



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>

INRA-CMSE
Laboratoire de Microbiologie
des Sols
DIJON

Université de Metz
UFR Sciences Fondamentales
et Appliquées
METZ

Thèse
présentée à l'Université de Metz
pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université

par

Christine LORS

IMPACT DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES
SUR LA DIVERSITE SPECIFIQUE ET
'FONCTIONNELLE DE LA MICROFLORE DU SOL

CAS DU DINITRO-*O*-CRESOL

soutenue le 28 février 1997
devant la commission d'examen

P. Vasseur	Président	Professeur à l'Université de Metz
J.C. Fournier	Rapporteur	Ingénieur de Recherche à l'INRA de Dijon
M. Schiavon	Rapporteur	Professeur à l'INPL-ENSAIA de Nancy
G. Soulas	Examineur	Directeur de Recherche à l'INRA de Dijon
P. Bauda	Examineur	Maître de Conférence à l'Université de Metz
G. Laguerre	Examineur	Chargé de Recherche à l'INRA de Dijon
I. Feix	Membre invité	Ingénieur ADEME d'Angers

Ademe



5112035

S/M3 97/9

INRA-CMSE
Laboratoire de Microbiologie
des Sols
DIJON

Université de Metz
UFR Sciences Fondamentales
et Appliquées
METZ

Thèse
présentée à l'Université de Metz
pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université

par

Christine LORS

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19970203
Cote	S/M3 97/9
Loc	Magasin

IMPACT DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES SUR LA DIVERSITE SPECIFIQUE ET FONCTIONNELLE DE LA MICROFLORE DU SOL

CAS DU DINITRO-O-CRESOL

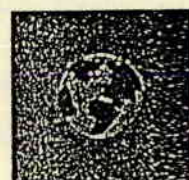
soutenue le 28 février 1997
 devant la commission d'examen

P. Vasseur
 J.C. Fournier
 M. Schiavon
 G. Soulas
 P. Bauda
 G. Laguerre
 I. Feix

Président
 Rapporteur
 Rapporteur
 Examineur
 Examineur
 Examineur
 Membre invité

Professeur à l'Université de Metz
 Ingénieur de Recherche à l'INRA de Dijon
 Professeur à l'INPL-ENSAIA de Nancy
 Directeur de Recherche à l'INRA de Dijon
 Maître de Conférence à l'Université de Metz
 Chargé de Recherche à l'INRA de Dijon
 Ingénieur ADEME d'Angers

Ademe



Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'INRA de Dijon dirigé par Monsieur Jean-Claude Germon.

Cette thèse a été financée par l'ADEME dans le cadre de l'unité « Service Recherche Scientifique Impact et milieux ».

Je remercie M. Soulas pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe pesticide et pour avoir dirigé avec un grand intérêt ce travail. Je lui exprime toute ma gratitude pour le soutien scientifique qu'il m'a apporté pendant ces trois ans et sa disponibilité lors de la rédaction de ce mémoire.

J'exprime ma profonde gratitude aux membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

J'adresse également mes remerciements à toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à ce travail et plus particulièrement à :

- Bernard Lagacherie pour l'intérêt qu'il a porté à ma thèse et ses précieux conseils tant scientifiques que techniques.

- Gisèle Laguerre pour m'avoir guidé dans l'étude génotypique de mes souches.

- Jean Blanquet (ENSAE, Dijon) pour son aide dans l'analyse statistique de mes données.

- Philippe Lemanceau, Thérèse Corborand et Xavier Latour (Laboratoire de la Flore Pathogène dans les Sols, INRA de Dijon) pour leur collaboration à ce travail.

- Enfin, Nadine Rouard, Laurent Tessier, Sandrine Rousseaux et Abdallah Yassir pour leur bonne humeur et leur soutien lors de la phase finale de ce travail.

Je dédie ma thèse à toute ma famille, plus particulièrement à mes parents pour leur soutien moral qui m'a permis de mener à bien ce travail.

Nom : LORS Christine
Nature : Diplôme de Doctorat
Date de soutenance : 28 février 1997

Titre : Impact des produits phytosanitaires sur la diversité spécifique et fonctionnelle de la microflore du sol : Cas du DNOC.

Résumé : L'impact des pesticides sur la microflore du sol a été abordé par l'étude de l'effet d'un herbicide, le DNOC, pris comme « polluant modèle ».

Nous avons tout d'abord considéré l'influence du DNOC sur la croissance de souches isolées de micro-organismes choisies dans trois groupes microbiens. Deux d'entre eux ont une définition taxonomique, les *Rhizobium* et les *Pseudomonas* alors que le 3^{ème} a une définition fonctionnelle; il s'agit des micro-organismes dégradant le 2,4-D. Cette approche a permis de mettre en évidence la sensibilité de certains micro-organismes (*Rhizobium*) ou la résistance d'autres (*Pseudomonas*) au DNOC. Elle a également révélé une grande diversité de réponses des souches dégradant le 2,4-D, suggérant que dans le sol la communauté dégradante est susceptible d'être exposée à des modifications importantes de composition dont les conséquences fonctionnelles sont probablement loin d'être négligeables. Cependant, cette approche trop simplificatrice ne reflète pas ce qui se passe réellement dans le sol, où des mécanismes de protection physico-chimiques et biologiques tendent probablement à limiter l'impact réel des polluants.

C'est pourquoi, dans la seconde partie, nous avons étudié l'impact du DNOC sur la structure de deux sous-ensembles de la communauté bactérienne du sol, les bactéries cultivables sur milieu non sélectif, et sur milieu dans lequel le 2,4-D constitue la principale source de carbone et d'énergie. Il ressort clairement de cette étude que le DNOC a des effets déstructurants qui se manifestent sur les deux groupes microbiens considérés. Il apparaît nettement que le DNOC, à la dose la plus élevée ($c = 50 \text{ mg kg}^{-1}$), contribue à la diminution du nombre d'espèces de la microflore totale cultivable et de la microflore se développant sur milieu 2,4-D, avec sélection d'une microflore Gram-. La seule différence entre ces deux groupes réside dans la rapidité de réponse, qui se manifeste dès 7 jours dans le premier cas et après deux semaines d'exposition dans le second cas. On constate d'ailleurs une convergence de l'évolution des indices de diversité calculés en fonction de critères morphologiques ou génétiques. La prise en compte du temps a permis d'apprécier la chronicité des effets notamment à des doses où un effet immédiat est peu marqué. Nous avons pu constater une convergence à long terme des trajectoires évolutives des échantillons de sol traités à différentes concentrations, sans réversibilité possible, même dans les échantillons de sol témoin où l'évolution semble tendre vers un appauvrissement en espèces microbiennes.

L'effet du DNOC a ensuite été étudié au travers de ses conséquences sur la diversité métabolique de l'ensemble des bactéries cultivables, et sur l'efficacité fonctionnelle des bactéries dégradant le 2,4-D. Nous avons montré que la présence dans le sol du DNOC était susceptible de modifier la signature métabolique d'une communauté microbienne au travers d'un profil d'utilisation de différents substrats carbonés. Ces modifications sont suffisamment marquantes pour être considérées comme de possibles indicateurs de l'impact écotoxicologique de composés chimiques toxiques.

Les changements fonctionnels liés à la présence d'un biocide dans le sol ont été appréciés par l'action qu'il exerce sur le déroulement d'une fonction particulière, la dégradation du 2,4-D, en considérant comme entités fonctionnelles des microéchantillons de sol. Les résultats ont montré que la capacité d'agrégats individuels à dégrader le 2,4-D est un révélateur extrêmement sensible de l'impact d'un xénobiotique tel que le DNOC.

Ce travail démontre que certaines agressions chimiques, telles que celles qui résultent de la présence du DNOC, provoquent au sein de la microflore du sol des réajustements spécifiques et des adaptations fonctionnelles relativement prononcées.

Mots clés : herbicide, DNOC, 2,4-D, dégradation, sol, effet toxique, bactéries, diversité génotypique, diversité phénotypique.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Microbiologie des Sols, INRA-CMSE
17 rue de Sully, 21034 DIJON CEDEX

Directeur de thèse : G. Soulas

Name : Lors Christine
Diploma : PhD

Title : Impact of herbicides on the functional and specific diversity of the soil microflora.
A test case : the DNOC

Abstract :

The impact of herbicides on the soil microflora was studied through the effect of a model molecule : the DNOC.

We first considered the influence of the DNOC on the growth of pure strains of microorganisms selected in 3 microbial groups. Two of the three were defined by their taxonomic position (*Rhizobia* and *Pseudomonas*), the third by its functional ability to degrade 2,4-D. This approach showed that *Rhizobia* were sensitive, *Pseudomonas* were resistant and 2,4-D degraders had very different responses to DNOC. This suggests that, in the soil, 2,4-D degraders may be exposed to important modifications in their diversity with functional consequences. But, this approach cannot reflect what really happens in the soil where physico-chemical and biological protections probably limit the impact of pollutants.

That is the reason why, in a second time, we studied the DNOC impact on the structure of two subsets of the soil microbial community : bacteria growing on a non-selective medium and on a medium with 2,4-D as the main carbon and energy source. We can clearly see that DNOC has destructuring effects on both groups : a diminution of the number of species and a selection of gram negative bacteria. The only difference is in the velocity of the answer which occurs as soon as 7 days for the "total population" and 14 days for the "2,4-D degraders". Moreover, diversity indices calculated on both morphologic and genetic criteria vary similarly for both populations. We showed a long term based but irreversible convergence of the evolution of control and treated soil samples towards a diminution of the number of microbial species.

The DNOC effect on the metabolic diversity of the total population and on 2,4-D degraders was then studied. We showed that DNOC presence in the soil could modify the metabolic signature of a microbial community defined by the ability to degrade different substrates. The effect is such, that we could consider it as a possible indicator of the ecotoxicological impact of toxic molecules.

Functional changes due to the presence of a biocidal molecule were investigated through its effect on the 2,4-D degradation in micro-samples. DNOC inhibits the degradation even at low doses where a stepwise effect is observed.

This work demonstrates that the soil microbial population reacts to the presence of a chemical pollutant such as the DNOC by a functional and specific adaptation.

Key-words : Herbicide, DNOC, 2,4-D, degradation, soil, bacteria, toxic effect, genotypic diversity, phenotypic diversity

Research laboratory : Laboratoire de Microbiologie des Sols - CMSE, INRA, 17 rue sully, BV 1540, 21034 Dijon Cedex

SOMMAIRE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

EVALUATION DES EFFETS NON VOULUS DES COMPOSES XENOBOTIQUES SUR LA MICROFLORE DU SOL

A. INTRODUCTION	1
B. METHODES GLOBALES D'ESTIMATION DE L'IMPACT DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES SUR LA TAILLE ET L'ACTIVITE DE LA MICROFLORE DU SOL.....	2
I. MESURE DE LA TAILLE DES PEUPELEMENTS MICROBIENS DU SOL.....	3
1. <i>Dénombrements</i>	3
2. <i>Méthodes biocidales</i>	4
3. <i>Méthodes physiologiques</i>	6
4. <i>Exemples d'application des techniques de mesure de biomasse</i>	7
II. PROCESSUS MICROBIENS ET ACTIVITES ENZYMATIQUES	9
1. <i>Processus respiratoires et dégradation des matières organiques</i>	9
2. <i>Fonctions liées au cycle de l'azote</i>	11
3. <i>Activité enzymatiques</i>	12
III. PARAMETRES BIOCINETIQUES ET ECOPHYSIOLOGIQUES.....	12
1. <i>Les paramètres expérimentaux</i>	13
2. <i>Les mesures d'activité hétérotrophe</i>	15
C. METHODES D'ESTIMATION DE L'IMPACT DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES BASEES SUR L'ETUDE DE LA DIVERSITE MICROBIENNE.....	16
I. LA DIVERSITE MICROBIENNE : SIGNIFICATION ET INDICATEUR D'IMPACT ECOTOXICOLOGIQUE	16
II. LA DIVERSITE MICROBIENNE : CARACTERISATION ET MESURE.....	17
1. <i>Diversité spécifique et taxonomique</i>	17
a. <i>Caractérisation de la diversité par les techniques conventionnelles</i>	18
b. <i>Caractérisation de la diversité par profilage génétique</i>	20
c. <i>Caractérisation de la diversité par profilage avec les acides gras</i>	22
2. <i>Diversité microbienne : autres niveaux d'analyse</i>	22
a. <i>Diversité génétique</i>	22
b. <i>Les profils métabolique : diversité fonctionnelle</i>	24
D. CONCLUSION	26

IMPACT DU DNOC SUR DES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES

A. OBJECTIFS	28
B. MATERIEL ET METHODES	30
I. LE SOL ET LES PRODUITS	30
II. GROUPES BACTERIENS	30
1. <i>Bactéries du groupe <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents</i>	30
2. <i>Bactéries du groupe <i>Rhizobium</i></i>	30
3. <i>Bactéries dégradant le 2,4-D</i>	30
a. <i>Isolement</i>	30
b. <i>Caractérisation de Gram</i>	31
c. <i>Caractérisation génotypique</i>	32
d. <i>Classification des souches bactériennes</i>	34
C. ETUDE DE L'EFFET DU DNOC SUR LES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES.....	35
I. PRINCIPE.....	35
II. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	36
D. RESULTATS-DISCUSSION	37
I. CARACTERISATION DE LA DIVERSITE BACTERIENNE AU SEIN DE LA POPULATION DEGRADANT LE 2,4-D ...	37
1. <i>Isolement</i>	37
2. <i>Caractérisation du type Gram</i>	38

3. Caractérisation génotypique	38
a. Profil REP (Repetitive Extragenic Palindromic)	38
b. Profil de restriction du gène de l'ADNr 16S	38
II. ETUDE DU COMPORTEMENT DES SOUCHES BACTERIENNES VIS A VIS DU DNOC	39
E. CONCLUSION	41

IMPACT DU DNOC SUR LA DIVERSITE DE LA MICROFLORE BACTERIENNE DU SOL

A. INTRODUCTION	43
B. MATERIEL ET METHODES	44
I. LE SOL EST LES PRODUITS	44
1. <i>le sol</i>	44
2. <i>Les substances xénobiotiques</i>	45
3. <i>Autres produits</i>	45
II. TRAITEMENT INITIAL DU SOL	45
III. DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES DU SOL	45
1. <i>Préparation de la suspension de sol</i>	45
a. Principe	45
b. Protocole expérimental	46
2. <i>Les communautés microbiennes échantillonnées</i>	46
a. Les milieux de culture	46
b. Etalements et dilutions	47
IV. EVALUATION DE LA DIVERSITE DE LA MICROFLORE DU SOL	47
1. <i>Les communautés bactériennes échantillonnées</i>	47
2. <i>Caractérisation de la diversité phénotypique</i>	48
3. <i>Caractérisation de la diversité génotypique</i>	48
a. Principe	48
b. Les produits et les milieux réactionnels	48
c. Conditions d'amplification de l'ADNr 16S	48
d. Digestion de l'ADNr 16S	49
e. Interprétations	49
V. ETUDE DU COMPORTEMENT D'UNE SOUCHE RESISTANTE AU DNOC	50
1. <i>Caractérisation phénotypique</i>	50
2. <i>Caractérisation génotypique</i>	51
3. <i>Caractérisation physiologique</i>	51
a. Tests de croissance	51
b. Tests de dégradation	51
C. RESULTATS-DISCUSSION	52
I. DENOMBREMENTS	52
1. <i>La microflore totale</i>	52
2. <i>La microflore se développant sur milieu 2,4-D</i>	53
II. ETUDE DE LA DIVERSITE PHENOTYPIQUE	53
1. <i>Diversité basée sur le critère de Gram</i>	53
a. La microflore totale	53
b. Microflore dégradant le 2,4-D	54
2. <i>Diversité basée sur des critères morphologiques</i>	55
a. La microflore totale	55
3. <i>Diversité basée sur des critères génétiques</i>	56
a. La microflore totale	56
b. Microflore isolée sur milieu 2,4-D	60
III. ETUDE DE LA SOUCHE DOMINANTE DANS LE SOL TRAITE A FORTE DOSE DE DNOC	62
1. <i>Identification phénotypique</i>	62
2. <i>Caractérisation génotypique</i>	62
IV. CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE	63
1. <i>Tests de croissance</i>	63
2. <i>Tests de dégradation</i>	63
D. CONCLUSION	63

**CONSEQUENCES METABOLIQUE ET FONCTIONNELLE
DE LA PRESENCE DU DNOC DANS LE SOL**

A. OBJECTIFS	66
B. MATERIEL ET METHODES	68
I. PRODUITS ET PREPARATION INITIALE DES ECHANTILLONS DE SOL	68
II. ETUDE DE L'INFLUENCE DU DNOC SUR LA DIVERSITE METABOLIQUE DE LA MICROFLORE DU SOL	69
1. <i>Préparation des suspensions de sol</i>	69
2. <i>Préparation des plaques de microtitration</i>	69
3. <i>Traitements des données et interprétations</i>	69
4. <i>Etude de l'effet du DNOC sur la diversité fonctionnelle</i>	71
a. Première expérience	71
b. Deuxième expérience	76
C. RESULTATS-DISCUSSION.....	76
I. EFFET DU DNOC SUR LA DIVERSITE METABOLIQUE DE LA MICROFLORE DU SOL	76
1. <i>Approche globale</i>	76
2. <i>Approche analytique</i>	77
II. EFFET DU DNOC SUR LA DIVERSITE FONCTIONNELLE DE LA MICROFLORE DU SOL.....	79
1. <i>Première expérience</i>	79
a. Effet du DNOC sur la minéralisation du ¹⁴ C-2,4-D dans les agrégats individuels	79
b. Effet du DNOC sur la minéralisation comparée du ¹⁴ C-2,4-D dans des agrégats individuels ou des massifs d'agrégats. Effet sur l'incorporation du carbone.	83
2. <i>Seconde expérience</i>	85
D. CONCLUSION	86

CONCLUSION GENERALE

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

EVALUATION DES EFFETS NON VOULUS DES COMPOSES XENOBIOTIQUES SUR LA MICROFLORE DU SOL

A. INTRODUCTION

Les micro-organismes du sol et du sous-sol sont les principaux agents du recyclage des éléments nutritifs des végétaux cultivés et l'une de leurs caractéristiques principales est, sans aucun doute, la très grande variété des espèces microbiennes qui coexistent dans un milieu aussi complexe que le sol. Ceci permet à la microflore du sol, considérée dans son ensemble, d'exploiter à des fins nutritives et énergétiques tous les gisements carbonés présents sous des formes chimiques variées, sous différents états d'accessibilité biologique et dans des niches écologiques qui représentent des conditions environnementales très changeantes. A l'adaptation pour ces différents milieux, parfois extrêmes, correspond une diversité physiologique et métabolique dont l'expression repose sur l'acquisition d'une information génétique d'une très grande richesse. Son inventaire reste à faire. Quant à son exploitation à des fins agricoles ou industrielles, elle reste encore du domaine de l'exception et se limite, le plus souvent, à quelques tentatives encore sous le contrôle des chercheurs.

Parmi les techniques culturales dont l'usage s'est largement répandu au cours des dernières décennies, l'utilisation généralisée des produits phytosanitaires constitue une avancée essentielle et incontournable. Elle représente cependant, pour la microflore du sol, une source potentielle d'agression multiforme et répétée. Celle-ci tient, d'une part à la nature biocide de ces composés et à un effet biologique dont le spectre ne se limite pas aux seules espèces visées, d'autre part au rôle central que joue le sol dans leur acheminement, faisant des micro-organismes, dont il est l'habitat naturel, les cibles potentiellement les plus exposées. Une évolution souhaitable vers une agriculture durable, respectant au mieux l'intégrité des auxiliaires les plus utiles en agriculture, nécessite que soient prises en compte ces conséquences potentiellement dommageables. Leur appréciation sera, de toute façon, progressivement imposée par une législation d'autant plus stricte que les instruments de mesure actuels ne garantissent pas toujours la sûreté du diagnostic.

On dispose actuellement de deux façons d'apprécier les risques encourus par les micro-organismes du sol confrontés à la présence de composés xénobiotiques potentiellement toxiques. La première vise à analyser les effets nets résultants qui se manifestent à un niveau

relativement global. Ils concernent essentiellement les modifications de taille et d'activité à partir desquelles on peut suspecter des changements dans le comportement physiologique de la microflore considérée comme une entité fonctionnelle. En fait, ces "régulations" combinent probablement à la fois des adaptations physiologiques réelles de certaines espèces microbiennes et des réajustements qui affectent la structure de la microflore naturelle en autorisant l'expression et le développement de ses éléments les plus performants sous les contraintes imposées. Cette évolution, qui traduit la puissance du potentiel homéostatique des micro-organismes du sol, contribue à tamponner et, éventuellement, à soustraire de nos possibilités actuelles d'investigation, les changements pondéraux et fonctionnels qui affectent la fraction la plus sensible de la microflore. Ainsi, un second mode d'appréciation des conséquences écotoxicologiques des produits phytosanitaires consiste à utiliser des outils d'investigation permettant d'atteindre un niveau d'analyse suffisamment fin pour pouvoir relier les effets observés à un niveau global, plus en rapport avec leurs conséquences agronomiques, à des effets structuraux, plus explicatifs et susceptibles d'ouvrir des perspectives de remédiation. Cependant, en regard de l'intérêt et des promesses offertes par ces approches méthodologiques nouvelles, on ne peut, pour l'instant, disposer que d'un arsenal de techniques souvent mises au point dans un contexte scientifique et sur des objets différents. Leur utilisation, dans le cadre d'un système aussi complexe que le sol, nécessite au minimum que soient définies les conditions qui justifient leur application et, au delà, que les résultats auxquels elles conduisent soient interprétés selon une grille qui intègre les contraintes inhérentes au milieu. Ainsi, par exemple, les techniques de biologie moléculaire ont fait naître un très gros espoir dans le domaine de l'analyse de la structure des communautés microbiennes naturelles. En effet, on s'aperçoit, en dépit d'une puissance analytique certaine, qu'elles ne représentent en définitive qu'une autre façon, complémentaire mais également déformée, d'aborder la réalité microbienne dans son milieu naturel. La physiologie peut permettre de déceler des réponses comportementales auxquelles la biologie moléculaire peut apporter un support populationnel. Il y a donc encore largement la place pour des techniques plus conventionnelles, dont la modernité n'est peut-être qu'une question de moyens d'interprétation plus puissants et mieux adaptés. C'est du moins ce que tentera de démontrer ce travail.

B. METHODES GLOBALES D'ESTIMATION DE L'IMPACT DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES SUR LA TAILLE ET L'ACTIVITE DE LA MICROFLORE DU SOL

Pendant longtemps, les dénombrements, les mesures de respirométrie ou d'activités métaboliques et enzymatiques ont représenté l'essentiel des possibilités techniques pour étudier l'impact des produits phytosanitaires sur la microflore du sol. Nous ne tenterons pas ici

d'en faire une analyse détaillée qui a largement été faite par ailleurs (Greaves *et al.*, 1976; Greaves, 1982; Simon-Sylvestre et Fournier, 1979; Grossbard, 1976; Hicks *et al.*, 1990; Greaves et Malkomes, 1980; Zelles *et al.*, 1985 et 1986; Malkomes et Wöhler, 1983; Wainwright, 1978). Nous nous bornerons à en rappeler les principales limites, à montrer dans quelles conditions certaines d'entre elles ont trouvé un regain d'intérêt et enfin, à présenter les recours méthodologiques actuels.

Considéré au travers des indicateurs les plus globaux auxquels ces techniques permettent d'accéder, soit un nombre total d'individus, la consommation d'un substrat ou la production d'un métabolite, les principaux reproches qui peuvent leur être faits sont, pour les dénombrements, le manque de sensibilité qui ne permet pas de détecter des effets de faible amplitude et pour les mesures d'activité, notamment respirométriques, des réponses ambiguës qui peuvent faire apparaître sous forme de regain positif d'activité des actions délétères pour la microflore du sol. En outre, les descripteurs de densité microbienne ne sont pas forcément corrélés aux descripteurs fonctionnels correspondants. Ces caractéristiques, renforcées par l'extrême diversité des conditions expérimentales qui ont présidé à l'utilisation de ces techniques et rendu impossible la mise en évidence de quelques tendances fortes, ont pendant longtemps entretenu le sentiment d'une fausse impression de sécurité. On la retrouve souvent sous-jacente dans de nombreuses études concernant les effets des pesticides sur la microflore des sols et elle a été pour beaucoup dans la prise de conscience, relativement tardive, d'une possibilité réelle d'impact.

I. Mesure de la taille des peuplements microbiens du sol

1. Dénombrements

S'agissant des techniques de dénombrement, les reproches qui leur sont souvent faits sont d'être inadaptées au comptage des organismes à développement mycélien et de ne permettre d'accéder qu'à une minorité des organismes unicellulaires. Cette sélectivité constitue un obstacle réel et incontournable dès lors que l'objectif affiché est un inventaire tendant à l'exhaustivité. Cependant, dans le cadre qui nous intéresse, celui de la recherche de groupes ou de fonctions microbiennes qui puissent être considérés comme de possibles bioindicateurs d'effets, les bactéries cultivables sont susceptibles de représenter un échantillon acceptable sinon représentatif de la microflore procaryotique. Cela pourrait suffire pour en retirer des présomptions de preuves quant à l'existence d'un effet plus généralisé à l'ensemble de la communauté microbienne du sol. D'ailleurs, l'application de ces mêmes techniques à des groupes microbiens fonctionnels plus spécialisés procède de la même démarche de simplification et d'inférence.

Parmi les applications les plus récentes, celles qui concernent l'étude des remaniements structuraux qui affectent les communautés microbiennes soumises à un stress chimique sont

peut-être parmi les plus intéressantes. Elles seront présentées et discutées dans le chapitre relatif à la description de la diversité microbienne. C'est en effet dans ce cadre et compte-tenu des nouvelles possibilités de définition d'unités taxonomiques basée sur des critères génotypiques plus rapides et plus discriminants que les critères morphologiques traditionnels, qu'elles ont trouvé un terrain d'application de choix. C'est d'ailleurs, pour l'instant, la seule possibilité technique qui permette de construire des diagrammes de type "rang-fréquence" et de calculer des indices synthétiques de diversité. Les applications qui concernent des groupes physiologiques spécialisés, tels ceux qui interviennent dans les différentes étapes du cycle de l'azote (ammonifiants, nitrifiants, dénitrifiants ou fixateurs), sont intéressantes par rapport à leur importance agronomique mais aussi replacées dans le cadre de la recherche de communautés indicatrices ou sentinelles (Moorman, 1989) ou encore comme élément contribuant à la définition d'un profil écotoxicologique (Domsch *et al.*, 1983). Ainsi que le soulignent Hicks *et al.* (1990), un des avantages liés à l'étude des changements de la composition spécifique d'une communauté fonctionnelle est qu'ils sont une clé d'interprétation aux modifications cinétiques subies par les processus qu'ils gouvernent.

Malgré l'extrême variabilité des réponses, quelques tendances fortes se dégagent cependant. En ce qui concerne les bactéries considérées dans leur ensemble, l'impression générale qui ressort de la littérature est que ce groupe microbien est relativement peu sensible aux pesticides dès lors que les produits sont appliqués à des doses correspondant à une pratique agricole normale. Il faut souligner que la sensibilité est une caractéristique très variable selon les différents groupes microbiens, voire même les différentes espèces d'un même groupe. Ainsi, les bactéries sporulantes semblent en moyenne plus tolérantes. Des changements de morphologie ont parfois été observés ainsi que des modifications de structure de la paroi cellulaire (Grossbard, 1976). Les conclusions concernant les champignons sont encore plus contradictoires. Ainsi, Grossbard (1976) conclut à une plus grande sensibilité des champignons aux herbicides alors qu'Edwards (1989) ne note aucune réaction particulière. Hicks *et al.* (1990) attribuent même une certaine capacité de résistance aux champignons saprophytes, certains d'entre eux ayant tendance à augmenter en nombre avec certains produits (Simon-Sylvestre et Fournier, 1979). En fait, c'est surtout une certaine sélectivité d'action des herbicides qu'il faut retenir, avec, pour conséquence, une modification de la flore fongique. Enfin, la sensibilité particulière des champignons aux fongicides n'est pas surprenante, même si, là encore, d'importantes différences spécifiques de sensibilité existent (Hicks *et al.*, 1990).

2. Méthodes biocidales

C'est Jenkinson (1966) qui a démontré qu'il était possible de mesurer la taille de la microflore du sol en tuant la plupart des cellules microbiennes avec un agent biocide, tel que le chloroforme, puis, après avoir réinoculé le sol et remplacé l'échantillon dans des

conditions favorables à la reprise de l'activité microbienne, en mesurant la quantité de carbone minéralisé à partir de la biomasse tuée. De ces observations préliminaires, Jenkinson et Powlson (1976) en ont déduit un protocole original et une formule simple permettant de calculer le carbone contenu dans la biomasse microbienne C_μ :

$$C_\mu = \frac{(C - CO_2)_f - (C - CO_2)_{nf}}{K_c} \quad (1)$$

Le numérateur, couramment appelé flush, représente la différence obtenue en soustrayant de la quantité de carbone minéralisée à partir d'un échantillon fumigé, $(C - CO_2)_f$, celle obtenue à partir d'un échantillon témoin non fumigé, $(C - CO_2)_{nf}$, et le dénominateur un coefficient de calibration, K_c , introduit pour tenir compte du fait que seule une fraction du carbone de la biomasse morte qui est utilisé est dégagé sous forme de CO_2 . Cette technique, connue sous le nom de méthode de Fumigation-Incubation (CFI), a été l'objet de différentes adaptations portant notamment sur la définition et le choix de témoins facilitant et voire améliorant la mesure du flush (Chaussod et Nicolardot, 1982). Plus récemment, son principe même a été modifié, la période d'incubation étant supprimée au profit d'une extraction du carbone soluble suivant immédiatement la fumigation (Vance *et al.*, 1987). La procédure alternative obtenue, connue sous le nom de méthode de Fumigation-Extraction (CFE), permet de calculer le carbone microbien à partir de la différence des quantités de carbone soluble dans les échantillons fumigés et non fumigés pondérée d'un coefficient K_{ec} , tenant compte de la non extractabilité d'une fraction du carbone microbien. La formule correspondante est la suivante :

$$C_\mu = \frac{Cext_f - Cext_{nf}}{K_{ec}} \quad (2)$$

dans laquelle $Cext_f$ et $Cext_{nf}$ représentent les quantités de carbone solubles dans les échantillons fumigés et non fumigés.

Cette technique, comme la précédente, nécessite la détermination d'un coefficient de calibration, pour laquelle plusieurs démarches ont été adoptées : addition de quantités connues de micro-organismes cultivés en laboratoire et éventuellement marqués au carbone 14 (Nicolardot *et al.*, 1984), ou marquage *in situ* de la microflore du sol par des apports de substrats marqués au carbone 14, habituellement du glucose, (Voroney et Paul, 1984; Sparling et West, 1988; Bremer et Van Kessel, 1990), ou en combinant les deux approches (Chaussod *et al.*, 1986). Or, il s'avère que la valeur de ces coefficients fluctue avec le type de sol et la saison. Ainsi, le coefficient K_{ec} , calculé pour un ensemble de différents sols de surface, varie de 0,20 à 0,50 (Sparling et West, 1988; Sparling *et al.*, 1990). Ce domaine de variation peut même être plus étendu lorsqu'on considère des sols prélevés en profondeur, pour lesquels des études récentes (Dictor *et al.*, en cours de publication; Topp et Tessier, communication personnelle) ont montré que des valeurs de l'ordre de 0,1 pouvaient être

atteintes. Ces variations reflètent des différences dans la composition des communautés microbiennes, mais aussi et surtout des différences dans la répartition des constituants cellulaires. Il est probable que les milieux oligotrophes, que représentent les horizons inférieurs de sol, favorisent la constitution de substances de réserve, dont l'extractabilité et la minéralisation diffèrent de celles des constituants cytoplasmiques. Par rapport à une appréciation des risques écotoxicologiques vis-à-vis des micro-organismes du sol, ces variations représentent une source d'erreur dans l'estimation de l'ampleur des effets, que seul le calcul d'un coefficient adapté à chaque situation particulière peut permettre d'éviter.

La technique de Fumigation-Extraction offre plusieurs avantages par rapport à la technique de Fumigation-Incubation : une applicabilité étendue à des sols acides ou riches en carbone facilement minéralisable sans aucune hypothèse sur la nature et le comportement métabolique de la population microbienne qui recolonise le sol après fumigation (Tate *et al.*, 1988), réduisant ainsi le problème du choix du témoin. Dans le cadre qui nous intéresse, c'est-à-dire celui de l'estimation des effets des substances polluantes sur la microflore du sol, elle présente aussi l'avantage majeur d'éviter le biais qui pourrait affecter l'estimation du carbone microbien lorsque celle-ci repose sur une incubation en présence de résidus de polluants. Même si des études récentes, l'une avec du 2,4-D (Soulas et Fournier, 1987), l'autre avec différents éléments-traces (métaux lourds) en quantités modérées (Brookes *et al.*, 1986a), ont permis de lever cette incertitude, il ne s'agit, pour l'instant, que de cas isolés, qui ne garantissent pas que, pour d'autres polluants et dans d'autres conditions, cette technique ne génère pas d'artefacts.

Enfin, les deux techniques CFE et CFI se rejoignent dans leur incapacité à détecter des changements de composition de la microflore. Ainsi, l'éventualité d'un marquage préalable par des substrats plus spécifiques de groupes fonctionnels se heurte à la difficulté de donner une signification biologique simple à la quantité de radioactivité incorporée dans les corps microbiens sans passer par la mise en oeuvre d'une modélisation, telle que celle qui a été décrite pour les micro-organismes dégradant le 2,4-D (Soulas et Lagacherie, 1990). En effet, en raison de son remplacement progressif par du carbone non marqué, cette quantité est soumise dans la cellule à des variations relatives qu'il est impossible de rapporter à la quantité inconnue et variable de carbone du groupe microbien considéré dont les variations de taille ne reflètent pas forcément celles de l'ensemble de la microflore du sol.

3. Méthodes physiologiques

Pour répondre au besoin précédent, il faut avoir recours à une autre procédure basée sur une approche méthodologique différente mise au point par Anderson et Domsch (1978). Celle-ci, SIR (respiration induite par un substrat), consiste à saturer la capacité respiratoire de la microflore du sol par des apports optimisés de substrats carbonés, en l'occurrence du glucose, puis à suivre la minéralisation pendant un laps de temps très court durant lequel la croissance microbienne peut être considérée comme négligeable. Cette grandeur est donc

directement en relation avec la taille de la biomasse initiale activée par l'apport du substrat. Une calibration par rapport à la technique de Fumigation-Incubation a permis d'établir une formule de passage permettant de calculer la concentration en carbone microbien du sol à partir de la détermination de la vitesse initiale de minéralisation du glucose. C'est probablement là que se situe la faiblesse majeure de cette technique qui ne peut être auto-calibrée. En outre, il s'agit d'une mesure de biomasse active et, plus probablement de la fraction à stratégie de croissance de type r, la plus prompte à se développer à la suite d'introductions importantes de substrats carbonés. Il est donc difficile de savoir à quelle fraction de la population microbienne totale on accède par cette technique. Dans le cadre plus précis de l'utilisation de cette technique à la mesure de la biomasse de sols contaminés, Malkomes (1986) a émis quelques doutes concernant la valeur du facteur de calibration, dont la détermination a été faite pour un ensemble de sols non contaminés. Cet auteur fait également remarquer que la présence du biocide peut altérer la proportion des organismes capables de minéraliser le glucose.

4. Exemples d'application des techniques de mesure de biomasse

Ces exemples concernent différents types de composés xénobiotiques organiques et minéraux. Ainsi, Joergensen *et al.* (1995) ont montré que la technique CFE pouvait être utilisée pour étudier l'évolution de la teneur en C et N de la biomasse ainsi que d'autres paramètres de l'activité microbienne dans un sol contaminé avec un hydrocarbure. De nombreuses applications concernent les pesticides. Les techniques biocidales, notamment la technique CFI, a permis à Duah-Yentumi et Johnson (1986) de mettre en évidence une réduction significative de la biomasse d'un sol après application de vinclozoline, un fongicide à large spectre appliqué à la dose de 5 kg ha⁻¹. L'emploi simultané des dénombrements leur a permis de montrer que cette réduction était liée à une diminution de la flore fongique, la biomasse bactérienne tendant même à limiter la baisse. Par contre, Biederbeck *et al.* (1987) ont montré que 35 années de traitement au 2,4-D avec des doses compatibles avec la pratique agricole ne semblent pas avoir affecté de façon significative la biomasse d'un sol. S'appuyant également sur un dispositif de longue durée, Jones *et al.* (1992) ont comparé trois programmes d'application de différents pesticides (non signalés). Ils concluent que l'application systématique de doses d'assurance se traduit par une réduction globale de la biomasse due à une modification de l'équilibre entre biomasses bactérienne et fongique. De même, Schuster et Schröder (1990) ont fait la preuve qu'un programme de traitement associant deux herbicides (le dichlorprop et le glyphosate), deux préparations fongicides (procloraze et carbendazime ou captafol et triadiméfon) et un insecticide (le pirimicarbe) entraînait, après chaque application, une réduction de l'ordre de 10 à 15% de la biomasse SIR. Lors d'une étude effectuée avec deux types de sol et quatre pesticides différents (le bénomyl, l'isoproturon, la simazine et le dinoterbe), Harden *et al.* (1993) observent, dans tous les cas,

une réduction de la biomasse estimée par CFE ou SIR, toujours significative avec le dinoterbe. C'est la technique CFE qui semble la plus sensible en permettant de déceler le plus grand nombre de différences significatives. Ce résultat avait déjà été observé par Fournier *et al.* (1992). Récemment, Hart et Brookes (1996) ont montré que l'activité biologique de deux fongicides de la famille des inhibiteurs de la synthèse des stérols, l'époxyconazole et le triadiméfon, était supérieure pour une biomasse fongique en cours de croissance et que, dans ce cas, une réduction de biomasse de 5 et 12% par rapport au contrôle se manifestait. Anderson (1981) avait déjà démontré le rôle de certains fongicides, tels que le captane, le thirame et le verdasane sur la biomasse du sol. A 5 mg kg^{-1} , la réduction de biomasse est de 40%, le retour à la normale étant réalisé après 8 jours. A une dose dix fois supérieure, l'effet est amplifié, plus persistant, et se manifeste par une modification de la proportion relative de la population bactérienne et fongique. A l'inverse des résultats précédents, Wardle et Parkinson (1990) ne détectent d'effets sur la biomasse SIR qu'après une application unique de 2,4-D, piclorame ou glyphosate à une dose de 200 mg kg^{-1} . Ces effets ont disparu après 27 jours d'incubation.

On retrouve des études identiques concernant les effets des métaux lourds dont la présence dans les sols agricoles tire son origine des amendements à base de boues activées. Ainsi, Brookes *et al.* (1986a) ont validé la technique de Fumigation-Incubation pour des sols contenant des quantités modérées de métaux lourds tels que Cu, Ni, Zn et Cd. C'est avec cette technique, que Fliessbach *et al.* (1994) ont montré que dix années de traitements avec des boues entraînent un accroissement de la biomasse. Celui-ci est cependant moins prononcé dans des sols ayant reçu des boues à une forte charge métallique, la réduction pouvant atteindre 26%. Cette observation confirme les résultats déjà obtenus par Brookes et McGrath (1984). Chander et Brookes (1993) ont précisé l'effet des métaux lourds considérés isolément ou en combinaison. Ainsi, aucun des métaux testés, Zn, Cu et Ni, pris séparément et présents dans le sol en dessous de la limite européenne réglementaire, n'entraîne de diminution de la biomasse. Des effets significatifs se manifestent cependant pour tous les métaux au-delà de cette limite. En outre, cette étude démontre le caractère biocide accru des associations, les effets apparaissant additifs. Dans une étude récente, Chander *et al.* (1995) ont montré que des applications importantes de boues provoquaient un accroissement immédiat de la biomasse. Cependant, au cours des 64 semaines qui suivent, la décroissance de la biomasse se fait de façon exponentielle. Après ce laps de temps, la biomasse du sol traitée avec les boues non enrichies retrouve le niveau de celle du sol témoin. Par contre, une réduction significative de 15 à 20% est obtenue lorsque les boues ont été préalablement enrichies pour porter la concentration de chaque métal lourd à une valeur de l'ordre de deux à quatre fois la limite européenne recommandée.

Signalons enfin, deux autres applications des mesures de biomasse. En particulier, la technique de Fumigation-Extraction, utilisée après marquage de la biomasse à l'aide d'un

substrat marqué au carbone 14, a permis de montrer qu'une contamination avec des éléments-traces métalliques (Bardgett et Saggar, 1994) ou avec du DNOC (Rouard *et al.*, 1996) augmentait le rapport carbone respiré/carbone incorporé dans la biomasse, traduisant une moindre efficacité du métabolisme énergétique. Par ailleurs, l'emploi d'inhibiteurs sélectifs bactériens ou fongiques, comme par exemple la streptomycine ou le cycloheximide, permet d'accéder à la contribution de ces groupes microbiens à l'activité respiratoire globale du sol. Deux exemples ont déjà été présentés et discutés. Il s'agit de celui de Wardle et Parkinson (1990) concernant l'effet de certains herbicides et de celui de Anderson (1981) concernant l'effet de certains fongicides.

II. Processus microbiens et activités enzymatiques

Ainsi que le souligne Greaves *et al.* (1976), si les études sur les peuplements peuvent fournir des informations essentielles sur les différents types de réponses microbiennes à la présence d'un biocide, leurs significations fonctionnelles réelles ne peuvent être appréciées que replacées dans le cadre de l'étude des processus dont les micro-organismes sont la force motrice. Nous n'envisagerons ici que les processus d'importance agricole.

1. Processus respiratoires et dégradation des matières organiques

Sans aucun doute, les mesures d'activité respiratoire ont été et continuent d'être la référence en matière d'estimation des effets des pesticides sur la microflore du sol. Il y a à cela des raisons théoriques (leur liaison avec l'importance de la communauté microbienne et la dégradation de la matière organique du sol) et pratiques (la diversité et la simplicité des dispositifs expérimentaux disponibles). Les mesures d'activité respiratoire sont probablement aussi à l'origine des résultats les plus controversés. Pour reprendre les principales conclusions de la littérature, les fongicides à large spectre et les fumigants sont probablement les produits les plus actifs, les effets dépressifs observés étant souvent temporaires et globalement réversibles avec rattrapage (Wainwright, 1978). Dans leur grande majorité, les herbicides ne semblent avoir d'effets qu'à des concentrations suffisamment élevées et souvent sans rapport avec les concentrations environnementales (Edwards, 1989). Cependant, certains, sans rapport de structure apparent, s'avèrent capables d'inhiber la production de CO₂ à des doses plus raisonnables, ou même, à l'inverse, de la stimuler. Pour Grossbard (1976), il s'agit probablement d'un phénomène de découplage. Enfin, pour Wainwright (1978), les insecticides sembleraient n'avoir qu'une influence marginale. Il y a lieu de considérer avec la plus grande précaution toutes ces généralisations. Les effets observés sont, le plus souvent, des cas d'espèces sauf peut-être pour les fongicides dont les cibles recherchées sont une composante importante de la microflore du sol. Le plus souvent cependant, la plus grande prudence est nécessaire dans l'interprétation des résultats expérimentaux. Il y a à cela un certain nombre de raisons. D'abord, l'activité respiratoire est un indicateur non spécifique de

la microflore puisque la macrofaune ainsi que les racines des plantes contribuent à la respiration globale. Surtout, l'absence d'effet visible voire même la stimulation de l'activité respiratoire peuvent être les manifestations secondaires d'une suppression sélective préalable d'espèces sensibles, dont le carbone peut être facilement utilisé par des souches résistantes qui réoccupent la niche écologique abandonnée. Enfin, l'utilisation de fortes doses d'un produit facilement dégradable peut alimenter la production de CO₂. L'utilisation de substrats carbonés simples (glucose, protéines, amidon, cellulose) ou composites (paille ou même matériel végétal frais) marqués au carbone 14, offre une alternative plus satisfaisante pour aborder le problème de la perturbation de la microflore indigène dans son aptitude à décomposer la matière organique du sol en présence de pesticides.

Récemment, certains auteurs (Thomas *et al.*, 1974; Christensen *et al.*, 1989, Bääth, 1990, 1992a et b, 1994) ont repris l'idée de Brock (1967) d'utiliser la capacité d'incorporation de la thymidine radioactive par les micro-organismes des milieux aquatiques pour déterminer leur taux de croissance. Il s'agit en effet d'un métabolite qui est directement et théoriquement utilisé de façon spécifique dans la synthèse de l'ADN des micro-organismes, un processus fondamental de la vie microbienne. Pour Riemann et Lindgaard-Jørgensen (1990), l'incorporation de thymidine représente un processus qui dépend directement de l'activité métabolique générale et, de ce point de vue, est peut être plus représentatif que la minéralisation du glucose. D'abord appliquée à des environnements aquatiques, son utilisation a été étendue au sol avec deux types de procédures : soit une extraction directe de l'ADN du sol et mesure de la radioactivité incorporée (Thomas *et al.* 1974; Christensen *et al.*, 1989; Bääth, 1990), soit une extraction préalable des bactéries du sol dont la suspension sert à réaliser le test d'incorporation (Bääth, 1992a et b). Cette technique n'est pas exempte de reproches. En particulier, l'ARN et les protéines sont également marqués de façon non spécifique (Brittain et Karl, 1990). Le protocole opératoire doit également tenir compte de la possibilité d'une incorporation de thymidine autre que celle directement ajoutée et synthétisée de novo. La technique de dilution isotopique, décrite par Pollard et Moriarty (1984), donne entièrement satisfaction (Bääth, 1992a et b). Enfin, avantage ou inconvénient, cette technique ne semble s'appliquer qu'aux bactéries.

Lindgaard-Jørgensen et Riemann (1989) ont d'abord montré que l'incorporation de thymidine pouvait offrir une solution pour apprécier la toxicité de produits chimiques sur leur biodégradabilité. Ces mêmes auteurs (Riemann et Lindgaard-Jørgensen, 1990) ont proposé cette procédure comme test rapide pour déterminer les effets sur des communautés microbiennes naturelles de diverses substances toxiques, telles que le 3,5-dichlorophénol, le 2,4-dinitrophénol et le bichromate de potassium, qui diminuent considérablement la capacité d'incorporation de la thymidine. Cette même observation a été reproduite avec un insecticide tel que le diméthoate (Jones and Johnson, 1996) ou encore avec un métal lourd comme le cuivre (Bääth, 1992a). Cette dernière étude a aussi permis de mettre en évidence

l'apparition d'une microflore tolérante à Cu, Ag, Zn et Cd après une pollution sévère dépassant la IC₅₀.

2. Fonctions liées au cycle de l'azote

Les transformations microbiennes de l'azote combiné sont probablement l'un des indicateurs parmi les plus couramment utilisés pour aborder l'étude des effets des pesticides sur la microflore du sol (Vonk J.W., 1991; Moorman, 1989). Ce choix est d'abord dicté par la sensibilité intrinsèque particulière des micro-organismes autotrophes impliqués dans ces transformations, ensuite par la nécessité de préserver l'une des fonctions du sol dont l'importance agronomique est vitale et, enfin, par la facilité qu'il y a à quantifier de façon simple, sensible, précise, reproductible et automatisable les différentes formes de l'azote dans le sol. En ce qui concerne le sens et la nature des effets observés, on retrouve, là encore, une abondance de résultats parfois contradictoires. Un certain accord existe pour conclure à une relative tolérance ou même quelquefois une légère stimulation de l'étape d'ammonification, sauf peut-être vis-à-vis des fongicides. D'après Edwards (1989), elle serait directement la conséquence de la diversité des espèces microbiennes impliquées, qui cacherait une sensibilité spécifique très variable sans conséquence visible sur le processus global. Les avis sont plus partagés sur l'étape de nitrification qui suit. Alors que Wainwright (1978) et Edwards (1989) concluent à une relative insensibilité des étapes de nitrification vis-à-vis des herbicides et des insecticides appliqués aux doses recommandées, Grossbard (1976) rapporte, dans les mêmes conditions, de nombreux exemples d'inhibition par les herbicides. Ce qui semble certain, c'est que d'une part, parmi les différentes catégories de pesticides, ce sont les fongicides qui apparaissent à nouveau les composés les plus actifs, d'autre part l'accumulation de nitrites est rarement observée, enfin le pH du sol est probablement un facteur important de la réponse observée.

La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique a également été l'occasion de nombreuses investigations. Du fait de la participation de deux partenaires, il faut distinguer, dans la réaction observée, la part qui revient à chacun. Il apparaît que la sensibilité des *Rhizobium* aux pesticides est d'avantage fonction de la souche que de l'espèce et que les effets quelquefois observés au niveau des processus de nodulation et de fixation sont à attribuer aux dommages causés aux plantes plutôt qu'à des effets directs s'exerçant sur le partenaire microbien (Greaves et Malkomes, 1980).

La réponse des organismes dénitrifiants aux pesticides reste encore relativement mal connue. L'inhibition du processus, observée avec de nombreux herbicides, ne peut permettre de conclure à une tendance générale. Il est possible que, dans le sol et comme dans le cas de l'ammonification, la diversité des espèces microbiennes impliquées pourrait limiter l'amplitude de l'inhibition qui, en terme de fertilité du sol, est une conséquence souhaitable.

3. Activités enzymatiques

Puisque la plupart des transformations se déroulant dans le sol sont sous le contrôle d'enzymes, il était naturel de rechercher dans l'activité de différents types d'enzymes, des indicateurs d'impact, qui soient en même temps corrélés avec des processus microbiens. Compte-tenu de leur rapidité, de leur simplicité et de leur reproductibilité, les tests enzymatiques ont connu un très large succès. Effectivement, certains enzymes du sol, tels les phosphatases et les uréases, ont un lien apparent avec les cycles du phosphore et de l'azote. D'autres, telles les déshydrogénases, qui interviennent dans les oxydations biologiques, devraient être corrélés avec l'activité respiratoire globale de la microflore du sol (Greaves et Malkomes, 1980; Malkomes et Wöhler, 1983). En fait, ces corrélations n'apparaissent pas toujours de façon évidente, laissant quelques doutes sur la valeur des activités enzymatiques en tant que bioindicateurs de la qualité biologique du sol. Il y a à cela plusieurs raisons. Les enzymes du sol peuvent avoir des origines diverses qui ne se limitent pas à la seule microflore : la macrofaune et la flore du sol en produisent également. Par ailleurs, certaines activités sont sous le contrôle de différents enzymes dont les optima de fonctionnement ne se superposent pas. Enfin, ces enzymes existent souvent dans le sol à l'état adsorbé, ce qui leur confère une relative protection vis-à-vis de stress chimiques. Seuls des effets à long terme sont susceptibles d'être significatifs avec, pour les herbicides, une difficulté supplémentaire d'interprétation. La suppression permanente de la couverture végétale et la réduction des entrées organiques dans le sol peuvent être plus limitantes que l'effet antimicrobien de l'herbicide (Grossbard, 1976). Signalons également la possibilité d'une inhibition directe de certains enzymes par des biocides présents dans le milieu. C'est le cas de Cu sur la déshydrogénase (Chander *et al.*, 1995). La tendance actuelle est de se concentrer sur quelques enzymes, telles les déshydrogénases intracellulaires et caractéristiques des cellules vivantes, ou encore un ensemble d'enzymes hydrolytiques globalement caractérisés par une activité FDA d'hydrolyse de l'acétate de fluoresceïne et qui, selon Dick (1992) jouent un rôle central dans l'écologie du sol. Au plan quantitatif, on note un certain nombre de tentatives pour utiliser les activités enzymatiques comme bases d'indices empiriques de qualité du sol, qui ont l'avantage de combiner plusieurs types d'activité enzymatiques. Parmi les indices les plus connus, citons le BIF (Biological Index of Fertility) de Stephanic *et al.* (1984), l'indice EAN (Enzyme Number Index) de Beck (1984), l'indice HC (Hydrolysing coefficient) de Perucci (1992) et la proposition de Nannipieri *et al.* (1983) de définir des quotients enzymatiques ($q(E)$), ou activités enzymatiques spécifiques, c'est-à-dire rapportées à l'unité de biomasse.

III. Paramètres biocinétiques et écophysologiques

Les différentes approches dont il est question dans le chapitre qui suit ont toujours pour appui expérimental des mesures de taille et/ou d'activité. Elles diffèrent de celles qui ont été

présentées jusqu'ici, par le souci d'interpréter les données expérimentales à l'aide de paramètres caractéristiques du comportement microbien. Il s'agit soit de paramètres expérimentaux plus signifiants quant aux modifications physiologiques, notamment énergétiques, qui résultent d'un stress chimique, soit de paramètres calculés, plus théoriques qui sont des descripteurs habituels du comportement dynamique des micro-organismes.

1. Les paramètres expérimentaux

Il s'agit de paramètres directement mesurables ou combinant des données expérimentales complémentaires obtenues sur les mêmes individus et dont elles permettent de révéler certains aspects du fonctionnement, notamment énergétique. Ainsi, Soulas et Fournier (1987) ont montré que le marquage préalable *in situ* de la microflore du sol avec un substrat marqué au carbone 14 permettait ensuite d'aborder, dans des conditions de sensibilité accrue, l'étude de l'effet d'un traitement du sol avec un composé xénobiotique sur la vitesse du turnover du carbone microbien radioactif. Celle-ci serait directement liée à une modification du métabolisme de maintenance des micro-organismes du sol avec, probablement, une consommation accrue de constituants carbonés endogènes. Elle serait également associée à une baisse d'efficacité du rendement du métabolisme énergétique des substrats présents dans le milieu extérieur. Ainsi, cette étude a permis de confirmer le rôle particulièrement actif du DNOC par comparaison avec d'autres produits tels que le 2,4-D, le CIPC ou le 2,4,5-T. La possibilité d'un marquage préalable avec des substrats carbonés plus spécifiques permet d'envisager une utilisation de cette technique pour analyser le comportement énergétique de groupes microbiens fonctionnels. De même, l'emploi d'inhibiteurs sélectifs devrait permettre d'analyser séparément les réponses des microflore bactérienne et fongique.

D'autres paramètres apparaissent également comme de bons descripteurs du comportement énergétique des micro-organismes et, en tant que tels, comme des indicateurs biologiques potentiels. Il s'agit d'abord du rapport entre le carbone de la biomasse et le carbone organique total, C_{mic}/C_{org} , proposé par Anderson et Domsch (1986). Son intérêt tient à la différence de rapidité de réponse des compartiments biologique et abiotique de la matière organique du sol à la suite de perturbations qui affectent un système en équilibre. Ainsi, des sols pour lesquels ce rapport s'écarte sensiblement de valeurs comprises entre 2,3 et 4% doivent être considérés comme étant en phase d'évolution, accumulant ou perdant du carbone. La valeur du rapport C_{mic}/C_{org} est donc fonction de l'éloignement de l'état d'équilibre du système considéré. A partir d'une étude portant sur 134 parcelles dont 65 en monoculture et 69 en rotation, Anderson et Domsch (1989) ont montré que la valeur de ce rapport est caractéristique du système de culture. Elle est plus élevée, 2,9 contre 2,3%, pour le système à base de rotations, ce que les auteurs interprètent comme étant le résultat d'une meilleure efficacité d'assimilation de la communauté microbienne en présence d'une plus grande variété de substrats carbonés entrant dans un sol sous polyculture. L'utilité de ce paramètre n'a pas été

démontrée dans le cadre de l'analyse des réponses microbiennes à des pollutions chimiques. Elle découle cependant directement du lien fonctionnel qui existe entre le rapport C_{mic}/C_{org} et un autre paramètre écophysologique, la vitesse spécifique de respiration ou quotient métabolique pour le CO_2 (qCO_2 , rapport entre la respiration basale et la biomasse à l'équilibre) défini par Pirt (1975). Cette connexion ressort d'ailleurs clairement d'une étude portant sur l'influence du pH du sol sur l'activité microbienne, où il apparaît que l'accroissement de l'activité respiratoire avec un abaissement du pH va de pair avec une diminution du rapport C_{mic}/C_{org} (Anderson et Domsch, 1993). Pour une communauté microbienne en équilibre, la vitesse spécifique de production de CO_2 est directement liée à la demande énergétique de maintenance. Le maintien de l'équilibre dans des conditions défavorables nécessite une consommation énergétique additionnelle, dépensée dans des processus d'adaptation ou même de réparation. Pour cette raison, certains auteurs ont proposé d'utiliser le qCO_2 comme indicateur de stress des écosystèmes notamment terrestres (Anderson et Domsch, 1990). Cette proposition a été contestée par Bradley et Fyles (1995) sur la base de la difficulté qu'il y a à distinguer dans la variation du qCO_2 la part qui revient à une modification du stock de carbone accessible, et celle qui traduit les changements d'état métabolique des micro-organismes à la suite du rééquilibrage entre espèces zymogènes et autochtones. De leur côté, Wardle et Ghani (1995) ont argumenté sur la signification réelle de ce paramètre. Ces auteurs lui attribuent une portée limitée comme prédicteur de la capacité de restauration des écosystèmes à la suite de perturbations qu'ils définissent comme des changements rapides des conditions environnementales. Ils proposent de limiter son usage comme indice de stress dans des environnements par ailleurs en relatif équilibre. L'étude de Brookes *et al.* (1986a), réalisée sur des sols différemment contaminés par des métaux lourds, a montré que la vitesse spécifique de respiration est multipliée par 2,64 lorsque la charge métallique en Zn, Cu, Ni et Cd est augmentée d'un facteur 4. Fliessbach *et al.* (1994) montrent également que le qCO_2 est un indicateur sensible des effets résultant de dix années de traitement de deux sols avec des boues activées, éventuellement enrichies avec un cocktail de différents métaux lourds, Cu, Zn, Ni et Cd.

Un autre paramètre écophysologique peut également être considéré comme un bon candidat pour interpréter les relations entre activité microbienne et pollution chimique. Il s'agit du coefficient de maintenance, "m", dont Anderson et Domsch (1985) ont proposé une méthode de mesure pour des communautés microbiennes dans leur environnement naturel. Il correspond à la quantité de C-glucose permettant de maintenir la production de CO_2 à un niveau d'équilibre qui reflète la demande énergétique d'une communauté microbienne en état de non croissance. En théorie, lorsque cet état d'équilibre est atteint, les valeurs du coefficient de maintenance et du quotient métabolique doivent être égales puisque la totalité du substrat alimente le métabolisme énergétique et est donc entièrement minéralisée. Son utilité reste à démontrer.

2. Les mesures d'activité hétérotrophe

Le concept d'activité hétérotrophe a été proposé en premier par Parsons et Strickland (1962) pour des environnements aquatiques, puis développé par la suite par Wright et Hobbie (1965, 1966) qui en ont extrait les bases expérimentales et théoriques. Le principe de la méthode consiste à mesurer les vitesses initiales d'absorption ou de minéralisation d'un substrat carboné pour différentes doses d'apport. Les données expérimentales sont interprétées à l'aide de la relation de « Michaelis-Menten » reliant vitesse (v) et concentration (S) par une équation hyperbolique :

$$v = \frac{V_m \times S}{K_m + S}$$

où V_m est la vitesse initiale maximale d'absorption (ou de minéralisation) et K_m , la constante de Michaelis, ces deux paramètres étant respectivement liés à l'efficacité de la transformation et à l'affinité pour les substrats carbonés disponibles. En fait, c'est une seconde équation qui est utilisée en pratique. Si f est la fraction minéralisée (ou absorbée) au bout du temps t d'un apport à la concentration A d'un substrat déjà présent dans le milieu à la concentration "naturelle" S_n , on a alors :

$$\frac{t}{f} = \frac{1}{V_m} A + \frac{(K_m + S_n)}{V_m}$$

Une représentation linéaire du rapport t/f en fonction de la concentration de l'apport A donne une droite dont la pente est $1/V_m$, l'ordonnée à l'origine un paramètre T_n tel que $T_n = (K_m + S_n)/V_m$, l'axe des x étant coupé à la valeur $-(K_m + S_n)$. Le paramètre T_n , appelé temps de turnover, a une signification écologique importante puisqu'il représente le temps nécessaire pour atteindre la dégradation complète du substrat à sa concentration "naturelle" S_n . Lorsque le substrat carboné n'est pas déjà présent dans le milieu ou que A excède largement la concentration naturelle S_n , la relation précédente se simplifie et se réduit à la forme plus connue de Lineweaver et Burk dite représentation en doubles inverses :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{A}$$

Sur un plan pratique, l'estimation des paramètres V_m , K_m et éventuellement T_n et de leur distribution se fait généralement par régression linéaire. Li (1983) a montré que cette procédure est statistiquement peu efficace et doit être abandonnée au profit d'un ajustement direct par régression non linéaire du modèle hyperbolique aux données expérimentales.

La mesure de l'activité hétérotrophe est restée longtemps limitée à l'étude des milieux aquatiques. Son application au sol pose deux questions, l'une technique et l'autre théorique. La technique est basée sur une mesure instantanée de la vitesse initiale de minéralisation.

Elle nécessite que l'homogénéité de la distribution du substrat ajouté dans le milieu soit atteinte suffisamment rapidement pour que le phénomène biologique mesuré ne soit pas modifié dans son déroulement par des processus physiques parallèles, modifiant l'accessibilité biologique du substrat. Une solution satisfaisante semble avoir été trouvée par une réduction de la taille des échantillons. Par ailleurs, l'hypothèse biologique sous-jacente est celle de l'intervention d'un groupe fonctionnel caractérisé par une certaine homogénéité cinétique. Or, quelques études (Li, 1983; Azam et Hodson, 1981) ont montré que la diversité cinétique, en relation avec la diversité des régimes nutritifs de la microflore du sol, semblait être la règle plutôt que l'exception. Panikov *et al.* (1992) ont formalisé cette observation en développant une formulation basée sur une double cinétique michaelienne. Malgré tout, en dépit de cette complexité physiologique inhérente au système sol, quelques auteurs ont déjà tenté d'utiliser la procédure dans sa version initiale simplifiée (Wagner, 1975; Ferroni *et al.*, 1985; Dobbins et Pfaender, 1988; Anderson et Gray, 1990). Plus rares encore sont les exemples d'application dans le cadre de l'appréciation des impacts écotoxicologiques liés à des perturbations des milieux naturels d'origine anthropique. Pourtant, Ferroni *et al.* (1983) ont illustré de façon convaincante son utilité pour étudier les conséquences prévisibles liées à une acidification d'une eau lacustre à la suite de pluies acides. Ainsi, l'abaissement du pH de l'eau, de la valeur 7,5 à la valeur 5,5, multiplie par 4 le temps de turnover et réduit de près de 60% le potentiel hétérotrophe de la microflore naturelle. Ces résultats ne semblent pas être liés à une dissolution de métaux lourds tels que Cu et Ni. Plus récemment Rouard *et al.* (1996) ont montré que le DNOC modifiait le comportement physiologique des communautés microbiennes présentes à différents niveaux dans un profil de sol. En particulier, à toutes les profondeurs, les deux paramètres biocinétiques V_m et K_m sont diminués. Ce qui montre que la diminution du potentiel hétérotrophe va de pair avec une augmentation de l'affinité des micro-organismes pour le substrat, ce résultat étant interprété comme l'indication d'une adaptation à un appauvrissement nutritionnel.

C. METHODES D'ESTIMATION DE L'IMPACT DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES BASEES SUR L'ETUDE DE LA DIVERSITE MICROBIENNE

I. La diversité microbienne : signification et indicateur d'impact écotoxicologique

Le fonctionnement du sol suppose deux niveaux de diversité. Le premier concerne la diversité des transformations et des activités dont il est le siège et qui sont sous la dépendance de groupes microbiens fonctionnels spécifiques. Les exemples des différentes transformations associées aux cycles du carbone et de l'azote ne représentent probablement qu'une partie du

potentiel métabolique du sol. Cette diversité a pour avantage principal de permettre une meilleure exploitation des ressources nutritives présentes dans l'environnement. Cependant, pour chaque type de transformation, il existe un second niveau de diversité qui se caractérise, à l'intérieur de chaque groupe fonctionnel concerné, par la coexistence d'individus qui diffèrent par leurs aptitudes physiologiques. Cette diversité permet à la fois une meilleure exploration du milieu en permettant l'exploitation d'une même ressource dans des niches écologiques différentes, et une certaine permanence de la fonction dans des conditions extérieures changeantes. On peut donc, a priori, postuler qu'elle est essentielle à la stabilité et à la résilience des écosystèmes terrestres et, pour les agrosystèmes, au maintien de leur fertilité. La question est donc de savoir dans quelle mesure certaines pratiques agricoles sont susceptibles de modifier l'état de diversité d'un sol et quel niveau minimum de diversité il est nécessaire de préserver pour assurer son renouvellement et maintenir intacte la capacité d'évolution des communautés microbiennes naturelles (Atlas, 1984a). Plus que par leur capacité à réduire globalement la taille des communautés microbiennes, les pesticides, en raison d'une activité biologique différentielle, sont susceptibles d'altérer leur organisation naturelle et de nuire à la fois à leur fonctionnement et à leur faculté d'adaptation. La caractérisation et la mesure de la diversité microbienne apparaissent donc comme des outils d'analyse, permettant de détecter des impacts écologiques transparents aux approches énumératives et fonctionnelles plus traditionnelles (Atlas, 1984b).

II. La diversité microbienne : caractérisation et mesure

Il existe à l'heure actuelle un large éventail de techniques destinées à caractériser la diversité microbienne du sol. Nous distinguerons entre celles qui sont basées sur l'identification et/ou le repérage individuels des différentes espèces ou unités taxonomiques et celles qui font appel à des représentations synthétiques ou empreintes caractéristiques de l'ensemble de la communauté considérée comme une entité fonctionnelle.

