 ± 1	2 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	10 ± 1	
			0 - 40 A ₁₁	7 ± 1	0 ± 0	11 ± 1	1 ± 0,1	40 ± 7	13,5 ± 1,5	10 ± 3	
	Bas- versant	GAG C6	40 - 60 B _g	9 ± 1	0 ± 0	10 ± 0,1	2 ± 0,3	261 ± 29	68,2 ± 4,5	7 ± 0,6	
			Bas- fond	F1	0 - 20 A ₁₁	8 ± 1	0 ± 0	14 ± 2	1 ± 0,3	74 ± 22	23,5 ± 5,8
	Guéssihio	Sommet	GUE G6	0 - 20 A ₁	8 ± 0,3	0 ± 0	15 ± 2	3 ± 1	164 ± 32	102,2 ± 16,5	10 ± 2
				20 - 40 B ₂	13,2 ± 3	0 ± 0	11 ± 1	5 ± 0,6	772 ± 39	471,3 ± 58,5	8 ± 1
40 - 120 BC				11,2 ± 5	0 ± 0	8 ± 0,5	3 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	9 ± 2	
0 - 20 A ₁				17,5 ± 1	0 ± 0	21 ± 1	9,1 ± 0,3	200 ± 8,5	96 ± 4	13 ± 2	
Mi-versant		GUE G4	20 - 40 B ₂	7 ± 2	0 ± 0	10 ± 1	3 ± 0,5	182 ± 5,6	119 ± 42	9 ± 1	
			40 - 80 BC	8 ± 1	0 ± 0	8 ± 0,3	3 ± 0,1	101 ± 40	70,3 ± 12	8,3 ± 1	
			80 - 100 C	10 ± 4	0 ± 0	6 ± 1	3 ± 0,5	0 ± 0	0 ± 0	9,2 ± 2	
			0 - 20 A ₁₁	5 ± 2	0 ± 0	15 ± 1	0 ± 0	40 ± 2,6	10,8 ± 0,6	11 ± 1,2	
Bas-versant		GUE G2	20 - 60 B _g	5 ± 1	0 ± 0	7 ± 0,3	0 ± 0	39 ± 4	7,5 ± 0,5	8 ± 0,1	
			Bas-fond	GUE G1	0 - 20 A ₁₁	9 ± 0,3	0 ± 0	50 ± 5	2 ± 1	28 ± 3	15,5 ± 0,5

Tableau 3. 10 : Analyse élémentaire des horizons de sols de Côte d'Ivoire échantillonnés le long d'une toposéquence sur les deux sites d'étude. Eléments totaux extraits par fusion alcaline. Pf : Perte au feu. Soufre (S) total par combustion sèche. NA : Non Analysé ; Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz.

Sites d'étude	Positionnement	Profondeur (cm)	Eléments totaux (%)											S _{total} (mg.kg ⁻¹ sol sec)
			SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO ₂	CaO	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅	Pf		
Gagnoa	Sommet	GAG C1	0 - 20 A ₁	35,1	28,9	11,9	0,0	0,1	0,1	0,4	0,2	0,4	20,8	268,0
			20 - 60 B ₂	34,9	36,1	15,1	0,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	11,0	172,0
			60 - 100 BC	28,7	40,6	21,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	8,2	243,0
			100 -120 C	20,1	45,8	25,2	0,0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	6,8	386,0
	Mi- versant	GAG C5	0 - 20 A ₁	49,0	14,7	7,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	20,2	NA
			20 - 60 B ₂	37,2	28,5	11,9	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	16,9	NA
			60 - 100 BC	38,6	33,6	14,4	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	9,0	NA
	Bas- versant	GAG C6	0 - 40 A ₁₁	43,3	11,5	2,5	0,0	0,1	0,0	0,1	0,2	0,1	29,7	169,0
			40 - 60 B _g	56,4	7,1	1,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,2	0,1	19,9	57,9
	Bas- fond	F1	0 - 20 A ₁₁	51,9	28,4	6,7	0,0	0,1	0,0	0,2	0,4	0,1	10,9	183,0
Guéssihio	Sommet	GUE G6	0 - 20 A ₁	45,0	28,4	12,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	12,0	231,0
			20 - 40 B ₂	26,5	43,5	18,5	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	8,0	193,0
			40 - 120 BC	17,8	48,2	20,3	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	8,9	322,0
	Mi-versant	GUE G4	0 - 20 A ₁	35,8	25,5	11,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	24,9	303,0
			20 - 40 B ₂	32,4	27,6	14,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	14,9	213,0
			40 - 80 BC	26,7	35,5	19,5	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	10,0	239,0
			80 -100 C	22,5	41,1	23,2	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	10,5	456,0
	Bas-versant	GUE G2	0 - 20 A ₁₁	57,5	8,4	1,5	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3	0,1	25,6	94,0
			20 - 60 B _g	49,6	5,5	0,8	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	29,4	56,6
	Bas-fond	GUE G1	0 - 20 A ₁₁	33,7	33,0	9,1	0,0	0,3	0,1	0,2	0,3	0,1	21,5	973,0

3.3.1.4 Différentes formes du fer

Les teneurs en fer des sols présentent des variations qu'il faut souligner. Elles révèlent un gradient de teneurs décroissantes des sommets (Fe_{total} de 11 à 25 % en Fe_2O_3) au bas des versants (Fe_{total} de 1 à 2,5 % en Fe_2O_3) avec, dans les profils, des teneurs croissantes de la surface (Fe_{total} de 7 à 12 % en Fe_2O_3) à la base du profil (Fe_{total} de 14 à 25 % en Fe_2O_3) pour le sommet et le mi-versant de la toposéquence. Pour le bas de versant, les teneurs en fer sont décroissantes de la surface (Fe_{total} de 1,5 à 2,5 % en Fe_2O_3) à la base (Fe_{total} de 0,8 à 1,2 % en Fe_2O_3) du profil (*Tableau 3.10*).

La forme du fer dominante dans les profils de sol des sommets et mi versant des toposéquences est représentée par la fraction extractible au Citrate Bicarbonate Dithionite (CBD), c'est-à-dire correspondant à des oxydes bien cristallisés. Une forte rupture de teneurs apparaît avec les profils de bas de versant et de bas fond où ces formes du fer passent de 40 à 83 g. kg^{-1} de sol à des valeurs d'environ 1g. kg^{-1} (*Tableau 3.11*). Pour ces sols, on constate aussi une perte importante de ces formes du fer dans les horizons de surface.

Le second compartiment fer, le plus important, est constitué par du fer extractible au pyrophosphate (c'est-à-dire au fer lié à la matière organique (MO) (de 2,6 à 12 g. kg^{-1} sol sec), dont les teneurs diminuent aussi fortement dans les sols de bas de versant (0,6 à 1,2 g. kg^{-1} sol sec), et réaugmentent sensiblement dans les sols de bas fond (2,2 à 12 g kg^{-1} sol sec). Le compartiment de ces formes de fer est voisin de celui du compartiment fer CBD, sauf dans le bas fond.

On peut donc souligner une mobilisation et une forte perte, avec une exportation du fer au détriment des oxyhydroxydes bien cristallisés et des formes organo-minérales présentes dans les horizons superficiels des sols des sommets et mi-versant des toposéquences, ainsi que des pertes et exportations très fortes des profils des sols de bas de versant et des bas-fonds.

Les autres formes du fer (Fe_{Tamm} et Fe_{Acido}) sont présentes en plus faibles quantités (*Tableau 3.11*). Les teneurs en Fe_{Tamm} diminuent du sommet à la base de la toposéquence (1,2 à 0,072 g. kg^{-1} sol sec) et de la surface à la profondeur dans les sols du sommet (1,2 à 0,7 g. kg^{-1} sol sec). Elles augmentent de la surface à la profondeur dans les profils de mi-versant (0,5 à 1 g. kg^{-1} sol sec) et diminuent (0,5 à 0,07 g. kg^{-1} sol sec) dans ceux de bas de versant. Á la diminution des teneurs en Fe_{Tamm} correspondent des augmentations de teneurs en Fe_{CBD} (*Tableau 3.11*), indiquant l'altération des oxyhydroxydes et le passage à des formes bien cristallisées du fer.

Les formes du fer acido solubles présentent les teneurs les plus élevées dans les sols de bas de versant et de bas fond. Elles sont particulièrement élevées dans les sols de bas fond (2,3 à 10,5 g. kg^{-1} sol sec), montrant la forte disponibilité du fer dans ces situations hydromorphes. Le fer est sans doute en grande partie ferreux et "adsorbé" sur les constituants minéraux ou organo-minéraux des sols.

Les teneurs en aluminium sont sensiblement supérieures à celles du fer et varient de façon semblable (*Tableau 3.10*). Elles diminuent du sommet à la base des toposéquences (Al_{Total} 48 à 8% en Al_2O_3) et augmentent de la surface à la base du profil pour les sols de sommet (Al_{Total} 28 à 48 % en Al_2O_3) et de mi-versant (Al_{Total} 14 à 41 % en Al_2O_3). Ces teneurs augmentent et sont relativement élevées dans les sols de bas-fond (Al_{Total} 28 à 33 % en Al_2O_3) par rapport aux sols de bas de versant où elles diminuent de la surface à la profondeur du profil (Al_{Total} 11,5 à 5,5 % en Al_2O_3).

Les formes extractibles de l'aluminium présentent les plus fortes teneurs dans la fraction CBD, puis pyrophosphate (*Tableau 3.12*), mais ne représentant qu'une très faible partie de l'aluminium total (moins de 7% de Al_{Total}). Pour les formes extractibles au réactif de Tamm (complexables et acidosolubles) et strictement acidosolubles (extraction HCl) les teneurs en aluminium sont plus faibles. Elles suivent un gradient légèrement croissant, de la surface à la profondeur du profil, pour les formes amorphes "Tamm", et décroissant de la surface à la base du profil pour les formes acidosolubles.

Pour ces deux fractions d'aluminium extractibles (Al_{Tamm} et Al_{Acido}), les teneurs diminuent aussi du sommet à la base de la toposéquence. Comme pour le fer, le gradient des teneurs paraît suivre le gradient d'altération du sommet à la base des profils d'une part, et du sommet à la base de la toposéquence d'autre part, avec une redistribution et une augmentation de teneurs des formes extractibles dans les sites de bas-fond (Al extractible 1,9 à 4,8 g. kg⁻¹ sol sec). Tout comme pour le fer, il paraît intéressant de distinguer les formes plus strictement minérales des formes organo-minérales liées à des composés humiques et fulviques extractibles.

Tableau 3.11 : Répartition des différentes formes de fer dans les horizons de sols de Côte d'Ivoire échantillonnés le long d'une toposéquence sur les deux sites. Fe_{hydro} : Fe hydrosoluble extrait à l'eau ; $Fe_{éch}$: Fe échangeable extrait par KCl (1M); Fe_{acido} : Fe acidosoluble extrait par HCl (0,5N); Fe_{Tamm} : Fe extrait par l'oxalate d'ammonium ; Fe_{CBD} : Fe extrait par le Citrate –Bicarbonate-Dithionite ; Fe_{pyro} : Fe extrait par le pyrophosphate de sodium (0,1M) ; Fe_{total} : Fe total obtenu après fusion alcaline. Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz.

Sites d'étude	Positionnement	Profondeur (cm)	Formes du Fe (g.kg ⁻¹ sol sec)								Fe libre /Fe total
			Fe _{total}	Fe libre (extractible)							
				Fe _{Hydro}	Fe _{éch}	Fe _{acido}	Fe _{Tamm}	Fe _{CBD}	Fe _{pyro}	%	
Gagnoa	Sommet	GAG C1	0 - 20 A ₁	83,0	0,1	0,0	0,6	1,2	20,0	4,1	31,3
			20 - 60 B ₂	105,4	0,1	0,0	0,4	0,9	24,9	7,5	32,1
			60 - 100 BC	146,8	0,3	0,0	0,3	0,8	35,0	9,2	31,0
			100 -120 C	176,0	0,0	0,0	0,2	0,8	49,9	4,7	31,5
	Mi- versant	GAG C5	0 - 20 A ₁	49,0	0,1	0,0	0,8	0,6	11,4	2,6	31,8
			20 - 60 B ₂	83,0	0,1	0,1	0,5	0,7	21,3	5,0	33,3
			60 - 100 BC	100,6	0,0	0,1	0,5	0,9	40,2	7,4	48,9
			0 - 40 A ₁₁	17,5	0,0	0,0	1,3	0,5	1,1	1,3	23,8
	Bas- versant	GAG C6	40 - 60 B _g	10,4	0,1	0,1	1,2	0,3	1,2	1,2	38,8
			Bas- fond	F1	0 - 20 A ₁₁	46,8	0,0	0,2	2,3	0,3	1,0
Guéssihio	Sommet	GUE G6	0 - 20 A ₁	88,7	0,1	0,0	0,8	1,0	23,1	6,2	35,2
			20 - 40 B ₂	129,4	0,5	0,0	0,5	1,0	32,4	6,6	31,6
			40 - 120 BC	142,0	0,0	0,0	0,4	1,0	33,5	7,5	29,9
	Mi-versant	GUE G4	0 - 20 A ₁	77,1	0,1	0,0	0,8	0,9	16,9	4,9	30,7
			20 - 40 B ₂	98,6	0,1	0,0	0,8	1,0	24,8	5,9	33,1
			40 - 80 BC	136,5	0,1	0,0	0,4	0,9	33,7	10,3	33,2
			80 -100 C	162,4	0,0	0,0	0,3	1,1	83,1	5,0	55,1
	Bas-versant	GUE G2	0 - 20 A ₁₁	10,1	0,0	0,1	1,3	0,3	0,9	1,3	39,0
			20 - 60 B _g	5,6	0,0	0,0	0,9	0,1	0,5	0,6	38,2
	Bas-fond	GUE G1	0 - 20 A ₁₁	63,7	0,0	0,3	10,5	4,7	1,2	12,0	45,0

Chapitre 3 :

Propriétés des sols de rizières et de leurs solutions

Tableau 3.12 : Répartition des différentes formes d'aluminium dans les horizons de sols de Côte d'Ivoire échantillonnés le long d'une toposéquence sur les deux sites. Al_{hydro} : Al hydrosoluble extrait à l'eau ; $Al_{éch}$: Al échangeable extrait par KCl (1M); Al_{acido} : Al acidosoluble extrait par HCl (0,5N); Al_{Tamm} : Al extrait par l'oxalate d'ammonium ; Al_{CBD} : Al extrait par le Citrate –Bicarbonate-Dithionite ; Al_{pyro} : Al extrait par le pyrophosphate de sodium (0,1M) ; Al_{total} : Al total obtenu après fusion alcaline ; Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz

Sites d'étude	Positionnement	Profondeur (cm)	Différentes formes d'aluminium (g.kg ⁻¹ sol sec)								Al libre / Al total
			Al total	Al libre (extractible)							
				Al Hydro	Al éch	Al acido	Al Tamm	Al CBD	Al pyro		
Gagnoa	Sommet	GAG C1	0 - 20 A ₁	153,15	0,12	0,19	0,89	0,77	3,30	2,13	4,82
			20 - 60 B ₂	191,00	0,11	0,29	0,74	0,90	4,25	4,68	5,74
			60 - 100 BC	214,69	0,42	0,21	0,66	1,06	5,68	5,69	6,39
			100 -120 C	242,20	0,00	0,23	0,56	0,93	5,40	2,42	3,94
	Mi- versant	GAG C5	0 - 20 A ₁	77,94	0,17	0,24	0,58	0,40	1,48	1,40	5,48
			20 - 60 B ₂	150,74	0,13	0,30	0,63	0,71	2,77	3,33	5,22
			60 - 100 BC	178,12	0,00	0,37	0,87	1,07	4,65	5,46	6,97
	Bas- versant	GAG C6	0 - 40 A ₁₁	60,98	0,04	0,23	0,38	0,18	0,23	0,55	2,63
			40 - 60 B _g	37,50	0,26	0,22	0,39	0,18	0,20	0,68	5,14
	Bas- fond	F1	0 - 20 A ₁₁	150,29	0,07	0,24	0,43	0,21	0,25	0,70	1,27
Guéssihio	Sommet	GUE G6	0 - 20 A ₁	150,30	0,16	0,30	1,07	0,88	4,05	3,82	6,85
			20 - 40 B ₂	230,28	0,77	0,22	0,76	0,88	3,86	3,73	4,43
			40 - 120 BC	255,40	0,00	0,29	0,95	1,20	4,56	5,03	4,71
	Mi-versant	GUE G4	0 - 20 A ₁	134,76	0,20	0,23	0,81	0,74	3,44	3,14	6,35
			20 - 40 B ₂	146,02	0,18	0,27	0,94	0,83	3,80	3,98	6,85
			40 - 80 BC	187,72	0,10	0,33	0,96	1,33	5,40	8,38	8,79
			80 -100 C	217,56	0,00	0,33	0,74	1,12	7,89	2,84	5,94
	Bas-versant	GUE G2	0 - 20 A ₁₁	44,34	0,04	0,26	0,39	0,19	0,22	0,80	4,28
			20 - 60 B _g	29,02	0,04	0,30	0,32	0,12	0,13	0,45	4,67
	Bas-fond	GUE G1	0 - 20 A ₁₁	174,63	0,03	0,38	1,31	0,86	0,49	1,77	2,77

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que, dans les sols étudiés, les quantités de fer et d'aluminium libres extraites par le réactif CBD représentent, respectivement, 2 à 51 % de la quantité de fer total (Fe_{Total}) et 0,2 à 3 % de la quantité d'aluminium total (Al_{Total}) (*Tableau 3.13 et 3.14*). Ce qui suggère qu'une partie (presque la moitié) du fer présent dans ces sols est sous forme d'oxydes et hydroxydes. Dans ces sols, le réactif CBD a extrait plus de fer, et parfois plus d'aluminium, que l'oxalate acide d'ammonium à pH 3 ou le pyrophosphate de sodium 0,1 M à pH 10 dans les horizons des sols de sommet et mi-versant des toposéquences, alors que dans les sols du bas-versant et du bas-fond c'est l'inverse qui est observé. En effet, plus de fer et d'aluminium sont extraits des sols des bas-fond par le pyrophosphate de sodium 0,1 M à pH 10 (2 à 11⁰/₀₀ pour le Fe et 0,5 à 2⁰/₀₀ pour Al) que par le réactif CBD (1 à 2⁰/₀₀ pour le Fe et 0,1 à 0,5 pour Al⁰/₀₀). Les formes cristallines du fer dominant sous forme d'oxyhydroxydes dans le sommet de la toposéquence alors que dans le bas fond, ce sont les formes amorphes ou dispersables ou organo-minérales qui sont les espèces mobilisables (libre) dominantes. Cette évolution des formes du fer et de l'aluminium correspond bien à un gradient d'altération et à la formation de phases résiduelles ou apportées, altérées et mobilisables.

Dans ces sols, le fer est aussi moins échangeable dans le sommet (moins de 10⁰/₀₀) que dans le bas fond (plus de 150⁰/₀₀).

Les formes facilement disponibles d'aluminium (Al_{Hydro} , $Al_{éch}$ et Al_{HCl}) sont plus abondantes que celle du fer. Cette présence est sans doute à liée à l'acidité des sols ($4 < pH_{eau} < 5$; $3 < pH_{KCl} < 4$). En effet, certains auteurs ont reconnu que l'aluminium échangeable n'existe que dans les sols acides (**Boyer, 1976**) et surtout fortement acides (**Segalen, 1973**). Ils considèrent aussi que d'autres facteurs peuvent influencer l'apparition de l'aluminium échangeable : la nature des argiles (les argiles de type smectite, illite et chlorite développent proportionnellement plus d'aluminium échangeable que les kaolinites pour un pH identique) et la présence de sulfures dans des sols hydromorphes, susceptibles d'entraîner par oxydation une acidification considérable.

En Côte d'Ivoire, il ya lieu de souligner qu'une grande partie (plus de 60 %) du fer de ces sols est liée sans doute à des réseaux de silicates, non extractibles et peu mobilisables par les réactifs utilisés. Plus de 90 % de l'aluminium seraient aussi associés à des silicates, contre seulement 10 % sous forme libre (extractible). Le fer présent dans les solutions de sols, et à l'origine de la toxicité ferreuse pourrait aussi provenir de l'altération des silicates et du remplacement du fer par l'aluminium (substitution isomorphique)

Ces sols des toposéquences de Côte d'Ivoire sont donc riches en fer et aluminium dont la majorité serait liée aux réseaux des silicates. Une part importante est sous forme d'oxyhydroxydes bien cristallisés, réductibles et donc mobilisables. Par ailleurs, les quantités de fer facilement mobilisables extraites, respectivement, par le pyrophosphate de sodium (Fe_{Pyro}), l'acide HCl (Fe_{HCl}) et l'oxalate

d'ammonium (Fe_{Tamm}) sont relativement abondantes dans presque tous les horizons et pourraient être à l'origine de cette forte mobilisation dans les bas-fonds.

L'analyse des différentes formes de fer montre un appauvrissement en fer des sols du bas versant dû à un engorgement et à un enrichissement en fer des sols du bas-fond, essentiellement sous forme acidosoluble et associé aux matières organiques provenant des sols amonts, et fixé sans doute par la matière organique.

L'étude de la répartition des différentes formes du fer suggère qu'il existe deux types de nappes : l'une superficielle et temporaire, engendrant des effets d'oxydo-réduction ménagés dans les sols de sommet et mi-pente, et l'autre, permanente, fluctuant au rythme des saisons, provoquant une oxydo-réduction plus drastique dans les sols de bas de versant et les bas-fonds.

Tableau 3.13 : Rapports entre des différentes formes du fer. Fe_{Tamm} : fer extrait par l'oxalate d'ammonium ; Fe_{CBD} : fer extrait par le Citrate –Bicarbonate-Dithionite ; Fe_{Pyro} : fer extrait par le pyrophosphate de sodium (0,1M) ; Fe_{total} : fer total obtenu après fusion alcaline. Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz

				Rapport des différentes formes de fer				
Sites d'étude	Positionnement		Profondeur (cm)	%				
				Fe _{CBD} / Fe _{total}	Fe _{Tamm} / Fe _{total}	Fe _{Pyro} / Fe _{total}	Fe _{Tamm} / Fe _{CBD}	Fe _{Pyro} / Fe _{Tamm}
Gagnoa	Sommet	GAG C1	0 - 20 A ₁	24,1	1,5	4,9	0,1	3,3
			20 - 60 B ₂	23,6	0,9	7,2	0,0	7,9
			60 - 100 BC	23,8	0,6	6,3	0,0	10,8
			100 -120 C	28,3	0,4	2,6	0,0	6,2
	Mi- versant	GAG C5	0 - 20 A ₁	23,4	1,2	5,3	0,0	4,6
			20 - 60 B ₂	25,7	0,9	6,0	0,0	6,9
			60 - 100 BC	40,0	0,9	7,4	0,0	7,9
	Bas- versant	GAG C6	0 - 40 A ₁₁	6,2	2,8	7,2	0,5	2,6
			40 - 60 B _g	11,9	2,7	11,1	0,2	4,1
	Bas- fond	F1	0 - 20 A ₁₁	2,2	0,6	4,7	0,3	7,2
Guéssihio	Sommet	GUE G6	0 - 20 A ₁	26,0	1,2	6,9	0,0	6,0
			20 - 40 B ₂	25,0	0,8	5,1	0,0	6,6
			40 - 120 BC	23,6	0,7	5,3	0,0	7,6
			0 - 20 A ₁	21,9	1,2	6,4	0,1	5,3
	Mi-versant	GUE G4	20 - 40 B ₂	25,2	1,0	6,0	0,0	6,1
			40 - 80 BC	24,7	0,6	7,5	0,0	11,6
			80 -100 C	51,2	0,7	3,1	0,0	4,7
			0 - 20 A ₁₁	9,2	3,1	13,2	0,3	4,3
	Bas-versant	GUE G2	20 - 60 B _g	9,0	1,3	10,8	0,1	8,3
			Bas-fond	GUE G1	0 - 20 A ₁₁	1,9	7,3	18,8

Tableau 3.14 : Rapports entre des différentes formes de l'aluminium. Al_{acido} : Al acidosoluble extrait par HCl (0,5N); Al_{Tamm} : Al extrait par l'oxalate d'ammonium ; Al_{CBD} : Al extrait par le Citrate – Bicarbonate-Dithionite ; Al_{Pyro} : Al extrait par le pyrophosphate de sodium (0,1M) ; Al_{total} : Al total obtenu après fusion alcaline. Gagnoa (GAG); Guéssihio (GUE). F1 et G1 : parcelles plantées en riz

				Rapport des différentes formes d'aluminium				
Sites d'étude	Positionnement		Profondeur (cm)	%				
				Al _{CBD} / Al _{total}	Al _{Tamm} / Al _{total}	Al _{Pyro} / Al _{total}	Al _{Tamm} / Al _{CBD}	Al _{Pyro} / Al _{Tamm}
Gagnoa	Sommet	GAG C1	0 - 20 A ₁	2,2	0,5	1,4	0,2	2,8
			20 - 60 B ₂	2,2	0,5	2,5	0,2	5,2
			60 - 100 BC	2,6	0,5	2,6	0,2	5,4
			100 -120 C	2,2	0,4	1,0	0,2	2,6
	Mi- versant	GAG C5	0 - 20 A ₁	1,9	0,5	1,8	0,3	3,5
			20 - 60 B ₂	1,8	0,5	2,2	0,3	4,7
			60 - 100 BC	2,6	0,6	3,1	0,2	5,1
	Bas- versant	GAG C6	0 - 40 A ₁₁	0,4	0,3	0,9	0,8	3,0
			40 - 60 B _g	0,5	0,5	1,8	0,9	3,7
	Bas- fond	F1	0 - 20 A ₁₁	0,2	0,1	0,5	0,8	3,3
Guéssihio	Sommet	GUE G6	0 - 20 A ₁	2,7	0,6	2,5	0,2	4,3
			20 - 40 B ₂	1,7	0,4	1,6	0,2	4,2
			40 - 120 BC	1,8	0,5	2,0	0,3	4,2
	Mi-versant	GUE G4	0 - 20 A ₁	2,5	0,6	2,3	0,2	4,2
			20 - 40 B ₂	2,6	0,6	2,7	0,2	4,8
			40 - 80 BC	2,9	0,7	4,5	0,2	6,3
			80 -100 C	3,6	0,5	1,3	0,1	2,5
	Bas-versant	GUE G2	0 - 20 A ₁₁	0,5	0,4	1,8	0,8	4,3
			20 - 60 B _g	0,5	0,4	1,5	0,9	3,7
	Bas-fond	GUE G1	0 - 20 A ₁₁	0,3	0,5	1,0	1,8	2,0

3.3.1.5 Analyse minéralogique

L'analyse minéralogique qualitative et semi quantitative a été réalisée au microscope électronique à transmission (MET), associé à un spectromètre d'émission sur la fraction < 2 mm finement broyée. Cette fraction apparait homogène et semble constituer deux phases (*Planche 3.1 à 3.3*) : une phase argileuse dominée par la kaolinite (*Clichés 1 et 7*) et une phase composés d'oxydes de fer (hématite et goethite), d'aluminium (*clichés 4 et 5*) et de titane (*Cliché 2 et 6*), de la muscovite (*Spectre 8*) et du quartz (*cliché 5*).

Au microscope électronique à transmission (*Clichés 1 et 7*), seules des images d'amas de fins granules d'hématite ou de baguettes de goethite apparaissent associées aux particules argileuses (kaolinite). En

fait, quand il y a association entre ces deux constituants les images sont opaques et difficiles à observer.

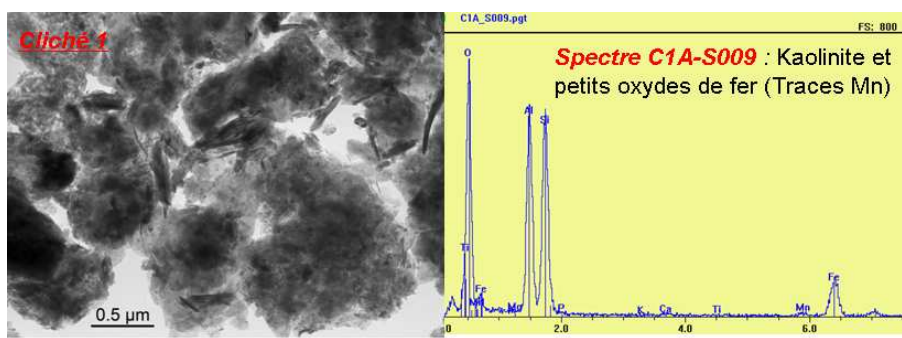
Les observations au MET montrent que la kaolinite en forme hexagonale renferme des oxydes de fer qui se présentent sous deux morphologies : en granules et en baguettes (*Cliché 1*). Egalement les oxydes de fer (goethite) sont associés à l'aluminium (*Clichés 5*).

Les résultats de la microanalyse (*Tableau 3.15*) confirment la présence de ces différents minéraux observés au microscope. La kaolinite reste dominante dans tous les sols et est dans l'ensemble (en particulier dans le bas fond) ferrique. On observe la présence d'oxydes de titane dans les sols du sommet (C1) et de mi- versant (C5).

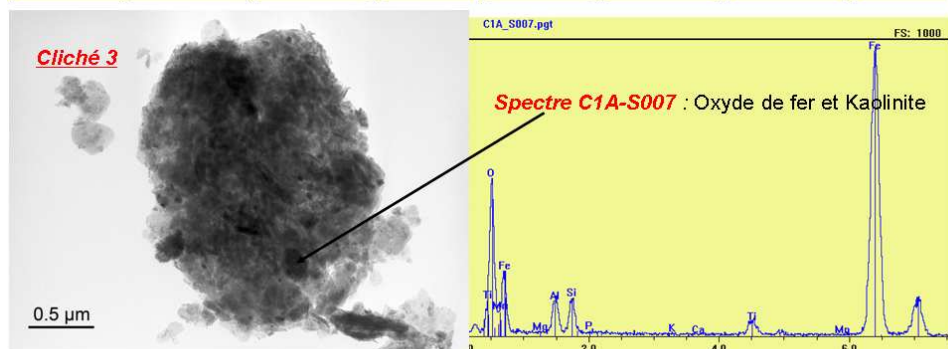
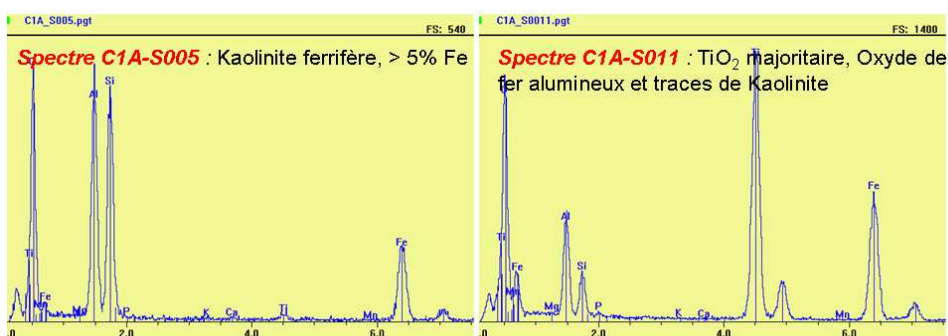
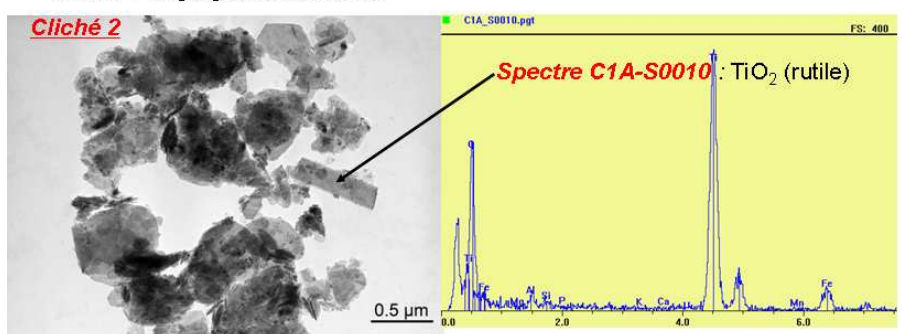
Les observations par Diffraction de Rayons X (DRX) confirment :

- dans les sols du sommet : la présence de quartz, de kaolinite, de goethite, de maghémite ;
- dans les sols de mi et du bas versant, la présence de kaolinite, d'illite, de quartz, d'albite, de nacrite, de rutil, de cristobalite et de goethite ;
- dans le bas-fond, la présence de rutil, de quartz, de nacrite, de kaolinite et de goethite.

Planche 3.1 : Observation (MET) et analyse spectroscopique (EDS) des échantillons de sol du sommet (C1)



Cliché 1 : Agrégat de kaolinites



Cliché 3 : Agrégat de kaolinite et oxydes de fer

Planche 3.2 : Observation (MET) et analyse spectroscopique (EDS) des échantillons de sol étudiés :
Mi- versant (C5)

Mi-pente de la toposéquence

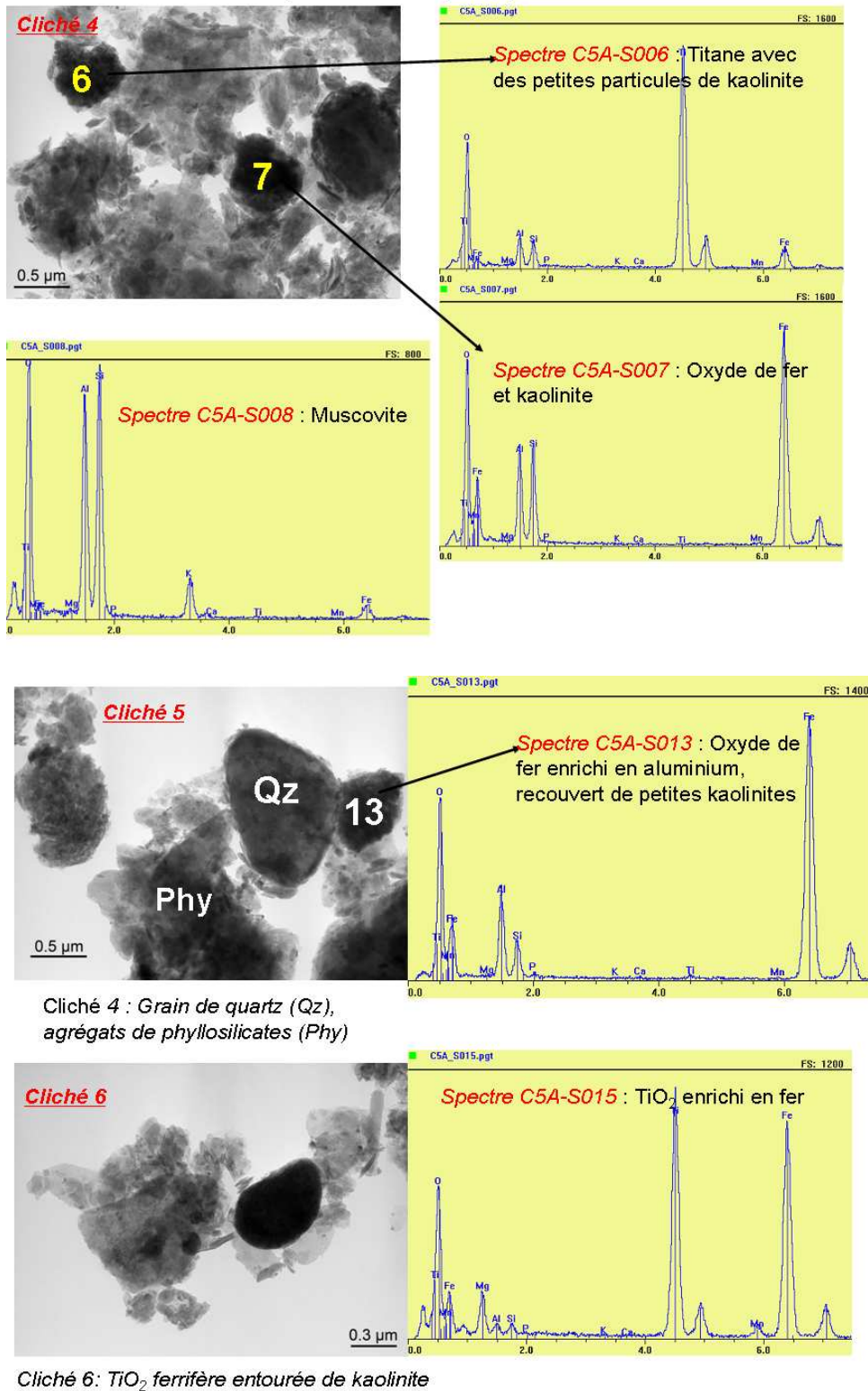


Planche 3.3 : Observation (MET) et analyse spectroscopique (EDS) des échantillons de sol de bas-fond (F1,G1)

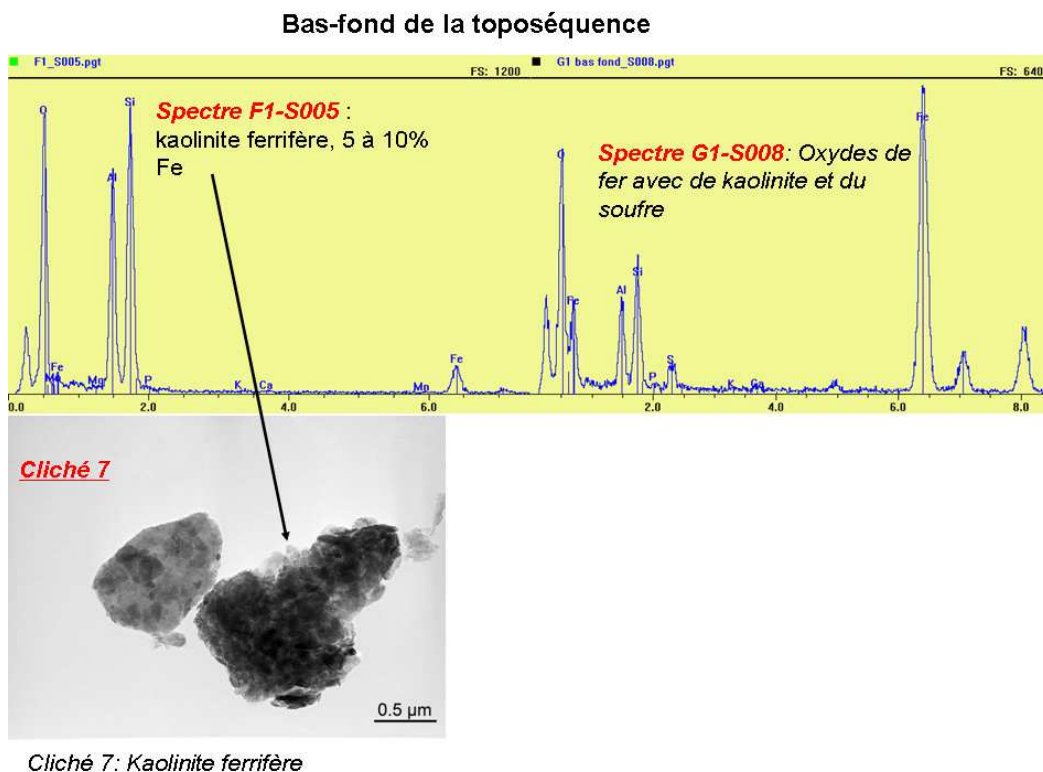


Tableau 3.15 : Microanalyse MET. Composition élémentaire (% Atomique)

Eléments	Sommet					Mi-versant					Bas-Fond	
	Spectre C1A-005	Spectre C1A-007	Spectre C1A-009	Spectre C1A-010	Spectre C1A-011	Spectre C5A-006	Spectre C5A-007	Spectre C5A-008	Spectre C5A-013	Spectre C5A-015	Spectre F1-S005	Spectre G1-S008
O	58,0	55,1	63,0	69,5	62,9	63,2	59,4	62,0	58,5	50,6	65,4	61
Al	18,3	4,2	17,0	1,0	7,4	4,0	9,5	16,0	9,1	0,7	14,3	6,4
Si	17,7	4,0	17,0	0,5	3,0	3,0	9,6	18,0	4,0	0,7	18,4	8,4
Fe	6,0	35,2	3,0	2,0	9,0	2,8	21,4	1,0	28,4	21,0	2,0	22,2
Ti		1,5		27,0	17,7	27,0				20,8		
Mn										0,9		
Mg										5,2		
S												2
K												

3.3.2 Solutions de sols

Les analyses effectuées sur les échantillons d'eaux de rizières de Côte d'Ivoire, prélevées, respectivement, dans la source principale (SP), le canal principal (CP), le casier planté en riz (Cp) et dans le casier non planté en riz (Cnp), montrent des teneurs importantes en cations majeurs (Figure

3.6) aux différents points de prélèvements, avec des teneurs plus élevées en silicium et en sodium dues aux phénomènes d'altération aboutissant à la solubilisation des éléments. On observe aussi des teneurs élevées en fer (jusqu'à 10mg.l^{-1}) dans les eaux, avec une plus forte solubilisation dans les casiers rizicoles (Cp) à Guéssihio et dans la source principale (SP) à Gagnoa. La solubilisation de cet élément peut être liée d'une part, à l'engorgement permanent des rizières, qui crée des conditions réductrices favorables et, d'autre part, à des phénomènes de transferts et d'altération. Il y a donc une mobilisation et une dissolution active du fer dans les casiers rizicoles, surtout sur le site de Guéssihio où la quantité de fer est plus importante ($0,13\text{mmol.l}^{-1}$) dans les casiers plantés (Cp).

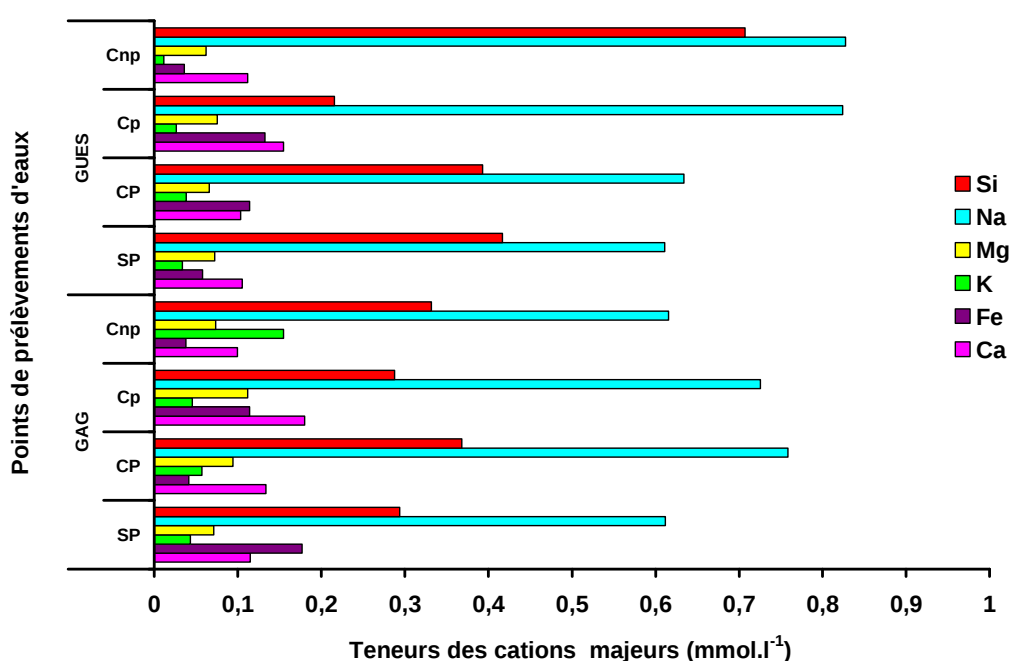


Figure 3.6 : Teneurs en cations majeurs (mmol.l^{-1}) des eaux prélevées aux différents points : Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp) sur les sites de Gagnoa (GAG) et de Guéssihio (GUES)

Les teneurs en anions sont généralement faibles (Figure 3.7) mais dominées par le chlore et le sulfate. On constate l'absence du nitrate dans les casiers rizicoles (Cp), ce qui traduit les conditions anoxiques du milieu.

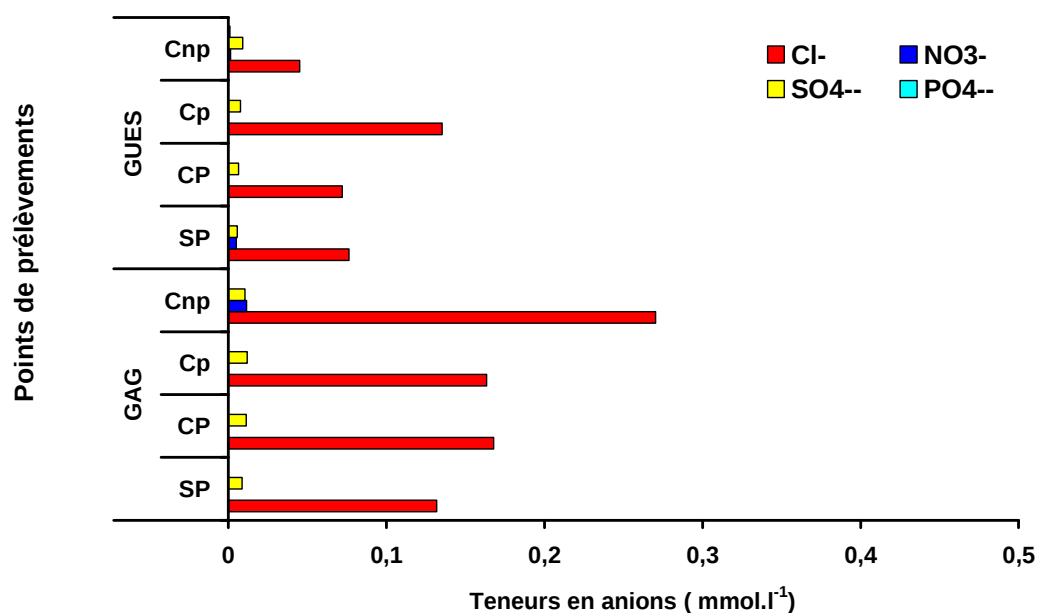


Figure 3.7: Teneurs en anions majeurs (mmol.l⁻¹) des eaux prélevées aux différents: Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp) sur les sites de Gagnoa (GAG) et de Guéssihio (GUES)

L'analyse du carbone organique dissout (COD) montre d'importantes teneurs dans les différents points de prélèvements, avec des teneurs plus fortes dans les casiers rizicoles (Cp) où elles atteignent environ 25 mg.l⁻¹ de COD (Figure 3.8).

Le dosage des anions organiques présents dans ces eaux révèle la présence de divers acides (gluconique, acétique, oxalique, formique) dont la teneur est inférieure à 2 mg.l⁻¹. La présence de COD et d'acides organiques suggère des activités microbiennes à l'origine de la production de ces composés. Les sols rizicoles présentent donc des conditions énergétiques et nutritionnelles favorables à l'activité bactérienne.

Il apparaît que les anions majoritairement impliqués dans la mobilisation des éléments minéraux seraient des composés organiques.

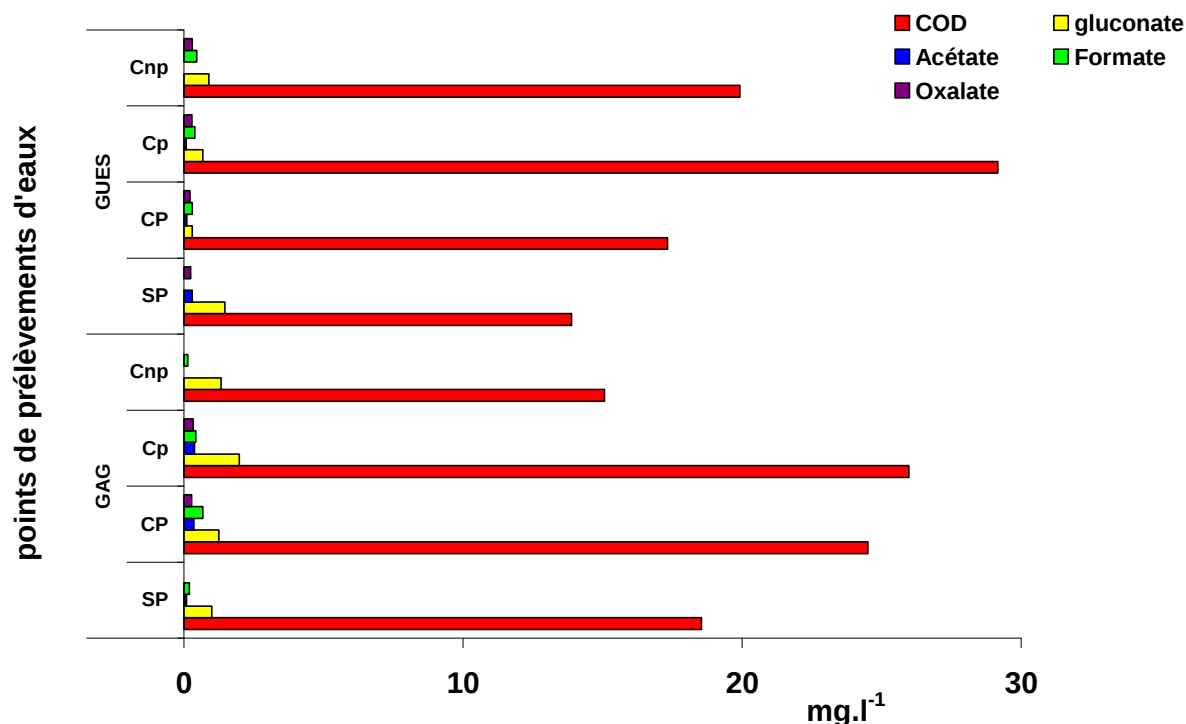


Figure 3.8: Teneurs (mg.l^{-1}) des différents acides organiques et du carbone organique dissout (COD) des eaux prélevées aux différents points : Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp) sur les sites de Gagnoa (GAG) et de Guéssihio (GUES)

Une autre série d'analyses effectuée sur le terrain concerne la caractérisation d'un nombre plus limité de paramètres chimiques (pH , Fe^{2+} , NH_4^+ , Mn^{2+} , SO_4^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-}) des eaux durant la grande saison sèche (novembre 2007 à mars 2008) et la grande saison de pluies (mars à juillet 2008). Des mesures mensuelles ont été effectuées sur le terrain dans les différents points de prélèvement cités ci-dessus, grâce aux différents kits d'analyses utilisés.