1. Diversité spécifique et taxonomique

Seule la reconnaissance et le dénombrement des différentes espèces d'une communauté microbienne permettent d'établir les relations d'abondance, caractéristiques de la structure de ces communautés et d'associer à la diversité correspondante, une mesure qui lui confère une valeur comparative. Il existe plusieurs façons d'accéder à ces mesures. La première repose sur une analyse directe des diagrammes de distribution de fréquence des espèces. L'ajustement de différents modèles théoriques de distribution, avec ou sans contenu écologique, permet de caractériser la distribution au travers de paramètres de centrage (l'espérance), de dispersion (la variance), et de dissymétrie. Les différentes distributions statistiques habituelles continues ou discrètes peuvent ainsi coexister avec des modèles au contenu plus écologique susceptibles de procurer des éléments d'interprétation relatifs aux interactions entre les espèces de la

communauté ou au mode d'appropriation des ressources du milieu. Il existe cependant une approche plus synthétique de la diversité spécifique au travers de différents indices décrivant le nombre d'espèces, la régularité de leur distribution ou les deux à la fois. Les indices de richesse traduisent simplement le nombre total d'espèces recensées. Ils se calculent généralement en rapportant le nombre d'espèces au nombre total d'individus. Si l'on veut tenir compte de la répartition inégale des individus selon les différentes espèces, le calcul de l'indice de diversité doit en outre s'appuyer sur la connaissance des proportions de chaque espèce. L'indice le plus communément utilisé est celui de Shannon-Weaver (Shannon, 1948; Shannon-Weaver, 1949) :

$$H' = - \sum_i^N p_i \log_2 p_i$$

où p_i est égal à la proportion du $i^{\text{ème}}$ biotype par rapport au nombre total de souches.

L'indice de régularité est alors obtenu en rapportant la diversité mesurée à la valeur maximale qu'elle pourrait prendre si toutes les espèces étaient également représentées.

Quelle que soit l'approche utilisée, la mesure de la diversité se heurte à deux difficultés méthodologiques, d'une part la représentativité d'échantillons qui ne sont pas tirés au hasard et dont la composition est liée à une contrainte instrumentale, d'autre part le choix des critères de l'identification des différentes espèces. En effet, l'identification et le dénombrement des espèces supposent leur isolement préalable et l'on sait que, en ce qui concerne les communautés microbiennes du sol, cette étape est extrêmement sélective. On estime que seulement 10% des espèces microbiennes peuvent être isolées du sol. Cette sélectivité entraîne une sous-estimation de la diversité de la communauté dont est issu l'échantillon analysé. Au plan statistique, ce biais ne permet pas une véritable estimation de l'erreur sur la valeur de l'indice de diversité, rendant ainsi ambiguës et critiquables les comparaisons (Atlas, 1984a; Mills et Wassel, 1980). Cependant, dans le cadre qui nous intéresse, la description de la diversité à partir de l'ensemble restreint des bactéries cultivables, même biaisée, pourrait suffire à fournir des indications tendancielle extrapolables à l'ensemble de la communauté. Le deuxième obstacle est lié à la définition de l'espèce qui, chez les procaryotes, n'a pas le même caractère de précision que chez les eucaryotes. La définition d'unités taxonomiques assimilables à des espèces est une question importante, notamment au plan écotoxicologique, dans la mesure où la mise en évidence de changements de structure des communautés microbiennes peut dépendre du niveau de résolution choisi pour en différencier les éléments constitutifs.

a. Caractérisation de la diversité par les techniques conventionnelles

Il s'agit d'un prolongement logique des techniques culturales que nous avons abordées dans la première partie relative aux effets sur la taille des communautés microbiennes.

Elles consistent à identifier et recenser différents groupes microbiens. Cela peut aller d'une simple étude de relation de dominance entre microflore bactérienne et fongique (Jones *et al.*, 1992) à celle du comportement de différents groupes bactériens (Duah-Yentumi et Johnson, 1986), ou concerner sinon l'ensemble du moins un échantillon tiré au hasard des différentes espèces cultivables sur des milieux plus ou moins sélectifs. C'est ainsi que Atlas *et al.* (1991) ont montré que le 2,4,5-T, à une concentration de 100 ppm, diminuait le nombre de taxons présents dans le sol, cette évolution étant accompagnée d'une plus grande tolérance de la population dominante vis-à-vis de modifications des conditions ambiantes de température, de pH et de salinité ainsi que d'une diversité métabolique accrue. Lors d'une étude portant sur l'effet de l'application à long terme de boues activées sur la communauté bactérienne totale aérobie et celle résistante au cadmium, Barkay *et al.* (1985) ont montré que la réponse de la microflore à une telle pollution se traduisait par une augmentation de la diversité de la population bactérienne résistante au cadmium; ceci est dû à l'accroissement préférentiel de bactéries du genre *Pseudomonas* et de bactéries Gram+ anaérobies. Il s'agit, à notre connaissance, des seules études portant sur la communauté microbienne du sol sans considération taxonomique ou fonctionnelle particulière. Cette pauvreté de la littérature s'explique aisément si l'on considère la somme de temps et de travail nécessaire pour mener à bien l'entreprise. Or, l'investissement humain de telles études, notamment lorsque celles-ci visent à accéder à un indice de diversité, peut être réduit de trois façons différentes : -i : en substituant aux critères morphologiques, physiologiques et biochimiques traditionnels des critères d'identification plus discriminants, plus faciles à mettre en œuvre et automatisables. De ce point de vue, les profils d'utilisation de substrats carbonés (type API et Biolog) de même que les profils de type PCR-RFLP, qui se prêtent à des techniques de taxonomie numérique, constituent sans aucun doute des progrès décisifs -ii : en diminuant la taille des échantillons ou -iii : en diminuant le nombre de caractères servant à l'identification des taxons. Ainsi, Bianchi et Bianchi (1982) ont montré que la valeur de l'indice de diversité d'une communauté microbienne isolée de sédiments marins tend à se stabiliser lorsque le nombre de souches testées augmente. Le nombre de 20 à 30 souches semble suffisant pour obtenir un indice de diversité représentatif. De plus, le nombre de tests retenus pour la définition des différents taxons peut être réduit de 62 à 30 sans aucune influence sur l'indice de diversité. Mills et Wassel (1980) avaient déjà montré, dans une étude semblable, que l'utilisation d'une vingtaine de tests, aboutissant à un niveau de résolution différent de l'espèce, pouvait déjà apporter une information utilisable quant à la structure et la fonction d'une communauté microbienne. Ces auteurs ont, par ailleurs, souligné l'importance du nombre d'isolats dans la détermination de l'indice de diversité dont la valeur dépend plus de la richesse en espèces que de la régularité de leur distribution. Deux exemples, consacrés aux effets des métaux lourds sur des communautés microbiennes de sol illustrent les avantages de cette stratégie de simplification. Le premier est celui de Hirsch *et al.* (1993) qui

ont limité leur investigation à la seule population de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, pour démontrer qu'une contamination du sol par Cd, Zn, Cu, Cr et Pb apportés par des amendements répétés de boues entraînait, dans les populations isolées des nodosités formées avec le trèfle blanc et violet, l'élimination de l'ensemble des souches efficaces et la survie d'une souche de *Rhizobium* (isolat S) inefficace. Le profil RFLP du gène *lac* chromosomique de cette souche ne montre aucune relation avec ceux des souches efficaces disparues. Reber (1992), retenant comme critère de classification taxonomique l'aptitude à utiliser comme source de carbone et d'énergie vingt substrats carbonés pour l'essentiel aromatiques, a pu isoler près de 200 souches dans différents échantillons de sols contaminés avec des métaux lourds. Il a ainsi pu montrer que dans trois situations sur cinq, on observait une baisse significative de diversité alors que dans les deux autres situations le maintien ou même l'augmentation de la diversité pouvait s'expliquer par une valeur du pH rendant les métaux inaccessibles.

b. Caractérisation de la diversité par profilage génétique

Il ne s'agit pas, ici, de commenter des exemples tirés de la littérature, dont nous n'avons trouvé que peu de traces, mais plutôt de présenter quelques techniques de biologie moléculaire récentes, susceptibles de fournir des alternatives intéressantes pour la reconnaissance des différentes espèces présentes dans une communauté. Elles ont toutes, pour base méthodologique, un traçage des différents individus par le biais des gènes codant pour les ARNr 16S, dont la collecte est réalisée par extraction de l'ADN du milieu et amplification par PCR avec des amorces universelles. Le problème technique à résoudre consiste donc à analyser un polymorphisme de séquence plutôt que de taille des fragments amplifiés. Plusieurs stratégies sont possibles. La plus ancienne consiste à cloner les différents fragments dans des vecteurs servant ensuite à transformer une souche bactérienne, généralement *E. coli*. L'analyse de la librairie ainsi constituée se fait par récupération de chaque fragment individuel après isolement du vecteur des cellules recombinantes et excision. Un séquençage permet ensuite son identification par référence à des séquences connues. Ce protocole, qui a connu différentes variantes (Weller et Ward, 1989; Stackebrandt *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1991; Giovanni *et al.*, 1990; Moyer *et al.*, 1994, Rochelle *et al.*, 1994; Benlloch *et al.*, 1995; Martinez-Murcia *et al.*, 1995, Boivin *et al.*, 1995), reste relativement long et complexe et doit rester limité à des communautés de petite taille. Plus récemment, Muyzer *et al.* (1993) ont proposé une technique d'électrophorèse en gel avec gradient dénaturant (DGGE), technique mise au point par Fisher et Lerman (1983), puis Myers *et al.* (1987) pour détecter des mutations ponctuelles. Cette technique est basée sur une séparation des différentes séquences en fonction de leur propriété de dénaturation lorsqu'elles migrent dans un gradient dénaturant, un mélange d'urée et de formamide. La dénaturation fait apparaître des structures branchées dont la migration dans le gel est stoppée. Cette technique a été appliquée avec succès à l'analyse directe de communautés naturelles du sol (Führ et Kubiak, 1995a et b). Encore plus

récemment, Avaniiss-Aghajani *et al.* (1994) ont mis au point une autre approche basée sur un principe très simple et qui semble prometteuse. Elle consiste à amplifier par PCR les gènes codant pour les ARNr 16S avec des amorces dont une, la supérieure, porte un groupement fluorescent, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La digestion des amplifiats avec une endonucléase de restriction produit, à partir de chacun d'entre eux, un fragment terminal marqué de taille différente. Dans leur article original, Avaniiss-Aghajani *et al.* (1994) ont proposé une détection de ce fragment par électrophorèse capillaire avec un détecteur à fluorescence induite par laser. Cette procédure a été adaptée pour une électrophorèse sur gel avec marquage de l'amorce à la digoxigénine, et du fragment de restriction terminal. La révélation se fait par chimioluminescence après transfert sur membrane (Soulas *et al.*, en préparation). En théorie, on associe donc un fragment de restriction à chaque bactérie d'un mélange. En réalité, une même taille de fragment peut être obtenue à partir de différentes espèces bactériennes. L'utilisation combinée de différents enzymes de restriction devrait permettre de lever, en partie, cette indétermination et de se rapprocher d'un niveau de description des communautés microbiennes d'autant plus proche de l'espèce que le nombre d'enzymes utilisés est important.

Les techniques de biologie moléculaire ont, sans aucun doute, apporté des instruments d'analyse extrêmement puissants, permettant notamment d'avoir accès à des micro-organismes impossibles à atteindre par les techniques culturelles classiques. Par ailleurs, excepté peut-être pour les approches basées sur une caractérisation par séquençage, la charge expérimentale est relativement réduite et permet un plus grand nombre d'analyses. Enfin, l'utilisation de gènes autres que ceux codant pour les ARNr 16S permet d'envisager des études portant sur des groupes fonctionnels. Cependant, ces techniques ont aussi leurs limites, la plus sérieuse étant l'extraction de l'ADN du sol qui doit satisfaire deux exigences contradictoires. Elle doit être suffisamment douce pour éviter une fragmentation excessive du produit mais avec le risque d'une extraction incomplète et peu productive, ou privilégier le rendement au détriment de la qualité physique. Compte-tenu de ces contradictions, on est actuellement dans l'ignorance à peu près complète de l'origine et de la représentativité du matériel extrait. L'étape de PCR n'est pas non plus exempte de reproches. Elle se caractérise souvent par une sélectivité d'amplification qui privilégie certaines séquences d'un mélange (Reysenbach *et al.*, 1992) et introduit un biais dans l'image que l'on restitue de la structure d'une communauté microbienne. En outre, Silva et Batt (1995) ont montré que l'efficacité de l'amplification dépendait aussi de l'état physiologique des micro-organismes. Pour ces différentes raisons, les techniques de biologie moléculaire ne peuvent être envisagées comme substituts aux techniques conventionnelles. Elles permettent seulement d'aborder autrement, et avec des groupes microbiens différemment structurés, l'analyse des communautés microbiennes naturelles et de leur évolution en présence de stress notamment d'origine chimique.

c. Caractérisation de la diversité par profilage avec les acides gras

Parmi les autres molécules "signature" qui peuvent être utilisées pour déterminer la composition d'une communauté microbienne, les acides gras des phospholipides (PLFA) offrent un certain nombre d'avantages : on les trouve dans les membranes de toutes les cellules vivantes mais ils sont inexistantes dans les substances de réserve. Ils ont un taux de turnover relativement rapide dans les cellules mortes et chaque espèce microbienne en possède un ensemble de composition caractéristique. Plus de 8000 souches bactériennes peuvent ainsi être différenciées par leurs profils PLFA (Tunlid et White, 1990). L'analyse de la composition en acides gras des phospholipides est donc un instrument important de classification taxonomique et phylogénétique des micro-organismes. Les bactéries Gram+ et les actinomycètes contiennent typiquement des acides gras à chaîne méthylée tandis que les eucaryotes, notamment les champignons, synthétisent plus spécifiquement des acides gras saturés à nombre pair d'atomes de C et des acides gras polyinsaturés (Zelles *et al.*, 1994). Compte-tenu de ces variations individuelles, la composition en acides gras des communautés microbiennes est probablement caractéristique de leur structure. Korner et Laczko (1992) ont proposé d'utiliser le profil en acides gras extraits du sol comme base de jugement de la diversité des communautés microbiennes. Haack *et al.* (1992) ont confirmé la validité de cette approche en montrant que différents mélanges de bactéries du sol pouvaient être distingués sur la base de leurs profils en acides gras en mettant en œuvre des méthodes statistiques multivariées, telles que l'analyse en composantes principales. Enfin, Frostegård *et al.* (1992; 1996) et Pennanen *et al.* (1996) en ont donné des exemples d'application destinés à étudier les changements qui affectent la structure de communautés microbiennes de sols contaminés avec des métaux lourds. Dans la première étude citée, les auteurs précédents ont montré qu'après six mois de contact avec cinq métaux lourds différents, la communauté microbienne d'un sol évoluait avec l'apparition de groupes microbiens plus tolérants aux polluants et que ces changements étaient détectés à des concentrations sans effet sur la teneur en ATP ou sur l'activité respiratoire. Par la suite, ces mêmes auteurs ont mis en évidence le rôle de Zn dans le développement particulier d'une microflore fongique saprophytique alors que, dans le même temps, les champignons ectomycorhizogènes régressent. Cette dernière étude souligne cependant la principale faiblesse de cette approche technique, l'impossibilité de relier les réarrangements bactériens observés à des changements dans la répartition fréquentielle de groupes microbiens identifiés.

2. Diversité microbienne : autres niveaux d'analyse

a. Diversité génétique

La diversité des séquences codantes d'une communauté microbienne est probablement une condition nécessaire pour lui assurer une capacité de réponse vis-à-vis des perturbations du milieu extérieur et est donc un élément essentiel de stabilité et de résilience. Il est donc normal

qu'on ait cherché à caractériser les communautés microbiennes par la richesse ou, ce qui revient au même, par l'hétérogénéité de leur contenu génomique. Torsvik *et al.* (1990a et b; 1994) ont proposé une définition théorique de la diversité génétique ainsi qu'une technique pour la mesurer. Pour ces auteurs, la diversité génétique est une mesure du nombre et de la fréquence de génomes bactériens différents dans une population ou une communauté. Elle peut se déduire de la complexité de l'ADN extrait du mélange bactérien, cette propriété étant définie par le nombre total de paires nucléotidiques dans des séquences non répétées. Pour les bactéries, la complexité se confond avec la taille du génome puisque ces organismes n'ont de copies multiples que pour un nombre limité de gènes. Plus grande est la complexité du génome d'un organisme, plus faible sera la concentration partielle d'une séquence génomique particulière. En conséquence, la cinétique de réassociation de fragments d'ADN homologue simple brin est celle d'une réaction d'ordre 2, dans laquelle la vitesse est proportionnelle au carré de la concentration en ADN homologue, et pour une concentration donnée en ADN total, cette vitesse est une fonction inverse de la complexité de l'ADN. Si c_0 est la concentration initiale en nucléotides de l'ADN simple brin, c cette même concentration au bout du temps t et $t_{1/2}$ le temps au bout duquel c vaut $c_{0/2}$, alors la fraction résiduelle d'ADN simple brin s'exprime par la relation :

$$\frac{c}{c_0} = \frac{1}{1 + kc_0 t}$$

où k représente la constante de vitesse de la réaction du second ordre. La moitié de l'ADN est réassociée pour une valeur $c_{0/2}$ qui est fonction de la complexité de l'ADN. Pour un mélange bactérien, en supposant que le $c_{0/2}$ de l'ADN de différentes bactéries est sensiblement le même, Torsvik *et al.* (1990a) ont montré que la valeur expérimentale du $c_{0/2}$, bien que sans valeur cinétique précise, pouvait cependant être utilisée comme paramètre pour exprimer la complexité de l'ADN du mélange. Estimant la diversité génétique à partir de l'ADN extrait d'un mélange de 206 bactéries cultivables choisies au hasard, ces auteurs ont montré que la valeur du $c_{0/2}$ correspondait à 20 génotypes entièrement hétérologues. Par comparaison, la valeur calculée à partir de l'ADN total extrait du sol représentatif de l'ensemble de la communauté bactérienne était de 4000 génotypes hétérologues, soit une diversité 200 fois supérieure, apportant au passage un support chiffré à la sélectivité reconnue des techniques culturales. Atlas *et al.* (1991) ont appliqué cette procédure à l'étude de l'effet du 2,4,5-T ($c = 100 \text{ mg kg}^{-1}$) sur la communauté microbienne de sol. Ils ont interprété la diminution sensible de la diversité génétique comme résultant de la prolifération de plasmides entraînant une diversité nutritionnelle accrue.

La littérature donne d'autres exemples de techniques de caractérisation de l'ADN extrait du sol et dont l'usage peut être envisagé pour détecter des changements structuraux affectant la composition génétique des communautés naturelles. Parmi ces différentes techniques, citons

l'hybridation croisée par laquelle on peut mesurer le degré de similarité de l'ADN de deux communautés (Ritz and Griffiths, 1994) et qui a permis à Xueqing Xia *et al.* (1995) de montrer que le 2,4-D était sans effet appréciable sur les communautés microbiennes de trois sols différents. Ces auteurs parviennent à la même conclusion avec une technique d'amplification utilisant des amorces aléatoires (RAPD) dont l'usage en écologie moléculaire avait été recommandé par Hadrys *et al.* (1992). Récemment, Holben et Harris (1995) ont proposé une technique de fractionnement de l'ADN après liaison avec du bisbenzimidazole qui se fixe préférentiellement dans les régions riches en liaisons A-T. Cette fixation modifie la densité du complexe ADN-bisbenzimidazole permettant ainsi la séparation de l'ADN suivant le pourcentage G+C dans un gradient de CsCl. On obtient un profil d'abondance relative de l'ADN dans différentes fractions de G+C % différents. En fait, il est difficile de juger de l'apport réel de ces différentes techniques au travers des exemples trop peu nombreux qui sont donnés dans la littérature.

b. Les profils métabolique : diversité fonctionnelle

La seule description en termes taxonomiques d'une communauté microbienne ne suffit pas à juger de son rôle écologique et de ses capacités fonctionnelles réelles. En effet, si selon Wünsche *et al.* (1995), une communauté microbienne est une unité fonctionnelle qui traduit la diversité génétique et donc les capacités métaboliques des différentes espèces qui la composent, son fonctionnement dépend aussi d'interactions synergiques entre espèces (Zak *et al.*, 1994). L'empreinte métabolique d'une communauté microbienne déterminée au travers d'un profil d'utilisation de différents substrats carbonés et énergétiques offre donc une base de classification des communautés microbiennes du sol plus en rapport avec leur rôle fonctionnel. Wünsche *et al.* (1995) y voient également la possibilité de détecter des dérives environnementales liées à des pollutions ou de contrôler les résultats d'un processus de bioremédiation. Garland et Mills (1991) ont proposé d'utiliser dans ce but le système de plaque de microtitration de type Biolog dont chaque puits contient, outre les éléments minéraux nécessaires, un substrat carboné et un indicateur rédox, le violet de tétrazolium, qui sert d'accepteur d'électrons. Sa réduction au cours de la transformation entraîne la formation d'un composé insoluble violet, le formazan, qui s'accumule dans le milieu intracellulaire. L'inoculation d'une plaque avec une suspension bactérienne fournit simultanément le résultat de 95 tests biochimiques utilisables en taxonomie numérique. C'est pourquoi, ce dispositif a été particulièrement utilisé pour l'identification de souches microbiennes isolées de différents environnements (Carnahan *et al.*, 1989; Mauchline et Keevil, 1991; Miller et Rhoden, 1991; Amy *et al.*, 1992; Klingler *et al.*, 1992; Wünsche et Babel, 1996). Les applications concernant l'étude de communautés naturelles sont assez représentatives de la diversité des situations qui peuvent être abordées et de la pertinence de la technique, notamment lorsqu'elle est relayée par une évaluation du signal multivariable généré par des analyses statistiques appropriées monovariées ou multivariées (Garland, 1996a et b). Utilisant l'analyse en composantes

principales, Garland et Mills (1991) ont pu caractériser et classer trois communautés microbiennes hétérotrophes issues de trois habitats différents, une eau douce, une suspension de bactéries rhizosphériques et une suspension de bactéries de sol après incubation sur milieu dilué. Une méthode de groupement a été utilisée par Winding (1994) pour différencier des sols agricoles, perturbés, et des sols de forêts et de prairies, non perturbés. Zak *et al.* (1994) ont calculé des indices de diversité, de richesse et de distribution métabolique, en s'appuyant sur des concepts analogues à ceux qui sont utilisés pour caractériser la diversité taxonomique. Ce travail, rapportant les résultats d'une étude portant sur la comparaison des profils biochimiques de six sols ayant porté des couverts végétaux différents, est une bonne illustration des différentes possibilités par lesquelles l'information contenue dans les données peut être analysée. Dans une optique plus prospective et compte-tenu des caractéristiques de composition chimique des exsudats racinaires, la détermination des profils métaboliques des communautés rhizosphériques peut être un instrument puissant de différenciation des "structures" métaboliques des communautés rhizosphériques associées à différentes plantes cultivées et de leur dynamique au cours des cycles végétaux (Garland, 1996a) ou consécutivement à des tentatives de manipulation. Bien que traitant d'une microflore phyllosphérique, l'étude de Ellis *et al.* (1995) offre l'exemple de ce type d'application. Enfin, dans le domaine écotoxicologique, Wünsche *et al.* (1995) ont mis en évidence des modifications importantes dans les profils métaboliques de communautés microbiennes de sols contaminés avec des hydrocarbures. Ces modifications résultent vraisemblablement de processus d'adaptation, provoquant un enrichissement en espèces dégradant les hydrocarbures. Parmi les améliorations possibles, la prise en compte des caractéristiques cinétiques de la consommation des différents substrats ainsi que l'adjonction d'autres groupes de substrats carbonés pourraient permettre d'accroître le caractère discriminant de la procédure et d'étendre le champ de ses applications. Entre autres, une meilleure représentation des substrats aromatiques pourrait en faire un moyen de classification métabolique des sols venant compléter les caractérisations physiques et chimiques habituelles (Garland et Mills, 1991). Malgré tout, un certain nombre de critiques peuvent être formulées. La première concerne le caractère sélectif de la procédure lié à un mode de détection qui dépend d'une étape culturale. Une détection préférentielle de bactéries à stratégie de croissance de type r est donc probable. En outre, ainsi qu'il ressort du travail de Haack *et al.* (1995) réalisé sur un ensemble de souches isolées du sol et utilisées seules ou en mélange, certains genres bactériens tels *Bacillus* et *Arthrobacter* semblent ne donner systématiquement qu'un nombre minimal de réponses positives. Les auteurs interprètent ce résultat comme reflétant le caractère oligotrophe de ces micro-organismes ou des exigences nutritives particulières non satisfaites par le milieu de culture. Les espèces rares, dont certaines peuvent être des acteurs importants dans le fonctionnement général des écosystèmes, sont probablement sous-estimées en raison, d'une part de la dilution initiale, nécessaire si l'on veut éviter la consommation parasite de

substrats carbonés originaires du sol, d'autre part de la difficulté que ces micro-organismes peuvent avoir à se développer dans un environnement biologique encombré et complexe. Plus généralement, ainsi que le soulignent encore Haack *et al.* (1995), bien que la vitesse et l'intensité de la consommation des différents substrats soient, pour une communauté donnée, des paramètres reproductibles, ils ne traduisent pas la somme des activités individuelles des différents composants de la communauté. Une forte oxydation peut aussi bien être le résultat de l'activité simultanée de plusieurs espèces que celle d'une seule espèce particulièrement active.

D. CONCLUSION

L'introduction des pesticides dans le sol expose directement les micro-organismes aux pollutions d'origine agricole et industrielle dont le sol est souvent la cible ultime. Ces organismes constituent donc à la fois des sondes potentielles utilisables dans le cadre d'une surveillance de la qualité chimique du sol mais également des indicateurs d'une dérive biologique qui pourrait, à terme, nuire au fonctionnement des agrosystèmes. La littérature existante montre que le problème de l'impact d'un polluant peut être abordé à différents niveaux d'investigation, allant de la souche isolée à la communauté microbienne, à l'aide d'indicateurs biologiques de natures différentes, de type populationnel ou fonctionnel, et conduire à des observations interprétables en termes qualitatifs ou quantitatifs. Aucune des différentes techniques rapportées ne peut prétendre, à elle seule, fournir une réponse globale permettant de juger de la signification écologique réelle des effets observés. C'est, au contraire, de la multiplicité des cibles et des approches que l'on peut espérer en avoir une vision plus réaliste. Il est par ailleurs évident que la seule mise en évidence d'effets ne peut suffire à conclure à une nocivité particulière d'un produit tant que ceux-ci n'ont pas été confrontés à ceux qui résultent des fluctuations normales qui affectent les populations et le fonctionnement des écosystèmes naturels. De ce point de vue, la sensibilité des tests peut quelquefois être une qualité illusoire et sans pertinence écologique, notamment lorsque ceux-ci reposent sur le choix d'indicateurs non spécifiques dont les variations dépendent souvent au moins autant de l'évolution normale des conditions du milieu que de la perturbation additionnelle liée à la présence d'un polluant.

C'est dans le cadre d'une recherche méthodologique fondée sur l'utilisation de différents descripteurs que nous avons envisagé d'étudier l'effet d'un herbicide, le DNOC ou 4,6 dinitro-ortho-crésol pris comme polluant modèle (Jensen H.L. et Lautrup-Larsen G., 1967; Nehez M. *et al.*, 1977), sur la microflore du sol. Nous avons d'abord considéré son influence sur la croissance de souches isolées choisies dans trois groupes microbiens. Deux d'entre eux ont une définition taxonomique, il s'agit des *Rhizobium* et des *Pseudomonas* et le troisième a une définition fonctionnelle, il s'agit des micro-organismes dégradant un

herbicide, le 2,4-D, dont plusieurs publications (Ka *et al.*, 1994; Fulthorpe *et al.*, 1995) ont souligné la diversité spécifique. L'utilité de cette approche ne peut se concevoir que pour la recherche de souches particulièrement sensibles pouvant servir d'indicateurs précoces (sentinelles), ou dans le cadre d'un large échantillonnage permettant d'apprécier l'impact potentiel d'un produit au travers de la proportion des souches dont la croissance est inhibée. Elle a pour principal inconvénient de considérer les micro-organismes en dehors de leur milieu naturel où des mécanismes de protection physiques, physico-chimiques et même biologiques tendent probablement à limiter l'impact réel des polluants. C'est pourquoi, dans la seconde partie de ce travail, nous avons étudié l'impact du DNOC sur la structure de deux sous-ensembles de la communauté bactérienne d'un sol, les bactéries cultivables sur milieu non sélectif ou sur milieu dans lequel le 2,4-D constitue la source principale de carbone et d'énergie. Dans la troisième partie, enfin, nous avons essayé de confirmer les modifications observées dans la structure des communautés précédentes par des observations relatives à un changement dans les capacités métaboliques de l'ensemble des bactéries cultivables ou de l'efficacité fonctionnelle des bactéries capables de dégrader le 2,4-D.

CHAPITRE I

IMPACT DU DNOC

SUR DES SOUCHES

BACTERIENNES ISOLEES

CHAPITRE I

IMPACT DU DNOC

SUR DES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES

A. OBJECTIFS

La façon la plus immédiate et la plus simple d'étudier l'effet des substances toxiques sur les micro-organismes consiste à réaliser des cultures pures de différentes souches microbiennes en présence de cette substance. L'idée sous-jacente est de relier l'intensité de l'activité biocide potentielle à la proportion des bactéries dont la croissance est perturbée, éventuellement pondérée par le degré de perturbation. Cette procédure, qui a été largement utilisée dans le passé (Cooper *et al.*, 1978; Cserhati *et al.*, 1992), n'est valable qu'à la condition que l'on puisse tester un grand nombre d'individus. Une multiplication des comportements biocides permettrait en outre de déceler des souches plus particulièrement et systématiquement sensibles ou au contraire résistantes qui pourraient s'avérer être des biomarqueurs d'une pollution environnementale.

La toxicité d'un produit peut être appréciée par le biais de la proportion de réponses négatives de la part de souches microbiennes en condition de cultures pures. C'est cette hypothèse que nous avons voulu tester dans cette première partie. Nous nous sommes intéressés à trois groupes microbiens : deux correspondent à des ensembles taxonomiques relativement homogènes; le troisième n'a qu'une définition fonctionnelle.

Le premier groupe bactérien concerne les *Pseudomonas* spp. fluorescents dont une collection a été constituée à Dijon par nos collègues de Flore Pathogène des sols (Lemanceau *et al.*, 1995). Ces bactéries ont été choisies parce que ce sont des micro-organismes ubiquistes qui interviennent dans de nombreux processus biologiques, tels que la chélation du fer grâce aux sidérophores (pyoverdines (Meyer et Abdallah, 1978) ou pseudobactines (Teintze *et al.*, 1981)) qu'ils produisent et la dégradation des molécules organiques de synthèse (Johnsen *et al.*, 1996). Cette aptitude biochimique pourrait leur conférer un degré de résistance accru par rapport au reste de la population microbienne du sol. Le second groupe de bactéries que nous avons retenu, les *Rhizobium*, issus de la collection du laboratoire de Microbiologie des Sols de l'INRA de Dijon, présente l'intérêt d'assurer par leur association avec les légumineuses une fonction agronomique importante, la fixation de l'azote. De nombreuses études ont montré qu'ils présentaient une certaine sensibilité vis-à-vis des pollutions environnementales causées par des molécules xénobiotiques (Moorman, 1989)

ou par des métaux lourds (Brookes *et al.*, 1986b). Ces polluants peuvent agir soit sur le partenaire microbien (Moorman, 1986), soit sur le partenaire végétal (Mårtensson, 1992a) ou sur l'interaction entre les deux partenaires (Mårtensson, 1992b). Enfin, le troisième groupe étudié correspond aux micro-organismes isolés du sol capables de dégrader une molécule xénobiotique, le 2,4-D. Ce groupe a pour caractéristique d'avoir une taille restreinte, généralement estimée à 10^5 UFC g⁻¹ de sol, mais probablement aussi une diversité spécifique et génétique importante. Ces caractéristiques permettent d'une part de le considérer comme un échantillon représentatif de l'ensemble de la microflore du sol, d'autre part de rassembler un éventail accru de possibilités métaboliques et physiologiques susceptible de multiplier les cibles potentielles et d'augmenter la sensibilité de ce groupe particulier aux perturbations du milieu. Les souches testées correspondent à celles isolées du sol, puis caractérisées par différentes techniques de biologie moléculaire. Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'ensemble des souches isolées par une technique basée sur une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant des amorces REP correspondant à des séquences nucléiques palindromiques extragéniques répétées. Les séquences REP, à l'origine des amorces utilisées, présentent la particularité d'être répétées plusieurs fois dans le génome de toute une variété de procaryotes (Versalovic *et al.*, 1991), tels que *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Rhizobium* (De Bruijn, 1992), *Pseudomonas* et *Xanthomonas* (Louws, 1994). Cette méthode présente l'avantage de générer des profils représentatifs de l'ensemble du génome bactérien sans extraction préalable de l'ADN et de différencier de faibles variations génomiques dans des souches d'une même espèce (niveau infraspécifique de caractérisation). Dans un deuxième temps, pour réaliser des groupements à un niveau taxonomique moins fin, nous avons réalisé une seconde caractérisation sur un échantillon de souches présentant des profils REP différents, en utilisant la technique de PCR couplée à une étude du polymorphisme de taille de fragments de restriction (RFLP) des gènes codant pour l'ARNr 16S. Ce gène constitue un excellent marqueur biologique. Il est formé de régions très conservées chez tous les micro-organismes, qui servent d'amorces universelles en PCR et des régions variables, qui peuvent être amplifiées. Cette technique constitue une méthode suffisamment discriminante pour différencier des espèces au sein d'un même genre bactérien, tels que *Pseudomonas* (Laguerre *et al.*, 1994b), *Rhizobium* (Laguerre *et al.*, 1994a) et *Agrobacterium* (Ponsonnet et Nesme, 1994).

Tableau I-1 : Caractéristiques des souches de *Pseudomonas* issues de la collection de la Flore Pathogène des Sols de l'INRA de Dijon (Lemanceau *et al.*, 1995).

SOUCHES	ESPECE
S134, TRp 124, TRp 624, S 924, S 222	<i>P. fluorescens</i> biovar 2 phénon 1
TR 133, TR 231, S134, TE 125, TE 712	
LR 426, TRp 522, TE 911	<i>P. fluorescens</i> biovar 3 phénon 9
TRp 622, LRp 712, LRp 811	
TR 233, TR 335, TRp 122, TE 12	<i>P. fluorescens</i> biovar 3 phénon 10
,TR 131, TE 421, TE 423	
LRp 214, TR 632, LR 423	<i>P. fluorescens</i> biovar 3 phénon 11
LE 411 J, LE 412 J, LE 413 J	<i>P. fluorescens</i> biovar 3 phénon 12
LR 223, S 724, TRp 725	<i>P. putida</i> biovar A phénon 3
LE 611, LR 228, LRp 212	<i>P. putida</i> biovar A phénon 5
LE 414 J, TE 612, TRp 1021, LE 521, TR 103 J	<i>P. putida</i> biovar A phénon 6
TRp 621, LE 324 J, LRp 812, LRp 511	
LE 2216, LE 711, LE 3216	<i>P. putida</i> biovar A phénon 7
S 131, S 321, TR 541, LRp 921	<i>P. putida</i> biovar A phénon 8
LRp 414, TR 931, LR 832, S 824	<i>P. intermédiaire</i> phénon 4

S : sol nu
R : rhizosphère
Rp : rhizoplan

TR : tissus racinaire
E : endophyte

T : tomate
L : lin

Tableau I-2 : Caractéristiques des souches issues de la collection de *Rhizobiaceae* du laboratoire de Microbiologie des Sols de l'INRA de Dijon (Laguerre *et al.*, 1994).

SOUCHES	ESPECE	ORIGINE GEOGRAPHIQUE
ATCC 10004	<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae	Etats-Unis
USDA 2071	<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii	non connu
H 132	<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli	France
CFN 42	<i>R. etli</i>	Mexico
CFN 299	<i>R. tropici</i> type II A	Brésil
ATCC 9930	<i>S. meliloti</i>	Etats-Unis
ATCC 43677	<i>R. galegae</i>	Finlande
CCBAU 2609	<i>R. huakuii</i>	Chine
R602 sp	<i>Rhizobium</i> (phaseolus) espèce génomique 1	France
PhD12	<i>Rhizobium</i> (phaseolus) espèce génomique 1	France
H152	<i>Rhizobium</i> (phaseolus) espèce génomique 2	France
C58	<i>A. tumefaciens</i>	France

R. : *Rhizobium*
S. : *Sinorhizobium*
A. : *Agrobacterium*
bv. : biovar

B. MATERIEL ET METHODES

I. Le sol et les produits

Le sol utilisé provient d'un champ d'essai de l'INRA de Dijon qui n'a jamais subi de traitement au 2,4-D. Il s'agit d'un sol limono-argileux prélevé dans l'horizon de surface (0 à 20 cm) et dont les caractéristiques sont présentées en annexe I.

Le produit phytosanitaire utilisé est le DNOC (4,6-dinitro-*o*-crésol). Ses caractéristiques physico-chimiques sont données en annexe II a.

II. Groupes bactériens

1. Bactéries du groupe *Pseudomonas* spp. fluorescents

Les souches utilisées sont issues de la collection du laboratoire sur la Flore Pathogène dans le Sol de l'INRA de Dijon. Elles sont d'origine diverses : elles ont été isolées dans le sol de Dijon en présence de deux espèces végétales (le lin et la tomate) à partir de quatre compartiments (le sol nu, la rhizosphère, le rhizoplan et les tissus racinaires). Parmi ces *Pseudomonas*, on distingue trois espèces différentes : *P. fluorescens* qui possède cinq biovars, *P. putida* qui en possède deux et *P. intermédiaire*. Les souches qui ont servi à cette étude sont indiquées dans le tableau I-1.

2. Bactéries du groupe *Rhizobium*

Les souches utilisées proviennent de la collection du laboratoire de Microbiologie des Sols de l'INRA de Dijon. Parmi ces souches, qui ont été identifiées par RFLP du gène de l'ARNr 16S amplifié par PCR (Laguerre *et al.*, 1994a), un échantillon de souches appartenant à différentes espèces a été étudié. Leurs caractéristiques sont données dans le tableau I-2.

3. Bactéries dégradant le 2,4-D

a. Isolement

Le dispositif d'isolement utilisé est constitué de plaques de microtitration dont chaque puits contient un agrégat de sol. Après traitement avec du 2,4-D marqué au carbone 14, la dégradation de ce dernier donne lieu à un dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ qui est piégé sur un filtre de papier imbibé d'une solution d'hydroxyde de baryum saturée, recouvrant la plaque de microtitration et maintenu en contact étroit avec l'orifice de chaque puits. Le précipité de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ formé est ensuite révélé par autoradiographie (Tabor *et al.*, 1976; Fulthorpe *et al.*, 1996) (figure I-1).

L'isolement bactérien a été réalisé à partir d'agréats de sol, de 1 à 2 mm de diamètre, répartis dans chaque puits d'une plaque de microtitration de 96 puits

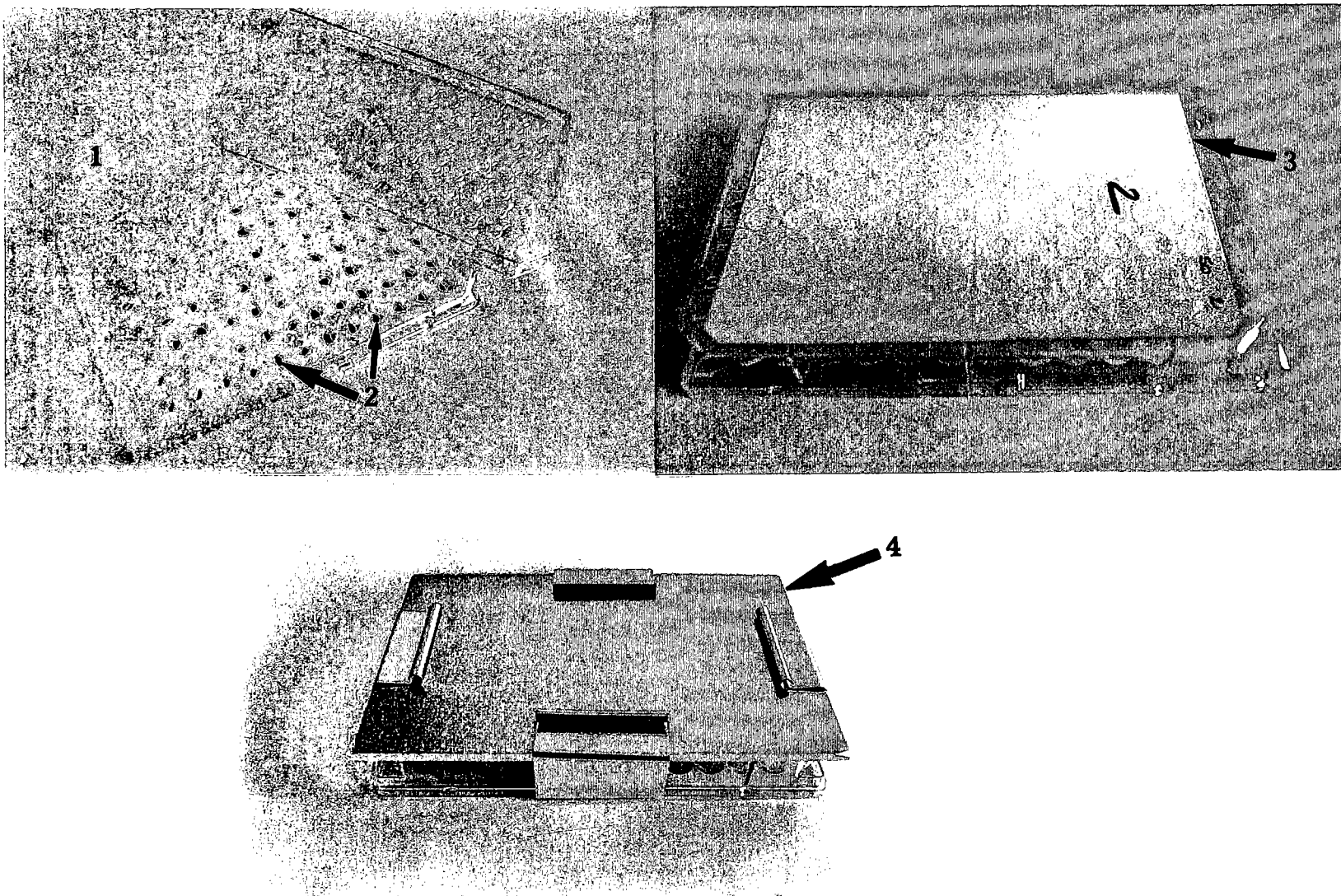


Figure I-1 : Dispositif expérimental de détection d'une dégradation du $^{14}\text{C}_1\text{-2,4-D}$ au sein d'agrégats de sol.

- 1. plaque de microtitration
- 2 : agrégats de sol
- 3 : filtre de papier Whatman imbibé d'une solution de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ saturée
- 4 : plaque d'aluminium

(Microwell Nunclon Delta, France). Quatre microplaques ont été préparées. Les étapes de l'isolement sont résumées sur la figure I-2. A chaque agrégat de sol, de poids moyen d'environ 20 mg, est ajouté 10 µl de milieu minéral additionné de 2,4-D froid à la concentration de 20 mg l⁻¹ et de 2,4-D marqué au ¹⁴C sur le carbone 1 de la chaîne latérale à raison de 333 Bq par puits. Les plaques de microtitration, recouvertes d'un filtre de papier Whatman 3MM (11 x 7,3 cm), préalablement imbibé d'une solution d'hydroxyde de baryum saturée et d'une plaque métallique maintenue par quatre pinces, sont incubées à 20 °C sous agitation. L'incubation des agrégats s'est poursuivie pendant sept semaines, un changement des filtres étant réalisé chaque semaine. Les filtres, immergés dans un bain d'acétone, puis séchés à l'étuve à 105°C pendant 10 minutes, sont mis au contact d'un film autoradiographique (hyperfilm β max, Amersham, France). Celui-ci se trouve impressionné au niveau des plages contenant de la radioactivité, permettant ainsi de repérer les puits contenant des agrégats "dégradants".

Les agrégats positifs ont été regroupés en quatre classes d'activité en fonction de la vitesse de dégradation du 2,4-D, le critère de classification retenu étant la détection d'une dégradation appréciable sur le filtre après 21, 28, 35 et 49 jours. Tous les agrégats d'une même classe ont été mis en suspension dans 20 ml de milieu minéral additionné de 2,4-D froid à la concentration de 20 mg l⁻¹ et de 2,4-D marqué sur le C₁ de la chaîne latérale, de telle sorte que la totalité de la suspension puisse être répartie à raison de 200 µl par puits sur quatre nouvelles microplaques. Deux apports supplémentaires de 2,4-D ont été réalisés pour enrichir la population en micro-organismes dégradants. La détection des puits contenant des micro-organismes dégradants a été réalisée périodiquement selon la méthode décrite précédemment. Le contenu des puits positifs est dilué à 10⁻⁵, puis des aliquotes de 0,1 ml ont été étalées sur boîte de Pétri contenant du milieu minéral additionné de 2,4-D à la concentration de 20 mg l⁻¹ comme seule source de carbone et d'énergie. Pour chaque puits, nous avons préparé trois boîtes de Pétri. Les colonies ont été sélectionnées en fonction de leurs différences morphologiques, puis purifiées sur le même milieu. Dans le but de vérifier leur capacité de dégradation, chacune d'entre elles a été soumise au même test de dégradation sur microplaque, tel qu'il a été décrit précédemment. Les souches identifiées comme dégradantes ont été mises en collection après congélation dans du glycérol (à 25 %) à -80°C.

b. Caractérisation de Gram

Les souches bactériennes ont été caractérisées sur la base de la structure de leur paroi cellulaire et de leur réponse à la coloration Gram, réalisée selon la méthode de Manifi et Kneifel (1990). Une solution méthanolique à 0,1 g ml⁻¹ de L-Alanine 7-amido-4 méthyl-coumarine (Sigma) préparée extemporanément a été stérilisée par filtration sur filtre Millipore (diamètre des pores = 0,2 µm), puis incorporée à un milieu NA (Annexe III) dilué au 1/10 stérile, à une température de 45°C. Une colonie de chaque

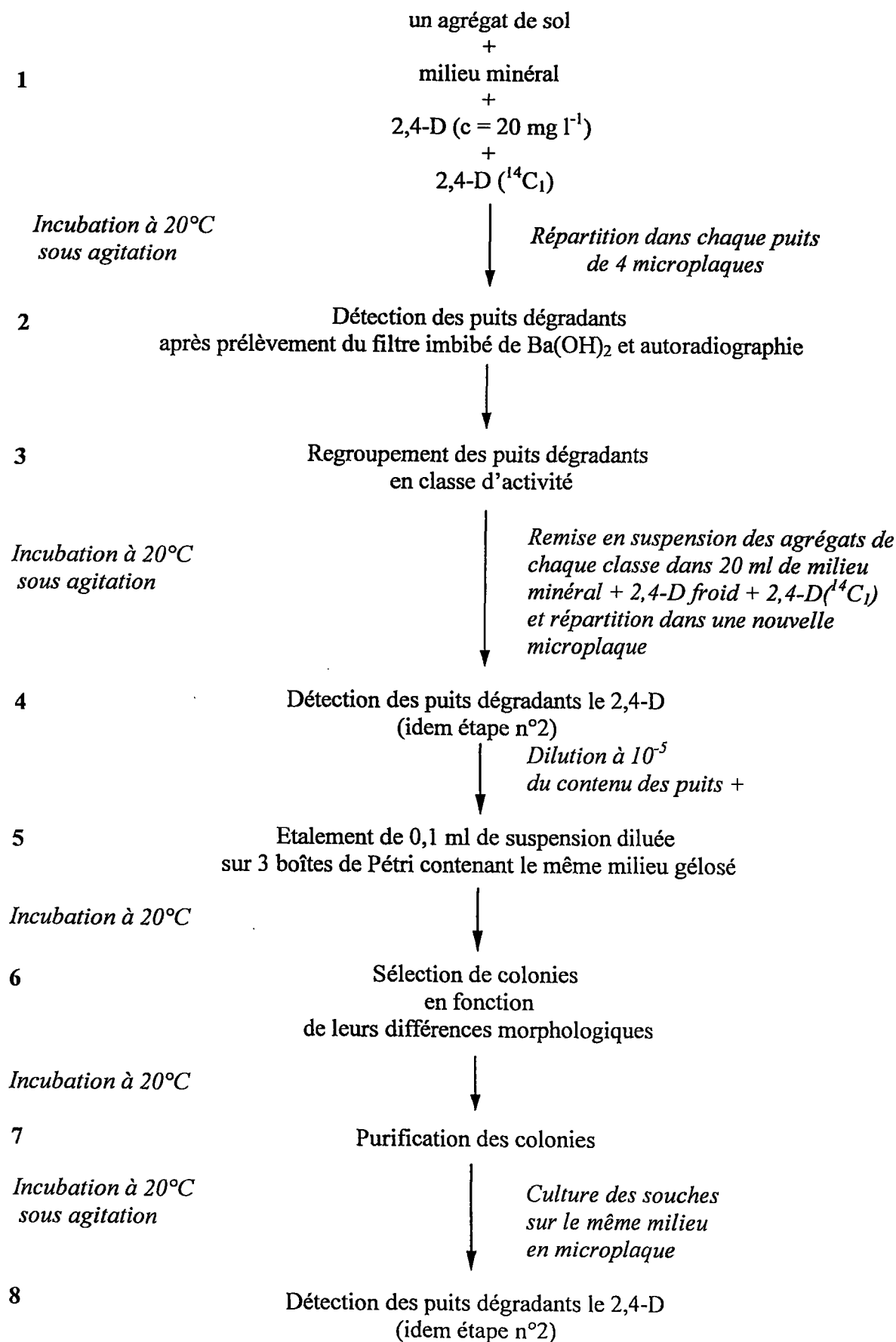


Figure I-2 : Protocole d'isolement des souches dégradant le 2,4-D à partir du sol.

souche bactérienne a été déposée à la surface de ce milieu coulé dans des boîtes de Pétri. Après deux heures à température ambiante, la présence ou l'absence d'activité aminopeptidasique a été visualisée sous lampe ultra-violette. Le caractère Gram- a été déterminé par l'apparition d'une fluorescence émise à partir de la culture. Un témoin positif (*Pseudomonas fluorescens*) et un témoin négatif (*Rhodococcus rhodochrous*) ont été inclus dans chaque boîte de Pétri.

c. Caractérisation génotypique

La caractérisation génotypique a été réalisée par deux méthodes différentes basées sur l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de deux types de fragments géniques, ceux compris entre des séquences palindromiques répétées (REP) et ceux codant pour les ARNr 16S.

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier une région génique comprise entre deux zones dont on connaît la séquence nucléotidique. Cette amplification nécessite la succession de plusieurs étapes réactionnelles. Une première étape de dénaturation thermique de l'ADN bicaténaire réalisée à 95-97°C permet de séparer les deux chaînes antiparallèles de la double hélice d'ADN par une rupture des liaisons hydrogène existant entre les bases de chacune des deux chaînes d'ADN monocaténares. Suit une étape d'hybridation, à température réduite (55°C), au cours de laquelle de courts fragments oligonucléotidiques (amorces) complémentaires d'une région donnée s'associent aux brins originels dénaturés. L'étape d'amplification, réalisée à 72°C, nécessite la présence d'une polymérase thermorésistante appelée *Taq* Polymérase (car isolée de *Thermophilus aquaticus*). Celle-ci régénère, à partir de l'amorce, la partie complémentaire de chacune des chaînes monocaténares isolée au cours de la dénaturation initiale. La succession de plusieurs cycles de chacune de ces trois étapes (dénaturation, fixation des amorces et élongation) permet d'obtenir la multiplication exponentielle de la fraction d'ADN située entre les deux sites de fixation des amorces.

L'étape hybridation des amorces est probablement la plus critique. En effet, à des températures inférieures à 50°C, le risque d'appariement hétérologue des amorces augmente de façon très significative, alors qu'à des températures plus élevées (55°C), la spécificité de l'amplification est accrue mais l'efficacité diminuée. En pratique, la PCR est réalisée directement à partir des cellules bactériennes sans extraction préalable de l'ADN. Cependant, pour fragiliser les cellules et augmenter l'efficacité de la réaction de PCR, celles-ci ont été préalablement traitées à la protéinase K, selon le protocole décrit par Lemanceau *et al.* (1995), afin de dégrader la composante protéique des parois cellulaires et inactiver les DNases et les RNases libérées lors de l'éclatement des protoplastes.

Les produits et les protocoles expérimentaux détaillés des techniques utilisées sont rapportés en annexe IV.

(1) Amplification des séquences inter-REP (Repetitive Extragenic Palindromic)

Les amorces REP IR-1 et REP IR-2 (de taille égale à 18 pb), décrites par Versalovic *et al.* (1991), permettent l'amplification de régions situées entre les deux séquences REP. Cette réaction génère des fragments d'ADN de différentes tailles qui, séparés par électrophorèse en gel d'agarose, donnent un profil caractéristique de la souche bactérienne étudiée. Les amorces REP sont issues de la séquence REP consensus suivante (de 38 pb) :

REP consensus :

5'-GCCCKGATGNCGSNNNNNRCSCTTATCYGGCCTAC 3'

REP IR-1 :

3'-CGGICTACIGCIGCIII-5'

REP IR-2 :

5' ICGICTTATCIGGCCTAC 3'

Abréviations :

N = A ou G ou C ou T; I = Inosine; K = G ou T; R = A ou G, S = C ou T; Y = C ou A

Le protocole expérimental suivi est celui décrit par De Bruijn (1992) (annexe IV). L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (Hybaid Omnigene) en utilisant le programme suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 6 minutes, suivi de 30 cycles à 94°C pendant 1 minute, 40°C pendant 1 minute, 65°C pendant 8 minutes et enfin élongation finale à 65°C pendant 16 minutes. Pour chaque série d'amplifications est inclut un témoin sans ADN constituant un témoin négatif d'amplification et un marqueur de poids moléculaire de 1 kb (Gibco-BRL, France). Les fragments d'ADN amplifiés sont séparés par électrophorèse en gel horizontal (6 x 8 cm, 14 puits) d'agarose (1,5 %, Sigma type II EEO A6877) dans un tampon TAE (Tris-Cl 40 mM, acétate-Na 4 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,3) sous une tension de 100 V (5,5 V/cm) pendant une heure. La préparation du gel ainsi que les conditions de dépôts sont rapportées en annexe IV. Après électrophorèse, le gel est coloré avec une solution de bromure d'éthidium. Les fragments d'ADN ainsi colorés sont visualisés sous rayonnements ultra-violet (302 nm) puis photographiés. Les profils obtenus directement après PCR ont été enregistrés et comparés pour classer les souches bactériennes en groupes REP.

(2) Analyse du polymorphisme des fragments de restriction du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S)

Pour privilégier la spécificité de la réaction d'amplification préalable, nous avons fixé la température d'hybridation à 60°C. Le cycle d'amplification, réalisée grâce à un thermocycleur (Hybaid Omnigene), consiste en une étape de dénaturation de 1 minute à 94°C, une étape

d'hybridation à 60°C et une étape d'extension d'amorces de 2 minutes à 72°C. On démarre l'amplification par une étape de dénaturation de 3 minutes à 95°C; on la termine par une étape d'extension de 3 minutes à 72°C.

Les amorces fD1 et rD1 (Weisburg *et al.*, 1991) ont été utilisées pour amplifier un fragment proche de la longueur totale du gène de l'ARNr 16S. Leurs séquences sont les suivantes :

-fD1 : 5'-AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG-3'

-rD1 : 5'-AAG-GAG-GTG-ATC-CAG-CC-3'

Pour chaque série d'amplifications est inclut un témoin sans ADN, constituant un témoin négatif d'amplification et le marqueur de poids moléculaire de 1kb. Le bon déroulement du processus d'amplification est vérifié par une estimation de la taille des fragments amplifiés par électrophorèse en gel d'agarose (8 cm x 6 cm) à 0,9 % (Sigma, type II Medium EEO), à 100V pendant 30 minutes.

La caractérisation ultérieure de ces différents fragments a été réalisée par analyse du polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP pour Restriction Fragment Length Polymorphism). Cette procédure a consisté à digérer un fragment d'ADN bicaténaire par un enzyme de restriction qui coupe au niveau de sites reconnus spécifiquement. Pour l'occasion, les fragments amplifiés ont été digérés par sept enzymes tétramétriques de restriction différents reconnaissant chacun une séquence particulière. Ces enzymes et les séquences reconnues sont indiqués en annexe IV. Nous avons choisi des enzymes de restriction "4 bases", de façon à augmenter la probabilité de coupure et avoir un nombre de bandes suffisant. Les différents fragments, dont le nombre et la taille sont déterminés en fonction de la fréquence et de la position des sites de coupure, sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse en gel d'agarose, générant ainsi un profil de restriction. Appliquée aux gènes codant pour les ARNr 16S, l'association des techniques de la PCR, qui met à profit l'existence de zones conservées pour l'utilisation d'amorces universelles et du RFLP qui, au contraire, a permis de détecter une variabilité au sein d'une famille de séquences homologues, a généré des profils de restriction spécifiques de chaque espèce bactérienne.

Après digestion, les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose (11 x 14 cm) à 3,5 % (Metaphor, Tebu) dans du tampon TBE 1X en présence du marqueur de poids moléculaire BVIII (Boehringer, Mannheim). Après migration sous 80 volts pendant 4 heures, le gel est coloré au bromure d'éthidium pour la détection des fragments d'ADN selon le protocole déjà décrit.

d. Classification des souches bactériennes

Pour chaque enzyme, les profils de restriction obtenus pour les isolats testés sont comparés. Les souches présentant un profil identique sont classées dans un même type. Ainsi, à chaque

souche est attribué un type ADN_r 16S, défini par la combinaison des profils de restriction obtenus avec les sept endonucléases testées.

Pour estimer les relations génétiques entre les gènes d'ARN 16S des souches testées, une matrice de similarité a été calculée à partir des coefficients de coïncidence ou coefficients de simple appariement qui expriment la proportion des fragments de restriction communs à chaque paire de souches par rapport au nombre total de fragments observés. Un dendrogramme est construit à partir de la matrice de similarité, en utilisant l'algorithme UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Sneath P. H. A. et Sokal R. R., 1973) à l'aide du logiciel NTSYS-pc. La corrélation entre la matrice de similarité et la matrice cophénétique (construite à partir de l'arbre phylogénétique obtenu) est estimée par le coefficient de corrélation r (test statistique de Mantel Z normalisé).

Les sites de restriction de certaines souches, présentant un comportement vis-à-vis du DNOC similaire ou proche de souches de références, ont été localisés sur l'ADN_r 16S par comparaison avec les cartes de restriction disponibles pour une collection de souches de références de *Pseudomonas* spp. (Laguerre *et al.*, 1994b; Jaunet *et al.*, 1995) et de *Rhizobium* (Laguerre *et al.*, non publié). La position phylogénétique de ces souches au sein des *Pseudomonas* ou des *Rhizobium* a été estimée en analysant les différences existant entre les sites de restriction des gènes de l'ARN_r 16S à l'aide du programme PAUP (phylogenetic analysis using parsimony) (Swofford, 1993). Ce logiciel de construction d'arbres phylogénétiques minimaux, comptant le minimum de changements de caractères (en considérant, dans notre cas, comme caractère, la présence ou l'absence d'un site), est basé sur la méthode de parcimonie de Dollo, qui se prête relativement bien à l'analyse des sites de restriction puisque son concept repose sur l'existence d'une asymétrie entre le gain et la perte d'un site (en sachant qu'il est plus facile de perdre que de gagner un site).

C. ETUDE DE L'EFFET DU DNOC SUR LES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES

I. Principe

L'effet des pesticides sur les micro-organismes a été étudié par des tests de croissance de différentes souches pures de bactéries, en présence de différentes concentrations de pesticides. Le dispositif expérimental utilisé est un lecteur-incubateur de croissance (Labsystems Bioscreen C) utilisant des plaques de microtitration. Il permet d'incuber en même temps deux microplaques de 100 puits sous agitation continue. L'appareil mesure, à une cadence ajustable, l'absorbance à l'intérieur de chaque puits. La température d'incubation peut être ajustée et un intérêt du système est de maintenir le couvercle des plaques de

microtitration à une température légèrement supérieure à celle du milieu de culture, limitant ainsi la condensation. La lecture peut donc se faire directement au travers du couvercle, limitant les possibilités de contamination.

II. Protocole expérimental

Les souches bactériennes, conservées sur boîte de Pétri contenant le milieu solide spécifique du genre bactérien étudié (milieu King B pour les *Pseudomonas*, milieu TY pour les *Rhizobium* et milieu LB pour les souches dégradant le 2,4-D) (Annexe III pour la description des différents milieux de culture), ont été mises en culture dans le même milieu liquide utilisé précédemment pendant 20 heures à 28°C.

L'absorbance des suspensions bactériennes, mesurée par rapport à un "témoin milieu", à une longueur d'onde de 620 nm, est ajustée à 0,5 avec le même milieu que celui utilisé lors de leur préculture.

L'effet du DNOC sur la croissance des souches bactériennes a été étudié pour deux concentrations différentes égales à 50 et 250 mg l⁻¹. La répartition des milieux (additionnés ou non de DNOC) et des inoculums bactériens sur la microplaque est déterminée par randomisation. Chaque puits contenant 300µl de milieu liquide est inoculé avec 10µl de chaque suspension bactérienne préalablement ajustée. Chaque traitement est répété quatre fois. Pour chaque milieu, un témoin non inoculé est réalisé afin de vérifier l'absence de contaminations. Les plaques de microtitration sont incubées à 28°C et agitées en continu. La lecture de l'absorbance est faite à 620 nm toutes les heures pendant 48 heures. Les valeurs d'absorbance sont traitées par un programme établi sous le logiciel Microsoft Excel qui permet dans un premier temps, de regrouper automatiquement les puits correspondant à une même souche et un même traitement, et dans un deuxième temps, de tracer sur un même graphe la courbe de croissance obtenue en présence et en absence du pesticide testé.

Après avoir tracé les différentes courbes de croissance, nous en avons retenu une quinzaine, qui nous ont semblé représenter les différents types de réponses obtenues et nous avons ajusté un modèle de croissance pour estimer l'effet du DNOC au travers des paramètres de croissance des différents souches sélectionnées. Nous avons choisi le modèle de croissance de GOMPERTZ en raison de sa flexibilité : il peut en effet décrire une courbe de croissance avec ou sans phase de latence initiale :

$$c_{\mu} = p_1 e^{-e^{-\frac{p_2 - t}{p_3}}} + p_4 t$$

avec $p_1 = p_3 \ln p_1 / c_{\mu}''$

dans laquelle p_1 représente la taille maximale de la population microbienne, p_2 l'abscisse du point d'inflexion, p_3 l'inverse du taux de croissance, p_4 la vitesse de mortalité, c_{μ} une

variable en relation avec la taille de la population microbienne et c_{μ}^0 la valeur de cette variable pour $t = 0$.

Les valeurs des paramètres ont été déterminées par régression non linéaire en utilisant le logiciel NL développé par le département de Biométrie (INRA), implanté dans la librairie STM (Becker *et al.*, 1988).

Par ailleurs, dans le but de classer les souches en fonction de leur comportement vis-à-vis du DNOC, une analyse factorielle de correspondance a été réalisée à partir des paramètres cinétiques, p_1 , p_2 et p_3 , calculés sur un échantillon représentatif des différentes cinétiques observées. Il s'agit d'un traitement statistique des données qui, comme l'analyse en composantes principales, permet de représenter et d'interpréter ces données dans un espace de dimension réduite à l'aide de variables explicatives indépendantes. Contrairement à l'A.C.P., l'A.F.C. n'établit pas de hiérarchie entre les lignes (individus) et les colonnes (variables) d'un tableau de données se présentant souvent comme un tableau de contingence. Le but de l'A.F.C. est d'établir des liens de dépendance, ou de correspondance, entre les deux ensembles de caractères. C'est une méthode essentiellement descriptive. Dans le cas qui nous intéresse ici, les données traitées sont constituées par l'ensemble des individus (souches bactériennes testées) et des variables (paramètres cinétiques).

D. RESULTATS-DISCUSSION

I. Caractérisation de la diversité bactérienne au sein de la population dégradant le 2,4-D

1. Isolement

L'isolement bactérien, effectué en présence de 2,4-D comme seule source de carbone et d'énergie, a conduit, lors du premier enrichissement, à sélectionner les souches dégradantes présentes dans 20 puits, et lors du deuxième enrichissement à en sélectionner 102. Parmi eux, les souches dégradantes de 42 puits ont été retenues aléatoirement.

Après étalement du contenu des puits sur boîtes de Pétri, les colonies sélectionnées en fonction de leurs différences morphologiques ont été testées pour leur aptitude à dégrader le 2,4-D par le test radioisotopique décrit précédemment. Sur l'ensemble des colonies testées, 60 colonies bactériennes isolées du sol sur leur capacité à dégrader le 2,4-D au niveau du Carbone 1 de la chaîne latérale se sont révélées être dégradantes.