Sur les deux sites, les eaux sont riches en sulfates et en ions ferreux (Figure 3.9 et 3.10). La teneur en sulfates décroît dans l'ensemble en saison sèche et croît en saison des pluies. Il en est de même pour l'ion ferreux qui présente un comportement voisin. La solubilisation des sulfates est corrélée positivement à celle du fer (Figure 3.11.)

Les pH des eaux indiquent une légère acidité ($6 < \text{pH} < 7$) et sont assez stables quels que soit les points de prélèvements. Une légère acidification se manifeste pendant la saison sèche.

On note l'absence de nitrates, de phosphates et de manganèse dans les eaux. La présence d'ammonium (NH_4^+), plus importante pendant la saison des pluies, décroissant pendant la saison sèche, ainsi que l'absence de nitrate décelable, suggère des conditions réductrices dues à l'engorgement des sols.

Dans l'ensemble, les éléments dosés évoluent de la même manière dans les différentes zones de prélèvements. Mais, en comparant les deux sites, une plus forte solubilisation d'éléments se manifeste à Guéssihio qu'à Gagnoa.

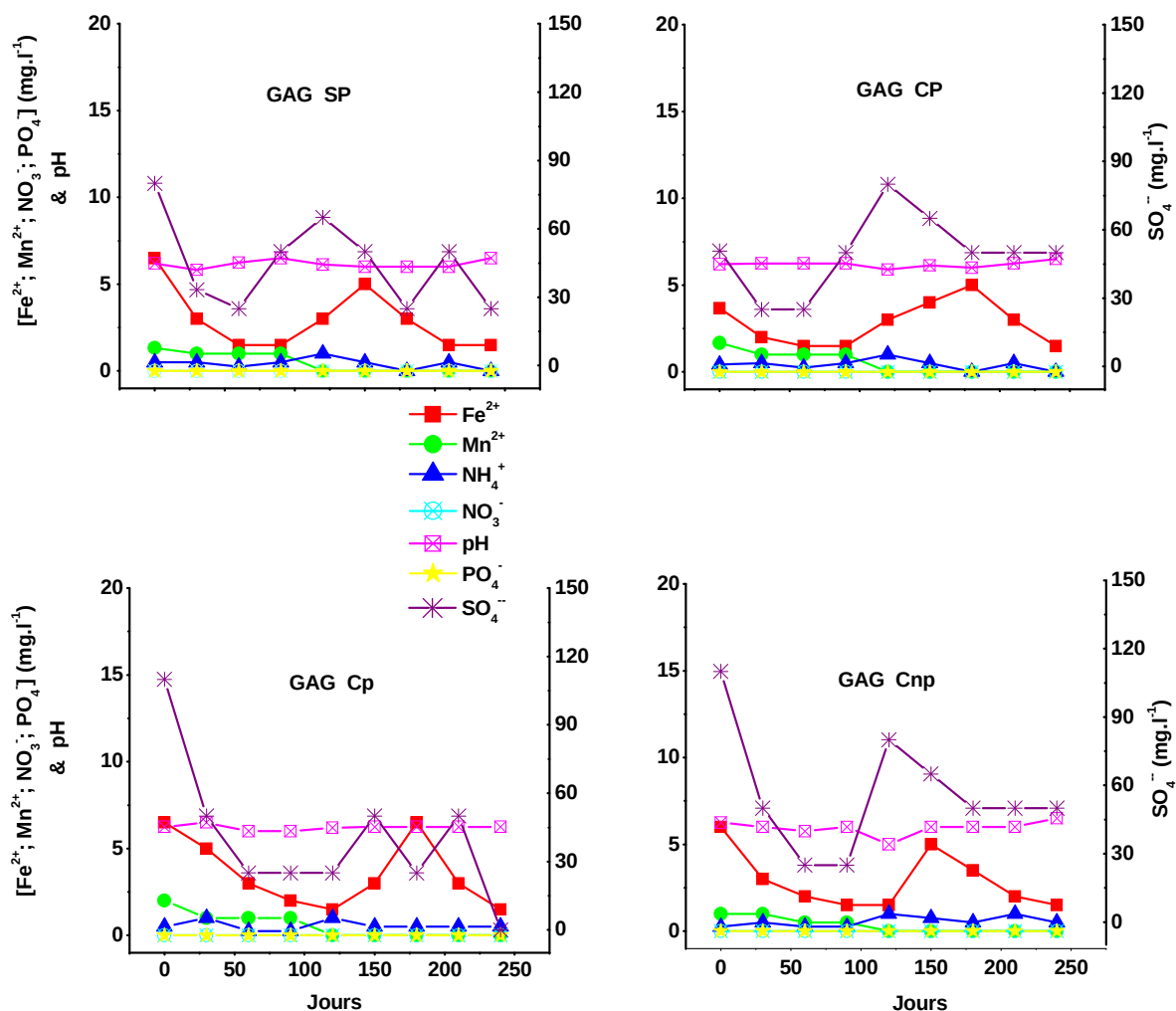


Figure 3.9: Evolution des teneurs en éléments majeurs (mg.l⁻¹) des eaux prélevées aux différents points : Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp) durant la grande saison sèche (0 (novembre 2007) à 120 (mars 2008) jours) et la grande saison de pluies (120 (mars) à 240 (juillet 2008) jours) sur le site de Gagnoa (GAG)

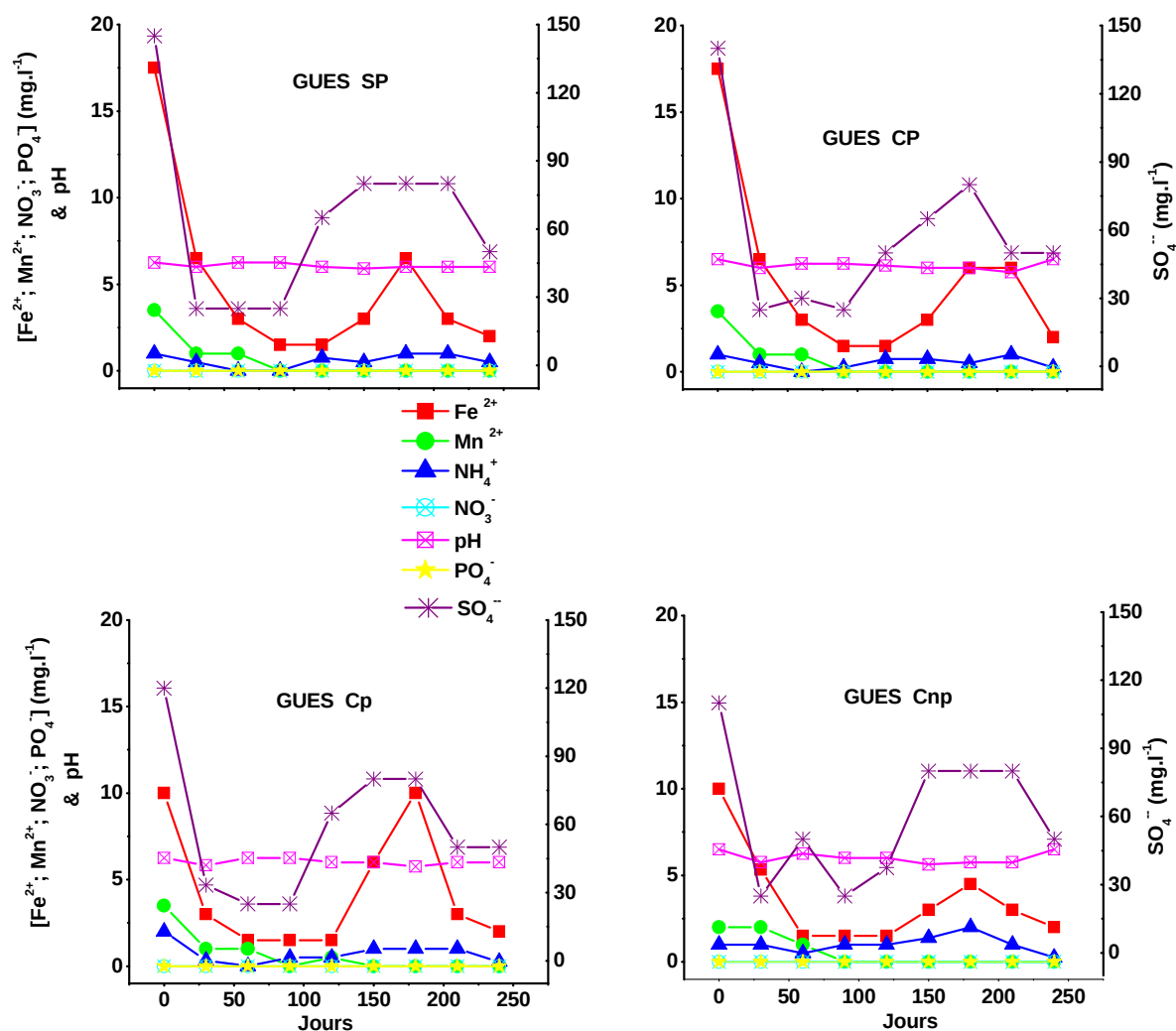


Figure 3.10: Evolution des teneurs en éléments majeurs (mg.l⁻¹) des eaux prélevées aux différents points: Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp) durant la grande saison sèche (0 (novembre 2007) à 120 (mars 2008) jours) et la grande saison de pluies (120 (mars) à 240 (juillet 2008) jours) sur le site de Guéssihio (GUES)

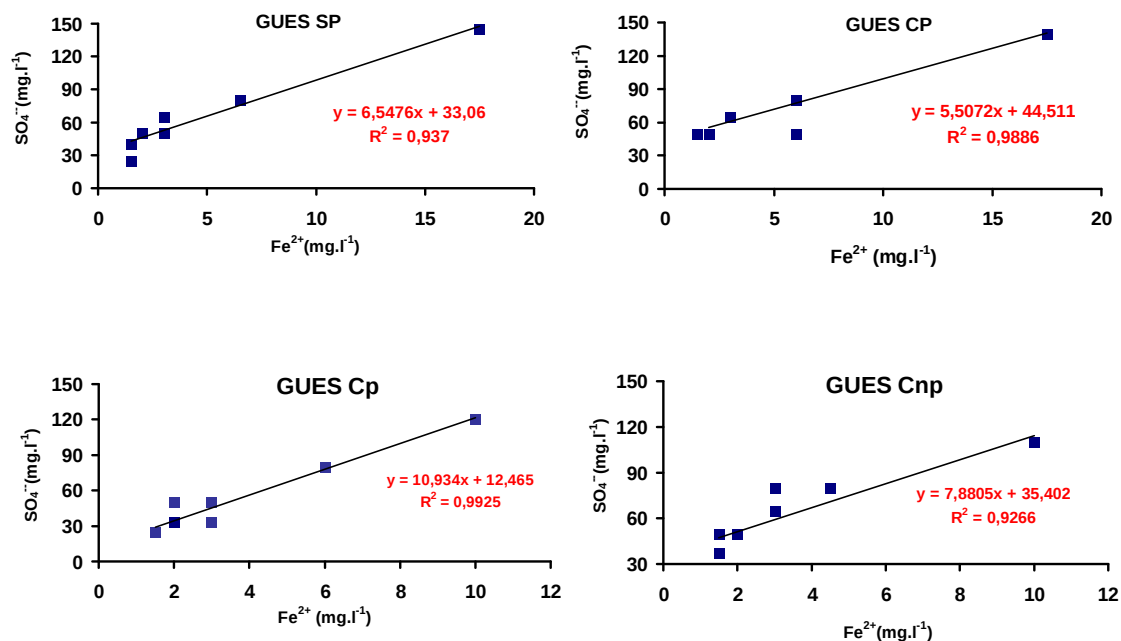


Figure 3.11: Analyse corrélative linéaire entre le fer ferreux et le sulfate en (mg.l⁻¹) des eaux prélevées à Guéssihio (GUES) aux différents points de prélèvement (Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp). Matrice de corrélation de Pearson à $p < 5\%$ et $n=7$.

3.4 Discussion

La caractérisation physico-chimique des sols et eaux de rizières de **Thaïlande** a montré des sols riches en silice (plus de 75%) avec des faibles teneurs en fer, mais plus fortes dans la parcelle amendée (L25) que dans la parcelle non amendée (L14). La distribution des différentes formes de fer révèle qu'une grande partie du fer de ces sols n'est pas associée aux réseaux des silicates, et se retrouve sous forme dite libre, dont une grande partie est sous forme organo-minérale, et aussi sous forme d'oxydes de fer bien cristallisés. Les différents résultats indiquent que ces sols renferment une fraction de fer mobilisable très importante, qui est facilement réductible par les microorganismes.

La faible teneur en fer observée dans les sols de bas-versant en **Côte d'Ivoire** correspond à la présence de conditions d'hydromorphie entraînant une déferrification des sols, qui conduit à leur blanchissement et leur gleyification, comme l'a montré la description des horizons du sol. L'aluminium, deuxième élément le plus abondant de ces sols après la silice, a une évolution des

teneurs similaires à celle du fer. La quantité croissante de la silice du sommet de la toposéquence vers le bas-fond est due à une forte lixiviation des sols, à une exportation importante des éléments (Fe, Al,...) et un enrichissement relatif en sables (quartz) et en kaolinite.

On constate de très fortes teneurs en soufre dans les bas-fonds, variant de 183 à 973 mg.kg⁻¹ sol sec, et suggérant une accumulation en conditions hydromorphes probablement sous forme de sulfures. Il ressort de ces résultats que ces sols sont silico-alumineux, relativement riches en fer et en matières organiques (M.O.) et pauvres en bases.

La forte teneur en aluminium des sols et, des phases hydrosolubles peut aussi être l'une des raisons de leur acidité. Cet élément (l'aluminium) représente en effet une source d'acidité potentielle considérable lorsqu'il est présent dans la solution du sol. Il peut également jouer le rôle de tampon acide en s'opposant à toute hausse du pH, tant qu'il n'est pas complètement éliminé du complexe absorbant. Par contre, il peut être aisément déplacé par les cations alcalino-terreux (calcium) ou substitué par le fer III. Mais, la faible teneur en calcium par rapport au fer pourrait laisser jouer un rôle majeur à cet élément. Le remplacement de l'aluminium par le fer peut être une des raisons, en complément de sa réduction et sa solubilisation par des bactéries ferri-réductrices, de la forte teneur en Fe²⁺ des solutions de sol responsable de la toxicité ferreuse.

La caractérisation des différentes formes du fer montre une mobilisation du fer, avec exportation du fer des horizons de surface au sommet et à mi-versant de la toposéquence ; une immobilisation et une accumulation dans les horizons plus profonds en bas de versant. Un gradient général d'exportation se manifeste du sommet au bas des versants. En revanche, on note une accumulation relative du fer dans le bas-fond, par rapport au profil de bas de versant, probablement liée aux conditions très réductrices. L'aluminium présente une répartition, dans les toposéquences et dans les profils, semblable à celle du fer.

La faible teneur en fer total dans les sols du bas du versant par rapport à ceux du bas-fond est sans doute liée aux conditions permanentes d'engorgement, qui favorisent la réduction et la mobilisation du fer ainsi que son exportation et sa redistribution.

L'aluminium peut être associé aux oxyhydroxydes de fer et aux formes organo-minérales ou dispersables du fer (**Andreux & Munier-Lamy, 1994**).

La présence d'ammonium et d'acides organiques, l'absence de nitrate et les fortes teneurs en matières organiques et en Fe²⁺ dans les solutions des sols, et en particulier dans les bas-fonds, révèlent des phénomènes de respiration anaérobie et de fermentations impliqués dans la mobilisation du fer, en parallèle à la biodégradation des matières organiques. Dans ces sols, il apparaît que des activités

bactériennes pourraient être impliquées dans la production de sulfate dont la solubilisation serait associée à celle du fer.

3.5 Conclusion

La caractérisation des eaux de rizières de Thaïlande et de Côte d'Ivoire montre des teneurs en Fe^{2+} relativement importantes. **En Thaïlande**, l'analyse de la solution des sols, faite par l'équipe de l'IRD, en collaboration avec le LDD, montre de fortes teneurs en Fe^{2+} et indique une réduction de fer plus forte dans la parcelle amendée (L25) par rapport à la parcelle non amendée (L14), avec des quantités plus élevées dans la zone non saline (NS).

L'analyse des eaux de rizières et solutions de sols de **Côte d'Ivoire** montrent une mobilisation et une dissolution active du fer qui est hautement corrélée à la solubilisation des sulfates. Cette forte mobilisation du fer est associée à l'acidité des sols indiquée par le pH, mais aussi à la réduction bactérienne du fer, à l'altération des oxyhydroxydes bien cristallisés et des formes organo-minérales observées dans les horizons superficiels des sols des sommets et mi versant des toposéquences, ainsi que dans les profils de sols des bas-fonds.

Deux types de nappes, l'une superficielle et temporaire engendrant des réductions liées à la saison des pluies, plus ponctuelles et limitées dans le temps, l'autre permanente, mais fluctuante dans les rizières en fonction des pratiques culturales, provoquant une réduction plus drastique, sont à l'origine de l'appauvrissement en fer des sols, très fortes en bas versant et à l'enrichissement en fer des sols du bas fond, essentiellement sous les formes acidosolubles et organo-minérales.

La détermination de caractéristiques des sols de Côte d'Ivoire montre des sols silico-alumineux relativement riches en fer, très acides et riches en matières organiques, surtout dans les bas-fonds où les teneurs en MO des horizons de surface atteignent 15 %. Ce qui indique une accumulation et un apport important, avec une minéralisation relativement faible ; et ceci, malgré un rapport C/N compris entre 10 et 15, suggérant une bonne biodégradabilité potentielle. Par contre, ceux de Thaïlande sont pauvres en M.O. et contiennent de faibles teneurs en fer.

L'étude des différentes formes de fer révèle qu'une grande partie du fer des sols de **Thaïlande** est sous forme organo-minérale, facilement mobilisable par les microorganismes, et aussi sous forme d'oxydes de fer bien cristallisés, fraction réductibles. En revanche, les sols de **Côte d'Ivoire**, sont riches en oxyhydroxydes de fer et d'aluminium dont la majorité est liée aux réseaux des silicates qui constituent une fraction non extractible et peu mobilisable. Les formes dites libres sont essentiellement sous forme bien cristallisée, moins mobilisable sur les sommets des toposéquences. En revanche, les formes

mobilisables (acido solubles), extractibles au réactif de Tamm, associées aux M.O., deviennent importantes, voire dominantes, dans les sols de bas de versant et de bas-fonds. On note ainsi un gradient d'altération et d'évolution des formes du fer.

La présence de carbone organique dissout (COD) et des divers acides organiques crée des conditions énergétiques et nutritionnelles favorables à l'activité bactérienne. La richesse des sols en matière organique, les fortes teneurs en COD et la présence de quantités importantes de fer réductibles et facilement mobilisables sont favorables à de fortes activités bactériennes ferri-réductrices. Ces activités sont fortement suggérées par les fortes teneurs en Fe^{2+} en solution et par la présence d'acides organiques d'origine fermentaire.

Le remplacement du fer par l'aluminium peut aussi être une des raisons, en complément de sa réduction et sa solubilisation par des bactéries ferri-réductrices, de la forte teneur en Fe^{2+} des solutions et de la toxicité ferreuse.

DEUXIEME PARTIE :

Etudes des communautés bactériennes impliquées

Chapitre 4 : Etude des activités ferri-réductrices des sols de rizières de Thaïlande

Chapitre 5 : Etude des activités ferri-réductrices des sols de rizières de Côte d'Ivoire

Chapitre 6 : Réduction bactérienne du fer et biodégradation des matières organiques du sol

Chapitre 4 : Communautés cultivables, activités ferri- réductrices et identification de populations bactériennes impliquées dans des sols de rizières affectés par la salinité (Thaïlande)

4.1. Introduction

Dans le Nord-Est de la Thaïlande, les pratiques culturales (déforestation des collines, cultures vivrières et industrielles) et le contexte géologique régional (évacuaires sous-jacentes) affectent directement la qualité des terres cultivables en bas-fond comme les sols de rizières. La présence de sel peut modifier la fertilité des sols et leur productivité (**Munns, 2002; Saied et al., 2005**).

Pour la plupart des espèces végétales, la présence de sel empêche l'élongation des feuilles et des racines, réduit la photosynthèse et limite également la production des hydrates de carbone. Mais, chaque espèce végétale a une réponse différente vis à vis de la salinité. Le riz est la seule espèce végétale modérément sensible à la salinité (**Yeo & Flowers, 1985; Lutts et al., 1996**) grâce à sa tolérance aux conditions hydromorphes.

Dans ces sols hydromorphes affectés par la salinité, les paysans apportent des amendements organiques sous forme d'excréments d'animaux et de résidus de végétaux. Environ 2,4 T. ha⁻¹ et par an de matières fraîches (**Quantin et al., 2008**) sont ainsi apportés dans le but d'améliorer la fertilité de ces sols pauvres en M.O. (environ 0,6 %) et acides (pH<6) et d'accroître la production du riz. Ces amendements organiques modifient les conditions du milieu (pH, Eh) en diminuant fortement le potentiel d'oxydo-réduction.

La caractérisation physico-chimique des eaux et des sols de ces rizières (**Grünberger et al., 2003; Quantin et al., 2008**) a montré que les parcelles recevant les amendements organiques présentent des conditions réductrices plus "fortes", avec une importante libération du fer ferreux soluble (Fe²⁺) et une meilleure production du riz sans observer de toxicité ferreuse.

Ces résultats ont conduit à envisager que l'activité bactérienne ferri-réductrice pouvait être un paramètre et un indicateur majeur de la qualité des sols et des eaux de rizières. Pour préciser le rôle des communautés bactériennes et des facteurs (apport de matières organiques, rhizosphère ou salinité), qui peuvent contrôler ces processus, diverses approches ont été mises en œuvre.

L'impact des différents facteurs tels que la salinité, l'apport ou non d'amendements organiques, la rhizosphère du riz sur la prolifération des bactéries cultivables, la présence et l'activité de communautés (consortia) IRB isolés ont été abordés et rapportés dans l'article ci-joint (**Bongoua et al., soumis a**). L'expérimentation s'appuyant d'une part, sur le dénombrement de communautés bactériennes cultivables et, d'autre part, sur l'étude des activités ferri réductrices des consortia bactériens isolés des différentes parcelles. Des milieux contenant essentiellement du glucose ou de l'acétate comme source de carbone et présentant un gradient de salinité (0 ; 15 ; 30 ; 60 et 90 g.l⁻¹ NaCl) ont été employés en vue de vérifier la capacité des consortia à dissoudre les oxydes de fer (goethite) en présence ou en absence de sel.

La structure des communautés ferri-réductrices, c'est-à-dire la caractérisation des espèces bactériennes présentes dans ces consortia bactériens isolés et leur dynamique au cours des processus de mobilisation-dissolution du fer en milieu salin ou non sont présentées dans un second projet d'article (*Bongoua et al., soumis b*). L'étude a été réalisée avec quatre consortia bactériens (S1, S2, S6, S8) possédant des activités ferri-réductrices notables, mais dont l'efficacité et les modes d'expression varient en fonction de la salinité du milieu (0 et 3% NaCl).

Ce chapitre rédigé en français résume les deux projets de publication présentés ci-après.

4.2. Conduite de l'expérience

4.2.1. Site et échantillon de sol

Pour mener cette étude, quatre parcelles (L25S, L25NS, L14S, L14NS), différant par leur mode de gestion, apport ou non d'amendements organiques, possédant ou non des zones salines et dont les caractéristiques sont décrites dans le chapitre 2, ont été choisies (*Figure 4-1*).

Pour étudier l'effet rhizosphérique, des échantillons de sol rhizosphérique (R) et de sol non rhizosphérique (NR) ont été distingués sur les quatre parcelles.

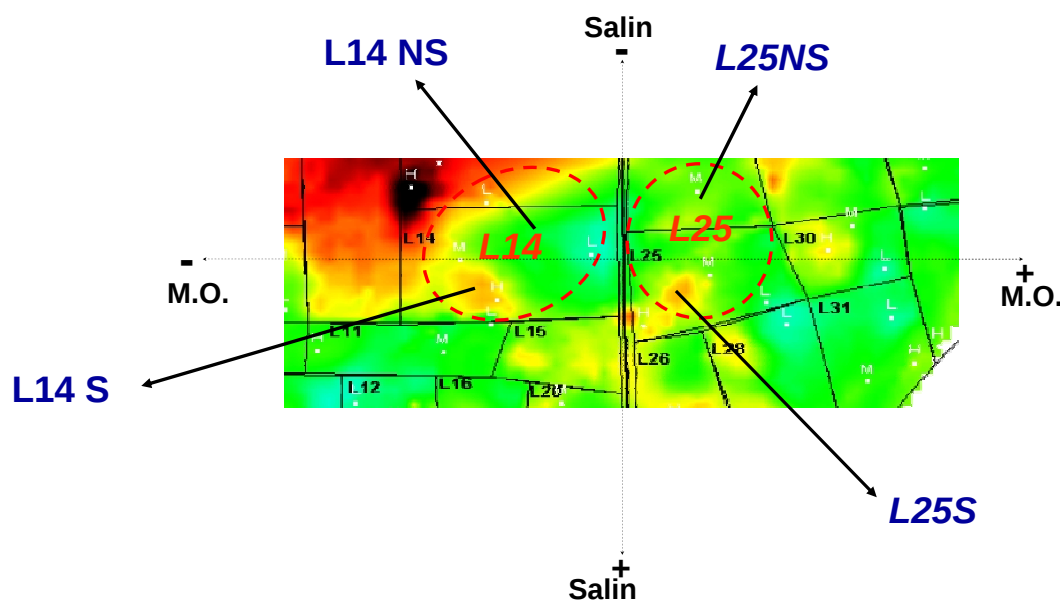


Figure 4.1 : Présentation des parcelles étudiées. L14 : parcelle non amendée ; L25 : parcelle amendée. NS : zone non saline ; S : zone salin. Amendements organiques (M.O.)

4.3. Résultats et discussion

4.3.1. Effet de différents paramètres (amendement, rhizosphère et salinité) sur la prolifération des communautés bactériennes.

La comparaison des dénombrements des communautés bactériennes cultivables entre les parcelles L25 et L14 des zones salines et non salines indiquent un effet très significatif des apports de matières organiques qui favorisent la prolifération des communautés bactériennes aérobies et anaérobies "totales", ferri et sulfato réductrices (*Figure 4.2*). Il est important de souligner une abondance des bactéries réductrices du fer et des sulfates dans les échantillons qui se manifeste alors que les teneurs en C organique total des parcelles sont peu différentes et relativement faibles 0,33 à 0,37 % pour les parcelles L25 et 0,17 à 0,18 % pour les parcelles L14. Ce résultat est en contradiction avec les études présentées par Ehrlich (1996), et par les travaux plus récents menés par Quantin *et al.*, (2001) et Stemmler et Berthelin (2003) qui ont observé un lien significatif entre la biodégradation-minéralisation de la matière organique du sol et la réduction bactérienne du fer.

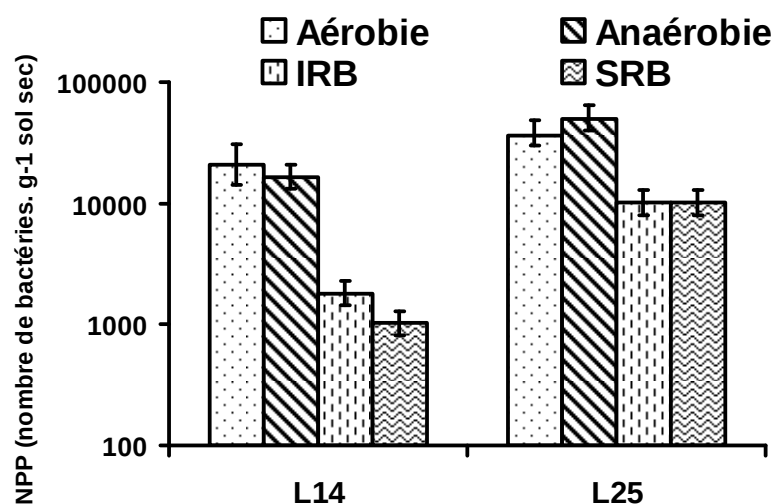


Figure 4.2 : Effet de l'amendement organique sur les communautés bactériennes cultivables. L14 : parcelle non amendée, L25 : parcelle amendée. IRB : Bactéries ferri –réductrices ; SRB : Bactéries sulfato –réductrices. NPP (nombre de bactéries le plus probable).

La rhizosphère a un effet général moins marqué que celui des M.O., et diversifié en fonction des paramètres du milieu. Les résultats de dénombrement (*Figure 4.3*) montrent un effet bénéfique et/ou protecteur de la rhizosphère pour le développement des communautés aérobies et anaérobies totales et ferri-réductrices pour les zones non salines qu'elles reçoivent ou non des matières organiques.

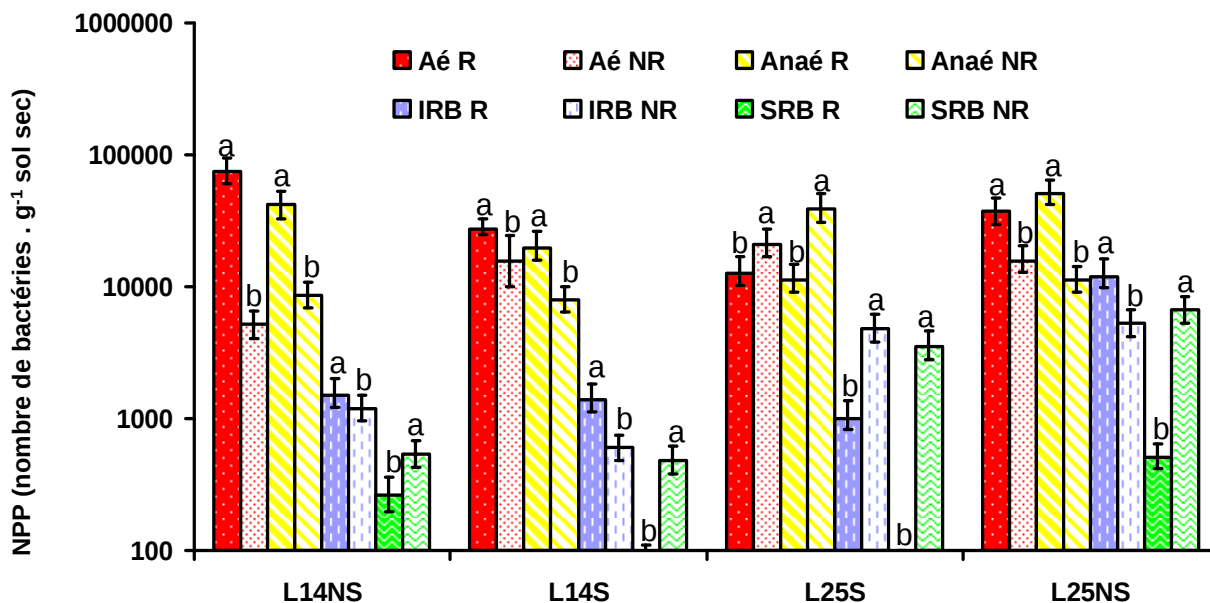


Figure 4.3 : Effet de la rhizosphère sur les communautés bactériennes cultivables. S (zone saline) ; NS (zone non saline). L14 : parcelle non amendée ; L25 : parcelle amendée. IRB : Bactéries ferri – réductrices ; SRB : Bactéries sulfato-réductrices ; Aé : aérobie ; Anaé : anaérobie. R : rhizosphérique ; NR : non rhizosphérique. NPP (nombre de bactéries le plus probable) Lettres (a,b): différence significative entre les moyennes des bactéries dénombrées sur sol rhizosphérique (R) et sol non rhizosphérique (NR) (Test de Student à $P_r < 5\%$)

Par contre, dans les zones salines, cet effet ne se manifeste que dans la parcelle ne recevant pas de matières organiques et pour les bactéries anaérobies et réductrices du fer. Ces derniers résultats peuvent s'expliquer par le fait que dans la parcelle L14, sans apport de matière organique, la rhizosphère apporte des ressources nutritionnelles (excrétions racinaires au sens large) (*Foster et al., 1983; Lynch & Whipps, 1990*). Un tel effet bénéfique de la rhizosphère a été observé pour des bactéries ferri-réductrices sur divers sols de milieux tempérés (*Leyval & Berthelin, 1983*). Il apparaît encore que le statut nutritionnel et énergétique favorable fournis ici par la rhizosphère, et précédemment par les apports de matières organiques, joue un rôle majeur. L'effet rhizosphère paraît plus net en zone non saline qu'en zone saline, du fait de l'abondance et de la meilleure disponibilité des nutriments.

En revanche, quel que soit le type de parcelle, on observe une plus faible communauté sulfato-réductrice à proximité des racines que dans le sol non rhizosphérique. Ce qui pourrait être lié à l'absence de nutriments convenables mais encore plus à des conditions réductrices insuffisantes. En effet, il existe dans la rhizosphère du riz une zone aérobie engendrée par l'exsudation d'oxygène par les racines (*Liesack et al., 2000; De Dorlodot et al., 2005*) qui pourrait être inhibitrice de la

sulfato-réduction nécessitant des conditions anaérobies strictes. Ce résultat conduit aussi à souligner que le riz se trouve dans de bonnes conditions de culture avec une rhizosphère qui est ou reste aérobie.

La présence de sel (8g.l^{-1} NaCl) (Figure 4.4), pour les parcelles ne recevant pas d'apports organiques (L14S ou L14NS), diminue significativement les populations bactériennes cultivables aérobies et n'a pas d'effet significatif sur les communautés bactériennes anaérobies. Cependant, elle a un effet variable sur les communautés ferri-réductrices, avec une diminution significative en condition non saline et une augmentation significative en condition saline.

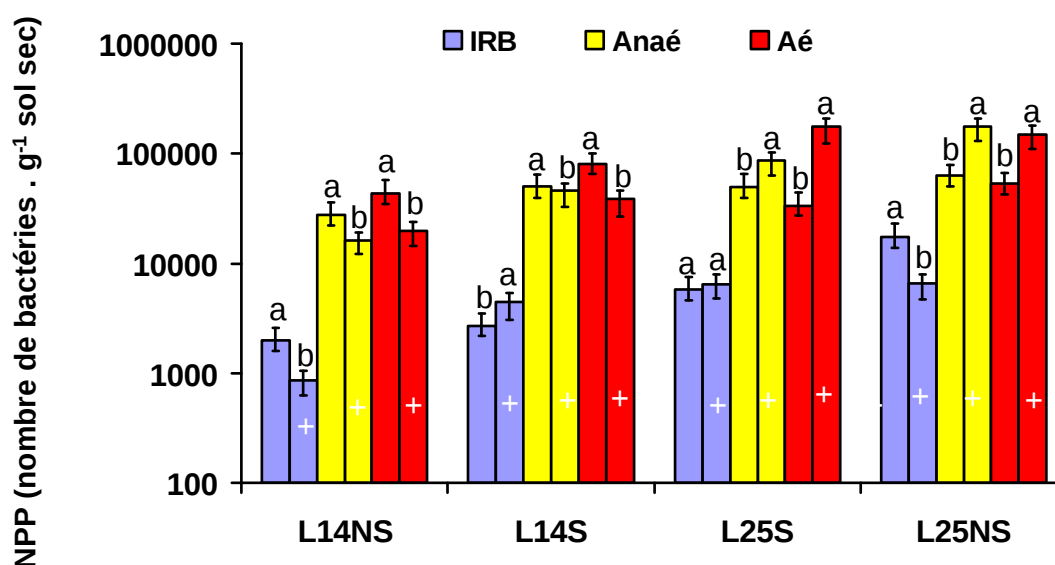


Figure 4.4 : Effet de la salinité sur les communautés bactériennes cultivables. Aé : aérobie ; Anaé : Anaérobie ; IRB : bactéries ferri-réductrices. L14 : parcelle non amendée, L25 : parcelle amendée. S: salin ; NS : non salin ; + : addition de 8g.l^{-1} NaCl. NPP (nombre de bactéries le plus probable) Lettres (a,b): différence significative entre les moyennes des bactéries dénombrées sur le milieu sans ajout de sel et avec ajout de sel (Test de Student à $P_s < 5\%$)

En revanche, dans les parcelles recevant des apports organiques (L25S et L25NS), l'addition de sel favorise significativement la prolifération de bactéries aérobies et anaérobies. Cependant, on note d'une part, une diminution significative du nombre de bactéries ferri réductrices cultivables dans la zone non saline, et d'autre part, une absence d'effet significatif dans la zone saline à $P_s < 5\%$.

Ces effets non inhibiteurs, voire stimulants, peuvent être liés aux conditions nutritionnelles tel que l'apport de matière organique, mais aussi, à la présence de différentes catégories de bactéries halotolérantes et halophiles comme le montre Bongoua *et al.*, (*soumis a*). Il apparaît en effet des communautés halotolérantes, voire sensiblement halophiles, qui se manifestent par une croissance jusqu'à 60 g.l⁻¹ de NaCl et des communautés plus strictement halophiles affichant des croissances entre 60 et 100 g.l⁻¹ de NaCl (Fig 4 dans Bongoua *et al.*, (*soumis a*). Cette variation des populations halotolérantes et halophiles a été déjà observée (**Dommergues & Mangenot, 1970; Madigan et al., 1996**), mais dans des conditions environnementales spécifiques tels que les marais salants, les sols salés, les sols de mangroves,.... Il apparaît donc que ces sols de rizières possèdent des communautés bactériennes diversifiées qui pourraient s'adapter à différentes situations de salinité (0 à 120 g.l⁻¹ NaCl). La diversité et l'hétérogénéité des populations halophiles, halotolérantes et non tolérantes (halosensibles) pourraient aussi expliquer la variabilité de l'influence de la salinité et de la rhizosphère.

Par ailleurs, la dissolution et la solubilisation de l'oxyde de fer (goethite) par les consortia bactériens, isolés à partir des 8 types de sols, en conditions non saline et saline (0 à 90g.l⁻¹ NaCl) montrent des activités ferri-réductrices différentes selon la nature de la source de carbone (glucose ou acétate), et selon le gradient de salinité du milieu de culture de 0 à 90g.l⁻¹ NaCl. L'accroissement de la salinité affecte significativement et différemment le développement des communautés ferri-réductrices. Certains consortia paraissent peu sensibles à la présence de sel et auraient un caractère halotolérant ou même halophile (*Tableau 4.1*) : les consortia S1, S2, S5, S6 réduisent et solubilisent efficacement le fer pour des teneurs en NaCl de 0 à 60g.l⁻¹ qui sont des concentrations au dessus de celles de l'eau de mer, 3,3% de sel dissout (**Kerkar, 2004**). Les consortia S5 et S6 paraissent plus actifs en milieu salin, à l'inverse des consortia S3, S4, S7 et S8. Pour le consortium S5, il faut souligner un caractère halophile marqué, puisque la réduction est importante (40 %) du fer total) pour des teneurs à 90g.l⁻¹ de NaCl. Les autres consortia (S1, S2, S3, S4, S6, S7, S8) solubilisent 0 à 20% du fer dans les milieux à 90g.l⁻¹ de NaCl. S3 présente une activité vraiment très faible. Les consortia S4, S7 et S8 pourraient être considérés comme halosensibles puisque la réduction-dissolution du fer est très faible pour des teneurs de 30 à 90 g.l⁻¹ de NaCl. En revanche, les consortia S1, S2, S5 et S6 comporteraient des populations ferri-réductrices halotolérantes ou des halophiles.

Tableau 4.1 : Quantités de fer réduit solubilisé (Fe^{2+}) par les consortia bactériens en présence ou absence de sel (répétitions $n=3$) et d'oxyde de fer

consortium	% Fe^{2+} / Fe total apporté			
	0 % NaCl	3% NaCl	6% NaCl	9% NaCl
S1	90,8 ± 0,5	99,8 ± 2,6	79,9 ± 6,6	8,5 ± 1,3
S2	98,3 ± 0,5	91 ± 2,2	84,4 ± 0,1	2,1 ± 0,5
S3	2,3 ± 0,7	0,83 ± 0,1	1,3 ± 0,03	2,9 ± 0,4
S4	34,9 ± 1,9	7,1 ± 0,6	3 ± 0,1	4 ± 0,3
S5	84,3 ± 7	62,8 ± 4,4	75 ± 4,2	42 ± 11
S6	73,4 ± 0,9	96,1 ± 0,2	93,2 ± 3,3	3,51 ± 0,2
S7	44,8 ± 3	1,6 ± 0,2	2,1 ± 0,4	4,5 ± 0,7
S8	99,3 ± 1,2	5,72 ± 1,5	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,3

4.3.2. Espèces bactériennes impliquées

La recherche des espèces bactériennes impliquées dans ces activités ferri réductrices a été effectuée sur quatre consortia sélectionnés en fonction de leur diversité et de l'efficacité des activités ferri-réductrices en conditions salines ou non (S1, S2, S6 et S8). Elle est présentée dans le second article ci-joint (*Bongoua et al., soumis b*).

L'analyse biomoléculaire montre une diversité des espèces (Tableau 4.2). La structure du consortium S1 et son activité ferri-réductrice n'est pas modifiée à 3% NaCl, concentration voisine de celle de l'eau de mer (*Kerker, 2004*). À l'inverse, les structures et les activités ferri-réductrices des consortia S2, S6 et S8 sont fortement modifiées. En effet, on observe chez le consortium S2, l'inhibition de la croissance de *Paenibacillus* à 3% NaCl, alors que *Ash et al., (1993)* et *Petrie et al., (2003)* l'avaient mentionné pour 10% NaCl, et le développement de *Virgibacillus* à 3% NaCl, en accord avec les résultats de (*Heyndrickx et al., 1998; Jiang et al., 2007*). L'activité ferri-réductrice de S2 est meilleure en condition saline que non saline. Le consortium S6 est composé essentiellement d'entérobactéries halotolérantes dont l'activité ferri-réductrice est stimulée par la présence de sel.

En revanche, la structure du consortium S8 est affectée par la salinité et fait apparaître deux groupes de bactéries halophiles non ferri-réductrices proches de *Bacillus* et *Alkaliphilus*.

Chapitre 4 :

Communautés cultivables, activités ferri-réductrices et identification de populations bactériennes impliquées dans des sols de rizières affectées par la salinité (Thaïlande)

Tableau 4.2 : Espèces identifiées en conditions salines ou non. (+) : présence ; (-) : absence. Bactéries reconnues comme ferri-réductrices (C) ou non connues (NC) à la ferri- réduction:

Consortiums	Espèces	0% NaCl	3 % NaCl	Fonctions connues
S1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	+	+	C
	<i>Océanobacillus iheyensis</i>	+	+	NC
S1,S2	<i>Shewanella Sp</i>	+	+	C
S2	<i>Paenibacillus</i>	+	-	C
	<i>Virgibacillus</i>	-	+	NC
S6	<i>BacteriumVNS3-1-2</i>	+	+	C
	<i>Enterobacter sp.</i>	+	-	C
	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	C
S8	<i>Clostridium beijerinckii</i>	+	++	C
	<i>Clostridium sp.</i>	+	+	C
	<i>Bacillus sp.</i>	+	++	C
	<i>Bacillus megaterium</i>	-	+	C
S1, S2, S6	<i>Shewanella putrefaciens</i>	+	+	C
S6, S8	<i>Alkaliphilus metalliredicens</i>	-	+	C

Les consortia bactériens ferri-réductrices cultivables présents dans ces sols de rizières révèlent la présence de souches déjà connues comme ferri réductrices et de souches associées mais non reconnues comme IRB (Tableau 4.2). Ces résultats permettent de définir un consortium ferri-réducteur comme étant une association de bactéries aérobies, aéro-anaérobies, respirant le fer, ou fermentaires.

4.4. Conclusion

La salinité peut inhiber la prolifération des communautés bactériennes et modifier leurs activités. Nos résultats ont montré des changements dans l'abondance et l'activité des communautés bactériennes en présence de sel. D'une façon générale, quelle que soit leur fonction, les communautés bactériennes sont moins nombreuses en milieu salin. Mais, l'addition de matières organiques semble améliorer la croissance et les activités des communautés bactériennes dans les zones salines. La rhizosphère stimule la prolifération des communautés bactériennes, surtout dans les zones non amendées en matières organiques. En revanche, un faible apport de matière organique peut limiter l'effet rhizosphérique. La réduction et la mobilisation du fer par les consortia bactériens isolés semblent variables en fonction de la nature des consortia, de leur tolérance au sel et de la nature des sources de carbone présentes dans l'environnement. Une adaptabilité des communautés bactériennes ferri-réductrices a été observée dans ces sols de rizières de Thaïlande due à la présence de divers groupes de bactéries halotolérantes à halophiles, favorisant le maintien des activités, y compris dans des conditions de milieux variables.

Il apparaît donc que ces sols de rizières possèdent des consortia ou communautés bactériennes ferri-réductrices diversifiées qui pourraient s'adapter à différentes situations de salinité (0 à 90 g.l⁻¹), des conditions salines voisines ou supérieures à celles de l'eau de mer, pour maintenir des activités significatives dans des conditions de milieu difficile, correspondant à de forts stress. Ces bactéries ferri-réductrices apparaissent dans ces milieux, soit comme des agents participants, soit comme indicateurs de la bonne qualité ou de l'amélioration de la qualité des rizières.

L'activité ferri-réductrice semble modulée par la salinité qui peut modifier la structure des communautés (S8) ou solliciter leur adaptation fonctionnelle (S6). En condition de salinité sévère, les expériences menées permettent d'évaluer le degré d'halophilie ou d'halotolérance des consortia sélectionnés, en relation avec leur potentiel de ferri-réduction. Dans un certain nombre de cas, l'augmentation de la salinité pourrait réduire significativement l'activité ferri-réductrice bactérienne et, par conséquent, la qualité des sols de rizières.

Chapitre 4 :

Communautés cultivables, activités ferri-réductrices et identification de populations bactériennes impliquées dans des sols de rizières affectées par la salinité (Thaïlande)

Projet d'article : Iron reducing bacterial communities as factor of soil quality in paddy fields affected by salinity (Thailand)

Jeanne Bongoua*, Christian Mustin, Jacques Berthelin,

LIMOS (Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols) UMR 7137, Nancy-Université, CNRS, Faculté des sciences, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, Cedex, France

*Corresponding author

Contact: jeanne.bongoua@limos.uhp-nancy.fr

Tel: +33383684283

Cel: +33383624284

Submitted to Biology Fertility of soil Journal.

Abstract

In paddy soils of Thailand, organic matter input was used efficiently to limit the effect of salinity which affects rice culture and production. Organic matter used as amendment and fertilizer promotes reducing condition increasing iron solubilisation but without ferrous toxicity. The purpose of this study was to specify the influence of salinity, organic matter input, rhizosphere on bacterial communities particularly iron reducing bacterial (IRB) which seems to play a major role in the quality of water and soil of rice fields. Results show that organic matter input increases the proliferation of cultivable bacterial communities and particularly IRB and their activity. All bacterial communities excepted sulphate reducing bacteria are stimulated in rice rhizosphere in plots without organic matter input. Whereas, in field receiving organic matter, this effect does not appear significantly. All cultivable bacterial communities were smaller in saline condition. Organic matter addition enhanced bacterial communities development in saline condition. Addition of easily metabolizable components such as glucose or acetate promotes iron reducing activities favouring fermentative or respiratory pathways. It appears that these paddy soils contained very diversified (halosensitive, halotolerant, halophile) iron reducing bacteria communities or consortia which could be adapted to various salinity condition (0 to 90 g.l⁻¹) using different organic substrate (glucose, acetate and soil organic matter (S.O.M.)) to maintain significant activities in extreme condition of salinity. The presence of specific iron reducing communities, salt tolerant, appeared as a key factor which is an indicator and contribute to control or ameliorate the quality of waters and soils of these paddy fields.

Keywords: rice, paddy fields, Thailand, salinity, organic amendment, rhizosphere, iron reducing bacteria, bacterial communities,

Introduction

Salinity is a major phenomena of soil degradation with deleterious impact on crop production (Sumner 2000) and concerns large areas of cultivated land in the world. In the Kong Kaen region of Northeast Thailand, more than 17% of cultivated land (Arunin 1984) are severely affected by salinity because of presence of evaporites: halite, gypsum, anhydrite,... in the below ground soil (Grünberger et al. 2003) and of modality of water management and agricultural practices. In lowlands, saline ground water comes up to the surface, inducing soil salinity. Therefore, salinity in complement of soil acidity drastically affects soil fertility and rice production and influences probably soil microbial communities and their activities.

To have a better rice production and limit salt effect and acidity, farmers supply organic matter (O.M.) (crop residues and manures) to their fields, which increased soil pH favourable to rice growth, the optimum pH being around 5.5 and 6.5 (Adkins et al. 1995). In plot receiving O.M., stronger reducing conditions appeared after flooding and large amounts of iron were released in soil solution. Fortunately, in such agronomic condition, saline effect is limited corrected by O.M. input no iron toxicity and a better rice production were observed (Quantin et al. 2008). Rice yield was around 400 to 600 kg.ha⁻¹ in salin and non salin not amended plots and 1500 and 3500 kg.ha⁻¹ in salin and non salin amended plots (Quantin and Grünberger unpublished data, personal communications).

In paddy soils, temporarily submerged and under O₂-limited condition, hydromorphy involved biological and chemical modifications. After, oxygen consumption by soil respiration (bacteria and fungi mainly), mineral elements (Fe III, Mn III et IV, SO₄⁻,...) can be efficient electron acceptors for anaerobic bacterial respiration or in complement of fermentation both coupled to organic compound biodegradation (Berthelin 1982; Ehrlich 2002; Roger 1996; Sadana and Claassen 2000; Yoshida 1976). Dissimilatory denitrification, manganese, iron and sulphate reduction can occur very strongly. These phenomena are under the dependence of "microorganism - mineral - organic matter interactions" which could be observed both in rhizospheric and non rhizospheric soils where bacterial communities are active (Rattray et al. 1995). The effect of organic matter input which limit or neutralize soil acidification and salt effect and improve rice production, stimulated also iron reduction and dissolution. Fe concentration in water reached 1.4 and 2.7 mmol.l⁻¹ at different depths of paddy

fields (Quantin et al. 2008). This suggested the involvement of iron reducing bacteria.

Studies concerning iron reducing bacteria (IRB) were widespread but often performed by considering only some specific populations or the activity of IRB communities using organic matter as carbon and energy sources (Lovley 1997; Lovley and Coates 2000; Lovley and Donald 1995; Lovley and Woodward 1996; Loyer et al. 1989; 1991a; 1991b; Quantin et al. 2001; Stemmler 2001; Stemmler and Berthelin, 2003). Salinity was also studied mainly as a parameter decreasing microorganism proliferation and their activity (Caton et al. 2004; Loyer et al. 1989; Loyer 1991a; 1991b; Lu et al. 2001; Madigan et al. 1996). The comparison of rhizospheric effect of IRB versus non rhizospheric effect was also but rarely studied (Jacq et al. 1990; Leyval and Berthelin 1983). To clarify the possible involvement of IRB communities and the impact and interaction of different environmental parameters such as salinity, organic matter input, rhizosphere on the functioning and quality of these paddy soils, different approaches were developed considering in this paper mainly the cultivable bacteria.

Materials and methods

Experimental sites and soil samples

Soil samples were collected in two main paddy field plots at Kong Kaen region, Northeast of Thailand (16°21' 12°74" N, 102°36'29°8"E). Some plots received organic matter (O.M.) which are rich in crop residue and manure (plot L25) and some others have no O.M. input (plot L14). The quantity of organic matter input was estimated at 2.4 t. FW (fresh weight) ha⁻¹ (Quantin et al. 2008). Each different plot contains a saline zone (S) and non saline zone (NS).

Four sampling zones provided respectively saline soil with organic matter input (L25S), non saline soil with organic matter input (L25NS), saline soil without organic matter input (L14S) and non saline soil without organic matter input (L14NS). Samples from rice rhizosphere (R) and non rhizospheric soils (NR) were also collected in these four zones. Thus, eight soil samples were used (L14SR, L14SNR, L14NSR, L14NSNR, L25SR, L25SNR, L25NSR, L25NSNR). The rhizospheric soil (R) was defined as soil adhering to rice roots stirring. The soils were sampled from the surface horizon (0-20cm) by Institute of Research and Development (IRD), France, and the Land Department Development (LDD) of Bangkok, Thailand. Collected soil samples were placed in well hermetically closed boxes, and kept in cold room between 0 to 4°C. The research and counting of bacterial

communities were done with fresh soil. Each experimental were performed with soil dried at low temperature (28-33°C).

Soil sample characteristics

The soils are classified as Solontchak (Salisols, WRB, 1998) or Aeric Kandiaquults (USDA classification) according to Grünberger et al., (2008). They are acid (Table 1) with a low reserve acidity $0.2 < \text{pH}_{\text{eau}} - \text{pH}_{\text{KCl}} < 0.7$; a sandy-silty texture (59 to 70 % of sand), poor in clay (5 to 7.2%). The electrical conductivity and water soluble element contents (data not showed) indicate the presence of salt zones in both plots. Cl^- and Na^+ soluble contents were as follow: 39 and 41 mmol.g^{-1} dry soil for L14S; 7 and 13 mmol.g^{-1} dry soil for L14NS; and 23 and 70.4 mmol.g^{-1} dry soil for L25S; 12.3 and 15.7 mmol.g^{-1} dry soil for L25NS. Both soils were poor in organic matter, but plots which received O.M. (L25) contained twice more than the other (L14). Furthermore, elementary analysis (Table 1) showed low iron contents (2 to 4 mg.g^{-1} dry soil). The analysis of the different forms of iron based on the sequential extraction method described by Quantin et al., (2002) revealed (1) large amounts associated to organic matters (Fe_{pyro} , 34 % of Fe_t) then (2) well crystallized iron oxyhydroxides (Fe_{CBD} , 24 % of Fe_t) and (3) poor crystallized iron oxyhydroxydes (Fe_{Tamm} , 19 % of Fe_t). These results suggest that iron is mainly from 44 to 82 % of Fe_t potentially reducible by bacteria (Berthelin et al. 2006; Bousserhine et al. 1999).

Experimental designs

Two types of approaches were used (1) research and counting of cultivable bacterial communities originating from plots having different environmental conditions (salinity, input of O.M., Rhizosphere) and (2) experiments using incubation in batch devices to determine (a) total iron reducing bacterial activity during soil organic matter biodegradation and (b) iron reducing activities of isolated bacterial consortia during the dissolution of goethite in different saline and nutrient conditions.

Research and counting of bacterial communities

Four cultivable bacterial communities total aerobic, total anaerobic, iron reducing bacteria (IRB), sulphate reducing bacteria (SRB) were determined for the eight types of samples, using microplate titration devices (Microtest^{TM96}, 35-3072, Tissue culture plate, Meylan Cedex France). The total

aerobic and total anaerobic bacteria were counted in Nutrient Broth (NB) Difco™ medium at 8 ‰. Iron Reducing Bacterial (IRB) communities were determined in anaerobic condition, in IRB medium containing yeast extract (Difco) (1g), peptone (Difco) (1.5g), KH_2PO_4 (0.5g), NaCl (0.10g), CaCl_2 (0.10g), NaHCO_3 (2.5g), sodium acetate (1g), micronutrient³ solution (10ml), vitamin solution⁴ (10ml) and iron (III) citrate (10g) per liter of ultra pure water. Sulphate Reducing Bacterial (SRB) communities were counted in anaerobic condition, in medium made of two solutions: solution A containing yeast extract (Difco) (1g), peptone (Difco) (1.5 g), KH_2PO_4 (0.5g), NaCl (0.10g), CaCl_2 (0.10g), NaHCO_3 (2.5g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.225g), DL-Lactate Na (50%) (1.5ml), micronutrient¹ solution (10ml), vitamin solution² (10ml) and ultra pure water (900ml); solution B containing $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2.5g), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1g) and ultra pure water (100ml) sterilized by filtering at 0.22µm. The final medium was a mixture of solution B / solution A (V/V: 1/10). The effect of salinity and the halophilic communities were determined in NB and IRB medium receiving 8 g.l⁻¹ NaCl. In complement the halophile growth was estimated also, in microtritation plate, by measurement of optical density at 620 nm, in NB media containing 0 to 120 g.l⁻¹ NaCl.

Inoculation and incubation of microplates

Suspension-dilution methods in liquid medium were adopted. From soil samples, ten fold serial dilutions from 10⁻¹ to 10⁻⁶ were performed and 20µl aliquot of each dilution were used to inoculate microplate wells containing 200µl of culture medium. Each microplate composed of 96 wells received three dilutions (10⁻¹ à 10⁻³) to have 24 wells per dilution. Each serial dilution was separated by empty wells to avoid cross-contamination. Microplates were incubated in aerobic conditions or in anaerobic conditions during 4 or 7 days at 28°C in dark. After incubation in NB media, a microplate spectrophotometer was used to evaluate the positive wells by measurement of optical density at 620 nm and to calculate the most probable number (MPN) (Hugues and Plantat 1983). Bacteria growth revealed positive wells by a colour change of IRB and SRB medium (IRB medium became colourless or greenish or brownish or dark and the SRB one gray-dark).

³ micronutrient solution : Nitrilotriacetic acid (NTA) (1.5g) ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3g) ; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.5g) ; NaCl (1g) ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1g) ; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.180g) or $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1g) ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1g) ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.100g) ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.01g) ; $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.01g) ; H_3BO_3 (0.010g) ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.010g) ; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.025g) ; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.3mg) and pure sterile water (1l)

⁴ BEM solution of vitamins ready to use after dilution 10⁻¹ and sterilized by filtering (0.2 µm) and conserved in tube of 10 ml at - 20°C

Global iron reducing bacterial activities during soil organic matter (S.O.M.) biodegradation

Experiments were done in batch devices to determine the impact of soil organic matter (SOM) biodegradation on iron reduction and dissolution. Global bacterial activities, organic matter mineralization and iron reduction and dissolution were determined in flask containing 30g of dry soil and 300ml of sterile ultrapure water without any exogenous addition of nutrients. Triplicates were incubated at 28°C in the dark during 20 days in stirring conditions. Abiotic treatments (control samples) were obtained by the addition of 1‰ Na-merthiolate to the solution. Incubation was done in anaerobic condition in jar (100 % N₂) using the automatic system Anoxomat (MART ® WS 80).

Mineralization of organic carbon was measured by CO₂ evolved using infrared spectrometry (BINOS 1004, Rosemont, Germany). The soluble ferrous iron (Fe²⁺) was determined with the Merck TM colorimetric kit (Eisen Test 8023) at 523 nm and total soluble iron was analysed by Plasma Emission Spectrometry (ICP-AES, Jobin Yvon 2038).

Isolation of bacterial consortia

Eight bacterial consortia were isolated from the eight types of soil samples: S1 from L25S R; S2 from L14S NR; S3 from L25S NR; S4 from L25NS R; S5 from L25NS NR; S6 from L14S R; S7 from L14NS R and S8 from L14NS NR respectively, to determine and compare in different experimental conditions (salinity, source of carbon and energy) their ability to reduce and dissolve iron. Isolation procedure was made of three steps: preculture, enrichment culture and isolation.

Preculture: Serial dilutions 10⁻³ to 10⁻⁶ of soil samples (10 g soil sample in 100 ml sterile water at 8 ‰ NaCl) were prepared and 5ml of each dilution was used to inoculate flasks containing 50 ml of sterile NB medium at 8 ‰ (Nutrient Broth Difco TM). *Enrichment culture:* after two days of incubation, each preculture of soil sample was diluted (1ml of preculture in 9ml of sterile 8 ‰ NaCl) and 20µl aliquot of each diluted preculture was transferred into microplate wells containing 200µl of NB medium. The microplates were incubated in anaerobic jar during 4 days at 28 °C in dark. *Isolation:* after incubation, the positive wells were determined by measurement of optical density at 620nm by the microplate photometer and 4ml of positive wells from enrichment culture and from the lower dilution were selected and added to 1.5ml of glycerol then conserved at -80°C.

Study of the iron reducing activity of isolated bacterial consortia in saline and non saline conditions

5ml aliquot dilution (10^{-1}) of isolated bacterial consortium were used to inoculate flasks (sterilized centrifuge tube, 525-0384 VWR, Strasbourg, France) containing 50ml of modified Bromfield medium (BrFe) (Bousserrhine et al. 1999) which contained yeast extract (Difco) (0.15 g), KH_2PO_4 (0.5 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1g), CaCO_3 (0.067 g) per liter of ultra pure water. D-Glucose (11 g) or sodium acetate (1g) were added in medium as carbon source. Glucose and acetate were adopted from reference medium (Bousserrhine et al. 1999; Lovley et al. 1993). pH was adjusted to 6.5. To consider the salinity, these growth media received 0, 15, 30, 60 and 90 g.l^{-1} NaCl. Each flask received 87.5 mg of the iron oxyhydroxide powder (ref. Prolabo, generic formula $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, containing mainly poor-crystallizer goethite). Non inoculated flasks were used as abiotic treatment (control sample). Three replicates were performed per bacterial consortium. Incubations were done at 28 °C in the dark during 30 days and in stirring conditions.

After incubation, culture broth was centrifuged at 7500 rpm for 10min at 5°C. Then pH, Eh, ferrous iron (Fe^{2+}) and total soluble iron (iron water fraction) were measured in filtered supernatant (0.22 μm) as previously described. On the pellet obtained by centrifugation, 5ml HCl (0.5N) were added and stirred during one hour at 20°C to measure acido soluble ferrous iron fraction released in the supernatant. Flasks, microtitration plates and medium were sterilized by autoclaving at 110 °C. Incubation was done in anaerobic condition in jar (80 % N_2 , 10 % CO_2 and 10 % H_2) using the automatic system Anoxomat (MART ® WS 80).

Expression of results and data treatments

An index (Id) of iron oxide dissolution was expressed as the percentage of solubilized total iron (water soluble and / or acido soluble) versus total iron added by oxide and was used to plot kinetic data.

Significant differences between counting or experimental treatment or different parameters were determined using STATISTICAT software at 95% of confidence. The comparison of the iron reducing activities of the isolated bacterial consortia, at different salt content, was done with the Newman-Keuls test using XLSTAT at 95% confidence interval software.

Results

Cultivable bacterial communities in the different types of soil samples

Organic input effect

The counting of cultivable iron reducing bacteria from the eight sample types (*Fig 1*) showed a significant higher ($P_a < 0.01$) number (5.8 to $17.3 \cdot 10^3$ bacteria. g^{-1} dry soil) in plots which have organic matter (O.M.) input as fertilizers (L25S and L25NS) than in those which not received O.M. (2 to $3 \cdot 10^3$ bacteria. g^{-1} dry soil) whatever the soil salinity was, excepted aerobic bacterial communities. IRB and SRB communities were also significantly larger ($P_a < 0.01$) in plots with organic matter input, where they represented more than 50% of total anaerobic bacterial communities, than in plots without O.M. input where they were less than 50% of the total anaerobic bacteria. The low values of total bacterial community can be due to the non specificity versus specificity of the medium allowing to have relatively large number of IRB and SRB.

Rhizosphere effect

Aerobic, anaerobic, iron reducing (IRB) cultivable bacteria were significantly present in larger number ($P_r < 0.05$) in rhizospheric soil in non saline zone (L14NS, L25NS) than in saline one (*Fig 2*). The bacterial communities were from 1 to $75 \cdot 10^3$ bacteria. g^{-1} dry soil in rhizosphere soil and 1 to $15 \cdot 10^3$ bacteria. g^{-1} dry soil in non rhizospheric soil of non saline zone. Rhizosphere effect occurred significantly only in non saline zone (L25NS and L14NS) on total aerobic, total anaerobic and iron reducing bacterial communities for $P_r < 0.05$. In all studied plots, sulphate reducing bacteria (SRB) communities were lower in the rhizosphere than in the non rhizosphere soil ($P_r < 0.05$) whatever soil salinity was. The environmental conditions appeared better for SRB in non rhizospheric soil at the difference of other communities, which can be stimulated in rhizosphere. This can be related to rice rhizosphere properties which can be relatively more aerobic due to the presence of aerenchymes (*Liesack et al., 2000; De Dorlodot et al., 2005*).

Salinity effect

Results presented in *Fig 3* reveal that in plot without O.M. input (L14), salt addition in medium decreased significantly the number of cultivable aerobic, anaerobic and IRB communities in non saline zone (L14NS). In saline zone (L14S), salt added in NB or IRB medium decreased significantly aerobic

bacterial community, but had not significant effect on anaerobic bacterial communities and increased significantly IRB communities at $P_s < 0.05$. In plots with organic matter input, the addition of salt in medium increased significantly aerobic and anaerobic bacterial whatever soil salinity was but not IRB communities ($P_s < 0.05$).

Presence of Halophilic and/or halotolerant bacterial communities

Bacterial growth was observed in incubation performed in microtitration plates at different salt contents (0 to 120 g.l⁻¹ NaCl) of NB medium. Diverse bacterial groups can be distinguished depending on the salinity and the soil sample (*Fig 4*). In plots without organic matter input (L14), aerobic or anaerobic bacterial communities growth decreased relatively rapidly when the salt concentration increased. Bacterial communities were growing between 0 to 60 g.l⁻¹ NaCl content. For this soil sample, the higher growth was observed at low (0 to 5 g.l⁻¹ NaCl) and high (40 g.l⁻¹ NaCl) salt contents. In presence of higher salt contents (>60 g.l⁻¹ NaCl), bacterial growth decreased and was very low. From plots with organic matter inputs (L25), the bacterial communities grew well in presence of higher salt contents. The communities appeared more diversified in this soil. Bacterial communities can growth strongly and very significantly until 60 g.l⁻¹ NaCl but some communities showed development at 80 g.l⁻¹ NaCl. Such results suggested the presence of diverse groups of halotolerant and halophilic bacterial communities.

Iron solubilisation and dissolution during soil organic matter (SOM) biodegradation

The mineralization of soil organic matter (SOM) in anaerobic condition, simulated rice soil waterlogging, and determined by measurement of CO₂ evolved from incubated soil, indicated a strong bacterial activity in biotic treatments. No significant CO₂ production was observed in abiotic control (*Table 2*). In biotic treatment CO₂ production varied from 873 to 1320 µg.g⁻¹ dry soil. The O.M. mineralization was significantly ($P < 0.001$) higher (1267 to 1320 µg.g⁻¹ dry soils) in plots with O.M. input (L25S and L25NS). No significant ($P > 0.05$) higher quantities of O.M. (920 to 1320 µg.g⁻¹ dry soils) were mineralized in non saline zone (L25NS and L14NS) than in saline zone (873 to 1267 µg.g⁻¹ dry soils). But the mineralization coefficient (% of total organic C mineralized) was higher in L14 plots indicating a higher biodegradation and availability of the O.M. In all the biotic incubations iron was efficiently solubilized as ferrous iron (*Table 2*) and no dissolution occurred in abiotic control. Iron

reducing bacterial activity was also inhibited in the control. This solubilisation is more important but not significantly ($P > 0.05$) in plots with organic matter input. The yield between carbon mineralization and iron solubilisation are very similar in all the soils. More than 85g iron can be solubilised per 100g mineralized of carbon.

Iron oxide reduction and dissolution in saline and non saline conditions by isolated bacterial consortia

The reduction and dissolution of the iron oxide goethite added in medium containing glucose or acetate as carbon sources with a salinity gradient from 0 to 90g.l⁻¹ NaCl present a large diversity of results, depending on the nature of the consortium, the salt content of the medium and the source of carbon and energy.

pH and Eh evolution

No significant decrease of pH and Eh was noticed in abiotic treatments (controls). But in inoculated flasks (biotic samples), Eh decreased from +490 to -300 mV indicating the development of reducing conditions associated to bacterial activities (data no show). In incubated flasks, a high decrease of pH (6.5 to 4.3) was observed in biotic samples in BrFe medium containing glucose (BrFe+Glu) which correspond to the production of acids by fermentation. In BrFe with acetate (BrFe +Ace) medium, pH increase (6.5 to 8.6). This increase could be due to iron reduction and /or acid element consumption or alkaline element release.

Ferric iron reduction and solubilisation of ferric oxyhydroxides

No reduction and dissolution of iron oxide, evaluated by the amount of water soluble (hydro) ferrous iron and by the acid extractable ferrous iron from the solid phase, was observed in abiotic treatments (controls). This process was totally associated to bacterial activities (*Fig 5 and 6*). The eight isolated bacterial consortia had various behaviour in the medium with glucose (BrFe+Glu). Iron reduction was principally observed as soluble ferrous iron (*Fig 5*) excepted in incubations with consortia S5 (L25NS R), S7 (L14NS R) and S8 (L14NS NR) where an important part of reduced iron (10 to 40% ferrous iron) was present on solid phase (acido soluble form). Excepted consortium S3 (L25S NR), all the bacterial consortia S1 (L25S R); S2 (L14S NR), S4 (L25NS NR), S5 (L25NS R), S6 (L14S R), S7 (L14NS R) and S8 (L14NS NR) had strong or very strong iron reducing activities depending on salt

contents. Until 60g.l^{-1} NaCl, more than 80% of iron oxide were reduced and solubilised as "hydro" ferrous iron by bacterial consortia S1, S2 and S6 then their iron-reducing activities were lower or very lower at 90g.l^{-1} NaCl content. Bacterial consortium S5 had a different behaviour at 90g.l^{-1} NaCl content versus other consortia. It reduced and solubilised efficiently iron oxide at high salt content (90g.l^{-1} NaCl). Halophilic characters were also marked in consortium S6. It had a high iron reducing activity in saline condition until 60 g.l^{-1} . The halophilic character was less marked for consortiums S1 and S2 and very low for S8 which appeared sensitive to salt content. The comparison of the iron reducing activities of the different bacterial consortia allowed to underline that in plots which organic matter input, the consortia originating from the "rhizospheric" soil (S1 (L25S R) and S5 (L25NS R)) presented significantly higher ferri reducing activities versus consortia originating from "non rhizospheric" soil (S3 (L25S NR) and S4 (L25NS NR)) whatever the salt contents were (*Fig 5*) at $P < 0.01$. In plots without organic matter input, rhizopheric origin was not so well marked. Some bacterial consortia, S5 (L25NS R) and S6 (L14S R) presented strong iron reducing activities in very saline conditions (60 g.l^{-1} NaCl) and appeared as strongly halotolerant and halophilic. One consortium S8 (L14NS NR) is very active only in non saline condition and appeared as non halophilic and very halosensitive.

In the medium with acetate (BrFe+ Ace), in presence of bacterial consortia iron oxide was mainly reduced and present as acido soluble whatever the salt contents were (*Fig 6*). Iron oxide (goethite) dissolution as soluble Fe^{2+} was very low for all bacterial consortia, excepted for bacterial consortium S8 (L14NS NR). Almost, all the reduced iron (until 40%) was significantly "adsorbed" on solid phase and extractable by acid solution. Different behaviour was observed. Iron reduction was efficient at all the salt content for consortia S5 and S6, and significantly lower when salt was present at higher contents (60 to $90\text{ g.l}^{-1}\text{NaCl}$) for consortia S1, S4, S2. The consortia S7 and S3 were less efficient and presented a decreasing efficiency from 0 to 90g.l^{-1} NaCl. In BrFe +acetate medium, the sensitivity to salt seemed lower than in the BrFe +glucose medium: consortia (S1, S5, S6, S8) seemed more halotolerant and halophilic and eventually S₄ and S₂. There is high or relatively high iron reduction (more than 40 %) at high salt (90g.l^{-1} NaCl) contents. This very low iron dissolution was due to higher pH in acetate than in glucose containing media and to the low amount of acetate which limit the iron

reducing activity.

Discussion

The cultivable bacteria of different communities (total aerobic, total anaerobic, iron and sulphate reducing) in all the soil samples of rice fields of Thailand affected by salinity are present in relatively low number (2.10^2 to 8.10^4 of bacteria g^{-1} dry soil) in comparison to other studies concerning paddy fields (Asakawa et al. 1998). Generally much more bacteria were found in paddy fields. It was already observed in different soils that cultivable iron reducing bacteria (IRB) are widespread and numerous (10^2 to 10^8 of bacteria g^{-1} dry soil) in all main types of soils (Berthelin et al. 2006; Jacq et al. 1990; Leyval and Berthelin 1983; Munch and Ottow 1983; Stemmler and Berthelin 2003; Yoshida 1976). In these Thai paddy soils, IRB communities represent 50 to 75 % of cultivable bacterial communities and show a high ability to reduce and dissolve iron oxides and oxyhydroxydes (e.g. goethite) and ferric iron organo compounds (Fe pyro) present in the soil or added to nutrient medium. Iron was reduced as soluble (hydrosoluble) or non soluble ferrous iron (acido soluble). These differences are associated to the nature of the medium controlling the pH condition and evolution and the bacterial activities (fermentative or not). The intensity of bacterial reduction depends also on the saline condition and the iron and organic availability.

Available glucose promotes fermentation and development of acid conditions, production of organic ligands favourable to ferrous solubilisation. Acetate promotes here neutral or slightly alkaline conditions favourable to production of ferrous iron on the solid phase. This reduction on the solid phase suggested favourable conditions for the formation of FeII, FeIII mineral such "fougerite" (Berthelin et al., 2006; Trolard et al., 1996; Ona-Nguema et al., 2002). In plot with organic matter input, bacterial consortia originating from rhizospheric soil (S1 and S5) seems more active than those from non rhizospheric soil (S3 and S4) as noted previously in medium with glucose.

The input of organic matter in paddy fields promotes significantly the development in saline or non saline conditions of the total anaerobic, ferri and sulphate reducing communities. It is of major interest to underline that the more important proliferation of iron and sulphate reducing bacterial communities occurs in soils having the higher total organic carbon contents (0.33 to 0.37 % C). A very low difference in organic carbon content is sufficient to have significant effect. For plots without organic

matter input (0.17 to 0.18 % C), the number of the cultivable bacteria was significantly lower. This effect was in agreement with studies performed by Ehrlich (1996), Quantin et al. (2001) and Stemmler and Berthelin (2003) who showed a coupling between soil organic matter (SOM) biodegradation-mineralization and iron reducing bacterial activities. The large numbers of IRB and SRB communities observed in plot L25S in comparison with L14S is linked to the organic matter input. This organic matter input which decreased the deleterious effect of salinity stimulates consequently growth and activity of IRB. Energetic and nutritional parameters associated to organic matter input appear well as an essential and dominant factor in the development of IRB and SRB and in the improvement of these Thai paddy soils and rice production.

Rhizospheric effect is here beneficial or has a protective effect on IRB in plots without organic matter input in saline and non saline conditions. In this condition rhizosphere brings nutrients (root excretions and deposits) favourable to bacterial proliferation (Foster et al. 1983; Lynch and Whipps 1990). Such beneficial rhizospheric effect was already observed for iron reducing bacteria in various temperate soils (Leyval and Berthelin, 1983).

Rhizosphere effect appeared generally more significant in non saline zone than in saline zone. This result is in agreement with Khaled et al., (2003) showing an inhibition of young white clover nodulation by the presence of 2g.l^{-1} NaCl and with Saadallah et al., (2003) who observed a reduction of growth root in white clover in presence of salt. According to these authors, saline stress involved a disorder of membranes with biochemical modification of their ultrastructure and therefore their excretion.

Sulphate reducing bacteria (SRB) are significantly less present in the rhizosphere which can inhibit their proliferation. Their lower number near roots could be linked to the absence of suitable nutrients but even more to deficient reducing conditions. At the contrary they present larger communities in non rhizospheric soils and waterlogged soil which is characterized by an oxygen deficit and where anaerobic conditions are established fast by a lower diffusion and an important consumption of oxygen. Rice rhizosphere presents aerobic zone (De Dorlodot et al. 2005; Liesack et al. 2000) which limit development of SRB communities which requires strict anaerobic conditions. Moreover, the iron reducing bacteria communities could restrict their development.

Salinity decreases significantly the number of total aerobic and anaerobic cultivable bacteria number (8.10^4 to 4.10^4 bacteria g^{-1} dry soil) in plots without organic matter input. The input of organic matter increases significantly the development of all bacterial communities and limit harmful effect of salt.

Addition of salt has a limiting effect on proliferation of IRB communities in non saline plots whereas in saline zone, there is not significant effect (L25S) or a stimulation effect (L14S). These effects are relatively different from those observed by Madigan et al., (1996) and Romeo et al., (2001) who showed inhibition effect of salt, limiting bacterial population development. These non inhibition or stimulating effects can be linked to nutritional conditions (organic matter input) but also to the presence of different groups of halotolerant and halophilic bacteria as indicated by incubation in microplates with different salt contents from 0 to 120 $g.l^{-1}$ NaCl. Growth occurred at high NaCl content: halotolerant or more or less halophilic communities are growing until 60 $g.l^{-1}$ NaCl and strictly halophilic communities grow between 60 and 100 $g.l^{-1}$ NaCl. Diversity of halotolerant and halophile communities we have observed in this study were already reported by Dommergues and Mangenot (1970) and Madigan et al., (1996) but in specific environmental conditions (saline soils, mangroves,...). The diversity and heterogeneity of halophilic, halotolerant and halosensitive populations can also explain the variability of salt and rhizosphere effects.

These Thai paddy fields contain rich IRB communities able to reduce and solubilise iron as soluble ferrous iron or as acid extractable ferrous iron according to the consortia, their origin, their nutrient and saline environment. Depending on the availability of carbon and energy source (e.g. glucose or acetate), there are two types of occurrence of iron reduction. One (with glucose) having dominant fermentative processes where iron is solubilised as soluble ferrous iron. With metabolic pathways, acidification occurs with organic acid production allowing and promoting the solubilisation of iron as Fe^{2+} (Bousserhine et al. 1999; Chidthaisong and Conrad 2000). The other having much more iron respiration processes (with acetate) where iron reduction occurs mainly on the solid phase (acid extractable ferrous iron) and where higher pH (neutral or slightly alkaline) limit also soluble iron. All the isolated consortia present both processes but with different efficiency underlining the large

diversity and adaptability of the IRB communities in these soils.

The iron reducing activities of consortium culture in different salinity conditions revealed that some consortia are not very sensitive to the presence of salt and have halotolerant and halophilic characteristics: S1, S2, S5, S6 reduce and solubilise efficiently iron for 0 to 60 g.l⁻¹ NaCl. S5 has a higher halophilic character because reduced 40 to 50 % of total iron in medium containing 90g.l⁻¹ NaCl.

Table 3 summarized the behaviour of 4 representative consortia and allows to distinguish low efficient consortia (S3); halosensitive consortia (S8) and haloterant halophilic consortia (S1 and S5). The comparison of iron reducing activities of consortia in glucose and acetate media indicated that some bacterial consortia were halosensitive or haloterant (S1, S8) or non active (S3, S4) in medium with glucose but were active and reduced efficiently iron in acetate medium at high salt content (until 90 g.l⁻¹ NaCl). A complementary observation allowed to note that in medium with glucose, S8 consortium is active only in non saline condition but in medium with acetate it can reduced around 40 % of iron oxide at 90 g.l⁻¹ NaCl. These results suggest a large diversity and variability in the consortia populations depending on interaction between availability of nutrients (Table 3). Studies of the structure and activities of populations of the IRB communities and consortia have to be developed.

Therefore it appeared that these paddy fields contain very diversified iron reducing bacterial consortia or communities which could be adaptable to large salinity conditions (0 to 90 g.l⁻¹ NaCl) using different organic substrate (glucose, acetate and soil organic matter) to maintain significant activities in extreme condition corresponding to high stress. These iron reducing bacteria appear as efficient agent which contribute to the quality of water and soil of paddy fields. The best conditions of rice production are observed in the situation where iron reducing bacterial activities occurs efficiently with input of O.M. and without ferrous toxicity. These IRB communities can participate in the control of pH by proton trapping and OH⁻ release and probably by releasing also nutrients during O.M. biodegradation and ferric oxyhydroxyde weathering. Such process can also increase availability of phosphorus.

Conclusion

The salinity can inhibit the proliferation of bacteria community and their activities. Our result showed changes in bacterial communities abundance and activities in presence of salt. All the bacteria communities were less important in saline condition. The addition of organic matter seems to ameliorate bacteria communities growth and activity. Similarly, the rhizosphere of rice stimulates bacteria communities activities in particular plot receiving organic matter. A lower organic matter addition can be limit rhizosphere effect. The iron reduction and mobilisation by bacterial consortiums isolated appears various according to the consortiums nature, their salt tolerance and carbon source origin in the environment. An adaptability of iron reducing bacterial communities was noticed in this rice fields of Thailand owed to the presence of diverse bacterial groups halotolerantes to halophile favouring the maintain of iron reducing activities same in extremes conditions. The identification of bacterial species involved in iron reduction activities must be précised by molecular tools.

Table 1: Soil sample characteristics: organic matter, pH_{H_2O} and different forms of iron. L14: no organic matter input; L25: organic matter input; S: saline zone; NS: non saline zone. Fe_{water} : iron extracted by water; $Fe_{éch}$: iron extracted by KCl (1M); Fe_{acido} : iron extracted by HCl (0.5N); Fe_{Tamm} : iron extracted by ammonium oxalate at $pH=3$; Fe_{CBD} : iron extracted by Citrate –Bicarbonate-Dithionite ; Fe_{Pyro} : Iron extracted by sodium pyrophosphate (0.1M) at $pH=9$; Fe_{total} : total iron .

Plots	Organic Matter ^(a) (%)			pH_{H_2O}	Iron partition ($\mu g \cdot g^{-1}$ dry soil)						
	MO	C	C:N		Fe_{water}	Fe_{exch}	Fe_{acid}	Fe_{Tamm}	Fe_{CBD}	Fe_{pyro}	Fe_{total}
L14S	0.30 ± 0.01	0.17 ± 0.00	8.48 ± 0.52	4.9 ± 0.02	23 ± 1	0.5 ± 0.001	84 ± 5	433 ± 13	550 ± 40	800 ± 70	2310 ± 200
L14NS	0.31 ± 0.02	0.18 ± 0.01	9.14 ± 0.47	4.8 ± 0.6	18 ± 3	0.5 ± 0.001	64 ± 20	360 ± 50	570 ± 9	750 ± 200	2200 ± 500
L25S	0.57 ± 0.14	0.33 ± 0.08	10.88 ± 0.68	5.4 ± 0.01	25 ± 11	0.5 ± 0.001	178 ± 4	460 ± 20	650 ± 23	520 ± 30	3030 ± 20
L25NS	0.64 ± 0.05	0.37 ± 0.03	11.20 ± 0.33	5.2 ± 0.1	22 ± 7	0.5 ± 0.001	80 ± 1	430 ± 30	640 ± 20	422 ± 20	3610 ± 100

Table 2: Organic matter mineralization, iron reduction and solubilisation in biotic and abiotic incubations of the four types of soil samples during 20 days incubation. L14: without organic matter input plot; L25: organic matter input plot; S: saline zone; NS: no saline zone.

Parameters	Plots							
	L25S (amended)		L25NS (amended)		L14S (non amended)		L14NS (non amended)	
	Biotic	Abiotic	Biotic	Abiotic	Biotic	Abiotic	Biotic	Abiotic
Total solubilised Fe ($\mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil)	302 $\pm$ 65	0	333 $\pm$ 75	0	216 $\pm$ 44	0	236 $\pm$ 94	8 $\pm$ 2
CO ₂ ($\mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil) evolved	1267 $\pm$ 124	193 $\pm$ 23	1317 $\pm$ 48	207 $\pm$ 6	873 $\pm$ 35	173 $\pm$ 5.8	920 $\pm$ 27	243 $\pm$ 4
C- CO ₂ (‰) total C (mineralization coefficient)	14.7 $\pm$ 1.4	2.2 $\pm$ 0.3	13.6 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.1	19 $\pm$ 1	3.7 $\pm$ 0.1	19.6 $\pm$ 1	5.2 $\pm$ 1
C mineralised	346 $\pm$ 34	53 $\pm$ 6	359 $\pm$ 13	57 $\pm$ 2	238 $\pm$ 10	47 $\pm$ 2	251 $\pm$ 7	66 $\pm$ 1
R (%) Yield = total solubilised Fe / C mineralised	87 $\pm$ 2	0	93 $\pm$ 6	0	91 $\pm$ 4	0	94 $\pm$ 13	0

Chapitre 4 :

Communautés cultivables, activités ferri-réductrices et identification de populations bactériennes impliquées dans des sols de rizières affectées par la salinité (Thaïlande)

Table 3: Iron reduced indices according to the salinity and carbon source. (-) not detectable; (+) low; (++;+++) significant; (++++) high

	Salt contents (mg.L ⁻¹)									
	Water soluble					Acid extractable				
	0	15	30	60	90	0	15	30	60	90
S1- Glucose	+++++	+++++	+++++	++++	-	-	-	-	-	-
S1- Acetate	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++
S3- Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3- Acetate	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
S5- Glucose	++++	+++++	+++++	+++++	+++	-	+	++	++	-
S5- Acetate	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
S8- Glucose	+++++	+	-	-	-	+	-	-	-	-
S8- Acetate	-	-	-	-	-	+++	+++	++	++	++

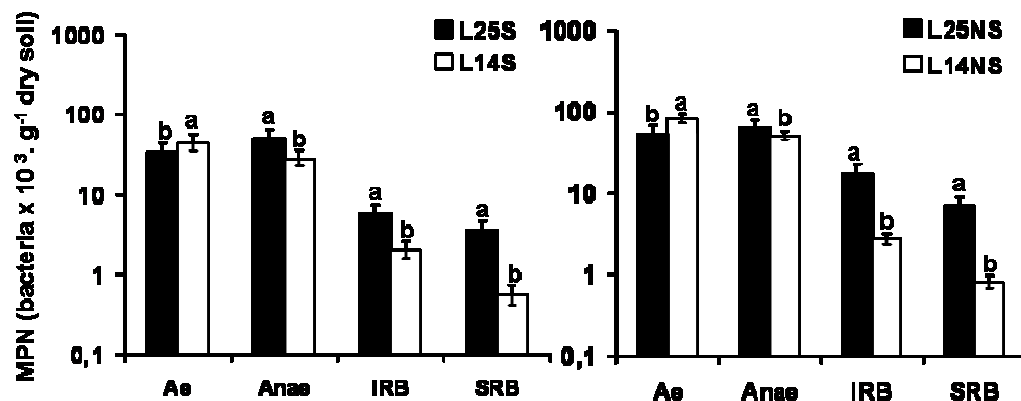


Fig.1: Effect of organic matter input on bacterial communities (Ae:total aerobic; Anaer: total anaerobic; IRB: iron reducing bacteria; SBR: sulphate reducing bacteria). Saline (S) or Not (NS). MPN (Most Probable Number). Different letters (a,b) indicate a significant difference between the two plots with (L25) or without (L14) organic matter input (test of student for $P_a < 1\%$. 24 replicates, Bar (I)= standard deviation

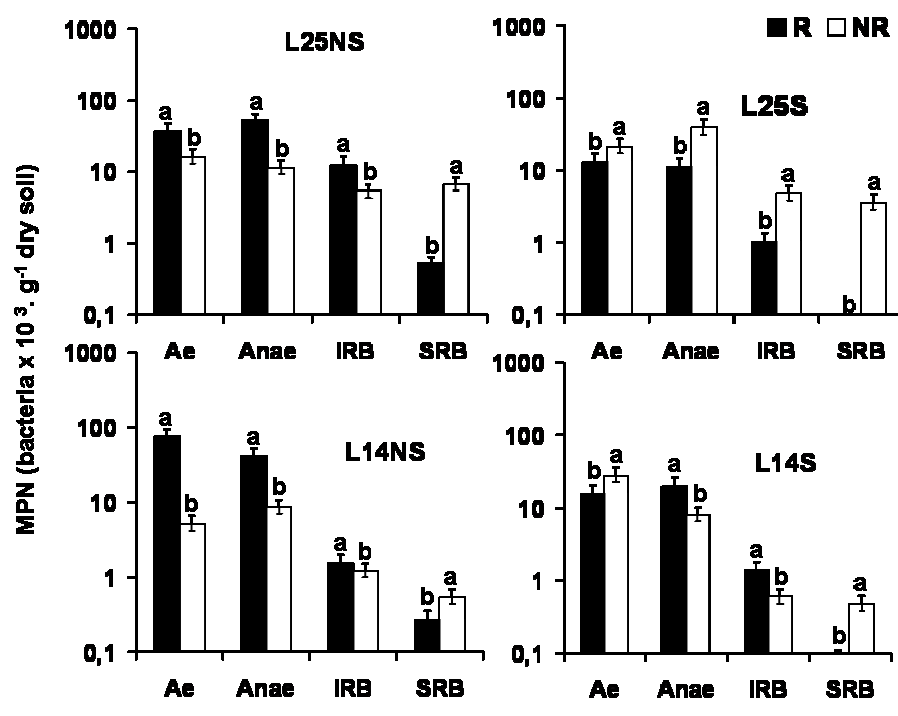


Fig.2: Effect of rhizosphere on bacterial communities (Ae:total aerobic; Anaer: total anaerobic; IRB: iron reducing bacteria; SBR: sulphate reducing bacteria). Saline (S) or Not (NS). MPN (Most Probable Number). Different letters (a,b) indicate a significant difference between the two plots with (L25) or without (L14) organic matter input (test of student for $P_a < 1\%$. 24 replicates, Bar (I)= standard deviation

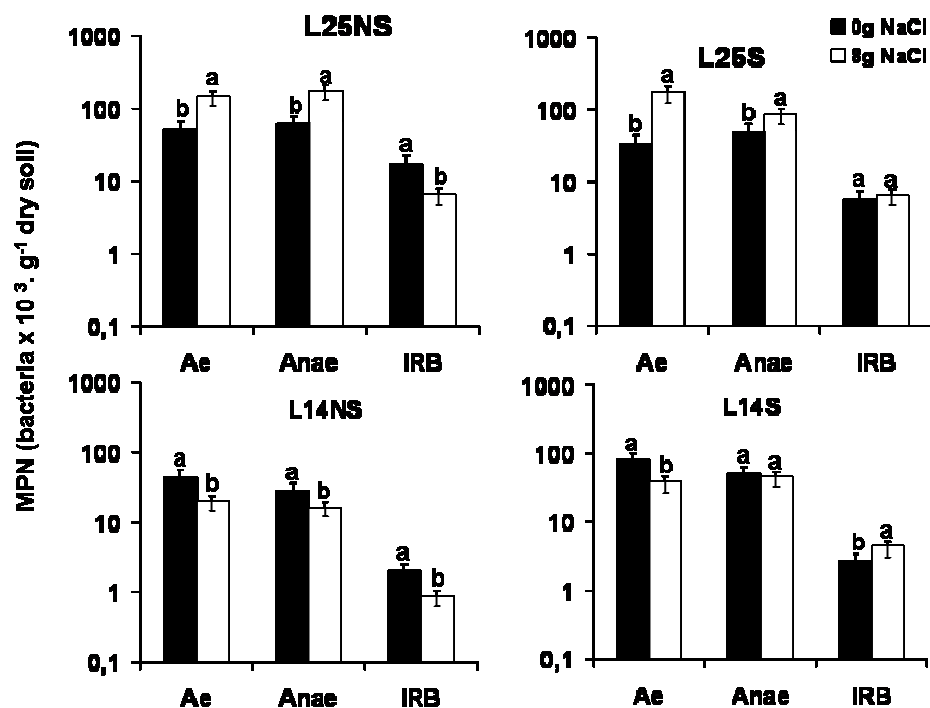


Fig.3: Effect of salinity on bacterial communities (Ae:total aerobic; Anaer: total anaerobic; IRB: iron reducing bacteria; SBR: sulphate reducing bacteria). Saline (S) or Not (NS). MPN (Most Probable Number). Different letters (a,b) indicate a significant difference between the two plots with (L25) or without (L14) organic matter input (test of student for $P_a < 1\%$. 24 replicates, Bar (I)= standard deviation

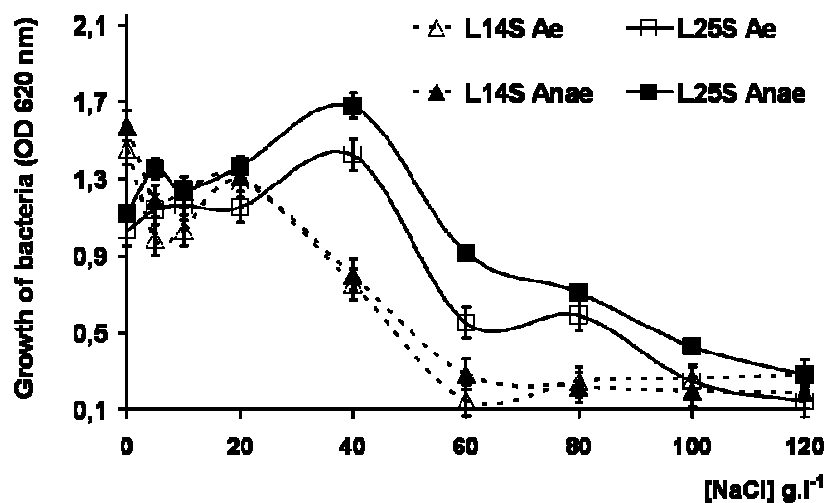


Fig.4 : Diversity of halotolerant and halophilic bacterial communities present in the paddy soils.

Bacterial growth was measured by optical Density (OD) at 620 nm. Ae: aerobic; Anaer: Anaerobic.

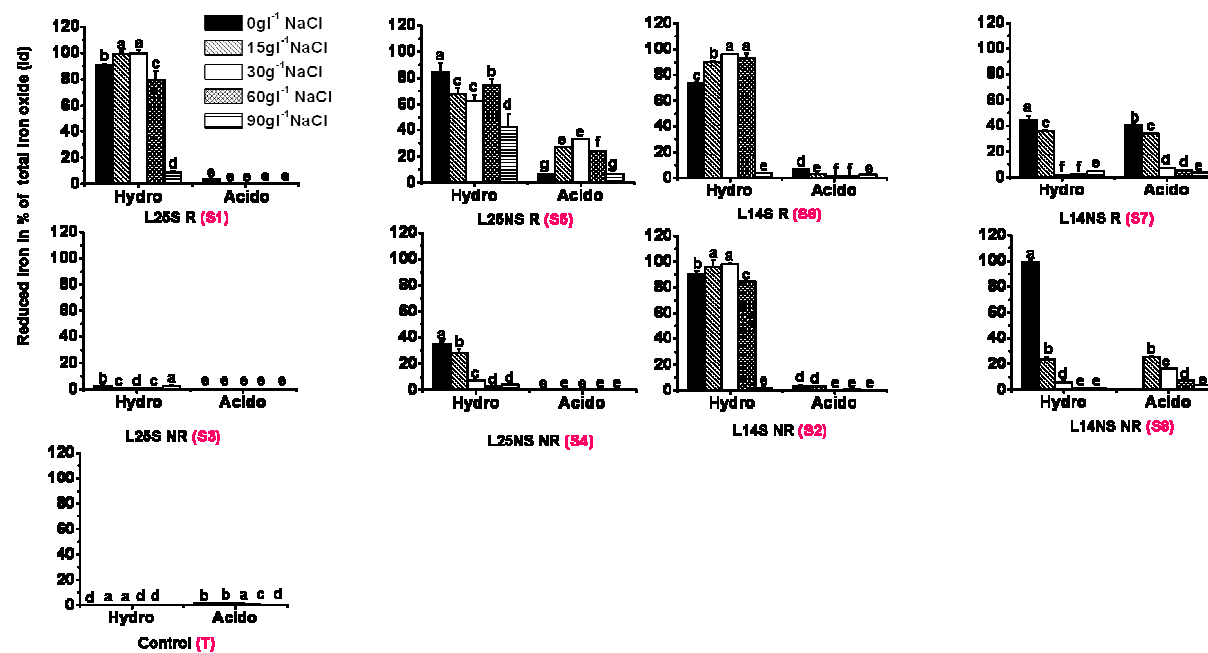


Fig.5: Amount of reduced iron (%) of soluble and acido extractable Fe^{2+} of the total iron) solubilised from oxyhydroxyde by bacterial consortia (S1,S2,S3,S4,S5,S6,S7,S8) in culture media with glucose (BrFe+ Glu) during 30 days incubation in different conditions of salinity (0 to 90g.l⁻¹ NaCl). Letters (a,b,c,d,e,f,g) indicated a significant difference between the saline condition for both iron forms (Hydro soluble and acido soluble) (student test of Newman-Keuls $p < 5\%$. 3 replicates; Bar (I)= standard deviation).