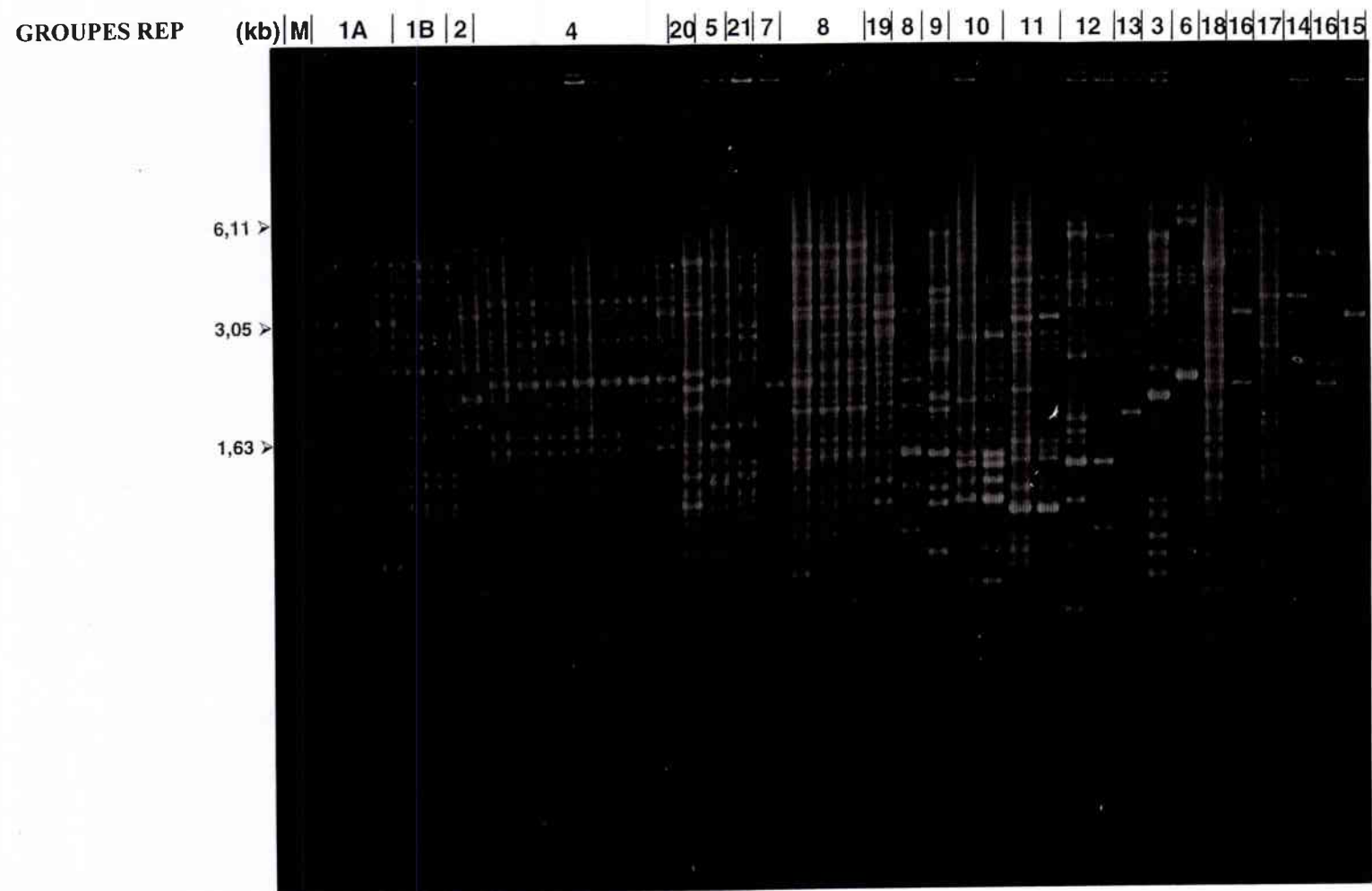


Figure I-3 : Profils et groupes REP des souches dégradant le 2,4-D isolées du sol de Dijon.
M : marqueur de poids moléculaire 1 kb, Gibco BRL.

2. Caractérisation du type Gram

Les résultats de la caractérisation phénotypique basée sur le caractère Gram sont reportés dans le tableau I-4. La majorité des souches sont Gram - alors que 9 seulement sont Gram +.

3. Caractérisation génotypique

a. Profil REP (Repetitive Extragenic Palindromic)

Nous avons ensuite réalisé des empreintes génétiques par PCR-REP pour l'ensemble des isolats. Les isolats ayant le même profil REP sont regroupés dans un même type REP. Les types REP présentant de nombreuses bandes majeures en commun ont été regroupés. Ainsi, nous avons pu identifier 46 types REP, qui ont été rassemblés en 22 groupes REP et qui sont présentés sur la figure I-3. Un des groupes REP, le groupe 4, est majoritaire et représente 25 % des souches isolées (figure I-4a).

b. Profil de restriction du gène de l'ADNr 16S

Etant donné que les souches appartenant à un même groupe REP peuvent être considérées comme des individus proches ou identiques d'une même espèce, des souches appartenant chacune à un groupe REP différent ont été analysés au niveau du gène de l'ADNr 16S dont le polymorphisme permet d'identifier les souches d'une même espèce ou d'espèces phylogénétiquement apparentées.

Des profils de restriction du gène de l'ADNr 16S ont été effectués sur 16 souches appartenant chacune à un groupe REP différent. Les produits d'amplification ont été digérés par sept enzymes de restriction. Pour chaque enzyme, le nombre de fragments de restriction varie de 2 à 8 selon les isolats. Les profils de restriction obtenus avec *Msp* I sont présentés figure I-5.

Chaque souche étudiée est caractérisée par un profil (de A à H) pour chacun des enzymes de restriction testés (tableau I-3). En comparant les profils obtenus avec les sept endonucléases de restriction, 10 génotypes ont été détectés parmi les 16 souches testées. Parmi elles, deux génotypes (1 et 3) sont dominants, représentant chacun 27 % des souches isolées (figure I-4b). Avec les sept enzymes testées, les profils obtenus sont identiques pour les souches C1, C10, C43, C53, C59 et C60 ou encore pour les souches C22 et C49, C12 et C52 (tableau I-3). Certains types REP possèdent un même type ADNr 16S. Ainsi, les types ADNr 16S dominants comprennent les groupes REP 1A, 1B, 11, 18, 21, 22 pour le 1 et 4 et 14 pour le 3 (figure I-4b). Ces souches d'un même génotype peuvent être considérées comme appartenant à une même espèce ou à une espèce phylogénétiquement apparentée. Les autres types REP sont associés chacun à un type ADNr 16S.

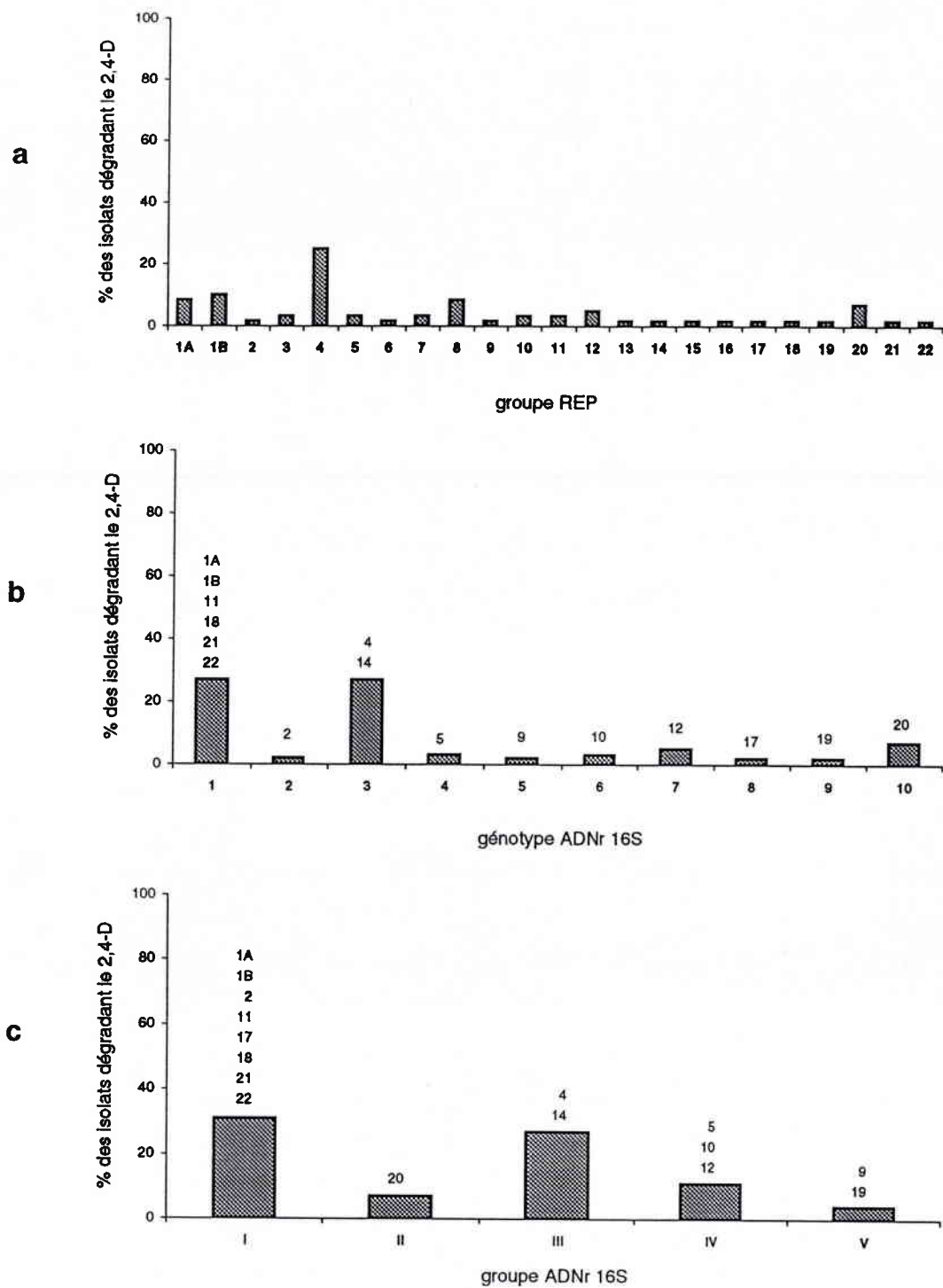


Figure I-4 : Distribution des groupes REP (a), des génotypes ADNr 16S (b) et des groupes ADNr 16S (c) au sein de la population dégradant le 2,4-D. Les chiffres notés au-dessus de chaque histogramme correspondent aux groupes REP.

Tableau I-3 : Profils de restriction du gène de l'ARN ribosomal 16S des souches dégradant le 2,4-D.

Souche	Profils de restriction du gène de l'ADNr 16S						
	<i>Msp</i> I	<i>Cfo</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Dde</i> I	<i>Nde</i> II
C1	A	A	A	A	A	A	A
C10	A	A	A	A	A	A	A
C12	A	A	A	D	D	H	A
C22	B	B	B	B	B	B	B
C30	C	C	C	C	F	F	C
C40	D	D	D	E	E	D	E
C42	E	C	C	C	C	C	D
C43	A	A	A	A	A	A	A
C47	C	C	C	C	C	C	E
C49	B	B	B	B	B	B	B
C52	A	A	A	D	D	H	A
C53	A	A	A	A	A	A	A
C54	F	F	F	E	E	D	E
C55	G	G	G	G	G	G	G
C59	A	A	A	A	A	A	A
C60	A	A	A	A	A	A	A

Pour un enzyme de restriction testé , les souches ayant le même profil sont caractérisées par la même lettre (de A à H).

Figure I-5 : Profils de restriction de l'ADNr 16S amplifié par PCR et digéré par *Msp* I.
Dans l'ordre de gauche à droite : marqueur de poids moléculaire (marqueur B VIII, Boehringer), C1, C10, C12, C22, C30, C40, C42, C43, C47, C49, C52, C53, C54, C55, C59, C60.

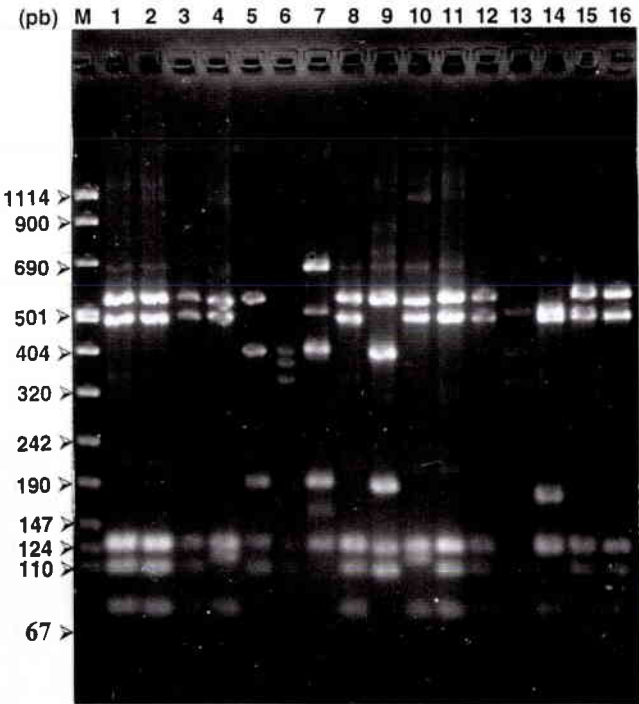
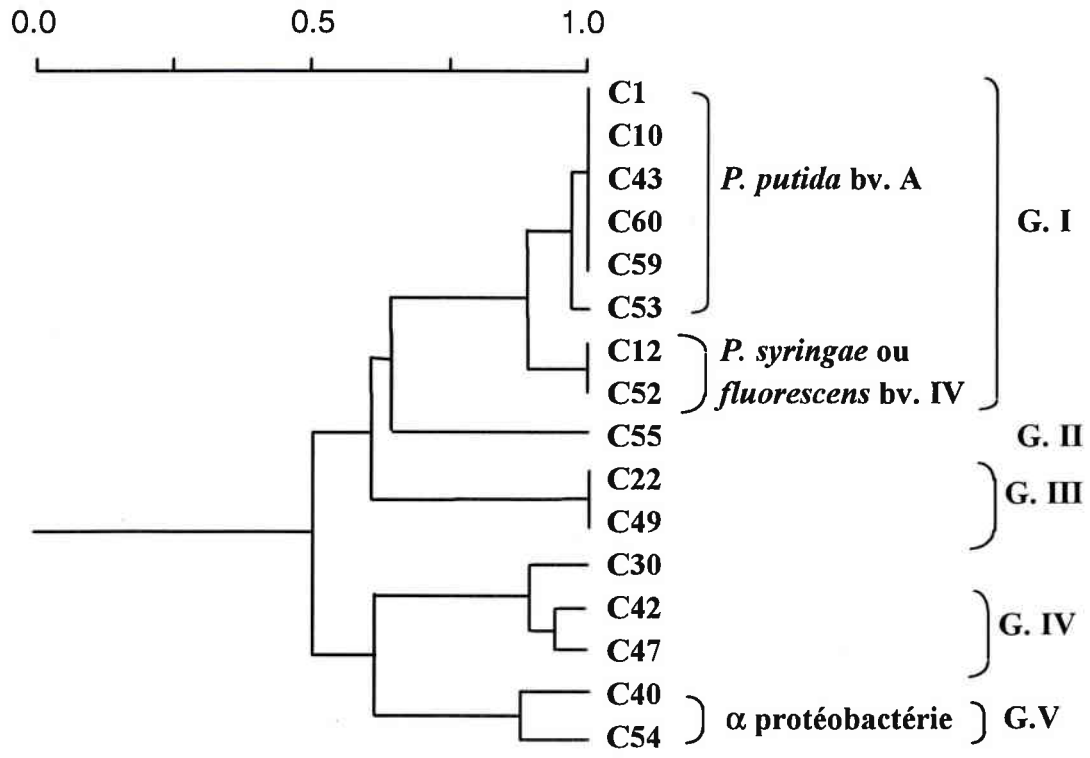


Tableau I-4 : Caractérisation génotypique et phénotypique des souches dégradant le 2,4-D.

Nbre d'isolats	Souche représentative du groupe REP	Type REP	Groupe REP	Groupe ADNr 16S	Gram	Identification bactérienne
5	C1	1	1A	1	-	<i>P. putida</i> bv. A
6	C10	6	1B	1	-	<i>P. putida</i> bv. A
2	C43	32	11	1	-	<i>P. putida</i> bv. A
1	C53	41	18	1	-	<i>P. putida</i> bv. A
1	C59	45	21	1	-	<i>P. putida</i> bv. A
1	C60	46	22	1	-	<i>P. putida</i> bv. A
1	C12	8	2	1	-	<i>P. syringae</i> ou
1	C52	40	17	1	-	<i>P. fluorescens</i> bv. IV
4	C55	43	20	2	-	ni
15	C22	17	4	3	-	ni
1	C49	37	14	3	-	ni
5	C30	21	5	4	+	ni
2	C42	31	10	4	+	ni
2	C47	35	12	4	+	ni
2	C40	29	9	5	-	α protéobactérie
1	C54	42	19	5	-	α protéobactérie
1	C32	23	6	nd	nd	ni
2	C33	24	7	nd	nd	ni
5	C35	25	8	nd	nd	ni
1	C48	36	13	nd	nd	ni
1	C50	38	15	nd	nd	ni
1	C51	39	16	nd	nd	ni

ni : non identifié
nd : non déterminé
bv. : biovar

Figure I-6 : Dendrogramme UPGMA obtenu à partir de la matrice de similarité calculée à partir de l'analyse du RFLP du gène de l'ARNr 16S des souches dégradant le 2,4-D.
Corrélation cophénétique : $r = 0,98$.



L'arbre phylogénétique, construit à partir de la matrice de similarité, a permis de distinguer cinq groupes qui sont présentés sur la figure I-6 et dans le tableau I-4. Parmi eux, deux groupes, renfermant des souches Gram-, sont dominants (groupe ADNr 16S I et III).

Le groupe 1 renferme des souches (C1, C10, C12, C43, C29, C53, C59, C60) dont deux (C12 et C52) sont caractérisées par un type ADNr 16S différent de celui de l'ensemble des souches du groupe considéré. Ces dernières font vraisemblablement parties du même genre bactérien mais pourraient appartenir à des espèces différentes. La comparaison des profils de restriction de ces souches par rapport à ceux de souches de référence de *Pseudomonas* a permis de confirmer cette hypothèse en les identifiant comme faisant partie de deux espèces différentes : espèce *P. putida* biovar A pour les premières et espèce *P. syringae* ou *P. fluorescens* biovar IV pour les souches C12 et C52.

Le groupe 3 est constitué par seize isolats (tableau I-4) appartenant probablement à la même espèce ou à des espèces phylogénétiquement proches (type ADNr 16S identique), dont quinze peuvent être considérées comme des souches proches ou identiques d'une même espèce (même type REP) et qui présentent la particularité d'être dominantes dans le sol de Dijon.

Les souches représentatives du groupe 5 (C40 et C54) ont pu être classées comme appartenant à des genres ou des espèces phylogénétiquement proche des *Rhizobiaceae*, qui sont des α protéobactéries, comme le montre l'un des 100 arbres phylogénétiques (tous quasi identiques) obtenus par analyse de parcimonie sur la base des variations existant entre les sites de restriction du gène de l'ARNr 16S (figure I-7).

Le groupe 4, quant à lui, regroupe des souches gram +, appartenant probablement à un même genre bactérien mais à des espèces différentes (types ADNr 16S différent).

II. Etude du comportement des souches bactériennes vis à vis du DNOC

Au vu des différents comportements des souches testées, un classement tenant compte des différentes formes de courbes de croissance en présence de différentes concentrations en DNOC a été établi (tableau I-5 et figure I-8). Sur un échantillonnage représentatif de quatorze souches répondant aux différents types de courbes observées, nous avons ensuite calculé par régression non linéaire les paramètres cinétiques p_1 , p_2 et p_3 , dont les valeurs (Annexe VI) ont servi de données à l'A.F.C..

Les résultats de l'A.F.C. sont donnés en annexe IX-A. Ils ont été calculés à partir du tableau de contingence constitué de 14 lignes et 9 colonnes dont les lignes et les colonnes correspondent respectivement aux souches testées et aux paramètres cinétiques p_1 , p_2 et p_3 des courbes témoins et traitées au DNOC à 50 et 250 mg l⁻¹.

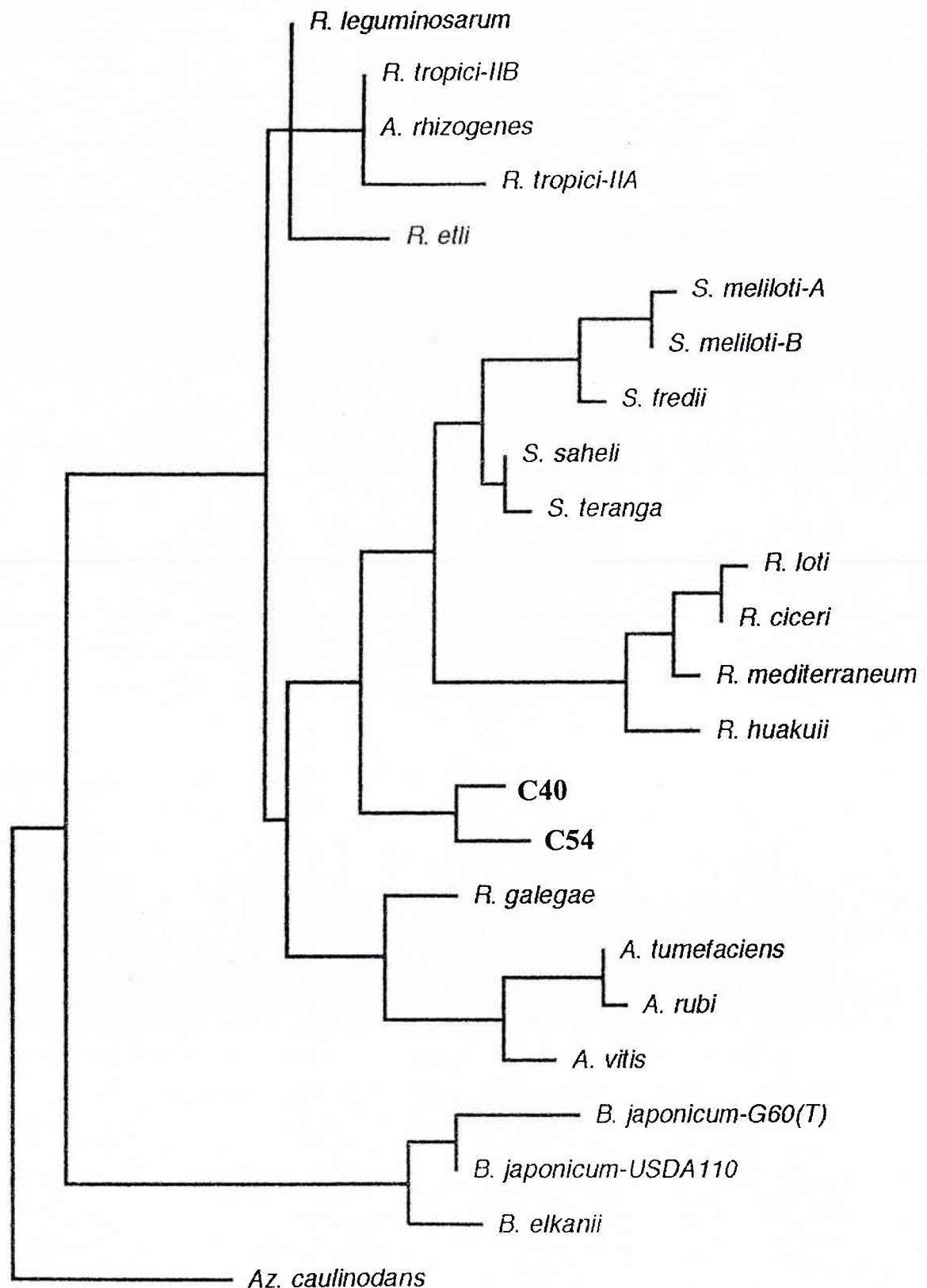


Figure I-7 : Arbre phylogénétique construit par analyse de parcimonie estimant les relations entre des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* (α protéobactéries) et les souches dégradant le 2,4-D, C40 et C54, sur la base des variations entre les sites de restriction de l'ADNr 16S.

R. : *Rhizobium*
S. : *Sinorhizobium*
A. : *Agrobacterium*
B. : *Bradyrhizobium*
Az. : *Azorhizobium*

Les trois premiers axes contribuent à 94,1 % de l'inertie totale. Nous nous sommes limités à une représentation dans un espace à deux dimensions compte-tenu du fait que le 3^{ème} axe n'explique que 4,8 % de la variabilité totale.

De l'examen des coordonnées des variables sur les premiers axes factoriels (figure I-9), il paraît a priori difficile d'attribuer à chacun des axes une signification précise même si leur contribution relative à expliquer la variation de certaines variables peut parfois être importante. Ainsi, l'axe 2 contribue pour près de 63 % à l'inertie liée à la variable $2p_3$. Pour aucun des trois axes, on ne trouve de liaison bien nette avec l'un des paramètres cinétiques ou avec un traitement herbicide. La représentation des différentes variables dans le plan principal ne fait pas apparaître de tendances qui pourraient laisser supposer une quelconque liaison entre la valeur d'un paramètre cinétique et la concentration en biocide. Malgré tout, la position des différentes souches dans le premier plan principal (figure I-9) conduit à distinguer quatre groupes microbiens qui permettent d'interpréter l'axe 2 en terme de sensibilité et l'axe 1 en terme de réversibilité de l'effet observé sur la croissance. Ainsi, la souche *S. meliloti*, sensible dès la faible dose de DNOC, apparaît isolée dans le plan et nettement séparée selon l'axe 2 de l'ensemble des autres souches pour lesquelles la toxicité ne se manifeste pas ou seulement à la dose la plus élevée. L'axe 2 oppose les espèces des groupes 2 et 3, pour lesquelles un retard de croissance s'accumule, puis se stabilise à celles des groupes 4, 4a et 4b qui parviennent à surmonter l'inhibition initiale de croissance. Cette phase de latence pourrait correspondre à une période d'adaptation de la souche au produit ou à la sélection d'un mutant résistant au DNOC qui se développerait plus rapidement que la souche initiale en raison d'un taux de croissance plus élevé.

Il est intéressant de constater que les souches C40 et C54 identifiées comme proche de la famille des *Rhizobiaceae* présentent le même comportement que la souche d'*Agrobacterium* testée dont la sensibilité aux pesticides a déjà été observé antérieurement notamment par Moorman *et al.* (1986).

Les souches de la collection de *Pseudomonas* et celles dégradant le 2,4-D (C1, C10, C43, C53, C59, C12, C52) identifiées comme appartenant à ce même genre bactérien sont relativement insensibles, aucun retard de croissance n'étant détecté quelle que soit la dose appliquée. Cette résistance, caractéristique des *Pseudomonas*, peut s'expliquer par la nature de leur paroi très complexe constituée de trois couches superposées à partir de la membrane plasmique : l'espace périplasmique, le peptidoglycane et la membrane externe. Cette membrane est constituée de phospholipides, de lipopolysaccharides et de protéines qui s'organisent de façon à ce que les parties hydrophobes des lipides soient orientées vers la face interne de la membrane et les groupements hydrophiles contenant des sites anioniques (groupements phosphates et groupements carboxyliques) soient disposés sur la face externe. Ces derniers constituent la partie réactive de la membrane externe vis-à-vis des substances

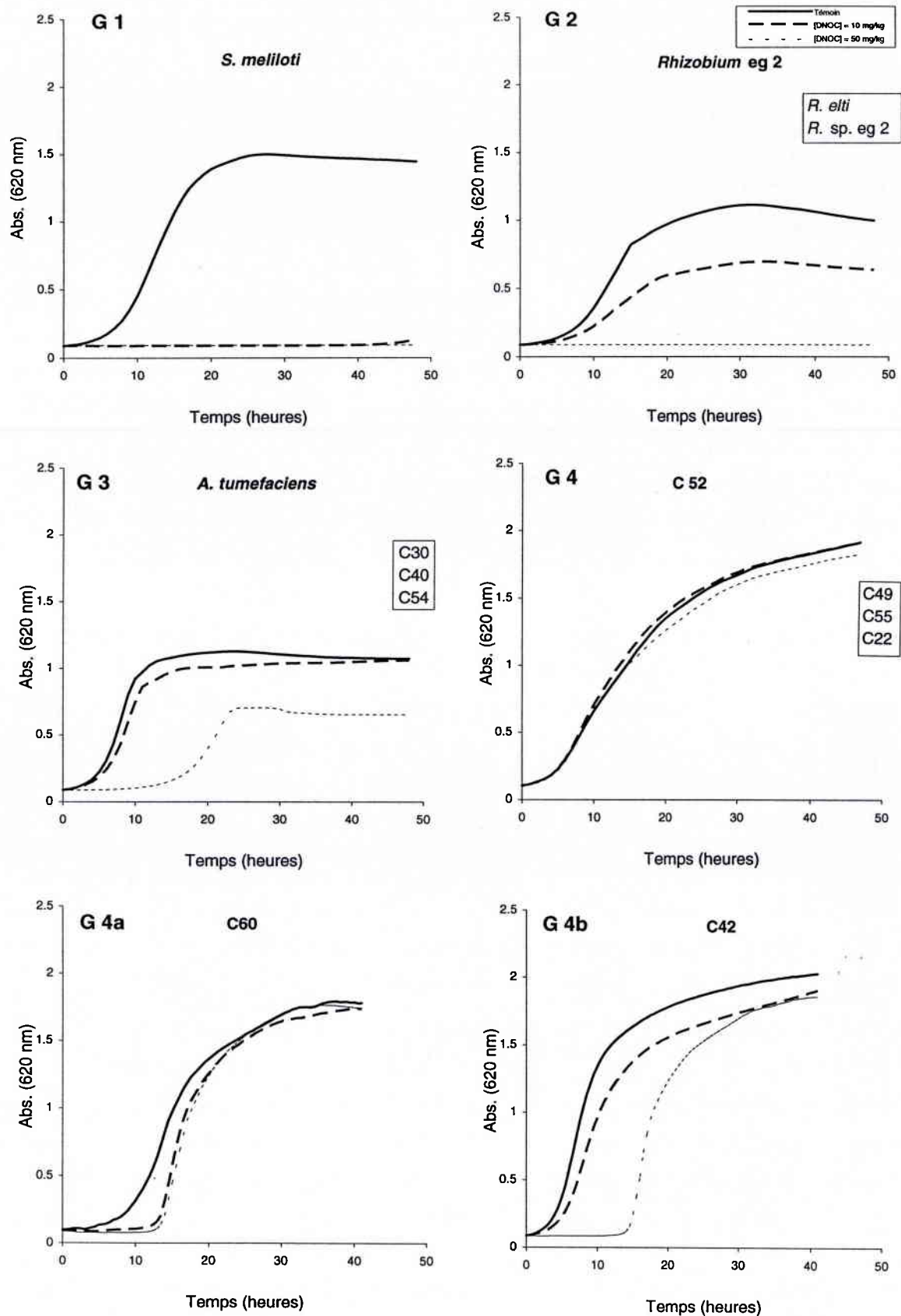


Figure I-8 : Différents types de courbes de croissance obtenus en présence de différentes concentrations en DNOC.

Les souches encadrées correspondent à celles qui ont été utilisées pour l'A.F.C..

tableau I-5 : Types de comportements vis-à-vis du DNOC.

GROUPE DNOC	EFFET DU DNOC (mg l⁻¹)	
	50	250
1	++++	++++
2	+++	++++
3	+	+++
4	-	-
4a	l	l
4b	-	l

degré de toxicité du DNOC :

- l** : présence d'une phase de latence
- ++++** : inhibition de croissance totale
- +++** : inhibition de croissance moyenne
- +** : inhibition de croissance faible
- : inhibition de croissance nulle

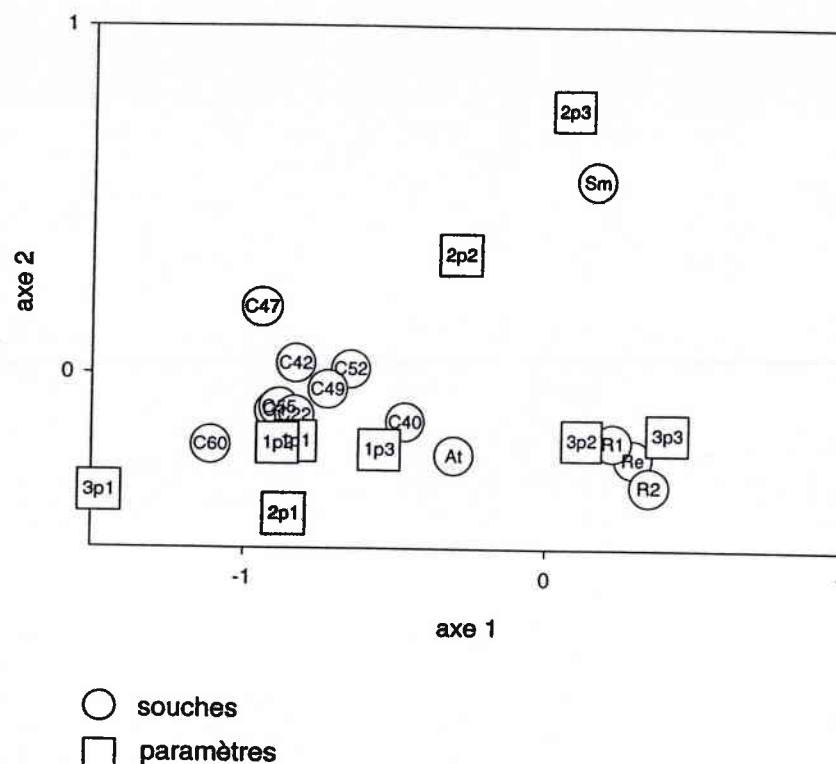


Figure I-9 : Classification des souches testées dans le premier plan factoriel.
 Sm, R1, R2 et At correspondent respectivement à *S. meliloti*, *R. sp. eg 1*, *R. sp. eg 2*, *R. elti* et *A. tumefaciens*.
 p1, p2 et p3 représentent respectivement le plateau, l'abscisse du point d'inflexion et l'inverse du taux de croissance de chaque courbe précédé par le chiffre 1, 2, 3 correspondant respectivement aux paramètres cinétiques des courbes du témoin, du traité au DNOC à 50 et 250 mg l⁻¹.

toxiques. Cette membrane joue ainsi un rôle de protection physique tendant à limiter la pénétration des xénobiotiques dans le milieu intracellulaire (Beveridge et Koval, 1981; Hoyle et Beveridge, 1983).

Nous avons regroupé dans le tableau I-6 l'ensemble des résultats concernant les différents types de regroupements effectués selon des critères génétiques (partie droite du tableau) et des caractéristiques comportementales en présence de DNOC (partie gauche du tableau). On s'aperçoit qu'à une exception près, la souche C13 non identifiée, toutes les souches du genre *Pseudomonas* et celles dégradant le 2,4-D sont relativement tolérantes au DNOC, au moins dans les conditions de notre étude. On peut également constater que la diversité d'appartenance spécifique des souches dégradant le 2,4-D se traduit par une certaine diversité de réponse puisqu'on retrouve des souches dégradant le 2,4-D dans tous les groupes de sensibilité excepté le groupe 2. Le caractère Gram ne semble pas un critère déterminant. C'est dans le groupe des *Rhizobium* que l'on trouve la plus grande proportion de souches sensibles. Toute conclusion relative à une sensibilité particulière de ce genre microbien aux métaux lourds (Hirsch *et al.*, 1993) ou aux pesticides (Moorman, 1986) serait cependant prématurée. Seule une analyse portant sur un nombre d'individus plus important permettrait de confirmer cette hypothèse. Ceci illustre une faiblesse de la démarche adoptée qui, pour être efficace, demanderait le traitement d'un nombre beaucoup plus important de souches microbiennes, ce qui alourdirait considérablement la charge expérimentale. D'autres approches nous semblent devoir être privilégiées.

E. CONCLUSION

Dans cette première partie, nous avons choisi trois groupes microbiens caractérisés par des complexités génétiques pour étudier l'influence du DNOC sur les dynamiques de croissance de souches pures de micro-organismes. Parmi les trois groupes retenus, deux ont une définition taxonomique, les *Rhizobium* et les *Pseudomonas* alors que le troisième a une définition fonctionnelle; il s'agit des micro-organismes dégradant le 2,4-D. Une pré-étude concernant ce groupe microbien qu'il nous a fallu rassembler, nous a confirmé la grande variété des espèces qu'il rassemble puisque pour un total de 16 souches appartenant à des groupes REP différents, on peut repérer 10 génotypes différents. Deux d'entre eux sont dominants et dans certains groupes on retrouve une forte proportion de micro-organismes apparentés aux *Pseudomonas*, confirmant une nouvelle fois la diversité des aptitudes métaboliques de ce genre microbien. Compte-tenu de l'inégalité de tailles des groupes retenus, il serait prématuré de donner un sens écologique général aux différences de sensibilité qu'ils manifestent par des aptitudes différentes à se développer en présence de DNOC.

Tableau I-6 : Effet du DNOC sur les souches microbiennes du sol en relation avec leur classification.

Groupe ^a DNOC	Nbre d'isolats	Souche ^b type	identification	Gram	Groupe ADNr 16S	Groupe REP
<u>Collection de <i>Rhizobium</i></u>						
1	1	ATCC 9930	<i>S. meliloti</i>	-		
1	1	USDA 2071	<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii	-		
1	1	ATCC 43677	<i>R. galegae</i>	-		
1	1	CCBAU 2609	<i>R. huakuii</i>	-		
2	1	CFN 42	<i>R. elti</i>	-		
2	1	R602 sp	<i>R. sp. eg 1</i>	-		
2	1	PhD12	<i>R. sp. eg 2</i>	-		
2	1	CFN 299	<i>R. tropici</i> type II A	-		
2	1	ATCC 100004	<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae	-		
3	1	C58	<i>A. tumefaciens</i>	-		
<u>Collection de <i>Pseudomonas</i></u>						
4	19	Trp 522	<i>P. fluorescens</i> bv. 3	-		
4	10	TR 133	<i>P. fluorescens</i> bv.2	-		
4	22	LR 223	<i>P. putida</i> bv. A	-		
4	4	Lrp 414	<i>P. intermédiaire</i>	-		
<u>Souches dégradant le 2,4-D</u>						
1	2	C13	ni	nd	nd	3
3	1	C40	α protéobactérie	-	5	9
3	1	C54	α protéobactérie	-	5	19
3	2	C30	ni	+	4	5
4	1	C52	<i>P. syringae</i> ou	-	1	17
4	1	C12	<i>P. fluorescens</i> bv. IV	-	1	2
4	5	C1	<i>P. putida</i> bv. A	-	1	1A
4	6	C10	<i>P. putida</i> bv. A	-	1	1B
4	2	C43	<i>P. putida</i> bv. A	-	1	11
4	1	C53	<i>P. putida</i> bv. A	-	1	18
4	1	C59	<i>P. putida</i> bv. A	-	1	21
4	1	C32	ni	nd	nd	6
4	2	C33	ni	nd	nd	7
4	5	C35	ni	nd	nd	8
4	1	C48	ni	nd	nd	13
4	1	C50	ni	nd	nd	15
4	1	C51	ni	nd	nd	16
4	1	C49	ni	-	3	14
4	15	C22	ni	-	3	4
4	4	C55	ni	-	2	20
4a	1	C60	<i>P. putida</i> bv. A	-	1	22
4b	2	C42	ni	+	4	10
4b	3	C47	ni	+	4	12

^a : groupe défini par l'AFC.

^b : souches de références décrites dans le tableau I-1 et I-2 et souches isolées du sol de Dijon.

ni : non identifié

nd : non déterminé

Plutôt que d'entrer dans le détail d'une hypothétique relation entre la complexité génétique d'un groupe microbien et sa "rusticité écologique", nous avons préféré considérer les résultats d'un point de vue plus global en essayant de relier les caractéristiques de croissance, appréciées au travers des paramètres biocinétiques, à la présence de DNOC. En fait, et peut-être encore en raison d'un nombre de cas examinés trop faible, nous n'avons pas pu déterminer lequel de ces paramètres biocinétiques est le meilleur indicateur d'impact. Le seul résultat probant que nous ayons obtenu concerne la relative diversité des réponses obtenues avec les souches dégradant le 2,4-D. Ceci laisse penser que dans le sol la communauté dégradante est sujette à des modifications importantes de composition dont on peut attendre des conséquences au niveau fonctionnel. Ce sera l'objet des chapitres ultérieurs de démontrer que les observations réalisées à partir de souches pures dans des conditions de laboratoire peuvent, dans certains cas et sous certaines conditions, fournir des éléments d'appréciation d'une situation abordée dans un cadre plus naturel. Malgré tout, ce travail confirme que sans un investissement expérimental important, portant notamment sur une extrême diversification du matériel biologique à tester, cette approche reste toujours relativement décevante.

CHAPITRE II

IMPACT DU DNOC

SUR LA DIVERSITE DE LA MICROFLORE

BACTERIENNE DU SOL

CHAPITRE II

IMPACT DU DNOC SUR LA DIVERSITE DE LA MICROFLORE BACTERIENNE DU SOL

A. INTRODUCTION

Etudier l'effet d'un biocide sur des souches pures permet de détecter les souches présentant une sensibilité vis-à-vis d'un xénobiotique, mais ne reflète pas ce qui se déroule réellement dans le milieu naturel, où existent non seulement une très grande diversité spécifique, mais probablement aussi des mécanismes physiques, physico-chimiques et biologiques de protection. Aussi, est-il nécessaire de s'intéresser à ce qui se passe *in situ*.

Par rapport à l'objectif que nous nous sommes fixé, qui est d'étudier l'impact d'un biocide sur la biocénose, on peut classer en trois catégories les techniques d'évaluation d'un effet :

- celles qui n'autorisent qu'une approche qualitative de la modification d'une empreinte biochimique et génétique d'une communauté (même si des moyens mathématiques statistiques peuvent être mis en oeuvre pour étayer la signification des effets observés). Les modifications "spectrales" détectées ne permettent aucune inférence quant aux réajustements spécifiques qui les sous-tendent. Ces techniques peuvent au mieux servir de base à l'élaboration de tests.

- celles, plus analytiques, qui autorisent une description à l'aide d'indices quantitatifs directement reliés au nombre d'espèces constitutives de la communauté. La détermination de la richesse spécifique peut être obtenue, soit à partir des techniques culturales, soit par des techniques telles que la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ou électrophorèse en gel de gradient dénaturant) (Muyzer *et al.*, 1993) appliquée à un extrait d'ADN de sol. Bien que nécessaire, cette donnée n'est pas toujours suffisante. L'impact d'un biocide sur les populations microbiennes naturelles se manifeste probablement autant par une modification de l'ordre d'abondance des espèces indigènes que par la disparition pure et simple de certaines d'entre elles.

- celles, qui autorisent une description combinée en terme de richesse et de distribution fréquentielle spécifiques. Pour l'instant, seules les méthodes de cultures, qui permettent d'isoler les espèces individuelles sur milieu solide, permettent d'atteindre cet objectif. Elles se heurtent à un faible rendement de la procédure d'isolement (10 % au maximum de la population totale) qui peut faire douter de la représentativité de l'échantillon des bactéries cultivables par rapport à l'ensemble de la population microbienne d'un sol. La lourdeur de

l'approche expérimentale trouve sa justification dans une appréciation plus analytique des effets observés. Les comparaisons nécessaires à leur mise en évidence font appel à des critères objectifs différents qui peuvent être les paramètres des lois de distribution des espèces recensées dans les différents traitements ou des indices synthétiques globaux tenant compte des caractéristiques de richesse et de distribution. L'un de ceux-ci, l'indice de Shannon-Weaver, a été utilisé par Atlas (1991) pour détecter les conséquences que peut provoquer un herbicide, le 2,4,5-T, sur la diversité et l'organisation naturelle de la communauté microbienne du sol. Ceci se traduit généralement par une diminution de diversité qui reflète, dans certain cas, la toxicité des polluants et la survie exclusive des espèces tolérantes, dans d'autres cas, la dominance de micro-organismes physiologiques spécialisés.

L'objectif de la présente étude est de déterminer l'impact d'un herbicide, le DNOC, sur la qualité biologique d'un sol appréciée à partir de l'étude de l'abondance et la diversité spécifiques de la communauté microbienne qu'il abrite, en s'intéressant d'une part à l'ensemble des bactéries cultivables sur milieu non sélectif, d'autre part à un groupe physiologique plus restreint, mais néanmoins suffisamment diversifié taxonomiquement pour envisager de le considérer comme une possible communauté indicatrice. La biodiversité a été évaluée sur des critères phénotypiques (critère du Gram, morphologie, tests biochimiques) et génétiques (polymorphisme des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S), ceci à trois niveaux d'interprétation. En effet, nous avons d'abord simplement recensé, après différentes périodes d'incubation, différentes unités taxonomiques définies selon différents critères. Ensuite, l'étude de la distribution de ces unités taxonomiques nous a permis d'obtenir une image plus détaillée des réajustements microbiens induits par la présence de DNOC. Enfin, une analyse factorielle de correspondance nous a permis de comparer les trajectoires évolutives des communautés microbiennes dans un espace référencé par rapport au temps de contact et à la dose d'apport de l'herbicide.

B. MATERIEL ET METHODES

I. Le sol est les produits

1. le sol

Le sol provient d'un site expérimental situé sur le domaine de l'abbaye de Cîteaux dans la plaine de la Saône (Côte d'Or). Il s'agit d'un sol limono-argileux dont les caractéristiques sont présentées en annexe I.

Le sol a été prélevé en surface (horizon 0-20 cm). La teneur en eau ne permettant pas un tamisage immédiat, le sol a été étalé en serre pour un séchage à l'air jusqu'à ce que l'humidité atteigne 60 % de l'humidité équivalente, soit une teneur en eau de 15 % par rapport au sol sec.

Le sol a été alors tamisé et la fraction de sol retenue a concerné les agrégats, dont la taille était comprise entre 2 et 3 mm. Le sol ainsi obtenu a été conservé à 4°C avant d'être utilisé.

2. Les substances xénobiotiques

Lors de cette expérimentation, nous avons étudié l'effet de deux produits phytosanitaires différents, le DNOC (4,6-dinitro-*o*-crésol) et le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) dont les caractéristiques physiques et chimiques sont données en annexe II-a.

3. Autres produits

Ils seront signalés et leurs caractéristiques seront données dans chaque partie expérimentale pour les besoins de laquelle ils ont été utilisés.

II. Traitement initial du sol

Le sol a été traité au DNOC aux concentrations de 15, 30 et 50 mg kg⁻¹ et au 2,4-D à la concentration de 50 mg kg⁻¹ (exprimées par rapport au sol sec). Les pesticides, sous forme de poudre, ont été dissouts dans de l'éthanol à 96 %. 250 µl de la solution éthanolique ont été mélangés à 1g de sol séché à 105°C après broyage et tamisage à 100 µm. Après évaporation de l'éthanol à 28°C pendant 4 heures, cette portion de sol traité a été mélangée à 49 g d'agrégats de sol dont l'humidité a été ajustée à 120 % de la capacité de rétention (C.R. = 18,5 %). Un échantillon témoin, ne recevant pas de pesticide, a été préparé dans des conditions identiques. Les échantillons de sol traités ou non ont été incubés à 20°C dans des fioles en verre de 500 ml dont l'ouverture périodique a permis de maintenir de bonnes conditions d'aération du sol. Pour chaque traitement, des prélèvements de sol ont été réalisés après 7, 16 et 62 jours de contact avec le pesticide.

III. Dénombrement des micro-organismes du sol

1. Préparation de la suspension de sol

a. Principe

Le sol constitue un milieu solide hétérogène dans lequel les micro-organismes sont présents soit sous forme libre, soit sous forme liée aux particules du sol. Une étape de dispersion s'avère nécessaire pour séparer les micro-organismes de la partie organo-minérale du sol et augmenter la proportion des micro-organismes présents à l'état libre dans la solution du sol. Le principe de cette dispersion repose sur le remplacement des ions calcium présents à la surface des colloïdes et des bactéries, par des ions sodium portés sur une résine échangeuse d'ions sous forme sodique (Mac Donald, 1986). La monovalence du sodium ainsi que sa forte hydratation tendent à maintenir plus éloignées les surfaces chargées et ainsi à augmenter la contribution des forces de répulsion au détriment des forces d'attraction de type "London",

dont le rôle est prépondérant à faible distance. Il en résulte une dispersion des argiles et des associations argiles / micro-organismes.

b. Protocole expérimental

Dans des tubes à centrifuger de 35 ml, ont été introduit 4 g de résine échangeuse d'ions Amberlite IRC-76 (Sigma) sous forme sodique, 5 g de billes de verre stériles (1mm de diamètre), 20 ml de solution de dispersion (2,5 % de polyéthylène glycol 6000 (Prolabo), 1 % de tween 80 (Prolabo)) et 10 g de sol. Les tubes ont été placés sur un agitateur mécanique rotatif pendant 1 heure à 4°C. La suspension ainsi obtenue a constitué la dilution 10^0 .

2. Les communautés microbiennes échantillonnées

Nous avons examiné les effets biologiques du DNOC et du 2,4-D sur deux communautés microbiennes : la communauté des bactéries cultivables sur milieu non sélectif et celle des bactéries se développant sur un milieu dans lequel le 2,4-D constitue la principale source de carbone et d'énergie. La raison de ce deuxième choix tient à la diversité spécifique de cette communauté qui pourrait, de ce fait, être considérée comme une communauté indicatrice simplifiée, donc plus accessible, comparée à l'ensemble des bactéries totales cultivables et à laquelle une fonction mesurable peut être attachée.

a. Les milieux de culture

La composition détaillée des différents milieux est donnée en annexe III. Le milieu Nutrient Agar (NA) dilué au $1/10^{\text{ème}}$ et le milieu à base d'extrait de sol (ES), dont la teneur en carbone organique est de 350 mg l^{-1} , ont été employés pour le dénombrement de la microflore totale. Ce sont des milieux complets qui permettent la croissance de micro-organismes phylogénétiquement diversifiés. Le deuxième milieu, le milieu à l'extrait de sol, a été choisi pour obtenir une variabilité de substrats carbonés plus en rapport avec celle qui existe dans le sol.

La communauté microbienne dégradant le 2,4-D a été estimée sur milieu dans lequel le 2,4-D, à la concentration de 200 mg l^{-1} , est la principale source de carbone et d'énergie. On devrait donc isoler des micro-organismes dégradant le 2,4-D.

Le milieu TY, à base de bactotryptone et d'extrait de levure (annexe III), a été utilisé pour la culture en milieu liquide des différentes souches isolées avant cryoconservation.

Tous ces milieux ont été autoclavés à 120°C pendant 20 minutes, puis additionnés d'une solution d'antifongique, le cycloheximide ou actidione, à une concentration de $0,5 \text{ g l}^{-1}$ (d'eau déminéralisée), préalablement stérilisée par filtration sur filtre Millipore (diamètre des pores = $0,2 \mu\text{m}$). Ces milieux (solides) ont été alors répartis, à raison de 20 ml, en boîte de Pétri.

b. Etalements et dilutions

Les suspensions-dilutions de sol ont été réalisées par dilution de 1 ml de la dilution (n-1) dans 9 ml de liquide de Ringer dilué au $\frac{1}{4}$, puis répartis en tubes de 20 ml. La solution de Ringer (Ramsay, 1984) contient 2,25 g l⁻¹ de NaCl, 0,105 g l⁻¹ de CaCl₂ et 0,12 g l⁻¹ de NaHCO₃. 100 µl des dilutions 10⁻³, 10⁻⁴ et 10⁻⁵ ont été étalés sur les différents milieux de culture solide en boîte de Pétri, à raison de cinq répétitions par dilution. A l'occasion de chaque prélèvement de sol, les dénombrements sont réalisés après 7, 16 et 28 jours pour permettre l'apparition et la prise en compte des colonies correspondant à des organismes à croissance lente. La taille de la microflore totale ou celle de la microflore poussant sur milieu 2,4-D a été exprimée en Unités Formant des Colonies (U.F.C.) rapportée au poids de matière sèche de sol.

IV. Evaluation de la diversité de la microflore du sol

1. Les communautés bactériennes échantillonnées

Lors de chaque prélèvement de sol, soit 7, 16 et 62 jours après apport des deux herbicides, nous avons isolé 30 colonies par traitement et par milieu, soit un total de 540 souches. Elles ont été prélevées aléatoirement, à l'aide d'un cure-dent en bois stérile, à partir des boîtes correspondant à la dilution qui permet d'obtenir de 100 à 300 colonies par boîte (soit la dilution 10⁻⁴).

Les bactéries appartenant à la microflore totale et celles appartenant à la microflore se développant sur milieu 2,4-D ont été purifiées par plusieurs repiquages successifs respectivement sur milieu NA (dilué au 1/10) et sur milieu 2,4-D. Au terme de la purification, les différentes souches ont été conservées sur boîte à + 4°C. Pour une conservation de longue durée, les souches ont été mises en culture sous agitation à 28°C en milieu TY liquide ou en milieu 2,4-D pour les souches appartenant respectivement à la microflore totale ou à celle dégradant le 2,4-D. 500 µl de la suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance ont été placés dans des tubes de cryoconservation et additionnés de 600 µl de solution de glycérol à 25 %. Le mélange a été homogénéisé au vortex (Bioblock, TOP-MIX 94323). Les tubes ont été congelés à - 80°C. Les lots de souches isolées à partir des différents traitements et après différentes périodes d'exposition aux herbicides seront repérés par la suite par une lettre, soit A, B, D et E respectivement pour les sols témoins ou traités au DNOC à 15 mg kg⁻¹, 50 mg kg⁻¹ et au 2,4-D à 50 mg kg⁻¹, suivie d'un chiffre, soit 1, 2 ou 3, pour les prélèvements après 7, 16 et 62 jours d'incubation (tableau II-1). Des souches de référence, choisies en fonction de leur appartenance à des genres différents (tableau II-2), ont été incluses dans notre étude pour tenter une identification ou au moins déterminer une appartenance générique des souches isolées.

Tableau II-1 : Repérage des lots de souches isolées à partir des différents traitements de sol (lettre) et des temps de prélèvement (chiffre).

	T ₁ = 7 jours	T ₂ = 16 jours	T ₃ = 62 jours
<u>sol témoin</u>	A1	A2	A3
<u>sol traité au DNOC</u>			
15 mg.kg ⁻¹ sol sec	B1	B2	B3
50 mg. kg ⁻¹ sol sec	D1	D2	D3
<u>sol traité au 2,4-D</u>			
50 mg. kg ⁻¹ sol sec	E1	E2	E3

Tableau II-2 : Origine des souches de références.

ESPECE	ORIGINE
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	MSDJ G49
<i>Bacillus cereus</i>	MSDJ C24
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	MSDJ C2
<i>Alcaligenes piechandiu</i>	MSDJ C9
<i>Pseudomonas putida</i>	CFBP 2066
<i>Rhizobium meliloti</i>	ATCC 9930
<i>Rhizobium meliloti</i>	SU 47
<i>Pseudomonas syringae</i>	CFBP 2213
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CFBP 2202
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	CFBP 2443
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	MSDJ C58
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae	MSDJ 8401
<i>Arthrobacter globiformis</i>	MSDJ A2
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	MSDJ A8
<i>Rhizobium fredii</i>	USDA 205
<i>Pseudomonas palleroni</i>	CFBP 2445

ATCC : American Type Culture Collection, Rockeville MD USA.

LMG : Laboratorium voor microbiologie de Ghent, Belgium.

CFBP : Laboratoire de bactéries phytopathogènes (INRA); Angers.

SU 47 : Laboratoire de biologie moléculaire des relations plantes microorganismes (CNRS-INRA), Castanet-Tolosan.

MSDJ : Laboratoire de Microbiologie des Sols (INRA), Dijon.

USDA : *Rhizobium* Culture Collection, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Md.

2. Caractérisation de la diversité phénotypique

Les souches bactériennes ont été repérées par l'étude de certains caractères morphologiques et physiologiques tels que :

- l'aspect des colonies (taille, couleur, aspect de la surface, aspect des bords, opacité) étudié sur des cultures de 48 heures (ou plus selon la bactérie) en milieu NA dilué au 1/10.
- la réaction de Gram réalisée selon la méthode de Manifi and Kneifel (1990) décrite au chapitre I.

3. Caractérisation de la diversité génotypique

a. Principe

Pour cette caractérisation, nous avons utilisé la technique PCR-RFLP appliquée aux gènes codant pour les ARNr 16S.

Dans son principe, cette approche comporte trois étapes successives. La première consiste à fragiliser les cellules bactériennes à l'aide d'une enzyme protéolytique, la Protéinase K. La seconde est une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de la séquence cible d'ADN libérée par la lyse cellulaire consécutive à un traitement thermique initial. Enfin, la troisième étape a pour but de fragmenter la zone amplifiée avec un enzyme de restriction de façon à générer, sur gel d'agarose, des profils de bandes caractéristiques de l'espèce étudiée.

b. Les produits et les milieux réactionnels

Nous renvoyons à l'annexe IV pour la description des produits, des milieux réactionnels et des protocoles standards que nous avons utilisés pour réaliser cette étude.

c. Conditions d'amplification de l'ADNr 16S

Les conditions expérimentales de la PCR sont identiques à celles utilisées lors de la caractérisation génotypique des bactéries dégradant le 2,4-D (voir chapitre I). Les amorces utilisées sont les amorces universelles fD1 et 1492r (Weisburg *et al.*; Lane *et al.*, 1991) dont les séquences sont les suivantes :

-fD1	: 5'-AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG-3'	H = C ou T
-1492r	: 5'-TAC-GGH-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T-3'	M = A ou T ou C

Elles sont situées à chacune des extrémités des gènes codant pour les ARNr 16S, soit entre les bases 8 et 27 pour l'amorce supérieure fD1 et entre les bases 1492 et 1513 pour l'amorce inférieure 1492r. Elles ont été synthétisées par Eurogentec.

d. Digestion de l'ADNr 16S

Les protocoles opératoires détaillés sont donnés en annexe IV. En résumé, après vérification de la taille des amplifiats, la digestion des fragments d'ADN ribosomal 16S a été réalisée avec l'enzyme *Rsa* I (Appligene) choisi parce que c'est lui qui est le plus informatif et le plus discriminant pour différencier les différents taxons déterminés par séquençage (Moyer *et al.*, 1996). Cet enzyme ayant un optimum d'activité en milieu faiblement salin, le produit d'amplification a été préalablement dialysé. A titre de confirmation, l'enzyme *Nde* II a été utilisé pour vérifier les regroupements établis avec l'enzyme *Rsa* I.

Les sites de reconnaissances des deux enzymes de restriction sont :

Rsa I : GT▼AC

Nde II : ▼GATC

Les fragments d'ADN digérés ont été séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose (11 x 14 cm) à 3,5 % (Metaphor, Tebu) dans du tampon TBE 1X en présence du marqueur de poids moléculaire BVIII (Boehringer, Mannheim). Après migration sous 80 volts pendant 4 heures, le gel est coloré au bromure d'éthidium pour mettre en évidence les fragments d'ADN selon le protocole décrit en annexe IV.

Le calcul de la taille des fragments de restriction a permis d'établir des profils-types permettant de regrouper les différentes souches isolées et d'établir leur fréquence d'apparition en pourcentage de l'effectif total.

e. Interprétations

Différents types d'interprétation des résultats ont été réalisés :

La comparaison des distributions des effectifs des types génomiques entre les échantillons de sol témoins et ceux traités à différentes concentrations de pesticides a été réalisée grâce au test du χ^2 de Pearson, qui s'exprime selon la relation :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c (A_{ij} - E_{ij})^2 / E_{ij}$$

où A_{ij} , E_{ij} , r et c représente respectivement la fréquence réelle située dans la ligne de rang i et la colonne de rang j , la fréquence attendue située dans la ligne de rang i et la colonne de rang j , le nombre de lignes et le nombre de colonnes.

Dans la mesure où certaines classes contiennent moins de cinq individus, nous avons calculé la valeur exacte de la probabilité ou probabilité critique plutôt que la probabilité asymptotique, qui s'applique seulement à de grands échantillons. Ceci a été réalisé grâce au logiciel STATXACT (Version 2.11, 1992; Cytel Software Corporation). Ce test permet de

comparer les distributions des génotypes témoins et traités avec le pesticide, mais seulement pour un temps donné. L'inconvénient de ce type de logiciel est qu'il ne permet pas de prendre en compte les deux facteurs, traitement pesticide et temps d'incubation en même temps.

Pour répondre à ce besoin, nous avons effectué une analyse factorielle de correspondance (A.F.C.) qui est une méthode essentiellement descriptive et dont le principe est donné au chapitre I. Les données traitées sont constituées par l'ensemble des individus (types RFLP) et des variables (traitements pesticides). L'objectif est de mettre en relation une évolution dans la distribution des individus en fonction des différents traitements et du temps.

Nous avons également calculé un indice de diversité, en l'occurrence l'indice de Shannon-Weaver (Shannon, C. E., 1948; Shannon et Waever, 1949), qui s'exprime selon la relation :

$$H' = -\sum_i^N p_i \log_2 p_i$$

où p_i est égal à la proportion du $i^{\text{ème}}$ biotype par rapport au nombre total de souches. La variance relative à cet indice se calcule selon la formule (Pielou, 1966) :

$$Var(H') = \frac{1}{N} \left(\sum_i^N p_i \log_2 p_i - H'^2 \right)$$

V. Etude du comportement d'une souche résistante au DNOC

La souche étudiée correspond à celle dont le développement a été mis en évidence dans le sol traité à une forte concentration de DNOC (50 mg kg⁻¹) et dont nous avons voulu voir si la résistance à l'herbicide était liée à une capacité de dégradation.

1. Caractérisation phénotypique

Après détermination du caractère Gram par la méthode enzymatique décrit par Manifi et Kneifel (1990), la souche bactérienne a été identifiée phénotypiquement par des tests biochimiques et physiologiques utilisés pour différencier les espèces et les biovars selon les tests de Lelliott *et al.* (1966) concernant la présence de la cytochrome oxydase C552, de pigments fluorescents, des activités enzymatiques gélatinase, levane-saccharase et arginine déshydrolase ainsi que la réduction des nitrates, et ceux de Stanier *et al.* (1966), Palleroni (1984) concernant l'utilisation des glucides (saccharose, arabinose, sorbitol), du tréhalose, du L-tartrate et du L-tryptophane. Les protocoles détaillés de ces différents tests sont donnés en annexe V.

2. Caractérisation génotypique

La souche a été identifiée par PCR-RFLP du gène codant pour l'ARNr 16S. Celui-ci a été amplifié par PCR avec les amorces universelles fD1 et 1492r déjà présentées puis, digéré par douze enzymes de restriction, *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Cfo* I, *Nde* II, *Msp* I, *Dde* I, *Rsa* I, *Nci* I, *Sau96* I, *Scr* FI, *Taq* I, dont les caractéristiques sont présentées en annexe IV. On définit donc un profil de restriction pour chaque enzyme. Le génotype de la souche testée a été déterminé par la combinaison des profils de restriction obtenus avec les 12 endonucléases. La localisation des sites de restriction dans le gène de l'ADNr 16S a été possible grâce aux cartes de restriction disponibles pour une collection de souches de références de *Pseudomonas* spp. (Laguerre *et al.*, 1994b; Jaunet *et al.*, 1995). Cette méthode a permis à ces mêmes auteurs d'identifier et de classer différentes espèces de *Pseudomonas* fluorescents. La position phylogénétique de cette souche au sein des *Pseudomonas* fluorescents a été estimée en analysant les différences existantes entre les sites de restriction des gènes de l'ARNr 16S par la méthode de parcimonie de Dollo à l'aide du programme PAUP (phylogenetic analysis using parsimony) (Swofford, 1993).

3. Caractérisation physiologique

a. Tests de croissance

Le dispositif expérimental utilisé (Bioscreen) est celui décrit au chapitre I. La souche bactérienne a été d'abord mise en culture en tube stérile de 5 ml dans 3 ml de milieu TY liquide (annexe III) pendant 20 heures à 28°C sous agitation. 10 µl de cette suspension bactérienne ont servi d'inoculum pour ensemer 300 µl de milieu de culture contenus dans chaque puits d'une plaque de microtitration spécifique au lecteur utilisé. Les cultures ont été réalisées sur milieu minéral de base contenant ou non de l'extrait de levure ($c = 5 \text{ mg l}^{-1}$), puis additionné de DNOC comme seule ou principale source carbonée. Différentes concentrations en DNOC ont été utilisées dans les milieux ne contenant que l'herbicide comme seule source de carbone : 50, 100, 250, 300, 400, 500, 600 et 800 mg l⁻¹ et 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 et 800 mg l⁻¹ en présence d'extrait de levure. La composition précise des milieux de culture est donnée en annexe III. Cinq répétitions ont été effectuées pour chaque traitement. Dans les résultats de l'expérience relatifs à la croissance de cette souche en présence d'extrait de levure, la valeur de l'absorbance du témoin stérile préparé en cinq exemplaires a été retranchée à celle de l'échantillon inoculé pour chaque milieu. La croissance bactérienne a été déterminée par mesure de l'absorbance à 620 nm toutes les heures pendant 4 jours.

b. Tests de dégradation

La souche *1a* a été préalablement mise en culture en tube stérile de 5 ml contenant 3 ml de milieu King B pendant 12 heures à 28°C sous agitation. 1 ml de cette préculture a été ensuite

inoculé à 50 ml de milieu King B liquide additionné de DNOC à 75 mg l^{-1} contenu dans un erlenmeyer de 100 ml. Trois répétitions ont été faites. Les cultures bactériennes ont été ensuite placées à 28°C sous agitation. Un prélèvement périodique a été effectué au bout de 4, 7, 14, 21 et 35 jours d'incubation.

L'évaluation de la dégradation du DNOC par la souche *Ia* a été réalisée en appliquant la technique des ajouts, qui consiste à additionner, à chaque aliquote prélevée de concentration inconnue, une solution de DNOC de concentration connue égale, dans notre cas, à 50, 100 et 150 mg l^{-1} . Un dosage spectrométrique fait à partir de la suspension bactérienne préalablement centrifugée a été accompli à 420 nm. L'estimation de la concentration résiduelle en DNOC a été faite par régression linéaire entre l'absorbance et la concentration des ajouts. L'ordonnée à l'origine, changée de signe, a donné une estimation de la concentration résiduelle de l'échantillon non enrichi. Par ailleurs, une lecture de la suspension bactérienne non centrifugée à 620 nm nous a permis de suivre l'évolution de la densité cellulaire au cours du test de dégradation.

C. RESULTATS-DISCUSSION

I. Dénombrements

1. La microflore totale

Les résultats des dénombrements effectués à partir d'échantillons de sol témoin et traités aux différents pesticides sont reportés dans le tableau II-3. Ils sont exprimés en Unités Formant des Colonies (U.F.C.) par g de sol sec.

Les dénombrements bactériens réalisés sur les deux milieux testés (milieu NA dilué au 1/10 et milieu à base d'extrait de sol) étant très proches, les résultats ont été regroupés. Les résultats semblent fonction de trois facteurs, le type de pesticide, la concentration en DNOC et le temps.

La taille de la microflore totale cultivable sur gélose nutritive est du même ordre de grandeur ($4 \text{ à } 7 \cdot 10^7$) dans le sol témoin et dans le sol traité au 2,4-D à 50 mg kg^{-1} ou au DNOC aux concentrations testées ($15, 30 \text{ et } 50 \text{ mg kg}^{-1}$).