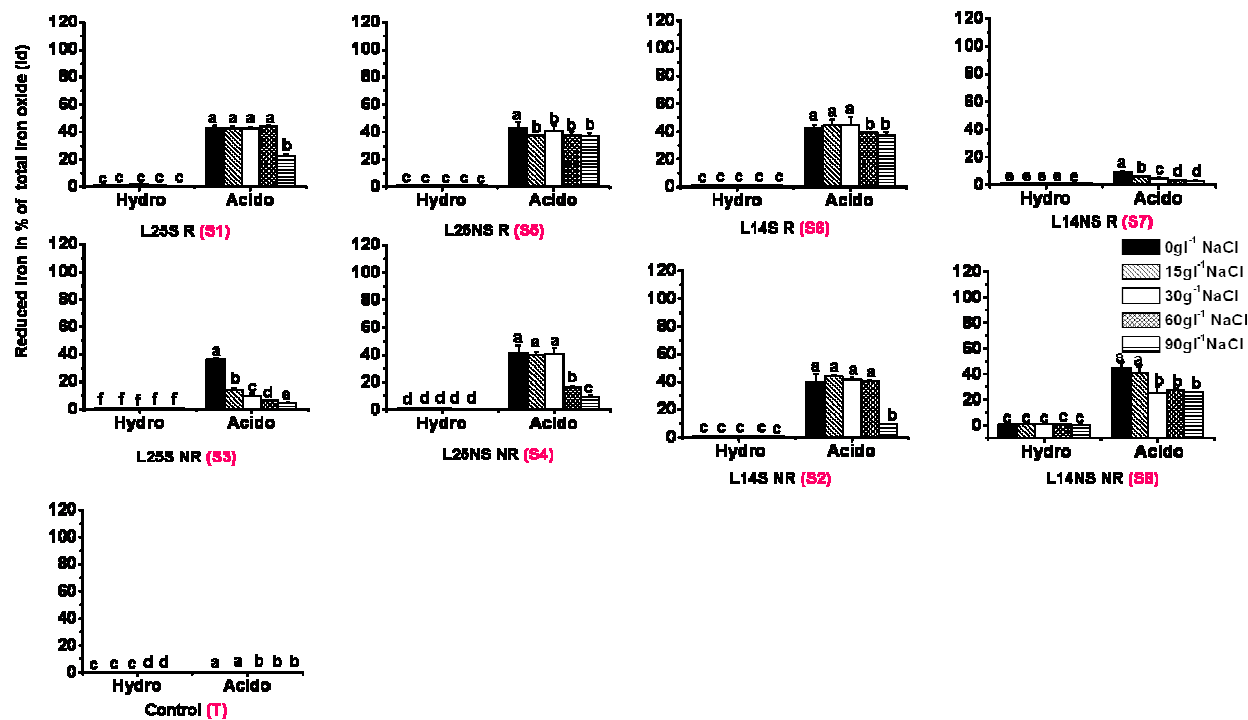


Fig.6: Amount of reduced iron (%) of soluble and acido extractable Fe^{2+} of the total iron) solubilised from oxyhydroxyde by bacterial consortia (S1,S2,S3,S4,S5,S6,S7,S8) in culture media with acetate (BrFe+Ace) during 30 days incubation in different conditions of salinity (0 to 90g.l⁻¹ NaCl). Letters (a,b,c,d,e,f,g) indicated a significant difference between the saline condition for both iron forms (Hydro soluble and acido soluble) (student test of Newman-Keuls $p < 5\%$. 3 replicates; Bar (I)= standard deviation).

Projet d'article: Effect of salinity on activity and population dynamic during iron –reduction by bacterial consortia isolated from rice fields

Jeanne Bongoua*, Aurélie Cébron, Jacques Berthelin, Christian Mustin

LIMOS (Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols) UMR 7137,
Nancy-Université, CNRS, Faculté des sciences, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, Cedex, France

*Corresponding author

Contact: jeanne.bongoua@limos.uhp-nancy.fr

Tel: +33383684283

Cel: +33383624284

Submitted to FEMS Microbiology Ecology

Abstract

In the Northeast of Thailand, change in agricultural practices (deforestation and development of new cultures), and impact of geochemical environment (presence of evaporites) promote salinity of soils that affect soil quality, rice production and as a consequence modify the abundance, composition, diversity and metabolic functions of microbial communities.

To better understand the mechanism and parameters involved in the dynamic of iron in the rice fields cultivable bacterial consortia (S1 ; S2 ; S6 et S8) were isolated from soil affected or not affected by salinity and receiving or not organic amendment.

The comparison of the ability of bacterial consortia to reduce and dissolve iron of ferric oxyhydroxyde (goethite) in saline and not saline media allow to underline that soil contain (1) consortium (S1) not affected by the presence of salt (2) consortium (S2) sensitive but maintaining an efficient iron reducing activity by salinity (3) consortium (S6) having an higher iron reducing activity in saline condition and (4) consortium (S8) inhibited for their iron reducing activity by salinity. These paddy fields contain efficient and adaptable iron reducing bacterial communities made of iron respiring (*Shewanella sp.*) and fermentative (*Clostridium sp.*) bacteria, aerobic (*Oceanobacillus iheyensis*), aero-anaerobic (*Paenibacillus sp.*), anaerobic (*Alkaliphilus metalliredigens*; *Clostridium sp.*) bacteria. All the consortia have an efficient ability to reduce and solubilize iron and to weather ferric oxyhydroxyde (goethite). They contribute to maintain a significant iron reduction and dissolution in changing environmental conditions.

Introduction

About 7% of world land areas present high salt concentrations (**Munns, 2002**). Crop production is highly affected by the increasing salinization of soils. An excessive salinity can modify the fertility and productivity of a soil, and often leads to loss of habitat and reduction of biodiversity. Salinity poses several problems for plant growth and development, by inducing physiological dysfunctions (**Rawat & Banerjee, 1998**). Salt causes premature senescence, reduces the photosynthesis and limits the carbohydrate production (**Munns, 2002; Saied et al., 2005**). However, various plant species are affected differently by the soil salinity depending on their phenology (**Yeo & Flowers, 1985; Lutts et al., 1996**). As rice is one of the main staple food in some country (**FAO, 2004**), it's important to better understand the effect of salt stress on rice crop production and on the soil biological functioning.

In the Northeast of Thailand, changes in agricultural practices (deforestation and development of new cultures), flood waters and geochemical environment (presence of evaporites) promote salinity of soils that affect soil quality and the rice production (**Montoroi et al., 2005; Grünberger et al., 2008; Quantin et al., 2008**). To limit the deleterious effect of salinity on rice production, the farmers added high quantities of fresh organic matter (crop residues and manure) to their paddy field to decrease the impact of salinity and increase the pH, that favoured the rice production. Indeed, it has been shown that organic matter incorporation increased the reducing conditions, promoting the release of soluble ferrous iron (**Quantin et al., 2008**) and simultaneously the increase of pH. These modifications could result mainly from iron-reducing bacterial (IRB) activity. In such situation, ferrous toxicity was not observed and iron-reducing activity did not exhibit a deleterious effect but appeared to be considered as an indicator of the soil quality.

Saline environments are considered extreme habitats for microbial life (**Rothschild & Mancinelli, 2001; Oren, 2002**). Jiang et al., (2007) shown that the abundance, composition, diversity and metabolic functions of microbial communities were lower in saline and

hypersaline terrestrial environments. However this type of environment favoured the development of halotolerant bacteria, which are tolerant to high salt concentration but do not require NaCl for growth, and halophiles bacteria, which require NaCl for growth. Olivier et al., (1994) and Kerkar (2004) classified three groups of halophiles based on their response to NaCl: slight halophiles (growth at 2 to 5% NaCl), moderate halophiles (growth at 5 to 20% NaCl) and extreme halophiles (growth at 20 to 30% NaCl).

Moreover, many microorganisms are implicated in the immobilization-mobilization and solubilization of iron, because they draw energy from the oxidation of reduced form of iron (Madigan et al., 1996; Ehrlich, 2002) or by reduction of ferric iron Fe(III) (Lovley & Donald, 1995; Lovley, 1997a). Only few studies have been conducted about Fe(III)-reduction activity under saline conditions. Several halophiles bacteria have been characterized for their ability to reduce Fe(III) to Fe²⁺. But, their tolerance to salt is not well known, and bacteria as *Shewanella* sp. was only able to grow in medium containing less than 6% NaCl (Roh, 2001).

Studies concerning iron reducing bacteria (IRB) were widespread but often approached by considering only some specific population or the activity of communities using organic matter (Loyer et al., 1989; 1991b, a; Lovley & Donald, 1995; Lovley & Woodward, 1996; Lovley, 1997b; Lovley & Coates, 2000; Quantin et al., 2001; Stemmler, 2001; Stemmler & Berthelin, 2003). Salinity was also studied mainly as a parameter decreasing microorganism proliferation and their activity (Loyer et al., 1989; Loyer, 1991a, b; Madigan et al., 1996; Lu et al., 2001; Caton et al., 2004). Finally, the interactions between parameters such as salinity and availability of iron and organic matter were not really observed.

In a previous study, we revealed the presence of iron-reducing bacterial communities and their adaptation to salts (Bongoua et al., *submitted*). Different types of cultivable bacterial consortia were isolated and characterized for their different activities and behaviour depending on the salinity and the nature of the electron donor organic sources (glucose, acetate). Whatever the studied soil plots, cultivable bacterial consortia presented halotolerant or moderate halophilic (5 to 12 %) characteristics and their behaviour and iron-reduction activities were stable and reproducible.

The aim of our study was to better characterize the structure of the consortia, their activity efficiency and the bacterial dynamic. Four consortia (S1; S2; S6 and S8) were selected to be further studied. Their capacity to dissolve iron oxide according to the salinity and the activity kinetics of the consortia were studied by measurement of different parameters (pH, Eh, glucose consumption, organic acid production, iron reduction and solubilisation). Simultaneously, the determination of the consortia structure was done using molecular biology tools (PCR-TTGE and sequencing).

Materials and methods

Experimental sites and samples

The soil samples originate from paddy soils located in the Northeast of the Thailand (16°21' 12°74" N, 102°36'29°8"E) in the region of Kong Kaen. The soil are classified as Solonchacs (Salisols, FAO, 1998) or belong to Aeric Kandiaquults groups (USDA, classification) according to Grünberger et al., (2008). They were sampled from the surface horizon (0-20cm) by IRD and the Land Department Development (LDD) of Bangkok, Thailand.

The salinity was showed by water soluble element contents (Data no showed) which allow to underline the presence of salts in different zones of both plots L14 and L25 ($\text{Cl}^- = 39$ and $\text{Na}^+ = 41 \text{ mmol.g}^{-1}$ dry soil for L14S vs $\text{Cl}^- = 7$ and $\text{Na}^+ = 13 \text{ mmol.g}^{-1}$ dry soil for L14NS; $\text{Cl}^- = 23$ and $\text{Na}^+ = 70.4 \text{ mmol.g}^{-1}$ dry soil for L25S vs $\text{Cl}^- = 12.3$ and $\text{Na}^+ = 15.7 \text{ mmol.g}^{-1}$ dry soil for L25NS).

Soils are sandy-silty acid soils (water pH 4.8 to 5.2) with relatively low content in organic matters (O.M.), 0.3 % for soil without O.M. input and 0.6 % for soil with O.M. input (Table 1).

Total iron content was low (2 to 4 ‰ of dry soil). But the larger part of iron seemed very mobilisable: associated to O.M. 0.4 to 0.8 (Fe_{Pyro}); reducible 0.5 to 0.6 (Fe_{CBD}); soluble in acid and complexing conditions 0.05 to 0.4 ‰ ($\text{Fe}_{\text{Acid,Tamm}}$) of dry soil (Table 2). These results suggest that iron was not included in silicate lattices, but was from 44 to 82 % of Fe_t potentially reducible by bacteria (Berthelin et al., 2006) i.e. as ferric oxyhydroxides.

Choice of bacterial consortia

Four cultivable bacterial consortia (S1 ; S2 ; S6 et S8) isolated from previous preliminary studies (*Bongoua et al.*, ***submitted***) were selected for their different ability and efficiency to reduce and solubilise iron III to Fe^{2+} in presence or absence of salts (NaCl). The consortium bacteria S1 were isolated from L25S; S2 and S6 from L14S and S8 from L14NS.

Experimental design

Kinetic of iron oxyhydroxide dissolution

The cultures were performed in 250 ml bottle flasks containing 40 mL of Bromfield modified medium (BrFe medium) as described by (*Bousserrhine et al.*, **1999**), adjusted to pH 6.5. Ferric iron (goethite) was provided as an iron oxyhydroxide powder (ref. Prolabo, generic formula $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, containing mainly poor-crystallizer goethite). Flasks were sterilized by autoclaving and placed in anaerobic jars under anoxic atmosphere (80 % N_2 , 10 % CO_2 and 10 % H_2). After sterilisation, 4ml of suspension of the isolated bacterial consortium were used to inoculate the medium. Non inoculated flasks were used as control samples. Three replicates were performed per sample. Incubations were done at 28 °C in the dark during 30 days and in stirring conditions. After incubation (2, 4, 8, 15 and 30 days), pH and Eh were measured in the culture solution (Tacussel PHN 81, Choffel Electronique), then culture broth was centrifuged at 15000 rpm during 10 min at 5°C and the supernatant was filtered at 0.22 μm . Soluble iron (ferrous, Fe^{2+}) and total, organic acid released and glucose consumption were measured. Ferrous iron (Fe^{2+}) was measured using a Merck TM colorimetric kit (Eisen Test 880023) at 523 nm and total soluble iron was determined by ICP-AES after acidification by HCl (11N) to avoid iron precipitation. Organic acids were analyzed by ionic chromatography on Aminex HPX-87H sulfonic cation-exchange column (300*7.8 mm I.D., Bio-rad Labs., Marnes la Vallée, France) on 25 μl of sample (the analysis concern one replicate). Elution was performed at 50°C with an eluent containing 5 mmol.L^{-1} H_2SO_4 during 28 min at a flow rate of 0.5mL/min. Organic acids

were detected at 210 nm by a UV detector. Glucose was determined by spectrophotometry with the Kit GOD-PAD (bio-Labs., Maizy, France) based on the enzymatic oxidation of glucose in gluconic acid and the formation of pink complex and measurement of optical density at 500 nm. The bacterial dissolution index (Id) was expressed by the following equation:

$$\text{Id (\%)} = \frac{[\text{Soluble Fe}] \text{ in mg.L}^{-1} \times \text{Volume of medium incubated in mL}}{1000 \times (\text{Total amount of iron as oxide in the medium in mg})} \times 100$$

Iron dissolution and glucose kinetic model were first order and defined by:

$A = A_0 (1 - e^{-kt})$ for glucose or $A = A_0 e^{-kt}$ for goethite dissolution with A = amount of glucose or soluble iron available and A_0 = amount available of glucose or soluble iron at initial time; K = constant of goethite dissolution or glucose consumption; t = time of incubation.

The comparison the iron reducing activities of different isolated bacterial consortium, at different salt content, was evaluated with the Newman-Keuls test using XLSTAT at 95% confidence interval software. Differences between the most probable number (MPN) of bacteria were evaluated by STATISTICAT software at 95%.

DNA extraction, quantification, purification and identification

DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from the bacterial pellet obtained by centrifugation of the incubation medium of the 4 consortia. The bacterial pellet was dissolved in 200 μ L of physiological solution and was pretreated with 20 μ L of lysozyme (10 mg.mL⁻¹) during 30 min at 37°C in stirring condition then with 20 μ L of Protéinase K (1 %) during 30 min at 70°C in water-bath. DNA was then isolated using a Bead Beating method (FastDNA ® Kit, Q-Biogene) according to the manufacturer's recommendation.

PCR (Polymerase Chain Reaction) condition

Bacterial 16S rRNA gene fragments were amplified using the universal primer set described by Feslke et al. (1998): 968F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3') holding a GC clamp (underlined sequence, described by Muyzer et al. (1947)) and 1401R (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'). PCR reactions were performed in 50µl reaction volume containing 1X PCR Buffer (Invitrogen), 1.5 mM of MgCl₂, 200 µM of each dNTP (Fermentas), 0.2 µM of each primers, 1.25 U of Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen) and 1µl of template of DNA.

The amplification of 16S rRNA was carried out with the following temperature profile: step one heated to 94°C (5 min), followed by 35 cycles of 3 steps. These steps were 30 s of denaturation at 94°C, 45 s at 56°C and 45 s at 72°C. The final step consisted of 7min of elongation at 72°C. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% (wt/vol) agarose gel and visualized under a GelDoc transilluminator (BioRad) after staining with 0.5 µg.mL⁻¹ ethidium bromide, to check the amplification and the size of the PCR products (475bp expected).

Temporal thermal gradient gel electrophoresis (TTGE) analysis

TTGE was performed on a DCode system (BioRad, France) by using vertical polyacrylamide gel (6% [wt/vol] acrylamide, 7 M urea, 2% [vol/vol] glycérol, 0.1% (w/v) Ammonium Persulfate, 0.1% (v/v) TEMED) in 1.25 × TAE buffer (1 × TAE corresponds to 40 mM Tris-acetate, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.3). PCR products were run during 5 h at a constant voltage of 100V, with a temperature gradient increasing from 57°C to 67°C (2°C per hour). After electrophoresis, acrylamide gel were stained by SYBR Gold (0.1ml.l⁻¹) and further visualization was done under a UV GelDoc Transilluminator (Bio-Rad) coupled with software Computer Science Quantity One. Bands of interest were extracted from the gel and the DNA reamplified using the same PCR method but replacing the primer 968F-GC by 968F. The reamplified PCR products were purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostic) and sequenced (Eurofins-MWG Biotech, France). The 16S rRNA gene fragment sequences were compared to available sequences on GenBank database and their

membership determined by BlastN.

Results

Iron reduction and solubilisation from goethite and consumption of carbon source by bacterial consortia

Iron reduction and solubilization

The iron reducing activities of the four selected bacterial consortia (S1, S2, S6, S8) cultivated in Bromfield medium containing glucose were variable among the consortia and depending on the presence or absence of salt (0 or 3 % NaCl) (*Figure 1*). Iron is mainly solubilised as ferrous iron (Fe^{2+}). The absence of reduction and dissolution in the control treatments (abiotic treatment) underlined again the major role of IRB in this weathering process of ferric oxyhydroxides.

Bacterial consortium S1 was not sensitive to saline conditions because the characteristic constant (k) of iron dissolution was the same (k=0.33 to 0.34) in presence or absence of salt (*Table 2*). Bacterial consortium S2 dissolved more rapidly the goethite in absence of salt with (k=0.35) than in saline condition (k= 0.22); whereas bacterial consortium S6 dissolved more rapidly the ferric oxyhydroxydes in presence of salt (k=0.31) than in absence of salt (k=0.22). For bacterial consortium S8, in absence of salt the goethite was rapidly dissolved during the first 8 days of incubation (k=0.8) and then reach a stationary phase from 8 to 15 days of incubation (k=0.02). Whereas in saline condition the dissolution was very low (k= 0.1).

Glucose consumption

The bacterial consortia consumed quickly most of the glucose during the first 15 days for their energetic requirements (*Figure 1*), with similar kinetic (k= 0.09 to 0.32, *Table 2*) whatever the salinity of the medium. The fast consumption of glucose in fifteen days (*Figure 1*) did not appear as a limiting factor for bacterial iron reduction in the experimental conditions. Because all or almost all the ferric iron present in the medium was reduced and solubilised. For consortium S8 when cultivated in salt medium the glucose was almost totally used while there

was no or very low iron reducing activity (only 2 % of iron were reduced and solubilised). In such condition glucose seemed not to be used for iron reducing bacterial activity.

pH and Eh evolution

In inoculated flasks, Eh decreased rapidly from +400 to -300 mV (*Figure 2*) indicating the development of strong reducing conditions associated to bacterial activities. Acidification by bacterial activities occurred also but depended on the type of bacterial consortia. Strong and fast acidification from pH 6.0 to pH 3.0 occurred with consortium S8 and S6 with a stronger decrease of pH for the consortium S6 in non-saline condition. The decrease of pH was slower and lower with the consortia S1 and S2.

Metabolic compounds released in the culture media: biochemical profiles of bacterial consortia.

Simultaneously to glucose consumption and iron reduction, different compounds were released in the culture medium during incubations. Mainly acid compounds as gluconic, pyruvic, malic, succinic, lactic, acetic, propionic, butyric, oxalic, formic, citric, fumaric acids, have been observed (Table 3). The content and evolution of these organic acids provided information on the "global" physiology and activity of the consortia in relation with the salinity (*Tables 3 and 5*). Consortium S1 released gluconic acid in lower but stable quantities in non-saline conditions (57 to 120 mg.L⁻¹) than in saline conditions where it reached 287 mg.L⁻¹ then decreased to 17 mg.L⁻¹. Succinic acid is in lower amounts in non-saline than in saline conditions.

In all culture conditions, lactic and acetic acids were produced in low amounts during the first 8 days of incubation and then their concentration increased (8 to 30 days). Higher contents were observed in saline than in non-saline condition for S1 and S2 consortia. For S1, lactic acid has a content of 3257 mg.L⁻¹ at 15 days and then decreased to 522 mg.L⁻¹ at 30 days. Acetic acid at the opposite was 15 and 1518 mg.L⁻¹ respectively. Succinic and acetic acids can be provided by lactate transformation. Propionic and butyric acids were not produced by S1.

For consortium S2, the quantity of gluconic acid decreased (from 134 to 21 mg.L⁻¹) in non-saline condition and increased (from 42 to 181 mg.L⁻¹) in saline condition. This consortium released more acids in saline than in non-saline conditions. At 2 to 4 days in saline condition, amounts of lactic and acetic acids released were lower at beginning of incubation then increased at 15 days. Gluconic, lactic and acetic acids were less concentrated in non-saline than in saline condition. Propionic acid was released in the medium after 2 to 4 days and 15 days of incubation, in saline and non-saline conditions, respectively. Low amounts of butyric acid were also observed in both conditions. The consortium S2 seemed to have a larger fermentation pathway range but produced lower amounts of acids than S1.

In both salinity conditions, the amount of gluconic acid produced by S6 was then consumed at the end of incubation. More lactic acid was produced in saline conditions than in non-saline condition (1428 to 1808 mg.L⁻¹ compared to 0 to 306 mg.L⁻¹). On the contrary, more acetic acid was released in medium without salt than with salt (172 to 1973 mg.L⁻¹ compared to 51 to 321 mg.L⁻¹). The consortium S6 produced higher propionic acid amount in both conditions than the other consortia.

Comparatively to the other consortia, S8 released more butyric acid (31 to 393 mg.L⁻¹), which decreased during incubation in saline condition, and more acetic acid (150 to 4509 mg.L⁻¹) and succinic acid in non-saline condition. In medium without salt, butyric acid was not produced. There was much more acetic and succinic acids released in non-saline condition than in saline one.

Dynamic of bacterial consortia during iron reduction processes

The TTGE profiles of 16S rRNA genes, showed variation of the bacterial consortia structure according to the salinity of the medium, the carbon source and the time of incubation (after 2, 4, 8, 15 et 30 days of culture) (*Figure 4*).

The three replicates for the same sampling time of one consortium presented similar TTGE profile indicating the reproducibility of the experiments and the methods, thus only one of them was presented in figures 4 for clarity.

The TTGE profiles of the consortium S1 were the same in saline and non-saline conditions with the identification of 4 main bacterial species corresponding to the bands a, b, c and d (Figure 4 and Table 6). However, a succession of species appeared during incubation time course. Two bacterial species were present all along the incubation, these were closely related to *Shewanella* sp. and *Shewanella putrefaciens* corresponding to the bands (b) and (c), respectively (Table 6). The band (a) (closely related to *Clostridium acetobutylicum* sequence) appeared after 4 and 8 days in non-saline and saline medium, respectively. Indeed, *Clostridium acetobutylicum* is known to grow only when strict anaerobic conditions were present. The band (d) appeared after 15 days in saline and non-saline conditions, the sequence of this band was closely related to the aerobic and halotolerant, *Oceanobacillus iheyensis*. Strict anaerobic (a) and aerobic (d) bacteria were coexisting.

For bacterial consortium S2 in saline and non-saline conditions, TTGE profiles showed the presence of common bands (b and c) that after sequencing were showed to be the same species as the consortium S1 (two bacteria closely related to *Shewanella* sp. and *Shewanella putrefaciens*). However, the consortium was composed of different species: the bacteria corresponding to the bands (e and f), closely related to *Paenibacillus* sp. and *Virgibacillus* sp., were favoured and became dominant after 15 days incubation in non-saline and saline conditions, respectively. These two species are affiliated to facultative anaerobic bacteria.

The characterization of the structure of bacterial consortium S6 showed the presence of commons species (bands g, h, and j) in saline and non-saline conditions. The sequences corresponding to the bands g, h and j, were closely related to *Alkaliphilus metalliredigens*, bacterium VNS₃-1-1, and *Enterobacter cloacae*, respectively. The bacterial species corresponding to the bands (i) and (k) and related to *Enterobacter* sp. and *Shewanella putrefaciens*, were favoured in non-saline and saline conditions, respectively.

The TTGE profile of bacterial consortium S8 showed the presence of common species (bands l, m and n) in saline and non-saline conditions, even if along time the bands (l) and (n) became less dominant. The sequences corresponding to these bands were closely related to *Clostridium beijerenkii* (l), *Clostridium* sp.(m) and *Bacillus* sp.(n). Two species, corresponding to the bands

(o) and (p), and closely related to *Bacillus megaterium* and *Alkaliphilus metalliredigens*, were favoured only in saline medium.

Discussion

Cultivable iron reducing bacteria were largely present (from 10^3 to 10^4 bacteria per g of dry soil) in paddy fields affected by salinity, in both control plots and plots receiving organic matter (O.M.) to control and remediate the salinity and acidity. The number of cultivable iron reducing bacteria (IRB) was higher in plots that received O. M.. It can be underlined that this significant effect was observed even if the O.M. content was relatively low and the difference between plots also very low (0.17 and 0.33% of organic matter).

The cultivable iron reducing bacterial consortia isolated from rice fields showed an efficient ability to reduce and dissolve iron from ferric oxyhydroxides (goethite) in saline and non saline condition (0 or 3 % NaCl). They consume glucose fastly in both saline and non saline conditions. The efficiency of their activities depends on abiotic (salinity) and biotic (nature of the populations of the consortia) parameters that have interactions between them.

The different activities and the structure of the bacterial consortia were either stable or constant and homogeneous or very variable according to the salt contents and incubation times.

In every bacterial consortium having strong ferri-reducing activities, 4 to 5 different bacterial types were identified. Some were common to all the consortia and all saline conditions. Some others seemed more specific to environmental conditions. In all studied consortia (S1, S2, S6 and S8), we identified bacteria closely related to already known iron-reducing bacteria (*Shewanella putrefaciens*, *Shewanella* sp., *Alkaliphilus metalliredigens* *Clostridium* sp., *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus*). Some of them were common to different consortia (*Shewanella* sp. and *Shewanella putrefaciens* in S1, S2 and S6 and *Alkaliphilus metalliredigens* in S6 and S8). Others were more specific to one consortium (*Clostridium* sp., *Clostridium*

beijerinckii and *Bacillus megaterium* in S8). Bacteria not related to known IRB were also present (*Oceanobacillus iheyensis* in S1 *Virgibacillus sp.* in S2). Some bacteria grew in both saline and non saline conditions (*Clostridium acetobutylicum*, *Shewanella sp.* and *Shewanella putrefaciens* in S1; *Clostridium sp.* in S8), while some others developed only under saline (*Virgibacillus sp.*, *Bacillus sp.* and *Bacillus megaterium* and *Clostridium beijerinckii*) or non-saline (*Paenibacillus*, *Enterobacter sp.*) conditions.

The potential salt stress observed by Arnold et al., (1990) limiting the iron assimilation by *Shewanella putrefaciens* was not detected here probably because of the presence of a mixed populations including *Shewanella putrefaciens* an iron reducing bacteria well know in marine and aquatic environment (Arnold et al., 1990; Vogel et al., 1997; McLeod et al., 2002) ; *Clostridium acetobutylicum* which produce organic acids and hydrogen by fermentation (Nölling et al., 2001) and *Oceanobacillus iheyensis* which is an extremely salt tolerant and alkaliphilic bacteria (Lu et al., 2001).

The high solubilisation and the absence of variation of the iron reduction kinetics observed in S1 consortium in saline and non saline conditions can be due to the development of the same individual consortium bacteria in both conditions. The consortium S1 could to be consider as halotolerant and slightly halophile. It includes two *Shewanella* (species) present during all the culture and other bacterial populations (*Clostridium acetobutylicum*) which appeared significantly during consortium growth after 4 or 8 days of culture respectively in saline and non saline conditions, even later (15 days) for *Oceanobacillus iheyensis*. Curiously, alkaliphilic, aerobic bacteria (*Oceanobacillus iheyensis*) appeared after an anaerobic one (*Clostridium acetobutylicum*). Those different identified populations present a relatively large spectrum of metabolic pathways, allowing a large adaptability of the consortia in saline and non saline conditions.

Oceanobacillus iheyensis can change its phenotype and can sporulate. It gains its energy through numerous metabolic pathways such as glycolysis, starch and sucrose metabolism, galactose metabolism and carbon fixation. It has various catabolite and anabolic functions:

glycolysis / gluconeogenesis, TCA cycle, PPP, fructose and mannose metabolism, urea cycle and metabolism of amino groups, glutamate metabolism, penicillins and cephalosporins biosynthesis, D-arginine and D-ornithine metabolism, petidoglycan biosynthesis, pyruvate metabolism, Carbon fixation, Nitrogen and Sulfur metabolism, plus many others (7)

C. acetobutylicum is able to use a number of different fermentable carbohydrates as an energy, as well as carbon, source. The genome codes for proteins that aid in the breakdown of many substrates: xylan, levan, pectin, starch, and other polysaccharides. Another notable metabolic pathway is that some Clostridia (including *C. acetobutylicum*) are capable of "fixing" atmospheric nitrogen. Different byproducts are released at different phases of growth in *C. acetobutylicum*. During exponential growth phase, primary products are acetate and butyrate. During this time, nitrogen fixation is also taking place. Some time after the cell enters stationary phase and the production of butanol and acetone occur.

For the other bacterial consortia (S2, S6, S8) modification of activity and population structures were observed in saline and non saline condition. In saline condition, the iron reducing activities can decreased (S2) or be inhibited (S8) or increased (S6). The presence of salt favoured significantly the growth of some bacterial populations (*Virgibacillus sp.*, *Bacillus megaterium*, and *Bacillus sp*) or inhibited the growth of *Paenibacillus sp.* at 3% NaCl. The fast and high iron reduction dissolution observed in non-saline condition can be linked to the activity of *Paenibacillus* whose growth is inhibited at 10% NaCl (Ash et al., 1993; Petrie et al., 2003). The presence of salt favours the development of *Virgibacillus*, moderate halophile bacteria (Heyndrickx et al., 1998; Jiang et al., 2007) but decreased as suggested by our results its ability to dissolve iron oxyhydroxide (goethite). S2 consortium can be considerate as a moderate halosensitive bacterial consortium.

Bacterial consortium S6 had three common growing bacteria in saline and non-saline conditions (*Alkaliphilus metalliredigens*, *Bacterium VNS₃-1-2*, *Enterobacter cloacae*), and two specific bacterial strains, one growing only in saline (*Shewanella sp.*) and one growing only in non-saline (*Enterobacter sp*) conditions. The higher iron reducing activity in saline condition can be

associated to the presence of *Shewanella* sp. but also *Alkaliphilus*, *Bacterium* and *Enterobacter*. S6 can be a slightly or moderate halophile consortium.

Iron reduction by bacterial consortium S8, was almost totally inhibited in saline condition. In non saline condition, *Clostridium beijerinckii* and *Bacillus* sp. appeared respectively at 2 and 4 days of culture but disappeared from 4 and 8 days of culture and *Clostridium* sp. appeared from 4 to 30 days of culture. The fast and high iron reducing activity can be associated to the activity of *Clostridium* and *Bacillus* in non saline conditions. In saline condition, *Bacillus megaterium* and *Alkaliphilus metalliredigens* appeared at the beginning of culture and *Clostridium beijerinckii* developed from 2 days to 30 days of culture. As in non-saline condition, *Clostridium* sp. appeared at 4 days of culture. The inhibition of iron reducing activity in saline condition suggests that the association of *Clostridium* sp., *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium* and *Clostridium beijerinckii* was unable to solubilise iron oxide in saline condition despite the efficient growth of the bacteria (e.g. consumption of glucose). The difference between saline and non saline conditions can be related to the development of acetic fermentation in non saline conditions vs butyric fermentation in saline conditions. The release of electron during fermentation, to be used for iron reduction, seems to be not enough efficient. Similarly, Hoffmann and al., (2002) and Arnold and al., (1990) noticed that high salinity stress (0.7 to 1.2 M NaCl) limited the iron assimilation by *Bacillus* and consequently its biological activity. *Alkaliphilus metalliredigens* was able to reduce iron oxides in alkaline environment (pH from 7.5 to 11) and to grow at 0 to 8 % NaCl (Ye et al., 2004), indeed this type of bacteria could be inhibited by acid pH. Our results revealed that *Alkaliphilus metallireducens* was able to grow in acid condition (6<pH<3) but unable to have an iron reducing activity. S8 consortium was halosensitive for the iron-reduction activity and halotolerant for fermentation growth. The metabolic pathways had to be better known to determined the absence of iron reduction by S8 consortium in saline conditions despite a well observed butyric fermentation.

The composition and nature of the populations of the different consortia can explain their adaptability and efficiency in saline and non saline medium. Some other bacteria, not

significantly detectable by PCR TGGE, such as those involved in gluconic, lactic, acetic, propionic fermentative pathways are also present and can participate to the reduction-dissolution processes. The production of organic acids allows to maintain ferrous in solution, but the main process of iron reduction and dissolution in these media is attributed to bacterial reduction process either by iron respiring bacteria (e.g. *Shewanella*) or by fermentative bacteria (e.g. *Clostridium*).

The study revealed diverse types of bacterial associations, isolated from a paddy fields, including iron respiratory bacteria (*Shewanella*, in S1 and S2), or having respiratory and fermentative bacteria (S6, S8 in non saline condition) or only fermentative bacteria (S8 in non saline condition). Each type of association of these different populations of IRB define efficient functional iron reducing bacteria consortium made by the association of aerobic, aero-anaerobic, anaerobic, respiratory or fermentative bacteria and moderate halophile populations. The diversity and adaptability of consortia and of their populations indicate that IRB can be active in different conditions of salinity to have an helpful effect on soil quality in these paddy fields.

Conclusion

In conclusion, we note that different identified species were already more or less studied or noticed in pure culture but that their association in adaptable and efficient iron reducing bacterial consortia reveals interesting results. Such consortia allow to maintain and express iron reducing activity even when the conditions of medium are changing and eventually become extreme. We observed in certain consortia a complementarity of species and an iron reducing activity in saline and non saline conditions. In other consortia, there is not such complementarity and iron reduction occurs efficiently in saline or saline environment. Iron reducing activity can therefore be controlled on one hand by the structure and dynamic of species and on the other hand by the conditions of the medium (pH, salinity) which intervened on behalf of their development. This study showed also an efficient adaptability of iron reducing bacterial communities in different conditions of salinity linked to the diversity of species. These paddy

Chapitre 4 :

Communautés cultivables, activités ferri-réductrices et identification de populations bactériennes impliquées dans des sols de rizières affectées par la salinité (Thaïlande)

fields consortia involve in iron reducing activity both in moderate saline and non saline conditions.

Table 1: Soil sample characteristics: organic matter, pH and different forms of iron. L14: plot without organic matter input; L25: plot with organic matter input; S: salt zone; NS: non salt zone. Fe_{hydro} : Water soluble iron; Fe_{ech} : Exchangeable iron by KCl (1M); Fe_{acido} : Acido soluble iron extracted by HCl (0,5N); Fe_{Tamm} : Iron extracted by ammonium oxalate ; Fe_{CBD} : Iron extracted by Citrate –Bicarbonate-Dithionite ; Fe_{pyro} : Iron extracted by sodium pyrophosphate (0,1M) ; Fe_{total} : total Iron. Mean values and Standard Deviation (S.D.)

Plots	Organic Matter (%)			pH_{H_2O}	Different forms of iron ($\mu g \cdot g^{-1}$ dry soil)						
	O.M.	C	C:N		Fe_{hydro}	Fe_{ech}	Fe_{acido}	Fe_{Tamm}	Fe_{CBD}	Fe_{pyro}	Fe_t
L14S	0.30 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.00	8.48 $\pm$ 0.52	4.9 $\pm$ 0.02	23 $\pm$ 1	0.5 $\pm$ 0.001	84 $\pm$ 5	433 $\pm$ 13	550 $\pm$ 40	800 $\pm$ 70	2310 $\pm$ 200
L14NS	0.31 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.01	9.14 $\pm$ 0.47	4.8 $\pm$ 0,6	18 $\pm$ 3	0.5 $\pm$ 0.001	64 $\pm$ 20	360 $\pm$ 50	570 $\pm$ 9	750 $\pm$ 200	2200 $\pm$ 500
L25S	0.57 $\pm$ 0.14	0.33 $\pm$ 0.08	10.88 $\pm$ 0.68	5.4 $\pm$ 0.01	25 $\pm$ 11	0.5 $\pm$ 0.001	178 $\pm$ 4	460 $\pm$ 20	650 $\pm$ 23	520 $\pm$ 30	3030 $\pm$ 20
L25NS	0.64 $\pm$ 0.05	0.37 $\pm$ 0.03	11.20 $\pm$ 0.33	5.2 $\pm$ 0.1	22 $\pm$ 7	0.5 $\pm$ 0.001	80 $\pm$ 1	430 $\pm$ 30	640 $\pm$ 20	422 $\pm$ 20	3610 $\pm$ 100

Table 2: Kinetic reaction of glucose consumption and iron dissolution during 30 days of incubation.

$K=1/\tau$ (day⁻¹) τ : time characteristic. First order reaction with $p>5\%$.

bacterial consortium	Kinetic of glucose consumption		Kinetic of iron dissolution	
	0% NaCl	3% NaCl	0% NaCl	3% NaCl
	k	k	k	k
S1	0.151 ± 0.01	0.139 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.02
S2	0.091 ± 0.01	0.091 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.22 ± 0.03
S6	0.107 ± 0.01	0.125 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.31 ± 0.05
S8	0.317 ± 0.02	0.151 ± 0.01	0.76 ± 0.2* 0.02 ± 0.01**	0.11 ± 0.03

* calculated in the range of 2 to 8 days

** calculated in the range of 8 to 30 days

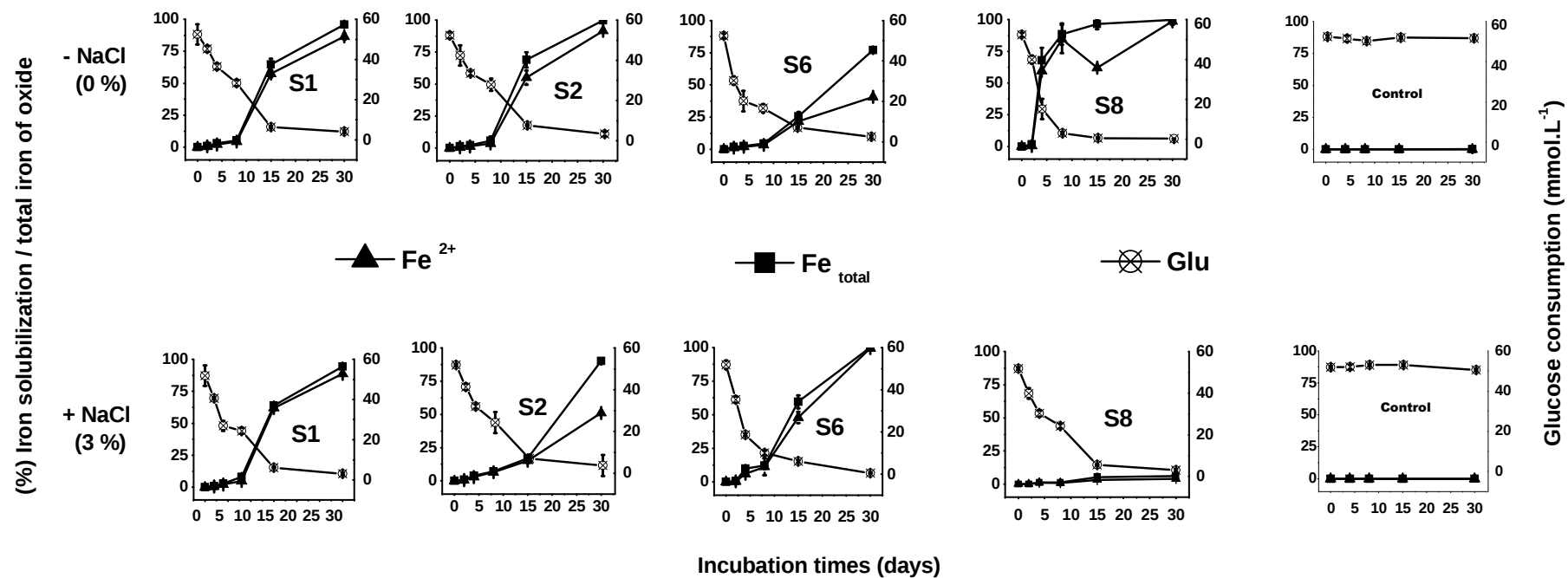


Figure 1: Iron solubilization and glucose consumption in culture media with or without salt by different bacterial consortia S1, S2, S6, S8. Control (abiotic treatment). 3 replicates. Bar (I): Standard Deviation.

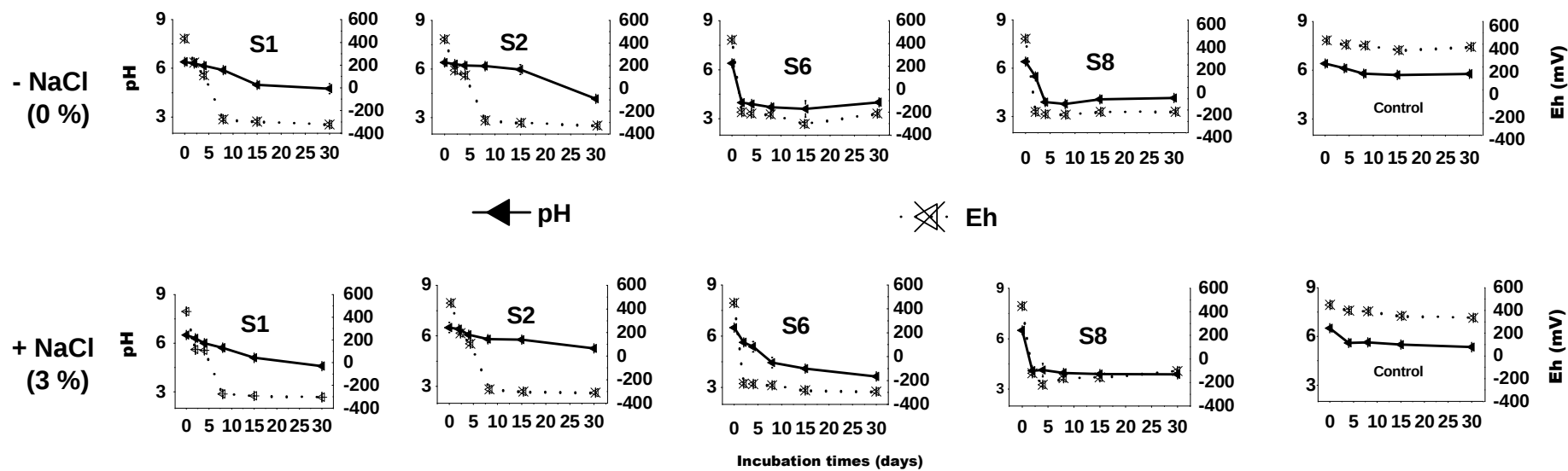


Figure 2: pH and Eh evolution in culture medium with or without salt inoculated by the bacterial consortia S1, S2, S6, S8. Control (abiotic treatment). 3 replicates. Bar (I): standard deviation.

Table 3: Organic acids released by bacterial consortia cultivated in Bromfield medium

Consortium	times	organic acids (ppm)						Consortium	times	organic acids (ppm)							
S1	(days)	gluconic	succinic	lactic	acetic	propionic	Butyric	S2	(days)	gluconic	succinic	lactic	acetic	propionic	butyric		
non saline (0% NaCl)	2	116.1	84.1	14.3	17	0	0	non saline (0% NaCl)	2	7.0	90.3	41.2	11.2	0	0		
	4	57	41.1	23.2	0	0	0		non saline (0% NaCl)	4	133.5	43.0	18.0	2.9	0	0	
	15	100.4	67.1	721.7	155.5	0	0			non saline (0% NaCl)	15	42.6	23.7	164.2	263.3	32.1	1
	30	121.4	68.1	744.1	219.7	0	0				non saline (0% NaCl)	30	20.9	15.1	21.0	60.5	26.1
saline (3 % NaCl)	2	268.5	177.4	105.8	135.7	0	0	saline (3 % NaCl)				2	43.8	1.3	3.6	18.3	23.9
	4	286.5	161	40.4	33.8	0	0		saline (3 % NaCl)			4	42.1	6.5	4.3	0	22.7
	15	130	174.1	3256.7	14.6	0	0			saline (3 % NaCl)		15	180.6	157.2	232.2	1072	0
	30	17	139.9	521.9	1517.5	0	0				saline (3 % NaCl)	30	119.1	87.6	222.1	1245.4	0
Consortium	times	organic acids (ppm)						Consortium	times			organic acids (ppm)					
S6	(days)	gluconic	succinic	lactic	acetic	propionic	Butyric	S8	(days)	gluconic		succinic	lactic	acetic	propionic	butyric	
non saline (0% NaCl)	2	80.6	1058.7	305.7	172.2	407.5	0	non saline (0% NaCl)	2	145.3	65.6	61.1	150.9	0	0		
	4	0	1747.8	18.3	1743.7	364.5	0		non saline (0% NaCl)	4	51.9	333.1	55.9	2584	45.9	0	
	15	4.4	1149.4	0	1912.7	339.3	0			non saline (0% NaCl)	15	0	1098.9	3.4	3406.4	66.5	0
	30	46.3	1556.5	58.8	1445.7	263.1	0				non saline (0% NaCl)	30	0	2475.9	29.5	4509	148.3
saline (3 % NaCl)	2	219.3	625.6	1427.6	201.9	451.2	0	saline (3 % NaCl)				2	52.6	96.2	101.7	41.7	36.6
	4	109.3	883.5	1717.7	320.5	222.9	0		saline (3 % NaCl)			4	25.6	11.2	23.4	132.1	6.5
	15	28.9	434.8	1807.9	22.3	131.3	0			saline (3 % NaCl)		15	27.1	12.3	4.2	384.4	27.4
	30	57.2	595.5	1720.6	51.5	105.8	0				saline (3 % NaCl)	30	25.7	24.8	19.6	106.6	19.3

Table 4: Identification of population in the bacterial consortia species by sequencing of 16S rRNA TTGE bands and phylogenetic affiliation using BlastN

TTGE bands	Concentration of NaCl where bands were detected	Closest relative species	% identity	Taxonomy	metabolism	Characteristic	References
a	0 % and 3%	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	98	Firmicutes	Fermenting	Gram-positive, Anaerobic. Produce several toxin and organic acids through fermentation of a variety of carbon source	Nölling and al., 2001
b	0 % and 3%	<i>Shewanella sp.</i>	100	Gamma Proteobacteria	Fermenting and iron respiring	Facultatives Anaerobic, Gram-negative, isolated from aquatic environment, sediments and oil fields.	McLeod and al., (2002); Vogel and al., (1997); Arnold and al., (1990);
c , k	0 % and 3%	<i>Shewanella putrefaciens</i>	100, 96			Abundance in marine waters and sediments suggest an important role in the turnover of organic matter in saline environment	
d	0 % and 3%	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	100			Aerobic, Gram-positive, Extremely halotolerant and alkaliphilic bacterium, isolated from deep-sea sediment, optimum concentration of NaCl for growth was 3% at pH 6.5 to 9.5.	Lu and al., (2001)
e	0 %	<i>Paenibacillus sp.</i>	100	Firmicutes	Fermenting	Facultative anaerobic bacterium, Gram positif growth inhibited by 10% NaCl, Observed in iron reduction	Ash and al., (1993); Petrie and al., (2003)
f	3%	<i>Virgibacillus sp.</i>	100			Gam Positive, facultatively anaerobic, Growth is stimulated by 4% NaCl and not inhibited by 10% NaCl	Heyndrickx and al., (1998); Jiang et al., (2007)
g , p	0 % and 3%	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i>	97	Firmicutes	Iron Respiring	Strict anaerobe, Gram Positive, Growth during iron reduction occurred over the pH range of 7.5 to 11.0 (optimum, pH 9.5), a sodium chloride range of 0 to 80 g/liter (optimum, 20 g/liter),	Ye and al., (2004)
h	0 % and 3%	<i>BacteriumVNS₃-1-2</i>	99	Gamma Proteobacteria	Fermenting and iron respiring	Gram-negative	
i	0 %	<i>Enterobacter sp.</i>	100				
j	0 % and 3%	<i>Enterobacter cloacae</i>	99				
l	0 % and 3%	<i>Clostridium beijerinckii</i>	99	Firmicutes	Fermenting	Gram positive, Anaerobic strict	
m	0 % and 3%	<i>Clostridium sp.</i>	100				
n	0 % and 3%	<i>Bacillus sp.</i>	100		Fermenting		
o	3%	<i>Bacillus megaterium</i>	100				

Table 5: Evolution of species and of organic acids released

Consortiums S1		Without salt				With salt			
species	evolution	2	4	15	30	2	4	15	30
a		+	+	+	+	-	-	+	+
b		+	+	+	+	+	+	+	+
c		+	+	+	+	+	+	+	+
d		-	-	+	+	-	-	+	+
acids released									
gluconic		+	-	+	+	++	++	+	-
succinic		+	-	+	+	+	+	+	+
lactic		-	-	++	++	++	-	++++	++
acetic		-	-	+	++	+	-	-	+++
propionic		-	-	-	-	-	-	-	-
butyric		-	-	-	-	-	-	-	-

Consortiums S6		Without salt				With salt			
species	evolution	2	4	15	30	2	4	15	30
g		-	-	-	-	-	-	-	-
h		-	-	+	+	+	+	-	-
i		+	+	+	+	-	-	-	-
j		+	+	+	+	-	-	-	-
k		-	-	-	-	+	+	-	-
acids released									
gluconic		+	-	-	-	++	+	-	-
succinic		+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
lactic		++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
acetic		+	+++	+++	+++	++	++	-	-
propionic		++	++	++	++	++	++	+	+
butyric		-	-	-	-	-	-	-	-

Consortiums S2		Without salt				With salt			
species	evolution	2	4	15	30	2	4	15	30
b		+	+	+	+	+	+	+	+
c		+	+	+	+	+	+	+	+
e		-	-	+	+	-	-	-	-
f		-	-	-	-	-	-	+	+
acids released									
gluconic		+	+	-	-	-	-	+	+
succinic		+	-	-	-	-	-	+	+
lactic		-	-	+	-	-	-	++	++
acetic		-	-	++	+	-	-	+++	+++
propionic		-	-	-	-	-	-	-	-
butyric		-	-	-	-	-	-	-	-

Consortiums S8		Without salt				With salt			
species	evolution	2	4	15	30	2	4	15	30
l		+	+	-	-	-	+	+	+
m		-	+	+	+	-	+	+	+
n		-	+	+	+	+	+	+	+
o		-	-	-	-	+	+	+	+
p		-	-	-	-	+	+	+	+
acids released									
gluconic		-	-	-	-	-	-	-	-
succinic		-	++	+++	++++	+	-	-	-
lactic		+	-	-	-	+	-	-	-
acetic		+	++++	++++	+++++	-	+	++	+
propionic		-	-	+	+	-	-	-	-
butyric		-	-	-	-	-	+	++	++

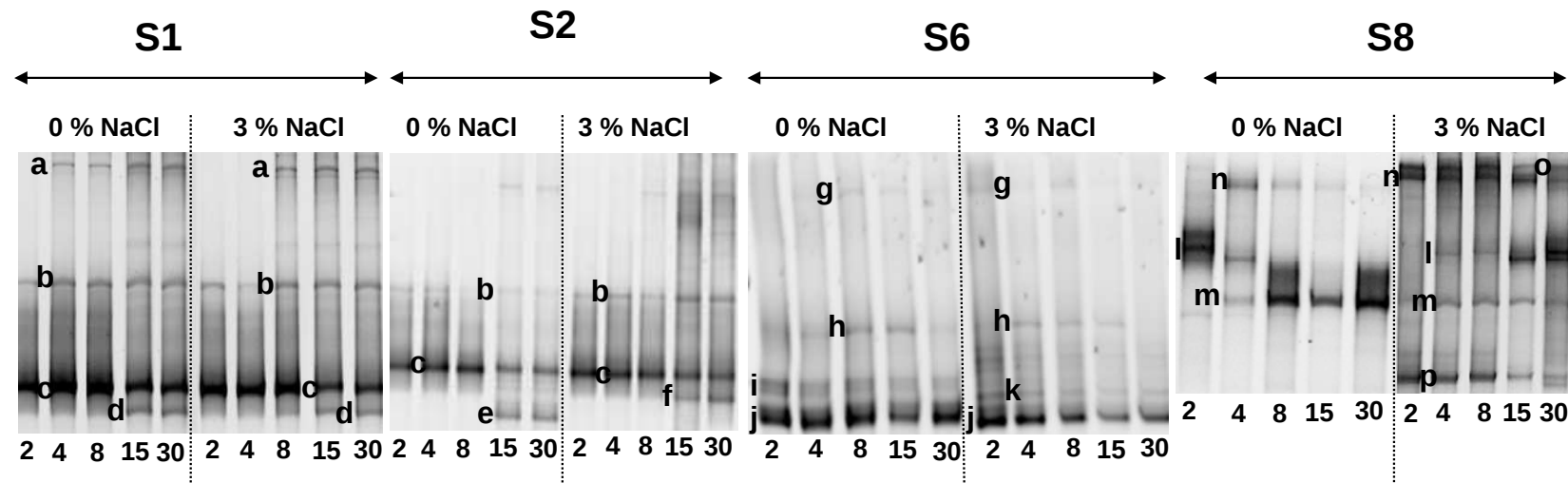


Figure 4: TTGE gel of 16S rRNA PCR products from the 4 bacterial consortia studied (S1, S2, S6 and S8). Community structure analysis have been performed along time after 2,4,8,15 and 30 days of incubation in presence or absence of salt (3 or 0 % NaCl). Profiles were similar for the three replicate flasks, thus only one TTGE profile was showed for clarity. Letters indicate the different bands that have been sequenced for phylogenetic identification presented in the Table 4.