Le DNOC ne semble pas avoir d'effet excepté à 50 mg kg^{-1} , où on observe une augmentation du nombre d'UFC g^{-1} à 7 jours. Cette stimulation, qui semble persister 16 jours, disparaît cependant à 62 jours d'incubation. Le 2,4-D, au contraire, tendrait à réduire la microflore totale à 62 jours.

Il apparaît enfin que le temps semble avoir un effet déterminant qui, globalement, se manifesterait par une tendance générale allant vers une diminution du nombre de bactéries.

Tableau II-4 : Dénombrement de la microflore isolée sur milieu 2,4-D réalisé sur des échantillons de sol ayant été soumis ou non à un traitement pesticide.

Temps	Traitements	UFC g ⁻¹
7 jours	DNOC ou 2,4-D (mg kg ⁻¹ sol sec)	Moyenne
	0	1,45 E ⁺⁷
	15	1,54 E ⁺⁷
	30	1,62 E ⁺⁷
	50	1,52 E ⁺⁷
	50 (2,4-D)	1,12 E ⁺⁷
16 jours	0	2,46 E ⁺⁷
	15	4,84 E ⁺⁷
	30	4,45 E ⁺⁷
	50	6,44 E ⁺⁷
	50 (2,4-D)	4,10 E ⁺⁷
62 jours	0	4,66 E ⁺⁷
	15	5,14 E ⁺⁷
	30	5,88 E ⁺⁷
	50	5,09 E ⁺⁷
	50 (2,4-D)	4,32 E ⁺⁷

2. La microflore se développant sur milieu 2,4-D

Le tableau II-4 regroupe les résultats des dénombrements réalisés à partir des échantillons de sol témoin et traités aux différents pesticides.

La taille de ce peuplement, de l'ordre de 10^7 bactéries g^{-1} (équivalent sol sec), est sensiblement la même quel que soit le traitement. Ce résultat tend à montrer que, dans le sol utilisé, soit la population microbienne dégradant le 2,4-D est particulièrement abondante si on la compare à d'autres données de la littérature (Fournier, 1980; Fournier *et al.*, 1981) soit, plus probablement, les conditions culturales laissent la place à des micro-organismes se développant sur les impuretés de la gélose en tolérant la présence de 2,4-D.

Contrairement à ce qui a été décrit pour la population totale, on observe au cours du temps une augmentation du nombre d'U.F.C., moins prononcée et retardée dans les échantillons témoins par rapport à ceux traités au DNOC ou au 2,4-D. Le traitement du sol au 2,4-D ne semble pas augmenter le nombre d'U.F.C. par rapport au témoin sauf à 16 jours où le nombre des bactéries dénombrées augmente de 50 %. L'effet du temps semble avoir plus d'impact sur le nombre d'U.F.C. que les pesticides eux-mêmes. En effet, le temps pourrait faire apparaître des espèces en moyenne plus tolérantes à la présence de 2,4-D dans le milieu de culture; le DNOC et le 2,4-D semblent accélérer cette évolution. La tendance évoluerait donc vers un enrichissement progressif des bactéries mieux armées pour tolérer un composé tel que le 2,4-D.

II. Etude de la diversité phénotypique

1. Diversité basée sur le critère de Gram

a. La microflore totale

Les distributions des bactéries Gram - dans les différentes populations sont présentées sur la figure II-1. Deux grandes tendances émergent. Dans les échantillons de sol témoin et traité au DNOC à 15 mg kg^{-1} , on observe une régression progressive de la proportion des bactéries Gram - : de 33 % à 7 jours d'incubation, cette proportion passe à 17 % à 62 jours dans le sol témoin. Dans le même temps, ce pourcentage passe de 42 % à 20 % dans le sol traité à la faible dose de DNOC.

Avec les deux herbicides apportés à la dose de 50 mg kg^{-1} , l'évolution se manifeste différemment. Au cours des 16 premiers jours, la proportion des bactéries Gram - augmente de façon importante pour atteindre 76 % avec le DNOC et 45 % avec le 2,4-D. Il s'en suit une période de réduction de ces pourcentages, d'ailleurs relativement plus importante en présence de 2,4-D, le retour au niveau du témoin étant réalisé à 62 jours. Le DNOC semble pour sa part assurer le maintien de bactéries Gram - qui, en fin d'incubation, représentent encore plus de 50 % des individus isolés.

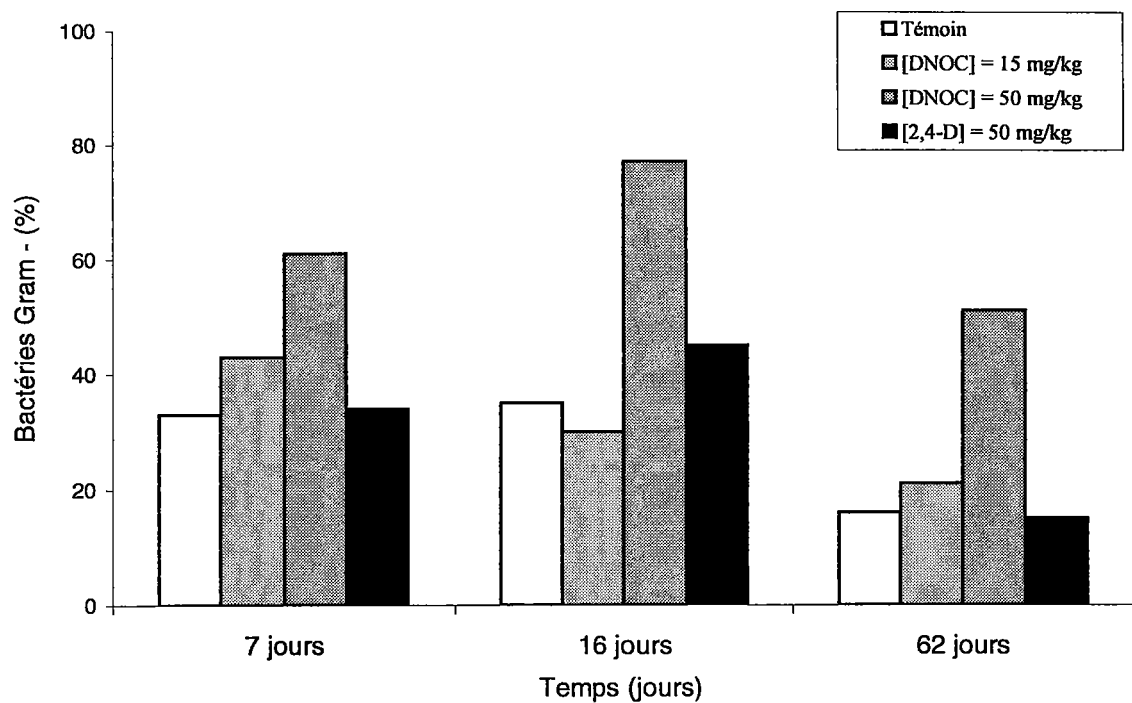


Figure II-1 : Effet du DNOC et du 2,4-D sur la distribution de la microflore bactérienne Gram - au sein de la microflore totale.

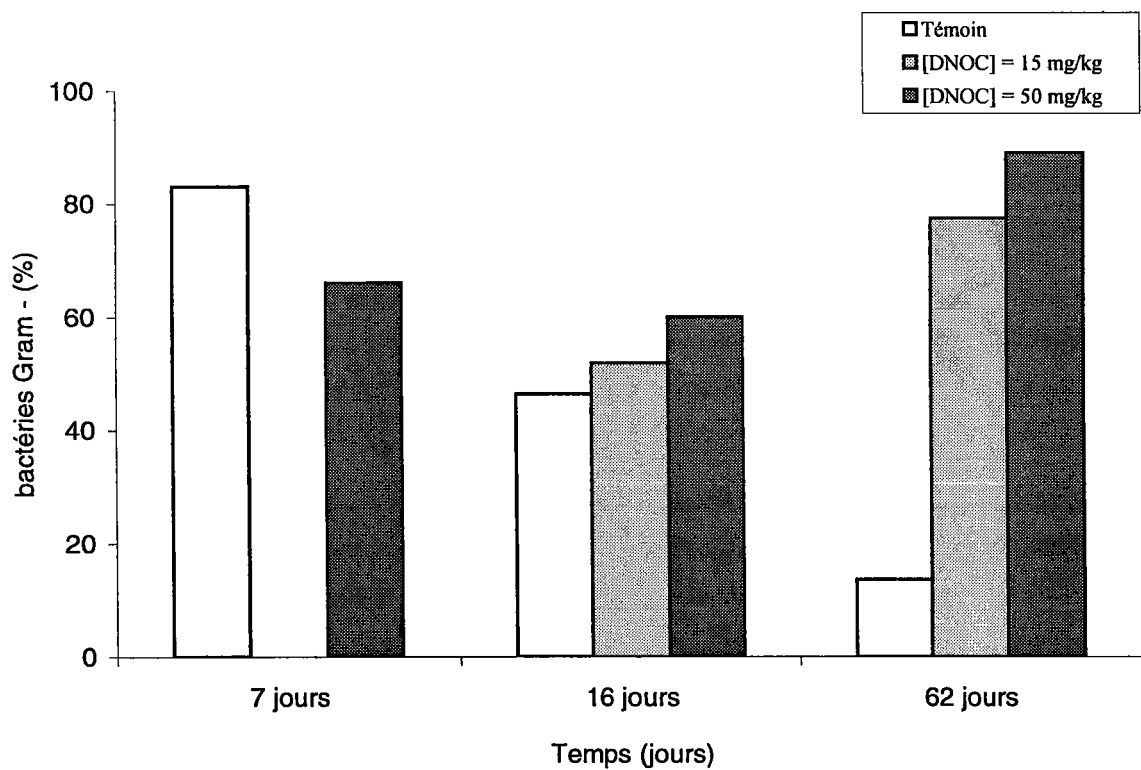


Figure II-2 : Effet du DNOC sur la distribution de la microflore bactérienne Gram - au sein de la microflore se développant sur milieu 2,4-D.

b. Microflore se développant sur milieu 2,4-D

L'effet du DNOC sur la distribution des bactéries Gram - isolées sur milieu 2,4-D est présenté figure II-2. A quelques détails près, on retrouve des tendances identiques à ce que l'on observe avec la microflore totale. Alors que la proportion des bactéries Gram - diminue dans les échantillons de sol témoin et passe de 83 % à 13 %, on observe une tendance inverse avec le DNOC quelle que soit la dose. A 62 jours d'incubation, les bactéries Gram - représentent 77 % et 89 % dans les échantillons de sol traité respectivement à 15 et à 50 mg kg⁻¹. Cette observation est en accord avec le fait que la plupart des bactéries dégradant le 2,4-D isolées à ce jour sont des bactéries Gram - appartenant à des genres divers tels que *Arthrobacter* (Sandmann et Loos, 1987), *Pseudomonas cepacia* (Greer *et al.*, 1990; Daugherty *et al.*, 1994), *Xanthobacter* (Ditzelmuller *et al.*, 1989), *Achromobacter* sp. (Steenenson et Walker, 1956; Bell, 1957), *Alcaligenes xylosoxidans* (Fournier, 1989), *Alcaligenes eutrophus* (Pemberton *et al.*, 1979), *Alcaligenes paradoxus* TV1 (Vallaes, 1992). Il se confirme donc que le DNOC semble favoriser le maintien d'une forte proportion de bactéries Gram- dans la communauté bactérienne considérée.

A ce stade de la discussion, nous pouvons rappeler les observations faites concernant les dénombrements qui se sont avérés être de mauvais révélateurs de l'impact de produits, tels que le DNOC ou le 2,4-D, quel que soit le groupe microbien considéré, confirmant ainsi de nombreuses études antérieures (Simon-Sylvestre et Fournier, 1976; Domsch *et al.*, 1983). Des approches plus récentes basées sur des mesures de biomasse en utilisant des techniques biocidales semblent offrir de meilleures garanties de sensibilité (Fournier *et al.*, 1992; Rouard *et al.*, 1996). Toutefois, dans le cas particulier de notre étude, la prise en compte du temps dans l'évolution comparée des dénombrements relatifs aux deux groupes microbiens étudiés permet d'envisager une interprétation biologique. En effet, le nombre d'U.F.C. déterminé sur milieu non sélectif tend à diminuer avec le temps sans rapport évident avec la présence de DNOC ou de 2,4-D. C'est une évolution inverse, moins rapide dans les échantillons de sol témoin que dans les échantillons de sol traités, que l'on observe pour la microflore isolée sur milieu 2,4-D, traduisant un enrichissement significatif en espèces bactériennes en moyenne plus tolérantes à la présence de 2,4-D dans le milieu de culture. Cette évolution ne semble pas liée au développement d'une communauté dégradant spécifiquement le 2,4-D puisqu'elle se manifeste également et de façon encore plus nette lorsque le sol a reçu du DNOC. Nos observations montrent par ailleurs que le DNOC contribue à un renforcement de la proportion des bactéries Gram- cultivables sur milieu non sélectif, et que le milieu 2,4-D sélectionne préférentiellement ce type de micro-organismes qui représente plus de 80% des isolats dans le sol témoin, alors que sur milieu non sélectif cette proportion n'atteint pas 35%. C'est donc probablement cet accroissement de la proportion des espèces Gram- en présence du DNOC qui pourrait expliquer la hausse des dénombrements sur milieu 2,4-D, laquelle résulterait de l'effet de protection mentionné au chapitre I.

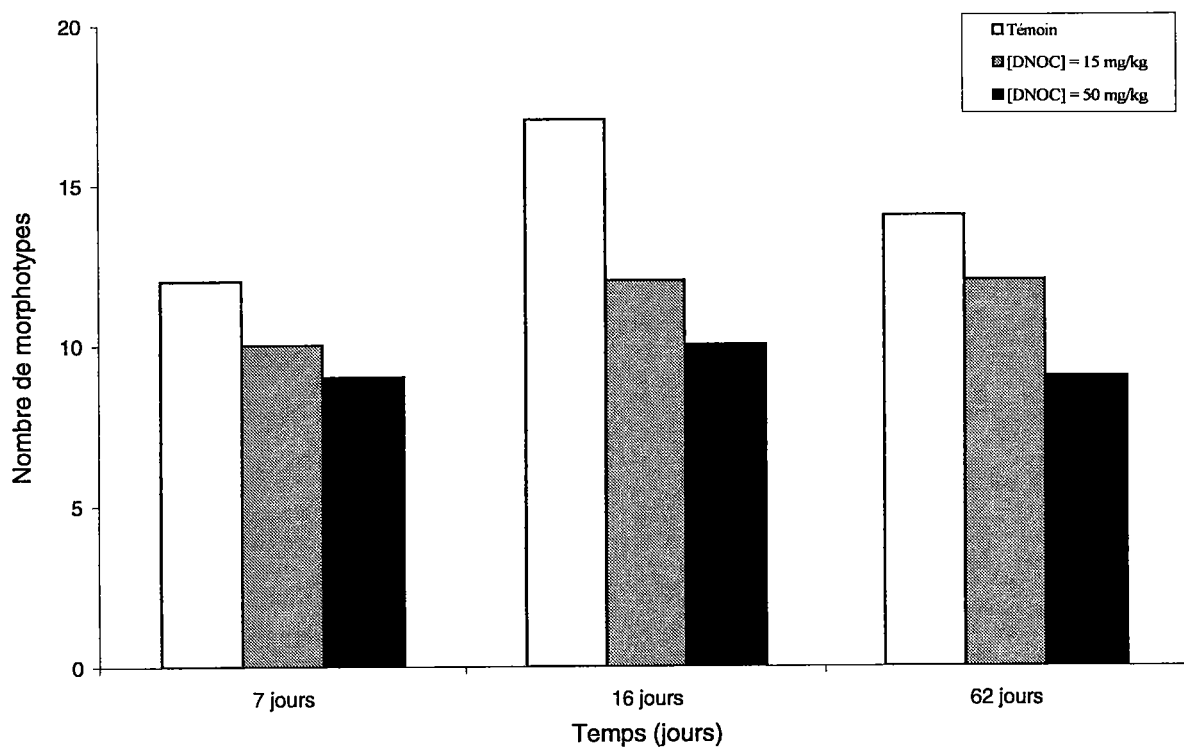


Figure II-3 : Effet du DNOC sur le nombre de morphotypes au sein de la microflore totale.

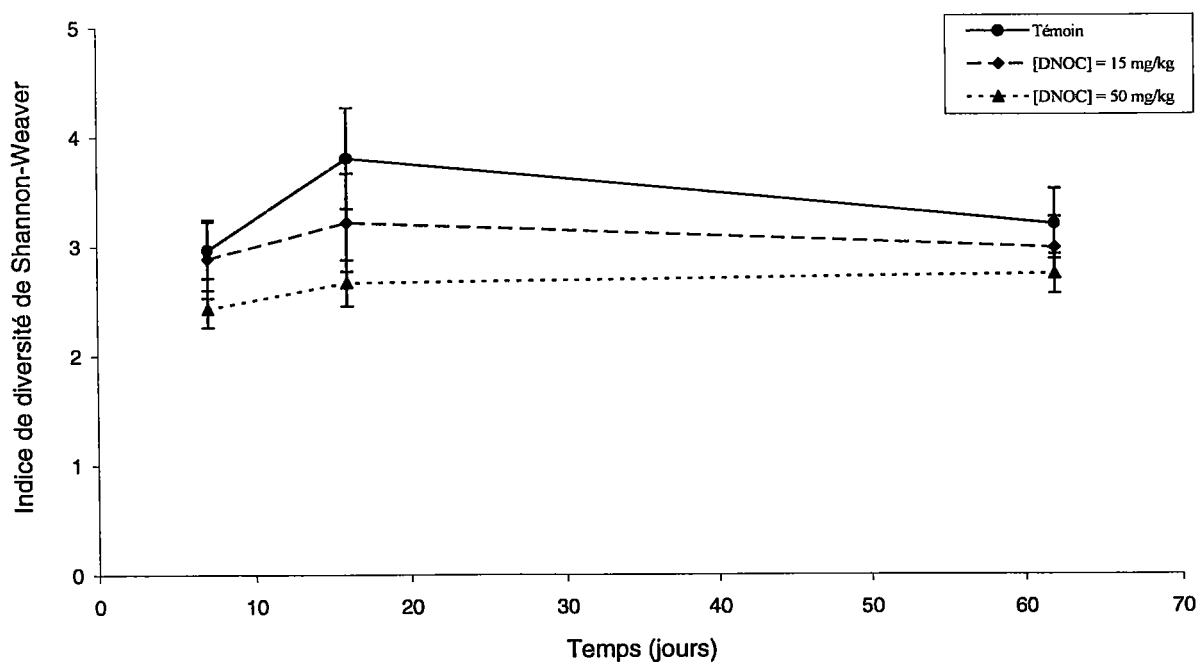


Figure II-4 : Effet du DNOC sur la valeur de l'indice de diversité de Shannon-Weaver, calculé d'après le nombre de morphotypes (les barres verticales correspondent aux écart-types).

2. Diversité basée sur des critères morphologiques

a. La microflore totale

Dans le but de constituer un échantillon qui soit le plus représentatif de la diversité du sol, les souches isolées à partir des deux milieux de culture, NA au 1/10 et ES, ont été regroupées pour une analyse globale de la population microbienne.

L'analyse des souches bactériennes isolées à partir des échantillons de sol témoin et traités selon les critères morphologiques retenus permet de distinguer 32 morphotypes. Leurs fréquences d'apparition sont présentées dans le tableau 1 de l'annexe VIII.

(1) Cas du DNOC

Une première approche globale concernant le nombre total de morphotypes laisse apparaître une tendance qui serait une diminution de la diversité morphologique lorsque la concentration en DNOC augmente. Ceci est valable à toutes les périodes de prélèvement (figure II-3). Ainsi, à 7 jours, on dénombre 12 morphotypes dans le sol témoin, 10 dans le sol traité à 15 mg kg⁻¹ de DNOC et 9 à 50 mg kg⁻¹ de DNOC : 6 morphotypes (1, 3, 5, 6, 7 et 9) se retrouvent dans les trois populations où ils représentent respectivement 83 %, 57 % et 48 % des effectifs (figure II-5a). A 16 jours d'incubation, les différences observées entre les échantillons de sol témoin et traités sont amplifiées en raison d'un accroissement du nombre de morphotypes plus important dans le sol témoin où l'on retrouve 17 morphotypes, que dans les sols traités où seulement 12 et 10 morphotypes dans l'ordre des concentrations croissantes, dont 7 (1, 3, 5, 6, 7, 9 et 10) communs, ont été détectés (figure II-5b). Enfin, à 62 jours, l'effet observé est à nouveau réduit : on retrouve 14, 12 et 9 morphotypes respectivement dans le sol témoin, traité à faible et forte dose, avec 8 morphotypes communs (les morphotypes 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12 et 13), soit 68 %, 85 % et 97 % des effectifs des classes considérées. 15 % des morphotypes se retrouvent dans tous les traitements (figure II-5c).

D'un point de vue analytique, la comparaison, à l'aide du test du χ^2 de Pearson, des distributions des différents morphotypes dans les échantillons de sol témoin et traités après différentes périodes d'incubation est reportée sur la figure II-5 et dans le tableau II-5. Il apparaît difficile de faire ressortir des tendances nettes puisque le temps d'incubation (comparaisons IV, V et VI, tableau II-5) introduit autant de différences dans les distributions que le traitement herbicide (comparaisons I, II et III, tableau II-5). Une indication plus utile peut être tirée de la diminution de l'indice de Shannon-Weaver en présence de DNOC dont la valeur diffère significativement de celle du témoin à la dose la plus élevée en herbicide (figure II-4).

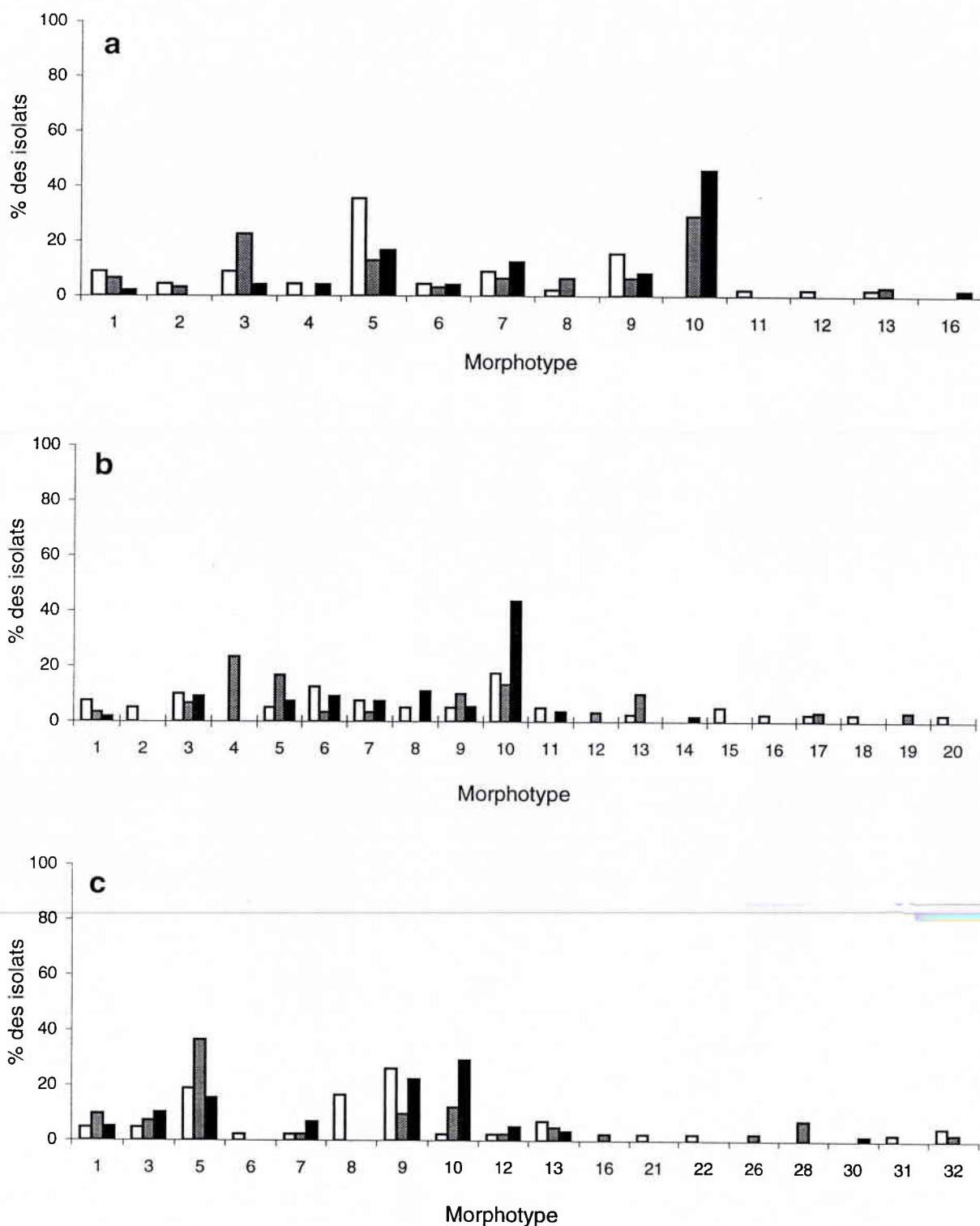
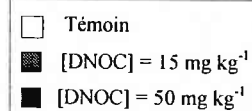


Figure II-5 : Distribution des morphotypes au sein de la microflore totale dans les échantillons de sols témoin et traité au DNOC.

a : après 7 jours d'incubation avec le DNOC

b : après 16 jours d'incubation avec le DNOC

c : après 62 jours d'incubation avec le DNOC



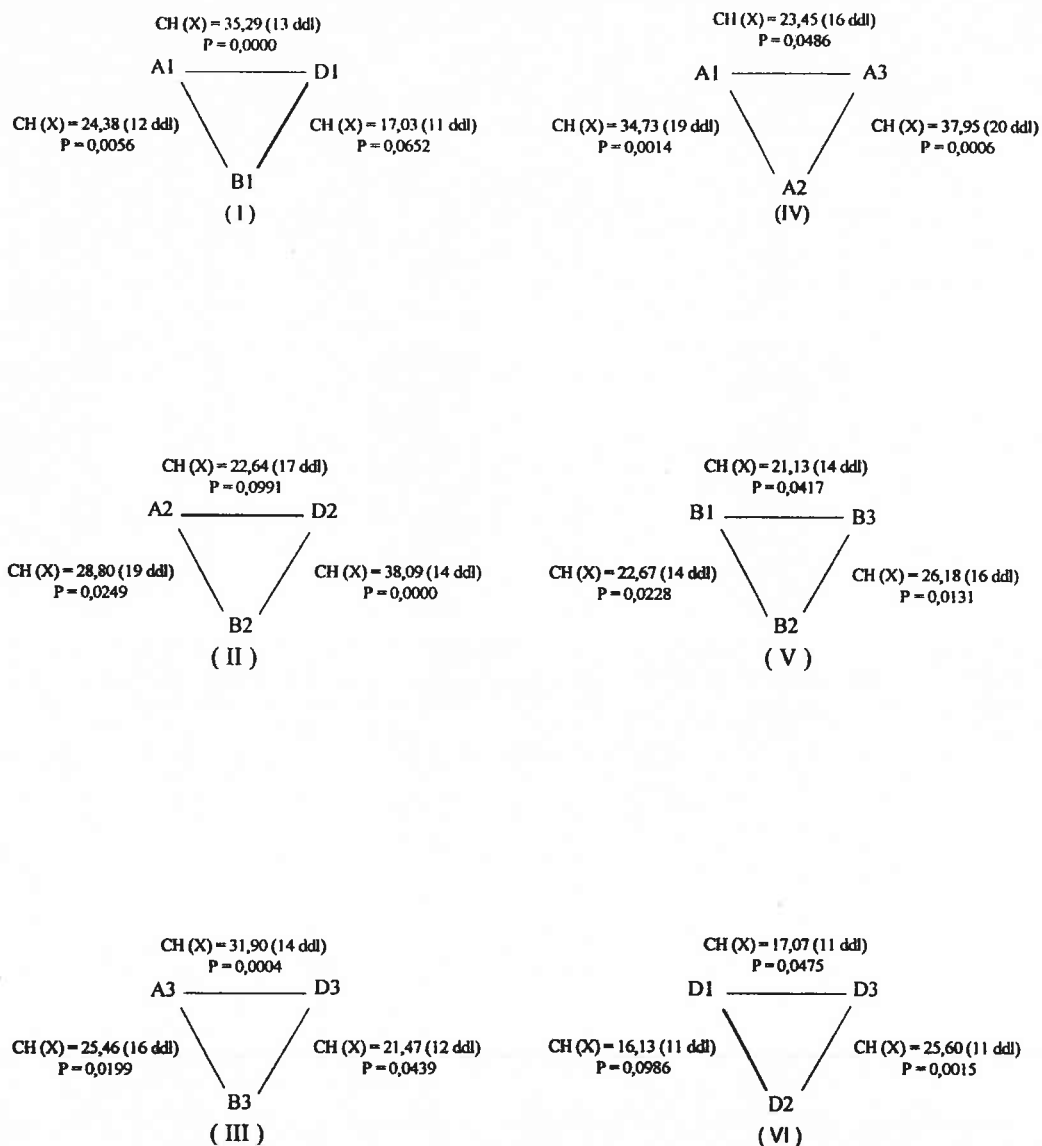


Tableau II-5 : Analyses statistiques de la distribution des différents morphotypes dans la population bactérienne totale après traitement au DNOC par le test de χ^2 de Pearson.

CH (X) : valeur prise dans l'expérience par la variable aléatoire du χ^2 (ddl : degrés de liberté).
P : probabilité exacte d'obtenir sous H_0 (hypothèse d'équivalence) une valeur du χ^2 égale ou supérieure à la valeur observée (si $P > 5\%$, la différence n'est pas significative (-)).

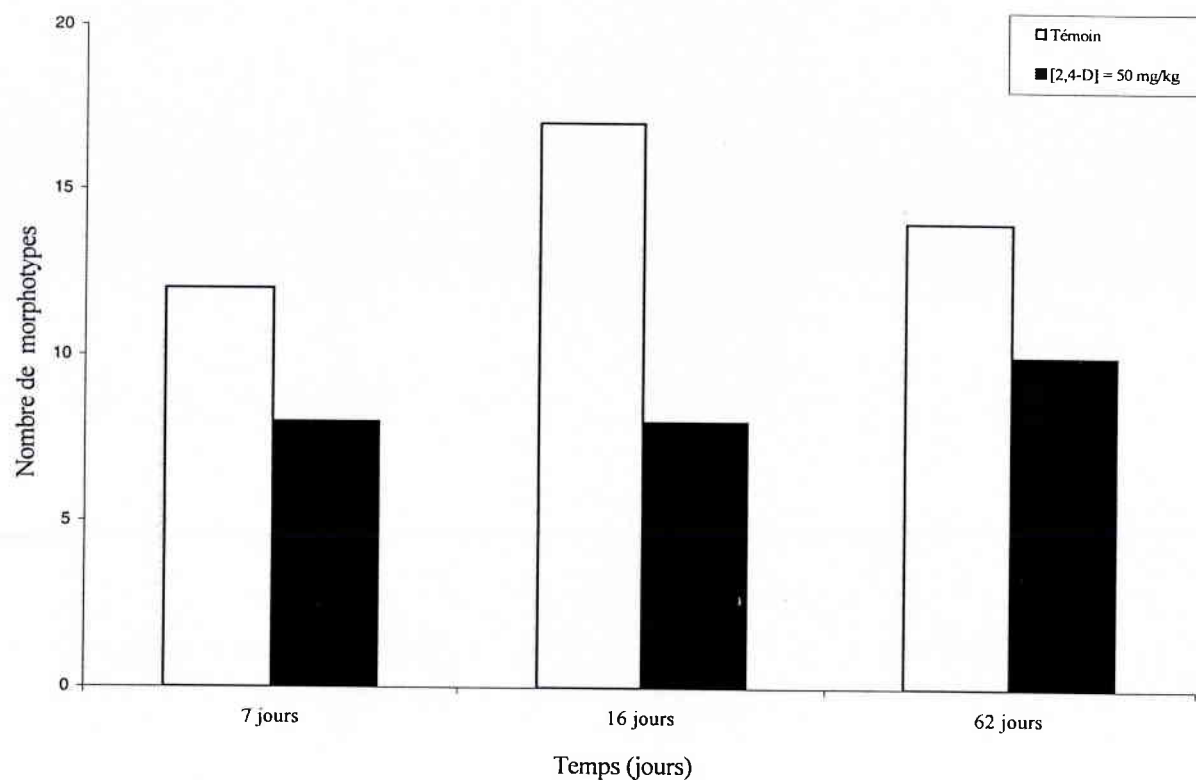


Figure II-6 : Effet du 2,4-D sur le nombre de morphotypes au sein de la microflore totale.

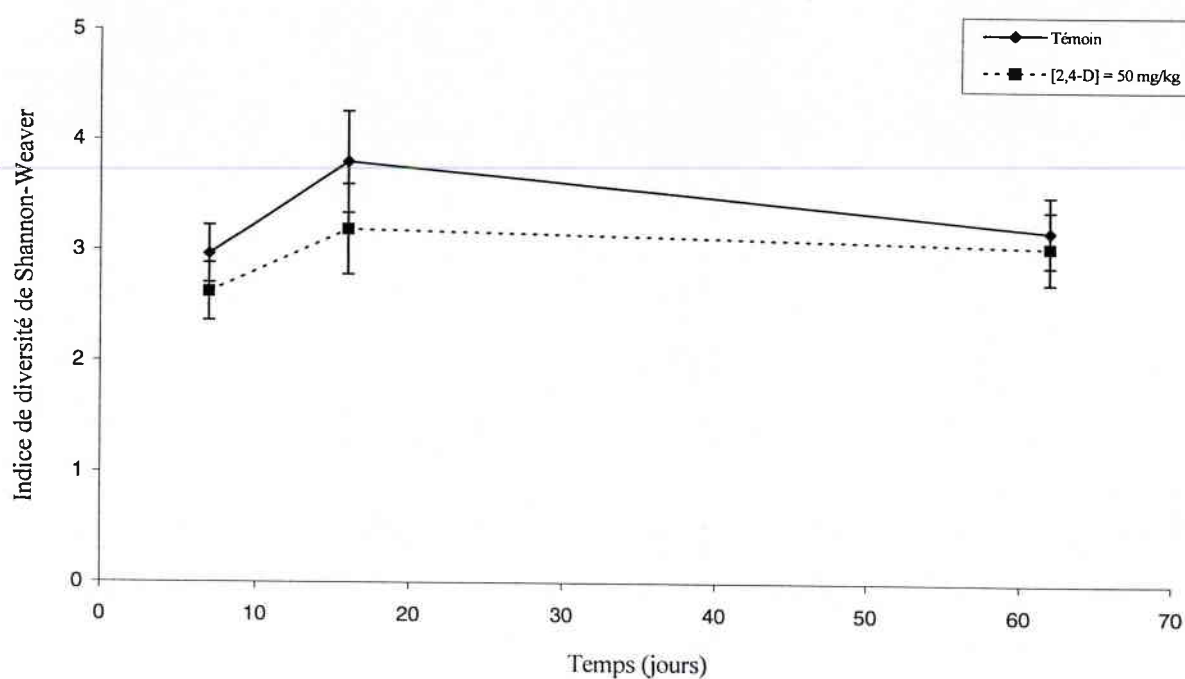


Figure II-7 : Effet du 2,4-D sur la valeur de l'indice de diversité de Shannon-Weaver, calculé d'après le nombre de morphotypes (les barres verticales correspondent aux écart-types).

(2) Cas du 2,4-D

L'examen de la figure II-6 montre que, de façon générale, le 2,4-D à 50 mg kg⁻¹ contribue à réduire, par rapport au témoin, le nombre de morphotypes des micro-organismes cultivables présents dans le sol. Cet effet est plus marqué à 16 jours de présence de l'herbicide et résulte à nouveau, d'une augmentation du nombre de morphotypes dans le témoin : la réduction du nombre de morphotypes est alors de 53 % contre respectivement 33 % et 29 % à 7 et 62 jours. Ce résultat n'est pas complètement confirmé par l'étude de la variation de l'indice de Shannon-Weaver (figure II-7) lequel tend à diminuer, mais de façon non significative, après traitement au 2,4-D. Une analyse plus fine de la distribution des morphotypes des échantillons de sol témoin et traité (figure II-8) a permis de dénombrer en tout 8 morphotypes communs qui représentent 46 % des individus pour le sol témoin et 81 % pour le sol traité. Certains types, 1 et 3 par exemple, sont systématiquement plus représentés dans le sol traité que dans le sol témoin. Pour d'autres, 5 et 9, l'ordre peut s'inverser au cours du temps. Parmi les morphotypes spécifiques à l'un ou l'autre traitement, le type 10 n'apparaît que dans le sol témoin et le type 14 uniquement dans le sol traité.

A 7 jours d'incubation, la distribution des morphotypes n'est pas significativement différente entre les populations des échantillons de sol témoin et traité ($P = 0,1842$) (tableau II-6). En effet, parmi les 6 morphotypes communs aux deux populations représentant 76 % des isolats du sol témoin et 95 % des isolats du sol traité, 4 sont dominants dans les deux cas (figure II-8a). Cette identité dans la distribution des morphotypes des populations suggère qu'à 7 jours, le 2,4-D n'a pas eu d'effet destructurant significatif. Par la suite, une certaine divergence apparaît dans la distribution des types morphologiques entre échantillons de sol témoin et traité (figure II-8b, II-8c et tableau II-6). Mais, curieusement, cette divergence semble être davantage liée à une évolution dans le sol témoin, dont les espèces semblent être différemment réparties aux trois dates de prélèvement ($P = 0,0014$; 0,0006 et 0,0486) plutôt que dans le sol traité qui manifeste une certaine stabilité spécifique pendant la période de contrôle ($P = 0,0971$; 0,7833 et 0,2678). Nous n'avons trouvé aucune explication évidente à ce rôle stabilisateur du 2,4-D.

3. Diversité basée sur des critères génétiques

a. La microflore totale

La caractérisation de la diversité des souches bactériennes isolées à partir des échantillons de sol témoin et traités a été réalisée par comparaison des profils PCR-RFLP de l'ADNr 16 S à partir de 540 souches. 25 % des souches testées dont l'ensemble des actinomycètes, soit 15 % des souches, n'ont pas permis d'obtenir une amplification, probablement en raison d'une lyse cellulaire insuffisante malgré le traitement à la protéinase K. Pour l'ensemble des 405 autres souches, on a bien obtenu un fragment de 1500 pb (figure II-9).

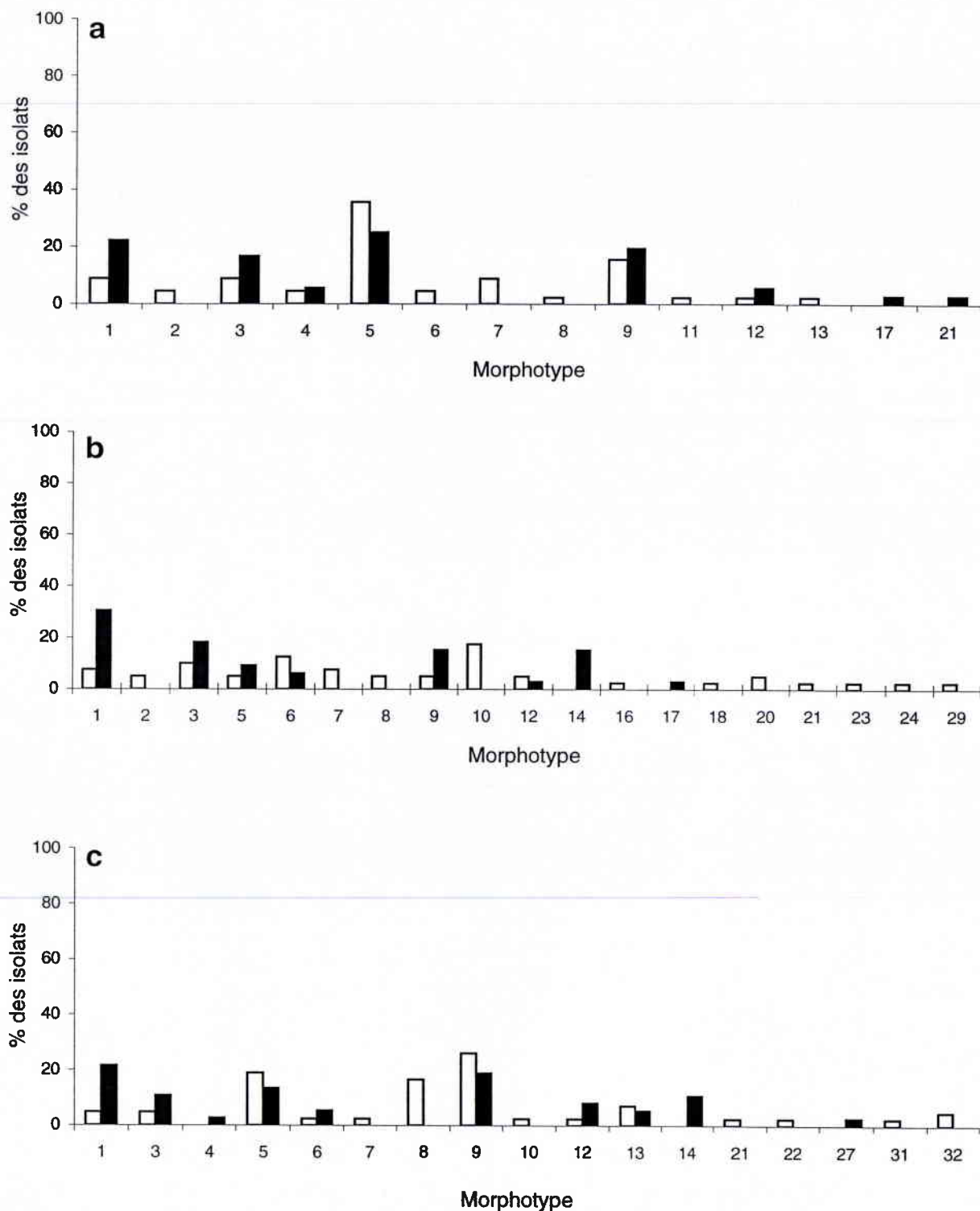
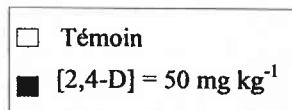


Figure II-8 : Distribution des morphotypes au sein de la microflore totale dans les échantillons de sols témoin et traité au 2,4-D.

a : après 7 jours d'incubation avec le DNOC
b : après 16 jours d'incubation avec le DNOC
c : après 62 jours d'incubation avec le DNOC



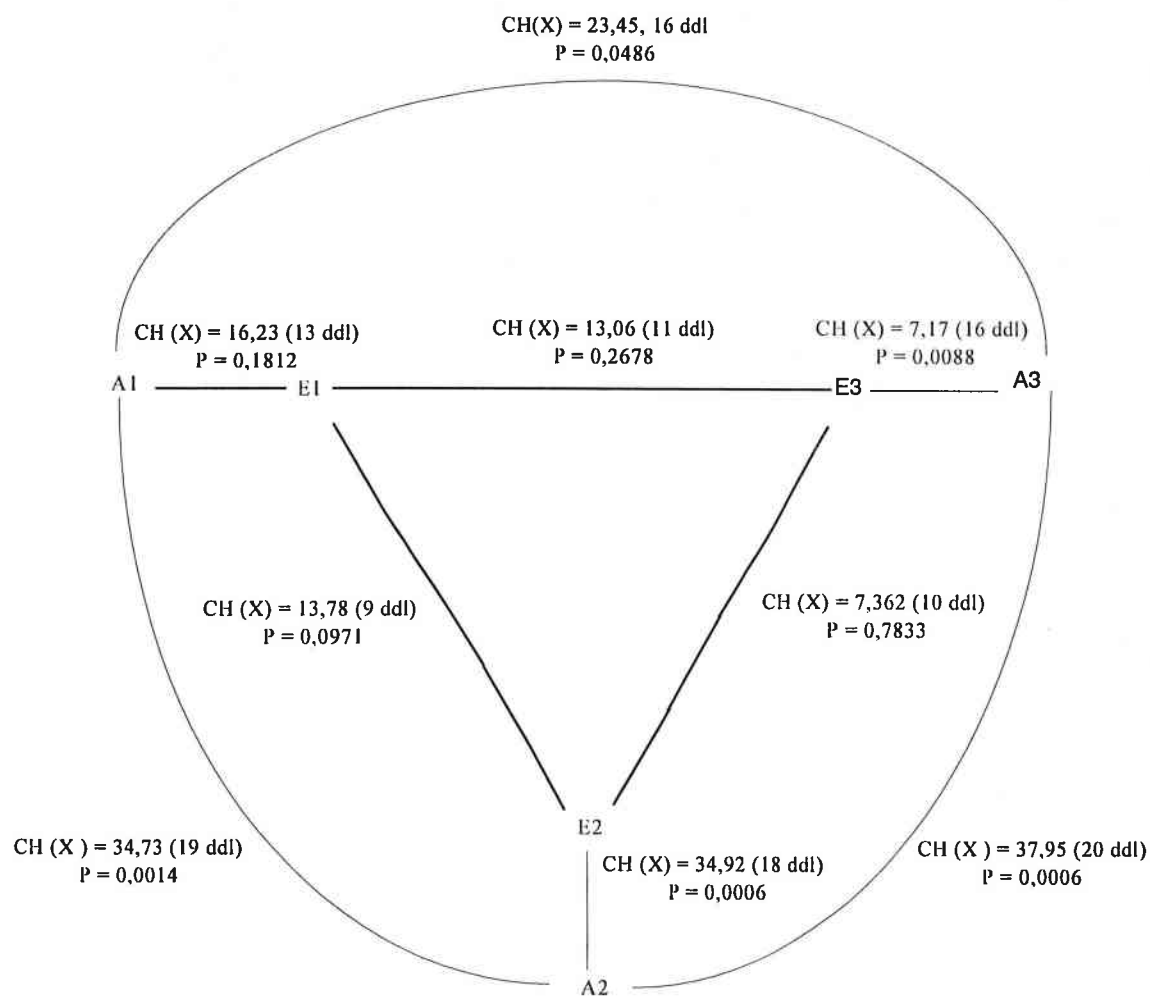


Tableau II-6 : Analyses statistiques de la distribution des différents morphotypes dans la population bactérienne totale après traitement au 2,4-D par le test de χ^2 de Pearson.

CH (X) : valeur prise dans l'expérience par la variable aléatoire du χ^2 (ddl : degrés de liberté).

P : probabilité exacte d'obtenir sous H_0 une valeur du χ^2 égale ou supérieure à la valeur observée (si $P > 5\%$, la différence n'est pas significative (-)).

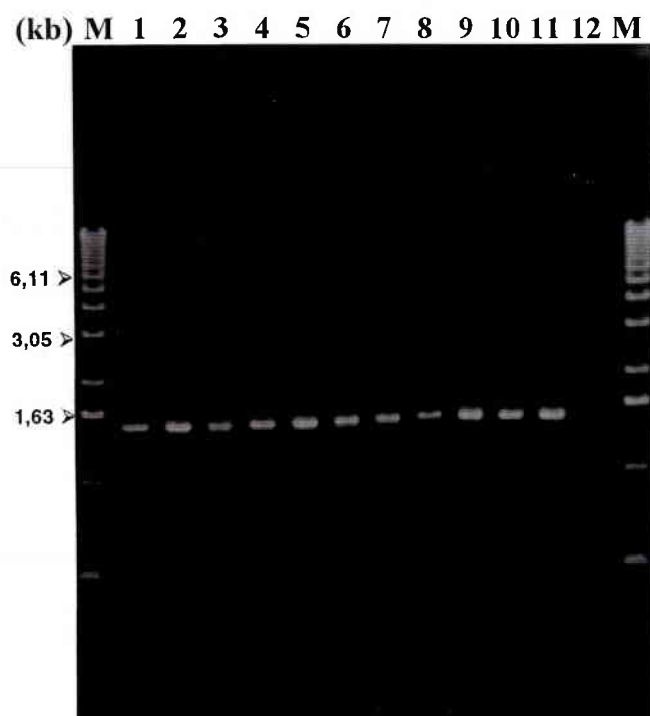


Figure II-9 : Amplification par PCR du gène de l'ADNr 16S des isolats de la microflore totale. De part et d'autre du gel se trouve un marqueur de poids moléculaire 1 kb (Gibco, BRL). Le puits 12 correspond à un témoin négatif d'amplification (sans ADN).

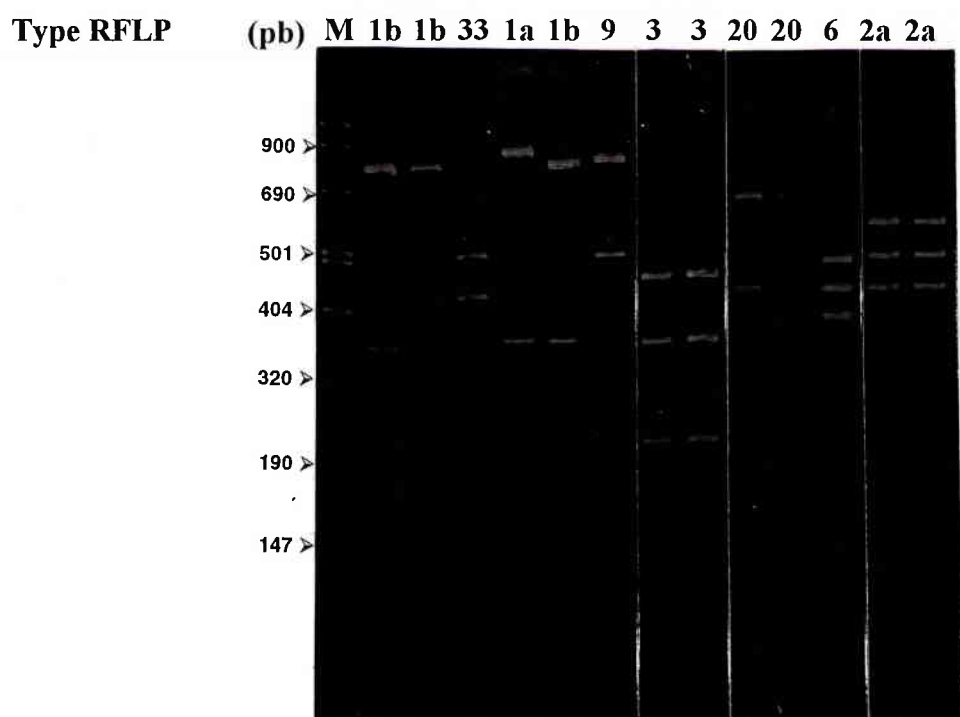


Figure II-10 : Exemples de profils de restriction de l'ADNr 16S amplifié par PCR et digéré par *Rsa* I des isolats de la microflore totale. (M : marqueur de poids moléculaire B VIII, Boehringer).

Les différents profils de restriction générés par PCR-RFLP après digestion par l'enzyme de restriction *Rsa* I ont été comparés visuellement, classés et regroupés selon leur identité. Des exemples de regroupement sont donnés figure II-10. Nous avons considéré comme appartenant à un même groupe, des profils qui ne différaient que par la position d'une ou deux bandes. Nous avons distingué ces profils homologues en adjoignant un indice littéral au numéro du profil. C'est le cas des types *1a* et *1b* qui ne diffèrent que par la position d'une bande correspondant à des fragments de taille égale respectivement à 900 et 820 pb, ainsi que des types *18a*, *18b*, *18c* et des types *21*, *21a*. L'ensemble des isolats a permis de définir 56 types de profils PCR-RFLP qui sont donnés sur la figure 1 de l'annexe VII. Leurs fréquences d'apparition sont présentées dans le tableau 2 de l'annexe VIII.

A titre de comparaison, des profils de restriction des gènes de l'ARNr 16S ont été effectués sur des souches de référence. Les profils, présentés sur la figure II-11, ont été utilisés pour tenter de rattacher les souches inconnues isolées du sol à des genres bactériens connus. Ainsi, parmi les profils recensés, les types *1a*, *1b*, *2a*, *3*, *8* et *9* ont été identifiés respectivement comme appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes* et *Rhizobium*.

(1) Cas du DNOC

Les résultats relatifs à l'évolution du nombre total de profils PCR-RFLP selon les différents traitements sont présentés sur la figure II-12. Seule la plus forte concentration en DNOC contribue à abaisser significativement le nombre de types de profils RFLP. Cette réduction atteint déjà 55 % 7 jours après l'apport de l'herbicide. Elle se maintient encore à un fort niveau à deux semaines (47 % de réduction), puis régresse pour ne plus représenter que 18 % à 62 jours.

Ces résultats sont confirmés par une étude plus détaillée de la distribution des profils RFLP au sein de la microflore totale (figure II-14). Lorsque le DNOC est appliqué à forte dose et quel que soit le temps de contact du sol avec ce pesticide, les distributions des types RFLP dans les populations des sols témoin et traités diffèrent significativement. Cela n'est pas le cas à la dose la plus faible, les probabilités correspondantes indiquant un certain degré de similarité dans la structure des communautés des échantillons de sol témoin (comparaisons I et II, tableau II-7). Seule la dose la plus élevée en herbicide contribue à une diminution statistiquement significative de la valeur; ceci est vrai tout au long de l'expérience, même si un rétablissement "relatif" apparaît à 62 jours. Celui-ci se fait avec des types RFLP différents de ceux présents dans le sol témoin (figure II-14c). Par ailleurs, qualitativement, une observation intéressante est celle du développement visible d'un profil RFLP, le type *1a*, qui représente respectivement 48, 55 et 38 % des souches isolées à 7, 16 et 62 jours d'incubation dans le sol traité à la dose la plus élevée. Le type 7, au contraire n'est

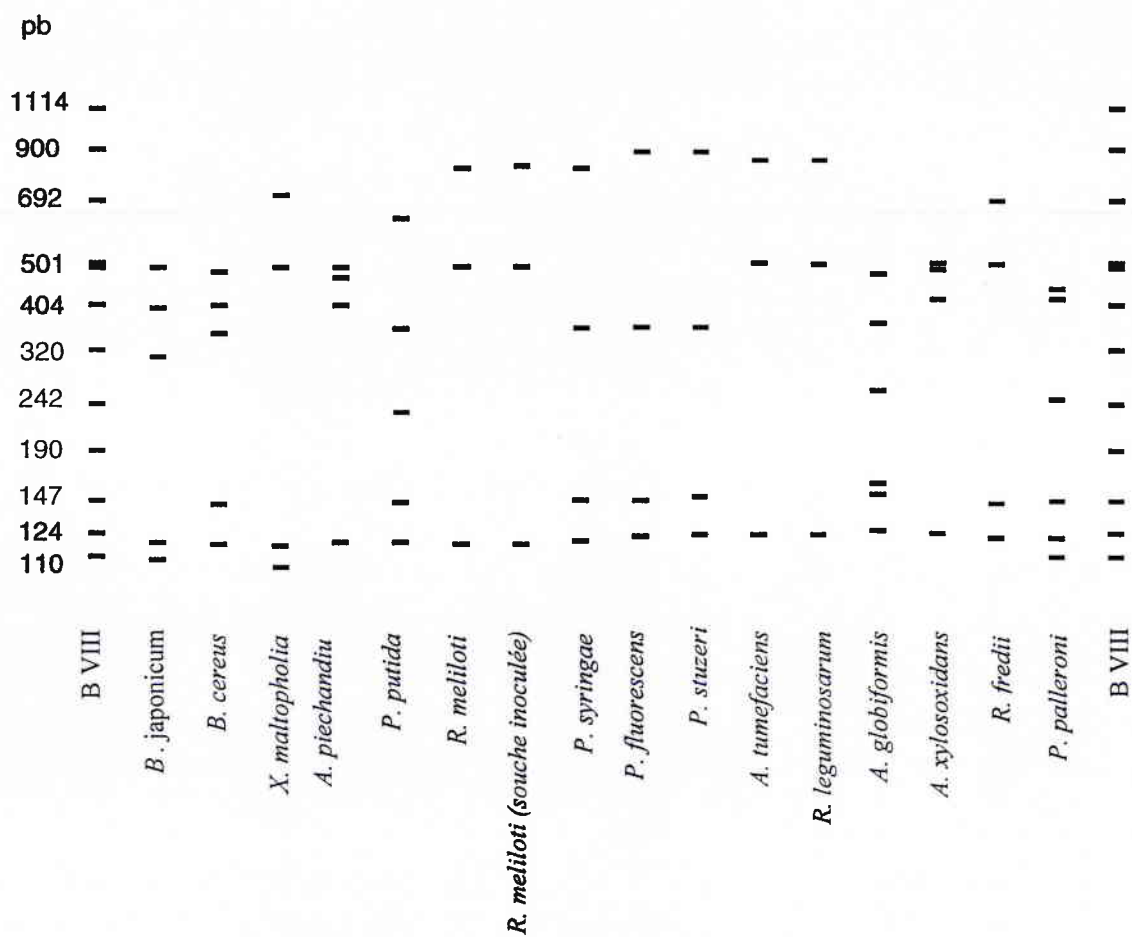


Figure II-11 : Représentation schématique des profils de restriction de l'ADNr 16S amplifié par PCR et digéré par *Rsa* I à partir de souches de référence.
De part et d'autre se trouve un marqueur de poids moléculaire B VIII (Boehringer).

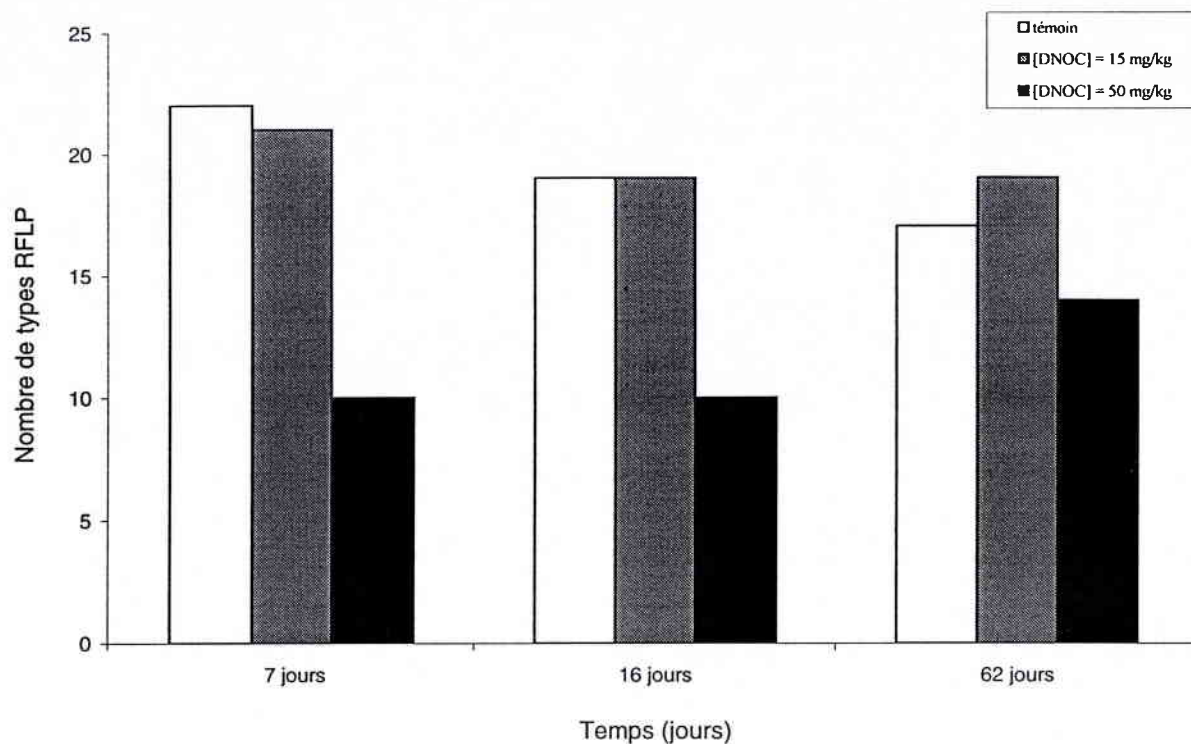


Figure II-12 : Effet du DNOC sur le nombre de types RFLP au sein de la microflore totale.

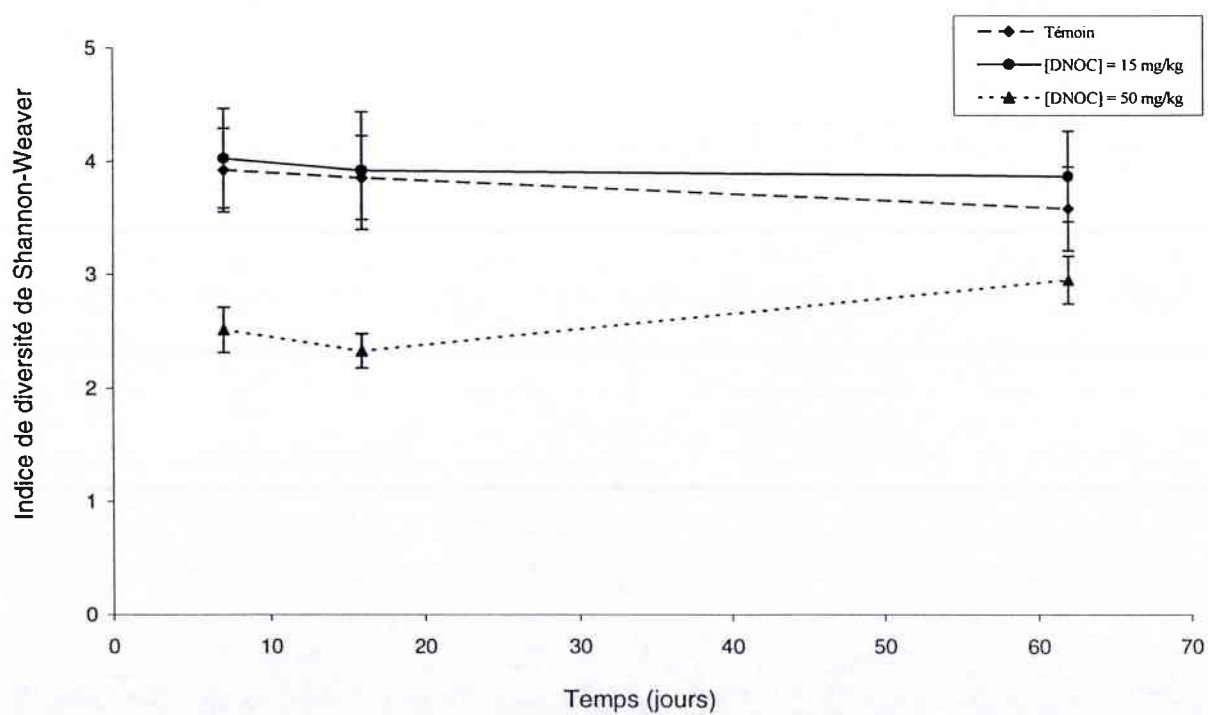


Figure II-13 : Effet du DNOC sur la valeur de l'indice de diversité de Shannon-Weaver, calculé d'après le nombre de types RFLP (les barres verticales représentent les écart-types).