Chapitre 5 : Communautés cultivables, activités ferri- réductrices et identification de populations bactériennes impliquées dans des sols de bas-fonds affectés par la toxicité ferreuse (Côte d'Ivoire)**5.1. Introduction**

En Afrique de l'Ouest, plus de 30 % de l'aire totale de la production rizicole est localisée dans les bas fonds, qui sont des milieux où peuvent se manifester des phénomènes de toxicité ferreuse. C'est une des contraintes édaphiques majeures rencontrée en Afrique de l'Ouest (**Audebert et al., 2006**). En Côte d'Ivoire, plus de 55% des surfaces cultivées en riz sont soumis à cette contrainte (**Chérif et al., 2006**). La toxicité ferreuse peut intervenir lorsque d'importantes teneurs en fer allant de 300 ppm à 600 ppm sont présentes dans la solution du sol (**Diatta et al., 1998a**). Dans les sols engorgés, en conditions réductrices, la solubilisation de grandes quantités de fer sous forme d'ions ferreux entraîne un déséquilibre en éléments provoquant un désordre nutritionnel qui affecte la croissance des cultures, notamment celle du riz. Les pertes moyennes de rendement dues à la toxicité ferreuse se situent autour de 45% (**Audebert et al., 2006**).

Plusieurs études (**Audebert, 2006a, 2006b**) ont été menées pour comprendre l'origine de la toxicité ferreuse. Selon Audebert (**2006a**) cette situation peut se mettre en place si les sols sont riches en fer ferreux, ont un pH acide, de faibles valeurs en CEC, en phosphore et en zinc, et s'ils présentent un excès de H₂S. De plus, des études de caractérisations physico-chimiques des eaux d'irrigation et des sols menées par Audebert (**2006b**) révèlent des potentiels redox (110-125mV) bas, de faibles teneurs en oxygène (< 4 mg.l⁻¹) des eaux, ainsi qu'une forte teneur en carbone organique des sols qui peuvent avoir un effet favorable sur la réduction du fer. La toxicité ferreuse pourrait aussi être provoquée par une intense réduction bactérienne du fer, en condition d'engorgement très réducteur (**Neue et al., 1998; Becker & Asch, 2005**).

L'étude dont ce chapitre rend compte vise à rechercher et à caractériser les communautés bactériennes cultivables, à préciser l'activité des consortia bactériens isolés, et à déterminer les principales populations impliquées pour définir l'origine des fortes teneurs en fer ferreux.

5.2. Protocoles d'études**5.2.1. Sites et échantillons de sol**

Cette étude a été réalisée sur deux bas-fonds du Centre Ouest de la Côte d'Ivoire, dans la région de Gagnoa : le bas fond de la station de recherche CNRA de Gagnoa (GAG) et celui de Guéssihio (GUE). Les échantillons de sol proviennent des horizons de surface (0-20cm) de rizières. Ils ont été prélevés dans les parcelles plantées (F1) et non plantées en riz (A15) pour le site de Gagnoa, et (G1) et (G1') pour le site de Guéssihio.

Les caractéristiques des toposéquences des sols de ce site et les propriétés chimiques des sols ont été décrites au chapitre 3.

5.2.2. Procédures expérimentales

Les conditions expérimentales, les méthodes utilisées pour la recherche et le dénombrement des communautés bactériennes cultivables "totales" aérobies, anaérobies ; ferri et sulfato réductrices, leurs activités ferri-réductrices pour la détermination des espèces bactériennes impliquées, sont décrites dans le chapitre 2, au paragraphe 2.3.

5.3. Résultats

5.3.1. Dénombrement des communautés bactériennes cultivables

Sur les deux sites d'étude (Gagnoa et Guéssihio), les différentes communautés bactériennes (aérobies, anaérobies, IRB, BrFe et SRB) cultivables dénombrées sont de l'ordre de 10^6 à 10^7 bactéries g^{-1} sol sec (*Tableau 5.1*). Sur le site de Gagnoa, on observe un nombre significativement plus important ($P_{To} < 0,0001$) de bactéries aérobies par rapport aux anaérobies sur la parcelle non plantée (A15), alors que sur la parcelle plantée, il y a significativement ($P_{To} < 5\%$) plus de bactéries anaérobies que de bactéries aérobies (*Tableau 5.2*).

A l'exception de la parcelle F1, les communautés bactériennes réductrices du fer (Ferri) dénombrées sur les milieux IRB et BrFe sont significativement moins importantes ($P_{Ferri} < 0,0001$) que les microflore anaérobies, quels que soient le site et la parcelle étudiés (*Tableau 5.2*). Sur les parcelles plantées, les bactéries réductrices du fer dénombrées sur le milieu IRB (milieu avec citrate de fer et acétate comme source de carbone) sont significativement ($P_{Fe} < 5\%$) plus nombreuses que celles dénombrées sur le milieu BrFe (milieu avec goethite et glucose comme source de carbone). Sur la parcelle non plantée, on observe l'absence d'effet significatif entre les communautés IRB et BrFe.

Tableau 5.1: Différentes communautés bactériennes cultivables dénombrées sur les parcelles **plantées (Plté)** en riz (F1) et **non plantée (N Plté)** en riz (A15) du site de **Gagnoa** et sur les parcelles plantées en riz (G1) et non plantée en riz (G1') du site de **Guéssihio**. Nombre de bactéries. $10^5 g^{-1}$ sol sec. IRB (bactéries ferri-réductrice); BrFe (bactéries fermentaires ferri-réductrices sur milieu Bromfield) ;

SRB (Bactéries sulfato réductrices). P : écarts significatifs entre les moyennes des dénombrements de la parcelle plantée et non plantée selon le test de comparaison de moyenne de Statistica.

a -Gagnoa			
Communautés bactériennes	F1 Plté	A15 (N Plté)	P
Aérobic	7,3 ± 2,2	26,8 ± 7,5	< 0,0001
Anaérobic	8,2 ± 1,1	7,2 ± 1,2	< 0,0001
IRB	7,4 ± 0,7	1,5 ± 0,2	< 0,0001
BrFe	5,2 ± 1,9	1,6 ± 0,7	< 0,0001
SRB	27,5 ± 7,3	43,3 ± 0,2	< 0,0001
b-Guessihio			
	G1 Plté	G1' (N Plté)	P
Aérobic	31 ± 9,3	8,8 ± 3	< 0,0001
Anaérobic	21,2 ± 7,1	16,2 ± 4,6	< 0,0001
IRB	6,3 ± 1,6	5,5 ± 1,4	0,002
BrFe	5 ± 0,9	5,1 ± 1	0,71
SRB	93,2 ± 23,6	134 ± 25,2	< 0,0001

Tableau 5.2 : Comparaison des communautés bactériennes dénombrées sur les parcelles plantées (Plté) en riz (F1) et non plantée (N Plté) en riz (A15) du site de Gagnoa et sur les parcelles plantées en riz (G1) et non plantée en riz (G1') du site de Guéssihio. IRB (bactéries ferri-réductrice); BrFe (bactéries fermentaires ferri-réductrice sur milieu Bromfield) ; SRB (Bactéries sulfato réductrices). Ferri : communautés bactériennes totales réductrices du fer (IRB+BrFe). $P_{To,Fe,Ferri}$: écarts significatifs entre les moyennes des communautés aérobies et anaérobies ; ferri réductrices et fermentaires et ferri réductrices et anaérobies des parcelles plantées et non plantées selon le test de comparaison de moyenne de Statistica.

Parcelles	Aérobic	Anaérobic	P_{To}	IRB	BrFe	P_{Fe}	Ferri	Anaérobic	P_{Ferri}
F1 (Plté)	7,3 ± 2,2	8,2 ± 1,1	0,0023	7,4 ± 0,7	5,2 ± 1,9	< 0,0001	11,6 ± 2,6	8,2 ± 1,1	< 0,0001
A15 (N Plté)	26,8 ± 7,5	7,2 ± 1,2	< 0,0001	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,7	0,2458	3,1 ± 0,9	7,2 ± 1,2	< 0,0001
G1 (Plté)	31 ± 9,3	21,2 ± 7,1	< 0,0001	6,3 ± 1,6	5 ± 0,9	< 0,0001	11,3 ± 2,5	21,2 ± 7,1	< 0,0001
G1' (N Plté)	8,8 ± 3	16,2 ± 4,6	< 0,0001	5,5 ± 1,4	5,1 ± 1	0,0505	10,6 ± 2,4	16,2 ± 4,6	< 0,0001

En général, sur les deux sites (Gagnoa et Guéssihio), on observe, de façon significative, un nombre plus élevé de bactéries réductrices du fer (IRB et BrFe) et de bactéries anaérobies sur les parcelles plantées en riz (F1 et G1), par rapport aux parcelles non plantées (A15 et G1') (Tableau 5.2). Par contre, le nombre de bactéries sulfato réductrices (SRB) de 3 à 13.10^6 bactéries.g⁻¹ de sol sec est significativement plus important sur la parcelle non plantée que sur la parcelle plantée (avec $P <$

0,0001). On constate également que les bactéries sulfato réductrices (SRB) sont plus nombreuses que toutes les autres communautés bactériennes dénombrées, y compris les bactéries ferri-réductrices ($p < 5\%$). (Figure 5.1).

Les communautés bactériennes totales (aérobies et anaérobies) dénombrées sur milieu nutritif Broth (NB) sont dans l'ensemble significativement ($p < 5\%$) plus importantes que les bactéries ferri réductrices (Figure 5.1) mais, significativement moins nombreuses que les communautés bactériennes réduisant le sulfate.

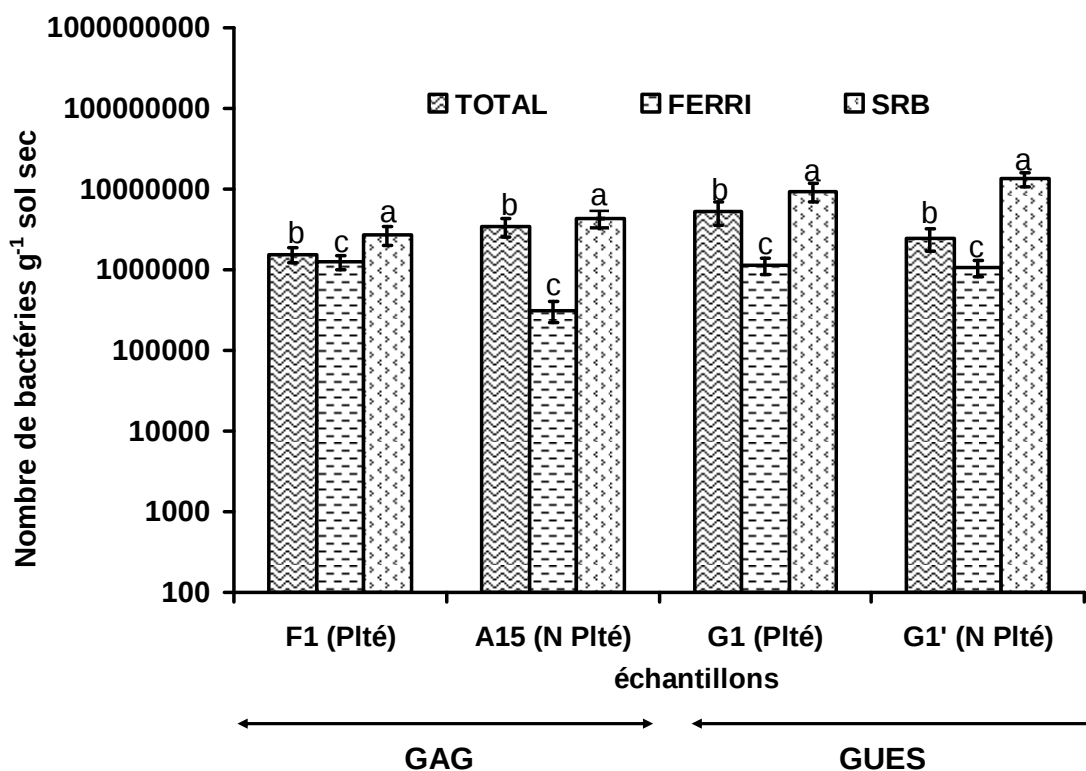


Figure 5.1 : Différentes communautés bactériennes cultivables dénombrées sur les parcelles **plantées (Plté)** en riz (F1,G1) et **non plantées (N Plté)** en riz (A15,G1') du site de Gagnoa (GAG) et du site de Guéssihio (GUES). Totale : Aérobie + Anaérobie ; Ferri= IRB + BrFe; SRB (Bactéries sulfato réductrices). a,b,c : groupes homogènes entre les différentes communautés bactériennes selon le test de Student de Newman- Keuls, avec $p < 0,05\%$.

5.3.2. Activités des consortia bactériens isolés des sols plantés en riz (F1 et G1) dans le milieu Bromfield avec glucose ou acétate

5.3.2.1. Evolution des paramètres du milieu (Eh, pH, fer et source de carbone)

❖ Traitements abiotiques

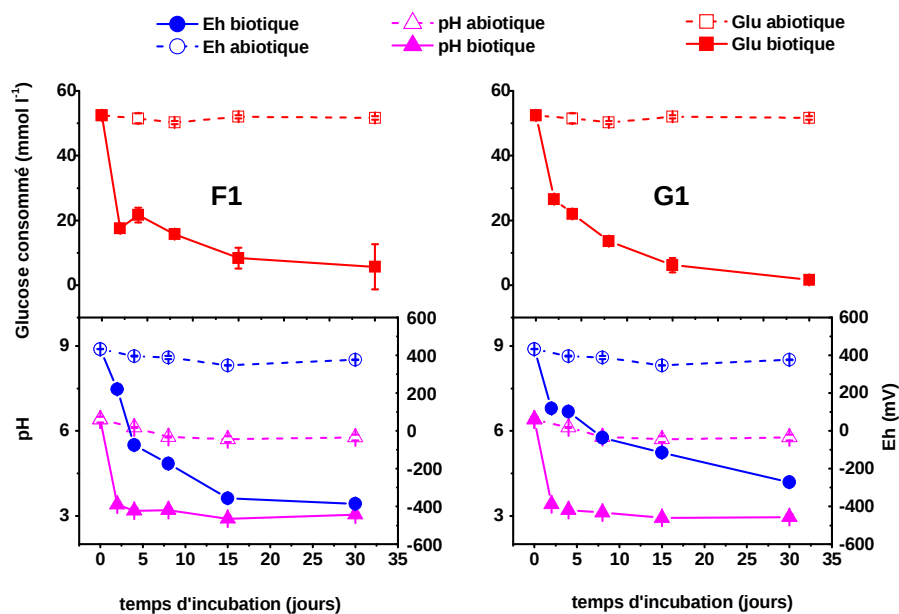
Dans l'ensemble, des traitements abiotiques (sans les consortia bactériens), il n'y a pas de variation des différents paramètres (*Figure 5.2*) dans les deux milieux BrFe avec glucose et avec acétate. Le Eh reste compris entre 400 et 380 mV, et le pH entre 6 et 5,80. Le glucose ou l'acétate restent constants après 30 jours d'incubation et ne sont pas consommés. Le fer réduit et le fer total solubilisé par rapport à la quantité de fer total apporté par l'oxyde est inférieur à 1% (*Figure 5.2*). Il y a lieu de souligner que le fer solubilisé est essentiellement sous forme Fe^{2+} .

❖ Traitements biotiques dans le milieu BrFe avec glucose (Glu) ou acétate (Acé)

Les résultats des traitements biotiques (en présence des consortia bactériens F1 et G1), montrent une baisse rapide du Eh, qui varie de 450 à -450mV après 30 jours d'incubation dans le milieu BrFe + Acé ou Glu, et une forte consommation de la source de carbone additionnée (Glu ou Acé). Néanmoins, on observe une consommation plus rapide de l'acétate (disparition complète de l'acétate après 15 jours) par rapport au glucose (consommé après 30 jours) par les deux consortia bactériens F1 et G1. En effet, la plus grande partie de l'acétate (plus de 90 %) est consommée en moins de 4 jours (*Figure 5.2*). On remarque une acidification du milieu BrFe +Glu, avec une diminution du pH variant de 6 à 3 et une alcalinisation du milieu BrFe+Acé, avec le pH croissant de 6 à 7,5 quel que soit le consortium bactérien utilisé (*Figure 5.2*).

La dissolution de l'oxyde de fer (goethite) se révèle par une augmentation rapide des teneurs en fer en solution (II et III) dans les milieux avec glucose, avec plus de 90% d'oxyde dissout après 15 jours d'incubation pour les deux consortia (*Figure 5.3*). Par contre, en présence d'acétate, moins de 1% de l'oxyde est dissous. Le fer soluble diminue jusqu'à 0,3% au bout de 30 jours d'incubation. On observe donc deux types de dynamique du fer comme mentionné avec les consortia isolés des sols de rizières de Thaïlande, qui dépendent de la source de carbone et d'énergie utilisée ainsi que des conditions du milieu (pH).

a- Glucose



b- Acétate

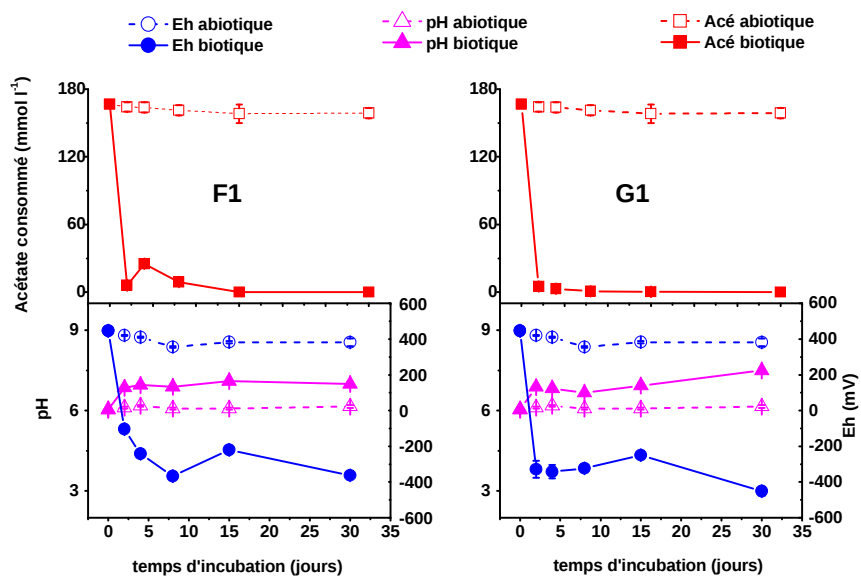


Figure 5.2 : Evolution des paramètres (pH, Eh, **acétate ou glucose** consommé) du milieu BrFe en fonction du temps d'incubation (jours) en présence des consortia bactériens (F1 et G1) (biotique) et dans les témoins (abiotique)

Chapitre 5 :

Communautés cultivables, activité ferri- réductrices et identification de populations bactériennes impliquées dans des sols de bas-fonds affectés par la toxicité ferreuse (Côte d'Ivoire)

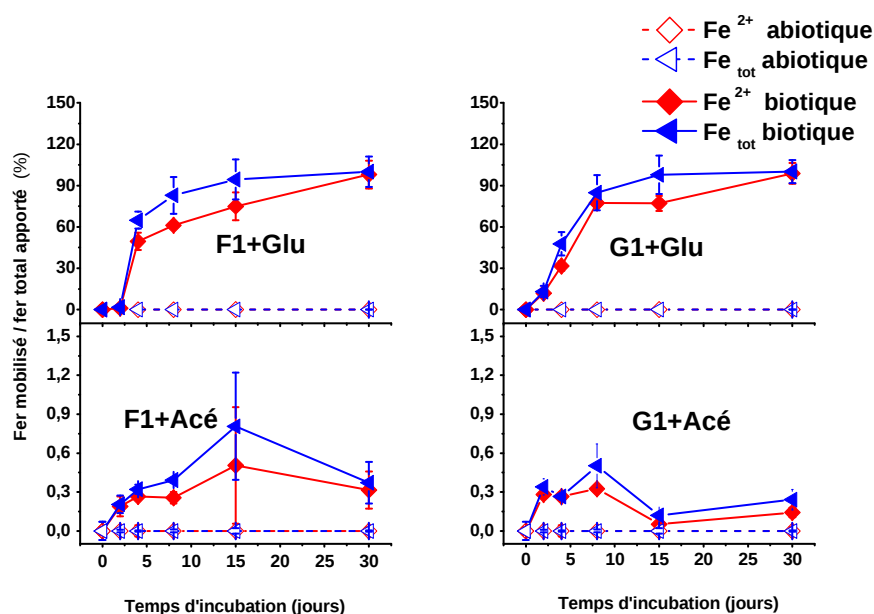


Figure 5.3: Fer solubilisé (fer réduit et fer total) en fonction du temps d'incubation (jours) par les consortia bactériens (F1 et G1) dans le milieu BrFe avec le **glucose** (Glu) ou l'**acétate** (Acé).

Toutefois, l'extraction de Fe(II) par 5ml HCl (0,5N) sur le culot restant montre la présence d'une importante quantité de fer réduit acidosoluble dans le milieu avec acétate. On observe sur la phase solide, plus de 95% de fer réduit (fer acido soluble) avec les deux consortia (Tableau 5.3). En revanche, dans le milieu avec glucose, moins de 1% de fer est retrouvé sous forme réduite acidosoluble sur la phase solide.

Dans les témoins abiotiques, on extrait moins de 1% de fer réduit acidosoluble. En fait, les rendements de la réduction du fer sont très voisins dans les deux milieux.

Tableau 5.3 : Fer réduit hydrosoluble (HYDRO) et acidosoluble (ACIDO) après 30 jours d'incubation par les consortia bactériens (F1 et G1) dans le milieu BrFe avec, soit de l'acétate (Acé) soit du glucose (Glu).

Echantillons	(% Fe ²⁺ mobilisés / Fe _{total} apportés)			
	BrFe+ Acé		BrFe+ Glu	
	Hydro	Acido	Hydro	Acido
F1	0,3 ± 0,1	95,9 ± 6,2	98 ± 10	0,2 ± 0,1
G1	0,1 ± 0,04	96,8 ± 6,9	98,9 ± 7,6	0,90 ± 0,02
Témoin abiotique	0 ± 0	0,1 ± 0,02	0,02 ± 0,001	0,1 ± 0,01

5.3.2.2. Acides organiques produits

Le *Tableau 5.4* indique la nature et les quantités d'acides organiques produits au cours de la solubilisation du fer dans le milieu BrFe, avec, soit de l'acétate, soit du glucose. Dans le milieu avec acétate, on observe principalement la formation d'acide propionique (65 à 189 ppm) et peu d'acide pyruvique (0,2 à 0,4 ppm), parallèlement à la consommation de l'acétate, alors que dans le milieu avec glucose, les voies fermentaires sont majoritaires, comme l'indique la production d'acide lactique (10000 à 24000 ppm), puis, en moindre quantité, d'acides propionique, acétique, succinique et pyruvique, après 30 jours d'incubation. Ceci suggère un consortium de bactéries fermentaires conséquent et diversifié.

Dans le milieu avec acétate, il pourrait aussi se développer des activités fermentaires comme l'indique la production d'acide propionique.

Tableau 5.4 : *Acides organiques présents dans le milieu BrFe avec du glucose ou de l'acétate en présence des consortia bactériens isolés F1 et G1, après 30 jours d'incubation*

Acides organiques (mg.l ⁻¹)	Milieu BrFe + Acétate		Milieu BrFe + Glucose	
	F1	G1	F1	G1
Gluconique	0	0	1,1	0,3
Pyruvique	0,2	0,4	65	211
Lactique	0	0	10781	24086
Succinique	0	0	285	224
Propionique	66	189	149	1454
Acétique	3,4	3	1509	664

5.3.2.3. Relations de corrélations entre les différents paramètres

Des analyses corrélatives (*Figure 5.4; 5.5 et 5.6*) effectuées entre les différents paramètres du milieu BrFe contenant, soit de l'acétate, soit du glucose, et en présence des deux consortia bactériens montrent des relations significatives pour $p < 0,01$ dans leur évolution au cours des incubations.

- Dans le milieu BrFe, avec comme source de carbone de l'acétate (BrFe+Acé), deux phases de corrélation entre le pH et les quantités de fer ferreux solubilisés (*Figure 5.4*), sont observées : l'une positive (avec $r^2_1 = 0,98$ pour F1 et $r^2_1 = 0,99$ pour G1), en début de culture, et l'autre négative, en fin de culture (avec $r^2_2 = 0,95$ pour F1 et $r^2_2 = 0,91$ pour G1). Pour ces deux consortia bactériens, une phase de dissolution de

l'oxyde de fer se manifeste par une augmentation de la quantité de fer ferreux dans le milieu, jusqu'à pH 6,7 ; puis, une seconde phase de précipitation (adsorption) du fer ferreux en conditions alcalines et, sans doute, quand les teneurs en fer solubles sont trop élevées. Cette immobilisation du fer correspond à la "production" de fer acidosoluble "adsorbé". Les corrélations hautement négatives et significatives ($p < 0,01$) entre les quantités de fer solubilisées et le Eh ($0,95 < r^2 < 0,96$) d'une part (Figure 5.4) et avec la consommation de l'acétate ($0,94 < r^2 < 0,97$) (Figure 5.5) d'autre part, reflètent l'influence des conditions alcalines du milieu, et non pas la réduction du fer, qui est très forte, comme le montrent les quantités de fer acidosolubles observées.

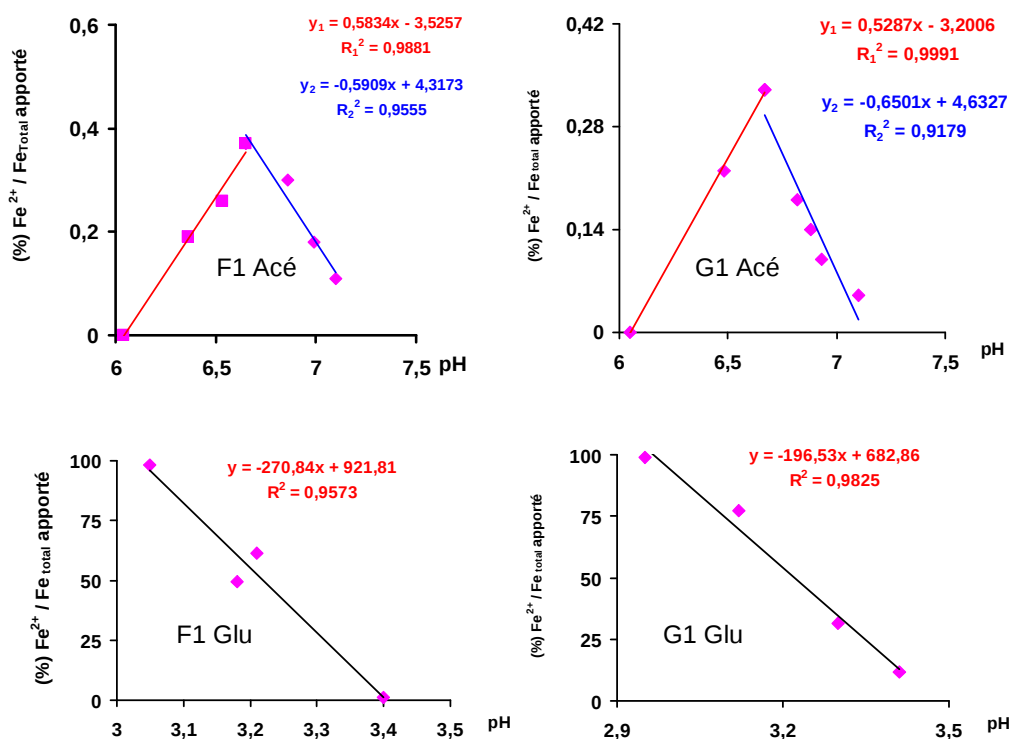


Figure 5.4: Corrélations entre le fer ferreux et le pH du milieu BrFe avec acétate ou glucose au cours de 30 jours d'incubation à $p < 0,001$

- Dans le milieu BrFe avec glucose (BrFe +Glu), les quantités de fer dissoutes sont hautement corrélées négativement avec le pH ($r^2=0,95$ et $r^2=0,98$) (Figure 5.4), le Eh ($r^2=0,96$ et $r^2=0,89$) (Figure 5.5) et la consommation du glucose ($r^2=0,84$ et $r^2=0,99$) (Figure 5.6) pour les 2 consortia F1 et G1.

Chapitre 5 :

Communautés cultivables, activité ferri- réductrices et identification de populations bactériennes impliquées dans des sols de bas-fonds affectés par la toxicité ferreuse (Côte d'Ivoire)

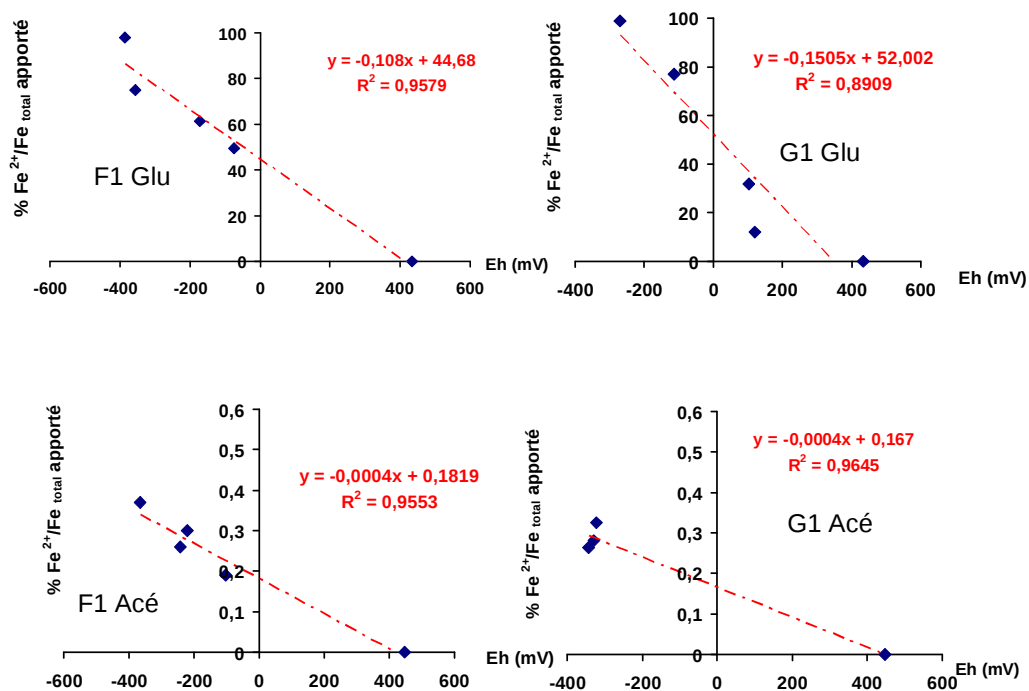


Figure 5.5 : Corrélation linéaire entre le fer ferreux et le Eh du milieu BrFe avec acétate ou glucose au cours de 30 jours d'incubation à $p < 0,001$

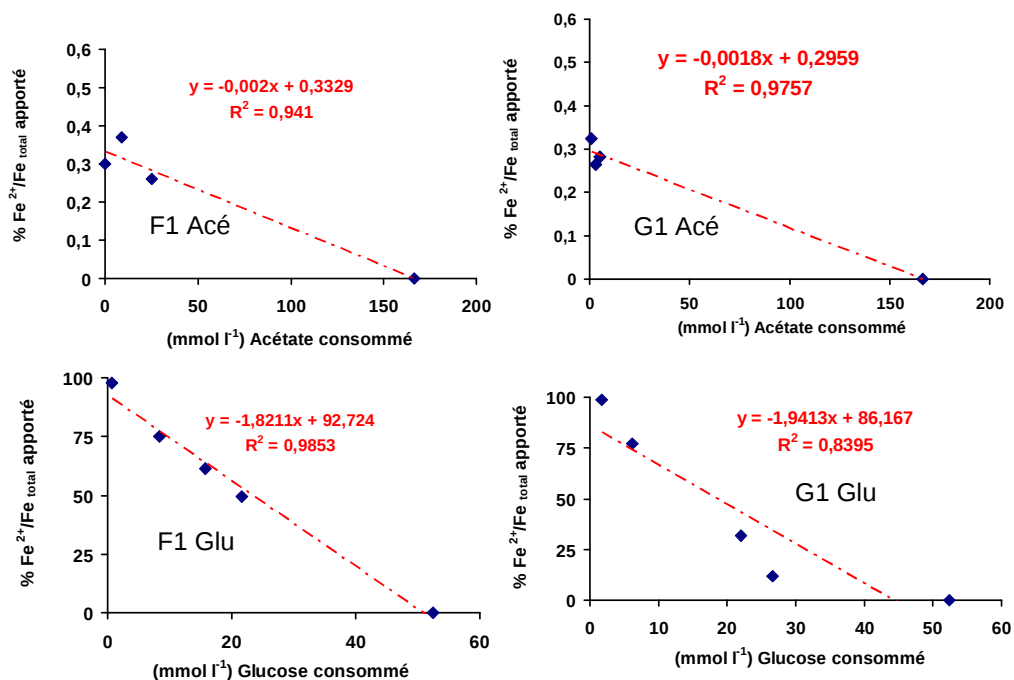


Figure 5.6 : Corrélation linéaire entre le fer ferreux et la source de carbone (glucose ou acétate) consommée pendant 30 jours d'incubation à $p < 0,001$

Il apparaît donc clairement, comme on pouvait le supposer, que la réduction et la solubilisation du fer, dans le milieu BrFe +Glu, sont liées à la consommation du glucose, à la forte diminution du potentiel redox (Eh) et à l'acidification du milieu. Dans le milieu avec l'acétate, la réduction, la dissolution et la précipitation du fer sont aussi liées à la consommation de l'acétate et à la diminution du potentiel redox. Dans ces conditions de milieu il serait important de suivre précisément la production de fer réduit, adsorbé, acidosoluble.

5.3.3. Identification des espèces bactériennes présentes dans les consortia

L'utilisation des techniques de PCR (Polymerase Chain Reaction)-TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel electrophoresis) de l'ADNr 16S pour les consortia bactériens (F1, G1), suivie de l'amplification des bandes, a permis d'observer la nature et l'évolution des communautés ferri-réductrices. On observe une variation du profil des consortia bactériens selon les cinétiques d'utilisation des sources de carbone et celle de réduction du fer en fonction du temps d'incubation (Figure 5.7). Les répétitions effectuées conduisent aux mêmes résultats et montrent une bonne homogénéité des expériences et analyses. *Bacillus sp.* est observée chez les deux consortia bactériens dans le milieu BrFe+Glu, alors que dans le milieu BrFe+Acé, *Thiobacillus sp.* et *Desulfovibrio desulfuricans* sont bien identifiées. L'espèce *Enterobacter sp.* est présente dans les deux milieux et les deux consortia.

L'intensité des bandes des espèces (*Bacillus sp* et *Desulfovibrio desulfuricans*) varie en fonction du temps. Dans l'ensemble, on observe une diminution de l'intensité des bandes des espèces *Bacillus sp.* et *Desulfovibrio desulfuricans* (bande a, b, f et g) à partir de 15 jours d'incubation pour le consortium F1. *Desulfovibrio desulfuricans* (bande f) pour le consortium G1 et *Thiobacillus sp.* (bande e) pour le consortium F1 sont visibles à partir de 8 jours dans le milieu BrFe+Acé quand l'acétate est consommé. Il y a donc dans ces consortia bactériens ferri réducteurs, des populations très diversifiées qui se développent en fonction d'une part, de la nature du substrat organique et, d'autre part, de l'évolution du milieu (dégradation des substrats et production de métabolites, évolution du pH et du Eh, réduction- solubilisation du fer). Dans le milieu avec glucose, deux populations dont les genres sont à préciser, *Bacillus sp* et *Enterobacter sp.*, sont impliquées dans le développement de voies fermentaires, comme en témoigne la production d'acides organiques. Pour les milieux contenant de l'acétate, la réduction bactérienne impliquerait sans doute des *Enterobacter sp.* qui seraient aussi responsables de processus fermentaires.

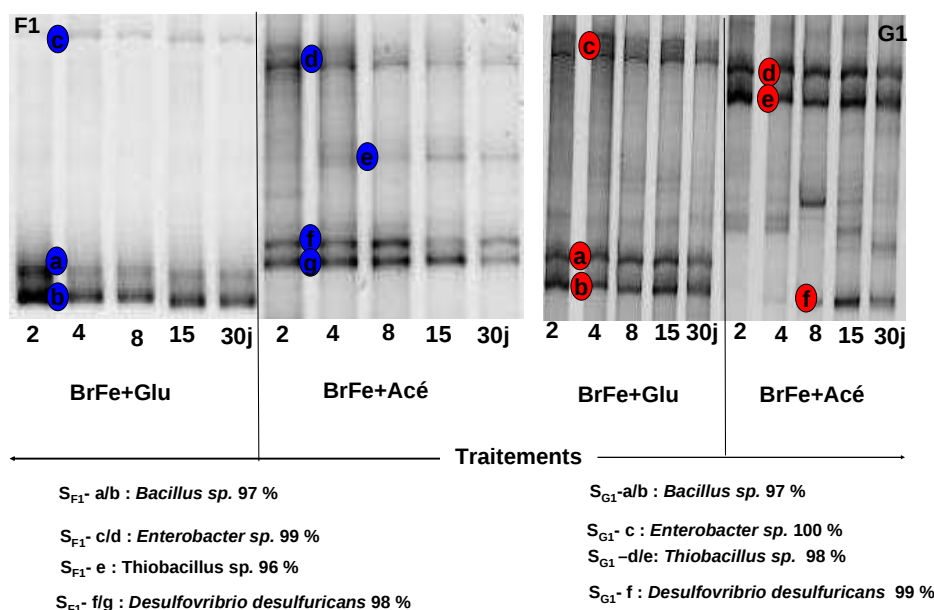


Figure 5.7 : Gels de TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) montrant les différents profils, des consortia bactériens (F1 et G1) isolés sur les parcelles plantées en riz, obtenus par la technique de PCR-TTGE sur l'ADNr 16S, après 30 jours de culture dans le milieu Bromfield (BrFe), avec, soit du glucose (BrFe+Glu), soit de l'acétate (BrFe+Acé)

La présence significative de *Desulfovibrio desulfuricans* et *Thiobacillus sp.* indique des bactéries impliquées dans les phénomènes d'oxydation – réduction du soufre. *Desulfovibrio desulfuricans* serait bien impliqué dans des processus de formation de sulfures (apparition de sulfures de fer noir dans les milieux au cours d'incubation). La nature et le rôle de *Thiobacillus sp.* méritent d'être précisés.

La dynamique et l'activité de ces populations dans les différents milieux est à mieux définir, en précisant leur nature et en suivant les consommations ou disparition de substrats organiques, la production de métabolites dans le milieu, ainsi que l'évolution des conditions d'acidité et de potentiel redox.

5.4. Discussion

Les dénombrements des communautés bactériennes cultivables (totale, ferri et sulfato réductrices) ont révélé la présence d'un nombre élevé de bactéries, de l'ordre 10^6 - 10^7 bactéries. g^{-1} sol sec. Cette abondance de bactéries peut être liée à la présence de quantités importantes de nutriments et à des conditions réductrices suffisamment convenables (**Quantin et al., 2001**). En effet, la teneur en matière organique de ces échantillons de sols est supérieure à 15% et leur rapport C/N tend vers 12. Ce qui signifie que les bactéries disposent, du point de vue nutritionnel, de quantités importantes de matière organique facilement décomposables (**Berthelin & DE Giudici, 1991**). La disponibilité de la matière organique est en effet un paramètre essentiel de la croissance microbienne (**Berthelin, 1982; Lovley & Woodward, 1996; Asakawa et al., 1998; Bousserhine et al., 1999**).

Les conditions particulières des sols de rizière maintenus submergés pendant une grande partie du cycle cultural, favorisent en effet l'activité des microorganismes anaérobies et stimulent les activités réductrices. Nos résultats montrent que le nombre de bactéries réductrices du fer représente plus de 80% de la microflore totale (aérobies et anaérobies). Ceci peut être lié à la nature et à la quantité de l'accepteur d'électrons (oxyde de fer) présent dans les sols. Selon Jäckel et Schnell (**2000**) la quantité d'accepteurs d'électrons présents dans l'environnement détermine la spécificité des processus microbiens. Ils ont ainsi observé une inhibition de la production du méthane dans les sols de rizières, après addition de fer III et de sulfate.

Le nombre élevé de bactéries ferri-réductrices sans doute non fermentaires (sur milieu IRB) par rapport aux bactéries ferri-réductrices fermentaires (milieu BrFe) peut favoriser l'utilisation de donneurs d'électrons comme H_2 , FeS_2 et d'accepteurs comme Fe^{3+} , NO_3^- , $Mn(IV)$,....

La présence de bactéries sulfato réductrices (SRB) en plus grand nombre que les autres communautés peut être liée d'une part, à des conditions d'anaérobiose stricte et à la présence de source de carbone convenable (**Sow, 2003; Stemmler & Berthelin, 2003**) et, d'autre part, à la nature ainsi qu'à la quantité de sulfate disponible dans les sols ou solutions de sol. En effet, d'importantes quantités de sulfate sont observées dans les sols (100 à 970 mg de soufre. kg^{-1} sol sec) et les eaux prélevées (30 à 150 mg de sulfate . l^{-1}) (chapitre 3). De même, une corrélation entre les teneurs et la dynamique des ions ferreux et le sulfate dans les eaux a été observée. Ce qui suggère la présence de source de soufre et de fer comme les sulfures de fer. La présence de populations de *Thiobacillus sp.* va aussi dans ce sens. La présence d'agrégats de complexes de sulfures de fer peut également expliquer ces résultats. Par ailleurs, (**Furusaka et al., 1991; Marchal et al., 2001**) ont montré que les bactéries SRB peuvent

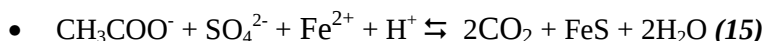
être présentes dans les agrégats de fer, ce qui contribuera à augmenter leur nombre, même dans la zone oxygène où leur survie et leur prolifération sont moindres. Cependant, les activités réductrices du sulfate ne se manifesteront que lorsque les conditions de donneur et d'accepteur d'électrons sont bien rencontrées (*Liesack et al., 2000*).

La plus forte quantité de bactéries SRB par rapport à la microflore totale peut être aussi due au fait que le milieu NB n'est pas adapté à la culture et au dénombrement des communautés bactériennes totales utilisant des substrats, aussi bien des donneurs (comme le lactate, le pyruvate,...) que des accepteurs d'électrons qui ne sont pas apportés dans le milieu NB.

La forte proportion des communautés bactériennes sulfato réductrices (SRB) présentes dans la parcelle non plantée par rapport à celle plantée en riz peut être liée à l'effet rhizosphérique défavorable du riz en raison de son apport en oxygène (*Liesack et al., 2000*).

Les incubations et cultures des consortia isolés montrent bien qu'ils sont à l'origine de la forte activité ferri-réductrice. Cette réduction bactérienne du fer est très forte (pratiquement totale), avec une forte dissolution de la goethite en présence du glucose quand le milieu s'acidifie, alors qu'elle est localisée à la phase solide (en présence de l'acétate) quand le milieu reste neutre ou s'alcalinise sensiblement. L'absence de fer en solution dans le milieu avec de l'acétate est liée à l'alcalinisation (pH= 7,5) du milieu, qui favorise une réprécipitation du fer solubilisé sous des formes colloïdales, organo-minérales,... qui sont à préciser. Cette alcalinisation peut avoir pour origine la présence d'ions alcalins Na⁺ (provenant de la biodégradation de l'acétate de Na) et la fixation de protons (H⁺) ainsi que la libération de (OH⁻) au cours de la réduction du fer. Par ailleurs, peu d'acides se forment dans le milieu contenant de l'acétate, seul l'acide propionique est observé en faible quantité alors qu'en utilisant le glucose les populations des consortia développent des conditions réductrices, mais produisent aussi des acides.

L'apparition de dépôts noirs dans les dispositifs contenant le milieu BrFe+Acé, en condition anaérobie, indique la présence d'activités sulfato-réductrices conduisant à la formation de sulfures, notamment de sulfures de fer, qui représentent le produit final des processus impliqués dans la réduction des sulfates (*Ehrlich, 1996*). Ainsi, le fer réduit en solution peut se trouver réprécipité sous forme de sulfure de fer peu ou pas cristallisé, donc facilement mobilisable, et, selon l'équation simplifiée (15). Ceci peut aussi concourir à limiter la quantité de fer solubilisé (moins de 1%) dans la solution du milieu BrFe+Acé. Aucun de ces dépôts n'est observé dans les témoins où les flacons n'ont pas été inoculés.



Dans le milieu BrFe+Glu, l'acidification de la solution est due aux différents acides formés lors de la fermentation du glucose ; ce qui favorise par ailleurs la solubilisation et le maintien du fer en solution. L'acidification participe sans doute aussi à la dissolution des oxydes (goethite) mais surtout au maintien du fer en solution et à sa disponibilité dans l'environnement (Xu & Gao, 2008).