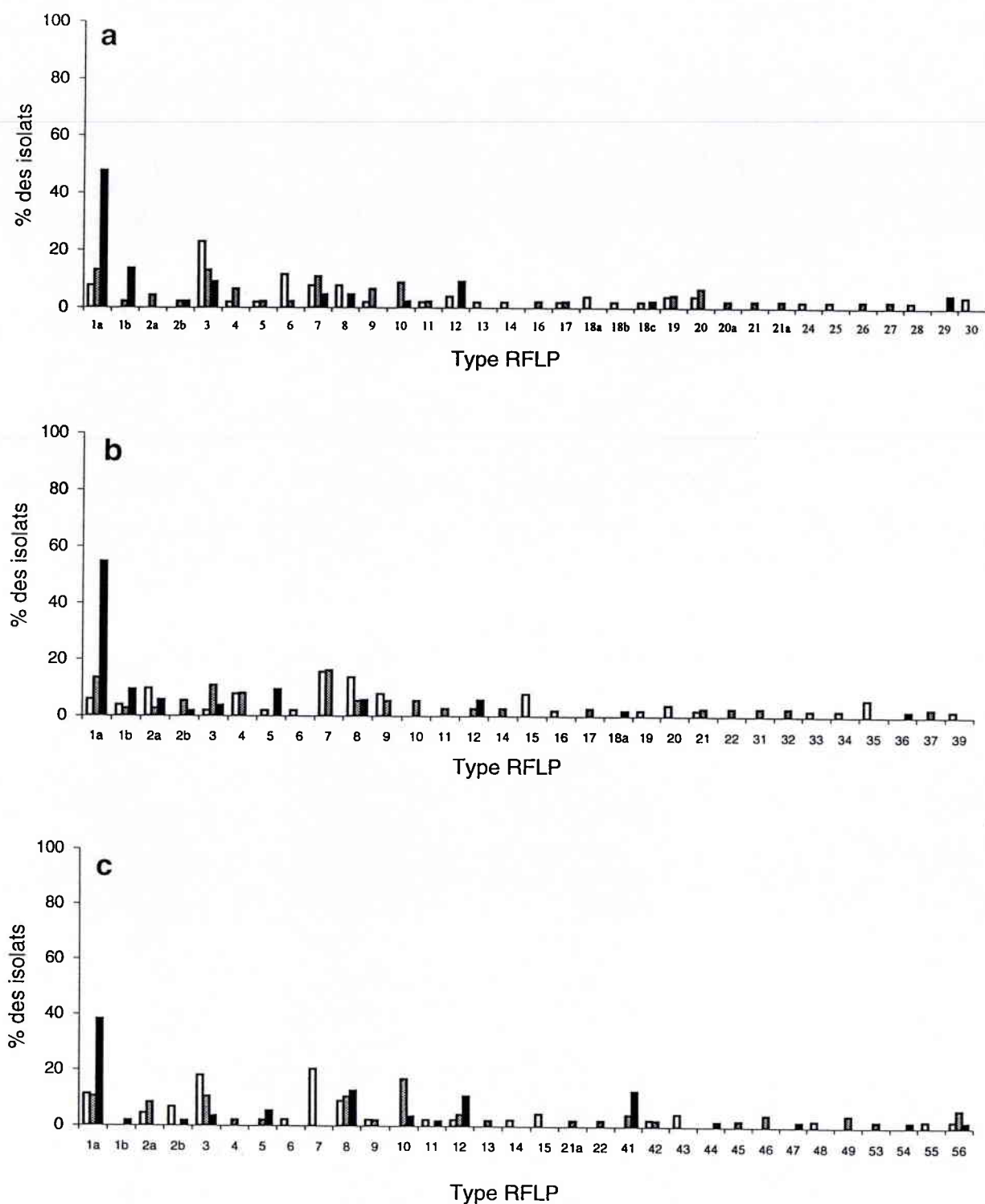


Figure II-14 : Distribution des types RFLP au sein de la microflore totale dans les échantillons de sols témoins et traités au DNOC.

a : après 7 jours d'incubation avec le DNOC

b : après 16 jours d'incubation avec le DNOC

c : après 62 jours d'incubation avec le DNOC

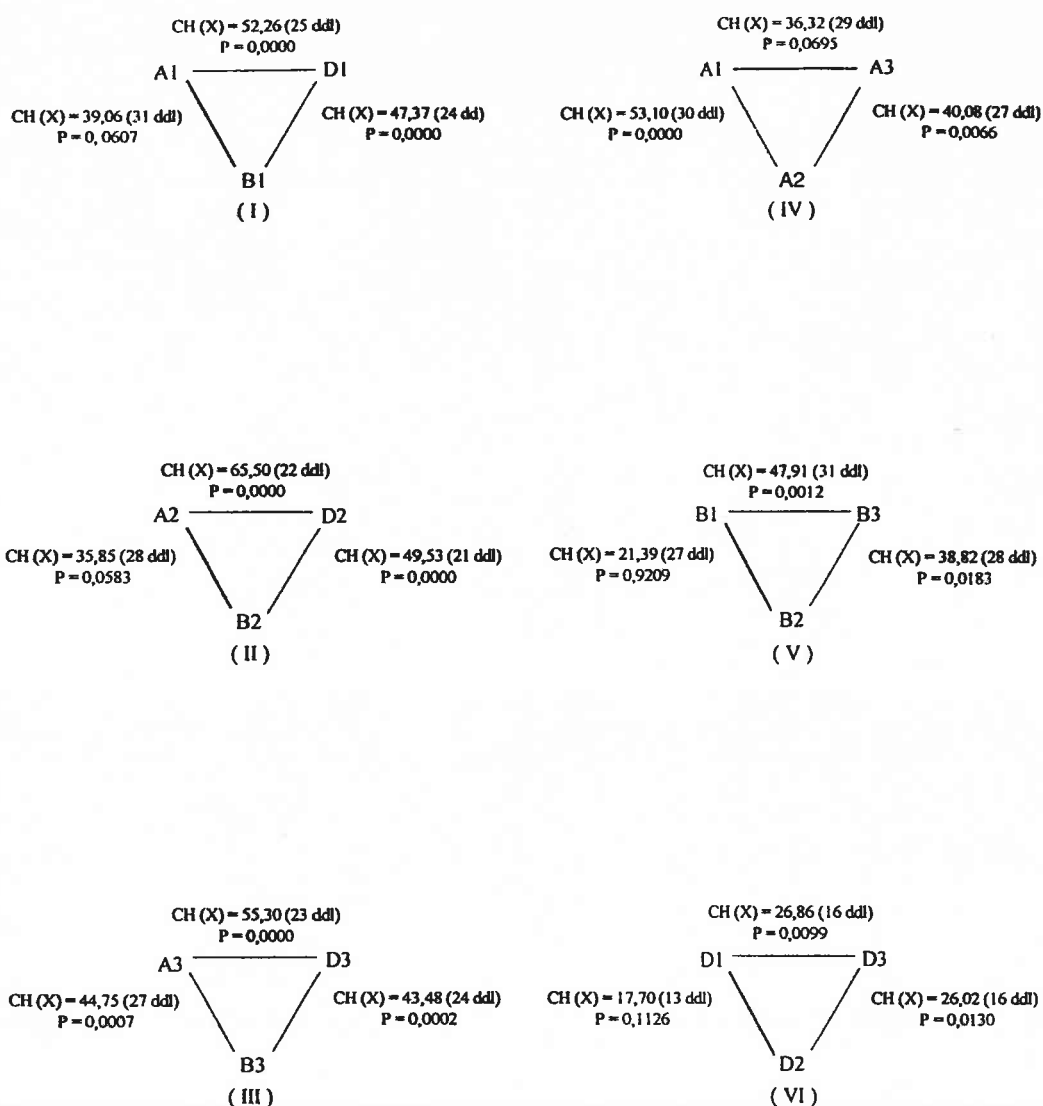


Tableau II-7 : Analyses statistiques de la distribution des différents génotypes de la population bactérienne totale après traitement au DNOC par le test de χ^2 de Pearson.

CH (X) : valeur prise dans l'expérience par la variable aléatoire du χ^2 (ddl : degrés de liberté).

P : probabilité d'obtenir sous H_0 une valeur du χ^2 égale ou supérieure à la valeur observée (si $P > 5\%$, la différence n'est pas significative (-)).

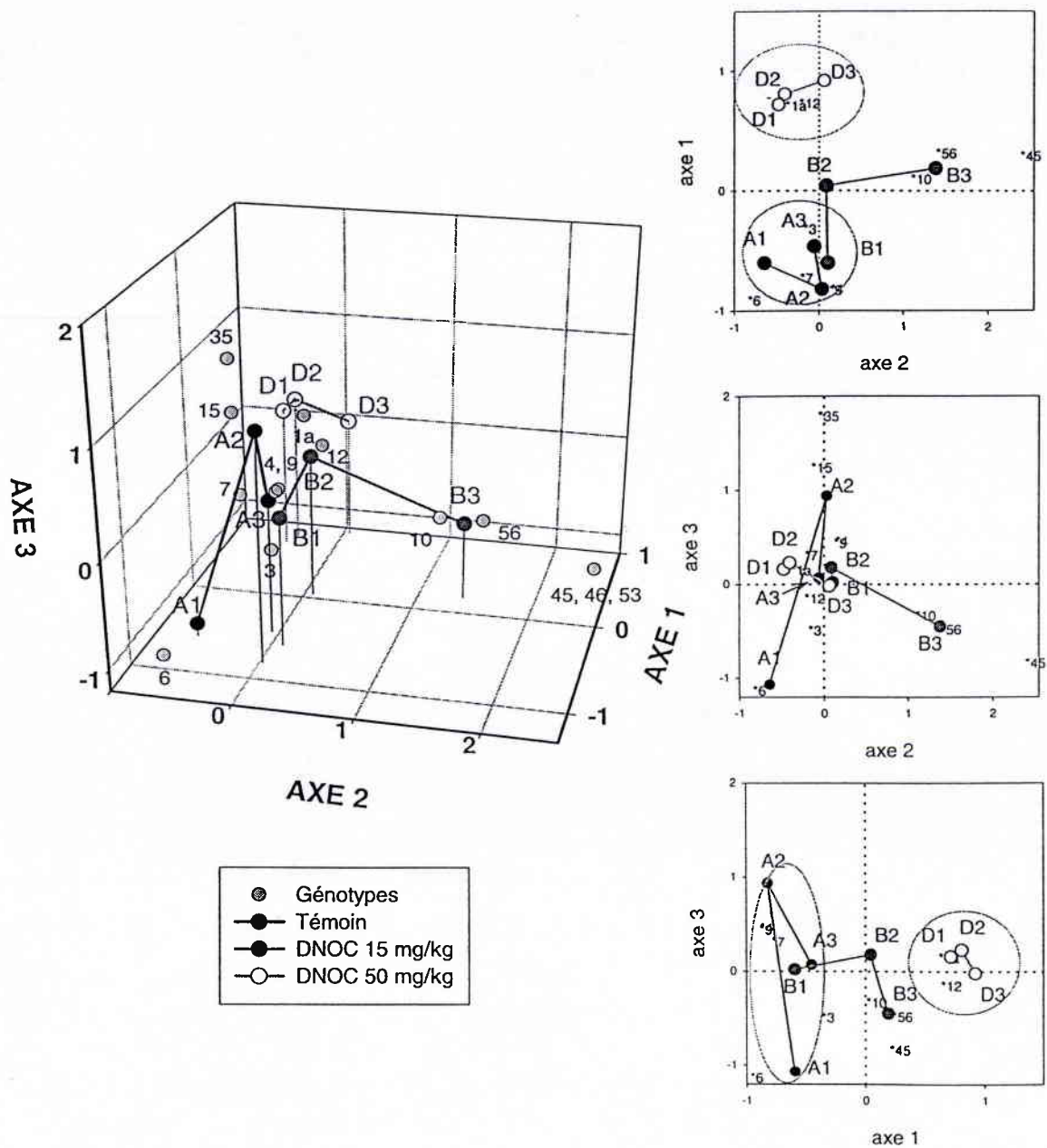


Figure II-15 : Effet du DNOC sur la population microbienne totale. Représentation dans l'espace factoriel principal ainsi que dans les trois premiers plans factoriels des traitements et des types RFLP associés.

pratiquement pas retrouvé en présence du DNOC, y compris à la faible dose à 62 jours de contact. Ce type semble être particulièrement sensible au DNOC.

En ce qui concerne le traitement à faible dose, l'analyse des profils de distribution permet de préciser les tendances évolutives qui sont plus qualitatives que quantitatives. En effet, jusqu'à 16 jours de contact avec le DNOC (figure II-14a et II-14b), les distributions des populations isolées du sol témoin et du sol traité ne diffèrent pas sensiblement. Ceci est confirmé par le calcul de l'indice de Shannon-Waever (figure II-13). Après deux mois de contact, une différence significative caractérise les distributions des types RFLP bien que le nombre de types RFLP reste inchangé. Ceci pourrait résulter d'un effet de substitution, les espèces affectées laissant la place à des espèces plus tolérantes initialement faiblement représentées. En dépit de cette modification dans la répartition des espèces microbiennes, l'indice de Shannon-Weaver est faiblement affecté (figure II-13). Cette dernière remarque met en lumière une faiblesse de cet indice de diversité qui semble relativement insensible à ces effets de substitution qui préservent la richesse spécifique.

Les données ayant servi à l'analyse factorielle de correspondance sont regroupées dans le tableau 2 de l'annexe VIII regroupant les types RFLP retrouvés dans les différents traitements après différents temps d'incubation. Les résultats obtenus sont reportés en annexe IX-B.

La qualité de représentation du nuage de points dans le plan factoriel principal est médiocre puisque celui-ci ne contribue qu'à 43,6 % de l'inertie totale. On est donc conduit d'une part à représenter les données dans l'espace déterminé par les trois premiers axes principaux pour une contribution, qui atteint tout juste 60 % de l'inertie totale (figure II-15) et d'autre part à compléter cette représentation en considérant les axes 4 et 5 pour mieux prendre en compte certaines variables. L'axe 1 oppose A1, A2 et, à un moindre degré, A3 ainsi que B1 et B2 à D1, D2 et D3. Cet axe est donc fortement lié à l'effet du DNOC à la dose la plus élevée. C'est B3 qui contribue le plus à la formation de l'axe 2 avec une très bonne qualité de représentation. Cette variable contribue pour près de 70 % à la variabilité expliquée par l'axe 2 qui détermine donc une direction spécifique d'évolution de la microflore en présence de faible quantité de biocide. Quant à l'axe 3, il est formé essentiellement par A1 et A2 dont il explique 50 % et 37,5 % de la variabilité. L'opposition entre A1 et A2 semble donc fortement liée aux réajustements spécifiques dans les échantillons témoins au cours des deux premières semaines d'incubation. Ainsi donc, les trois premiers axes principaux seraient chacun plus spécifiquement associés à l'évolution de la microflore dans les différents traitements. Les variables non expliquées par les trois premiers axes (A3 et B1, B2) contribuent à la formation des deux axes suivants : axe 4 pour A3 et axe 5 pour B1 et B2. Seul A3 est bien représenté sur le 4^{ème} axe tandis que B1 et B2 moins bien représentés s'y opposent. Les mêmes variables B1 et B2 sont bien représentées et sont quasiment confondus sur le 5^{ème} axe. Globalement, les résultats de l'A.F.C. confirment les conclusions concernant l'évolution

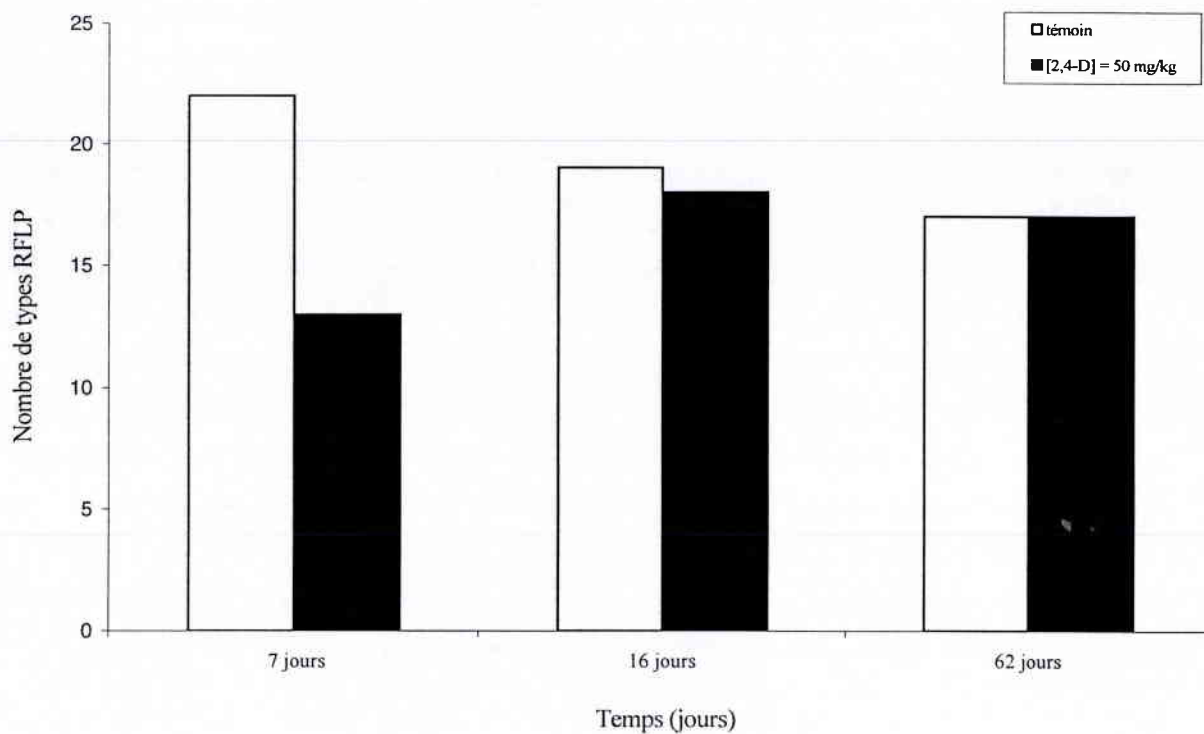


Figure II-16 : Effet du 2,4-D sur le nombre de types RFLP au sein de la microflore totale.

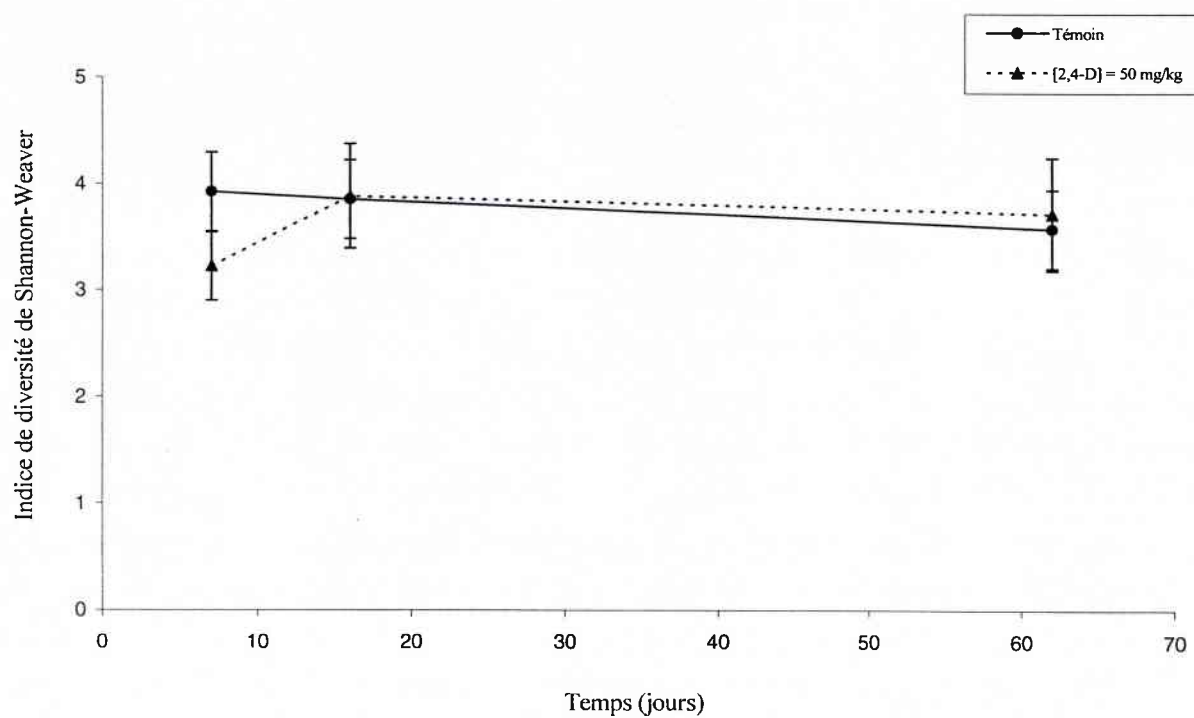


Figure II-17 : Effet du 2,4-D sur la valeur de l'indice de Shannon-Waever, calculé d'après le nombre de types RFLP (les barres verticales représentent les écart-types).

différentielle de la microflore dans les échantillons de sol témoin et traité à forte dose de DNOC. Ils confirment le caractère tardif de la distinction entre structure des populations dans les échantillons de sol témoin et traité à la faible dose et ils apportent une information complémentaire, celle d'une évolution spécifique de la microflore dans les échantillons de sol ayant reçu une faible dose de DNOC : la microflore qui s'y développe a une structure différente de celle du témoin et de celle de l'échantillon traité à la dose la plus élevée.

Une représentation simultanée de la position des différents types RFLP (lignes du tableau 2 de l'annexe VIII) et des variables (colonnes du tableau 2 de l'annexe VIII) permet d'associer de façon préférentielle certains génotypes aux différents traitements. La figure II-15 permet de distinguer trois grands groupes bactériens. Le premier de ces groupes concerne les génotypes isolés dans les échantillons pas ou faiblement traités, tels que le génotype 6, essentiellement lié à A1, les génotypes 15 et 35 dominants dans A2 ou encore les génotypes 4, 7, 9 qui se trouvent indifféremment dans tous échantillons de sol sauf ceux traités aux fortes doses de DNOC. Il s'agit probablement de souches sensibles à la forte dose de DNOC. Le second groupe de génotypes est étroitement associé aux traitements D1, D2, D3. On y trouve principalement le type 1a et secondairement les types 12, 1b, 5 et des types spécifiques de D1 (18c et 29) et de D3 (41, 44, 47, 54). Les souches correspondantes semblent présenter une tolérance vis-à-vis du DNOC appliqué à forte dose. Enfin, un troisième groupe de génotypes est recentré autour du traitement B3 avec la dominance du type 10 et la présence des types 21a, 22, 13, 42, 56, 45, 46, 49, 53. Il se confirme une nouvelle fois que le traitement à 15 mg kg⁻¹ a un caractère sélectif propre se traduisant par un remaniement spécifique sans perte importante de diversité. Il détermine une trajectoire évolutive particulière de la microflore, surtout en fin d'incubation. Une explication possible pourrait être une évolution dans le temps de la communauté bactérienne divergente par rapport à celle du témoin en raison d'une perturbation initiale liée à la présence de l'herbicide qui permettrait l'installation et le développement ultérieur d'espèces microbiennes peu représentées dans le sol témoin.

(2) Cas du 2,4-D

Le 2,4-D, à la dose de 50 mg kg⁻¹, a pour effet immédiat une diminution de 40 % du nombre de profils à 7 jours d'incubation (figure II-16). Ce phénomène s'annule très rapidement et, après deux semaines d'incubation, aucune différence ne peut plus être observée dans le nombre de types RFLP, probablement en raison de la dégradation de l'herbicide. Il faut noter que la différence initiale observée dans le nombre de génotypes correspond aussi à un indice de diversité plus faible dans le sol traité que dans le sol témoin, la différence se situant au seuil de la signification (figure II-17). D'ailleurs, l'étude de la distribution des profils RFLP recensés (figure II-18), assortie du test du χ^2 de Pearson (tableau II-8), ne permet pas de conclure à une différence significative dans les deux distributions à 7 jours ($P = 0,1739$). Peut-être faut-il y voir le résultat d'une plus faible sensibilité de ce test statistique aux espèces

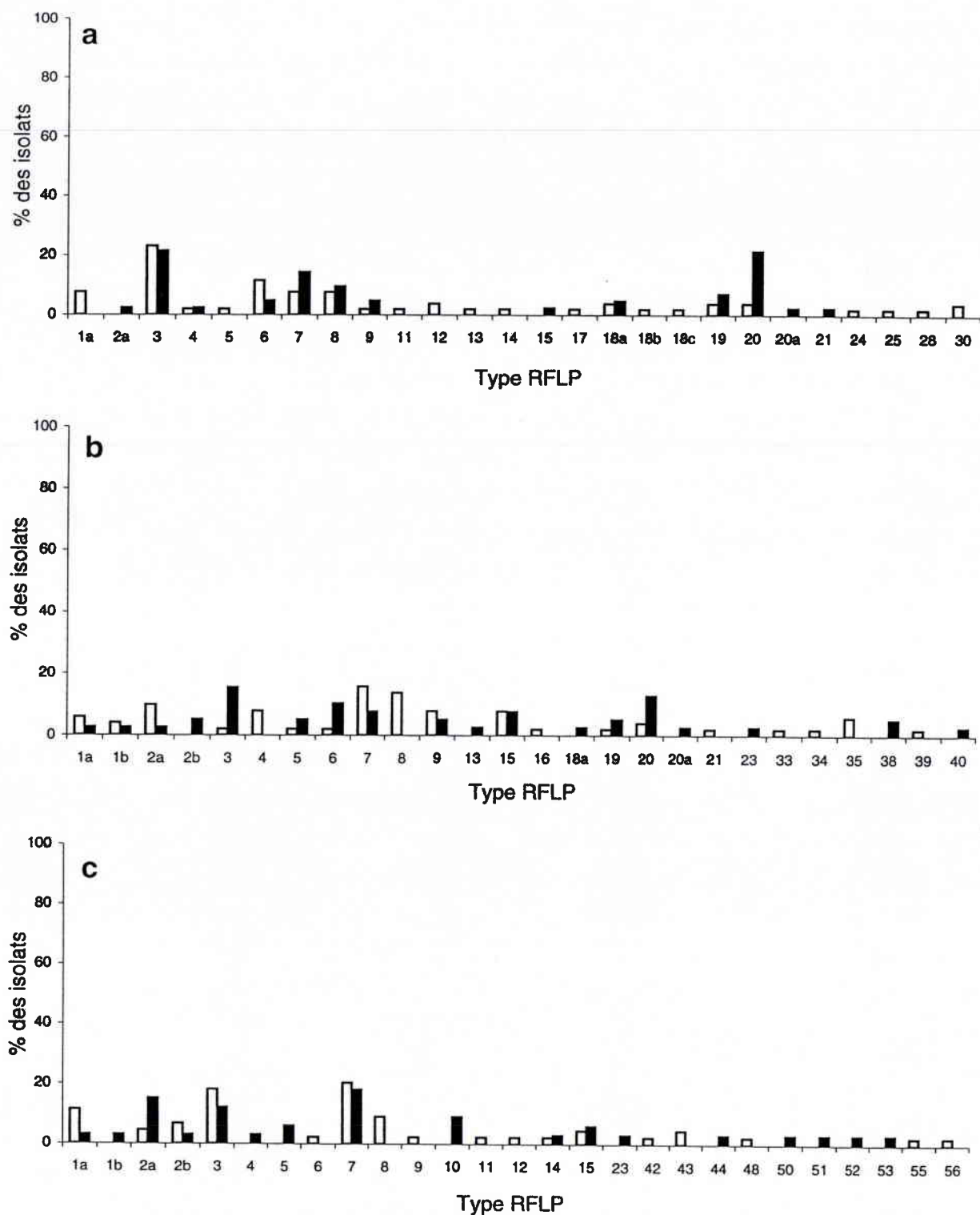
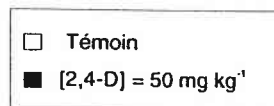


Figure II-18 : Distribution des types RFLP au sein de la microflore totale dans les échantillons de sols témoin et traités au 2,4-D.

a : après 7 jours d'incubation avec du DNOC

b : après 16 jours d'incubation avec du DNOC

c : après 62 jours d'incubation avec du DNOC



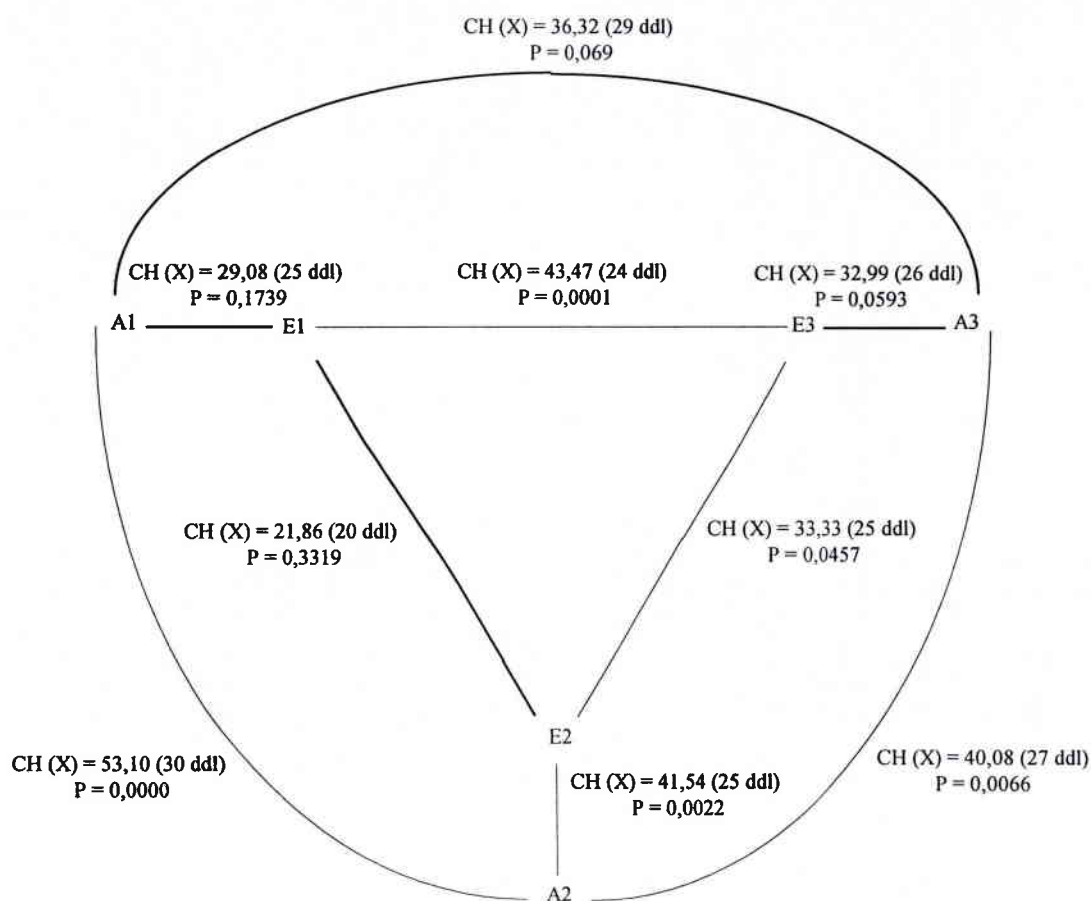


Tableau II-8 : Effet du 2,4-D sur la distribution des profils RFLP dans la population bactérienne totale estimé par le test de X^2 de Pearson.

CH(X) : valeur prise dans l'expérience par la variable aléatoire du X^2 (ddl : degrés de liberté).
P : probabilité d'obtenir sous H_0 une valeur du X^2 égale ou supérieure à la valeur observée (si $P > 5\%$, la différence n'est pas significative (-)).

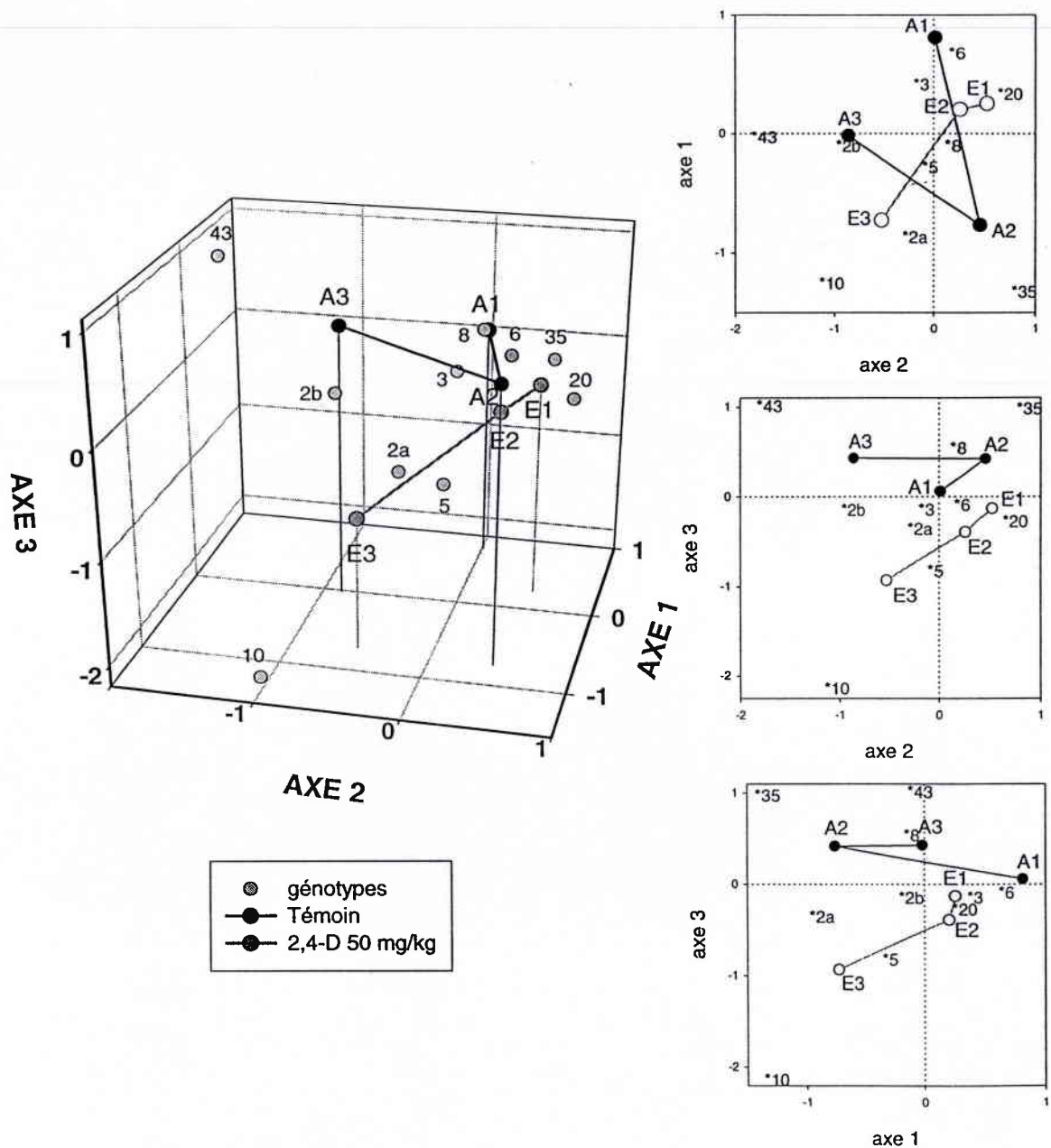


Figure II-19 : Effet du 2,4-D sur la population microbienne totale. Représentation dans l'espace factoriel principal ainsi que dans les trois premiers plans factoriels des traitements et des types RFLP associés.

faiblement représentées, comparée à celle de l'indice de Shannon-Weaver. Par ailleurs, l'analyse de l'évolution de la distribution des génotypes dans les échantillons de sol témoin et traité au 2,4-D ne confirme pas entièrement l'effet stabilisateur du 2,4-D que nous avons observé avec les morphotypes. La raison en est probablement une discrimination entre génotypes plus sûre qu'entre morphotypes.

Le tableau des données ayant servi à l'analyse factorielle de correspondance est donné dans le tableau 2 de l'annexe VIII. Les résultats obtenus à la suite de cette analyse sont rassemblés en annexe IX-C.

Etant donné que les trois premiers axes contribuent à 77,31 % de l'inertie totale, nous nous sommes limités à une représentation dans un espace à trois dimensions (figure II-19). Le premier axe est surtout lié à l'évolution qui se manifeste entre les deux états A1 et A2 qui s'opposent. L'évolution entre les états A2 et A3 est au contraire bien représentée par l'axe 2 qui oppose aussi E1 à E3. En fait, la comparaison des trajectoires suivies par les deux communautés microbiennes des échantillons de sol témoin et traité montre une évolution divergente au cours des quinze premiers jours avec apparition de génotypes particuliers à A2 (35, 4, 1b) suivie d'une relative restauration dans la période d'incubation qui suit puisque dans les états A3 et E3, on retrouve non seulement des génotypes caractéristiques (43, 11 pour A3 et 10 pour E3), mais aussi quelques génotypes communs (2b, 1a). Ce rattrapage pourrait être lié à la dégradation du 2,4-D et, avec lui, la disparition de la pression de sélection.

b. Microflore isolée sur milieu 2,4-D

Sur 240 souches testés, 214 souches ont été amplifiées par PCR, caractérisées puis regroupées selon 39 types RFLP (*Rsa* I) différents. Parmi ceux-ci, 26 sont communs à la microflore totale et 13 sont spécifiques à la microflore isolée sur milieu 2,4-D. Ce qui semblerait confirmer, qu'à côté des souches spécifiques dégradant l'herbicide, on isole aussi des génotypes non dégradants indifférents à sa présence. Ces isolats, numérotés par une lettre majuscule allant de A à M, sont caractérisés par des profils présentés figure 2 de l'annexe VII. Leurs fréquences d'apparition sont présentées dans le tableau 3 de l'annexe VIII.

On observe à nouveau la tendance qui caractérisait l'évolution de la population microbienne totale cultivable, à savoir, dans le sol témoin et le sol traité à la faible dose de DNOC, une augmentation sensible du nombre de types RFLP au cours des deux premières semaines d'incubation (figure II-20). Au cours de la période de six semaines qui suit, la diversité diminue dans le sol traité à 15 mg kg⁻¹ pour atteindre le niveau de celle du sol traité à la dose la plus élevée et qui reste relativement constante sur l'ensemble de la période d'observation. Globalement, cette observation illustre le rôle combiné de la concentration et du temps (c x t) dans les impacts écotoxicologiques. Ces tendances sont confirmées par l'évolution de l'indice de Shannon-Weaver (figure II-21). Il y a également concordance entre ce résultat global et les conclusions que l'on peut tirer de la comparaison des distributions des

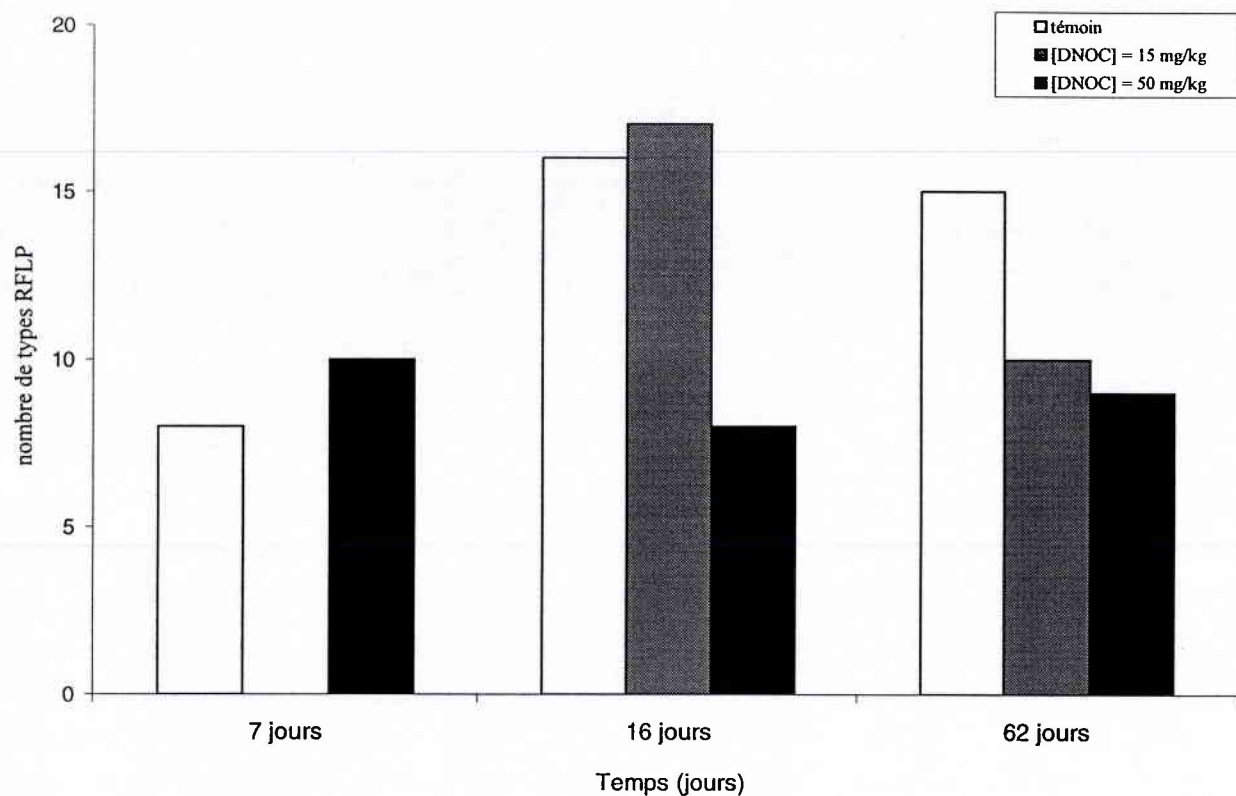


Figure II-20 : Effet du DNOC sur le nombre de types RFLP au sein de la microflore dégradant le 2,4-D.

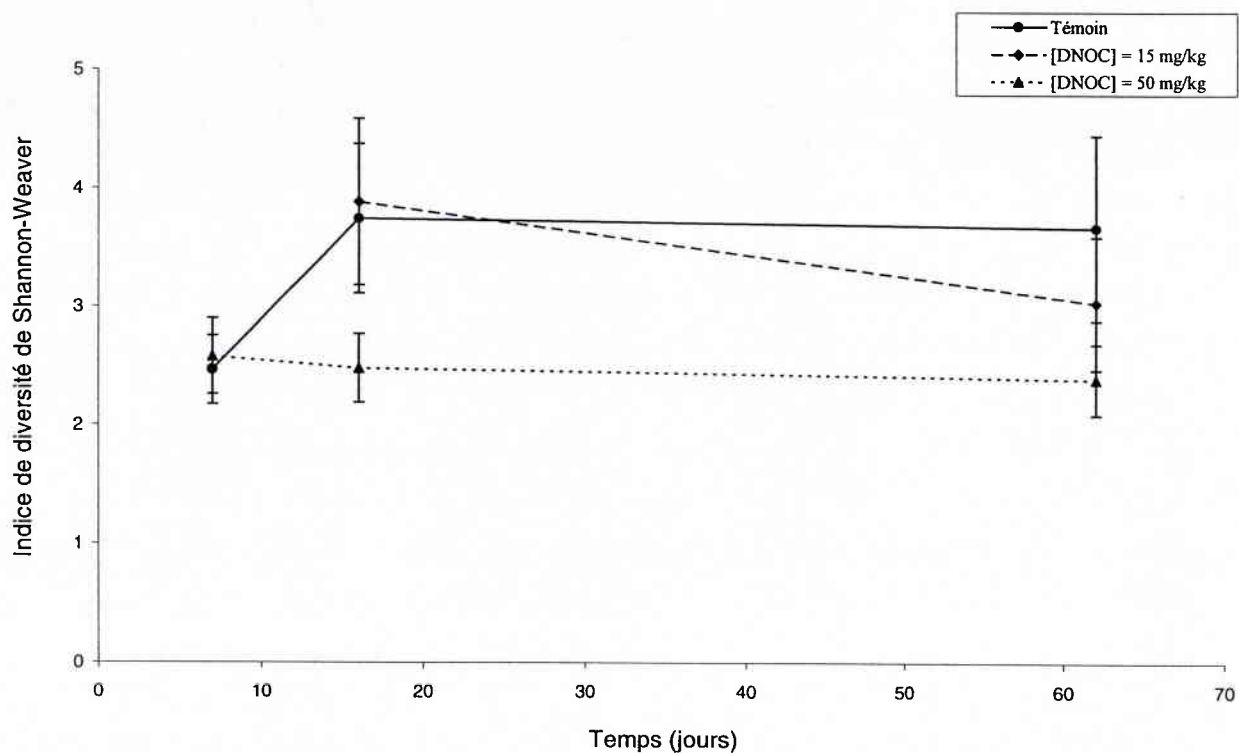


Figure II-21 : Effet du DNOC sur la valeur de l'indice de diversité de Shannon-Weaver, calculé d'après le nombre de types RFLP (les barres verticales représentent les écart-types).

types RFLP des échantillons de sol témoin et traités au cours du temps (figure II-22). Les valeurs des probabilités rapportées sur le tableau II-10 confirment très étroitement les conclusions tirées de l'examen des valeurs de l'indice de Shannon-Weaver, à savoir une certaine identité de distribution entre témoin et traité à forte dose à 7 jours, une forte analogie structurale entre témoin et traité à faible dose à 16 jours, enfin, une divergence d'évolution en fin d'incubation même si, pour chaque traitement, cette évolution tardive se fait sans perturbation fondamentale de la structure des populations, P variant de 0,1582 pour le témoin à 0,2632 pour le traité à forte dose.

L'annexe IX-C présente les principaux résultats de l'Analyse Factorielle de Correspondance réalisée à partir des fréquences d'apparition des bactéries isolées sur milieu 2,4-D (tableau 3 de l'annexe VIII).

Il est nécessaire de considérer les trois premiers axes principaux pour parvenir à une qualité de représentation telle que 70 % de la variabilité totale soit prise en compte. L'axe 1 est construit dans des proportions tout à fait comparables à partir des variables A1, D1, B3 et D3. Cet axe 1 oppose les états A1 et D1 d'une part, aux états B3 et D3 d'autre part : il traduit l'influence du DNOC sur l'évolution tardive des communautés microbiennes du sol. L'axe 2 intègre près de 60 % de A3 dont il explique 74,6 % de la variabilité. Cet axe serait lié à l'évolution tardive de la communauté microbienne en sol non perturbé. L'axe 3 est au contraire très lié à A2 qui contribue pour 54,6 % à sa construction et dont il explique 65 % de la variabilité. Cet axe serait majoritairement lié à l'évolution précoce de la communauté microbienne en sol non perturbé.

L'examen de la figure II-23 fait apparaître une double évolution dans le temps : celle des populations microbiennes des échantillons de sol témoin (trajectoire A1, A2, A3) qui se distingue nettement de celles des populations microbiennes soumises à un traitement au DNOC à forte dose (trajectoire D1, D2, D3), évolution confirmée en fin d'incubation par la trajectoire (B2, B3) des échantillons traités à la dose la plus faible. Aux différents états d'évolution sont associés plus ou moins sélectivement certains génotypes. Ainsi, les souches 6, 7 et surtout 20 sont présentes en début d'incubation puis disparaissent pratiquement totalement par la suite, cette disparition n'étant pas forcément liée à la présence du DNOC. Certaines souches apparaissent spécifiquement dans les sols traités quelle que soit la dose (souches 41 et 12 dans B3 et D3). En effet, outre la dominance de la souche 1a particulièrement prononcée dans le sol traité à la forte dose, les souches 12 et 41 sont également caractéristiques des échantillons de sol traités. A l'opposé, les génotypes E, K, L, 10, 14 et 56 sont des occupants tardifs et exclusifs du sol témoin.

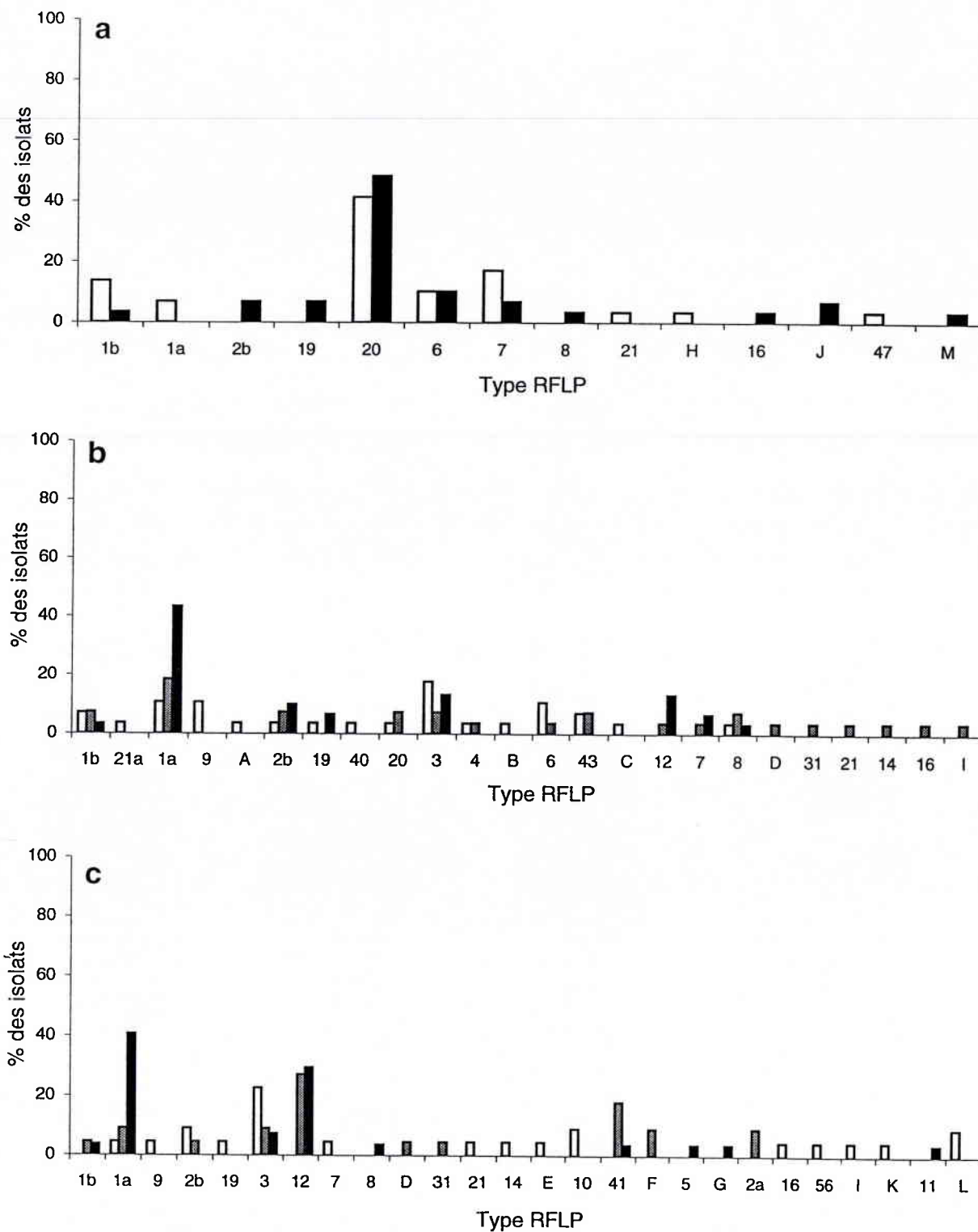
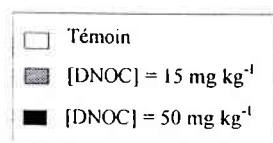


Figure II-22 : Distribution des types RFLP au sein de la microflore dégradant le 2,4-D dans les échantillons de sols témoin et traités au DNOC.

a : après 7 jours d'incubation avec du DNOC.
b : après 16 jours d'incubation avec du DNOC.
c : après 62 jours d'incubation avec du DNOC



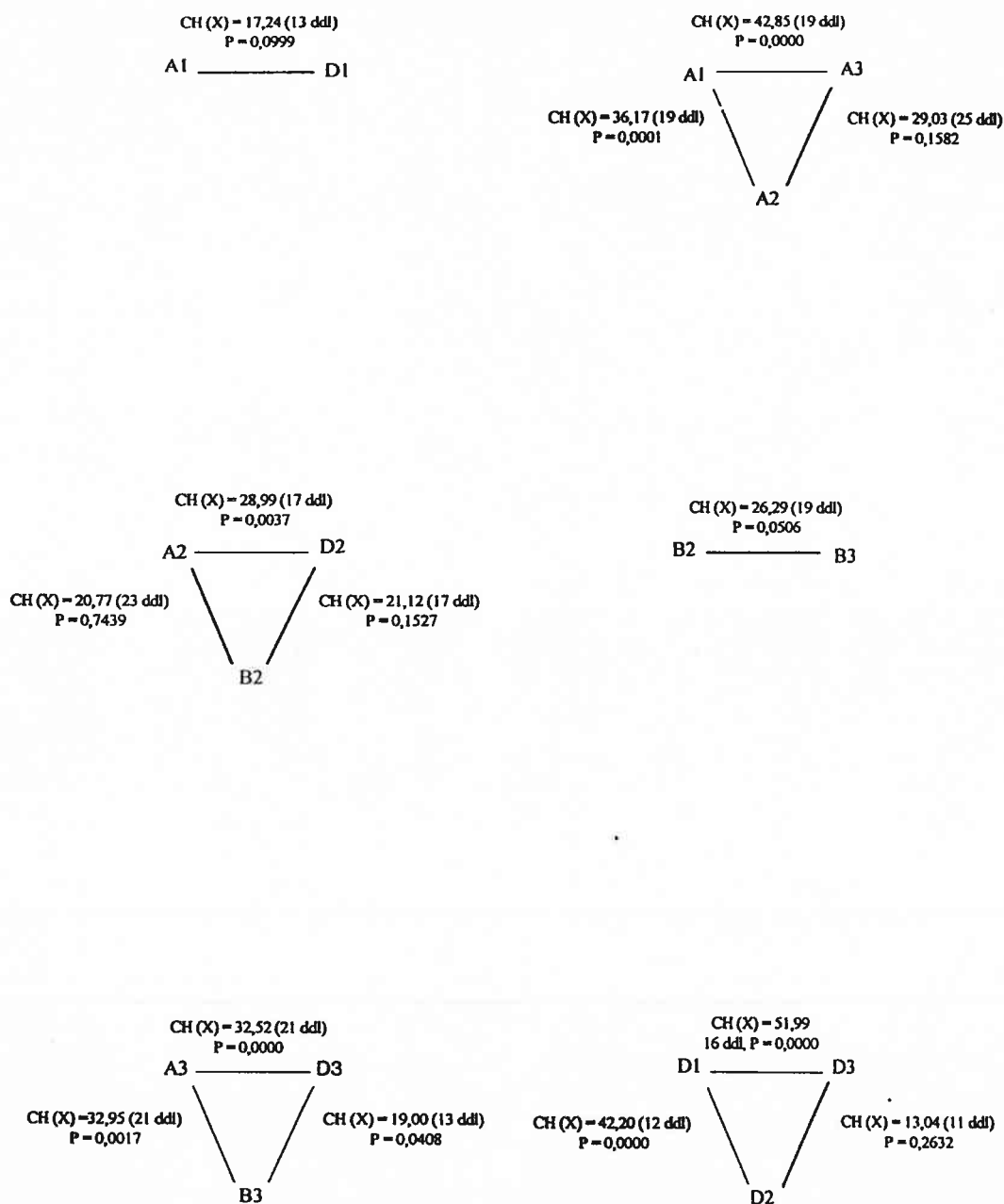


Tableau II-9 : Analyses statistiques de la distribution des différents génotypes de la population bactérienne se développant sur 2,4-D par le test de χ^2 de Pearson.

CH (X) : valeur prise dans l'expérience par la variable aléatoire du χ^2 (ddl : degrés de liberté).
P : probabilité d'obtenir sous H_0 une valeur du χ^2 égale ou supérieure à la valeur observée (si $P > 5\%$, la différence n'est pas significative (-)).

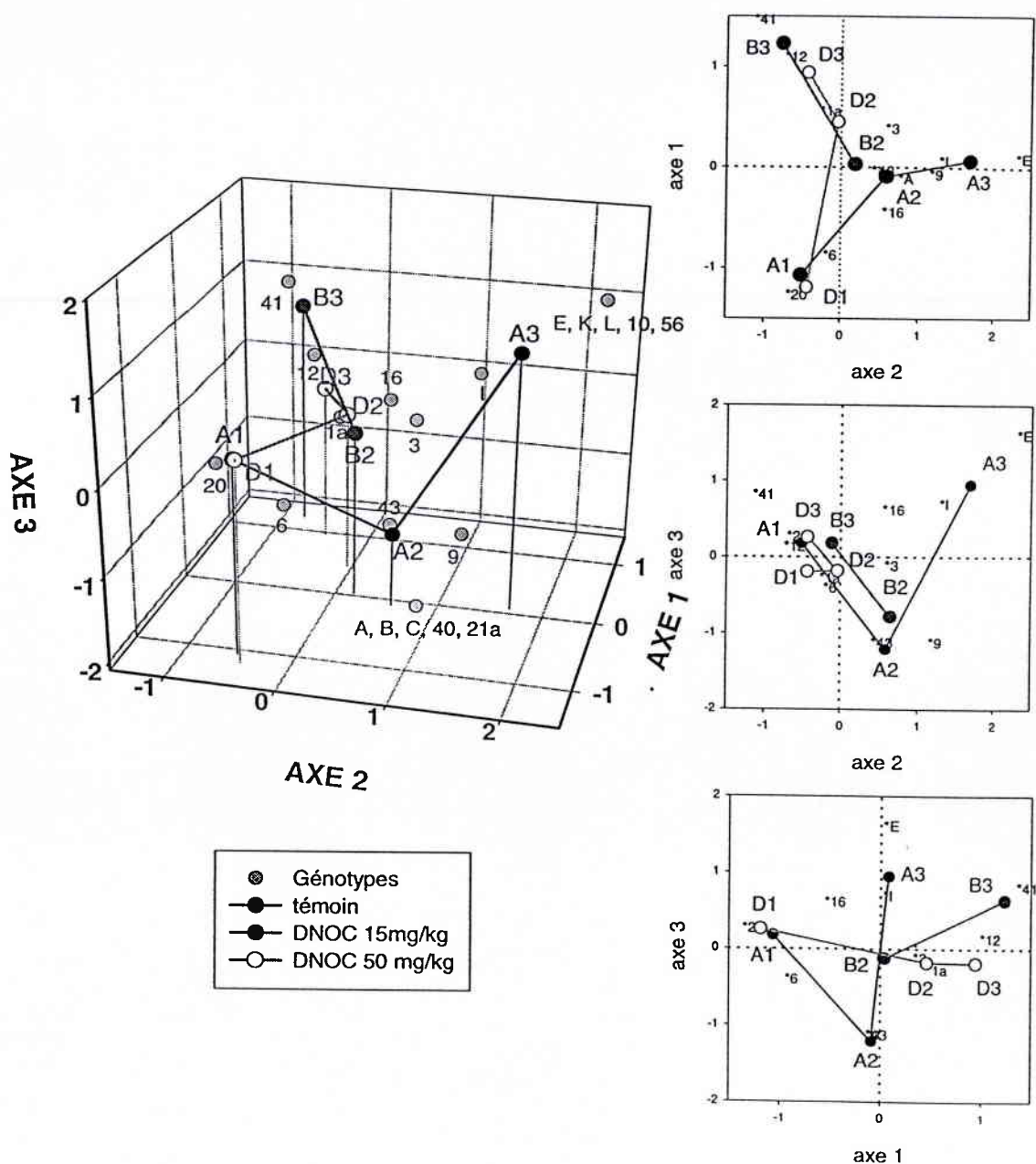


Figure II-23 : Effet du DNOC sur la population microbienne dégradant le 2,4-D. Représentation spatiale et sur les 3 premiers plans des résultats de l'a.f.c.

III. Etude de la souche dominante dans le sol traité à forte dose de DNOC

1. Identification phénotypique

L'appartenance de cette espèce au genre *Pseudomonas* a été confirmée par des caractéristiques génériques répertoriées dans le "Bergey's manual of Systematic bacteriology". L'isolat étudié (souche *1a*) est Gram -, produit une cytochrome C oxydase et forme des colonies muqueuses et envahissantes sur milieu King B (figure II-24) avec production d'un pigment fluorescent lors de l'exposition aux ultra-violets.

La détermination de l'espèce et du biovar, réalisée à l'aide de tests biochimiques, selon les méthodes de Lelliott *et al.* (1966), Stanier *et al.* (1966) et Palleroni (1984), dont les résultats sont rassemblés dans le tableau II-10, conduit à l'espèce *Pseudomonas fluorescens* biovar V.

2. Caractérisation génotypique

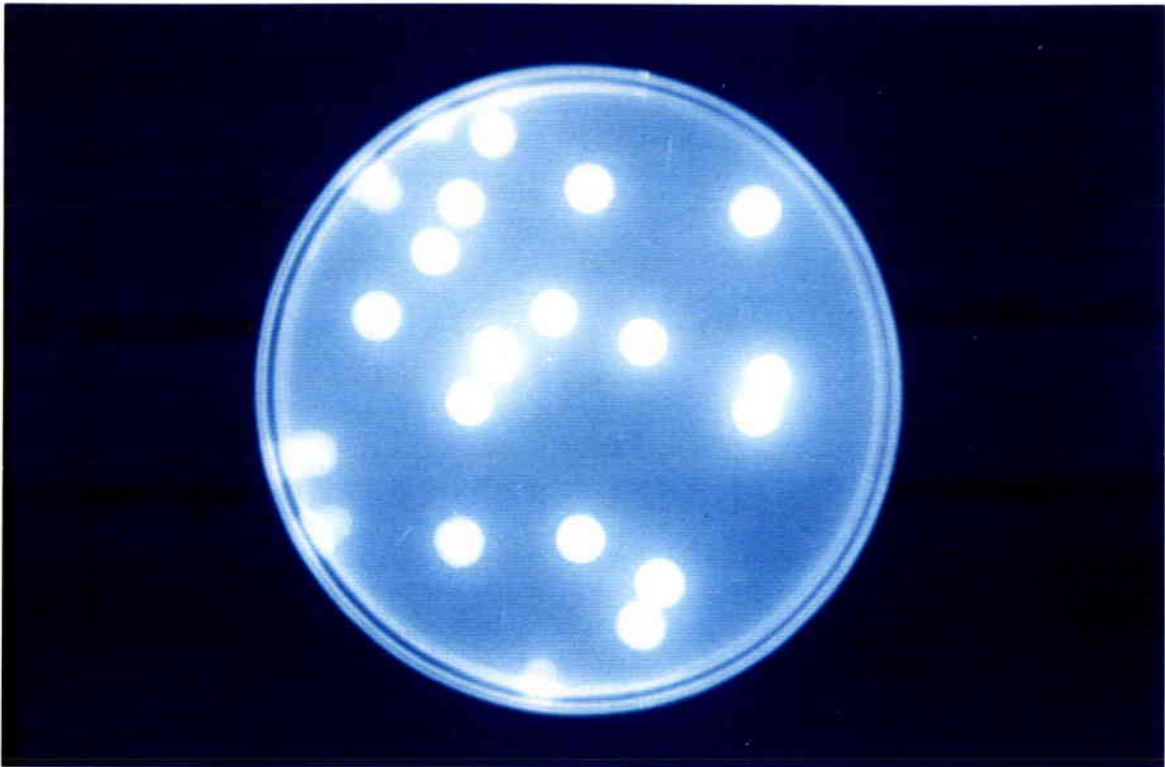
Pour vérifier que ces isolats, dominants dans le sol traité à forte dose de DNOC, proviennent bien d'une même souche et valider ainsi le regroupement effectué, un deuxième enzyme (*Nde* II) a été utilisé sur l'ADN provenant d'un échantillon de 25 souches appartenant à ce type RFLP. Tous les isolats testés présentent un profil identique (A) à l'exception d'un isolat pour lequel la bande à 260 pb est remplacée par deux bandes de taille estimée à 190 et 70 pb (profil B) (figure II-25), signifiant la présence d'un site de restriction supplémentaire. Cependant, à une exception près, nous pouvons considérer que ces isolats correspondent à une même espèce ou à une espèce phylogénétiquement proche, qu'il nous a paru intéressant de caractériser et d'étudier. Cette espèce a été identifiée au genre *Pseudomonas* après comparaison de ce profil avec ceux de souches de référence appartenant à différents genres bactériens (figure II-11).

Nous avons utilisé une caractérisation génotypique basée sur la technique de PCR-RFLP pour confirmer l'identification phénotypique de la souche *1a* en utilisant 12 enzymes de restriction. Les profils obtenus avec chaque enzyme sont présentés figure II-26. Parmi la collection des souches de *Pseudomonas* fluorescents examinée par Laguerre *et al.* (1994b), la souche de référence la plus proche de la souche étudiée (*1a*) est *P. fluorescens* biovar V CFBP2131 : sur 121 sites de restriction examinés, un seul est différent (absence du site *ScrF1* 87) par rapport à la souche CFBP2131. Différents arbres phylogénétiques ont été obtenus par analyse de parcimonie sur la base des variations existant entre les sites de restriction du gène de l'ARNr 16S. Parmi les 56 arbres obtenus très similaires les uns des autres, l'un d'eux est montré figure II-27. On constate que la souche *1a* se retrouve dans le groupe des *Pseudomonas* fluorescents en étant particulièrement proche de la souche de référence *P. fluorescens* biovar V.

Tableau II-10 : Caractérisation biochimique de la souche de type RFLP *1a* selon la méthode de Lelliot et *al.* (1966), Stanier et *al.* (1970) et Palleroni (1984).

TESTS BIOCHIMIQUES	SOUCHES				
	<i>P. fluorescens</i>			<i>P. putida</i>	<i>1a</i>
	biovar I	biovar III	biovar V		
oxydase	+	+	+	+	+
fluorescence	+	+	+	+	+
gélatine	+	+	+	-	+
saccharose	+	+	+	-	+
arabinose	+	+	+	-	+
sorbitol	+	+	+	-	+
tréhalose	+	+	+	-	+
L + tartrate	-	-	-	-	-
arginine	+	+	+	-	+
tryptophane	+	+	+	+/-	+
dénitrification	-	+	-	-	-
lévane	+	-	-	-	-

Figure II-24 : Morphologie des colonies de la souche de type RFLP *1a* après 48 heures de culture sur milieu King B à 25°C.



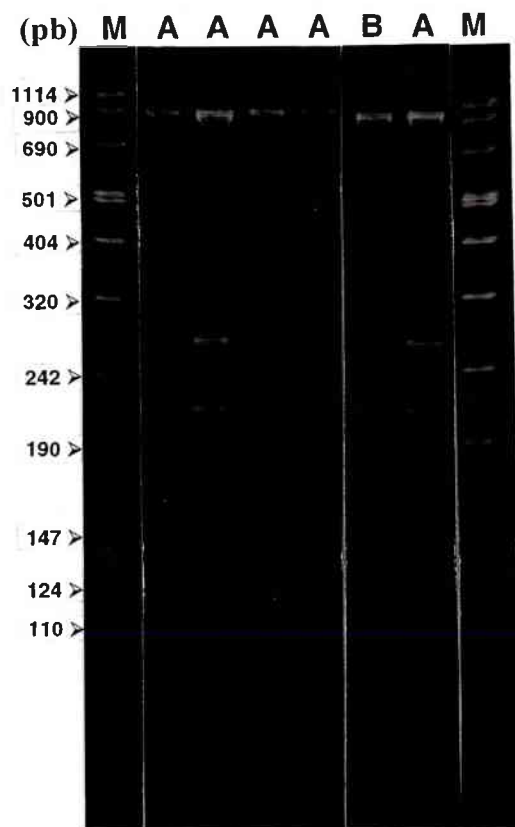


Figure II-25 : Profils de restriction de l'ADNr 16S amplifié par PCR et digéré par *Nde* II d'un échantillon d'isolats de RFLP *la*.
M correspond au marqueur de poids moléculaire (B VIII, Boehringer), A et B aux profils PCR-RFLP observés.

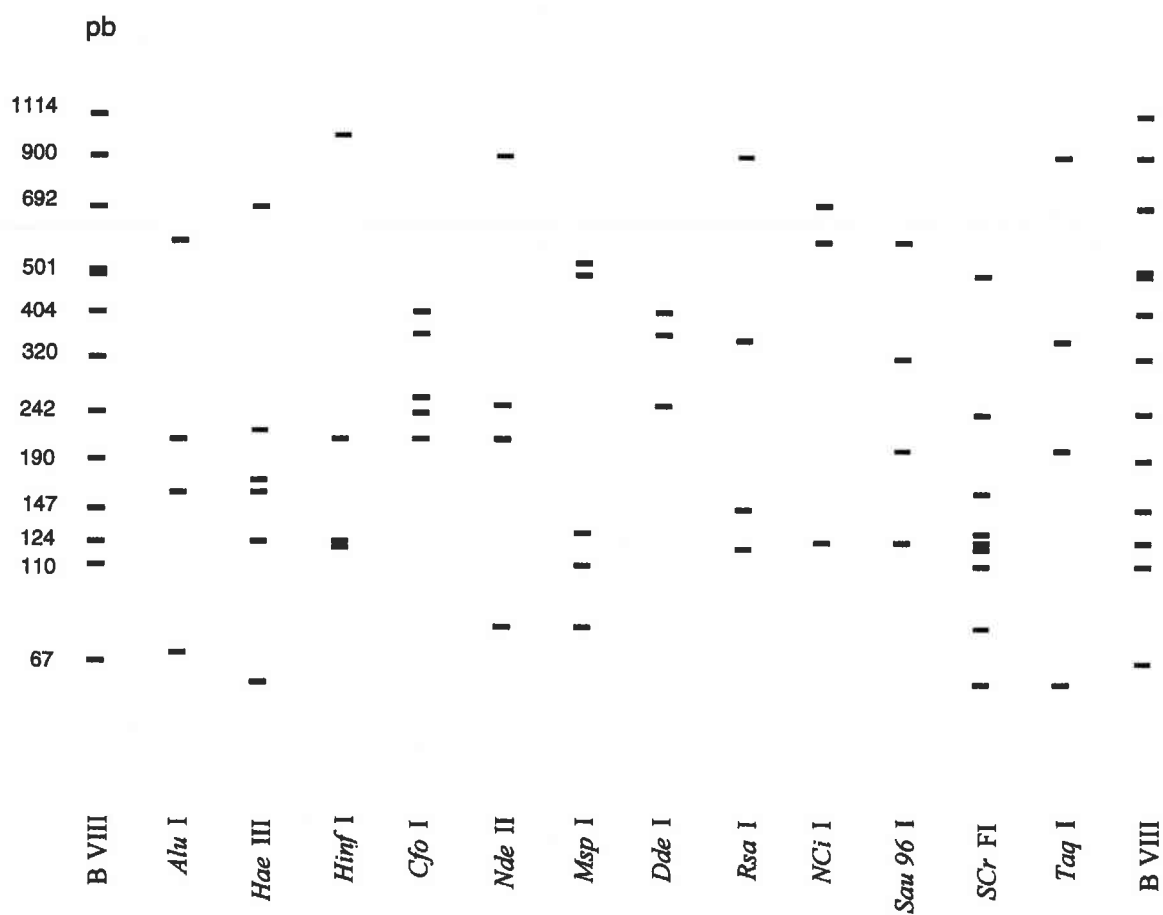


Figure II-26 : Représentation schématique des profils de restriction de l'ADNr 16S de la souche *la* digéré par les enzymes de restriction indiquées ci-dessus. La première colonne indique la position et la taille de bases (pb) des bandes du marqueur de poids moléculaire B VIII (Boehringer).

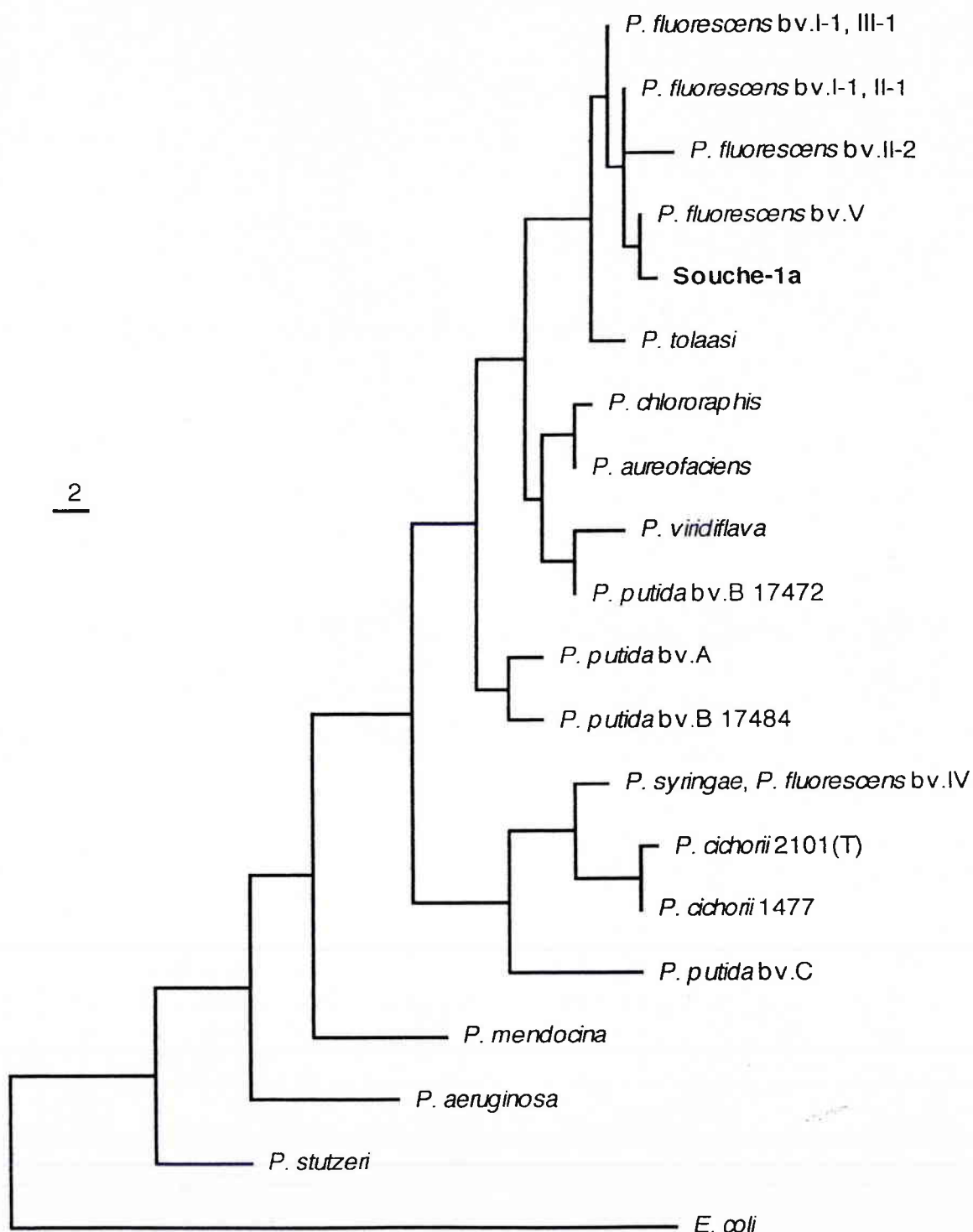


Figure II-27 : Arbre phylogénétique construit par analyse de parcimonie montrant les relations entre les espèces de *Pseudomonas* fluorescents sur la base des variations existant entre les sites de restriction de l'ADNr 16S. Les branches horizontales sont proportionnelles au nombre de changements d'états (présence ou absence d'un site).

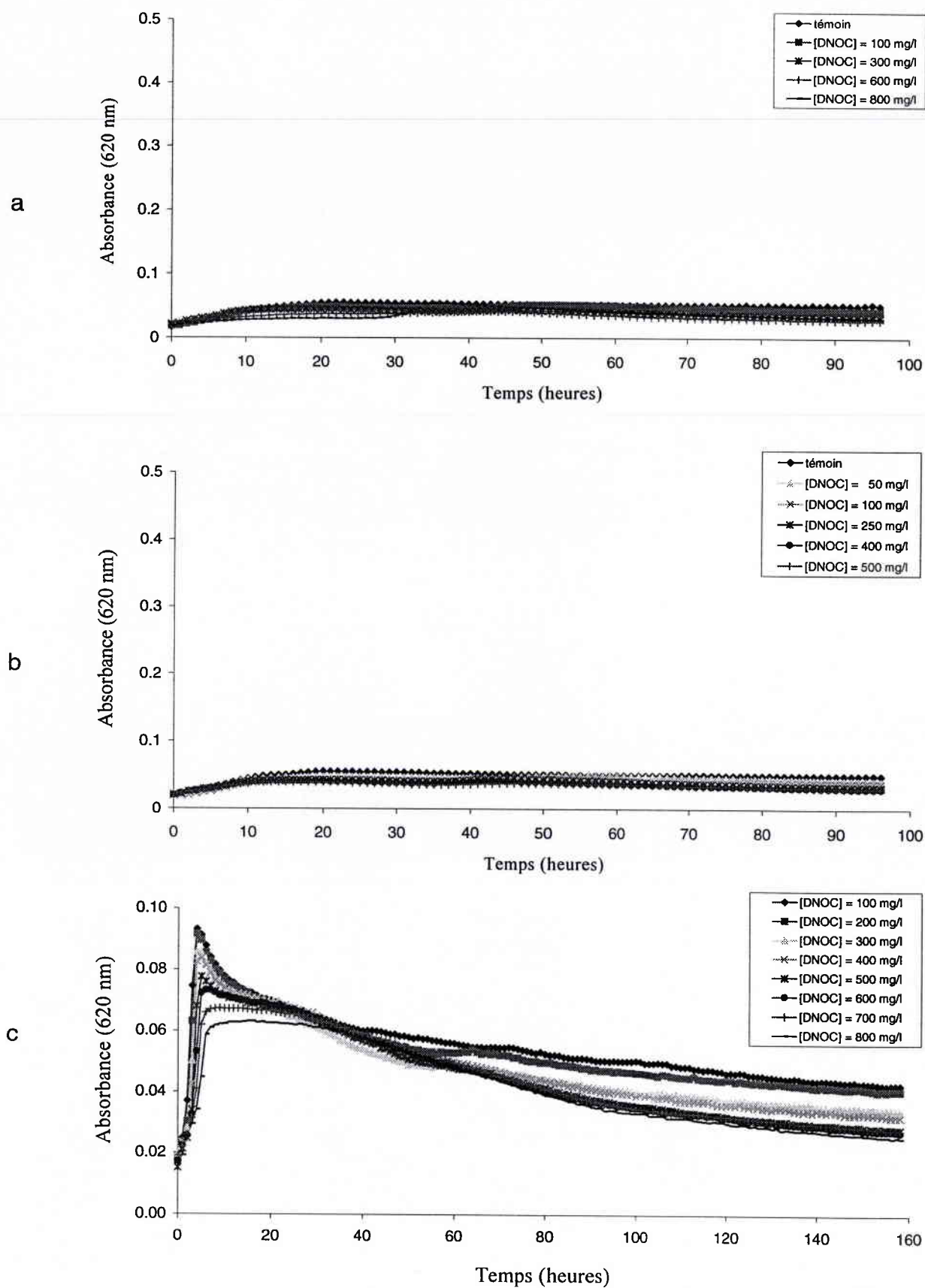


Figure II-28 : Comportement de la souche *Ia* en présence du DNOC comme seul source de carbone (a et b) et en présence d'une deuxième source carbonée (extrait de levure) (c).

IV. Caractérisation physiologique

1. Tests de croissance

Les résultats de cette expérimentation sont rapportés sur la figure II-28, représentant l'évolution de la densité cellulaire au cours du temps, la valeur du témoin non inoculé ayant été retranchée des résultats relatifs à la croissance de cette souche en présence d'extrait de levure.

Dans le cas où le DNOC constitue la seule source carbonée (a et b), aucune croissance n'est détectée alors qu'en présence d'un second substrat (c), de l'extrait de levure en faible quantité, une croissance bactérienne apparaît. Celle-ci est cependant d'autant plus inhibée que la dose de DNOC est importante et dans tous les cas, le DNOC provoque une régression sensible de la densité cellulaire dès lors que le substrat a disparu. Ce résultat suggère que, même en présence d'une source de carbone secondaire, la bactérie *1a* ne dégrade pas le DNOC et qu'il faut rechercher ailleurs l'origine de son développement dans le sol. Cette résistance vis-à-vis du DNOC est probablement à relier aux caractéristiques de la paroi de cette souche Gram-, qui pourrait représenter une barrière physique de protection limitant l'entrée du biocide dans le milieu intracellulaire.

2. Tests de dégradation

Les résultats de l'expérimentation sont rapportés figure II-29 où sont représentés en "a" un exemple de calcul de la concentration résiduelle en DNOC dans le milieu de culture par régression linéaire de l'absorbance après différents ajouts et en "b" le résultat de ces calculs au cours du temps parallèlement à l'évolution de la densité cellulaire.

Il apparaît que la concentration en DNOC dans le milieu de culture reste constante durant les 35 jours d'incubation, alors que la densité bactérienne diminue de façon exponentielle. Ce résultat confirme l'incapacité de la souche *1a* à dégrader le DNOC en même temps que sa relative sensibilité, dès lors que la concentration en herbicide est relativement élevée.

D. CONCLUSION

Au travers de l'étude qui vient d'être rapportée, nous avons abordé le problème de l'estimation de l'impact de produits phytosanitaires, le DNOC et le 2,4-D, sur la microflore du sol dans son milieu naturel. Notre objectif était de parvenir à une interprétation en termes structuraux du pouvoir déstabilisant des xénobiotiques et d'intégrer cette interprétation dans la durée afin de relativiser les éventuels effets observés en tenant compte de leur caractère transitoire. Nous avons mis à profit cette étude pour aborder deux questions, l'une relative au choix des groupes microbiens pris comme indicateurs en essayant de relier la finesse de

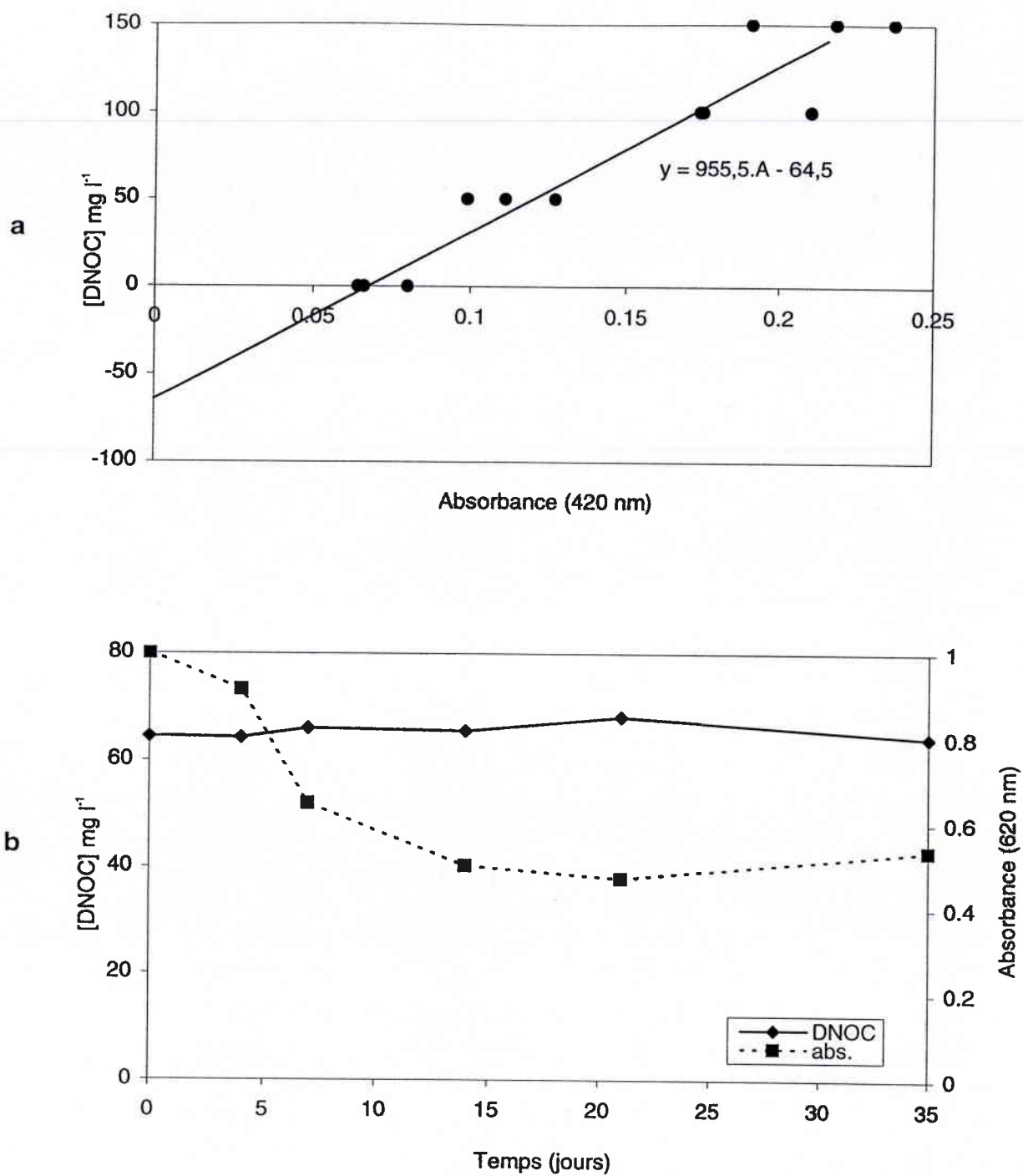


Figure II-29 : Etude de la dégradation du DNOC par la souche *Ia* .

a : régression linéaire reliant la concentration en DNOC et l'absorbance.

b : suivi de la disparition du DNOC et évolution de la croissance bactérienne au cours du temps.

l'analyse et la sûreté du diagnostic au niveau de la diversité spécifique, l'autre relative aux critères de définition des unités taxonomiques servant à définir la structure des peuplements. Pour répondre à la première question, nous avons choisi deux groupes microbiens indicateurs représentant probablement des fractions très inégales de la communauté microbienne d'un sol, les bactéries cultivables sur milieu non sélectif ou celles poussant sur un milieu dans lequel le 2,4-D constitue la source principale sinon unique de carbone et d'énergie. La structure de la communauté des bactéries cultivables sur milieu non sélectif a été établie en nous appuyant soit sur des critères morphologiques, peu discriminants mais faciles à mettre en œuvre, soit sur des critères génotypiques. Enfin, différentes techniques d'interprétation et de traitement des données nous ont permis de parvenir à des conclusions relativement convergentes sur le pouvoir déstructurant du DNOC sur les peuplements microbiens du sol.

Dans l'analyse des effets structuraux, nous nous sommes efforcés d'aborder le problème dans sa plus grande généralité, c'est-à-dire en prenant en compte les deux aspects complémentaires de richesse spécifique et de régularité de distribution. Ainsi, il apparaît nettement que le DNOC à la dose la plus élevée contribue à une diminution sensible de la richesse spécifique de la microflore totale cultivable comme de la microflore se développant sur milieu 2,4-D. La seule différence entre ces deux groupes microbiens réside dans la rapidité de réponse qui se manifeste dès 7 jours dans le premier cas et après seulement deux semaines d'exposition dans le second. Ce résultat montre aussi que si le DNOC contribue à assurer la prédominance de bactéries Gram-, cela ne se fait pas sans remaniements au sein de cette catégorie de micro-organismes. On constate une certaine convergence dans l'évolution des indices de richesse, calculés d'après le nombre de morphotypes ou le nombre de types RFLP même si dans le détail des différences apparaissent. En particulier, une définition morphotypique des individus conduit à observer une certaine progressivité dans la réponse en fonction de la concentration en herbicide alors que seule la dose la plus élevée contribue à une réduction sensible du nombre de types RFLP. De même, les effets du 2,4-D apparaissent plus transitoires s'ils sont évalués à partir du nombre de génotypes. En fait, ces différences de degré liées au caractère plus ou moins discriminant des critères retenus pour la définition des différentes unités taxonomiques sont difficilement interprétables en termes statistiques compte-tenu de l'impossibilité pratique de réaliser des répétitions qui ne nous a pas permis d'assigner une signification statistique aux résultats de nos différents comptages.

En théorie, les indices de diversité, tels que celui de Shannon-Weaver, devraient permettre d'aller plus loin dans l'analyse des modifications structurales qui affectent les communautés microbiennes soumises à des stress chimiques. Le fait qu'ils combinent les deux critères de richesse spécifique et de distribution fréquentielle leur confère une valeur plus synthétique. La réalité qui se manifeste au travers des différentes applications que nous en avons faites lors de cette étude conduit cependant à constater que le complément d'information qu'ils apportent n'est guère décisif dès lors que les effets structuraux ont une amplitude limitée et se traduisent

plus par des substitutions d'espèces que par de véritables modifications des relations de dominance.

C'est de l'analyse directe des diagrammes de distribution de fréquences des différentes espèces que l'on peut espérer apprécier au mieux le sens et l'ampleur de l'impact écologique lié à la présence d'un polluant dans le sol. C'est du moins ce qui ressort de cette étude. La contrainte majeure réside dans la lourdeur de l'approche expérimentale pour acquérir l'information nécessaire. En l'occurrence, en nous appuyant sur cette démarche, nous avons été en mesure de démontrer la réalité et la durée d'une perturbation que des approches numériques et fonctionnelles plus traditionnelles ne permettent pas toujours de mettre en évidence. Il ressort clairement de notre étude que le DNOC a des effets déstructurants qui se manifestent sur les deux groupes microbiens que nous avons considérés comme indicateurs potentiels. Leur valeur indicatrice semble par ailleurs tout à fait équivalente. Les conclusions relatives au 2,4-D sont un peu moins évidentes et cette partie de l'expérimentation mériterait d'être reprise pour confirmer les tendances qui se dégagent de notre étude.

CHAPITRE III

CONSEQUENCES METABOLIQUE

ET FONCTIONNELLE

DE LA PRESENCE DU DNOC

DANS LE SOL

CHAPITRE III

CONSEQUENCES METABOLIQUE ET FONCTIONNELLE DE LA PRESENCE DU DNOC DANS LE SOL

A. OBJECTIFS

Dans cette partie, nous nous proposons d'étudier l'effet du DNOC au travers de ces conséquences sur la diversité métabolique et fonctionnelle de la microflore du sol. Pour cela, nous nous appuierons sur deux approches complémentaires.

La première de ces approches consiste à mettre en évidence une modification des capacités métaboliques de la microflore du sol considérée comme une entité fonctionnelle. Pour cela, nous avons utilisé un système de plaques de microtitration dont chacun des 96 puits contient, outre les éléments minéraux nécessaires, un substrat carboné différent ainsi qu'un indicateur rédox, le violet de tétrazolium (Biolog GN et GP; Biolog, Inc., Hayward, California). Chaque microplaque compte donc, outre le témoin, 95 substrats différents dont la consommation entraîne la réduction de l'indicateur, lequel forme un composé insoluble violet qui s'accumule dans les corps microbiens. Ce système, mis au point par Bochner (1978), a d'abord été utilisé pour la reconnaissance et pour l'identification de souches isolées (Amy *et al.*, 1992; Klingler *et al.*, 1992; Wünsche et Babel, 1996; Mauchline et Keevil, 1991; Carnahan *et al.*, 1989; Miller et Rhoden, 1991). Plus récemment, Garland et Mills (1991) ont proposé de l'utiliser à des communautés microbiennes entières, l'empreinte métabolique servant de base de comparaison entre sols traités et non traités. Quelques exemples d'applications peuvent être trouvés dans la littérature. Ils concernent des communautés microbiennes issues d'environnement ou d'habitats différents (Garland et Mills, 1991; Garland, 1996a; Zak *et al.*, 1994; Winding, 1994; Bossio et Scow, 1995). Ces situations très tranchées, auxquelles correspondent probablement des communautés à composition et structure différentes, représentent un domaine de choix d'application de la procédure des profils métaboliques. Dans l'étude qui suit, nous avons voulu tester son pouvoir de résolution et voir si elle pourrait encore se justifier pour la comparaison de communautés dérivant l'une de l'autre par réarrangements structuraux limités tels que ceux auxquels on peut s'attendre, causés par la présence de produits phytosanitaires dans le sol.

Dans la seconde partie de cette étude, nous sommes repartis de la constatation du chapitre précédent concernant les signes évidents de perturbation par le DNOC que manifestait la communauté microbienne isolée sur milieu dans lequel le 2,4-D représentait la principale source de carbone et d'énergie. Nous avons voulu voir comment cette sensibilité particulière, observée

au niveau de souches isolées, se traduisait au niveau du fonctionnement de la communauté microbienne dégradante considérée dans son milieu naturel. Cependant, pour des groupes physiologiques restreints, l'échelle spatiale considérée est très importante. Ainsi, on sait maintenant que la diversité des cinétiques de dégradation du 2,4-D, qui caractérise différentes souches microbiennes naturelles isolées de différents milieux (Greer *et al.*, 1992), se retrouve probablement au sein de la communauté dégradante présente dans un sol et ne fait que traduire d'une part la convergence fonctionnelle de gènes ayant des filiations différentes, d'autre part la multiplicité des arrangements des gènes ou des opérons lors de la structuration de l'information génétique (Amy *et al.*, 1985; Don et Pemberton, 1985; Ka *et al.*, 1994; Matheson, 1994; Fulthorpe *et al.*, 1995). En constituant une première étape d'intégration, l'agrégat de sol constitue probablement une entité locale où non seulement la diversité spécifique trouve toujours un terrain d'expression mais où, par ailleurs, les relations de complémentarité métabolique peuvent contribuer à élargir le spectre des capacités physiologiques des communautés microbiennes naturelles. Ainsi, une étude réalisée par Soulas et Fournier (1981) sur la dégradation du 2,4-D dans les agrégats de sol de 2 à 3 mm de diamètre faisait apparaître, dans les cinétiques de dégradation de l'herbicide, une diversité trouvant son origine dans les caractéristiques physiologiques différentes des communautés microbiennes dégradantes élémentaires présentes au sein de chaque agrégat. Par la suite, Cartieaux (1995) a confirmé que ces communautés constituaient des unités fonctionnelles à représentation largement plurispécifique.

Les objectifs du travail que nous avons engagé étaient :

- de caractériser la diversité métabolique de la microflore du sol, estimée par son aptitude à dégrader un ensemble de substrats carbonés appartenant à des familles différentes et d'étudier l'effet du DNOC sur cette diversité.

- de caractériser la diversité fonctionnelle d'agrégats de sol vis-à-vis de la dégradation du 2,4-D, son évolution au cours du temps, ainsi que l'effet du DNOC sur cette diversité fonctionnelle. Par ailleurs, nous avons comparé les effets observés sur ces unités fonctionnelles élémentaires considérées individuellement et ceux que l'on observe dans des massifs d'agrégats, où les phénomènes de recolonisation par des espèces peu ou pas sensibles peuvent contribuer à masquer ou à limiter dans le temps les effets d'une perturbation écotoxicologique.

B. MATERIEL ET METHODES

I. Produits et préparation initiale des échantillons de sol

Les principales caractéristiques des différents produits froids et marqués sont données en annexe I-a.

Les méthodes de prélèvement et de préparation initiale du sol sont décrites dans le chapitre II et l'annexe I.

Le sol a été traité au DNOC suivant le protocole établi dans le chapitre II. Le DNOC, en solution éthanolique, est d'abord introduit, à raison de 250 μ l de solution dans 1 g de sol broyé et tamisé à 100 μ m. C'est ce support solide imprégné de DNOC qui, après évaporation de l'éthanol sous ventilation pendant 4 heures, sert à traiter les échantillons de 50 ou 100 g de sol sous forme de massifs d'agrégats de taille comprise entre 2 et 3 mm.

Pour l'étude relative à l'influence du DNOC sur la diversité métabolique de la microflore du sol, des échantillons de 50 g (équivalent sol sec) ont été traités au DNOC à des concentrations de 15, 30 et 50 mg kg⁻¹. Pour l'étude relative à l'influence du DNOC sur la diversité fonctionnelle, les échantillons de sol étaient de 100 g (équivalent sol sec) et les concentrations en DNOC de 20 et 40 mg kg⁻¹ lors d'une première expérience. Ces mêmes quantités étaient de 50 g pour des concentrations en DNOC de 10, 20, 30 et 40 mg kg⁻¹ lors d'une seconde expérience.

Les échantillons de sol traité et témoin ont été incubés à 20°C et à 80 % de l'humidité équivalente dans des fioles en verre de 500 ml recouvertes d'un film de parafilm destiné à limiter l'évaporation de l'eau sans supprimer les échanges gazeux. C'est dans ces échantillons primaires que nous avons essayé de caractériser l'évolution au cours du temps de la diversité métabolique de la microflore totale et de la diversité fonctionnelle de la microflore dégradant le 2,4-D présente dans différents agrégats. Pour cela, après différentes périodes d'exposition au DNOC, soit après 7, 16 et 62 jours de contact avec l'herbicide lors de l'étude relative à la diversité métabolique ou après 2, 9, 15 et 28 jours puis 2, 4, 6, 16, 30 et 60 jours respectivement pour la première et seconde expérience consacrée à l'étude de la diversité fonctionnelle, des échantillons secondaires ont été préparés. Il s'agissait, soit de lots d'agrégats de 10 g pour les travaux concernant la diversité métabolique ou de 2 g pour la première expérience propre à l'étude de la diversité fonctionnelle, soit d'agrégats isolés pour la deuxième expérience de cette dernière étude.

Figure III-1 : Substrats carbonés inclus dans les microplaques Biolog GP et GN.

ACIDES ORGANIQUES			COMPOSES AZOTES ORGANIQUES			CARBOHYDRIQUES			DIVERS		
n37	p54	ac. acétique	n62	p70	ac. succinamique	n10	p13	L-arabinose	n02	p02	α-cyclodextrine
n46	p55	ac. α-hydroxy butyrique	n64	p73	alaninamide	n11	p14	D-arabitol	n03	p04	dextrine
n47	p56	ac. β-hydroxybutyrique	n65	p74	D-alanine	n12	p16	cellobiose	n04	p05	glycogène
n48	p57	ac. γ-hydroxybutyrique	n66	p75	L- alanine	n14	p17	D-fructose	n05	p08	tween 40
n49	p58	ac. p-hydroxyphénoxy acétique	n67	p76	L-alanyl-glycine	n15	p18	L-fucose	n06	p09	tween 80
n52	p59	ac. α-kétoglutarique	n68	p77	L-asparagine	n16	p19	D-galactose	n35	p66	méthyl pyruvique
n53	p60	ac. α-kétovalérique	n70	p78	ac. L-glutamique	n17	p21	gentiobiose	n36	p67	mono-méthyl succinique
n56	p68	ac. propionique	n72	p79	ac. glycyl L-glutamique	n18	p23	α-D-glucose	n86	p87	inosine
n60	p71	ac. succinique	n79	p80	ac. L-pyroglutamique	n19	p24	m-inositol	n87	p89	uridine
n38		ac. cis-aconitique	n81	p81	L-sérine	n20	p25	α-D-lactose	n88	p88	thymidine
n39		ac. acitrique	n90	p82	putrécine	n21	p26	lactulose	n93	p84	glycérol
n40		ac. formique	n63		glucuronamide	n22	p27	maltose	n94	p96	D, L-α-glycérol phosphique
n41		ac. D-lactone galactonique	n69		ac. L-aspartique	n23	p29	D-mannitol	n95	p94	glucose-1-phosphate
n42		ac. D-galactonique	n71		ac. glycyl L-aspartique	n24	p30	D-mannose	n96	p95	glucose-6-phosphate
n43		ac. D-gluconique	n73		L-histidine	n25	p32	D-mélibiose	n85		ac. urocanique
n44		ac. D-glucosaminique	n74		hydroxy L-proline	n26	p37	β-méthyl D-glucoside	n91		2-aminoéthanol
n45		ac. D-glucuronique	n75		L-leucine	n27	p40	D-psicose	n92		2,3-butanediol
n50		ac. itaconique	n76		L-ornithinine	n28	p41	D-raffinose		p03	β-cyclodextrine
n51		ac. α-kéto butyrique	n77		L-phénylalanine	n29	p42	L-rhamnose		p06	inuline
n54		ac. D, L-lactique	n78		L-proline	n30	p46	D-sorbitol		p62	ac. D-méthyl ester lactique
n55		ac. malonique	n80		D-sérine	n31	p48	sucrose		p83	2,3-butanediol
n83		ac. D, L-carnitine	n82		L-thréonine	n32	p50	D-tréhalose		p85	adénosine
n57		ac. quinique	n83		D, L-carnitine	n33	p51	turanose		p86	2'-déoxyadénosine
n58		ac. D-saccharique	n84		γ-butyrique	n34	p52	xylitol		p90	adénosine-5'-monophosphate
n59		ac. sébacique	n89		phényléthylamine	n08	p10	N-acéthyl-D-glucosamine		p91	thymidine-5'-monophosphate
p63		ac. L-lactique	p61		lactamide	n07		N-acéthyl-D-galactosamine		p92	uridine-5'-monophosphate
p64		ac. D-malique				n9		adonitol		p93	fructose-6-phosphate
p65		ac. L-malique				n13		érythritol			
p69		ac. pyruvique					p7	mannane			
p72		ac. N-acéthyl L-glutamique					p11	N-acéthyl-D-mannosamine			
							p12	amygdaline			
							p15	arbutine			
							p20	ac. D-galacturonique			
							p22	ac. D-gluconique			
							p28	maltotriose			
							p31	D-mélézitose			
							p33	α-méthyl D-galactoside			
							p34	β-méthyl D-galactoside			
							p35	3-méthylglucose			
							p36	α-méthyl D-glucoside			
							p38	α-méthyl D-mannoside			
							p39	palatinose			
							p43	D-ribose			
							p44	salicine			
							p45	sédoheptulosane			
							p47	stachyose			
							p49	D-tagatose			
							p53	D-xylose			

p et n représentent respectivement un substrat constitutif de la microplaque Biolog GP ou GN suivi d'un chiffre qui correspond au numéro du puits dans lequel se trouve le substrat considéré.

II. Etude de l'influence du DNOC sur la diversité métabolique de la microflore du sol

1. Préparation des suspensions de sol

Les suspensions de sol ont été réalisées en suivant le même protocole que celui décrit au chapitre II. Après dispersion du sol, des suspensions-dilutions ont été faites dans du liquide de Ringer. 3 ml de la dilution 10^{-3} ont été introduits dans 27 ml de liquide de Ringer de façon à inoculer trois plaques de microtitration.

2. Préparation des plaques de microtitration

Deux types de plaques de microtitration de type Biolog ont été utilisés : Gram positif (GP) et Gram négatif (GN) qui regroupent respectivement les substrats biochimiques spécifiques à l'identification des bactéries Gram+ et Gram- et dont la composition est donnée figure III-1. Dans notre cas, la combinaison des deux nous a permis de tester un large nombre (131) de substrats carbonés pour évaluer la diversité fonctionnelle de la communauté microbienne du sol.

Les plaques Biolog ont été inoculées avec la suspension de sol préalablement préparée, à raison de 100 μ l par puits. Trois répétitions, soit trois microplaques, ont été réalisées pour chaque traitement de sol. La suspension a été agitée régulièrement pour assurer une dispersion homogène des particules de sol et des micro-organismes. Les microplaques ont été ensuite incubées à 20°C. La formation de formazan dans chaque puits est mesurée après 2, 3, 4, 9 jours par un lecteur de microplaque (MR 5000, Dynatech) relié à un ordinateur. Bien que le pic d'absorption du tétrazolium se situe à 590 nm, nous avons utilisé une absorbance de 490 nm en raison de l'équipement particulier de notre lecteur.

3. Traitements des données et interprétations

Pour les besoins des différentes interprétations, les données brutes, exprimées sous forme d'absorbances mesurées au cours du temps, ont été transformées de la façon suivante. Une première correction a consisté à calculer, pour chaque point de lecture de l'absorbance, une coloration moyenne par plaque, CM_t , à l'aide de la formule :

$$CM_t = \frac{\sum_{i=1}^{i=95} (A_i^t - B_t)}{95} \quad (\text{III-1})$$

dans laquelle A_i^t représente l'absorbance dans le puits i au temps de lecture t et B_t l'absorbance correspondante dans le puits témoin sans substrat. Le même type de calcul a été refait pour les différents types de substrats en distinguant 4 familles chimiques : les carbohydrates, les acides organiques, les composés azotés organiques et les substrats divers. Les cinétiques de développement des colorations moyennes, appréciées pour l'ensemble des

substrats ou pour chaque famille chimique nous ont servi à une première estimation globale de l'effet du DNOC sur l'activité métabolique de la microflore du sol.

Le calcul des colorations moyennes nous a ensuite permis de corriger nos données pour tenir compte d'une éventuelle variation dans le développement de la couleur d'une plaque à l'autre. Pour cela, nous avons utilisé un traitement semblable à celui préconisé par Garland et Mills (1991), puis par Garland (1996) consistant à normaliser la coloration de chaque puits en divisant l'absorbance correspondante au temps t , A_t^i , diminuée du blanc, B_t , par la coloration moyenne, CM_t :

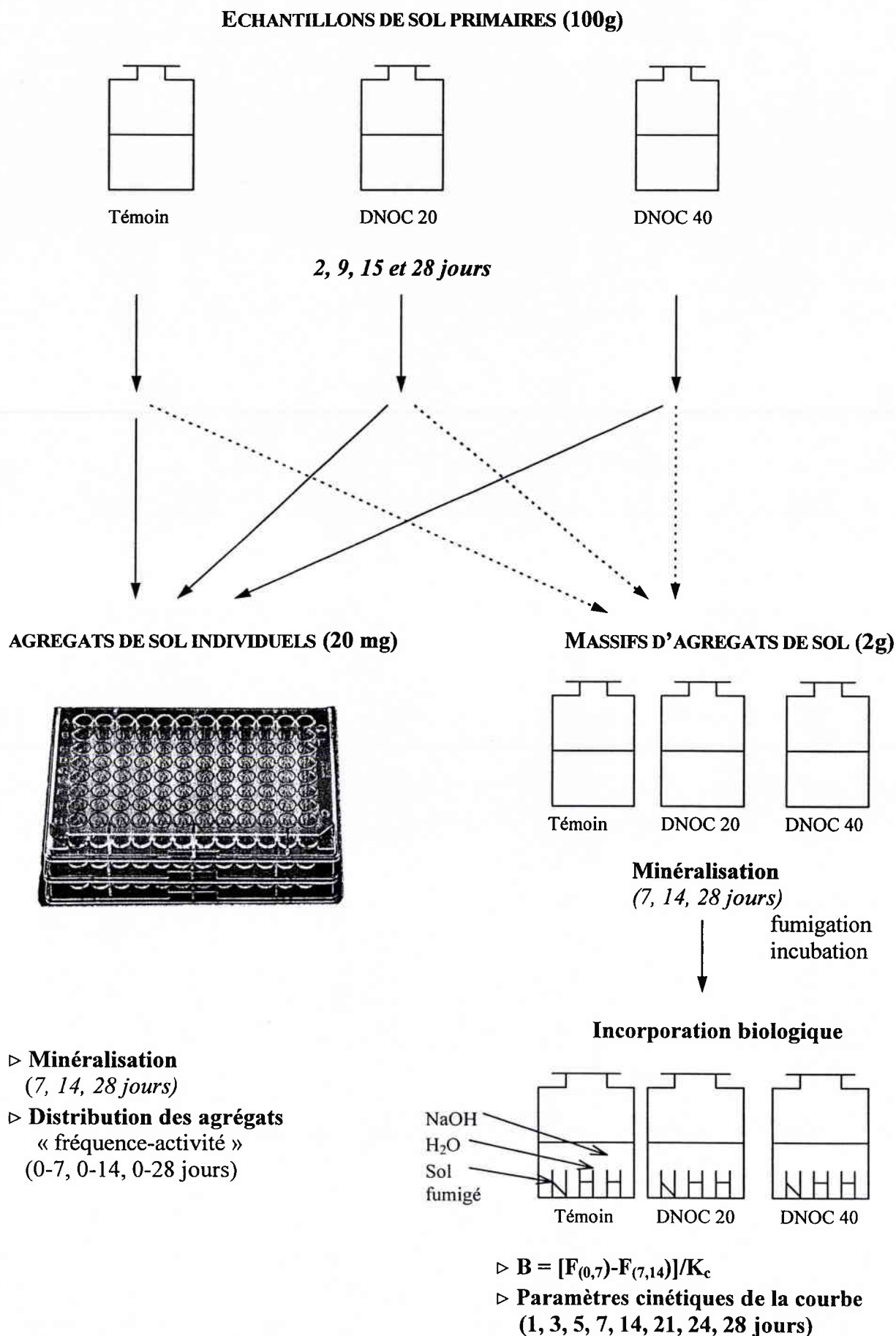
$$C_i^t = \frac{A_t^i - B_t}{CM_t} \quad (\text{III-2})$$

Ces données transformées ont ensuite été soumises à une analyse en composantes principales (A.C.P.), en utilisant le logiciel STATITCF. Cette méthode statistique essentiellement descriptive permet de présenter sous forme graphique le maximum de l'information contenue dans un tableau de données constitué en lignes par des individus (traitements DNOC) sur lesquels sont mesurés des variables quantitatives (utilisation de substrats carbonés). La technique utilisée en A.C.P. pour passer des p variables quantitatives initiales toutes plus ou moins corrélées entre elles en q variables quantitatives non corrélées appelées composantes principales, consiste à projeter le nuage des individus sur un espace W à q dimensions. Cependant, compte-tenu de l'impossibilité de traiter des tableaux prenant en compte l'intégralité des données concernant l'ensemble des substrats pour les trois prélèvements de sol, nous avons traité les données par lots correspondant aux différentes catégories de produits considérées séparément pour les deux types de microplaques GN et GP.

Dans une deuxième approche, nous avons utilisé un autre type de transformation consistant à substituer à l'ensemble des points de chaque cinétique une valeur unique, V_i , centrée et normalisée par rapport à la coloration moyenne de la plaque au temps t et calculée selon la formule :

$$V_i = \sum_t \frac{(A_t^i - B_t) - CM_t}{CM_t} \quad (\text{III-3})$$

Dans ce cas, nous avons analysé ensemble les résultats relatifs au trois prélèvements de sol, en opérant en deux étapes successives dont le but consistait d'abord à trier les substrats les plus discriminants au sein de chaque famille chimique, puis à faire une analyse globale sur les substrats retenus, toutes familles chimiques confondues. Le choix des substrats les plus discriminants a été réalisé à l'aide d'une série d'A.C.P. préliminaires appliquées séparément à chaque famille chimique. Nous avons alors sélectionné les substrats les mieux représentés dans le premier espace principal à trois dimensions, c'est-à-dire ceux pour lesquels la somme des



carrés des corrélations avec les trois premiers axes principaux était supérieure à 0,7 (en considérant comme variables représentatives celles pour lesquelles Σr^2 était supérieure à 0,7). Ce choix étant fait, nous avons ensuite réalisé une A.C.P. globale sur l'ensemble des substrats ainsi triés. Les données prises en compte dans toutes les analyses sont les moyennes de trois répétitions.

4. Etude de l'effet du DNOC sur la diversité fonctionnelle

a. Première expérience

(1) Objectifs et plan de réalisation

Le premier objectif était d'apprécier l'importance des phénomènes de recolonisation et de substitution qui, dans des échantillons de grande taille, contribuent à pondérer, tamponner ou même restaurer une fonction alors que de nombreux micro-organismes qui la contrôlent, disséminés dans différents agrégats, voient leur activité réduite en présence d'un biocide. Pour cela, nous avons comparé les conséquences d'un traitement au DNOC sur l'évolution dans le temps de l'activité de la microflore dégradant le 2,4-D analysée soit, dans des agrégats individuels soit, dans des massifs d'agrégats. Les prélèvements d'agrégats ont été réalisés après 2, 9, 15 et 28 jours d'exposition au DNOC. L'activité de dégradation des communautés microbiennes a été estimée à la fois par suivi des cinétiques de minéralisation et d'incorporation biologique du carbone du 2,4-D. Les différentes étapes de l'expérimentation sont présentées figure III-2.

(2) Minéralisation du carbone du 2,4-D : Etude en agrégats individuels

1). Dispositif expérimental

A partir de chacun des sols traités au DNOC à 20 et 40 mg kg⁻¹ et du contrôle, des agrégats de sol de poids moyen d'environ 20 mg ont été prélevés, puis répartis individuellement dans les 96 puits d'une plaque de microtitration (Microwell Nunclon Delta, France). Pour chaque traitement (concentration en DNOC et contrôle), 3 répétitions, soit 3 plaques de microtitration, ont été réalisées.

Chaque agrégat a été traité avec 5 µl d'une solution aqueuse tamponnée (tampon phosphate, pH = 7) de 2,4-D-¹⁴C marqué sur le carbone 1 de la chaîne latérale, de telle sorte que chaque agrégat de sol reçoive une radioactivité de 0,12 kBq pour une concentration initiale de 2,5 mg kg⁻¹ de sol.

Les microplaques ont été ensuite recouvertes d'un filtre de papier Whatman 3MM (110 x 73 mm) imbibé d'une solution d'hydroxyde de baryum saturée (annexe II-b), puis d'une plaque métallique en dural (130 x 85 mm) maintenue par quatre pinces afin d'assurer une bonne étanchéité du système. Dans chaque puits où une dégradation apparaît, le ¹⁴CO₂ libéré vient se

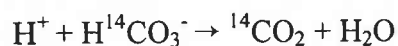
fixer dans la zone circulaire du filtre qui obstrue la partie supérieure du puits où le précipité de carbonate de baryum, résultant de la réaction entre le $^{14}\text{CO}_2$ et l'hydroxyde de baryum, reste localisé au-dessus de chaque puits (Tabor *et al.*, 1976; Fulthorpe R. *et al.*, 1996). Les filtres ont été prélevés périodiquement, soit après 7, 14 et 28 jours, puis immergés dans un bain d'acétone et séchés à l'étuve à 105°C pendant 10 minutes. Ils ont été ensuite conservés dans du papier aluminium avant d'être analysés qualitativement par autoradiographie et quantitativement par radioimagerie.

2). Quantification du dégagement du $^{14}\text{CO}_2$

La présence de radioactivité sur les filtres a été détectée par autoradiographie. Cette méthode consiste à enregistrer la distribution spatiale des substances radioactives dans des échantillons. Le principe repose sur la libération d'énergie, issue des émissions radioactives, aux grains d'argent présents sous forme d'une couche d'émulsion à la surface d'un film autoradiographique.

La mesure de la radioactivité contenue dans chaque zone de piégeage a été réalisée par autoradiographie numérique à l'aide d'un phosphorimageur (Phosphorimager 445SI, Molecular Dynamics). Les filtres ont été mis sous presse pendant 4 jours à la température ambiante dans une cassette au contact d'un écran phosphorescent constitué de fins cristaux de $\text{BaFBr} : \text{Eu}^{2+}$ incrustés dans un ligand organique. Au contact des échantillons radioactifs, le rayonnement β^- , émis lors de la désintégration du ^{14}C , excite les électrons de l'ion Eu^{2+} qui est oxydé en Eu^{3+} , tandis que BaFBr est réduit à l'état de BaFBr^- . Lors de la lecture, le phosphorimageur balaie l'écran excité à l'aide d'un rayonnement laser Hélium-Néon qui émet une lumière rouge de 633 nm absorbée par le complexe chargé BaFBr^- . Cette absorption provoque une oxydation du complexe, les électrons libérés entraînent alors la réduction de Eu^{3+} en Eu^{2+} , qui se traduit par une libération d'énergie sous forme de lumière bleue (450 nm). Un photomultiplicateur assure l'amplification du signal. La lumière finalement mesurée est proportionnelle à la quantité de radioactivité de chaque tache.

Cette radioactivité a été obtenue par référence à une courbe étalon obtenue de la façon suivante. Une solution aqueuse de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ a été préparée pour réaliser une gamme de solutions de radioactivités croissantes évaluée à : 0, 28, 56, 83, 111, 139, 167, 194, 222, 250, 278, 306 et 333 kBq l^{-1} . 150 μl de ces solutions ont été distribués dans chacun des 96 puits d'une plaque de microtitration, à raison de 8 répétitions pour chacune des 12 doses de radioactivité. La microplaque a été ensuite recouverte d'un rectangle (110 x 73 mm) de papier filtre imbibé d'une solution saturée de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, puis d'une plaque métallique en dural (130 x 85 mm) présentant à l'aplomb de chaque puits un orifice de 0,5 mm de diamètre permettant le passage de l'aiguille d'une seringue hypodermique à l'aide de laquelle on introduit 50 μl d'acide chlorhydrique 0,1 N. Cet ajout provoque la formation de $^{14}\text{CO}_2$ selon l'équilibre :



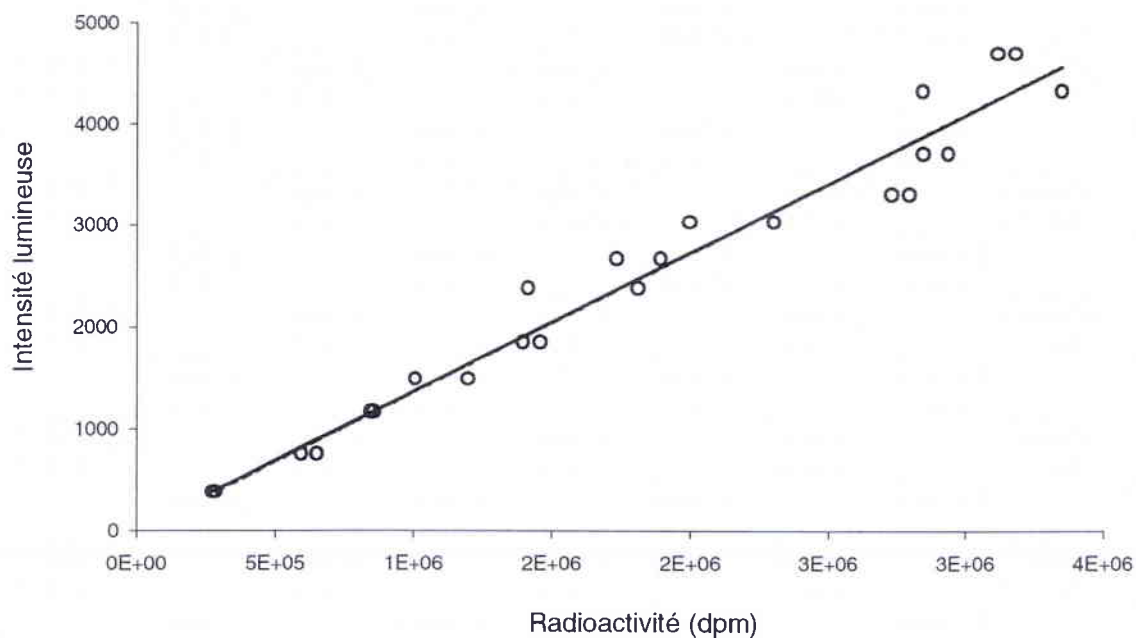


Figure III-3 : Courbe de calibration reliant l'intensité lumineuse à la quantité de radioactivité présente sur le filtre.



Figure III-4 : Dispositif expérimental d'incubation comprenant deux fioles à scintillation contenant dans l'une 5 ml de NaOH et dans l'autre 5 ml d'eau distillée ainsi qu'un flacon renfermant le sol.

Le $^{14}\text{CO}_2$ formé est piégé sous forme d'un précipité de $\text{Ba}_2^{14}\text{CO}_3$ dans le papier filtre comme indiqué précédemment. Deux séries de ces gammes étalons ont été introduites dans chaque cassette en même temps et pour la même durée que les filtres expérimentaux. Nous avons ensuite établi une courbe de calibration (figure III-3) reliant l'intensité lumineuse mesurée au niveau de chaque tache à la quantité de radioactivité présente.

L'effet du DNOC sur la capacité des agrégats de sol à minéraliser le 2,4-D est apprécié, soit en comparant les cinétiques de dégradation du 2,4-D agrégat par agrégat, soit en déterminant la distribution des agrégats par classes d'activité exprimée en % de radioactivité minéralisée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ par rapport à la radioactivité initialement introduite. Cette répartition a été calculée pour les périodes 0-7 jours, 0-14 jours et 0-28 jours. Pour la seconde expérience, les distributions des agrégats, exprimées en vitesse de minéralisation (%/jour), ont été représentées pour la période 7-14 jours sur toute la période d'incubation du sol. L'appréciation de la signification de l'effet du DNOC a été réalisée en calculant, pour différents concentrations en DNOC et après différents temps d'exposition, l'indice de diversité selon la formule proposée par Shannon-Weaver, associée à celle proposée par Pielou (1966) pour une estimation de l'écart-type correspondant (voir chapitre II).

(3) Minéralisation et incorporation biologique du carbone du 2,4-D : Etude en massifs d'agrégats

1). Dispositif d'incubation et mesure de la minéralisation

Cette expérimentation a été réalisée sur des échantillons de 2 g de sol (équivalent sol sec) sous forme de massifs d'agrégats de taille comprise entre 2 et 3 mm prélevés dans les échantillons primaires témoin et traité au DNOC aux deux concentrations 20 et 40 mg kg^{-1} . A chaque échantillon de 2 g ont été ajoutés 100 μl d'une solution aqueuse tamponnée (tampon phosphate, $\text{pH} = 7$) à 50 mg l^{-1} de 2,4-D- ^{14}C marqué sur le carbone 1 de la chaîne latérale, de telle sorte que chaque échantillon reçoive une radioactivité de 3,5 kBq pour une concentration initiale de 2,5 mg kg^{-1} en 2,4-D. L'apport de cette solution permet en même temps d'ajuster la teneur en eau à 80 % de la capacité de rétention (annexe I). Les échantillons de sol, contenus dans des fioles en verre de 20 ml, sont placés dans le dispositif présenté figure III-4. Celui-ci est constitué d'un flacon en verre de 370 ml dans lequel se trouvent deux fioles en plastique type scintillation contenant l'une 5 ml d'eau pour saturer l'atmosphère de l'incubateur et éviter un dessèchement du sol, l'autre 5 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,2 N destinée à piéger le $^{14}\text{CO}_2$ produit par minéralisation du 2,4-D. Le bocal est fermé hermétiquement à l'aide d'un bouchon en caoutchouc et placé en chambre climatique à 20°C. Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque traitement. Nous avons ensuite suivi les cinétiques de minéralisation du 2,4-D. Pour cela, les pièges contenant la soude sont changés après 7, 14 et 28 jours d'incubation. La radioactivité contenue dans la solution de soude a été analysée en scintillation liquide (Packard Tri Carb 1900 TR) après ajout de 10 ml de liquide scintillant

(ACSII, Amersham Corporation). Les résultats ont été exprimés en % de radioactivité initiale minéralisée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$.

2). Mesure de l'incorporation biologique

Parallèlement aux cinétiques de minéralisation du 2,4-D, nous avons étudié l'effet du DNOC sur l'incorporation biologique du carbone du 2,4-D. Pour cela, nous avons utilisé la technique de fumigation-incubation, mise au point par Jenkinson et Powlson (1976), qui consiste à tuer la majorité des micro-organismes du sol par fumigation avec du chloroforme, puis à faire consommer le carbone microbien libéré par les micro-organismes très peu nombreux ayant résisté au traitement biocide. L'excédent de minéralisation, lié à la consommation de ce carbone microbien facilement utilisable, est directement proportionnel à la taille de la biomasse tuée par fumigation et représentant la quasi-totalité de la microflore présente avant le traitement biocide. Soulas *et al.* (1984) ont montré que, moyennant l'utilisation de molécules marquées au ^{14}C , on pouvait utiliser cette technique pour suivre l'incorporation biologique du carbone des produits tels le 2,4-D, la fumigation ayant pour particularité de stopper définitivement sa dégradation. Ainsi, le produit non transformé, encore présent après fumigation, ne contribue pas à alimenter le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ dont l'origine se situe uniquement dans la minéralisation des corps microbiens marqués au ^{14}C tués par la fumigation.

Pratiquement, le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ issu de la minéralisation de la biomasse microbienne dégradante tuée est mesuré pendant une période initiale de 7 jours au terme de laquelle nous pouvons estimer que tout le carbone microbien a été minéralisé. La valeur obtenue doit être corrigée pour tenir compte à la fois de la minéralisation tardive de certains composants microbiens (substances de réserve, polymères structuraux,...) et de la minéralisation de la matière organique non vivante pouvant contenir de la radioactivité dans des métabolites d'origine non microbienne. Ce terme correctif, préconisé par Chaussod *et al.* (1982), correspond à la quantité de ^{14}C minéralisé pendant une période supplémentaire de 7 jours débutant après une période initiale d'incubation. Le carbone microbien est calculé selon la relation :

$$B = [F_{(0,7)} - F_{(7,14)}]/K_c$$

dans laquelle B représente la radioactivité incorporée dans la biomasse exprimé en % de la radioactivité initiale, F le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ exprimé en % de la radioactivité initiale sur la période considérée et K_c un coefficient de calibration. Ce coefficient correspond à la fraction du carbone microbien minéralisé sur la période (0-7) jours. Sa valeur a été estimée à 0.41 par Anderson et Domsch (1978).

La radioactivité incorporée dans la biomasse microbienne a également été estimée par la méthode cinétique décrite par Chaussod *et al.* (1986). Dans ce cas, le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ obtenu après fumigation a été suivi en mode cinétique et déterminé après 1, 3, 5, 7, 14, 21, 24 et 28 jours d'incubation. Une modélisation des cinétiques de minéralisation permet d'accéder à la

taille d'un compartiment assimilé au carbone microbien facilement minéralisable, le modèle général utilisé comprend deux termes, un terme exponentiel (modèle monomoléculaire) pour la minéralisation des corps microbiens et un terme linéaire (modèle d'ordre zéro) pour la minéralisation de la matière organique difficilement minéralisable, soit :

$$y = b (1 - e^{-kt}) + ct$$

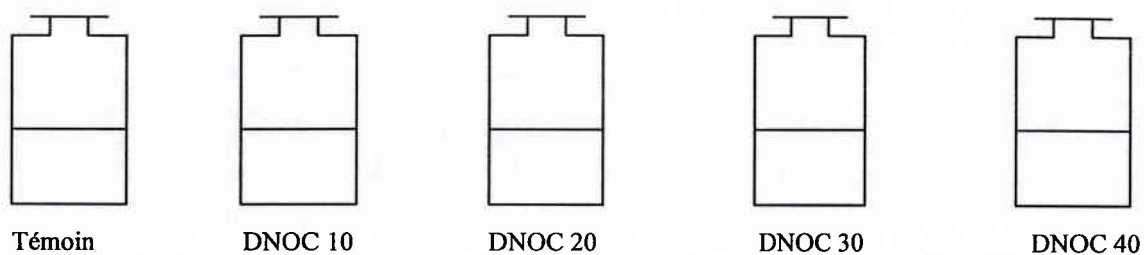
dans lequel y représente la quantité cumulée de ^{14}C -CO₂ dégagée au temps t exprimée en % de radioactivité initiale et b la taille du compartiment microbien facilement minéralisable également exprimée en % de la radioactivité initiale. Les paramètres k et c sont respectivement la constante de vitesse de minéralisation du compartiment b (exprimée en jour⁻¹) et la constante de vitesse de minéralisation du compartiment difficilement minéralisable (exprimée en % de la radioactivité initiale jour⁻¹). Les trois paramètres b , k et c ont été déterminés par régression non linéaire en utilisant le logiciel NL développé par le Département de Biométrie (INRA) et implanté dans la librairie STM (Becker *et al.*, 1988).

La mesure de la radioactivité incorporée a été faite après 28 jours d'incubation. Les échantillons sont fumigés à température ambiante, pendant 16 heures dans une étuve à vide dont l'atmosphère a été saturée par des vapeurs de chloroforme. Ce dernier a été préalablement rincé trois fois volume à volume avec de l'eau dans une ampoule à décanter. Ceci permet d'éliminer les traces d'éthanol jouant le rôle de stabilisant et qui pourraient servir de substrat carboné aux micro-organismes du sol durant la fumigation. Au terme de ce traitement, quatre mises sous vide sont réalisées pour éliminer toutes traces de chloroforme. Les pertes d'eau durant la fumigation sont compensées après pesées des échantillons de façon à conserver une humidité de 80 % de la capacité de rétention.

Chacun des douze échantillons de sol a été replacé dans le même dispositif d'incubation qu'avant fumigation et à nouveau incubé à 20°C pendant 28 jours. Après 1, 3, 5, 7, 14, 21, 24, 28 jours, les fioles de soude sont échangées. Le $^{14}\text{CO}_2$ piégé, provenant de la minéralisation du carbone de la biomasse microbienne ayant incorporé de la radioactivité à partir du 2,4-D- ^{14}C et tuée lors de la fumigation, a été mesuré au compteur à scintillation liquide (Packard Tri-Carb, 1900 TR) après addition de 10 ml de scintillant (ASC II, Amersham Corporation).

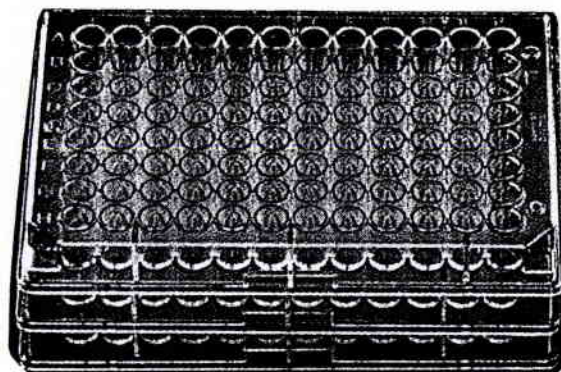
Les résultats ont été analysés par une analyse de variance sur les valeurs des quantités de radioactivité incorporée en utilisant le logiciel STATITCF. Les moyennes ont été comparées par le test de Newman-Keuls. Comme il existe une interaction significative ($P < 0.05$) entre les facteurs traitement et temps, les deux facteurs ont été analysés indépendamment. L'effet du traitement au DNOC a donc été étudié pour chaque durée d'incubation du sol avec le pesticide.

ECHANTILLONS PRIMAIRES (50 g)



2, 4, 6, 16, 30, 60 jours

AGREGATS INDIVIDUELS (20 mg)



Minéralisation

- ▷ *6 jours* : *2, 4, 7, 14, 28 jours*
- ▷ *30 jours* : *7, 14, 28 jours*

Distribution des agrégats : « Fréquence activité »

- ▷ 0-7, 0-14, 0-28 jours : *6 et 30 jours*
- ▷ 7-14 jours : *2, 4, 6, 16, 30, 60 jours*

Figure III-5 : Plan de l'expérimentation de la seconde expérience.

Les temps de prélèvement du sol et des filtres sont notés respectivement en italique gras et en italique.

b. Deuxième expérience

(1) Objectifs et plan de réalisation

L'objectif de cette étude était d'apprécier la capacité de restauration d'agrégats individuels sur une période de contrôle plus longue, choisie égale à 60 jours, selon les recommandations de Domsch *et al.* (1983) pour lesquels cette durée représente une limite au-delà de laquelle un effet observé devient critique. Expérimentalement, nous avons suivi exactement la même procédure que celle qui a été appliquée dans l'expérience précédente en nous limitant aux cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué au ^{14}C dans des agrégats individuels. Les différentes étapes de l'expérience sont données figure III-5.

(2) Protocole expérimental

Des agrégats individuels de sol ont été prélevés dans les cinq échantillons primaires de 50 g de sol (équivalent sol sec) non traité ou ayant reçu du DNOC aux concentrations de 10, 20, 30 et 40 mg kg⁻¹. Chaque agrégat est placé dans un puits d'une plaque de microtitration, puis traité avec 5 µl d'une solution aqueuse tamponnée (tampon phosphate, pH = 7) de 2,4-D marqué au ^{14}C sur le carbone 1 de la chaîne latérale. Nous avons réalisé ainsi un apport d'une radioactivité égale à 0,083 kBq par agrégat pour une concentration initiale de l'ordre de 2,5 mg kg⁻¹ (équivalent sol sec). Pour chaque traitement (c'est-à-dire pour chaque échantillon primaire), nous avons prélevé 288 agrégats différents; répartis sur trois plaques de microtitration considérées comme trois répétitions. Ces prélèvements ont été reproduits à l'identique après 2, 4, 6, 16, 30 et 60 jours de contact avec le DNOC. Nous n'avons suivi les cinétiques complètes de minéralisation du 2,4-D qu'après les prélèvements réalisés à 6 et 30 jours de contact avec le DNOC. Dans le premier cas, les prélèvements des filtres barytés ont été réalisés à 2, 4, 7, 14 et 28 jours et dans le second, seulement à 7, 14 et 28 jours. Pour les autres prélèvements dans les échantillons primaires; soit après 2, 4, 16 et 60 jours de contact avec le DNOC, seul le dégagement de radioactivité mesuré entre 7 et 14 jours après apport de 2,4-D- ^{14}C a été réalisé. C'est en effet la période d'incubation au cours de laquelle les cinétiques individuelles de minéralisation divergent le plus franchement. C'est du moins ce qu'il ressort des résultats de la première expérience ainsi que d'observations plus anciennes (Soulas *et al.*, 1981).