La production des métabolites organiques différents dans les deux milieux suggère des activités ferri-réductrices strictes (respiratoires) en présence de l'acétate et des activités fermentaires en présence du glucose. La nature des substrats organiques présents dans l'environnement peut donc orienter ces activités métaboliques de communautés bactériennes. Toutefois, la recherche de populations bactériennes ne fait pas apparaître de bactéries respirant strictement le fer.

L'identification et la caractérisation des populations bactériennes des consortia impliquées dans ces processus de réduction du fer a révélé la présence de quatre principales espèces : *Bacillus sp.* (dans le milieu BrFe+Glu), *Thiobacillus sp.* et *Desulfovibrio desulfuricans* (dans le milieu Brfe + Acé) et *Enterobacter sp.* (dans les deux milieux) qui sont, respectivement, des bactéries fermentaires et non fermentaires. Ces résultats sont en accord avec les travaux effectués par Dobbin *et al.*, (1999) et Jeong *et al.*, (2008) qui ont montré que diverses bactéries fermentaires (*Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus sp.*) sont connues comme utilisant le Fe (III) en tant que puits de protons pendant l'oxydation de plusieurs substrats organiques (glucose, lactate, glutamate). Tebo et Obraztsova (1998) considèrent que l'activité enzymatique de *Desulfotomaculum reducens* pendant la réduction des sulfates a favorisé une activité ferri-réductrice importante. Dobbin *et al.*, (1999) ont constaté que de nombreuses réductions du fer (III) par respiration sont observées en présence de l'espèce *Geobacter* et de *Desulfuromonas palmitatis* lorsque l'acétate est additionné dans les milieux de cultures.

L'augmentation du pH dans le milieu BrFe+Acé peut être liée à l'activité réductrice des espèces *Desulfovibrio desulfuricans*, avec la participation de l'espèce *Enterobacter*. Selon Francis *et al.* (2000) certaines espèces *Enterobacter* comme *Pantoea agglomerans* sont capables d'assurer leur croissance en couplant l'oxydation de l'acétate ou de l'hydrogène à la réduction du Fe (III).

Dans le milieu BrFe+Glu, l'acidification peut s'expliquer par l'activité fermentaire des espèces *Bacillus sp.* et *Enterobacter* qui peuvent produire des acides organiques (lactique, pyruvique, succinique, acétique et propionique) participant à la dissolution de l'oxyde (goethite).

Dans ces milieux, il y aurait couplage ou co-existence de phénomènes d'oxydo-réduction du fer et du soufre en anaérobiose, ou séparément, avec l'oxydation – minéralisation des produits organiques.

La présence de *Thiobacillus* et *Desulfovibrio*, en particulier dans le milieu avec l'acétate, suggère aussi des phénomènes d'oxydation et de réduction des composés soufrés.

5.5. Conclusion

Les approches mises en œuvre et les phénomènes observés ont montré la présence d'une forte communauté bactérienne sulfato-réductrice et ferri-réductrice dans ces sols de rizières de Côte d'Ivoire. Les activités ferri-réductrices sont très fortes et révèlent l'importance de la nature de la source de carbone dans le métabolisme des consortia bactériens impliqués, ainsi que dans les modes de réduction et de solubilisation du fer. La présence de bactéries fermentaires (*Bacillus* sp.) et de bactéries anaérobies strictes réductrices (*Desulfovibrio desulfuricans*) témoignent de la richesse des sols en substrats convenables et aussi des conditions réductrices strictes de ces milieux. L'action conjuguée des bactéries fermentaires et non fermentaires contribuerait efficacement à la solubilisation du fer, surtout dans les sols de rizières où les conditions d'anaérobiose sont assurées. Par ailleurs, l'acidité des échantillons de sols étudiés (pH<5) contribue à maintenir le fer en solution. La forte communauté sulfato-réductrice participerait à la formation de dépôts de fer sous forme de sulfure facilement remobilisable.

Dans les expériences faites avec le glucose comme source de carbone, on assiste à une dissolution-réduction avec exportation du fer vers les solutions. Alors qu'avec l'acétate, on observe une réduction in situ sur le minéral, conduisant sans doute à l'altération du minéral, combinée à la production de minéraux ferro-ferriques de types "fougérites".

Ce travail montre que la recherche, l'étude des communautés et des activités des bactéries ferri réductrices cultivables, puis la connaissance des populations bactériennes impliquées, sont nécessaires à la compréhension de la dynamique du fer dans les sols de rizières.

Les résultats des études de populations et de leur activité fournissent des indications fondamentales sur les mécanismes de réduction impliqués, ainsi que sur l'état et le niveau réducteur du milieu : présence d'espèces anaérobies strictes, de bactéries fermentaires, de bactéries du cycle de soufre, et fourniture d'indicateurs sur l'origine possible de la toxicité ferreuse.

Chapitre 6 : Etude des activités et de la dynamique des communautés bactériennes ferri réductrices au cours de la biodégradation des matières organiques des sols (MOS) de rizières**6.1. Introduction**

Des études précédentes (cf chapitre 4 et 5) ont montré que les consortia bactériens cultivables isolés sur les sols de rizières de Thaïlande et de Côte d'Ivoire dissolvent efficacement l'oxyde de fer (goethite) en présence de substrat organique facilement métabolisable comme le glucose et l'acétate. La nature de la source de carbone utilisée, qui définit les activités métaboliques des espèces bactériennes constituant les consortia et les paramètres du milieu de culture (salinité) semble contrôler efficacement la mobilisation du fer.

L'aptitude des communautés bactériennes de ces sols de rizières à développer des activités ferri-réductrices sans apport de substrats organiques exogènes et en utilisant les substances humiques du sol mérite d'être validée et précisée, et ce, d'autant plus que dans ces sites, les activités ferri réductrices apparaissent comme un paramètre et un indicateur majeur de la qualité des sols.

De nombreux travaux (**Yao & Conrad, 1999; Lu et al., 2002; Stemmler & Berthelin, 2003**) ont montré que dans les environnements anaérobies comme les sols très hydromorphes, les sédiments marins,..., les bactéries ferri réductrices joueraient un rôle important dans la décomposition des matières organiques naturelles.

Dans cette partie de l'étude, nos recherches visent à acquérir une meilleure connaissance des communautés bactériennes autochtones réductrices du fer, cultivables ou non, impliquées dans la biodégradation des MOS et la solubilisation du fer, afin de les comparer aux communautés bactériennes cultivables isolées sur des milieux de cultures spécifiques, et d'établir des convergences ou divergences entre ces deux approches pour valider les résultats obtenus sur des milieux synthétiques.

La démarche adoptée prend aussi directement en compte l'effet de la salinité et de l'amendement organique des sols (cas des échantillons de sols de Thaïlande) et les potentiels réducteurs diversifié de ces sols le long d'une toposéquence pouvant conduire à des toxicités ferreuses (rizières de bas-fond de Côte d'Ivoire). Elle permettra aussi de mieux déterminer l'effet de la source de carbone apportée dans les milieux de cultures spécifiques sur la structure des communautés bactériennes autochtones, cultivables ou non.

6.2. Conduite de l'expérience

6.2.1. Site et échantillons de sol

Pour les sols de Thaïlande, trois échantillons de sol provenant des horizons de surface (0-20cm) des rizières (L14S, L14NS, L25S), d'où sont originaires les consortia bactériens ferri-réducteurs efficaces isolés et étudiés précédemment, ont été sélectionnés.

Pour les sols de Côte d'Ivoire, les expériences ont porté sur sept échantillons provenant des trois profils C1, C6 et F1 du site de Gagnoa et décrits au chapitre 3 (Tableau 6.1).

Tableau 6.1 : Echantillons de sols étudiés. En **Thaïlande** : NS: Non Salin ; S: Salin ; L14: Parcelle non amendée en matières organiques; L25: Parcelle amendée. En **Côte d'Ivoire** : C1, C6 et F1 : Profils ; A₁₁, B₂, B_g, BC, C: Horizons.

Sites d'étude	Position topographique	Échantillons
Thaïlande	Bas-fond (Rizières)	L14NS
		L14S
		L25S
Côte d'Ivoire (Gagnoa)	Sommet (C1)	0 - 20 A ₁
		20 - 60 B ₂
		60 - 100 BC
		100 -120 C
	Bas -versant (C6)	0 - 40 A ₁₁
		40 - 60 B _g
	Bas-fond (Rizières) F1	0 - 20 A ₁₁

6.2.2. Procédure expérimentale

Les activités bactériennes, notamment ferri-réductrices, sont suivies au cours d'incubations anaérobies réalisées dans des dispositifs en cuve "batch", avec 30g de sol placés dans 300ml d'eau ultra pure, stérile, sans aucun apport de matière organique ou de nutriments supplémentaires, pendant 30 jours et à 28°C. Des traitements abiotiques sont obtenus par addition du merthiolate de sodium (1%) pour inhiber les bactéries.

Les conditions expérimentales détaillées et les méthodes utilisées sont décrites dans le chapitre 2, au paragraphe 2.3.1.2.

6.3. Résultats

6.3.1. Evolution des paramètres du milieu

Dans l'ensemble, quels que soit le type de traitement (biotique ou abiotique) et la nature de l'échantillon, il se produit une alcalinisation du milieu (*Tableau 6.2*), très légère en conditions abiotiques, et beaucoup plus marquée dans les traitements biotiques.

Tableau 6.2: Evolution du pH et Eh des suspensions de sols incubés. En **Thaïlande** : NS: Non Salin ; S: Salin ; L14: Parcelle non amendée en M.O. ; L25: Parcelle amendée en M.O.. En **Côte d'Ivoire** : C1, C6 et F1 : Profils. A₁₁, B₂, B_g, BC, C: Horizons.

Sites d'étude	Position topographique	Echantillons	pH		Eh (mV)	
			initial	final	initial	final
Thaïlande	Bas-fond (Rizières)	L14NS abio	5,2	5,4	470	393,0
		L14NS bio	5,3	5,5	443	63,0
		L14S abio	5,1	5,3	468	395,3
		L14S bio	4,9	5,2	454	41,7
		L25S abio	5,2	5,3	452	379,7
		L25S bio	5,3	5,5	430	-51,3
Côte d'Ivoire (Gagnoa)	Sommet	C1-A ₁ abio	5,6	5,7	478	351,3
		C1-A ₁ bio	5,7	6,7	414	-81,0
		C1-B ₂ abio	4,9	5,0	485	344,0
		C1-B ₂ bio	4,8	5,5	454	110,0
		C1-BC abio	5,6	5,8	466	320,0
		C1-BC bio	5,7	6,0	445	164,7
	Bas -versant	C1-C abio	5,3	5,4	476	319,7
		C1-C bio	5,0	5,4	440	221,0
		C6-A ₁₁ abio	5,4	5,4	489	310,3
		C6-A ₁₁ bio	5,2	6,2	408	-70,7
		C6-B _g abio	5,6	5,8	471	300,3
		C6-B _g bio	5,6	6,2	447	163,0
	Bas-fond (Rizières)	F1-A ₁₁ abio	5,1	5,4	489	310,3
		F1-A ₁₁ bio	5,2	5,8	458	-106,0

Pour les sols de Thaïlande, la remontée du pH au bout des 30 jours d'incubation varie de moins d'une unité (5,3 à 5,5) pour les trois échantillons de sols (L14S, L14NS et L25S), alors que pour ceux de Côte d'Ivoire (C1, C6, F1), elle varie d'une unité avec un accroissement de pH plus important pour les horizons de surface.

Le suivi du potentiel redox (Eh) dans les solutions incubées révèle des conditions réductrices plus marquées et même très fortes dans les traitements biotiques (*Tableau 6.2*). Pour les sols de Côte d'Ivoire, les conditions sont plus réductrices en surface des profils (C1-A₁: de 441 à - 81 mV) qu'en

profondeur (C1-C: de 440 à 221 mV), et aussi au bas-fond (F1-A₁₁ : de 458 à -106 mV), qu'au sommet.

Pour les sols de Thaïlande, la variation du Eh durant l'incubation s'établit dans l'ordre suivant : L25S > L14S > L14NS. Elle est plus forte dans les parcelles amendées (L25S) que non amendées (L14NS, L14S). Dans le traitement abiotique, le potentiel redox varie peu et reste supérieur à 300 mV en fin d'incubation. Cette forte diminution du Eh dans les traitements biotiques indique des activités bactériennes réductrices très fortes. Les résultats révèlent que les bas-fonds de Côte d'Ivoire (F1) sont plus réducteurs que ceux de Thaïlande. Cela peut être dû à des différences de propriétés des sols de Côte d'Ivoire, plus riches en MO (14,70 %) que ceux de Thaïlande (0.30 à 0.60% de M.O.).

La biotransformation des matières organiques du sol (M.O.S.) a été suivie par la mesure de la minéralisation (dégagement du CO₂), l'évolution des teneurs en carbone organique dissout (COD), la production par fermentation d'acides organiques et la minéralisation de l'azote (NH₄⁺, NO₃⁻). Elle révèle (*Tableau 6.3*) les informations ci-après:

❖ dans les traitements biotiques, les quantités de CO₂ sont très importantes avec une production 10 à 1000 fois plus élevée que dans les traitements abiotiques (*Tableau 6.3*).

Pour les sols de Thaïlande, la minéralisation du carbone s'établit dans l'ordre suivant : L25S > L14NS > L14S. Cette production de CO₂ est d'abord liée à la teneur en matière organique des échantillons de sols, mais aussi à la salinité : S et NS. Toutefois, le taux de minéralisation correspondant au pourcentage total du carbone minéralisé indique que les matières organiques des sols sans amendements se minéralisent relativement mieux (32 à 35 ‰) que celles des sols recevant des amendements. Le taux de minéralisation se classe ainsi L14NS > L14S > L25S et est meilleur en zone non saline qu'en zone saline (32 par rapport à 35 ‰).

Dans les sols de Côte d'Ivoire, la production de CO₂ est plus importante dans les horizons de surface des profils qu'en profondeur, quelle que soit la situation topographique, et elle dépend des teneurs en M.O.. Le taux de minéralisation des échantillons (*Tableau 6.3*) est plus élevé dans les horizons de surface (C1-A₁ = 22,6 ‰ C-CO₂) qu'en profondeur (C1-B₂ = 10,2 ‰ C-CO₂) au sommet de la toposéquence, alors qu'à mi-versant, il est plus important dans les horizons de profondeur (C6-B_g = 21 ‰ C-CO₂) qu'en surface (C6-A₁ = 16,6 ‰ C-CO₂). Ceci indique des qualités différentes des matières organiques plus ou moins minéralisables, et, peut être liée aux fluctuations des nappes qui entraîneraient une accumulation de M.O. différente, plus facilement biodégradable, dans les horizons un peu plus profonds à mi-versant ou bas de versant.

On constate aussi que le taux de minéralisation est très faible dans les bas-fonds (F1-A₁₁ = 3,9 ‰ C-CO₂) alors que la teneur en M.O. est relativement élevée. Cette plus lente biodégradabilité résulterait de la présence de conditions très réductrices en bas-fond, conduisant à des M.O. de

qualités différentes, dues à une activité limitée des microorganismes favorisant son accumulation ;

❖ l'évolution du carbone organique en solution (carbone organique dissout : COD) indique une augmentation du COD dans les traitements biotiques (*Tableau 6.3*). Ces quantités de matières organiques hydrosolubles libérées varient de 70 à 3510 $\mu\text{g.g}^{-1}$ sol sec. Elles sont plus importantes pour les échantillons de sol de la parcelle recevant des amendements organiques (L25S: 182 $\mu\text{g.g}^{-1}$ sol sec) en Thaïlande et pour les échantillons des horizons de surface en Côte d'Ivoire (C1-A₁ : 3510 $\mu\text{g.g}^{-1}$ sol sec; C6-A₁₁ : 278 $\mu\text{g.g}^{-1}$ sol sec; F1-A₁ : 740 $\mu\text{g.g}^{-1}$ sol sec) à plus fortes teneurs en matières organiques ;

❖ l'analyse des différentes formes de l'azote minéral en solution montre une production d'ammonium (NH_4^+) plus importante dans les horizons de surface des profils et dans les sols de bas-fond (*Tableau 6.3*).

Pour les sols de Thaïlande, le taux de minéralisation de l'azote, par rapport à la teneur en azote total des sols, est significativement plus élevée sur la parcelle amendée (L25S), avec 53,8 % de l'azote total minéralisé, que dans les sols non amendés (L14S, L14NS) avec 33 à 35% d'azote total minéralisé.

Pour les sols de Côte d'Ivoire, le taux de minéralisation de l'azote est plus important de la surface vers les profondeurs des profils, et du sommet vers le bas-fond de la toposéquence (56 à 5% de l'azote total).

Cette minéralisation de l'azote sous forme ammoniacale permet d'expliquer au moins en partie les augmentations de pH observées dans les solutions de sols incubés. Pour les nitrates, les résultats (*Tableau 6.4*) montrent aussi une très forte diminution des teneurs pour les sols de Côte d'Ivoire, suggérant des activités dénitrifiantes efficaces. En revanche, ces activités dénitrifiantes ne semblent pas se manifester efficacement pour les sols de Thaïlande où ces teneurs ne varient pas du début à la fin de l'incubation ;

❖ la recherche d'acides organiques issus de fermentations ou des voies métaboliques secondaires, au début ($t=0$ jour) et en fin d'incubation ($t=30$ jours) montre la présence en faible quantité d'acides organiques (gluconique, acétique, formique, fumarique et citrique), avec des valeurs n'excédant pas 2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ sol sec (*Tableau 6.5*). On constate la production d'acides (gluconique, acétique, formique) pendant l'incubation, surtout avec les échantillons de bas-fond et les échantillons des horizons de surface. Dans les horizons plus profonds (C1-C), et donc plus pauvres en matières organiques, ces acides organiques présents (acétique, formique et fumarique) seraient plutôt métabolisés et sont en quantité plus faible en fin d'incubation ;

Tableau 6.3: Evolution des quantités de carbone minéralisées (C-CO₂) et solubles (COD) et de l'ammonium (NH₄⁺) dans les solutions de sols incubés. En **Thaïlande** : NS: Non Salin ; S: Salin ; L14: Parcelle non amendée ; L25: Parcelle amendée. En **Côte d'Ivoire** : C1, C6 et F1 : Profils. A₁₁, B₂, B_g, BC, C: Horizons. Abiotique (abio), Biotique (Bio), Initial (0 jours), Final (30 jours).

Sites d'étude	Position topographique	Echantillons	Carbones (µg.g ⁻¹ sol sec)				T= C- CO2 (‰) de C total		NH ₄ ⁺ (µg.g ⁻¹ sol sec)		T _N = N-NH ₄ ⁺ (‰) de N total	
			CO ₂		COD		initial	final	initial	final	initial	final
			initial	final	initial	final						
Thaïlande	Bas-fond (Rizières)	L14NS abio	70	107 ± 36	-	-	1,5	2,3	0,3 ± 0	0,8 ± 0,1	-	-
		L14NS bio	70	1670 ± 70	60 ± 4	136 ± 35	1,5	35,5	3 ± 0,2	9,4 ± 0,4	35,3	-
		L14S abio	20	67 ± 15	-	-	0,4	1,4	0,2 ± 0	0,04 ± 0,01	-	-
		L14S bio	40	1543 ± 335	54 ± 5	132 ± 7	0,9	32,8	3,5 ± 0,5	8,9 ± 3,2	33,4	-
		L25S abio	30	103 ± 46	-	-	0,3	1,2	0,2 ± 0	0,08 ± 0,01	-	-
		L25S bio	50	2187 ± 143	65 ± 8	182 ± 17	0,6	25,4	9,4 ± 0,7	21,5 ± 1	53,8	-
Côte d'Ivoire (Gagnoa)	Sommet	C1-A ₁ abio	50	86 ± 2	-	-	0,1	0,2	1,4 ± 0	0,6 ± 0,1	-	-
		C1-A ₁ bio	90	10787 ± 409	102 ± 6	3510 ± 338	0,2	22,6	8,4 ± 0,3	149,2 ± 3,7	56,0	-
		C1-B ₂ abio	20	50 ± 4	-	-	0,1	0,1	0 ± 0	0,1 ± 0	-	-
		C1-B ₂ bio	40	3730 ± 174	52 ± 11	2944 ± 660	0,1	10,2	2,2 ± 0,5	12,7 ± 2,4	6,0	-
		C1-BC abio	40	97 ± 12	-	-	-	-	0 ± 0	0,03 ± 0,01	-	-
		C1-BC bio	30	2390 ± 225	64 ± 11	470 ± 50	-	-	2,7 ± 0,4	1,63 ± 0,3	-	-
		C1-C abio	10	73 ± 6	-	-	-	-	0,01 ± 0	0 ± 0	-	-
		C1-C bio	40	1153 ± 45	25 ± 4	66 ± 10	-	-	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,2	-	-
	Bas-Versant	C6-A ₁₁ abio	20	69 ± 1	-	-	0,1	0,3	0,3 ± 0	0,11 ± 0,02	-	-
		C6-A ₁₁ bio	70	3460 ± 286	67 ± 16	278 ± 53	0,3	16,6	3,3 ± 0,5	24,63 ± 3	13,2	-
		C6-B _g abio	60	153 ± 45	-	-	1,1	2,9	0,8 ± 0	0,7 ± 0,3	-	-
		C6-B _g bio	30	1103 ± 29	34 ± 3	82 ± 4	0,6	21,1	1,3 ± 0,2	6,7 ± 0,5	5,0	-
	Bas-fond (Rizières)	F1-A ₁₁ abio	50	410 ± 110	-	-	0,0	0,2	0,7 ± 0	0,8 ± 0,2	-	-
		F1-A ₁₁ bio	70	8807 ± 633	88 ± 4	740 ± 123	0,0	4,0	6,6 ± 1	69 ± 13	6,8	-

Chapitre 6 :

Etude des activités et de la dynamique des communautés bactériennes ferri réductrices au cours de la biodégradation des matières organiques des sols (MOS) de rizières

Tableau 6.4: Evolution des anions minéraux formés ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$) dans les solutions de sols incubés. En **Thaïlande** : NS: sol non salin ; S: sol salin ; L14: Parcelle non amendée ; L25: Parcelle amendée. En **Côte d'Ivoire** : C1, C6 et F1 : Profils. A₁₁, B₂, B_g, BC, C: Horizons. Biotique (Bio), Initial (0 jours), Final (30 jours).

Sites d'étude	Position topographique	Echantillons	Anions minéraux ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$)							
			Cl ⁻		NO ₃ ⁻		SO ₄ ²⁻		PO ₄ ³⁻	
			initial	final	initial	final	initial	final	initial	final
Thaïlande	Bas-fond (Rizières)	L14NS bio	565,4	622,1	6,6	6,3	25,0	31,8	0,0	0,0
		L14S bio	1854,6	1908,1	6,8	5,7	37,1	44,5	0,0	0,0
		L25S bio	3138,5	3225,6	39,9	38,8	76,5	92,8	0,0	0,0
Côte d'Ivoire (Gagnoa)	Sommet	C1-A ₁ bio	4,6	4,9	33,5	1,3	5,7	28,1	0,0	0,0
		C1-B ₂ bio	4,1	5,3	21,3	4,3	23,8	33,9	0,0	0,0
		C1-BC bio	2,8	4,3	6,4	1,6	39,1	46,9	0,0	0,0
		C1-C bio	2,7	2,7	10,2	8,2	44,5	70,3	0,0	0,0
	Bas-versant	C6-A ₁₁ bio	6,1	6,7	30,1	13,1	2,6	11,8	0,0	0,0
		C6-B _g bio	3,8	4,3	1,6	1,1	2,3	15,7	0,0	0,0
	Bas-fond (Rizières)	F1-A ₁₁ bio	4,8	7,1	6,0	1,2	13,2	51,1	0,0	0,0

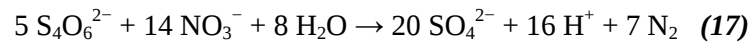
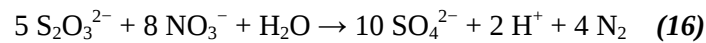
Tableau 6.5 : Evolution des acides organiques formés ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$) dans les solutions de sols incubés. En **Thaïlande** : NS: Non Salin ; S: Salin ; L14: Parcelle non amendée ; L25: Parcelle amendée. En **Côte d'Ivoire** : C1, C6 et F1 : Profils. A₁₁, B₂, B_g, BC, C: Horizons. Biotique (Bio), Initial (0 jours), Final (30 jours)

Site d'étude	Position topographique	Echantillons	Acides organiques formés ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$)									
			Gluconique		Acétique		Formique		Fumarique		Citrique	
			initial	final	initial	final	initial	final	initial	final	initial	final
Thaïlande	Bas-fond (Rizières)	L14NS bio	0,5	0,7	0,0	0,5	0,0	0,8	0,4	0,4	0,0	0,0
		L14S bio	0,3	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,4	0,3	0,0	0,0
		L25S bio	0,6	0,8	0,0	0,4	0,0	0,1	0,4	0,4	0,0	0,0
Côte d'Ivoire (Gagnoa)	Sommet	C1-A ₁ bio	0,4	0,9	0,1	1,5	0,0	0,6	0,3	0,7	0,0	0,3
		C1-B ₂ bio	1,1	0,0	0,5	1,4	0,1	0,8	0,2	0,1	0,0	0,5
		C1-BC bio	0,4	0,0	0,4	0,9	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0	0,2
		C1-C bio	0,0	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
	Bas-versant	C6-A ₁₁ bio	0,2	0,6	0,2	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,1	0,4
		C6-B _g bio	0,6	1,2	0,3	0,5	0,1	0,3	0,6	0,1	0,0	0,0
	Bas-fond (Rizières)	F1-A ₁₁ bio	0,4	1,1	0,2	1,2	0,1	0,9	0,3	0,6	0,0	0,4

❖ les mesures faites sur les anions dans les solutions de sols incubés entre le début (t= 0jour) et la fin (t=30 jours) révèlent, en plus des nitrates, la présence de chlorures et de sulfates dont les teneurs sont importantes (Tableau 6.4). On note l'absence de phosphates dans toutes les solutions des sols incubés. Les chlorures sont 100 fois plus élevés avec les échantillons provenant de la Thaïlande. Ceci s'explique par le caractère salin des sols. Cet élément est plus

élevé dans les zones salines (L14S, L25S) que dans les zones non salines (L14NS). Les sulfates présentent des teneurs plus modestes, mais sont en plus grandes quantités dans les sols recevant des M.O. (L25S). Ils augmentent sensiblement au cours de l'incubation.

Cette augmentation est plus importante avec les échantillons des horizons de profondeur (C1-C : $70 \mu\text{g SO}_4^{2-} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec}$) et ceux du bas fond (F1-A₁₁ : $51 \mu\text{g de SO}_4^{2-} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec}$). La plus forte teneur en sulfates dans les horizons de profondeur peut être associée à leur plus forte teneur en soufre total (C1-C : $386 \text{ mg de S} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec}$). L'augmentation des sulfates peut être liée à l'activité de bactéries oxydant les composés réduits du soufre comme *Thiobacillus denitrificans*. Cette bactérie anaérobie facultative oxyde en absence d'oxygène, des composés comme S_0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ en utilisant des accepteurs finaux d'électrons, par exemple les nitrates, comme l'indiquent les équations suivantes :



Les sols de Côte d'Ivoire présenteraient des activités sulfo-oxydantes liées à la présence de sulfures.

❖ l'analyse des oligo-éléments (Al, Fe, Mn, Si) montre de plus fortes teneurs en Al, Fe, Si dans les traitements biotiques par rapport aux traitements abiotiques (*Tableau 6.6*) sur les deux sites d'étude. Ce qui indique une dissolution bactérienne des phases minérales ou organo-minérales. Pour le manganèse, les dissolutions sont plus faibles ou inexistantes, en raison de sa faible présence.

Pour les sols de Thaïlande, les éléments les plus fortement solubilisés s'établissent dans l'ordre suivant : $\text{Fe} > \text{Si} > \text{Al} > \text{Mn}$ (*Tableau 6.6*). Ils sont plus mobilisés dans la solution de l'échantillon provenant de la parcelle amendée (L25S). On observe également une forte solubilisation du fer sous forme ferreuse qui s'établit dans l'ordre suivant : $\text{L25S} > \text{L14NS} > \text{L14S}$.

L'altération des échantillons de sols provenant de la Côte d'Ivoire (*Tableau 6.6*) révèle une mobilisation plus importante de l'amont à l'aval (du sommet vers le bas fond) des éléments majeurs. Les éléments les plus présents en solution sont : le fer et/ou l'aluminium, puis le silicium. Par contre, le manganèse est presque inexistant dans les différents horizons, sauf dans l'horizon C1-A₁. Cette forte mobilisation du fer de l'amont vers l'aval pourrait être liée à la nature des oxydes de fer et à la biodégradabilité des M.O. ; elle indique une altération potentielle élevée. Dans l'ensemble, le fer ferreux (Fe^{2+}), libéré dans les solutions, constitue 50 à 90 % de fer total solubilisé.

Tableau 6.6: Evolution des éléments majeurs et du fer ferreux solubilisé ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$) dans les solutions de sols incubés. **En Thaïlande :** NS: Non Salin ; S: Salin ; L14: Parcelle non amendée ; L25: Parcelle amendée. **En Côte d'Ivoire :** C1, C6 et F1 : Profils. A₁₁, B₂, B_g, BC, C: Horizons. Abiotique (abio), Biotique (Bio), Initial (0 jours), Final (30 jours).

Sites d'étude	Position topographique	Echantillons	Eléments minéraux totaux ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$)								Fe ²⁺ ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$)	
			Al		Fe		Mn		Si		Fe ²⁺	
			initial	final	initial	final	initial	final	initial	final	initial	final
Thaïlande	Bas-fond (Rizières)	L14NS abio	5,4	20,1	4,9	6,0	0,0	0,6	25,3	30,4	3,2 ± 0	4,9 ± 1
		L14NS bio	28,3	70,4	17,3	211,0	0,0	0,0	102,9	104,8	6,5 ± 0,9	117,9 ± 36
		L14S abio	2,0	2,6	5,3	5,4	1,0	1,6	25,1	44,8	0,8 ± 0	2,1 ± 1
		L14S bio	7,9	25,0	5,9	145,6	0,7	2,2	39,3	102,1	2,7 ± 0,7	78,1 ± 15
		L25S abio	0,4	10,5	2,0	2,7	4,5	13,8	29,7	33,5	0 ± 0	1,1 ± 0,2
		L25S bio	28,8	60,0	7,4	285,0	53,6	775,0	75,4	284,5	1,6 ± 0,1	126,7 ± 6,6
Côte d'Ivoire (Gagnoa)	Sommet	C1-A ₁ abio	11,0	17,3	9,6	11,1	0,0	5,8	12,4	41,6	8,4 ± 0	7,9 ± 1,3
		C1-A ₁ bio	313,8	980,0	109,2	1666,6	0,0	34,6	34,3	93,4	84,7 ± 14,7	1055,1 ± 261
		C1-B ₂ abio	0,0	0,0	1,2	2,4	0,9	5,4	2,8	30,3	0,6 ± 0,2	1 ± 0,1
		C1-B ₂ bio	57,0	1089,0	21,0	740,3	0,0	0,0	50,5	569,4	12,8 ± 5	725,9 ± 19,3
		C1-BC abio	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,9	16,8	0 ± 0	0,7 ± 0,2
		C1-BC bio	111,0	1725,0	46,0	1134,0	0,0	0,0	26,5	304,5	45,6 ± 13,5	714,6 ± 49,7
		C1-C abio	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,6	18,1	0 ± 0	0,5 ± 0,3
		C1-C bio	0,0	0,0	8,5	20,4	0,0	0,0	5,4	20,5	6,1 ± 2	18,7 ± 1,9
	Bas -versant	C6-A ₁₁ abio	3,5	5,2	5,0	5,9	0,0	0,0	8,5	57,4	1,8 ± 0	4,6 ± 1
		C6-A ₁₁ bio	103,7	247,5	22,3	441,0	0,0	0,0	14,1	108,3	18,1 ± 4,4	164,5 ± 5,1
		C6-B _g abio	7,4	18,9	5,6	10,1	0,0	0,0	23,0	44,8	2 ± 0	6,7 ± 2,4
		C6-B _g bio	0,9	76,8	22,4	113,3	0,0	0,0	2,0	452,3	17,8 ± 2,3	104 ± 11
	Bas-fond (Rizières)	F1-A ₁₁ abio	1,5	4,7	3,0	8,1	0,0	0,0	10,9	70,5	3,1 ± 0	9,7 ± 1,5
		F1-A ₁₁ bio	54,3	54,7	14,3	303,7	0,0	0,0	11,8	303,7	10,9 ± 0,8	287,5 ± 29,6

6.3.2. Relation entre la biodégradation anaérobie des matières organiques des sols (M.O.S) et la réduction bactérienne du fer dans les rizières de bas fond (L14S, L14NS, L25S, F1)

La biodégradation des matières organiques des sols en condition anaérobie entraîne, non seulement une forte mobilisation du fer correspondant à la réduction et la dissolution des oxydes, mais aussi une forte altération des minéraux porteurs de Si et Al.

Dans les sols de Thaïlande, Pour 100g de carbone organique minéralisés sous forme de CO₂, il y a 5 à 7 % de fer, 0 à 4 % d'aluminium et 0 à 7 % de silicium solubilisés (Tableau 6.7).

Pour les sols de Côte d'Ivoire, l'altération, au cours de l'incubation des horizons de sols, est plus forte du sommet vers les bas-fonds de la toposéquence, et de la surface vers la profondeur des profils. En revanche, le rendement des solubilisations ou altération montre une efficacité différente. Pour 100 g de carbone organique minéralisés sous forme de CO₂ il ya plus d'éléments (Fe, Al, Si) solubilisés dans les horizons plus profonds qu'à la surface (Tableau 6.7), et d'avantage au sommet que dans les bas-fonds. Le coefficient de minéralisation du carbone décroît de la surface des profils vers les profondeurs pour les sols de sommet, et augmente de la surface vers la profondeur pour les sols de mi-versant. Alors qu'il décroît du sommet vers les bas-fonds le long de la toposéquence.

Tableau 6.7 : Minéralisation de la matière organique et solubilisation du fer ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{sol sec}$) des échantillons de rizières de bas-fond incubés. **En Thaïlande :** NS: sol non salin ; S: sol salin ; L14:Parcelle non amendée ; L25: Parcelle amendée. **En Côte d'Ivoire :** C1, C6 et F1 : Profils. A₁₁, B₂, B₉, BC, C: Horizons.

Parameters	Thaïlande Bas-fond (Rizières)			Sommet		Côte d'Ivoire Bas -versant		Bas-fond (Rizières)
	L14NS	L14S	L25S	C1-A ₁	C1-B ₂	C6-A ₁₁	C6-B ₉	F1-A ₁₁
	Biotique	Biotique	Biotique	Biotique	Biotique	Biotique	Biotique	Biotique
Fer solubilisé (Fe ²⁺) ($\mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil)	117,9	78,1	126,7	1055,1	726,0	164,5	104,0	287,5
Fer total solubilisé ($\mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil)	221	145,6	285,0	1666,6	740,3	441,0	113,3	303,7
CO ₂ ($\mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil) degagé	1670	1543,0	2187,0	10787,0	3730,0	3460,0	1103,0	8807,0
Coefficient de minéralisation C- CO ₂ (‰) total C	35,5	32,8	25,4	22,6	10,2	16,6	21,1	4,0
Fer solubilisé / Fer total du sol (%)	10,0	6,3	9,4	2,0	0,7	2,5	1,1	0,6
Rendement (%) = Fe ²⁺ / CO ₂	7,1	5,1	5,8	9,8	19,5	4,8	9,4	3,3
Rendement (%) = Al ³⁺ / CO ₂	4,2	1,6	0,03	0,09	0,29	0,07	0,07	0,01
Rendement (%) = Si ⁴⁺ / CO ₂	6,3	6,6	0,1	0,01	0,2	0,03	0,4	0,03

L'analyse des solutions des quatre échantillons incubés provenant du bas-fond (L14S, L14NS, L25S et F1) incubés indique d'importantes solubilisations de fer (ferreux et total). Dans l'ensemble, la quantité de fer total mobilisé est supérieure à celle du fer ferreux solubilisé. La mobilisation du fer est plus importante pour l'échantillon F1 de Côte d'Ivoire par rapport aux échantillons des sols de Thaïlande (Tableau 6.7). Cette différence peut être liée à la faible teneur des matières organiques (moins de 1% C_{total}) des échantillons de Thaïlande (L14S, L14NS, L25S) à la source et à la disponibilité limitée du fer.

Par ailleurs, la comparaison effectuée entre les quantités de Fe^{2+} solubilisées et celles de carbone minéralisées ($C-CO_2$) pour les sols de bas-fonds révèle des corrélations très significatives (Figure 6.1), avec des coefficients (r) proche de 1.

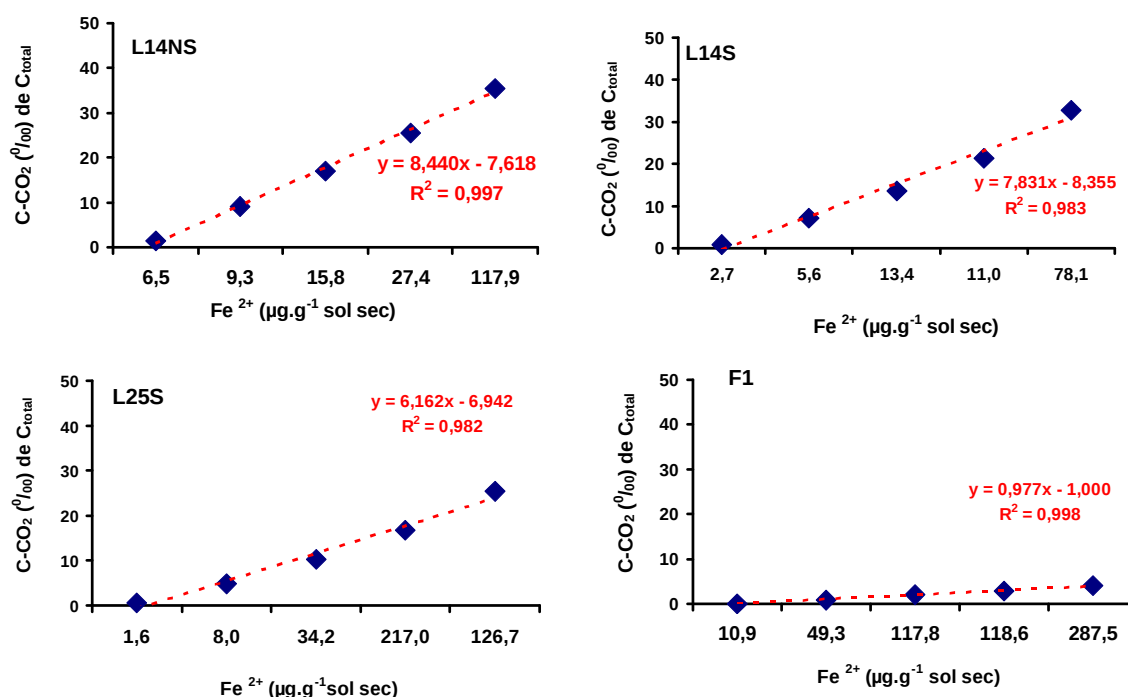


Figure 6.1: Analyse corrélative linéaire entre la solubilisation du fer sous forme ferreuse (Fe^{2+}) et la minéralisation des matières organiques au cours des incubations des traitements biotiques.

Nos résultats montrent un couplage entre la solubilisation du fer Fe^{2+} et la minéralisation du carbone dont l'efficacité est liée aux conditions réductrices du milieu, à la qualité et à la quantité de matière organique ainsi qu'à la disponibilité du fer. Toutefois, la nature et la diversité des communautés bactériennes impliquées jouent un rôle primordial et méritent d'être définies.

6.3.3. Identification des populations bactériennes impliquées dans la biodégradation des MOS et la réduction du fer en conditions anaérobies

L'analyse biomoléculaire réalisée par PCR TTGE sur l'ADNr 16s amplifiés à partir de l'ADN total extrait des quatre échantillons de sols de bas-fond (L14NS, L14S, L25S, F1) incubés en condition anaérobie montre la présence de nombreuses espèces révélées par les différentes bandes de gel (Figure 6.2). Au cours des 30 jours d'incubation, certaines nouvelles espèces ne sont plus détectables alors que d'autres deviennent plus détectables. Les bandes 3, 5, 7, 11 et 15 (*Ammoniphilus oxalaticus* ; *Alicycobacillus ferrooxidans* ; *Pseudomonas*) présentes en début de l'expérience, respectivement, pour les échantillons de sol L14NS, L14S, L25S et F1 ne sont plus détectables durant l'incubation. En revanche, les bandes 4, 13, 16, 17, 18, 19 (*Geobacillus*, *Thiobacillus*, *Enterobacter* et *Desulfovibrio desulfuricans*) sont détectées à la fin de l'incubation. Il ya également des différences pour les espèces présentes dans chaque site d'étude.

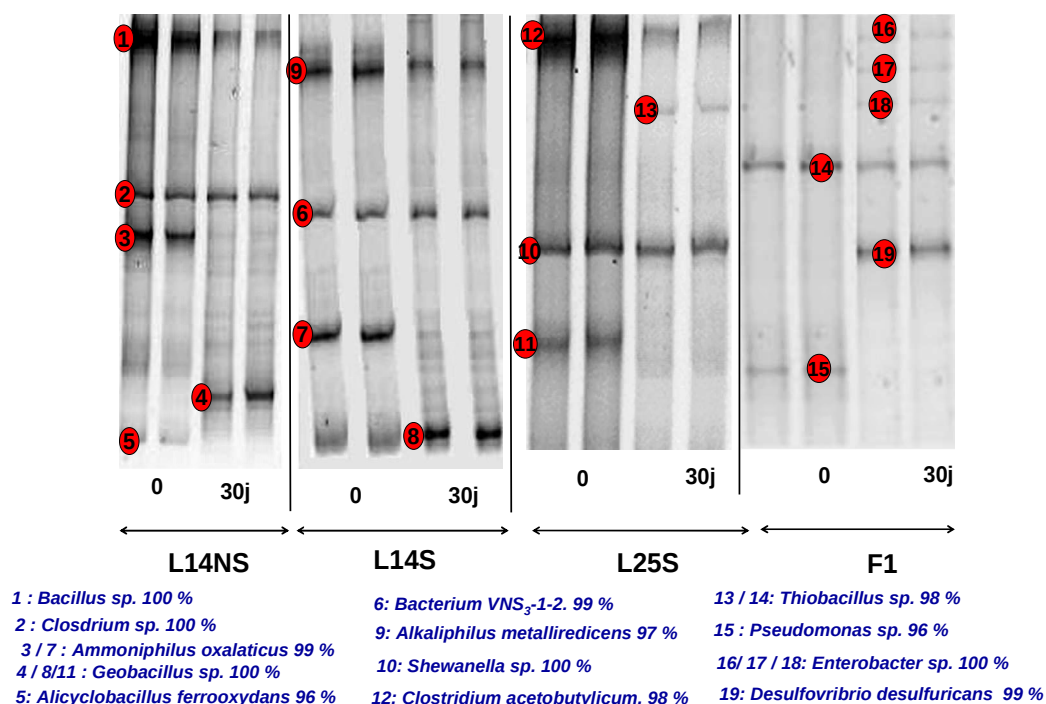


Figure 6.2: Gel de TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) montrant les différents profils moléculaires des échantillons de sols incubés sans apport de nutriments au début ($t=0$ jour) et à la fin ($t=30$ jours) de l'incubation. Bandes 1 à 19 : espèces identifiées.

Pour les sols de Thaïlande (L14S, L14NS, L25S), en comparant les espèces identifiées dans les zones salines (S) et non salines (NS) de la parcelle L14, on constate que seules les espèces *Clostridium* (2), *Bacillus* (1) et *Alicycobacillus ferrooxidans* (5) n'apparaissent pas dans la zone saline (L14S). La

salinité des parcelles semble favoriser la prolifération d'espèces plus alcalino-halophiles comme *Alkaliphilus metallireducens* (9).

En comparant les espèces présentes sur la parcelle non amendée en matière organique (L14S) et la parcelle amendée (L25S), on constate la présence d'espèces communes aux deux parcelles (*Geobacillus* (4 ; 8 et 11), *Clostridium* (2 et 12)) et d'espèces non communes (*Shewanella* (10) et *Thiobacillus* (13)), présentes uniquement sur la parcelle amendée.

Pour les sols de Côte d'Ivoire (profil F1), on note principalement la présence de bactéries sulfo-oxydantes (*Thiobacillus sp.* (13 et 14)) et sulfato-réductrices (*Desulfovibrio desulfuricans* (19)) capables d'oxyder les composés réduits du soufre (*Thiobacillus sp.*) ou des matières organiques (*Desulfovibrio desulfuricans*), et de réduire des composés minéraux (NO_3^- ; SO_4^{2-} ; ...) en intervenant directement sur le cycle du soufre et indirectement sur le cycle du fer. La présence des *Enterobacter* (15 ; 17 et 18) est aussi à souligner, de même que celle des *Pseudomonas* (15) qui deviennent non détectables durant l'incubation.

Durant l'incubation, on note la disparition de bandes de bactéries considérées comme aérobies (*Ammoniphilus oxalaticus* ; *Alicycobacillus ferrooxidans* ; *Pseudomonas*) au profit des bactéries anaérobies facultatives et anaérobies strictes (*Geobacillus*, *Thiobacillus*, *Enterobacter* et *Desulfovibrio desulfuricans*).

La comparaison des espèces bactériennes identifiées sur les échantillons de sols incubés sans apport de source de carbone exogène à celles des consortia cultivables isolés sur des milieux de cultures spécifiques, avec apport de glucose ou d'acétate ou de sel ($30 \text{ g.l}^{-1} \text{ NaCl}$) révèle (Figures 6.3 ; 6.4 ; 6.5 et 6.6) que l'apport de matières organiques facilement métabolisables (glucose ou acétate) favorise le développement de certaines espèces (*Bacillus megaterium*, *Clostridium beijerinckii*, *Alkaliphilus metallireducens*) pour S8 ; (*Shewanella sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Virgibacillus sp.*, *Enterobacter sp.*) pour S2 et S6 ; (*Shewanella putrefaciens*, *Océanobacillus sp.*) pour S1 et (*Bacillus sp.*) pour F1.

En revanche, sur l'ensemble des sols étudiés, les espèces comme *Ammoniphilus oxalaticus* (3 et 7) et *Alicycobacillus ferrooxydans* (5) ou *Geobacillus sp.* (4 ; 8 et 11) apparaissent quand seules les MOS sont présentes. Ces résultats montrent que l'apport de source de carbone (glucose ou acétate) ne favorise pas la prolifération de bactéries dénitrifiantes comme *ammoniphilus oxalaticus*.

Pour les sols de Thaïlande (Figures 6.3 ; 6.4 et 6.5), la diversité des espèces paraît moins large dans les incubations, avec la seule présence de la matière organique du sol (MOS). Ceci est sans doute lié à la faible teneur en matières organiques de ces sols.

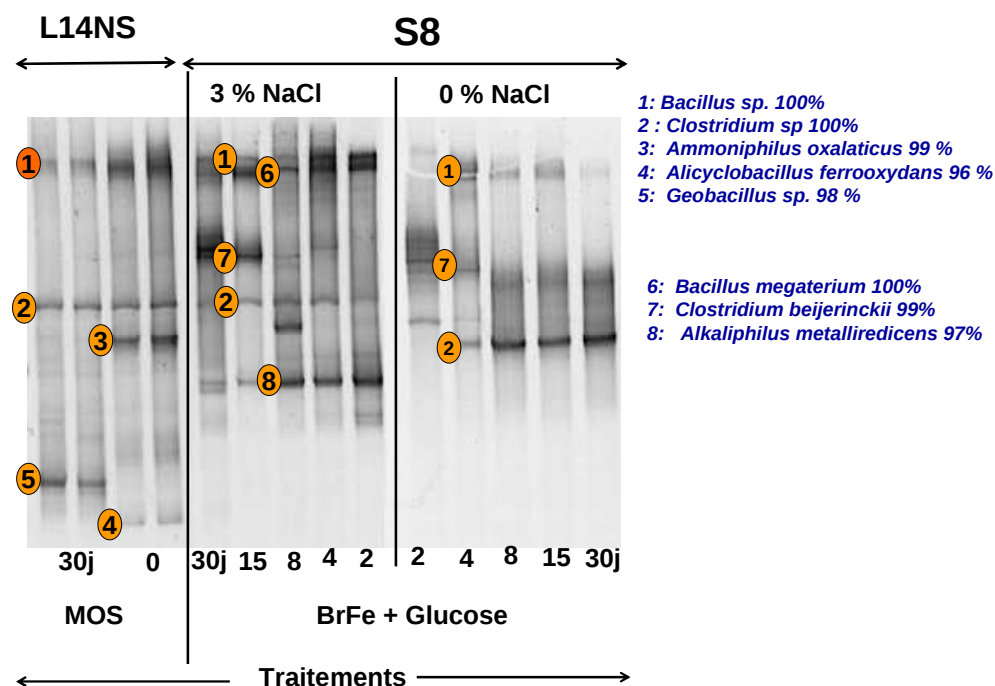


Figure 6.3 : Gel de TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) montrant les différents profils moléculaires de l'échantillon de sol L14NS sols incubé sans apport de nutriment et du consortium bactérien isolé (S8) sur milieux spécifiques avec du glucose et de l'acétate au début (t=0 jour) et à la fin (t=30 jours) de l'incubation. Bandes 1 à 8 : espèces identifiées.

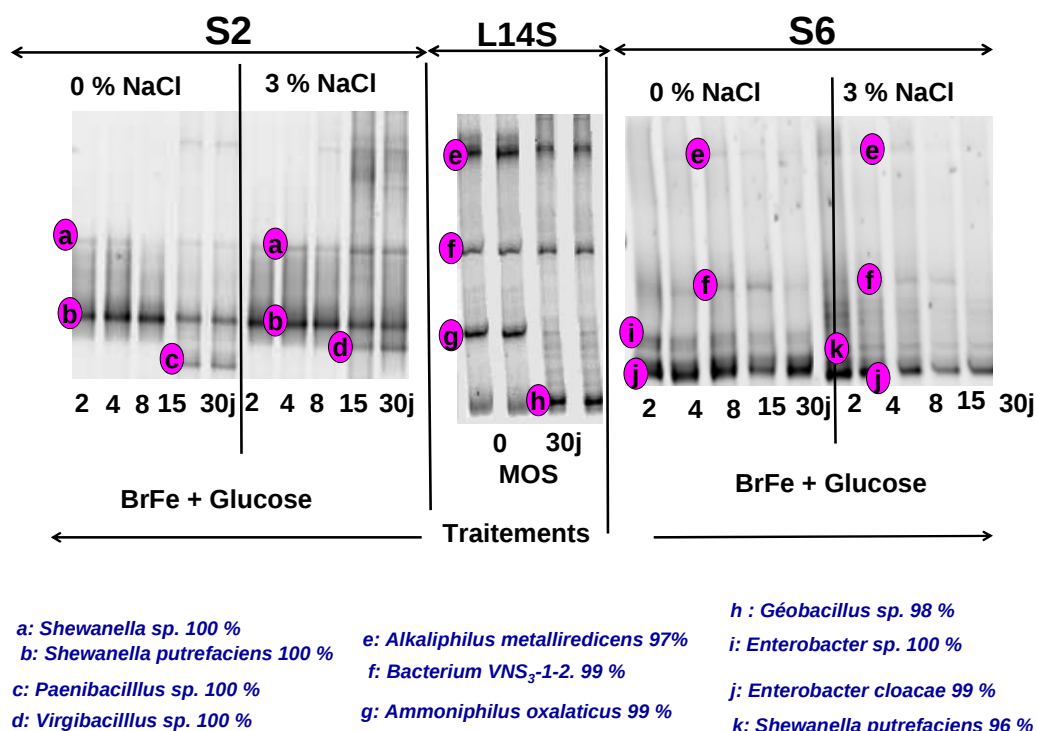
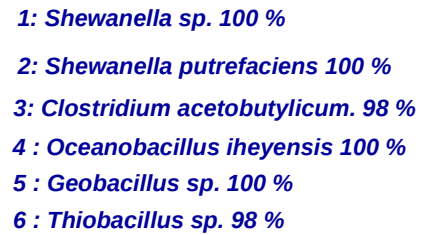


Figure 6.4 : Gel de TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) montrant les différents profils moléculaires de l'échantillon de sol L14S sol incubé sans apport de nutriment et des consortia bactériens isolés (S2 et S6) sur milieux spécifiques, avec du glucose et de l'acétate, au début (t=0 jour) et à la fin (t=30 jours) de l'incubation. Lettres : espèces identifiées.



Par contre, pour les sols de Côte d'Ivoire (F1), l'apport du glucose dans le milieu de culture favorise principalement le développement de *Bacillus*, alors que les bactéries sulfo-oxydantes (*Thiobacillus sp.*) et sulfato- réductrices (*Desulfovibrio desulfuricans*) prolifèrent quand on ajoute de l'acétate (Figures 6.6). Toutefois, quand seules les matières organiques du sol sont présentes, les espèces communes aux consortia cultivables avec l'acétate ou le glucose, tels *Thiobacillus sp.* *Desulfovibrio desulfuricans* (bactéries communes avec le milieu acétate) et *Enterobacter* (bactérie commune dans le milieu avec acétate et glucose) apparaissent également. La diversité paraît plus large dans les incubations avec la seule présence de la M.O. du sol.

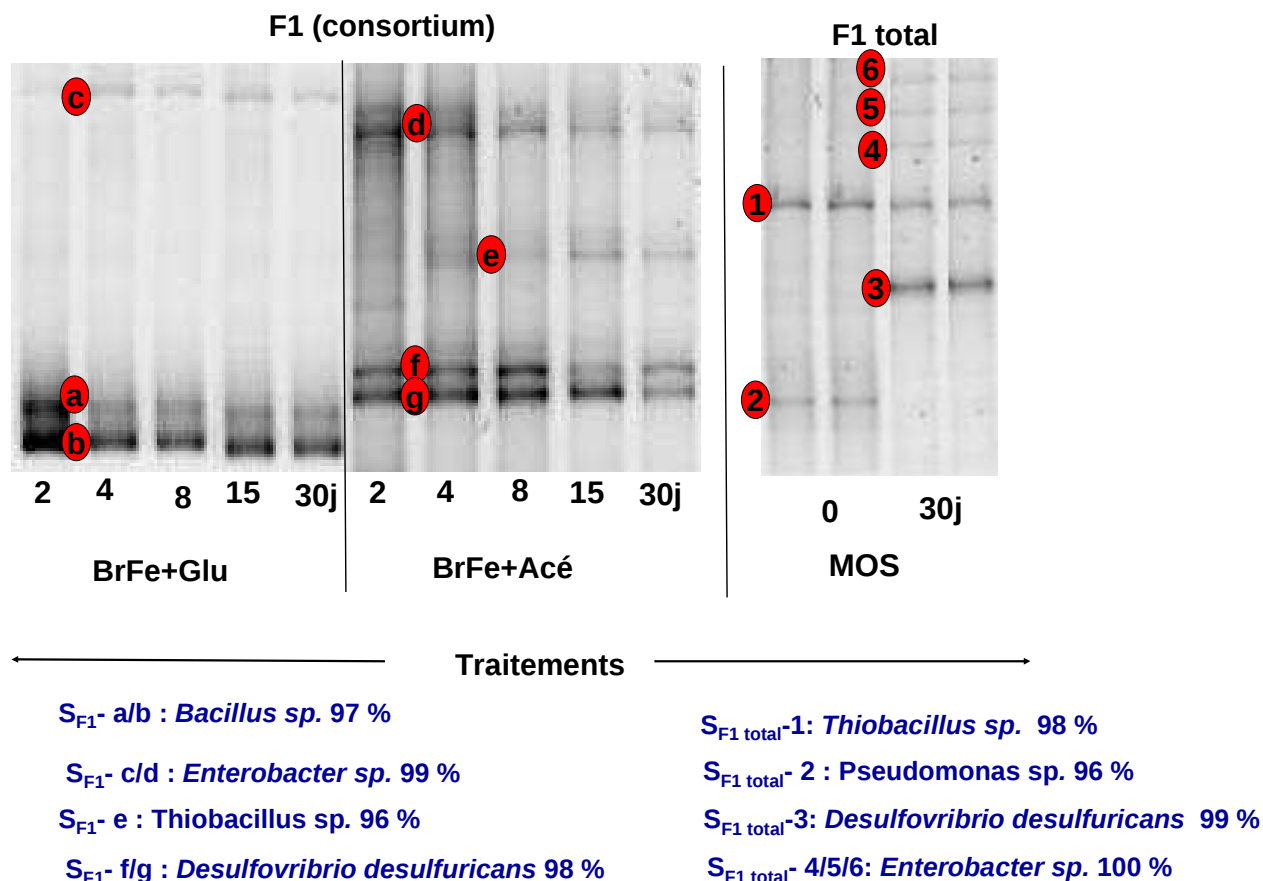


Figure 6.6: Gel de TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) montrant les différents profils moléculaires de l'échantillon de sols F1total et du consortium bactérien isolé (F1) sur milieux spécifiques, avec du glucose et de l'acétate au début (t=0 jour) et à la fin (t=30 jours) de l'incubation. Chiffres et lettres: espèces identifiées.

6.4. Discussion

La biodégradation et la minéralisation des matières organiques au cours de l'incubation des sols de rizières, pendant 30 jours, en condition anaérobie, entraînent une forte diminution du potentiel d'oxydo réduction (Eh) jusqu'à -100mV et une élévation sensible du pH. L'alcalinisation plus forte des solutions de sols incubés dans les traitements biotiques révèle une activité de la microflore de ces sols liée sans doute à la réduction du fer III en fer II, qui est un processus consommateur de protons, mais aussi à la formation d'ammonium résultant de la minéralisation des composés azotés en condition anaérobie (*Dommergues & Mangenot, 1970; Berthelin, 1982*). Ces variations du Eh et de pH, très importantes dans les traitements biotiques et très faibles dans les témoins (abiotiques), traduisent une forte activité de communautés bactériennes aéro-anaérobies et anaérobies.

Le taux de minéralisation C-CO₂ dégagé est plus élevé dans la zone non saline que dans la zone saline (L14NS par rapport à L14S), plus fort dans les parcelles n'ayant pas reçu d'amendements organiques (L14S, L14NS), probablement à cause la nature des composts (débris végétaux et animaux) apportés. Il pourrait présenter plus de compost de type humique que fulvique, avec un rapport AH/AF>1 comme pour les composts stables ou mûrs (**Houot et al., 2003**). Une production importante de CO₂, avec un taux plus faible de minéralisation et une relative forte libération de COD pour les échantillons de la parcelle amendée (L25) suggèrent vraiment un apport plus humique que fulvique, stimulant bien la réduction bactérienne du fer.

Pour les sols de Côte d'Ivoire, la diminution du taux de minéralisation de l'amont vers l'aval, et de la surface vers la profondeur des profils, indique des qualités différentes des matières organiques plus ou moins minéralisables et, peut être, liée aux fluctuations des nappes qui entraîneraient une accumulation de M.O. différente, plus facilement biodégradable dans les horizons un peu plus profonds à mi-versant ou bas de versant. Ceci suggère la présence des conditions très réductrices dans les bas-fonds, ralentissant le développement et l'activité des microorganismes intervenant dans la dégradation de la MOS en favorisant son accumulation. Selon Berthelin (**1982**), l'état d'oxygénation des milieux joue un rôle important dans la biodégradation des végétaux. En effet, dans un même temps, 13 % C des litières de *Calluna vulgaris* sont minéralisés en CO₂ en milieux aérés, alors que seulement 3 % le sont dans les profils engorgés. La décroissance de COD produits de la surface vers la profondeur pourrait sans doute provenir de la biodégradation lente de certains composés organiques réfractaires ou de celle de macromolécules lipidiques en condition anoxique (**Holmer, 1999**).

Ces processus de biodégradation de la matière organique semblent, dans les situations étudiées, étroitement associés à l'altération et à la transformation des minéraux des sols. En effet, nos résultats montrent une corrélation significative entre la minéralisation de la MOS (CO₂, COD, C-CO₂) et la solubilisation du fer. Ces résultats sont en accord avec ceux de Stemmler (**2001**) et Stemmler et Berthelin (**2003**), qui ont montré une forte relation significative entre les deux processus.

Pour les sols de Thaïlande, dont une fraction très importante de fer, principalement sous forme organo-minérale et réductible, facilement mobilisable par les bactéries, on note environ 6 à 10 % du fer total solubilisé. En revanche, le rendement de dissolution des oxydes par rapport à la quantité de CO₂ produite est faible. L'altération d'autres phases minérales ou organo-minérales sous l'influence des activités bactériennes est sensible, avec la dissolution de Al et Fe, quoi que relativement moindre que pour les sols de Côte d'Ivoire dans les conditions voisines.

Pour les sols de Côte d'Ivoire, où on détecte une part importante d'oxyhydroxydes sous forme bien cristallisée, réductible et mobilisable par réduction bactérienne, on observe moins de 3 % du fer total

solubilisé ; mais, les rendements de matières organiques minéralisées pour solubiliser le fer sont meilleurs qu'en Thaïlande.

L'altération d'autres phases minérales a favorisé la solubilisation de Al et Si, et est trois à vingt fois plus importante dans les traitements biotiques qu'abiotiques. Elle est donc d'origine principalement bactérienne. Ce sont les oxyhydroxydes, les oxydes de fer et les silicates qui sont altérés. Les phosphates ne sont pas ou n'apparaissent pas solubilisés. La quantité de chlorure, plus importante dans les échantillons de sol de Thaïlande, est à relier à la présence des sels mixtes (NaCl, KCl) dans ces sols (**Quantin et al., 2008**).

L'augmentation des teneurs en sulfates durant l'incubation des échantillons en condition anaérobiose doit correspondre, soit à l'oxydation de sulfures, soit à la minéralisation du soufre organique. Elle résulterait donc d'activités sulfo-oxydantes (*Thiobacillus*) ou d'activités minéralisatrices liées aux communautés anaérobies hétérotrophes (**Dommergues & Mangenot, 1970; Furusaka et al., 1991; Ehrlich, 1996**). En Côte d'Ivoire, cette production de sulfates se manifeste simultanément avec la solubilisation du fer, suggérant l'activité de bactéries oxydantes du soufre, simultanément ou non avec des activités réductrices du fer. La production plus élevée de sulfates en profondeur et en amont des versants résulterait sans doute de l'oxydation du soufre élémentaire qui y est en forte teneur, ou de la désorption des sulfates présents sur les sites d'échanges, ou encore de la minéralisation des composés organiques soufrés.

L'analyse biomoléculaire a révélé l'existence d'une grande diversité bactérienne présentant différentes voies de métabolisme : fermentaires (*Clostridium sp*, *Bacillus*, *Clostridium acetobutylicum*, *Enterobacter*), respiratoires du fer (*Alkaliphilus metalliredugens*, *Shewanella sp.*) des sulfates (*Desulfovibrio desulfuricans*), dénitrifiantes (*Ammoniphilus oxalaticus*) qui peuvent intervenir dans la biodégradation des MOS et la réduction directe ou indirecte du fer. Parmi ces espèces, certaines sont relativement bien connues (*Clostridium*, *Bacillus*, *Shewanella*, *Alkaliphilus metalliredugens*) pour leur capacité à réduire le fer (**Lovley, 1991, 1997; Bousserhine et al., 1999; Francis et al., 2000; Lin et al., 2007**). Sur les sols de rizières étudiés, on note, durant l'incubation, la "disparition" d'espèces aérobies (*Ammoniphilus oxalaticus*, *Alicyclobacillus ferrooxydans*) qui ne sont plus détectables au profit d'espèces aéro-anaérobies (*Bacillus*, *Geobacillus*) et anaérobies strictes (*Clostridium sp.*, *Clostridium acetobutylicum*, *Desulfovibrio desulfuricans*) lorsque le milieu devient très anoxique.

L'absence de *Clostridium*, *Bacillus* et *Alicyclobacillus ferrooxidans* en zone saline en Thaïlande, pourrait être liée à leur physiologie. Pour leur croissance, ils acheminent le fer dans les constituants cellulaires en utilisant des sidérophores (**Bsat & Helmann, 1999**) ; puis la présence d'une forte salinité dans le sol limiterait l'assimilation du fer et, par conséquent, leur croissance (**Hoffmann et al., 2002**) comme cela a été observé avec *Bacillus subtilis*. Ceci expliquerait leur non détection dans la zone saline.

La comparaison des espèces présentes dans les consortia bactériens isolés avec celles provenant des sols incubés révèle des espèces non cultivables comme (*Ammoniphilus oxalaticus*, *Alicyclobacillus ferrooxydans*), des espèces cultivables (*Bacillus megaterium*, *Clostridium beijerinckii*, *Shewanella putrefaciens*, *Océanobacillus*, *Virgibacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter cloacae*) et des espèces qui peuvent être cultivables ou non (*Clostridium sp*, *Bacillus*, *Alkaliphilus metalliredugens*, *Shewanella sp*, *Desulfovibrio desulfuricans* (Tableau 6.8). Les communautés isolées sur les milieux nutritifs synthétiques contiennent des populations que l'on observe aussi dans les communautés dégradantes les M.O.S. soulignant les convergences des deux approches. Les milieux synthétiques permettent d'observer au moins une partie des communautés dégradantes des M.O. du sol.

Tableau 6.8 : Espèces cultivables ou non présentes dans les sols de rizières. Matières organiques du sol (M.O.S.), Milieux synthétiques (milieu avec source de carbone glucose ou acétate)

Espèces identifiées	Milieux synthétiques	Milieux non synthétiques (MOS)	Communes aux milieux synthétiques et aux MOS
<i>Bacillus sp</i>			+
<i>Clostridium sp</i>			+
<i>Ammoniphilus oxalaticus</i>		+	
<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>		+	
<i>Geobacillus sp</i>		+	
<i>Bacillus megaterium</i>	+		
<i>Clostridium beijerinckii</i>	+		
<i>Alkaliphilus metalliredugens</i>			+
<i>Shewanella sp</i>			+
<i>Shewanella putrefaciens</i>	+		
<i>Thiobacillus sp</i>			+
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>			+
<i>Pseudomonas</i>		+	
<i>Bacterium VNS3-1-2</i>			+
<i>Enterobacter</i>	+		
<i>Clostridium acetobutylicum</i>			+
<i>Océano bacillus</i>	+		
<i>Virgibacillus</i>	+		
<i>Paenibacillus</i>	+		
<i>Enterobacter cloacae</i>	+		

Ces différentes espèces ont plus ou moins été isolées et étudiées dans divers environnements aquatiques, sols de rizières, sédiments,... Des travaux comme ceux de Saffarini *et al.*, (1994) et de Lin *et al.*, (2007) ont montré qu'elles sont capables, pour leur croissance, de réduire par dissimilation, certains composés organiques et minéraux (fer, manganèse, nitrate) en les utilisant comme accepteurs ou d'oxyder d'autres composés (Thiosulfate, soufre élémentaire) qu'elles utilisent comme donneurs

d'électrons. L'abondance et la diversité des espèces identifiées dans les sols de rizières et leurs différents métabolismes (fermentaires, respiratoires) joueraient un rôle majeur dans le turnover des matières organiques, même en condition saline, et aussi dans le cycle biogéochimique des éléments (Fe, C, N, S).

Ces résultats rendent également compte de la capacité de certaines bactéries à pouvoir se développer face à différents stress environnementaux (salinité, en utilisant divers types d'apports organiques). Dans ces situations, nous sommes en présence d'une diversité de communautés bactériennes dont les actions conjuguées contribueront à améliorer les activités ferri réductrices, paramètres majeurs de la qualité des sols de rizières.

En Côte d'Ivoire, il apparaît une spécificité supplémentaire : la présence des espèces anaérobies strictes (*Desulfovibrio*) qui pourraient sans doute contribuer à la forte solubilisation du fer.

La nature de la source de carbone influence l'analyse des communautés impliquées et l'observation de la diversité phylogénétique ou physiologique des bactéries ferri réductrices. En présence de la MOS, on note la présence de bactéries absentes, ou non décelables, dans les milieux synthétiques.

6.5. Conclusion

Cette partie de l'étude constitue une approche qui conduit à la mise en évidence de populations impliquées dans la biodégradation des M.O. du sol et, simultanément ou séparément, dans la réduction bactérienne et la dissolution du fer. Les espèces hétérotrophes observées sont aussi associées à des espèces impliquées dans le cycle du soufre. On observe ici que s'il y a couplage entre le cycle du fer (réduction) et celui du carbone (oxydation), il y a aussi association ou coexistence avec des bactéries sulfo oxydantes et sulfato-réductrices. Des espèces originales apparaissent dans ce système expérimental plus proche des conditions naturelles que dans les milieux synthétiques.

La définition du potentiel réducteur d'un sol peut être aussi associée à la présence d'espèces ou de populations plus ou moins spécifiques (comme les bactéries sulfato-réductrices). Les processus de dégradation des M.O.S. et de réduction du fer apparaissent régulés par une grande diversité d'espèces bactériennes présentes dans les sols de rizières.

Discussion Générale, Conclusion et Perspectives

Discussion générale

Le rôle des bactéries ferri-réductrices autochtones, des paramètres environnementaux tels que la salinité, les apports d'amendement organique sur le fonctionnement, la qualité des sols de rizières et la dynamique du fer a été abordé à travers différentes approches expérimentales, *in situ* et au laboratoire, sur deux sites d'étude présentant des situations divergentes : la réduction du fer paraît bénéfique dans les rizières de Thaïlande et néfaste dans celles de Côte d'Ivoire. Sur le premier site d'étude (**Thaïlande**), les sols sont salins, acides et pauvres en matière organique (moins de 1% MO) malgré l'apport d'amendement organique sur l'une des parcelles, alors que sur le deuxième site (**Côte d'Ivoire**), les sols sont non salins, acides et riches en matière organique (plus de 14 % MO).

Dans ces situations de milieux hydromorphes, l'objectif de ce travail se développait en deux axes. Le premier visait à dégager les paramètres microbiens contrôlant la réduction et la solubilisation du fer dans les sols de rizières, en intégrant trois niveaux d'organisation allant du niveau régional (salinité), au niveau parcellaire (matière organique), puis au niveau de la plante par la rhizosphère pour atteindre le niveau cellulaire et moléculaire, en identifiant les espèces bactériennes et les métabolites pouvant être impliqués dans ces processus de mobilisation du fer.

Le second concernait l'étude de l'impact de paramètres physiques et chimiques : toposéquence, capacité réductrice des sols, nature des sources du fer, influençant cette dynamique du fer dans les sols de rizières.

Pouvoir réducteur des sols de rizières

Dans les sols tropicaux, la cimentation des sols est assurée essentiellement par les oxydes de fer (hématite et goethite) et par la kaolinite, argile dominante de ces sols. Les études effectuées *in situ* et au laboratoire sur les eaux et les solutions de sol de rizières ont montré que le fer, l'aluminium et la silice sont les principaux éléments constitutifs. La présence du fer en quantité non négligeable sous forme solide (oxydes et oxyhydroxydes) ou soluble est très importante pour caractériser le pouvoir réducteur des sols. Le blanchissement des sols, du fait du départ des oxydes de fer (hématite, goethite) pour aboutir à des sols riches en matière organique de couleur gris-noir, comme ceux observés à mi-pente (profil C6 Côte d'Ivoire) laisse supposer l'existence de conditions d'engorgement prolongées, favorables aux activités bactériennes ferri-réductrices intenses. Par ailleurs, les extractions séquentielles caractérisant les formes du fer réalisées sur un éventail assez large d'échantillons de sols ont permis d'identifier les zones de lixiviation (Haut et mi versant) et les zones d'enrichissement (rizières, bas-fond) en fer.

On note donc des phénomènes de mobilisation-exportation de cet élément, de l'amont vers l'aval, comme observé par (**Diatta & Siband, 1998; ADRAO, 2002**), indiquant un gradient des conditions d'engorgement des sols, variables en mi-versant et alternées en bas-fond.

Les quantités élevées de carbone dans les sols de bas-fond indiquent une minéralisation relativement faible, qui est due très certainement aux conditions réductrices et anoxiques qui favorisent une dégradation lente de la matière organique (**Berthelin, 1982; Sun et al., 1997; Holmer, 1999**) ; et ceci, malgré un rapport C/N compris entre 10 et 15, suggérant une bonne biodégradabilité potentielle. Le taux de minéralisation plus élevée dans les sols de rizières de Thaïlande traduit que ces milieux sont moins réducteurs que ceux de Côte d'Ivoire. La biodégradation et la minéralisation des matières organiques du sol (M.O.S.) conduisent à des potentiels d'oxydo-réduction plus bas (-70 à -106 mV) pour les sols de Côte d'Ivoire que ceux de Thaïlande, soulignant, avec la manifestation d'activité sulfato-réductrice, le pouvoir plus réducteur des sols de Côte d'Ivoire. Le caractère plus argileux des sols de rizières de Côte d'Ivoire les rend plus aptes au développement de conditions plus réductrices (**Roger & Le Mer, 2003**).

Les activités ferri-réductrices contrôlées par les communautés bactériennes sont aussi particulièrement fortes dans les sols de Côte d'Ivoire.

Organismes impliqués

La présence très significative de bactéries réductrices du fer et du soufre (IRB et SRB) dans les sols de Côte d'Ivoire (10^6 à 10^7 bactéries. g^{-1} sol sec), et significative de celles des sols de Thaïlande (10^3 à 10^4 bactéries. g^{-1} sol sec), rend compte de la richesse en nutriments et des conditions réductrices favorables et fortes de ces milieux hydromorphes. La disponibilité en matière organique est un paramètre essentiel de la croissance et des activités microbiennes. Dans les sols de Côte d'Ivoire, la prédominance des bactéries sulfato-réductrices (SRB) au sein des communautés anaérobies est un indicateur d'une anaérobiose prononcée et de la disponibilité de source de donneurs ou d'accepteurs d'électrons favorables (matière organique naturelle, source du soufre) (**Sow, 2003; Stemmler & Berthelin, 2003**).

L'identification des communautés bactériennes impliquées dans les activités ferri-réductrices sur les sols de rizières de Thaïlande et de Côte d'Ivoire a révélé une diversité et une richesse de populations ainsi qu'une coexistence de diverses populations (*Figure 1*) : des espèces ferri-réductrices anaérobies et aéro-anaérobies (*Clostridium sp.*, *Bacillus sp.*, et *Shewanella sp.*, *Alkaliphilus metallireducens*) ; ferro-oxidantes (*Alicycobacillus ferrooxidans*) ; dénitrifiantes (*Ammoniphilus oxalaticus*) ; sulfo-oxydantes (*Thiobacillus sp.*) et sulfato-réductrices (*Desulfovibrio desulfuricans*). Ces espèces sont capables d'oxyder des composés minéraux (Fe, S, ...) réduits, ou les matières organiques comme sources d'énergie, et de réduire d'autres composés minéraux (Fe^{3+} ; NO_3^- ; SO_4^{2-} ; ...) comme accepteurs d'électrons intervenant dans les cycles géochimiques d'éléments majeurs, en particulier, du fer dans ces milieux en couplage ou en coexistence avec ceux du carbone, de l'azote et du soufre.

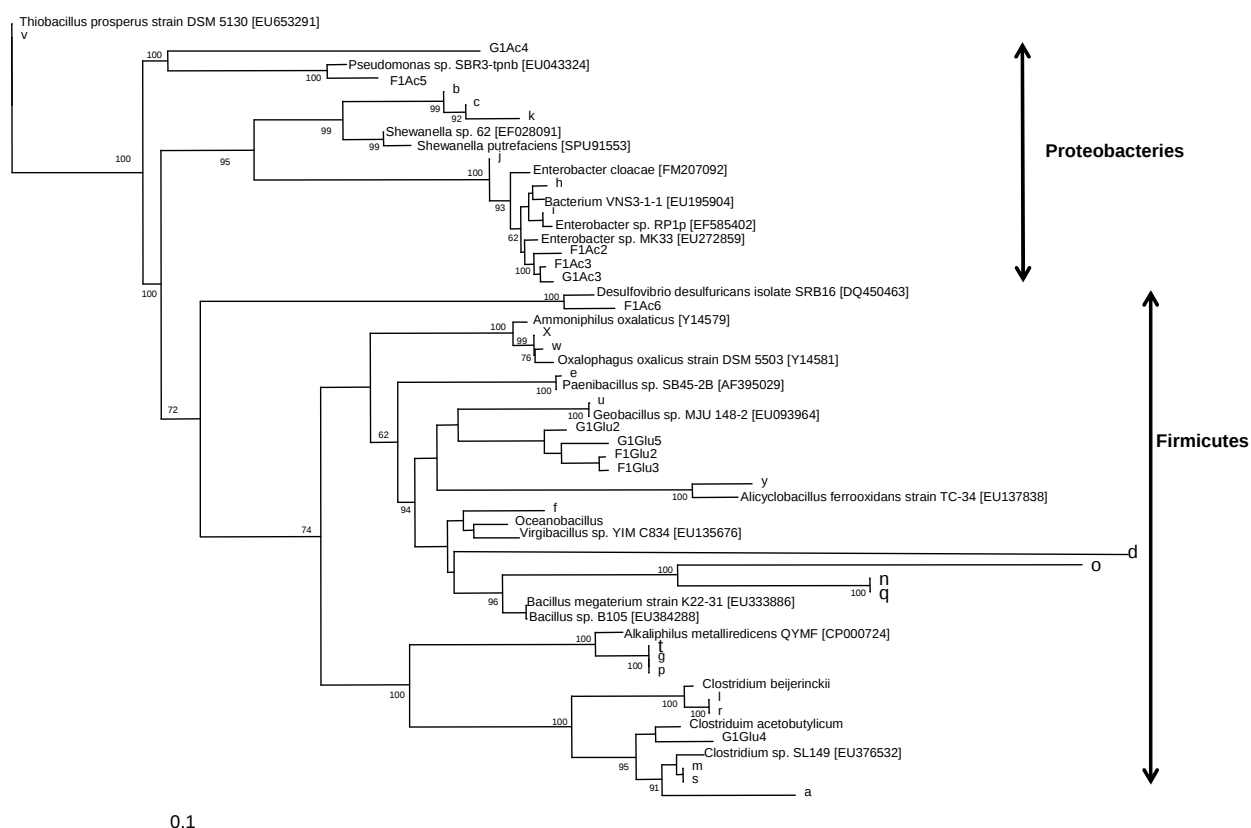


Figure 1 : Arbre phylogénétique basé sur des alignements des séquences de l'ADNr 16S pour les espèces bactériennes identifiées sur les sols de rizières de Thaïlande et Côte d'Ivoire et référencées dans Genbank et choisies selon l'arbre phylogénétique global des *Thiobacillus prosperus*. Les valeurs de Bootstrap de l'analyse ($n=100$) sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures 60%. La méthode neighbor-joining a été utilisée avec le logiciel PHYLIP 3,65. Les barres représentent 10% des variations de séquences.

L'identification génomique a mis évidence l'implication des espèces réductrices "obligatoires" comme *Shewanella* sp. et celle de fermentaires comme *Clostridium* sp. dans les processus de réduction du fer. La coexistence d'espèces aérobies, aérobies-anaérobies et d'anaérobies strictes est sans doute liée au fonctionnement hydrique très contrasté du milieu et à leur hétérogénéité, ménageant des zones très réductrices (niches de bactéries sulfato-réductrices) et des zones plus oxydées (rhizosphère).

Ces communautés et consortia ferri-réducteurs possèdent des populations présentant une grande stabilité et des activités fortes vis à vis de stress marqués, comme des conditions de salinité élevées. Cette homogénéité des espèces impliquées dans la réduction du fer se manifeste aussi en présence de changement de source de carbone de matière organique simple (glucose et acétate) ou complexes (matière organique des sols).

Des communautés bactériennes paraissent plus fluctuantes en fonction de ces stress environnementaux et montrent des changements de développement de populations correspondant à une adaptation aux conditions du milieu.

L'utilisation de nutriments complexes et "plus naturels" comme les M.O.S. donne, sans aucun doute, une image plus précise et plus réaliste que les conditions fournies par les milieux synthétiques avec apports d'acétate, de glucose, de source de fer. La présence de donneurs et d'accepteurs d'électrons facilement disponibles peut favoriser le développement de populations diversifiées.

L'étude de la structure et l'activité des communautés ferri-réductrices ou celles des phénomènes d'altération des minéraux et de biodégradation des M.O. qui y sont associés doivent passer par des approches privilégiant l'utilisation des matières organiques et des minéraux des sols.

Paramètres dominants influençant les activités bactériennes ferri-réductrices

L'étude de l'impact de la salinité sur la prolifération des bactéries et des activités ferri-réductrices, dans les sols de Thaïlande, a montré une diminution de la prolifération des groupes bactériens à 1% NaCl et des activités ferri-réductrices des consortia bactériens isolés à 9 % NaCl, c'est-à-dire à une concentration supérieure à celle de l'eau de mer (3,3 %). En revanche, les activités ferri-réductrices efficaces, variant avec le consortium bactérien, ont été observées jusqu'à 6 % NaCl. Ce qui souligne des fortes activités malgré la salinité élevée.

Des effets non inhibiteurs, voire stimulants, sur les activités ferri-réductrices ont aussi été constatés. Ils sont sans doute liés à la diversité des espèces bactériennes présentes dans les communautés de ces sols, et à leur adaptation aux différentes situations de salinité (0 à 120 g.l⁻¹NaCl). En condition de salinité sévère, avec des concentrations de sel voisines ou supérieures à celles de l'eau de mer, la nature, la diversité et l'adaptabilité des espèces bactériennes deviennent primordiales pour le maintien des activités ferri-réductrices.

Des communautés et des populations halotolérantes sont présentes et actives dans les rizières de Thaïlande soumises à la salinité. Dans ces milieux (Thaïlande) les activités ferri-réductrices apparaissent, soit comme agents participants, soit comme agents indicateurs de la bonne qualité ou de l'amélioration de la qualité des rizières.

L'effet de la matière organique (M.O.) sur les activités ferri-réductrices indique qu'aussi bien la quantité, la qualité que la nature des matières organiques contrôlent ces processus. En effet, on note d'importantes proliférations des bactéries réductrices du fer et des sulfates dans les sols plus riches en matière organique (Côte d'Ivoire), et des rendements d'activités ferri-réductrices élevées dans les sols pauvres en matière organique (Thaïlande) où la biodégradation des M.O. est forte.

Dans les sols de Côte d'Ivoire et de Thaïlande, la dégradation de matières organique par les microorganismes autochtones favorise de fortes réductions de fer, comme l'ont montré précédemment des études menées par Quantin *et al.* (2001), Stemmler et Berthelin (2003). Le couplage significatif entre la biodégradation-minéralisation de la matière organique du sol et la réduction bactérienne du fer est à nouveau confirmé. La nature et la quantité des amendements apportés doit jouer un rôle important (Houot *et al.*, 2003) dans la solubilisation du fer.

En Thaïlande, l'apport d'amendements organiques par les paysans, dans le but d'améliorer la production de riz sur des sols affectés par la salinité, améliore la croissance et les activités des communautés bactériennes ferri-réductrices dans les zones salines, entre autre, par le contrôle du pH. Le paramètre énergétique et nutritionnel apparaît ainsi comme le, ou un des paramètres dominants du développement des communautés bactériennes réductrices du fer, surtout dans ces conditions extrêmes.

La disponibilité du fer varie selon la nature des sources de fer, mais aussi de carbone dont la biodégradabilité est fondamentale. Par ailleurs, la nature de la source de carbone contrôle aussi le pH du milieu. En effet, des résultats différentiels soulignent que la réduction bactérienne du fer se manifeste, soit par sa solubilisation, essentiellement sous forme Fe^{2+} hydrosoluble, dans le milieu avec glucose où les fermentations conduisent à l'acidification, soit sous forme de fer Fe^{2+} adsorbé sur les phases solides et extractibles par une solution acide, dans le milieu avec acétate où il s'alcalinise. Les bactéries ferri-réductrices peuvent ainsi participer au contrôle du pH par la réduction du fer, ou par des processus fermentaires acidifiant le milieu.

La situation topographique des sols détermine l'hydromorphie et la saturation, limitée au sommet des versants au moment des fortes pluies. La variation des nappes contrôle la saturation à mi-versant et au bas du versant. Dans les bas fonds (rizières), l'engorgement aura tendance à se prolonger sur de grandes périodes. Les propriétés des sols (la teneur et la disponibilité en M.O. et en fer) contrôlent l'état ou le potentiel réducteur des sols.

En Côte d'Ivoire, le dénombrement de bactéries ferri et sulfato réductrices (IRB, SRB) et les études menées avec les sols incubés ont révélé d'une part, plus de bactéries SRB (anaérobies très strictes) que IRB, et, d'autre part, des conditions très réductrices dans les sols de bas-fond. Tout le long de la toposéquence, il apparaît des zones bien drainées (sommet), à engorgement très temporaire, des zones à engorgement avec des nappes fluctuantes pour les sols de mi-versant et de bas-versant, et des zones de bas-fond aérées/engorgées (les rizières). Sur les toposéquences, on note une exportation du fer des horizons de surface des profils de sol de sommet et de mi-versant. Dans les bas-versants et les bas-

fonds, le compartiment oxydes–oxyhydroxydes est très faible, les formes mobilisables (Fe_{acido} soluble et extractible à l'oxalate (Fe_{Tamm})) et organo-minérales (Fe_{pyro}) deviennent dominantes, et conduisent à une accumulation relative. L'activité réductrice est très forte.

Comparaison des deux sites d'études

La qualité des sols de rizières et la production rizicole, des sites étudiés en Thaïlande et en Côte d'Ivoire sont liées à l'activité des communautés bactériennes ferri-réductrices.

En Thaïlande, les communautés bactériennes ferri-réductrices apparaissent comme agents efficaces ou au moins indicatrices de l'amélioration de la qualité des rizières soumises à la salinité, si leurs activités sont stimulées par les apports de matières organiques (M.O.). Cet effet bénéfique s'exerce dans les milieux moins réducteurs où le fer est en plus faible teneur qu'en Côte d'Ivoire, et est lié en grande partie au compartiment organique des sols.

Les approches développées en Thaïlande (*Figure 2*) ont montré une diversité de communautés bactériennes qui s'adaptent à des concentrations de sel supérieures à celle de l'eau de mer, et qui présentent de fortes activités ferri-réductrices malgré les faibles teneurs en carbone des sols. Les techniques culturales utilisées par les paysans qui apportent des amendements organiques pour lutter contre la salinité favorisent l'activité ferri-réductrices et le contrôle du pH. Cette production d'alcalinité contribue à améliorer la croissance de riz. Mais, est-elle suffisante et peut-on la maintenir?

Des études ont montré que la salinisation des sols de rizières de bas fond est due à la modification de la végétation des sols de plateaux, qui favoriserait les phénomènes d'évapotranspiration. La culture de plantes comme les légumineuses arbustives pourrait limiter la remontée de la nappe saline et améliorer la fertilité des sols par les apports en composés organiques azotés. Toutefois, l'effet rhizosphère risque d'être limité.

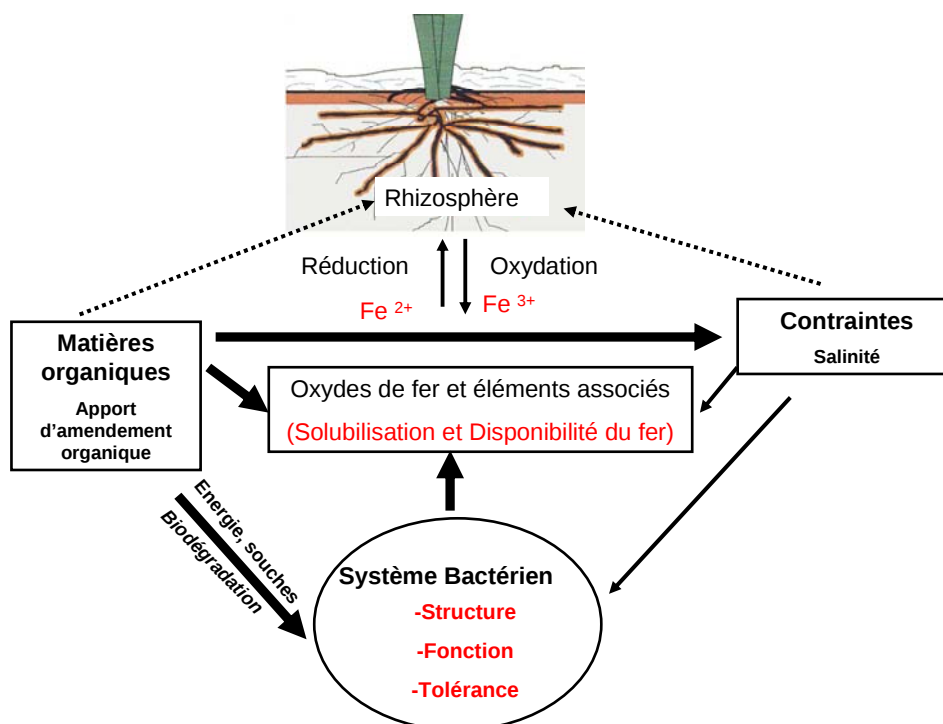


Figure 2 : Schéma de Synthèse générale des mécanismes impliqués dans la dynamique du fer dans les sols de rizières de Thaïlande

En revanche, dans les rizières de Côte d'Ivoire (Figure 3), les sols présentent de fortes teneurs en fer et en MO, une texture plus argileuse et un pouvoir réducteur plus important, qui se manifeste par de fortes activités ferri-réductrices et sulfato-réductrices. Les sols de Côte d'Ivoire présentent aussi, de façon significative, des populations bactériennes du cycle du soufre qui ne sont pas observées dans les rizières de Thaïlande.

Les approches menées en Côte d'Ivoire permettent de mieux cerner les problèmes de toxicité ferreuse observée chez le riz dans ces rizières de bas fonds. La caractérisation du complexe adsorbant (CEC) de ces sols de rizières a révélé une CEC faible, dominée principalement par le fer et l'aluminium, et carencée en autres cations. Cette déficience en autres cations peut entraîner un déséquilibre nutritionnel chez la plante de riz comme il a été rapporté dans quelques travaux (Jacq et al., 1987; Vizier, 1988; Jacq et al., 1990; Prade et al., 1990; Vizier, 1990; Neue et al., 1998) qui estiment que de multiples carences nutritionnelles peuvent être l'une des causes de la toxicité ferreuse observée chez les plants de riz. L'action conjuguée de bactéries anaérobies strictes sulfato-réductrices et fermentaires ou ferri réductrices doit, sans aucun doute, contribuer à la solubilisation et au maintien du fer sous forme ferreuse.

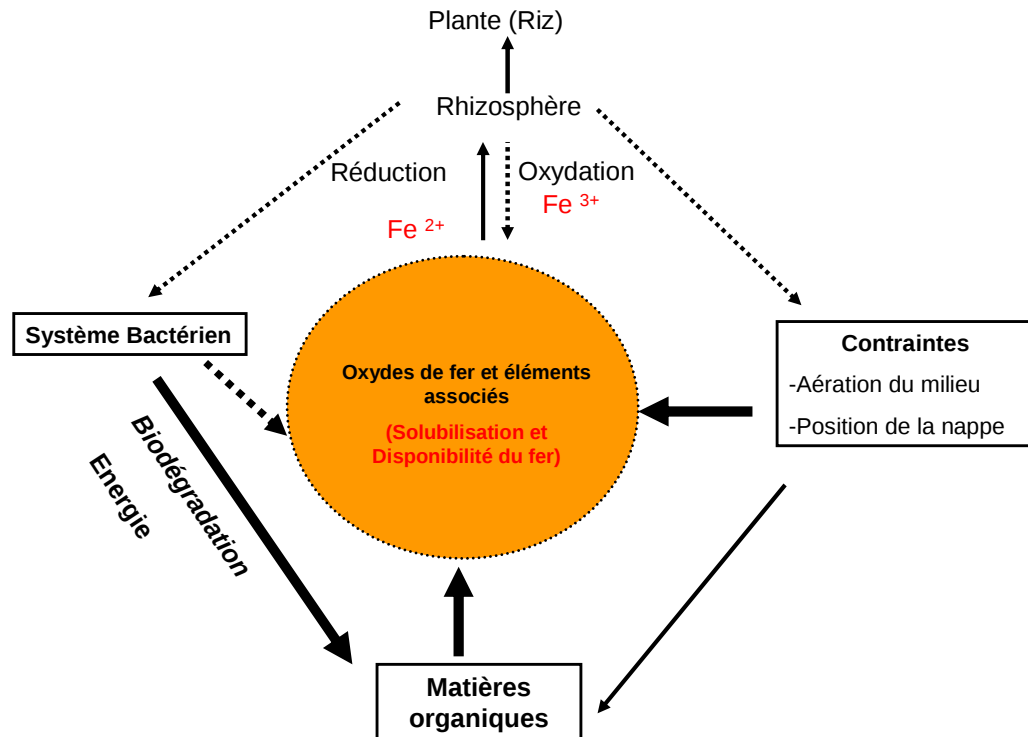


Figure 3 : Schéma de Synthèse générale des mécanismes impliqués dans la dynamique du fer dans les sols de rizières de Côte d'Ivoire

A partir des études menées, nous pouvons proposer quelques options de gestion qui pourraient aider à atténuer le problème de toxicité ferreuse. La réduction des phénomènes d'érosion et de lessivage pourraient être favorisé en utilisant des plantes comme les légumineuses sur les plateaux de ces milieux tropicaux humides. La zone réductrice située à mi-versant pourrait être atténuée en l'aérant par drainage ou par amélioration de la circulation de l'eau pour maintenir le fer sous forme ferrique. Dans le bas fond, l'utilisation de l'eau dormante, dont le but est de lutter contre les adventices, mais qui, par contre, accentue le problème de la toxicité ferreuse, devrait être évitée. La circulation de l'eau de façon continue et l'utilisation de variété de riz tolérante (*Oryza glaberrima*) à la toxicité ferreuse sont aussi des moyens de lutte à développer (Audebert et al., 2006; Audebert, 2006a, 2006b).

Conclusion et perspectives

Les sols de rizières, comme ceux de Thaïlande et de Côte d'Ivoire, que nous avons étudiés possèdent des communautés bactériennes ferri-réductrices constituées de consortia composés de 3 à 6 populations identifiées. Ces consortia très diversifiés peuvent s'adapter à différentes situations de salinité (0 à 90 g.l⁻¹), utiliser divers types de substrats organiques pour maintenir des activités significatives dans des conditions de milieu difficile correspondant à des stress forts.

Les activités ferri réductrices des populations et consortia bactériens sont beaucoup influencées par :

- la quantité et la qualité des matières organiques apportés ou présentes dans les sols ;
- la topographie, qui conditionne la dynamique de l'eau (le drainage, l'engorgement) et l'aération du milieu ;
- la texture et la structure : par exemple les sols argileux paraissent plus réducteurs,
- la richesse, la diversité et la nature des espèces bactériennes impliquées.

Ces communautés participent au contrôle du pH en le stabilisant et en l'augmentant sensiblement (piégeage des protons H⁺ et libération de OH⁻) ; elles libèrent aussi des nutriments, notamment azotés (NH₄⁺) pour la croissance du riz.

Dans les sols de Thaïlande, cette étude révèle qu'en conditions extrêmes, l'association des espèces en consortia bactériens est importante pour le développement et le maintien des activités. Les résultats montrent aussi une adaptabilité des bactéries ferri-réductrices aux milieux pauvres en matières organiques et salins. L'augmentation de la salinité peut diminuer la prolifération des bactéries, réduisant le fer, mais, les apports de M.O. peuvent y remédier.

Pour les sols de Côte d'Ivoire où l'on note une exportation importante du fer sous forme ferreuse, de l'amont vers les rizières en aval, l'action additive des activités ferri-réductrices favorise la solubilisation et la disponibilité du fer. Ce qui explique la forte concentration de Fe²⁺, causant des toxicités chez le riz.

Les communautés bactériennes ferri-réductrices apparaissent donc être des agents favorisant le bon fonctionnement des sols de rizières, comme en Thaïlande, ou exerçant un effet délétère, comme en Côte d'Ivoire. Contrôler leur activité est envisageable par la maîtrise de paramètres du milieu (drainage, apport de M.O., ...).

Afin d'approfondir et mieux comprendre les phénomènes associés à l'activité des bactéries réductrices du fer, différentes voies de recherches peuvent être proposées, notamment :

- (1) développer des expérimentations avec des cultures de riz, pour vérifier l'effet de la salinité ou de la teneur en Fe^{2+} du milieu sur la croissance du riz, en associant les bactéries ferri-réductrices pour mieux cerner leur rôle ;
- (2) mieux caractériser les constituants du sol : composés humiques, formes minérales et organo-minérales du fer et dynamique de l'eau qui contrôlent les activités bactériennes, afin de déterminer les compartiments réactifs et l'expression de la toxicité ferreuse ;
- (3) envisager l'activité de ces communautés à l'échelle d'un agrosystème complet, pour mieux définir le fonctionnement et la gestion des milieux concernés (les risques, ainsi que les traitements associés aux développements des bactéries ferri-réductrices (IRB)).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abifarín, A. O. (1988).** Grain yield loss due to iron toxicity. *WARDA Technical Newsletter*, **8(1)**, 1-2.
- Abifarín, A. O. (1989).** Progress in breeding rice for tolerance to iron toxicity. *WARDA (West Africa Rice Development Association) Annual report. Bouaké, Côte d'Ivoire*, 34-39.
- ADRAO. (2002).** Rapport annuel 2001-2002. Points saillants des activités, ADRAO / WARDA. Bouaké, Côte d'Ivoire, 29-37.
- Andreux, F. & Munier-Lamy, C. (1994).** Génèses et Propriétés des molécules humiques. Deuxième édition ed. In *Constituants et Propriétés des sols. Chapitre VI. Deuxième édition*, eds. M. Bonneau & B. Souchier, Vol. 2, Masson. Paris, 109-142.
- Asakawa, S., Akagawa-Matsushita, M., Koga, Y. & Hayano, K. (1998).** Communities of methanogenic bacteria in paddy field soils with long-term application of organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**, (3), 299-303.
- Ash, C., Priest, F. G. & Collins, M. D. (1993).** Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**, 253-260.
- Audebert, A. (2006a).** La toxicité ferreuse- Les conditions environnementales et les symptômes. In *Toxicité ferreuse dans les systèmes à base riz d'Afrique de l'Ouest*, eds. A. Audebert, L. T. Narteh, P. Kiepe, D. Millar & B. Beks. ADRAO, cotonou, Benin, 18-34.
- Audebert, A. (2006b).** Diagnostic du risque et approches de gestion de la toxicité ferreuse dans les bas-fonds rizicoles. In *Toxicité ferreuse dans les systèmes à base riz d'Afrique de l'ouest.*, eds. A. Audebert, L. T. Narteh, P. Kiepe, D. Millar & B. Beks, ADRAO. Cotonou, Benin, 6-17.
- Audebert, A., Narteh, L. T., Kiepe, P., Millar, D. & Beks, B. (2006).** Toxicité ferreuse dans les systèmes à base riz d'Afrique de l'ouest. ADRAO, Cotonou, Benin, 196 p.
- Becker, M. & Asch, F. (2005).** Iron toxicity in rice-conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition Science*, **168**, 558-573.
- Becquer, T., Bourdon, E. & Pétra, J. (1995).** Disponibilité du Nickel le long d'une toposéquence de sols développés sur roches ultramafiques de Nouvelle -Calédonie. *Géosciences de Surface*, 585-591.
- Benckisser, G., Santiago, S., Neue, H. U., Watanabe, I. & Ottow, J. C. G. (1984).** Effect of fertilization on exudation, dehydrogenase activity, iron reducing populations and Fe^{2+} formation in the rhizosphere of rice (*Oryza sativa* L.) in relation toxicity. *Plant and Soil*, **79**, 305-316.
- Berthelin, J. (1982).** Processus microbiens intervenant dans les sols hydromorphes en régions tempérées. Incidences sur la pédogenèse. *Pédologie Grand*, **32**, 3(3), 313-328.
- Berthelin, J., Andreux, F. & Tessier, D. (2005).** Constituants originaux du sol : réactivité et interactions. Chapitre 2. In *Sols et environnement. Cours et études des cas*, ed. Dunod, Collection Sciences Supérieures, 832 p.