C. RESULTATS-DISCUSSION

I. Effet du DNOC sur la diversité métabolique de la microflore du sol

1. Approche globale

Les graphes de la figure III-6 présentent les résultats relatifs à l'effet des différentes doses de DNOC sur le développement de la coloration moyenne calculée sur l'ensemble des substrats

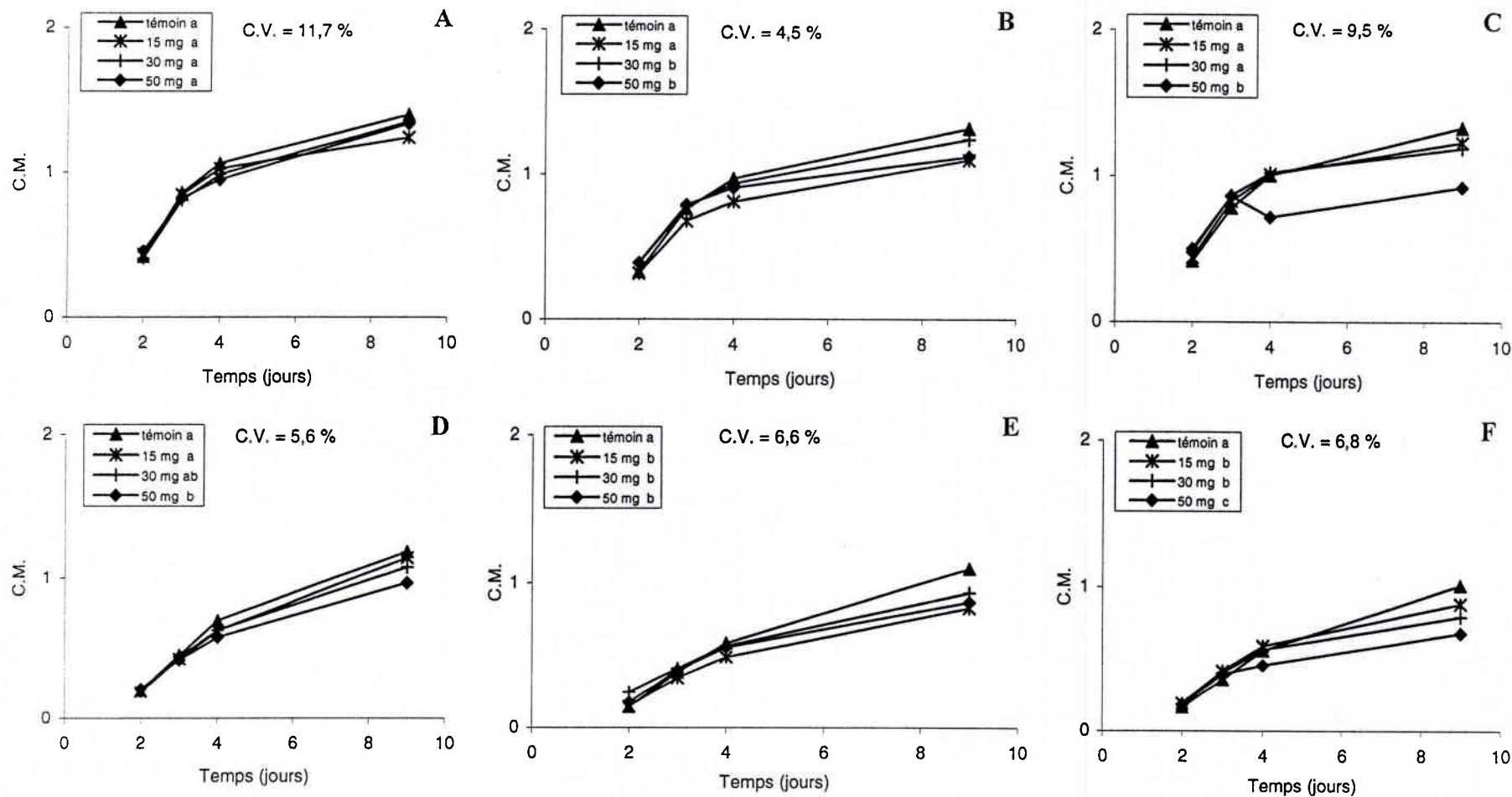


Figure III-6 : Effet de différentes doses de DNOC sur le développement de la coloration moyenne (C.M.) calculée sur l'ensemble des substrats relatifs aux microplaques de type GN (A, B, C) et GP (D, E, F) pour les échantillons de sol incubés pendant 7 jours (A, D), 16 jours (B, E) et 62 jours (C, F).

Deux traitements suivis de la (les) même(s) lettre(s) ne diffèrent pas significativement ($P < 0,05$) à 9 jours.

C.V. : coefficient de variation à 9 jours.

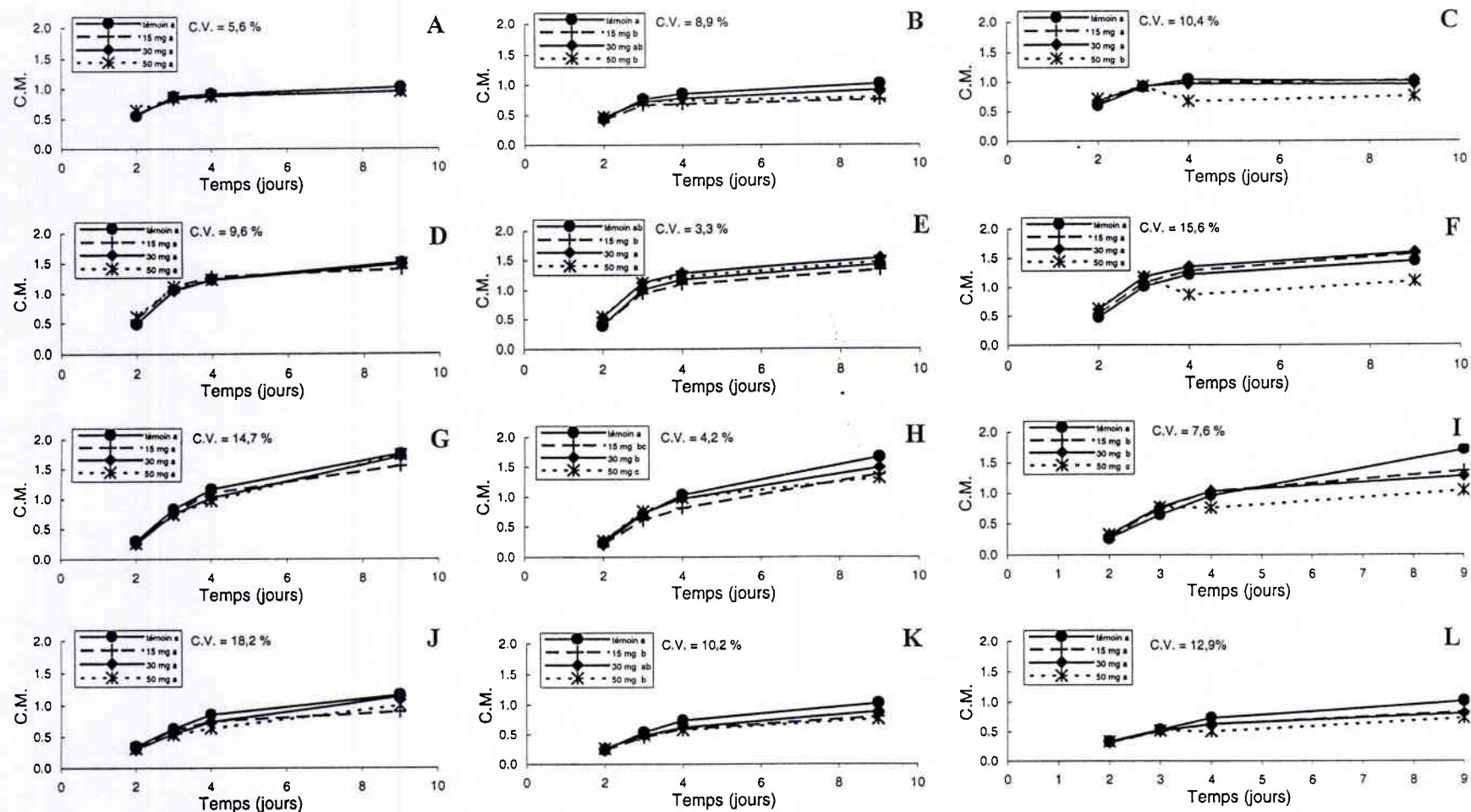


Figure III-7 : Effet de différentes doses de DNOC sur le développement de la coloration moyenne (C.M.) pour les acides organiques (A, B, C), les composés azotés organiques (D, E, F), les carbohydrates (G, H, I) et les substrats divers (J, K, L) des plaques Biolog GN des échantillons de sol incubés pendant 7 jours (A, D, G, J), 16 jours (B, E, H, K) et 62 jours (C, F, I, L) avec l'herbicide. Deux traitements suivis de la(les) même(s) lettre(s) ne diffèrent pas significativement ($P < 0,05$) à 9 jours. C.V. = coefficient de variation à 9 jours.

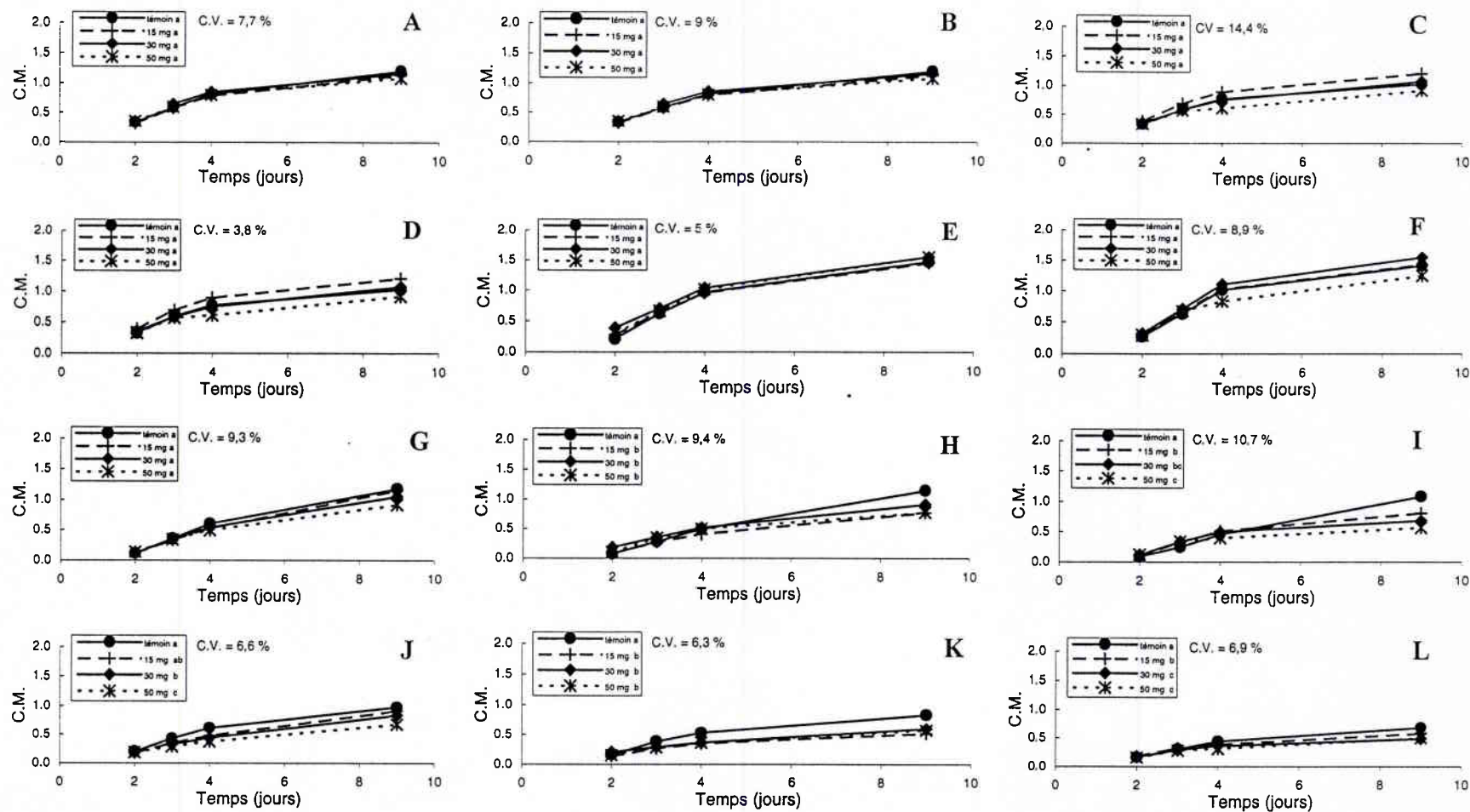


Figure III-8 : Effet de différentes doses de DNOC sur le développement de la coloration moyenne (C.M.) pour les acides organiques (A, B, C), les composés azotés organiques (D, E, F), les carbohydrates (G, H, I) et les substrats divers (J, K, L) des plaques Biolog GP des échantillons de sol incubés pendant 7 jours (A, D, G, J), 16 jours (B, E, H, K) et 62 jours (C, F, I, L) avec l'herbicide.

Deux traitements suivis de la(les) même(s) lettre(s) ne diffèrent pas significativement ($P < 0,05$) à 9 jours.

C.V. = coefficient de variation à 9 jours.

relatifs aux microplaques de type GN (graphes A, B, C) ou GP (graphes D, E, F) pour les échantillons de sol laissés pendant 7 jours (graphes A et D), 16 jours (graphes B et E) ou 62 jours (graphes C et F) en contact avec l'herbicide. Les résultats ont été analysés par une analyse de variance sur les valeurs des colorations moyennes de chaque microplaque obtenues en fin de cinétique (9 jours) en utilisant le logiciel STATITCF. Les moyennes ont été comparées par le test de Newman-Keuls. Les figures III-7 et III-8 donnent la même information pour les quatre familles chimiques de substrats carbonés contenues respectivement dans les plaques GN et GP.

Au niveau le plus global, celui qui concerne pour chaque type de microplaque l'ensemble des substrats, on observe une tendance assez générale à une réduction de la vitesse de développement et surtout de l'intensité de la coloration moyenne lorsque la concentration en DNOC augmente, l'effet étant plus particulièrement marqué et statistiquement significatif après 62 jours de présence de l'herbicide dans le sol. Cette constatation vaut également pour les différentes familles chimiques. Malgré tout, même significatifs, les effets observés ne contribuent pas à modifier de façon importante les caractéristiques cinétiques de la consommation des différents substrats, surtout pour les deux premiers prélèvements de sol. On peut conclure de cette première approche que la microflore qui se maintient en présence de DNOC ne se distingue pas par des caractéristiques physiologiques particulières de celle des sols non traités lorsqu'elle est placée dans les mêmes conditions de culture.

2. Approche analytique

A titre d'exemple, l'annexe X-A et la figure III-9 rassemblent les résultats de l'analyse en composantes principales réalisée en ne prenant comme variables que les seules données relatives aux hydrates de carbone des plaques de type GN. Les trois premiers axes principaux permettent d'expliquer 77,7 % de la variation relative à cet ensemble de données. En poussant plus loin l'analyse, notamment par un examen de la répartition des "individus" dans le plan principal, on observe des trajectoires évolutives qui traduisent un fort effet lié aux cinétiques de développement de la coloration dont le premier axe semble majoritairement responsable, surtout en fin de cinétique. Sur la figure III-9A, nous avons représenté quelques unes de ces trajectoires relatives à l'évolution des échantillons de sol témoin et traité à la dose la plus élevée après respectivement 7, 16 et 62 jours de préincubation. Il faut faire appel au troisième plan principal (figure III-9B) pour voir apparaître des groupements permettant de distinguer les échantillons traités (considérés ensemble) des échantillons témoins. L'axe 3 a donc une forte composante traduisant l'effet biologique du DNOC. Par ailleurs, toujours à partir des seuls hydrates de carbone, nous avons pu constater que la somme des carrés des corrélations avec les trois premiers axes principaux calculée pour chaque substrat évoluait au cours de la durée du test, traduisant une modification de la valeur discriminante de chaque substrat. Ces tendances sont reportées sur les figures III-10 et III-11. Elles confirment les observations déjà faites par Haack *et al.* (1995).

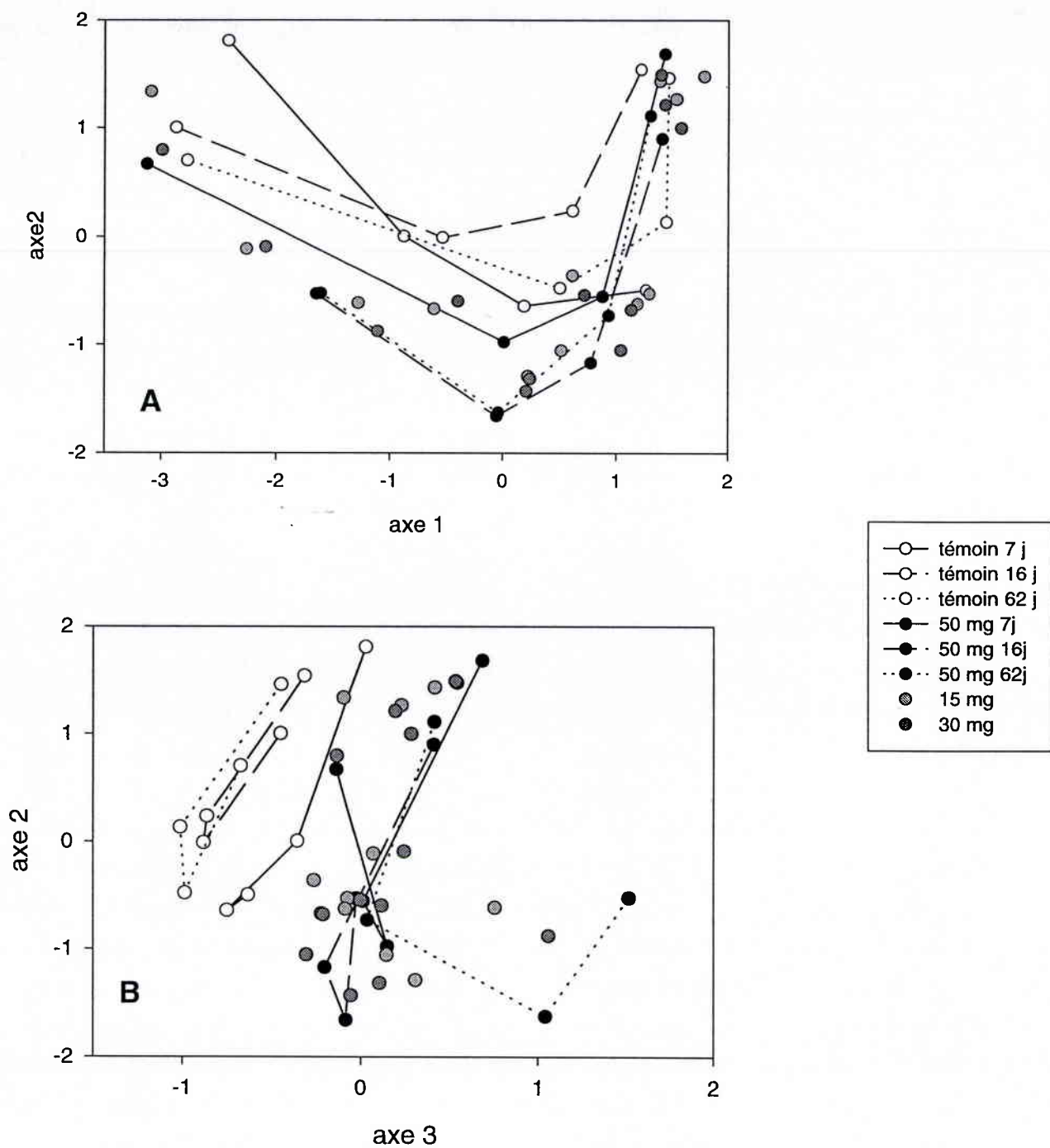


Figure III-9 : Trajectoires dans les plans 1-2 et 2-3 des traitements discriminés par une a.c.p. effectuée sur les hydrates de carbone GN.

Ces différentes conclusions sont, à quelques variantes de détail près, les mêmes pour toutes les familles de produits.

Dans le but de limiter l'effet du temps et de mieux faire ressortir les conséquences biologiques liées à la présence de l'herbicide, nous avons utilisé un deuxième type de transformation des données associant à chaque cinétique d'oxydation d'un substrat une valeur unique calculée selon la formule III-3. Nous avons analysé séparément les microplaques GN et GP. Pour la première catégorie de plaques, une série d'A.C.P. préliminaires réalisées par familles de produits nous a amené à sélectionner 11 acides organiques sur 24, 8 composés azotés organiques sur 25, 12 hydrates de carbone sur 28 et 5 composés divers sur 18. Le nombre total de substrats retenus pour l'A.C.P. globale a donc été de 36, soit une réduction de l'ordre du tiers. L'examen de la figure III-10 fournit a posteriori une justification à cette procédure de tri. On a représenté sur le graphe A, pour les 12 hydrates de carbone sélectionnés, les courbes retraçant l'évolution au cours du temps de la somme des carrés des corrélations avec les trois premiers axes principaux. Une certaine convergence de forme, se manifestant par une partie initiale ascendante suivie d'une stabilisation, distingue ce lot de substrats de l'ensemble des autres carbohydrates pour lesquels les courbes correspondantes sont moins uniformes (graphe B). L'annexe X-B et la figure III-12A résument les résultats de cette A.C.P.. 75 % de la variation totale observée peut être prise en compte en ne retenant que les trois premiers axes principaux, lesquels contribuent respectivement pour 34,8 %, 25,7 % et 14,5 % à expliquer cette variation. Seuls 4 substrats, la dextrine et le glycogène pour les polymères ainsi que le gentiobiose et le D-mélibiose pour les hydrates de carbone sont bien représentés sur l'axe 1 avec la somme des carrés des corrélations avec les trois premiers axes supérieure à 0,7. Ils ne sont plus que 2, l'acide p-hydroxyphénylacétique et l'acide itaconique pour l'axe 2. Aucun des substrats retenus n'est bien représenté sur l'axe 3. Nous avons représenté sur la figure III-12A la position des différents "individus" dans le plan principal. Un certain parallélisme apparaît dans les trajectoires temporelles suivies par les échantillons de sol témoins et traités à différentes doses de DNOC, celles-ci semblant majoritairement déterminées par le second axe principal. L'effet du DNOC, bien marqué, semble par contre essentiellement porté par le premier axe principal. Enfin, le rebroussement observé à 16 jours dans la trajectoire métabolique de la microflore du sol pourrait traduire une étape particulière dans l'évolution des bactéries Gram négatives que la présence de DNOC ne fait que moduler. Cette observation est à rapprocher de celles que nous avons faites dans la seconde partie de ce travail concernant d'une part l'évolution au cours du temps des bactéries cultivables Gram négatives dont la proportion tend à augmenter et d'autre part le développement caractéristique d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* pouvant représenter jusqu'à 55 % des bactéries cultivables.

L'utilisation de plaques de microtitration de type GP permet de confirmer les tendances précédentes, même si dans le détail quelques différences apparaissent. L'étape de tri des substrats nous a conduit à en sélectionner 43, soit un rendement légèrement supérieur à celui obtenu avec

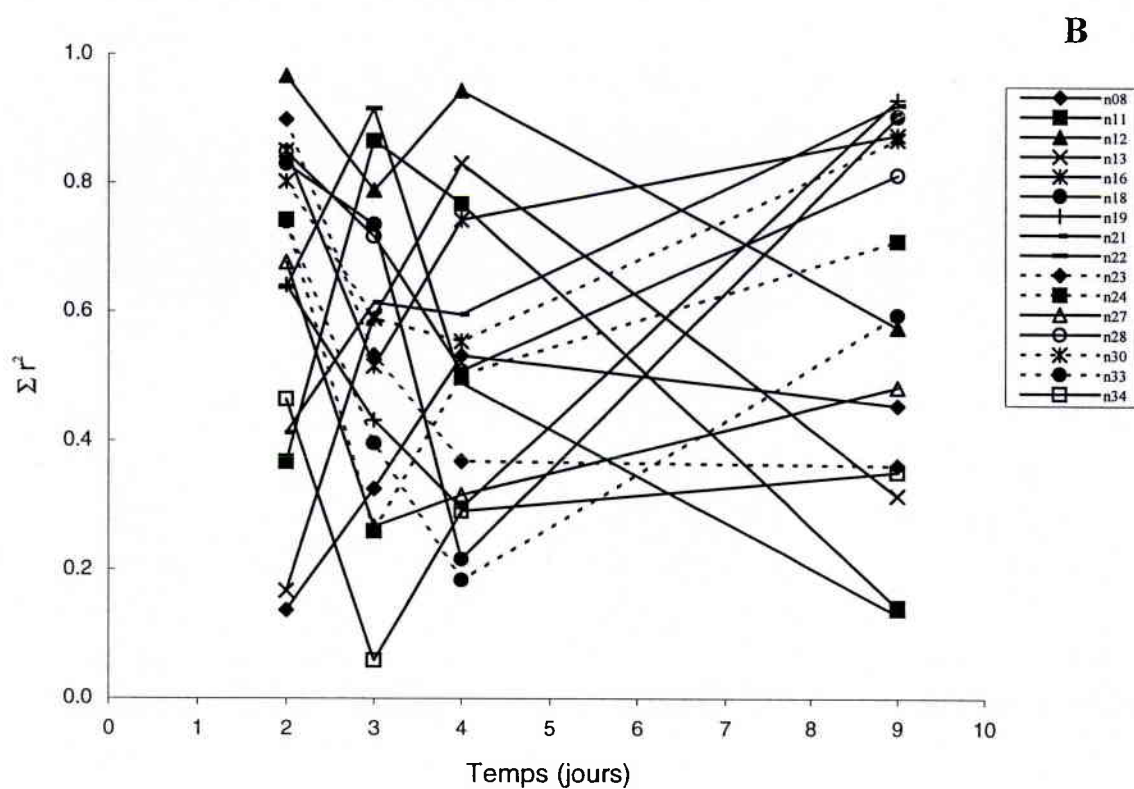
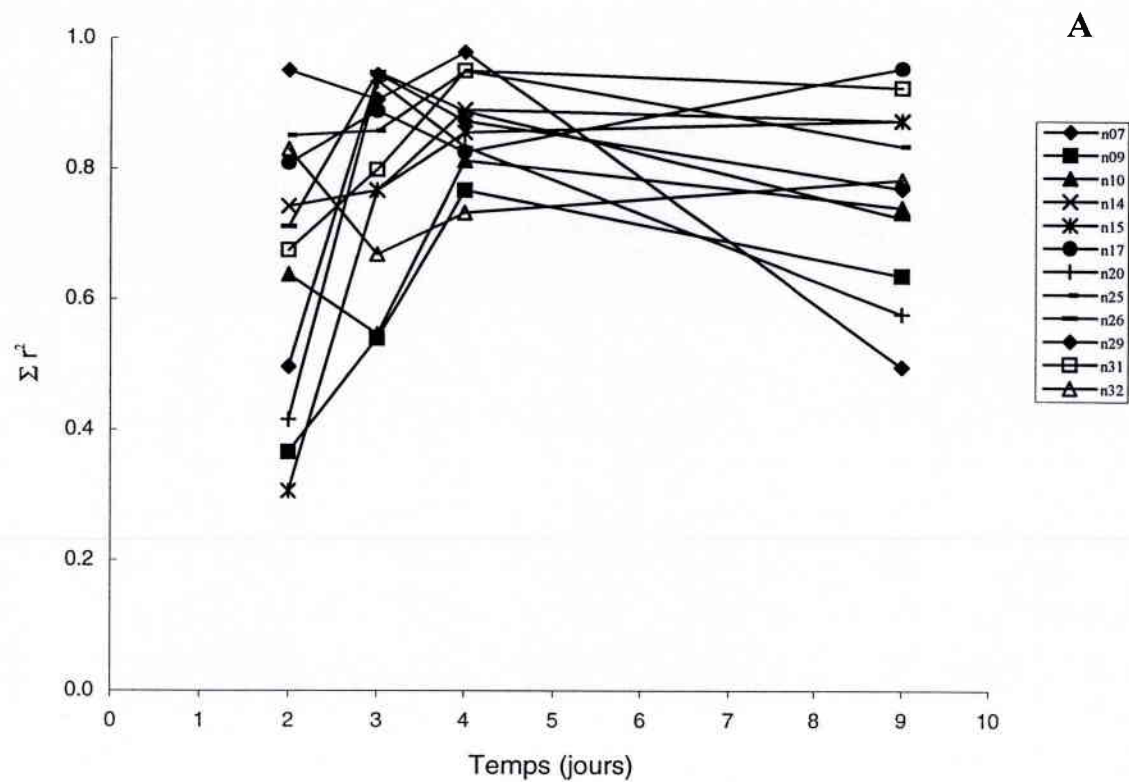


Figure III-10 : Evolution de la somme des carrés des corrélations des données relatives aux carbohydrates sélectionnés (A) et à ceux non retenus par la suite (B) des microplaques GN avec les trois axes principaux.

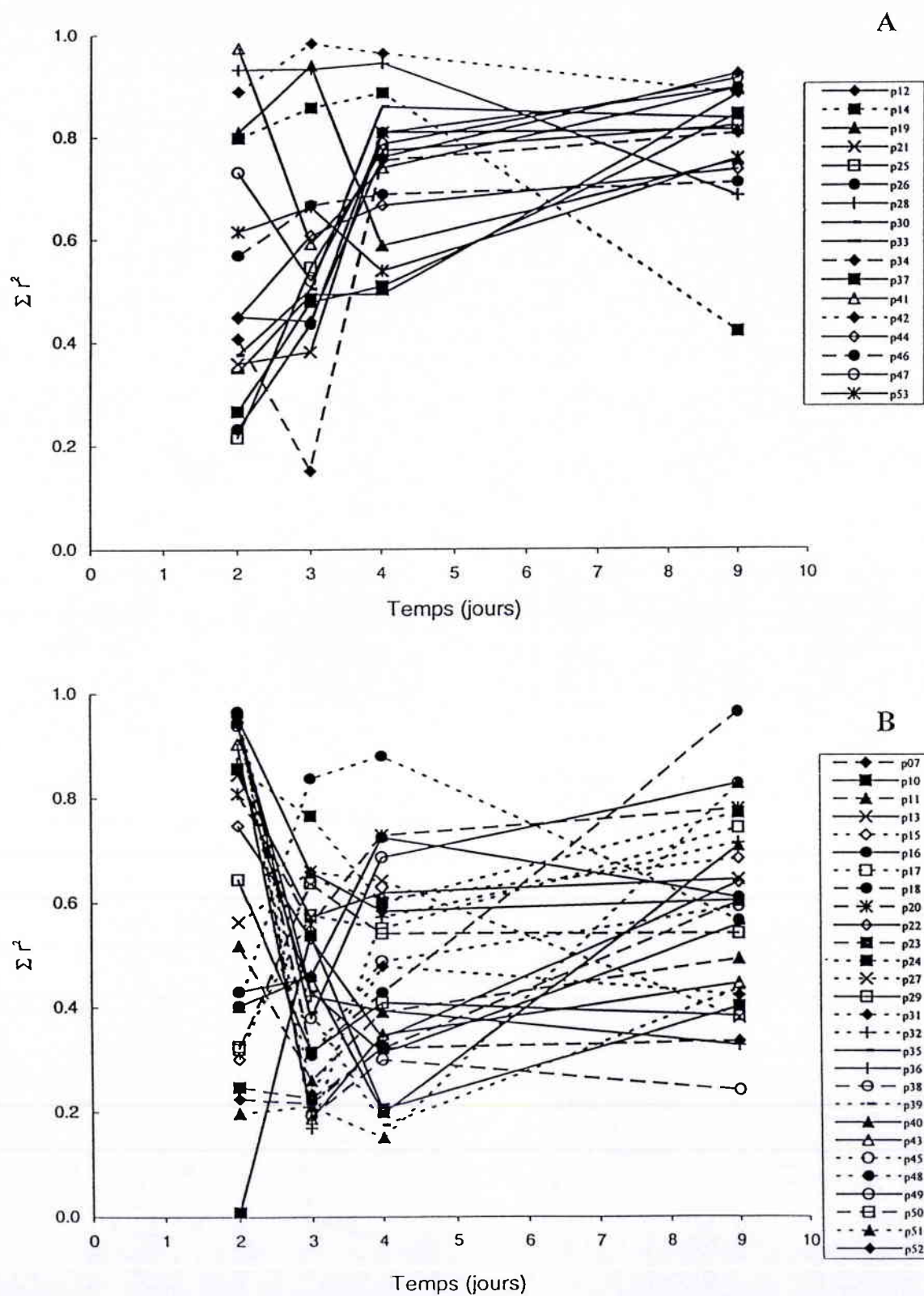


Figure III-11 : Evolution de la somme des carrés des corrélations des données relatives aux carbohydrates sélectionnés (A) et à ceux non retenus par la suite (B) des microplaques GP avec les trois axes principaux.

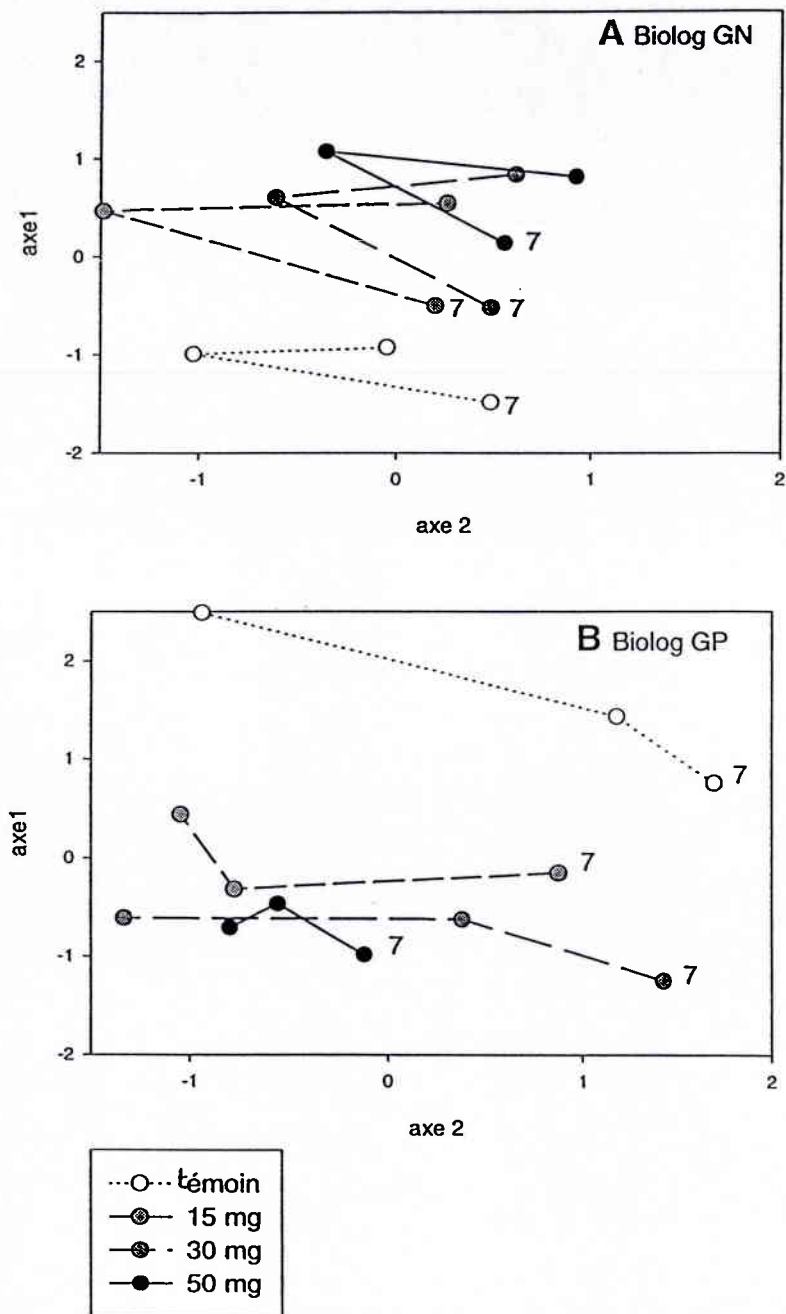


Figure III-12 : Trajectoires dans le plan factoriel 1 - 2 des traitements discriminés par A.C.P. sur les substrats retenus des plaques Biolog GN et GP.

les microplaques GN. A nouveau, les 17 hydrates de carbone sélectionnés présentent une variation temporelle de la somme des carrés des corrélations avec les trois premiers axes principaux (figure III-11A) plus homogène que lorsqu'on considère les autres représentants non retenus de cette catégorie de composés (figure III-11B). Cette observation est en accord avec celle que nous avons faite pour la même catégorie de substrats sur les plaques GN. Les résultats de l'A.C.P. réalisée sur le sous-ensemble de substrats retenus sont rapportés en annexe X-C et sur la figure III-12B. Le premier espace principal à trois dimensions permet d'expliquer 77,5 % de la variation totale dont 32,3 % reviennent au premier axe, 31 % au second et 14,2 % au troisième. Seul le L-rhamnose est bien représenté sur l'axe 1 alors que l'acide L-malique, l' α -D-lactose, le β -méthyl-D-galactoside, le 3-méthylglucose, le D-raffinose, le glycogène et l'inuline sont liés à l'axe 2. L'axe 3 n'est lié à aucun substrat particulier. La figure III-12B représente les regroupements entre individus qui traduisent l'évolution au cours du temps des échantillons de sol en fonction de la dose de DNOC. Il apparaît à nouveau clairement que l'axe 2 a une dimension essentiellement temporelle alors que l'axe 1 traduit principalement l'effet biologique, bien marqué, du DNOC sur la diversité métabolique de la microflore du sol. On constate par ailleurs, que les différentes trajectoires sont beaucoup plus linéaires et que la progressivité de l'effet du DNOC y est moins marquée que dans le cas des espèces Gram négatives.

Face aux résultats obtenus, il serait intéressant de poursuivre cette étude en se limitant aux substrats carbonés les plus discriminants et en insistant davantage sur les caractéristiques cinétiques de consommation de ces substrats.

II. Effet du DNOC sur la diversité fonctionnelle de la microflore du sol

1. Première expérience

a. Effet du DNOC sur la minéralisation du ^{14}C -2,4-D dans les agrégats individuels

L'ensemble des résultats de cette expérimentation est résumé par deux séries de figures. Sur les figures III-14 à III-17 sont représentées, de façon synthétique, les différentes cinétiques de minéralisation du ^{14}C -2,4-D obtenues pour des agrégats individuels prélevés dans des échantillons de sol témoin et traités à deux concentrations en DNOC après différentes périodes d'exposition à cet herbicide. Sur la partie gauche des figures, nous avons représenté les "cinétiques-enveloppes" pour chaque lot d'agrégats correspondant à un traitement au DNOC et une durée d'exposition, la cinétique correspondant à la moyenne arithmétique de l'ensemble des cinétiques du lot considéré (figure III-13) ainsi qu'un exemple d'une cinétique particulière. A chacune de ces représentations correspond, sur la partie droite de la figure, un graphique montrant l'évolution de la distribution des pourcentages cumulés de minéralisation du ^{14}C -2,4-D après 7, 14 et 28 jours d'incubation. Sur les figures III-18 à III-21, nous avons représenté ces mêmes résultats sous la forme de diagrammes "classe-fréquence" montrant l'influence de la

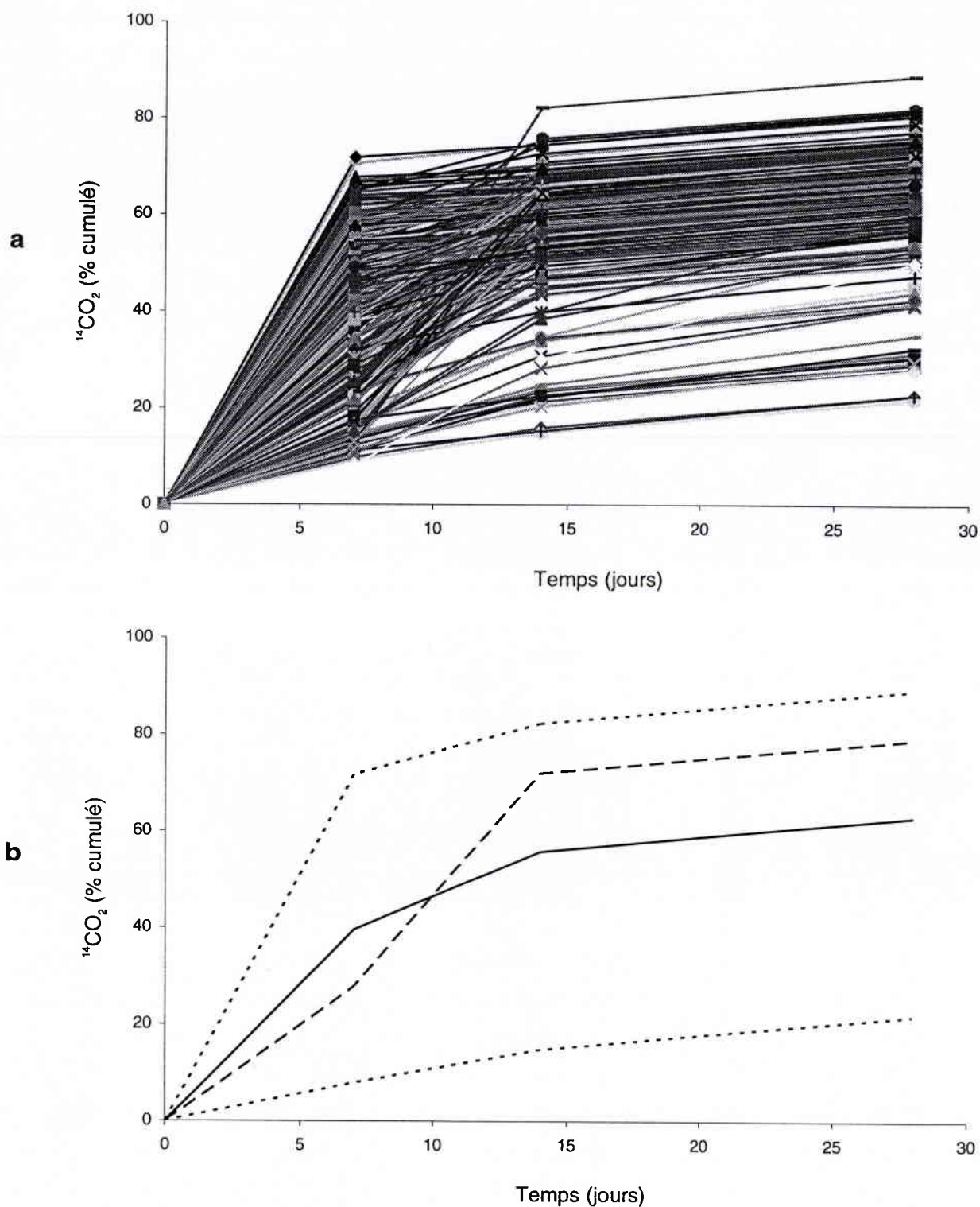


Figure III-13 : Représentation globale (a) et simplifiée (b) des cinétiques de minéralisation du 2,4-D [^{14}C -COOH] de l'ensemble des agrégats provenant d'échantillons de sol témoin.

a : cinétique de l'ensemble des agrégats pris individuellement.

b : moyenne de l'ensemble des agrégats (en trait plein), cinétiques-enveloppes (en pointillé) et exemple d'une cinétique particulière (en demi-pointillé).

concentration en DNOC et de la période d'exposition sur la distribution fréquentielle des agrégats en classes d'activité de minéralisation du 2,4-D.

(1) Cas des échantillons témoins

Les résultats relatifs aux échantillons témoins correspondent aux graphes "a" des figures III-14 à III-17 et aux barres blanches des différents diagrammes de figures III-18 à III-21. Ces différentes représentations conduisent à deux types d'observation. La première série de figures concerne les pourcentages finaux cumulés de minéralisation, qui varient de 10-15 % à 80-85 % quelle que soit la durée de préincubation ayant précédé le prélèvement des différents lots d'agrégats. Une telle variabilité dans le potentiel de minéralisation peut avoir plusieurs origines biologiques et abiotiques. On peut effectivement penser que les différents agrégats contiennent des communautés dégradantes dont les distributions spécifiques différentes déterminent des comportements physiologiques ou métaboliques correspondant à des activités de dégradation et/ou des rendements d'assimilation différents. Une première étude comparative (Vallaëys *et al.*, communication personnelle), réalisée à partir de trois agrégats issus du même sol que celui que nous avons utilisé pour ce travail, nous a en effet montré que non seulement les communautés dégradantes cultivées ont des tailles différentes, mais que parmi les 17 espèces dégradantes identifiées par des profils PCR-RFLP des gènes codant pour les ARNr 16S, seules quatre d'entre elles se retrouvent sur au moins deux agrégats. Par ailleurs, des amplifications réalisées avec des amorces *tfdA* (pJP4) et *tfdB* (pJP4) n'ont été productives qu'à deux occasions dans le premier cas et à sept occasions dans le second cas, indiquant une large diversité de séquences des gènes isofonctionnels impliqués. Diversité spécifique et génétique peuvent donc se combiner selon un large éventail de possibilités qui correspondent à autant de capacités différentes à dégrader le 2,4-D. En outre, il est aussi probable que l'hétérogénéité de répartition de la teneur en carbone entre les différents agrégats contribue à renforcer de façon très inégale l'activité des différentes communautés dégradantes, notamment lorsque le co-métabolisme est à la base du processus de transformation.

La comparaison des cinétiques de dégradation du 2,4-D observée pour les différents lots d'agrégats laisse apparaître trois catégories d'agrégats, un exemple de chacun d'eux étant présenté sur les figures III-14 à III-17. Un premier type de comportement se manifeste avec des agrégats pour lesquels l'essentiel de la minéralisation du 2,4-D se produit au cours de la première semaine. Il n'y a pas apparemment de limitation biologique à la dégradation, probablement en raison d'une population dégradante déjà suffisamment abondante et/ou active pour limiter le phénomène d'enrichissement et la durée de la phase de latence, lorsqu'elle existe. Pour une seconde catégorie d'agrégats, la minéralisation suit une cinétique sigmoïde plus ou moins prononcée, la vitesse maximale n'étant atteinte qu'en seconde semaine. Cette accélération est le signe d'une limite biologique à la dégradation avec phénomène de croissance. Enfin, pour tous les autres agrégats, la vitesse de minéralisation reste faible et inchangée tout au long de la

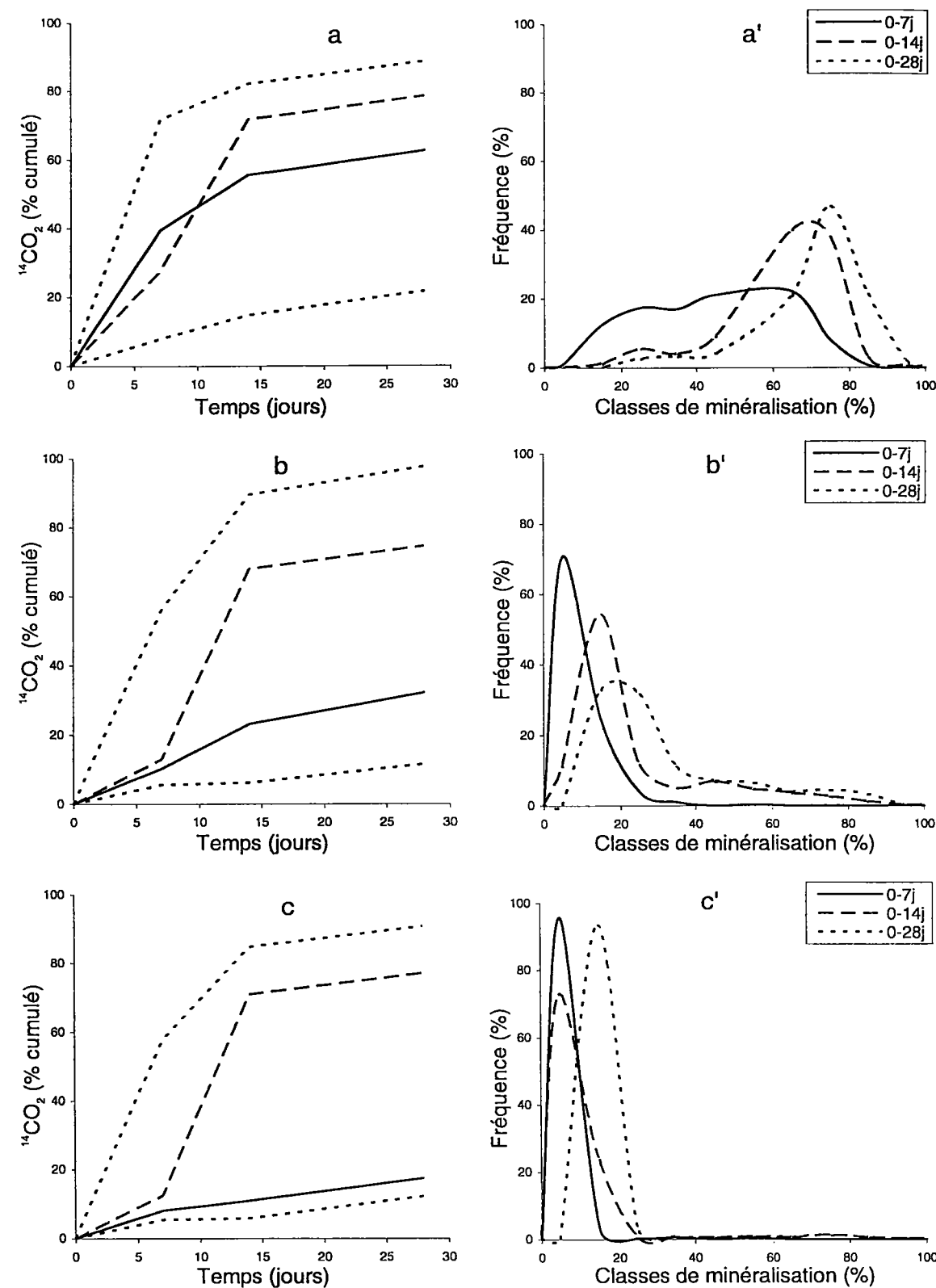


Figure III-14 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D [$^{14}\text{C-COOH}$] (à gauche) et distribution en classes de minéralisation (à droite) des agrégats provenant des échantillons de sol témoin (a et a') et traité au DNOC à 20 (b et b') et à 40 (c et c') mg kg^{-1} après 2 jours au contact du DNOC.

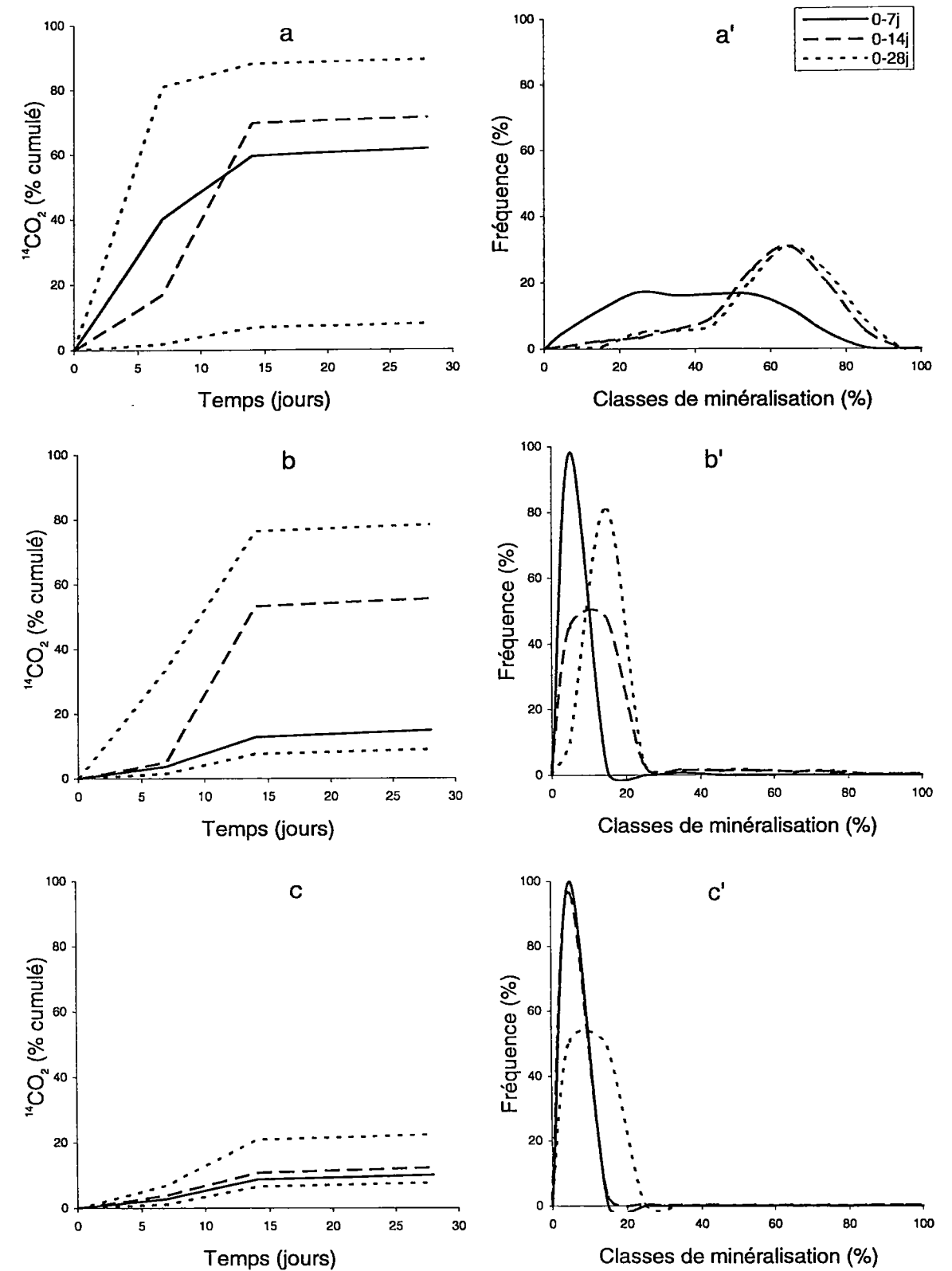


Figure III-15 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D [$^{14}\text{C-COOH}$] (gauche) et distribution en classes de minéralisation (à droite) des agrégats provenant des échantillons de sol témoin (a et a') et traité au DNOC à 20 (b et b') et à 40 (c et c') mg kg^{-1} après 9 jours au contact du DNOC.

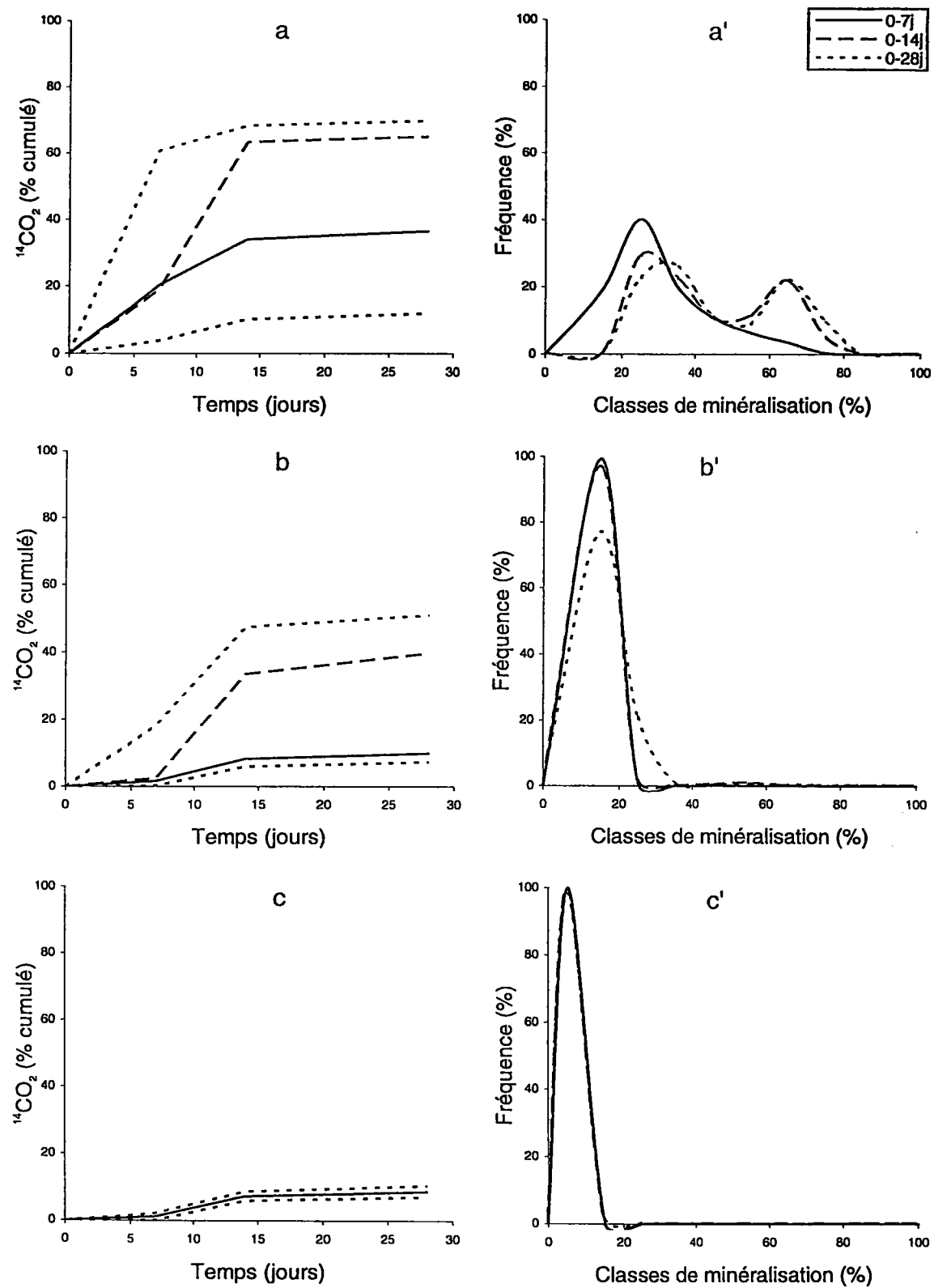


Figure III-16 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D [^{14}C -COOH] (à gauche) et distribution en classes de minéralisation (à droite) des agrégats provenant des échantillons de sol témoin (a et a') et traité au DNOC à 20 (b et b') et à 40 (c et c') mg kg^{-1} après 15 jours au contact du DNOC.

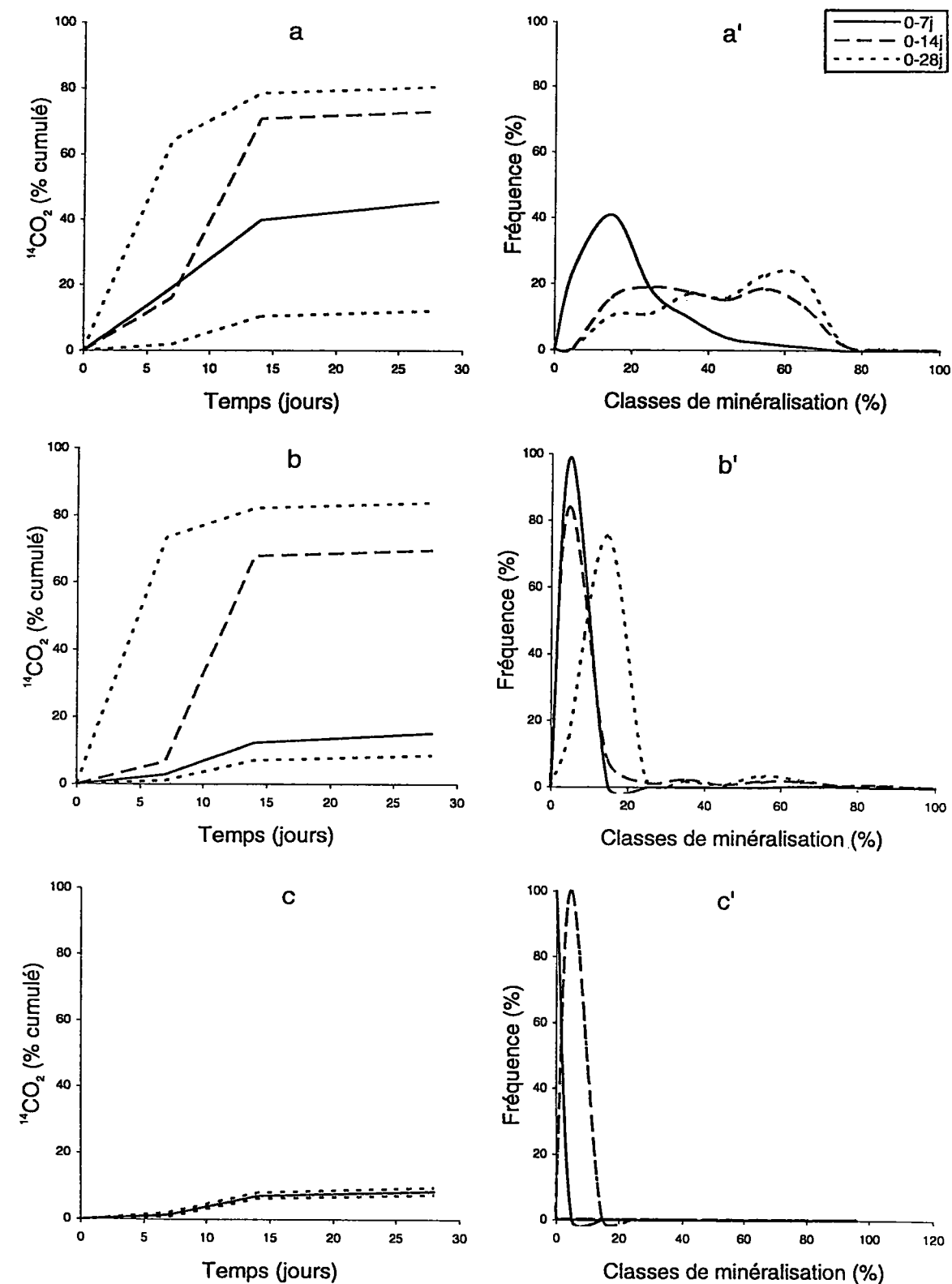
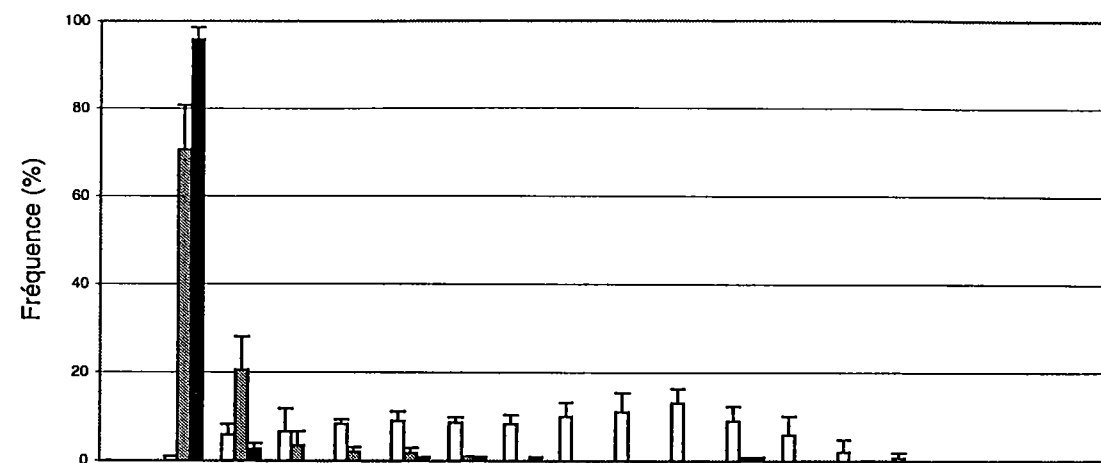
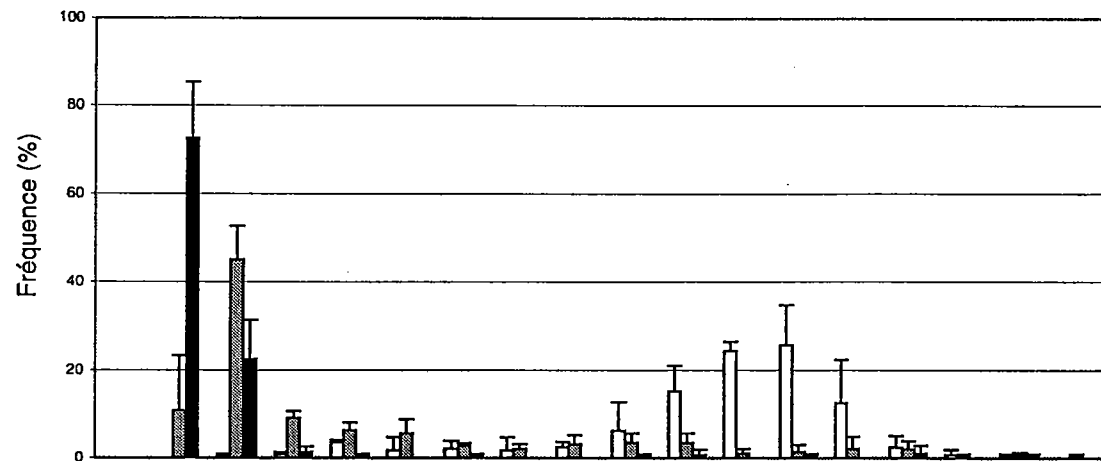


Figure III-17 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D [^{14}C -COOH] (à gauche) et distribution en classes de minéralisation (à droite) des agrégats provenant des échantillons de sol témoin (a et a') et traité au DNOC à 20 (b et b') et à 40 (c et c') mg kg^{-1} après 28 jours au contact du pesticide.

a



b



c

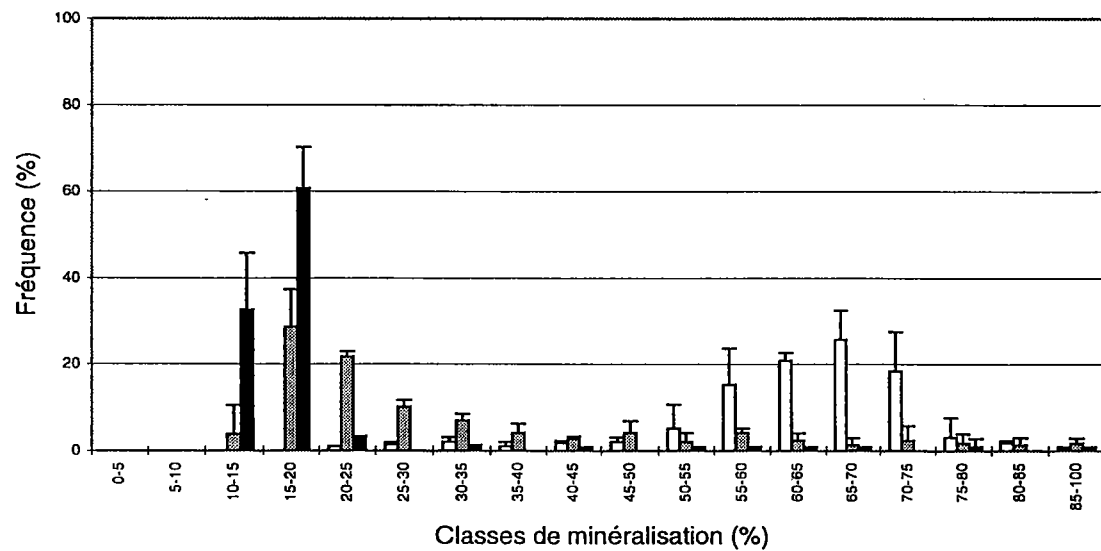
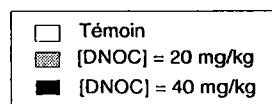
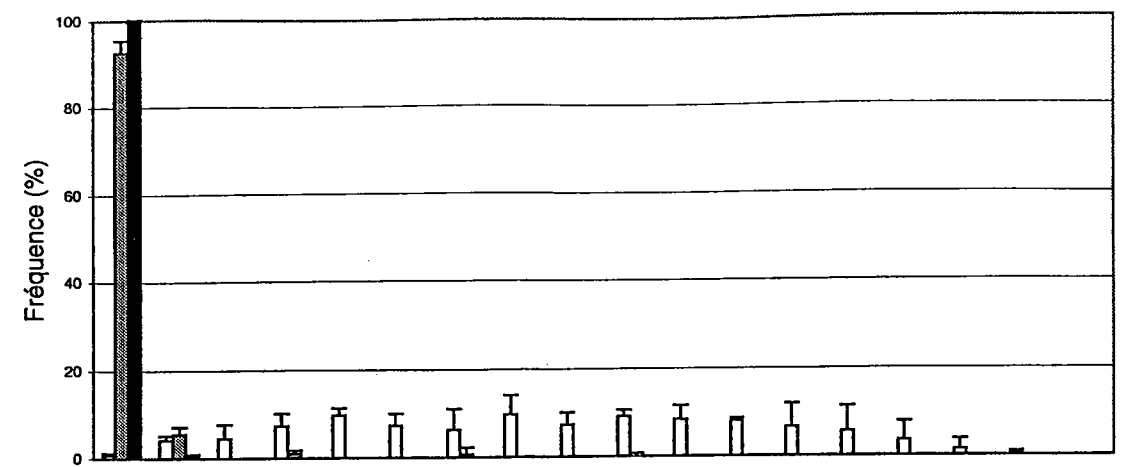


Figure III-18 : Distribution des agrégats provenant des échantillons de sol témoin et traités au DNOC par classes de minéralisation exprimée en % par rapport à la radioactivité initiale pour les périodes 0-7 (a), 0-14 (b) et 0-28 (c) jours après 2 jours au contact du DNOC.



a



b



c

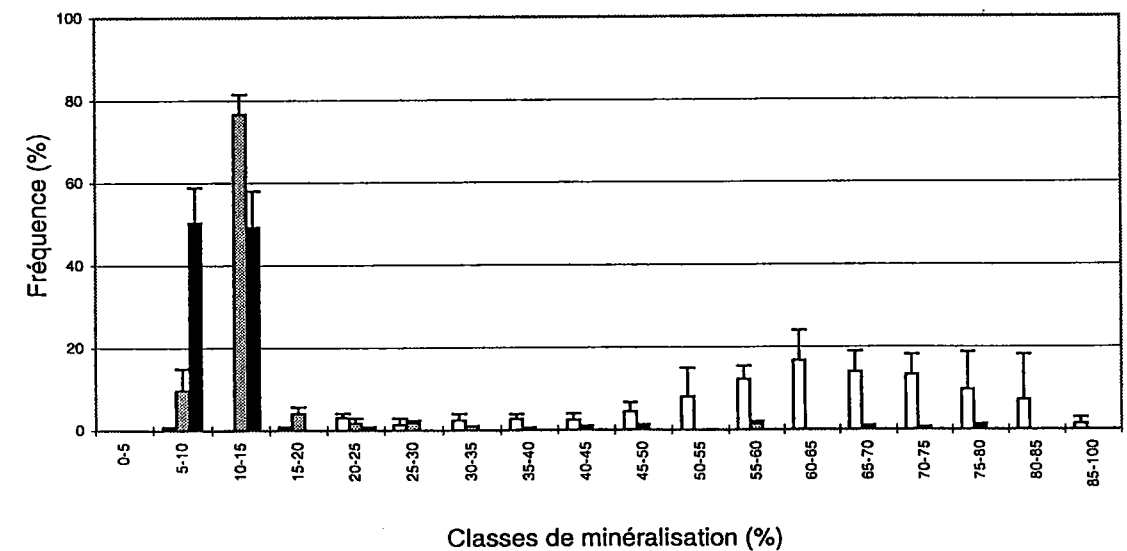
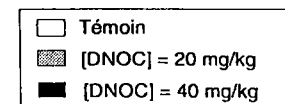


Figure III-19 : Distribution des agrégats provenant d'échantillons de sol témoin et traités au DNOC par classes de minéralisation exprimée en % par rapport à la radioactivité initiale pour les périodes 0-7 (a), 0-14 (b) et 0-28 (c) jours après 9 jours au contact du DNOC.