- Berthelin, J. & DE Giudici, P. (1991).** Processus microbiens et physico-chimiques liés à la biodisponibilité des nutriments dans la rhizosphère du riz: Cas des rizières de bas fond à Madagascar. In *Bas-fonds et riziculture-Thème III*, ed. CIRAD, Actes du Séminaire. Antananarivo, Madagascar, 273-283.
- Berthelin, J., Ona-Nguema, G., Stemmler, S., Quantin, C., Abdelmoula, M. & Jorand, F. (2006).** Bioreduction of ferric species and biogenesis of green rust in soils. *Comptes Rendus Geosciences*, **59**, 1-9.
- Bocquier, G. (1971).** Genèse et évolution de deux toposéquences de sols tropicaux du Tchad. Interprétation biogéodynamique. *Cahier O.R.S.T.O.M., série Pédologie*, **9**(4).
- Bongoua, J., Mustin, C. & Berthelin, J. (soumis a).** Salinity, rhizosphere and organic amendment impact on iron reducing bacterial activity in paddy rice field (Thailand). *Biology Fertility of Soil Journal*. submitted.
- Bongoua, J., Cébron, A., Béguiristain, T., Mustin, C. & Berthelin, J. (Soumis b).** Activity and population dynamic in saline or non saline conditions of iron reducing bacterial consortia isolated from rice fields. *FEMS Microbiology Ecology*. Submitted.
- Bonneau, M. & Souchier, B. (1994).** *Pédologie 2. Constituant et propriétés du sol. Deuxième Edition*. Masson, Paris, France, 665 p.
- Boquel, G. & Suavin, L. (1974).** Solubilisation du fer par deux souches bactériennes en présence de litière de Teck. *Revue d'écologie et de biologie du sol*, **11**, n°2, 187-195.
- Bousserrhine, N. (1995).** Etude de paramètres de la réduction bactérienne du fer et application à la déferrification des minéraux industriels. In *Géomicrobiologie et Biochimie Microbienne*, Vol. Docteur Université Henri-Poincaré Nancy I. Nancy, pp. 242.
- Bousserrhine, N., Gasser, U., G., Jeanroy, E. & Berthelin, J. (1998).** Effect of aluminium substitution on ferri-reducing bacterial activity and dissolution of goethites. *Earth & Planetary Sciences*, **326**, 617-624.
- Bousserrhine, N., Gasser, U. G., Jeanroy, E. & Berthelin, J. (1999).** Bacterial and Chemical Reductive Dissolution of Mn-, Co-, Cr- and Al-Substituted Goethites. *Geomicrobiology Journal*, **16**, 245-258.
- Boyer, G. L., Kane, S. A., Alexander, J. A. & Aronson, D. B. (1999).** Siderophore formation in iron-limited cultures of Frankia sp. strain 52065 and Frankia sp. strain CeSI5¹. *Canada Journal Botanic*, **77**, 1316-1320.
- Boyer, J. (1976).** L'aluminium échangeable : incidences agronomiques, évaluation et correction de sa toxicité dans les sols tropicaux. *Cahiers - ORSTOM, Série pédologie*, **14**(4), 259-269.
- Bruemmer, G. W., Gerth, J. & Tiller, K. G. (1988).** Reaction kinetics of adsorption and desorption of nickel, zinc and cadmium by goethite. I. Adsorption and diffusion of metals. *Journal of Soil Science*, **39**(1), 37-52.
- Bsat, N. & Helmann, J. D. (1999).** Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (Ferric Uptake Repressor) with the dhb Operator In Vitro and In Vivo. *Journal of Bacteriology*, **181**(14), 4299-4307.
- Buri, M. M., Masunaga, T. & Wakatsuki, T. (2000).** Sulfur and zinc levels as limiting factors to rice production in West Africa lowlands. *Geoderma*, **94**(1), 23-42.

- Canfield, D. E., Tramdrup, B. & Hansen, J. W. (1993).** The anaerobic degradation of organic matter in Danish coastal sediments: iron reduction, manganese reduction and sulfate reduction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **57**, 3867-3883.
- Cary, L. & Trolard, F. (2006).** Effects of irrigation on geochemical processes in a paddy soil and in ground waters in Camargue (France). *Journal of Geochemical Exploration*, **88**(1-3), 177-180.
- Caton, T. M., Witte, L. R., Ngyuen, H. D., Buchheim, M. A. & Schneegurt, M. A. (2004).** Halotolerant Aerobic Heterotrophic Bacteria from the Great Salt. *Microbial Ecology*, **48**, 449-462.
- Charlot, G. (1983).** Les réactions chimiques en solution aqueuse et caractérisation des ions., Masson, 7^{ème} Ed, . Paris, pp. 413.
- Chérif, M., Fofana, M., Audebert, A. & Zouzou, M. (2006).** Quelques aspects de l'importance de la toxicité ferreuse en Afrique de l'Ouest. In *Toxicité ferreuse dans les systèmes à base riz d'Afrique de l'ouest*, eds. A. Audebert, L. T. Narteh, P. Kiepe, D. Millar & B. Beks. ADRAO, Cotonou , Benin, pp. 157-166.
- Chidthaisong, A. & Conrad, R. (2000).** Pattern of non-methanogenic and methanogenic degradation of cellulose in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **31**(1), 87-94.
- Cornell, R. M. & Schwertmann, U. (1996).** *The Iron Oxides. Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. VCH, Weinheim, 573 p.
- Coughtry, P. J. & Thorne, M. C. (1983).** Radionuclide distribution and transport in terrestrial and aquatic ecosystems: a critical review of data. *AA Balkema, Rotterdam*.
- Crichton, R. R. (2001).** *Inorganic Biochemistry of iron Metabolism: from Molecular Mechanism To clinical consequences*, 2nd. John Wiley, Weinheim, 358 p.
- Crichton, R. R. & Pierre, J. L. (2001).** Old iron, young copper: from mars to venus. *Biometals*, **14**, 99-112.
- De Dorlodot, S., Lutts, S. & Bertin, P. (2005).** Effects of Ferrous Iron Toxicity on the Growth and Mineral Composition of an Interspecific Rice. *Journal of Plant Nutrition*, **28**, 1-20.
- Delaune, M., Reiffsteck, M. & Feller, C. (1991).** L'analyse granulométrique de sols et sédiments à l'aide du microgranulomètre «Sedigraph 5000 ET». Comparaison avec la méthode «pipette Robinson. *Cahiers ORSTOM Pédologie*, **26**, N°2(2), 183 -189.
- Diatta, S., Audebert, A., Sahrawat, K. L. & Traoré, S. (1998a).** Lutte contre la toxicité ferreuse du riz dans les bas-fonds. Acquis de l'ADRAO dans la zone des savanes en Afrique de l'Ouest. *Aménagement et mise en valeur des bas-fonds au Mali. Sikasso, Mali, CIRAD-CA*, 363-371.
- Diatta, S., Bertrand, R., Herbillon, A. J. & Sahrawat, K. L. (1998b).** Genèse des sols d'une séquence sur granito-gneiss en région du centre de la Côte d'Ivoire. In *Actes du 16ème Congrès Mondial de Science du Sol/ Proceedings of the 16th World Congress of Soil science, 20-26 Août /August 1998, CD-ROM Symposium / Workshop 15. Code 124. Montpellier, France. CIRAD*.
- Diatta, S. & Siband, P. (1998).** Evolution des sols sous culture continue: le cas des sols rouges ferrallitiques du sol de Sénégal. In *Soil Fertility Management in West African Land Use Systems: Proceeding of Regional Workshop held at Niamey, Niger, 4-8 March 1997*, ed. G. Renard, Neef, A., Becker, K., et Von oppen, M. Margraf Verlag, Weikerheim, Allemagne, 221-229.

- Dobbin, P. S., Carter, J. P., García-Salamanca San Juan, C., von Hobe, M., Powell, A. K. & Richardson, D. J. (1999).** Dissimilatory Fe(III) reduction by *Clostridium beijerinckii* isolated from freshwater sediment using Fe(III) maltol enrichment. *FEMS Microbiology Letters*, **176**(1), 131-138.
- Dommergues, Y. (1979).** La fixation d'azote dans la rhizosphère des céréales à paille. *Cahiers - ORSTOM, Série Biologie*, 3-7.
- Dommergues, Y. & Mangenot, F. (1970).** *Troisième Partie: Influence du milieu édaphique sur la microflore. Chapitre III - Le facteur eau.* Cie Masson & Editor, Paris, 796 p.
- Dos Santos, L. S. & De Oliveira, A. C. (2007).** Rice Iron Metabolism: from Source to Solution. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, **10** (2), 64-72.
- Ehrlich, H. L. (1996).** How microbes influence mineral growth and dissolution. *Chemical Geology*, **132**(1-4), 5-9.
- Ehrlich, H. L. (2002).** *Geomicrobiology*, 4^{ème} Edition. Marcel Dekker Publisher, New York, 800 p.
- Eschenbrenner, V. & Badarello, L. (1978).** Etude pédologique de la région d'Odienné. Feuille d'Odienné. Notice explicative. . *Cahiers - ORSTOM, Série Pédologie*, **74**.
- Expert, D., Rauscher, L. & Franza, T. (2004).** *Erwinia*, a Plant pathogen In *Iron Transport in Bacteria*, eds. J.-H. Crosa, A. R. Mey & S. M. Payne, ASM Press. Washinton D.C., pp. 402-412.
- FAO. (1998).** Wold références bases (WRB) for soil resources. In *Wold Soil Ressources Reports 84*, eds. J. A. Dekkers, O. C. Spaargaren, F. O. Nachtergaele, L. R. Oldeman & R. Brinkman. FAO, ISRIC & UISS, 88 p.
- FAO. (1999).** Bases de références Mondiales (BRM), Rome, 100 p.
- FAO. (2004).** Année internationale du riz. In Vingt-troisième conférence régionale pour l'Afrique, Fonds des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture. Johannesburg -Afrique du Sud.
- Fenchel, T., King, G. M. & Blackburn, T. H. (1998).** *Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling*. 2nd. Academic Press, San Diego, 307 p.
- Foster, R. C., Rovira, A. D. & Cock, T. W. (1983).** Ultrastructure of root -soil interface. *Revue d'écologie et Biologie du sol.*, **24**, 443-457.
- Francis, C. A., Obratsova, A. Y. & Tebo, B. M. (2000).** Dissimilatory Metal Reduction by the Facultative Anaerobe. *Pantoea agglomerans* SP1. *Applied and environmental microbiology*, **66**(543-548).
- Furusaka, C., Nagatsuka, Y. & Ishikuri, S. (1991).** Survival of sulphate-reducing bacteria in oxic layers of paddy soils. In *Diversity of Environmental Biogeochemistry*, ed. J. Berthelin, Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands, 259-266.
- Funakawa, S., Suzuki, R., Karbozova, E., Kosaki, T. & Ishida, N. (2000).** Salt-affected soils under rice-based irrigation agriculture in southern Kazakhstan. *Geoderma*, **97**(1-2), 61-85.
- Garcia, J. L. (1974).** Effet de la rhizosphère du riz sur la dénitrification. *Soil Biology and Biochemistry*, **7**, 139-141.

- Gerringa, L. J. A., Blain, S., Laan, P., Sarthou, G., Veldhuis, M. J. W., Brussaard, C. P. D., Viollier, E. & Timmermans, K. R. (2008).** Fe-binding dissolved organic ligands near the Kerguelen Archipelago in the Southern Ocean (Indian sector). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **55**(5-7), 606-621.
- Gerringa, L. J. A., Rijkenberg, M. J. A., Wolterbeek, H. T., Verburg, T. G., Boye, M. & de Baar, H. J. W. (2007).** Kinetic study reveals weak Fe-binding ligand, which affects the solubility of Fe in the Scheldt estuary. *Marine Chemistry*, **103**(1-2), 30-45.
- Golden, D. C., Ming, D. W., Bowen, L. H., Morris, R. V. & Lauer, H. V. (1994).** Acidified Oxalate and Dithionite solubility and color of synthetic, partially oxidized Al-magnetites and their thermal oxidation products. *Clays and clays minerals*, **42**(1), 53-62.
- Grünberger, O., Hartmann, C., Bourdon, E., Lesturgez, G., Yuvaniyama, A., Sukchan, S. & Ruaysoongnern, S. (2003).** Detailed characterization of a spreading saline patch inside a paddy field of Northeast Thailand. *The Second International Conference on soil quality. Evolution Mechanism and Sustainable Use of Soil Resources*, Yingtian, China. Communication Orale.
- Grünberger, O., Macaigne, P., Michelot, J.-L., Hartmann, C. & Sukchan, S. (2008).** Salt crust development in paddy fields owing to soil evaporation and drainage: Contribution of chloride and deuterium profile analysis. *Journal of Hydrology*, **348**(1-2), 110-123.
- Henrichs, S. M. (1995).** Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis-a comment. *Marine Chemistry*, **49**, 127-136.
- Herbillon, A. J. (1994).** Oxydes de Fer, Gibbsite, Oxydes de Manganèse et Minéraux Allophanes. In *Pédologie 2, Constituants et Propriétés du sol*, chapitre 2, eds. M. Bonneau & B. Souchier, Masson Paris, 665 p.
- Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., De Vos, P., Forsyth, G. & Logan, N. A. (1998).** Virgibacillus: a new genus to accommodate Bacillws pantothenics (Proom and Knight 1950). Emended description of Virgibacihs pantothenicus. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 99-106.
- Hoffmann, T., Schütz, A., Brosius, M., Völker, A., Völker, U. & Bremer, E. (2002).** High-salinity-induced Iron Limitation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **184** (3), 718-727.
- Holmer, M. (1999).** The Effect of Oxygen Depletion on Anaerobic Organic Matter Degradation in Marine Sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **48**, 383-390.
- Houot, S., Francou, C., Vergé-Leviell, C., Michelin, J., Bourgeois, S., Linères, M., Moreld, P., Parnaudeau, V., Le Bissonnais, Y., Dignac, M.-F., Dumat, C., Cheiab, A. & Poitrenaud, M. (2003).** Valeur agronomique et impacts environnementaux de composts d'origine urbaine : variation avec la nature du compost. *Dossier de l'environnement de l'INRA*, **25**, 107-124.
- Hugues, B. & Plantat, J. L. (1983).** Cacul des limites d'acceptation du nombre le plus probable dans le cas ou le nombre d'inoculums par dilution est important. *Chemosphere* **12**, 1679-1684.
- Imaizumi, M., Sukchan, S., Wichaidit, P., Srisuk, K. & Kaneko, F. (2002).** Hydrological and Geochemical behavior of saline groundwater im phra yun, northeast Thailand. *JIRCAS Working Report* **30**, 7-14.
- Jäckel, U. & Schnell, S. (2000).** Suppression of methane emission from rice paddies by ferric iron fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**, 1811-1814.

- Jacq, V. A. (1975).** La sulfato-réduction en relation avec l'excrétion racinaire. *Société Botanique de France. Colloque Rhizosphère*, 169-181.
- Jacq, V. A., Prade, K. & Ottow, J. C. G. (1987).** Significance of iron and sulphate redox processes in flooded soils for the nutrition of rice. *Congres International Society Soil Science*, **6**, 706 -714.
- Jacq, V. A., Prade, K. & Ottow, J. C. G. (1990).** Iron sulphide accumulation in rhizosphère of wetland rice (*Oryza sativa* L.) as a result of microbial activities. In *Diversity of Environmental Biogeochemistry*, ed. J. Berthelin, Elsevier Science Publishers. Amsterdam, The Netherlands.
- Jeanroy, E. (1983).** Diagnostic des formes du fer dans les pédogénèses tempérées. Evaluation par les réactifs chimiques d'extraction et apports de la spectrométrie Mössbauer. In *Sciences Naturelles*, Vol. Doctorat, Université de Nancy I. Nancy, 168 p.
- Jeanroy, E., Rajot, J. L., Pillon, P. & Herbillon, A. J. (1991).** Differential dissolution of hematite and goethite in dithionite and its implication on soil yellowing. *Geoderma*, **50**(1-2), 79-94.
- Jensen, H. S. & Thamdrup, B. (1993).** Iron-bound phosphorus in marine sediments as measured by bicarbonate-dithionite extraction. *Hydrobiologia*, **253**, 47-59.
- Jeong, T.-Y., Cha, G.-C., Yeom, S. H. & Choi, S. S. (2008).** Comparison of hydrogen production by four representative hydrogen-producing bacteria. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **14**(3), 333-337.
- Jiang, H., Dong, H., Yu, B., Liu, X., Li, Y., Ji, S. & Zhang, C. L. (2007).** Microbial response to salinity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan plateau. *Environmental Microbiology*, **9**(10), 2603-2621.
- Kerkar, S. (2004).** Ecology of Hypersaline Microorganisms. Chapitre 5. In *Marine Microbiology*, ed. F. Opportunities, National Institute of Oceanography, Goa. Ramaiah, 37-47.
- Khijniak, T. V., Slobodkin, A. I., Coker, V., Renshaw, J. C., Livens, F. R., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Birkeland, N.-K., Medvedeva-Lyalikova, N. N. & Lloyd, J. R. (2005).** Reduction of Uranium(VI) Phosphate during Growth of the Thermophilic Bacterium. *Thermoterrabacterium ferriducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(10), 6423-6426.
- Kraegeloh, A., Amendt, B. & Kunte, H. J. (2005).** Potassium Transport in a Halophilic Member of the Bacteria Domain: Identification and Characterization of the K⁺ Uptake Systems TrkH and TrkI from *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Journal of Bacteriology*, **187**(3) 1036-1043.
- Kraemer, S. M., Cheah, S.-F., Zapf, R., Xu, J., Raymond, K. N. & Sposito, G. (1999).** Effect of hydroxamate siderophores on Fe release and Pb(II) adsorption by goethite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **63**(19-20), 3003-3008.
- Kristensen, E., Ahmed, S. I. & Devol, A. H. (1995).** Aerobic and anaerobic decomposition of organic matter in marine sediments: which is fastest. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1430-1437.
- Lefebvre-Drouet, E. & Rousseau, M. F. (1995).** Dissolution de différents oxyhydroxydes de fer par voie chimique et par voie biologique: importance des bactéries réductrices. *Soil Biology and Biochemistry*, **27**(8), 1041-1050.
- Leyval, C. & Berthelin, J. (1983).** Effets rhizosphériques de plantes indicatrices de grands types de pédogénèse sur quelques groupes bactériens modifiant l'état des minéraux. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, **20**, 191-206.

- Liesack, W., Schnell, S. & Revsbech, N. P. (2000).** Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**(5), 625-645.
- Lin, B., Hyacinthe, C., Bonneville, S., Braster, M., Van Cappellen, P. & Röling, W. F. M. (2007).** Phylogenetic and physiological diversity of dissimilatory ferric iron reducers in sediments of the polluted Scheldt estuary, Northwest Europe. *Environmental Microbiology*, **9**(8), 1956-1968.
- Liu, X. & Millero, F. J. (1999).** The solubility of iron hydroxide in sodium chloride solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **63**(19-20), 3487-3497.
- Liu, X. & Millero, F. J. (2002).** The solubility of iron in seawater. *Marine Chemistry*, **77**(1), 43-54.
- Lopez, P. L. & Graham, E. P. (1972).** Determination of labile pool of manganese, iron, zinc, cobalt and copper in deficient soils by isotopic exchange. *Soil Science*, **114**, 296-299.
- Lovley, D. R. (1991).** Dissimilatory Fe (III) and Mn(IV) Reduction. *Microbiological Reviews*, **55**(2), 259-287.
- Lovley, D. R. (1997).** Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiology Reviews*, **20**(3-4), 305-313.
- Lovley, D. R. & Coates, J. D. (2000).** Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance. *microbiological journal*, **3**, 252-256.
- Lovley, D. R. & Donald, L. S. (1995).** Microbial Reduction of Iron, Manganese, and Other Metals. In *Advances in Agronomy*, Vol. Volume 54, Academic Press, 175-231.
- Lovley, D. R., Kashefi, K., Vargas, M., Tor, J. M. & Blunt-Harris, E. L. (2000).** Reduction of humic substances and Fe(III) by hyperthermophilic microorganisms. *Chemical Geology*, **169**(3-4), 289-298.
- Lovley, D. R. & Woodward, J. C. (1996).** Mechanisms for chelator stimulation of microbial Fe(III)-oxide reduction. *Chemical Geology*, **132**(1-4), 19-24.
- Loyer, J. Y. (1991a).** Classification des sols salés : les sols Salic. *Cahier O.R.S.T.O.M., série Pédologie*, **XXVI**, n°1, 51-61.
- Loyer, J. Y. (1991b).** Salinités des eaux d'irrigation: Problèmes et Solutions. In *Conférence I.A.M.*, ed. ORSTOM. BARI, Italie, 1-10.
- Loyer, J. Y., González Barrios, J. L. & Job, J. O. (1989).** Les principaux faciès salins et leur expression dans les en régions chaudes. *Actes de Seminaire. Mapini, Mexique*, 347-362.
- Lu, W. J., Wang, H. T., Huang, C. Y. & Wolfgang, R. (2002).** Communities of Iron(III)-reducing Bacteria in Irrigated Tropical Rice Fields. *Microbes and Environments*, **17**(4), 170-178.
- Lutts, S., Kinet, J. M. & Bouharmont, J. (1996).** NaCl-induced Senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars differing in salinity resistance. *Annals of botany*, **78**, 389-398.
- Lynch, J. M. & Whipps, J. M. (1990).** Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* **129**, 1-10.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (1996a).** *Biology of microorganisms*. 9th ed ed. Prentice Hall, Upper, Saddle River, 986 p.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (1996b).** *Biology of microorganisms. 9th ed ed.* Brock, 9th ed. Prentice Hall, Upper, Saddle River, 986 p.
- Maillard, J. (2001).** Le point sur l'irrigation et la salinité des sols en zone aride: Risques et Recommandations. Handicap International.
- Majerus, V., Bertin, P. & Lutts, S. (2007a).** Effects of iron toxicity on osmotic potential, osmolytes and polyamines concentrations in the African rice (*Oryza glaberrima* Steud.). *Plant Science*, **173**(2), 96-105.
- Majerus, V., Bertin, P., Swenden, V., Fortemps, A. & Lutts, S. (2007b).** Organ-dependent responses of the African rice to short-term iron toxicity: ferritin regulation and antioxidative responses. *Biology Plantarum*, **5** (2)(2), 303-312.
- Marchal, R., Chaussepied, B. & Warzywoda, M. (2001).** Effect of ferrous availability on growth of corroding sulfate-reducing bacterium. *International Biodeterioration et Biodegradation*, **47**, 125-131.
- Masajo, T. M., Alluri, K., Abifarin, A. O. & Jankiram, D. (1986).** Breeding for high and stable yields in Africa. . In *In the Wetlands and Rice in sub-Saharan Africa* ed. A. S. R. J. J. A. Lowe, Institute of Tropical Agriculture. Ibadan, Nigeria International, 107-114.
- Mathieu, C. & Pieltain, F. (2003).** *Analyse chimique des sols Méthodes choisies.* Lavoisier ed, Paris, 387 p.
- Mc Keague, J. A. & Day, J. H. (1966).** Dithionite and oxalate extractable Fe and Al as aids in differentiating various classes of soils. *Canadian Journal of Soil Science*, **46**, 13-22.
- McBride, M. B. (1994).** *Environmental Chemistry of Soils.* Oxford, New York, 406 p.
- Mengel, K., Schon, H. G., Keerthisinghe, G. & DE Datta, S. K. (1986).** Ammonium dynamics of puddled soils in relation to growth and yield of lowland rice. *Fertilizer Research*, **9**, 117-130.
- Montoroi, J.-P., Grünberger, O., Sukchan, S. & Kunglang, N. (2005).** Estimation de la salinité des sols du Nord-Est de la Thaïlande par électromagnétisme en domaine fréquentiel. In *5ème Colloque Geofcan (Geophysique des sol et des formations superficielles), 20 et 21 Septembre 2005*, ed. C. écrites. Orléan (FRANCE).
- Monty, P. J. (1995).** Le plant de riz et son environnement. . *Guide de formation ADRAO*, **2**, 34.
- Munch, J. C. & Ottow, J. C. G. (1980).** Preferential reduction of amorphous to crystalline iron oxides by bacteria activity. *Soil Science*, **129**, 15-21.
- Munch, J. C. & Ottow, J. C. G. (1983).** Reductive transformation mechanism of ferric oxide in hydromorphic soils. *Environmental Biogeochemistry*, **35**, 383-394.
- Munns, R. (2002).** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, **25**, 239-250.
- Mustafa, G., Singh, B. & Kookana, R. S. (2004).** Cadmium desorption from goethite in presence of desferrioxamine B and oxalic acid. In *3rd Australian New Zealand soils Conference, 5-9 December.*, ed. SuperSoil, CDROM. University of Sydney, Australia.
- Mustin-Deneux, S. (2003).** Milieux de cultures. Laboratoire des Interactions Minéraux-Matières Organiques-Microorganismes dans les Sols (LIMOS).

- Myers, C. R. & Nealson, K. H. (1990).** Respiration-Linked Proton Translocation coupled to Anaerobic Reduction of Manganèse (IV) and Iron (III) in *Schewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Bacteriology*, **172**(11), 6232-6238.
- N'Dabalishle, I. (1995).** Agriculture Ouest-africaine : cas de la Côte d'Ivoire. *Institut des savanes (IDESSA)*, 45-50.
- N'Guessan, Y. (2002).** L'évolution des rendements sur les périmètres de rizicultures irriguée de Côte d'Ivoire. *International Rice Commission Newsletter*
- Neue, H. U., Quijano, C., Senadhira, D. & Setter, T. (1998).** Strategies for dealing with micronutrient disorders and salinity in lowland rice systems. *Field Crops Research*, **56**(1-2), 139-155.
- Norini, M. P. (2007).** Ecodynamique, des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans les sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique: influence de la rhizosphère et de la mycorhization. In *Géosciences*, Vol. Doctorat, Université Henri Poincaré Nancy. Nancy, 241 p.
- Nozoe, T., Agbisit, R., Fukuta, Y., Rodriguez, R. & Yanagihar, S. (2004).** The Iron (Fe)-excluding power of rice roots as a mechanism of tolerance of elite breeding lines to iron toxicity. In *4th International Crop Science Congress*, 26 Sept -1 Oct ed. I. R. R. I. (IRRI). Brisbane, Australia.
- Paskiewicz, I. (2006).** Incidences d'interactions Racines-Microorganismes-Etats Hydrique sur la Mobilisation et Redistribution de Métaux dans des Sols Nickélicifères. In *Thèse Unique en Science du Sol. Géomicrobiologie*, Université Henri Poincaré, Nancy I. Nancy, 253 p.
- Petrie, L., North, N. N., Dollhopf, S. L., Balkwill, D. L. & Kostka, J. E. (2003).** Enumeration and Characterization of Iron(III)-Reducing Microbial Communities from Acidic Subsurface Sediments Contaminated with Uranium(VI). *Applied and environmental microbiology*, **69**(12), 7467-7479.
- Pham, C. A., Jung, S. J., Phung, N. T., Lee, J., Chang, I. S., Kim, B. H., Yi, H. & Chun, J. (2003).** A Novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiology Letters*, **223**, 129-134.
- Prade, K., Ottow, J. C. G., Jacq, V. A., Malouf, G. & Loyer, J.-Y. (1990).** Relations entre les propriétés des sols de rizières inondées et la toxicité ferreuse en basse Casamance (Sénégal). *Cahier O.R.S.T.O.M., série Pédologie*, **XXV**(4), 453-474.
- Quantin, C., Becquer, T. & Berthelin, J. (2002).** Mn-oxide: a major source of easily mobilisable Co and Ni under reducing conditions in New Caledonia Ferralsols. *Comptes Rendus Geosciences*, **334**(4), 273-278.
- Quantin, C., Becquer, T., Rouiller, J. H. & Berthelin, J. (2001).** Oxide weathering and trace metal release by bacterial reduction in a new Caledonia Ferralsol. *Biogeochemistry* **53**, 323-340.
- Quantin, C., Grunberger, O., Suvannang, N. & Bourdon, E. (2008).** Land Management Effects on Biogeochemical Functioning of Salt-Affected Paddy Soils. *Pedosphere*, **18**(2), 183-194.
- Quantin, C., Suvannang, N., Kunglang, N. & Grünberger, O. (2004).** Impact of paddy field management on reduction processes in salt-affected soils in North-Eastern Thailand. Second International Conference on soil quality. 22 au 23 Novembre 2004, Communication orale. Nancy.

- Quantin, P., Bourdon, E. & Becquer, T. (1997).** Minéralogie et contraintes édaphiques des sols ferritiques dérivés de roches ultrabasiques en Nouvelle -Calédonie: relations entre les constituants minéraux et disponibilité en certains éléments (Al, Fe, Si, Mg, Mn, Ni, Co, Cr, Cu, Zn et Mo) facilement solubles. . In *Ecologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères*, eds. T. Jaffré, R. D. Reeves & T. Becquer, ORSTOM, . Nouméa, 13-25.
- Quijano-Guerta, C. & Kirk, G. J. D. (2002).** Tolerance of rice germplasm to salinity and other soil chemical stresses in tidal wetlands. *Field Crops Research*, **76**(2-3), 111-121.
- Rafiee, M.-R., Sokhansanj, A., Yoosefi, M. & Naghizadeh, M.-A. (2007).** Identification of salt-inducible peptide with putative kinase activity in halophilic bacterium *Virgibacillus halodenitrificans*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **104**(3), 178-181.
- Rajot, J. L. (1992).** Dissolution des oxydes de fer (hématite et goethite) d'un sol ferrallitique des Llanos de Colombie par des bactéries ferri-réductrices. Implications sur le jaunissement des matériaux pédologiques rouges. Thèse en Géomicrobiologie, Université de Nancy I. Nancy, 193.
- Reddy, K. R. & Patrick Jr, W. (1986).** Denitrification losses in flooded rice fields. *Fertilizer Research*, **9**, 99-116.
- Reichard, P. U., Kretzschmar, R. & Kraemer, S. M. (2007).** Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **71**(23), 5635-5650.
- Rinaudo, G. (1977).** La fixation d'azote dans la rhizosphère du riz: importance du type variétal. *Cahiers - ORSTOM, Série Biologie*, **XII**(2), 117-119.
- Roger, P. & Le Mer, J. (2003).** Les sols : sources et puits de méthane. *Etude et Gestion des sols*, **10**(4), 331-345.
- Roger, P. A. (1996).** *Biology and Management of the floodwater Ecosystem in Ricefields*. IRRI (International Rice Research Institute), Los Banos, Philippines, 250 p.
- Roger, P. A. & Ladha, J. K. (1992).** Biological N₂ fixation in wetland rice fields: estimation and contribution to nitrogen balance. *Plant and Soil*, **141**, 41-55.
- Roger, P. A. & Watanabe, I. (1986).** Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice: potentialities, current usage, and limiting factors. *Fertilizer Research*, **9**, 39-77.
- Rouiller, J. (1993).** Techniques de laboratoire dans l'analyse des sols. Centre de Pédologie Biologique du CNRS,. In *Note technique CPB-CNRS*. Vandoeuvre, Nancy, 43 p.
- Roy, R. & Conrad, R. (1999).** Effect of methanogenic precursors (acetate, hydrogen, propionate) on the suppression of methane production by nitrate in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **28**(1), 49-61.
- Saffarini, D. A., DiChristina, T. J., Bermudes, D. & Nealson, K. H. (1994).** Anaerobic respiration of *Shewanella putrefaciens* requires both chromosomal and plasmid-borne genes. *Microbiology letters*, **119**, 271-278.
- Sahrawat, K. L., Diatta, S. & Singh, B. N. (2001).** Nutrient application reduces iron toxicity in lowland rice in West Africa. *Soil, Nutrient and Water Management. International Rice Research Note (IRRN)*, **26**(2), 51-58.

- Sahrawat, K. L. & Sika, M. (2002).** Comparative of *Oryza sativa* and *O. glaberrima* rice cultivars for iron toxicity in West Africa. *Soil, Nutrient and Water Management. International Rice Research Note (IRRN)*, **27**(2), 30-33.
- Saied, A. S., Keutgen, A. J. & Noga, G. (2005).** The influence of NaCl salinity on growth, yield and fruit quality of strawberry cvs. [']Elsanta' and [']Korona'. *Scientia Horticulturae*, **103**(3), 289-303.
- Scholes, P. & Mitchell, P. (1970).** Respiration-driven proton translocation in *Micrococcus denitrificans*. *Journal of Bioenergy*, **1**, 309-323.
- Schwertmann, U. & Cornell, R. M. (2000).** *Iron Oxides in laboratory. Preparation and Characterization*. 2nd Ed. WILEY- VCH, Weinheim, 188 p.
- Schwertmann, U. & Taylor, R. M. (1977).** Iron Oxides. In *Minerals in Soil Environments*, chapter 5, ed. J. B. Dixon, Soil Science Society of America. Madison, 860 p.
- Segalen, P. (1971).** La détermination du fer libre dans les sols à sesquioxydes. *Cahiers - ORSTOM, Série Biologie*, **IX**(1), 3-26.
- Segalen, P. (1973).** L'aluminium dans les sols. *Init et Dot 22*(ORSTOM Paris), 281p.
- Sokhansanj, A., Karkhane, A. A. & Jazii, F. R. (2005).** Identification and characterization of salt-inducible polypeptide in *Paenibacillus sp.*, a moderately halophilic bacterium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100**(5), 573-575.
- Sow, M. (2003).** Innovations en aménagement des sols de mangrove pour la riziculture : Cas du périmètre de Yangoyah (Guinée). *Étude et Gestion des Sols*, **10**(2), 95-106.
- Stemmler, S. J. (2001).** Altération microbienne des minéraux dans les sols hydromorphes : incidence du couplage entre les cycles du carbone et du fer. In *Science du sol - Géomicrobiologie*, Université Nancy I Nancy, 205 p.
- Stemmler, S. & Berthelin, J. (2003).** Microbial activity as a major factor in the mobilization of iron in the humid tropics. . *European Journal of Soil Science*, **54** (4), 725-733.
- Stolzfus, J. R., So, R., Malarvithi, P. P., Ladha, J. K. & De Bruijn, F. J. (1997).** Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant and Soil* **194**, 25-36.
- Sun, M. Y., Wakeham, S. G. & Lee, C. (1997).** Rates and mechanisms of fatty acid degradation in oxic and anoxic coastal marine sediments of long Island Sound. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61**, 341-355.
- Tardy, Y. (1993).** *Pédrologies des Latérites et des Sols Tropicaux*. Masson, Paris, 459 p.
- Tebo, B. M. & Obratsova, A. Y. (1998).** Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV) and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiology Letters*, **162**(11), 193-198.
- Traoré, T. (1985).** Fixation d'azote par les cyanobactéries dans les rizières du Mali. *MIRCEN Journal*, **1**, 213-224.
- Vizier, J.-F. (1988).** Toxicité ferreuse dans les sols de rizières. Importance du problème. Causes et mécanismes mis en jeu. Conséquences pour l'utilisation des sols. *O.R.S.T.O.M.-Cadache* 1-13.

- Vizier, J.-F. (1990).** Etude du fonctionnement des milieux saturés en eau. Une démarche physico-chimique. *Cahier O.R.S.T.O.M., série Pédologie*, **XXV**(4), 431-442.
- Watteau, F. & Berthelin, J. (1994).** Microbial dissolution of iron and aluminium from soil minerals: efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to aliphatic acids. *European Journal of Soil Biology*, **30**(1), 1-9.
- Webster, G., Gough, C., Vasse, J., Batchelor, C. A., O'Callaghan, K. J., Kothari, S. L., Davey, M. R., Dénarié, J. & Cocking, E. C. (1997).** Interactions of rhizobia with rice and wheat. *Plant and Soil*, **194**, 115-122.
- Xu, N. & Gao, Y. (2008).** Characterization of hematite dissolution affected by oxalate coating, kinetics and pH. *Applied Geochemistry*, **23**, 783-793.
- Yanni, Y. G., Rizk, R. Y., Corich, V., Squartini, A. & Ninke, K. (1997).** Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil*, **194**, 99-114.
- Yao, H. & Conrad, R. (1999).** Thermodynamics of methane production in different rice paddy soils from China, the Philippines and Italy. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**(3), 463-473.
- Yeo, A. R. & Flowers, T. J. (1985).** The absence of an effect of the Na/Ca ratio on sodium chloride uptake by rice (*Oryza sativa* L.). *New phytologist*, **99**, 81-90.
- Yin, S. X., Chen, D., Chen, L. M. & Edis, R. (2002).** Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and responsible microorganisms in two Chinese and Australian paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**(8), 1131-1137.
- Yoshida, T. (1976).** Microbial metabolism of loaded soils. E.A.P.M. Laren, Marcel Dekker Inc. *Soil Biochemistry*, **3**, 83-122.
- Zaitsev, G., Tsitko, I. V., Rainey, F. A., Trotsenko, Y. A., Uotila, J. S., Stackebrandt, E. & Salkinoja-Salonen, M. S. (1998).** New aerobic ammonium-dependent obligately oxalotrophic bacteria: description of *Ammoniphilus oxalaticus* gen. nov., sp. nov. and *Ammoniphilus oxalivorans* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 151-163.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : *Protocole d'extraction d'ADN à partir des inoculum bactériens*

1. Centrifuger l'inoculum bactérien à 15000 tr/min pendant 10min, verser le surnageant et rincer le culot avec 200µl d'eau physiologique sterile. Agiter et verser dans les microtubes
2. Ajouter 20µl de lysozyme et agiter pendant 30min à 37°C
3. Ajouter 20µl Protéinase K et agiter pendant 30min à 70°C (bain marie)
4. Prélever l'échantillon et le mettre dans les tubes matrice A lysing du kit
5. Ajouter 1ml CLS-TC. Utiliser le broyeur en agate pour homogénéiser et centrifuger pendant 10min à 12000tr/min
6. Prélever le surnagent (700-1000µl) dans les microtubes et ajouter à volume égal du Binding matrice du kit. Homogénéiser avec du voltex et agiter pendant 5min rotativement
7. Centrifuger en 10min et jeter le surnageant. Sur le culot ajouter 500µl SEWS-M, homogénéiser avec du voltex et centrifuger pendant une minute à 14000tr/min
8. Verser le surnageant et laisser sécher pendant 30min
9. Ajouter 100µl de DES et incubé à 55°C pendant 5min
10. Centrifuger et récupérer le surnageant (c'est l'ADN extrait) dans un autre microtube et conserver à -80°C
11. Après l'extraction, préparer le gel d'agarose (0,50g d'agarose dans 50ml de TAE (1X)), le faire chauffer au micro onde et couler le gel.
12. 1µl de bleu méthylène et 5µl d'extrait d'ADN pour les échantillons ou 5µl d'eau stérile filtrée à 0,2µm pour le témoin, 1µl de bleu et 1µl de marqueur d'ADN pour le marqueur de taille. La quantité et la qualité des extraits d'ADN obtenus sont ensuite vérifiées par électrophorèse à 120V dans le gel d'agarose 1% avec 5µl d'extrait d'ADN et 1µl de bleu de méthylène et révélées par un bain de bromure d'éthidium (BET, 0,5 mg.l⁻¹, Biorad) pendant 15min.

Annexe 2 : *Protocole d'extraction d'ADN à partir des échantillons de sols*

- Peser 0,5 g de sol dans un tube de centrifugation stérile de 5mL
- Ajouter un mélange de billes (grosses billes, petites billes et poudre de verre)
- Ajouter 0,8 ml de tampon d'extraction n°1 à 4°C (TRIS-base à 100 mmol/l ; EDTA à 100 mmol/l ; NaCl à 100 mmol/l et PVPP 1% ; SDS 2%)
- Ajouter 40 µL de tampon d'extraction n°2 à 4°C (CTAB à 6% et CaCl₂ à 5 mmol/l)
- Agiter le tube de centrifugation dans un broyeur agitateur horizontal 60 s à 1 m/s
- En cas de formation de mousse, faire une centrifugation rapide à 14000 rpm
- Ajouter 0,8 ml d'une solution de phénol à 4°C (phénol, chloroforme, alcool isoamylique)
- Ajouter 40 µL de chelex à 4 % et à 4°C et mélanger à la main jusqu'à obtenir une émulsion
- Agiter le tube de centrifugation dans un broyeur horizontal 30 s à 1 m/s
- Centrifuger le tube 5 min à 14000 rpm et à 4°C
- Transférer le surnageant dans un tube phase lock gel stérile de 2 ml
- Ajouter 0.8 ml d'une solution de chloroforme à 4°C (chloroforme, alcool isoamylique)
- Mélanger à la main jusqu'à obtenir une émulsion, puis centrifuger le tube pendant 5 min à 14000 rpm et à 4°C
- Transférer le surnageant dans un tube eppendorf stérile de 2 ml
- Ajouter 0.8 mL d'une solution de chloroforme à 4°C (chloroforme, alcool isoamylique)
- Mélanger à la main jusqu'à obtenir une émulsion
- Centrifuger l'émulsion durant 5 min à 14000 rpm et à 4°C
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube eppendorf stérile de 2 mL
- Ajouter 1 volume d'isopropanol à 4°C
- Laisser le tube 15 min à 4°C
- Centrifuger le tube 20 min à 14000 rpm et à 4°C
- Jeter le surnageant, ensuite ajouter 100 µL d'éthanol à 70% et à 4°C et centrifuger 2 min à 14000 rpm et à 4°C
- Jeter le surnageant et ajouter 100 µL d'éthanol à 70% et à 4°C
- Centrifuger à 2 min à 14000 rpm et à 4°C et jeter le surnageant
- Centrifuger à 1 min à 14000 rpm et à 4°C
- Sécher le culot (15 min minimum)
- Resuspendre le culot avec 50 µL de tampon TRIS à 10 mmol/l et pH = 8
- Stocker à -80°C jusqu'à utilisation

Annexe 3 : Caractéristiques physico-chimiques et organiques des solutions des rizières. Analyses effectuées au laboratoire. Différents points de prélèvements : Source principale (SP) ; Canal principal (CP) ; Casier planté en riz (Cp) ; Casier non planté (Cnp) sur les sites de Gagnoa (GAG) et de Guéssihio (GUES)

Sites d'étude	Points de prélèvements	mmol.l ⁻¹										mg.l ⁻¹				
		Ca	Fe	K	Mg	Na	Si	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ⁻²	PO ₄ ⁻³	gluconique	Acétique	Formique	Oxalique	COD
GUES	Cnp	0,11	0,04	0,01	0,06	0,86	0,71	0,05	0,00	0,01	0,00	0,90	0,00	0,46	0,29	19,92
	Cp	0,15	0,13	0,03	0,08	0,26	0,22	0,14	0,00	0,01	0,00	0,68	0,08	0,38	0,28	29,16
	CP	0,10	0,11	0,04	0,07	0,48	0,39	0,07	0,00	0,01	0,00	0,30	0,11	0,30	0,21	17,33
	SP	0,11	0,06	0,03	0,07	0,51	0,42	0,08	0,01	0,01	0,00	1,47	0,30	0,00	0,24	13,89
GAG	Cnp	0,10	0,04	0,15	0,07	0,40	0,33	0,27	0,02	0,01	0,00	1,33	0,00	0,14	0,00	15,07
	Cp	0,18	0,11	0,05	0,11	0,35	0,29	0,16	0,00	0,01	0,00	1,98	0,38	0,42	0,33	25,97
	CP	0,13	0,04	0,06	0,09	0,45	0,37	0,17	0,00	0,01	0,00	1,25	0,35	0,67	0,28	24,51
	SP	0,11	0,18	0,04	0,07	0,36	0,29	0,13	0,00	0,01	0,00	1,00	0,09	0,19	0,00	18,54

Résumé

Implications des communautés bactériennes ferri-réductrices et de paramètres environnementaux dans le fonctionnement et la qualité des sols de rizières (Thaïlande et Côte d'Ivoire)

Ce travail a été effectué pour définir le rôle des bactéries ferri-réductrices sur la mobilisation du fer dans deux types de situations environnementales : l'une où les rizières sont soumises à la salinité et à des apports de matières organiques (Thaïlande) et l'autre où la toxicité ferreuse se développe fortement (Côte d'Ivoire). Diverses approches ont été adoptées allant de la caractérisation des sols et des eaux in situ à des études expérimentales au laboratoire en distinguant l'impact de divers paramètres (amendement organique, salinité, rhizosphère, teneur et nature des matières organiques des sols). Pour les sols de Thaïlande, les résultats montrent que la salinité limite la prolifération des communautés bactériennes. L'apport de matières organiques, même faible, améliore la croissance et les activités des communautés bactériennes dans les zones salines. Une adaptabilité à la salinité est observée pour diverses populations de bactéries constituant des consortia ferri-réducteurs cultivables ou non, comportant au moins 4 à 5 populations identifiées. Ces consortia possèdent, pour certains des populations ferri-réductrices communes à l'ensemble des conditions (salines vs non salines), des populations soit halotolérantes (*Clostridium beijerinckii* ; *Bacillus* sp. ; *Oceanobacillus* sp., *Shewanella* sp.), soit halophiles (*Virgibacillus*, *Alkaliphilus metalliredigens*, *Bacillus megaterium*), soit halosensibles, favorisant le maintien des activités dans des conditions de milieux variables. En Côte d'Ivoire, les conditions de milieu semble plus réductrices avec la présence d'une forte communauté bactérienne sulfato-réductrice (*Desulfovibrio desulfuricans*) et d'une forte communauté bactérienne ferri-réductrice, majoritairement fermentaire (*Bacillus* sp.), qui contribuerait efficacement à la réduction et solubilisation du fer. L'activité bactérienne ferri réductrice délétère en Côte d'Ivoire mais bénéfique en Thaïlande, apparaît comme un paramètre et un indicateur de la qualité des sols de rizières.

Mots clés : Rizières, Rhizosphère, amendement organique, Matières organiques, toxicité ferreuse, salinité, bactéries et communautés ferri réductrices (IRB), réduction, dissolution et solubilisation du fer, qualité des sols, Thaïlande, Côte d'Ivoire.

Abstract

Involvement of iron reducing bacterial communities and of environmental parameters in the functioning and quality of paddy soils (Thailand and Ivory Coast)

This work was performed to define the role of iron reducing bacteria (IRB) on the iron mobilization in two types of paddy fields presented different environmental problems. One is affected by salinity and received organic matter (Thailand) and the other by ferrous toxicity (Ivory Coast). Different approaches were adopted to characterize soil and water properties and determine in experiments populations and activities of IRB. Main parameters involved are salinity, rhizosphere, organic matter and iron bacterial reducing activities. Furthermore, the study of the structure of bacterial populations was done using molecular biology (PCR-TTGE). In Thai paddy soils, the results show that salinity limit bacterial communities proliferation. But the addition of organic matter improves bacterial growth and activities and remediates rice production. Bacterial populations observed in saline and non saline condition, presented halotolerant (*Clostridium beijerinckii* ; *Bacillus* sp. ; *Oceanobacillus* sp., *Shewanella* sp.), halophile (*Virgibacillus*, *Alkaliphilus metalliredigens*, *Bacillus megaterium*), or halosensitive characteristic, allowing the activity of bacterial communities in different medium conditions. In Ivory Coast paddy soils, the environmental conditions are more reducing with the presence of a large community of sulphate-reducing bacteria (*Desulfovibrio desulfuricans*). A large diversity of iron reducing communities, predominantly fermentative bacteria (*Bacillus* sp.), seems to contribute efficiently to iron reduction and solubilization. Iron reducing bacterial activity deleterious in Ivory Coast but beneficial in Thailand, appears as a parameter and indicator of the quality of paddy soil.

Key words : paddy fields, Rice, Rhizosphere, organic amendment, organic matter, ferrous toxicity salinity, Iron reducing bacteria (IRB), iron reduction, iron dissolution and solubilisation, bacterial communities, soil quality, Thailand, Ivory Coast.