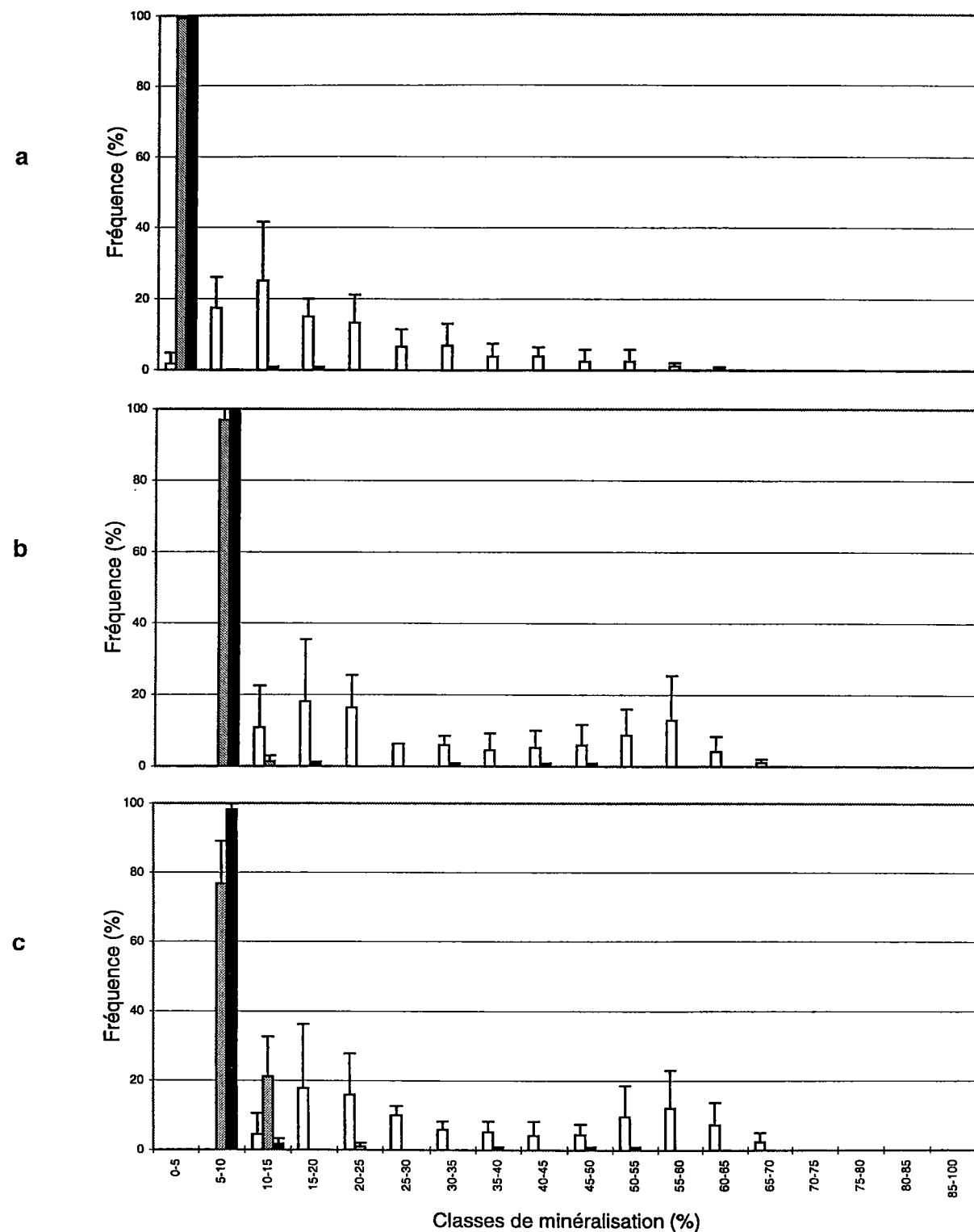


Figure III-20 : Distribution des agrégats provenant des échantillons de sol témoin et traités au DNOC par classes de minéralisation exprimée en % par rapport à la radioactivité initiale pour les périodes 0-7 (a), 0-14 (b) et 0-28 (c) jours après 15 jours au contact du DNOC.

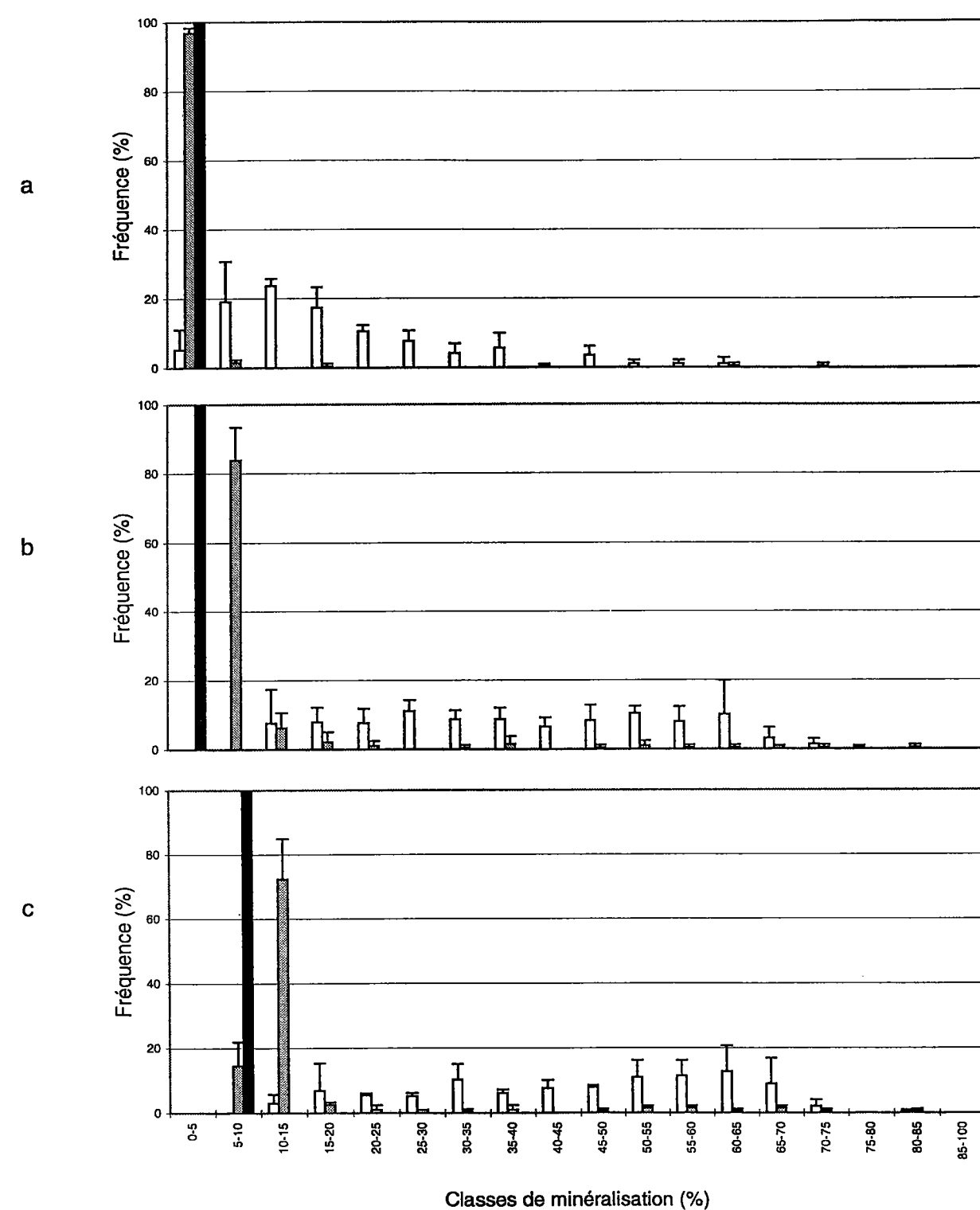
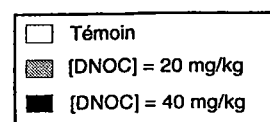
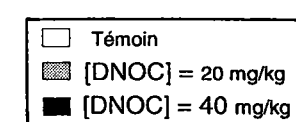
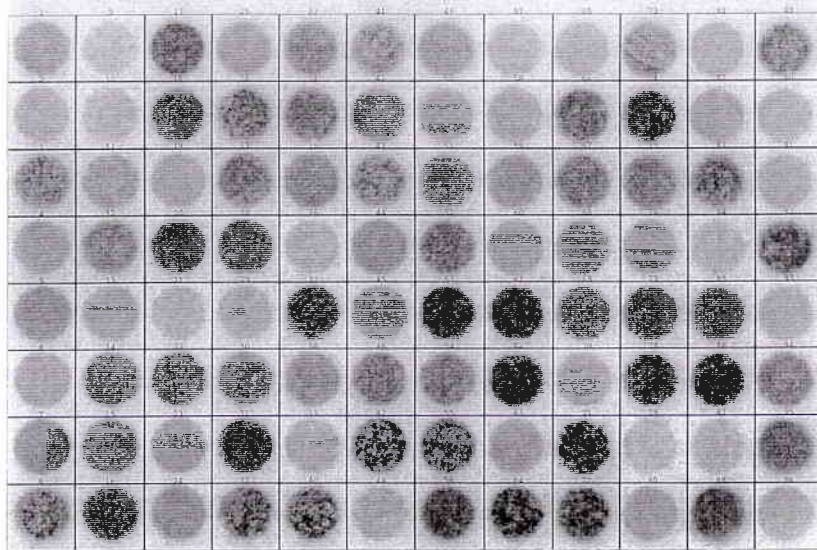


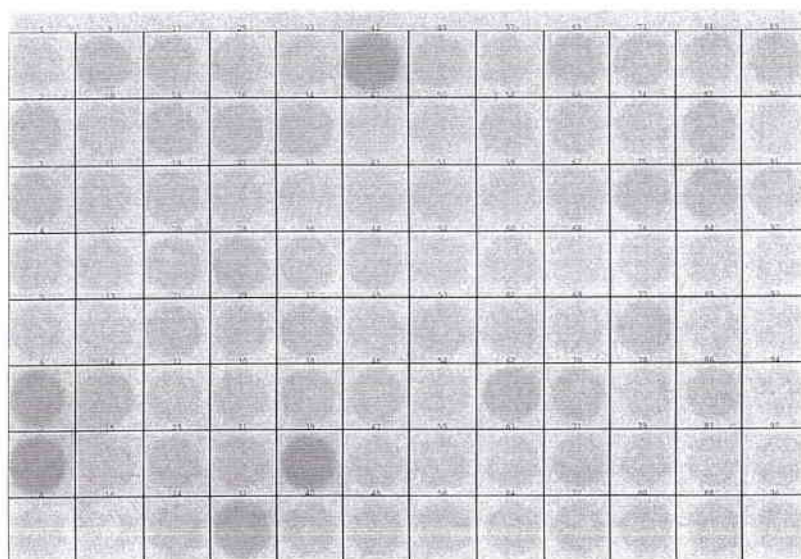
Figure III-21 : Distribution des agrégats des échantillons de sols témoin et traités au DNOC par classes de minéralisation exprimée en % par rapport à la radioactivité initiale pour les périodes 0-7 (a), 0-14 (b) et 0-28 (c) jours après 28 jours au contact du DNOC.



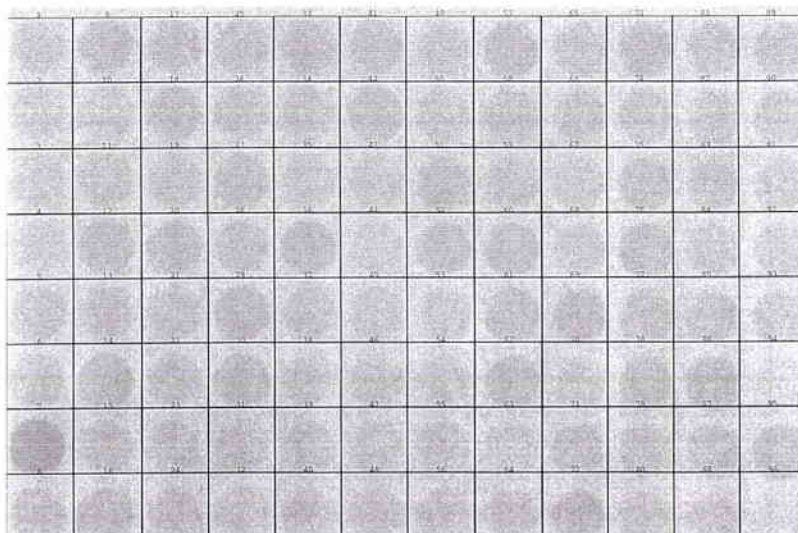
1



2



3



4

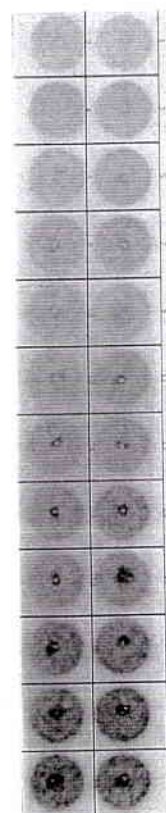


Figure III-22 : Autoradiogramme obtenu par analyse d'image (Phosphorimager 445 SI, Molecular Dynamics).

1 : Témoin

2 : $[DNOC] = 20 \text{ mg kg}^{-1}$

3 : $[DNOC] = 40 \text{ mg kg}^{-1}$

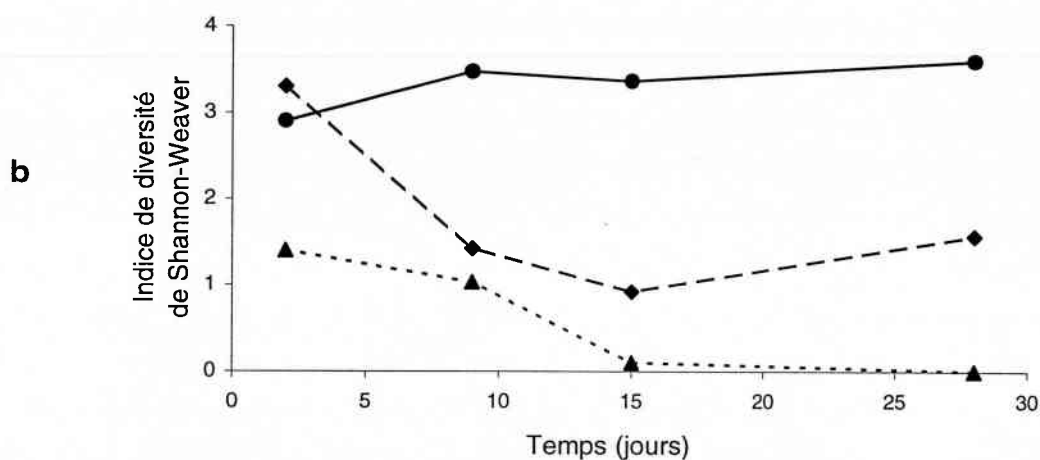
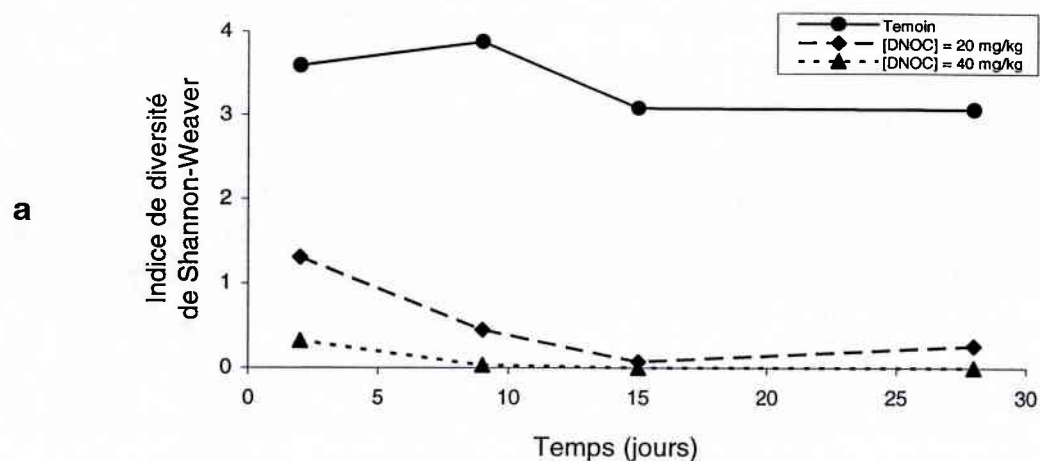
4 : Gamme de $H^{14}CO_3$ reliant l'intensité lumineuse de la tache à la quantité de radioactivité présente sur le filtre.

période de contrôle de 28 jours. La limite biologique à la dégradation est encore plus évidente, sans possibilité de rattrapage et probablement associée à des espèces ou communautés microbiennes à faible capacité d'assimilation pour le carbone de la molécule de 2,4-D.

Au cours de la période de préincubation en massif, on assiste à une modification progressive de la répartition des agrégats selon les trois catégories précédemment définies avec, pour conséquence, une évolution différente dans les profils des pourcentages cumulés de minéralisation au cours du temps. En effet, pour le lot d'agrégats prélevé après 2 jours de préincubation (figure III-14a'), on passe progressivement d'une distribution bimodale des pourcentages cumulés de minéralisation à 7 jours à une distribution pratiquement unimodale en fin de minéralisation, qui témoigne à la fois d'une forte proportion d'agrégats disposant d'un important potentiel initial de minéralisation et d'une forte capacité de rattrapage pour un second ensemble d'agrégats. Ce type d'évolution se retrouve globalement inchangé après 9 jours de préincubation (figure III-15a'), puis s'inverse par la suite. En effet, pour le lot d'agrégats âgés de 15 jours (figure II-16a'), la bimodalité dans la distribution des pourcentages de dégradation du 2,4-D n'apparaît pas immédiatement mais seulement 14 jours après l'apport de l'herbicide. Ce comportement correspond à une diminution sensible de la fraction des agrégats à forte activité initiale de dégradation au profit de ceux dont la microflore dégradante reste peu performante ou développe une activité plus tardive. Ce même schéma évolutif se confirme pour le lot d'agrégats préincubés pendant 28 jours (figure III-17a'). Ce résultat suggère que la mise en incubation du sol provoque le développement initial d'une microflore opportuniste zymogène contenant des espèces dégradantes dont l'activité peut être stimulée par une certaine accessibilité initiale du carbone organique facilement minéralisable. Le vieillissement du sol correspond à une réduction de cette microflore dégradante zymogène et au renforcement du rôle d'espèces autochtones moins nombreuses mais mieux armées pour se développer aux dépens de dérivés aromatiques issus de la matière organique stabilisée du sol et dont le 2,4-D peut apparaître comme un analogue structural. Ces résultats vont dans le sens des observations déjà réalisées par Soulas (1993) à partir d'une étude plus fine des cinétiques de minéralisation du ^{14}C -2,4-D dans des massifs d'agrégats. Ils confirment le caractère instable de la structure ainsi que la diversité métabolique de la communauté microbienne du sol dégradant le 2,4-D.

(2) cas des échantillons traités au DNOC

Un traitement du sol au DNOC contribue à une modification de la distribution du potentiel de dégradation parmi les différents agrégats (figure III-22). L'ampleur de la modification se caractérise essentiellement par une diminution très sensible de la fraction des agrégats manifestant une activité précoce de minéralisation de sorte qu'après 7 jours et pour la dose la plus faible en DNOC (fig III-14b') on observe, par rapport aux agrégats de sol témoin, un recentrage du profil de répartition des pourcentages de minéralisation autour d'une valeur inférieure à 10 %. L'évolution ultérieure de ce profil se traduit à la fois par un léger déplacement



c

Traitement	2 jours	9 jours	15 jours	28 jours
Témoïn	1.93	2.00	1.78	1.78
[DNOC] = 20 mg kg ⁻¹	1.15	0.67	0.26	0.51
[DNOC] = 40 mg kg ⁻¹	0.57	0.17	0.00	0.00

d

Traitement	2 jours	9 jours	15 jours	28 jours
Témoïn	1.73	1.89	1.86	1.93
[DNOC] = 20 mg kg ⁻¹	1.85	1.20	0.96	1.26
[DNOC] = 40 mg kg ⁻¹	1.19	1.02	0.32	0.00

Figure III-23 : Modification de l'indice de diversité de Shannon-Weaver après un traitement au DNOC calculé pour différents temps de contact du sol avec le DNOC sur la période 0-7 jours (a) et 0-28 jours (b).
Estimation de l'écart-type sur la valeur de l'indice de Shannon-Weaver correspondant à chaque situation sur la période 0-7 jours (c) et 0-28 jours (d).

du maximum de minéralisation qui, après 28 jours, se situe à un pourcentage de minéralisation de 20 % et l'apparition d'une traînée vers les pourcentages plus élevés, qui témoigne du développement tardif d'une activité de minéralisation chez un nombre limité d'agrégats. Le temps d'exposition au DNOC ainsi que sa concentration ne font que renforcer ces tendances. Il est possible de constater que l'on obtient le même type de profil et d'évolution 2 jours après un traitement au DNOC à 40 mg kg⁻¹ (sol sec) (figure III-14c') ou 28 jours après un traitement à 20 mg kg⁻¹ (figure III-17b'). Il s'agit là d'une manifestation de l'effet bien connu du facteur "c x t" en matière d'impact écotoxicologique.

Cependant dans notre cas particulier, la progressivité de l'effet avec le temps pourrait être, au moins en partie, liée à la diffusion du DNOC dans le massif d'agrégats. Certains d'entre eux pourraient être temporairement exempts de DNOC compte-tenu de l'apport initial inégalement réparti. Par ailleurs on note, après 28 jours de préincubation en présence de DNOC, à la dose la plus faible (figure III-17b' et III-21), la réapparition d'un nombre restreint mais non négligeable d'agrégats ayant retrouvé une forte capacité de minéralisation. Il s'agit là probablement de l'indication que, sur ces agrégats au moins, la concentration en DNOC a régressé à un niveau écologiquement supportable ou qu'une microflore résistante au DNOC et dégradant le 2,4-D a pu s'y développer. Le chapitre précédent nous a clairement montré qu'une telle possibilité n'était pas à écarter. Signalons enfin, qu'à la plus forte concentration en DNOC, la réduction avec le temps de la capacité du sol à dégrader le 2,4-D est très importante (figure III-14c', 15c', 16c' et 17c'). A aucun moment cependant elle ne disparaît : après 28 jours d'exposition au DNOC, tous les agrégats possèdent une activité résiduelle de dégradation qui conduit à une libération de radioactivité sous forme de ¹⁴CO₂ de l'ordre de 10 % de la radioactivité initiale introduite par le ¹⁴C-2,4-D (figure III-17c).

Ces différentes observations mettent donc clairement en évidence un effet négatif du DNOC sur la capacité de la microflore du sol à dégrader le 2,4-D. Cet effet, également observé avec le triclopyr (Lobaugh *et al.*, 1994), semble affecter en premier lieu la microflore zymogène dont le rôle précoce et efficace est considérablement réduit. Par la suite, c'est l'ensemble des acteurs microbiens de la dégradation qui réagit défavorablement et d'autant plus rapidement que la concentration est plus élevée. Ces conclusions sont confortées par un examen de l'évolution de l'indice de Shannon-Weaver calculé après différentes périodes d'exposition du sol au DNOC à partir des diagrammes de distribution des agrégats en classes d'activité exprimées en pourcentages de radioactivité libérée sous forme de ¹⁴CO₂ à 7 (figure III-23a) et 28 jours (figure III-23b). On observe effectivement, après seulement 2 jours de contact avec le DNOC, une réduction importante de l'indice de diversité à 7 jours (ID7) pour la dose de 20 mg kg⁻¹. Cette évolution est en rapport avec la diminution importante du nombre des espèces dégradantes dont l'activité, dans les agrégats témoins, se manifeste rapidement dans les jours qui suivent l'apport du 2,4-D. Par contre, le même indice calculé après 28 jours d'incubation (ID 28) a une valeur qui témoigne d'une redispersion tardive de la capacité des agrégats à dégrader le 2,4-D.

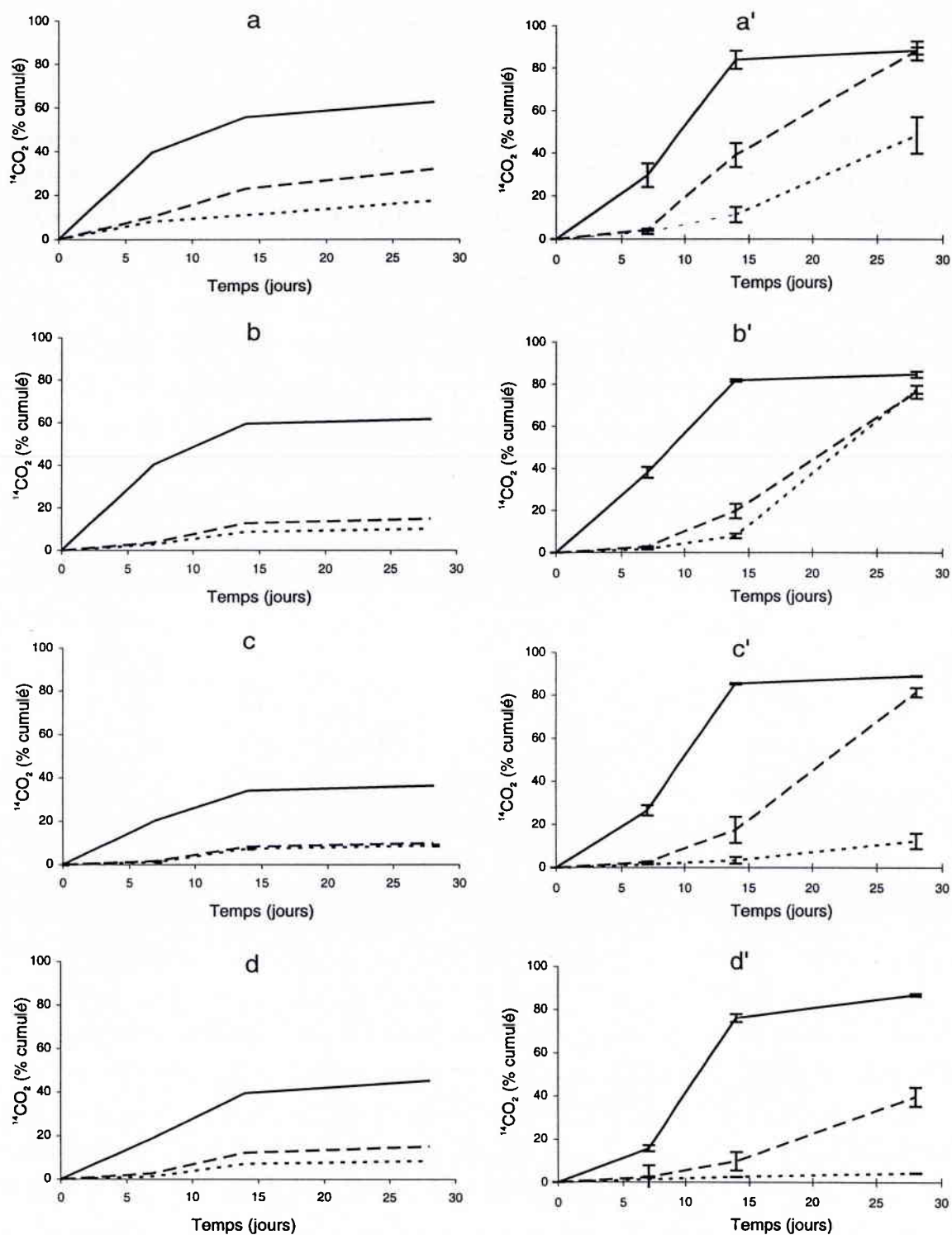


Figure III-24 : Cinétique de minéralisation du 2,4-D [$^{14}\text{C-COOH}$] dans les agrégats (à gauche) et dans les massifs d'agrégats (à droite) de sol.

a et a' : après 2 jours d'incubation avec le DNOC
 b et b' : après 9 jours d'incubation avec le DNOC
 c et c' : après 15 jours d'incubation avec le DNOC
 d et d' : après 28 jours d'incubation avec le DNOC

— Témoin
 --- traité DNOC 20 mg/kg
 ... traité DNOC 40 mg/kg

Le vieillissement des agrégats en présence de DNOC accentue la tendance à la réduction des indices de diversité à 7 ou 28 jours confirmant ainsi le regroupement des agrégats dans les classes de faible activité. Cependant, le relèvement de l'indice ID28, calculé à partir du lot d'agrégats préalablement laissés 28 jours en présence de DNOC à 20 mg kg⁻¹, confirme également la tendance à une certaine réversibilité de l'effet du DNOC.

b. Effet du DNOC sur la minéralisation comparée du ¹⁴C-2,4-D dans des agrégats individuels ou des massifs d'agrégats. Effet sur l'incorporation du carbone.

(1) Cinétiques de minéralisation

Les résultats relatifs à l'étude comparative des cinétiques de minéralisation du ¹⁴C-2,4-D dans les agrégats individuels et dans les massifs d'agrégats sont représentés sur la figure III-24. Sur la partie gauche de la figure, nous avons reporté les résultats déjà présentés sur les figures III-14 à III-17 en ne faisant figurer que la courbe théorique dont les différents points correspondent aux moyennes arithmétiques des pourcentages cumulés de radioactivités libérés sous forme de ¹⁴CO₂ pour l'ensemble des agrégats ayant subi le même prétraitement. Ce sont ces cinétiques "moyennes" que nous avons comparées aux cinétiques de minéralisation du ¹⁴C-2,4-D obtenues à partir de massifs d'agrégats telles qu'elles apparaissent sur la partie droite de la figure III-24. Il ressort de cette comparaison deux différences notables :

La première différence concerne la forme des cinétiques. Pour les agrégats individuels, les cinétiques "moyennes" sont en règle générale de type monomoléculaire signifiant une réduction constante de la vitesse "moyenne" de minéralisation. Au contraire, pour les massifs d'agrégats, la forme sigmoïde ou exponentielle prévaut, correspondant à un enrichissement plus ou moins tardif des échantillons de sol en espèces microbiennes dégradantes. Ces deux tendances se traduisent par des pourcentages finaux de minéralisation toujours supérieurs dans les massifs d'agrégats. Pour les échantillons de sol témoin, cette différence représente 20 à 25 % de la radioactivité initiale pour le premier temps de préincubation et atteint 40 % pour des échantillons de sol âgés de 28 jours. La présence de DNOC tend à augmenter ces écarts qui peuvent atteindre 70 % de la radioactivité initiale dans le cas du sol préexposé pendant 15 jours à 20 mg kg⁻¹ de DNOC. En fait, ces écarts sont une manifestation tardive due aux différentes formes de cinétiques. En effet, sur la figure III-25, nous avons représenté les différentes lignes de régression obtenues en comparant, tous traitements confondus et pour les périodes de référence 0-7, 7-14, 14-28 et 0-28 jours, la moyenne des pourcentages de minéralisation obtenus à partir des agrégats individuels, à celles des pourcentages correspondant aux massifs d'agrégats. Il ressort nettement de ces différentes régressions qu'au cours de la première semaine, la minéralisation du ¹⁴C-2,4-D progresse en moyenne plus rapidement dans les agrégats individuels que dans les massifs d'agrégats. Ce phénomène s'inverse dans la seconde semaine.

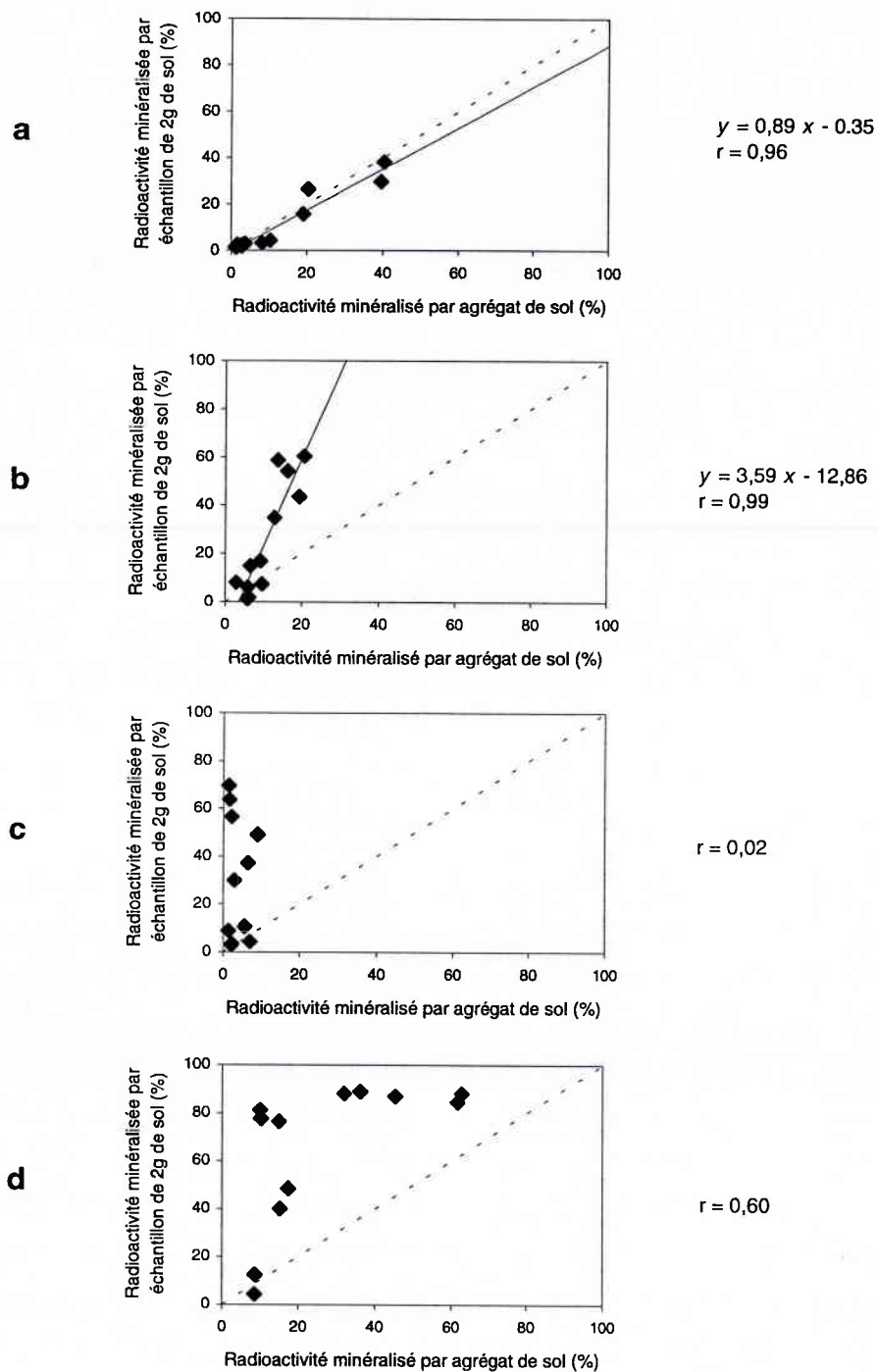


Figure III-25 : Etude de la régression entre les pourcentages finaux de radioactivité libérée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ dans les agrégats individuels et les massifs d'agrégats de sol.

- a : entre 0 et 7 jours de minéralisation
- b : entre 7 et 14 jours de minéralisation
- c : entre 14 et 28 jours de minéralisation
- d : entre 0 et 28 jours de minéralisation

Le second point distinctif du comportement cinétique des agrégats individuels et des massifs d'agrégats concerne leur réponse à la présence du DNOC (figure III-24). Alors que dans les agrégats individuels les différences que l'on observe dans les pourcentages cumulés de minéralisation entre échantillons de sol témoin et traités tendent au mieux à se stabiliser, avec les massifs d'agrégats, à une exception près, un rattrapage plus ou moins tardif et plus ou moins prononcé est toujours visible.

Ces différents résultats plaident en faveur d'une interaction entre agrégats qui aurait pour conséquence à la fois une meilleure efficacité de transformation du 2,4-D et une capacité accrue à restaurer cette activité à la suite d'un traitement biocide. Cette différence de comportement peut d'abord être interprétée comme résultant d'une limite à l'expression de la microflore dégradante contenue dans chaque agrégat individuel. Il est en effet tout à fait possible que la faible réserve en eau de chaque agrégat individuel ne suffise pas à maintenir, sur la totalité de la période de suivi des cinétiques de minéralisation, une humidité compatible avec le maintien d'une activité microbienne optimale. La limite interviendrait dans la seconde semaine. Or, c'est précisément au cours de cette période que de nombreux agrégats développent une capacité à dégrader le 2,4-D. Cette constatation n'invalide pas l'interprétation précédente, notamment dans la phase finale des cinétiques de minéralisation. Elle en limite cependant la portée laissant la place à une deuxième interprétation. C'est celle d'une possibilité de passage de matériel carboné, vivant ou non, entre agrégat d'un même massif. Ainsi, un agrégat dépourvu de microflore dégradante peut jouer le rôle de nourrice pour la microflore dégradante présente sur des agrégats voisins; surtout, ces derniers sont autant de sources d'inoculation laissant aux espèces les plus performantes la possibilité de quitter le cadre de leur agrégat d'origine pour coloniser les agrégats voisins et, éventuellement, se substituer aux espèces autochtones.

(2) Cinétique d'incorporation

Ces résultats relatifs à la mesure de l'incorporation biologique de carbone radioactif apporté sous forme de ^{14}C -2,4-D à des échantillons de sol préalablement soumis à une préincubation, pour certains d'entre eux en présence de DNOC à 20 ou 40 mg kg⁻¹, sont reportés sur les tableaux III-1-1 et III-1-2 et figure III-26.

Le tableau III-1-1 donne les valeurs de carbone microbien radioactif facilement minéralisable déterminé par la technique classique de fumigation-incubation, assorties de lettres définissant le degré de signification des différences observées. Le tableau III-1-2 rapporte, quant à lui, les valeurs des paramètres du modèle ayant servi à déterminer la valeur du carbone microbien radioactif (paramètre b) par la même technique interprétée par une méthode cinétique. D'une façon générale, cette dernière procédure conduit à des valeurs plus élevées de la fraction de la radioactivité incorporée dans la biomasse.

L'influence du prétraitement du sol sur l'incorporation biologique de radioactivité déterminée à la fin de chaque cinétique de minéralisation est représentée sur la figure III-26. On y constate

Tableau III-1 : Détermination du compartiment facilement minéralisable de la biomasse du sol.

1- par l'utilisation de la relation, ($F_{(0,7)} - F_{(7,14)}$)

Ces valeurs correspondent à la moyenne de la biomasse microbienne, non corrigée du K_c , de 4 échantillons de 2 g de sol. Les valeurs suivies par la (les) même (s) lettre (s) ne diffèrent pas au seuil de 5 % ($P < 0,05$).

Temps	Traitement au DNOC (mg.kg ⁻¹ sol sec)			C.V (%)
	0	20	40	
2 jours	1,39 a	1,26 a	0,88 b	14.8
9 jours	1,29 a	1,37 a	1,27 a	13.8
15 jours	1,33 a	1,32 a	0,18 c	8.7
28 jours	1,54 a	0,76 b	0.14 c	17.3

2- par une méthode de modélisation (Chaussod R. et Nicolardot B., 1982) : paramètres du modèle utilisés pour décrire l'incorporation de radioactivité dans la biomasse microbienne.

Temps	Traitement au DNOC (mg.kg ⁻¹ sol sec)	b	k _b	c
2 jours	0	1,557 ± 0,132	0,043 ± 0007	0,567 ± 0,150
	20	1,506 ± 0,082	0,039 ± 0,007	0,385 ± 0,082
	40	1,191 ± 0,257	0,036 ± 0,013	0,328 ± 0,151
9 jours	0	1,360 ± 0,048	0,050 ± 0,003	0,605 ± 0,069
	20	1,773 ± 0,253	0,054 ± 0,013	0,363 ± 0,119
	40	2,01 ± 0,306	0,057 ± 0,014	0,251 ± 0,066
15 jours	0	1,507 ± 0,03	0,033 ± 0,002	0,574 ± 0,037
	20	1,624 ± 0,030	0,030 ± 0,002	0,389 ± 0,017
	40	0,257 ± 0,074	0,037 ± 0,004	0,472 ± 0,374
28 jours	0	1,739 ± 0,041	0,041 ± 0,002	0,644 ± 0,050
	20	0,747 ± 0,072	0,031 ± 0,004	0,783 ± 0,276
	40	0,145 ± 0,052	0,021 ± 0,003	0,495 ± 0,501

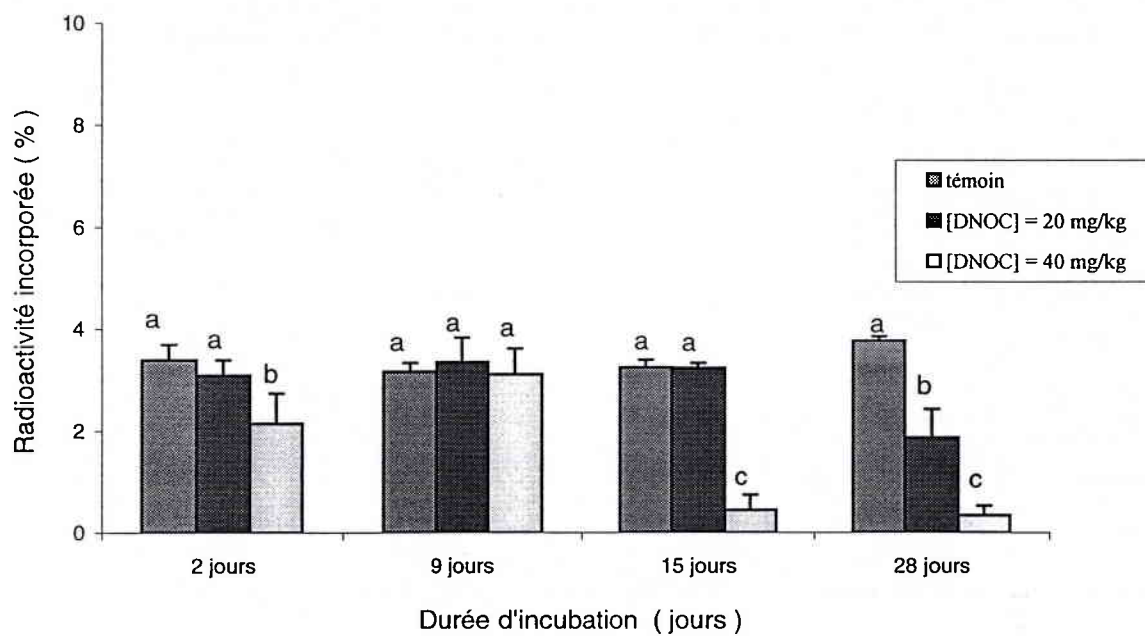


Figure III-26 : Effet du DNOC sur l'incorporation du ^{14}C -2,4-D dans la biomasse microbienne du sol $[(F_{0-7} - F_{7-14}) / 0,41]$.

Chaque valeur est la moyenne de la radioactivité incorporée dans la biomasse microbienne de quatre échantillons de 2 g de sol. Deux valeurs suivies de la(les) même(s) lettre(s) ne diffèrent pas significativement ($P < 0,05$).

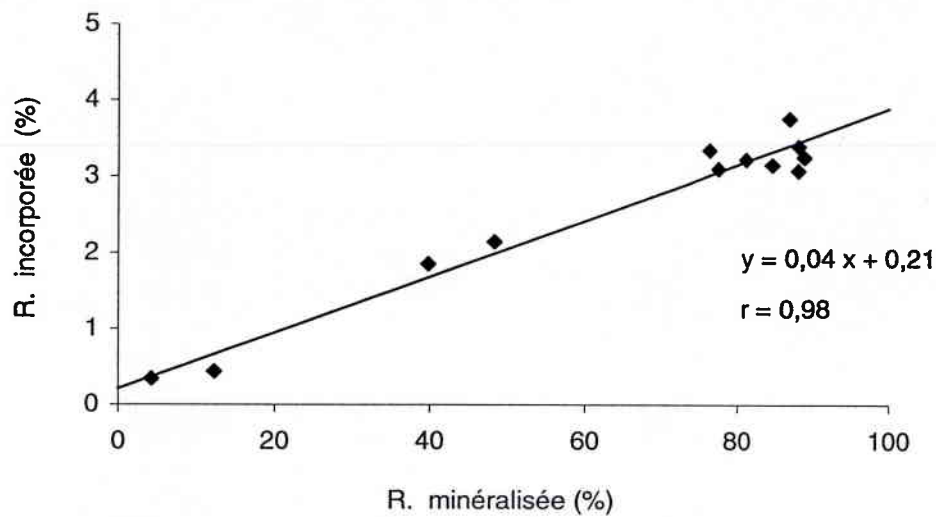


Figure III-27: Régression linéaire entre les pourcentages finaux de radioactivité incorporée dans la biomasse et ceux de la radioactivité libérée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$.
R. : radioactivité

une nouvelle fois l'influence de la concentration en DNOC et du temps de contact sur l'amplitude des effets observés. En outre, on observe une très bonne corrélation entre les pourcentages finaux de radioactivité libérée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ et les pourcentages correspondants de radioactivité incorporée dans la biomasse (figure III-27). Cette corrélation est l'indication claire que le DNOC agit bien sur l'efficacité de la minéralisation microbienne du 2,4-D plutôt que par une modification du rendement d'assimilation.

2. Seconde expérience

Les résultats expérimentaux de cette seconde expérience sont donnés sur les figures III-28 et III-29; ils concernent les cinétiques complètes de minéralisation du ^{14}C -2,4-D des agrégats individuels après 6 et 30 jours de préincubation sans ou en présence de DNOC aux concentrations de 10, 20, 30 ou 40 mg kg^{-1} .

Par ailleurs, sur les figures III-30 et III-31, nous avons représenté, sous forme de diagrammes, l'évolution dans le temps de la distribution des agrégats des échantillons de sol témoin et traités au DNOC à différentes doses en classes d'activité exprimée en pourcentages cumulés de carbone radioactif minéralisé, ceci pour deux périodes de préincubation de 6 jours et 30 jours.

Une première conclusion s'impose. Pour les échantillons de sol témoin, la distribution en classes d'activité après 6 jours de préincubation (figure III-28a') ne présente pas le caractère bimodal que nous avons observé au cours de la première expérience en début de cinétique pour une préincubation de durée équivalente. En outre, dans le cas présent, à l'issue de la première semaine de suivi des cinétiques de minéralisation, le caractère dégradant est relativement équitablement réparti entre les différents agrégats, l'évolution ultérieure se traduisant par une dispersion progressive de ce caractère. Après un mois de préincubation, les caractéristiques de distribution de la capacité dégradante et leur évolution au cours de la dégradation sont plus en accord avec ces résultats équivalents de la première expérience, la tendance au caractère bimodal se développant progressivement en cours de minéralisation.

La présence de DNOC, pendant la période de préincubation, a pour conséquence de recentrer la distribution du potentiel de dégradation, ceci de façon d'autant plus prononcée que la concentration en DNOC et la période d'exposition sont plus importantes. Ce résultat confirme tout à fait celui de la première expérience.

Enfin, sur la figure III-32, nous avons représenté l'évolution de la distribution comparée du potentiel de minéralisation exprimé par le pourcentage de carbone radioactif minéralisé au cours de la même période de référence, entre 7 et 14 jours après apport du 2,4-D, pour les différents lots d'agrégats prétraités à différentes concentrations en DNOC et au terme de périodes de préincubation en massif variant de 2 à 60 jours. Il ressort clairement de ces diagrammes que, toutes concentrations en DNOC confondues, l'éventail des activités minéralisatrices s'ouvre avec le temps, le phénomène étant d'autant plus prononcé que la concentration en DNOC est faible.

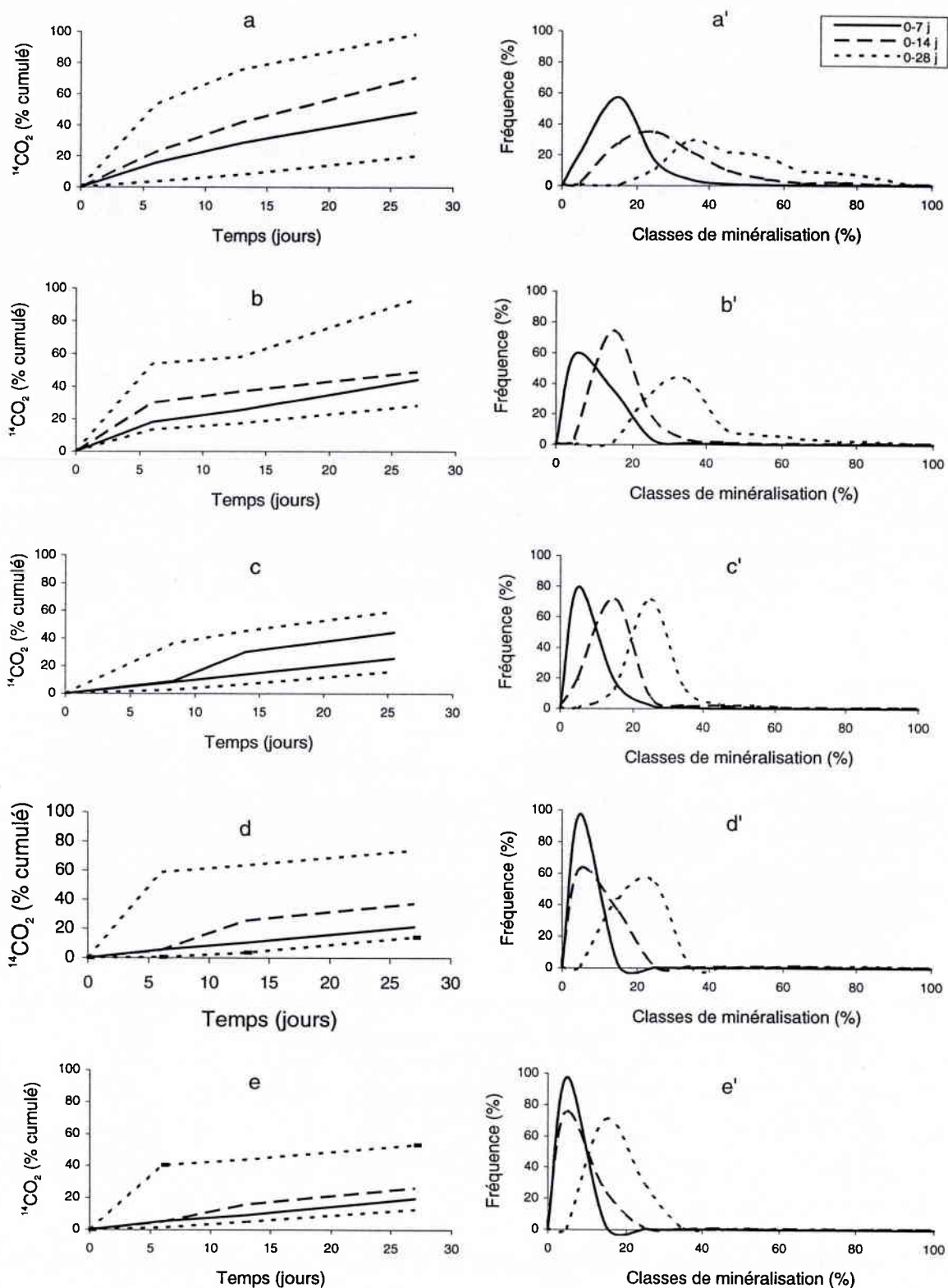


Figure III-28 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D [^{14}C -COOH] (à gauche) et distribution en classes de minéralisation (à droite) des agrégats provenant des échantillons de sol témoin (a et a') et traité au DNOC à 10 (b et b'), 20 (c et c'), 30 (d et d') et 40 (e et e') mg kg^{-1} après 6 jours au contact du DNOC.

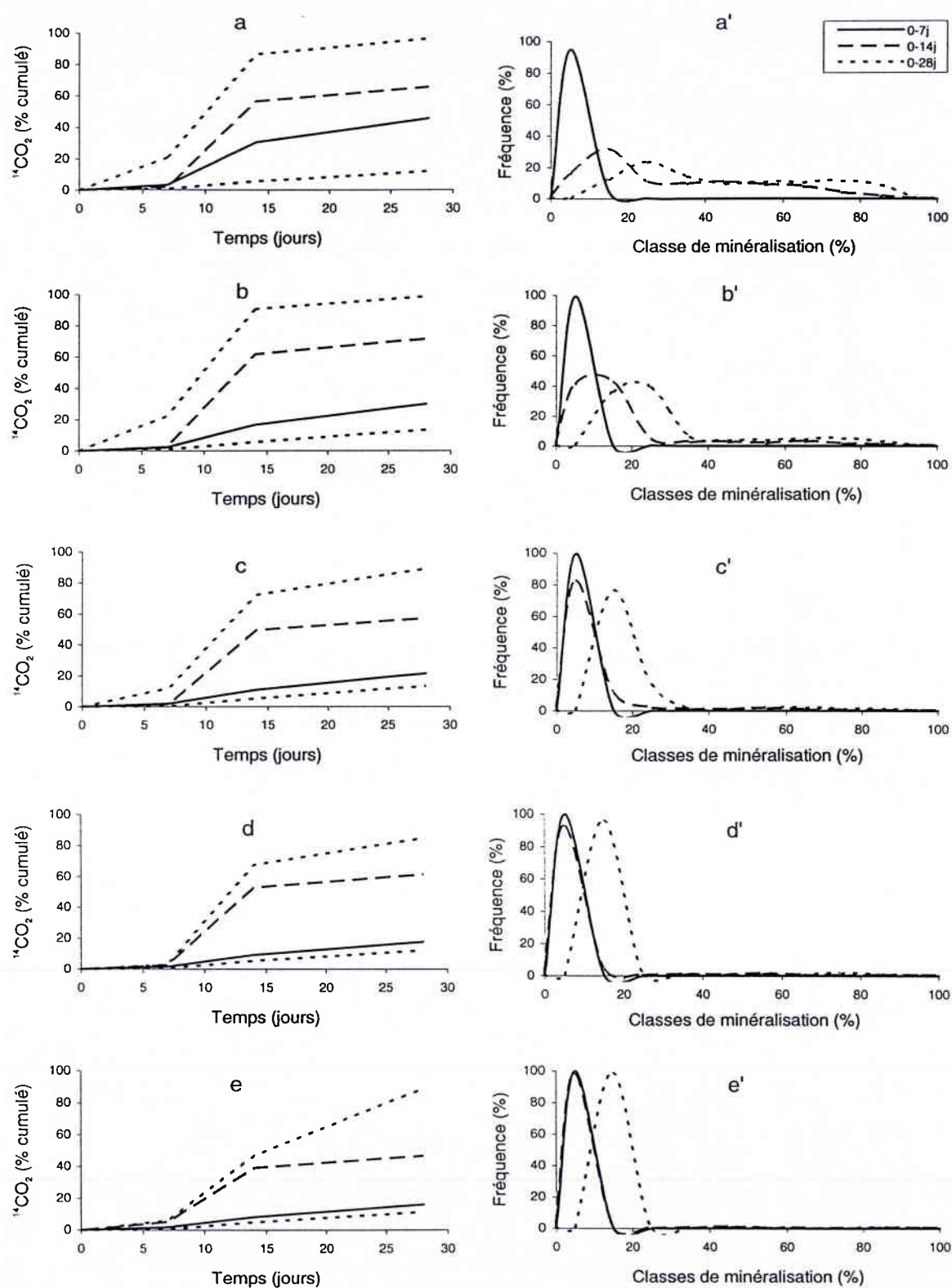
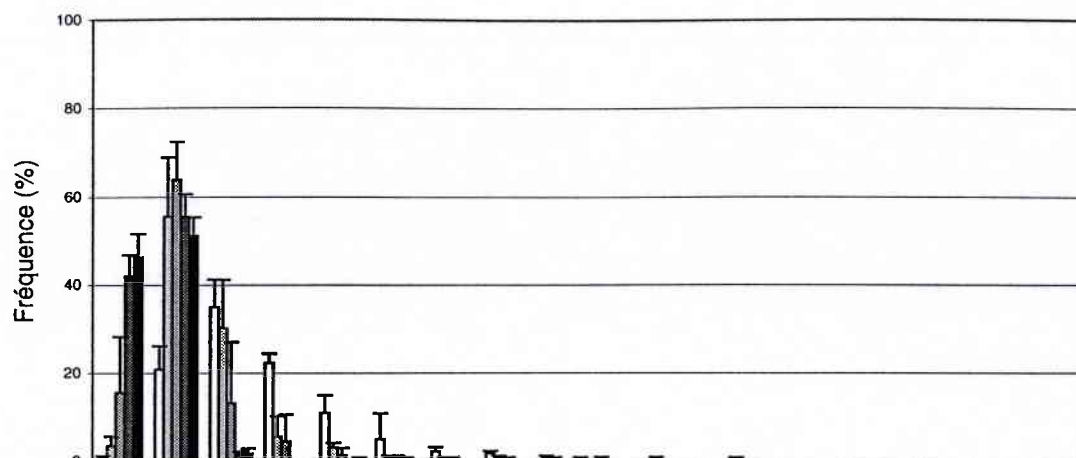
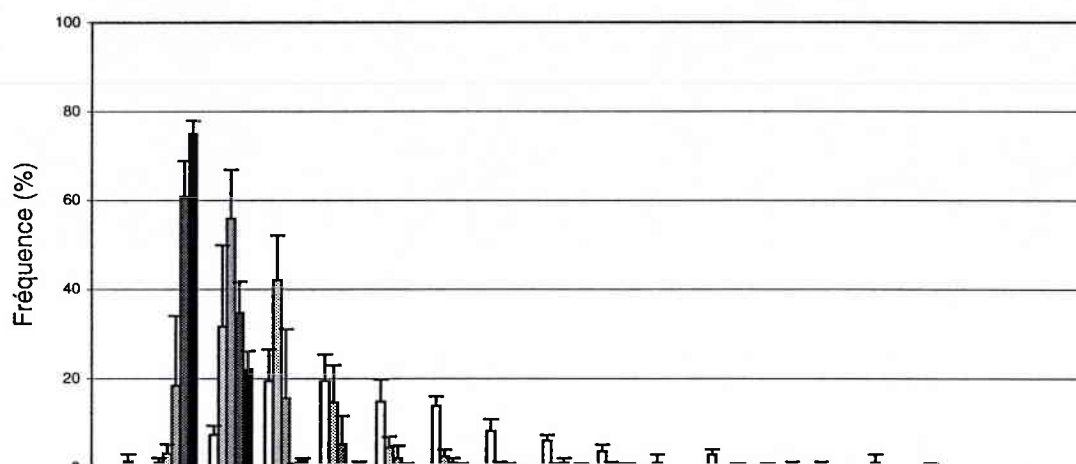


Figure III-29 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D [^{14}C -COOH] (à gauche) et distribution en classes de minéralisation des agrégats provenant des échantillons de sol témoin (a et a') et traités au DNOC à 10 (b et b'), 20 (c et c'), 30 (d et d'), 40 (e et e') mg kg^{-1} après 30 jours au contact du DNOC.

a



b



c

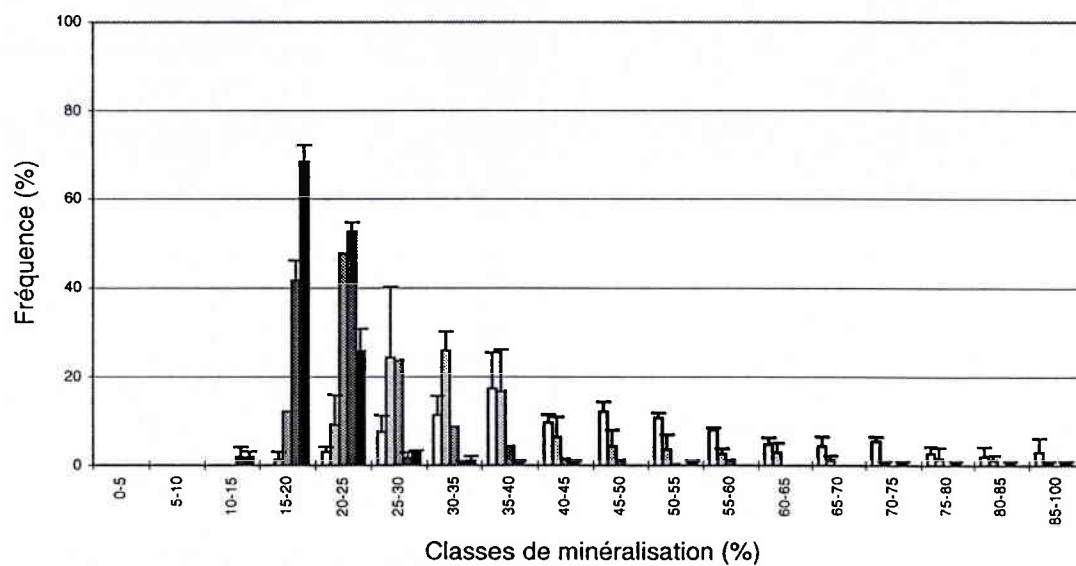


Figure III-30 : Distribution des agrégats provenant des échantillons de sol témoin et traités au DNOC par classes de minéralisation exprimée en % par rapport à la radioactivité initiale pour les périodes 0-7 (a), 0-14 (b) et 0-28 (c) jours après 6 jours au contact du DNOC.



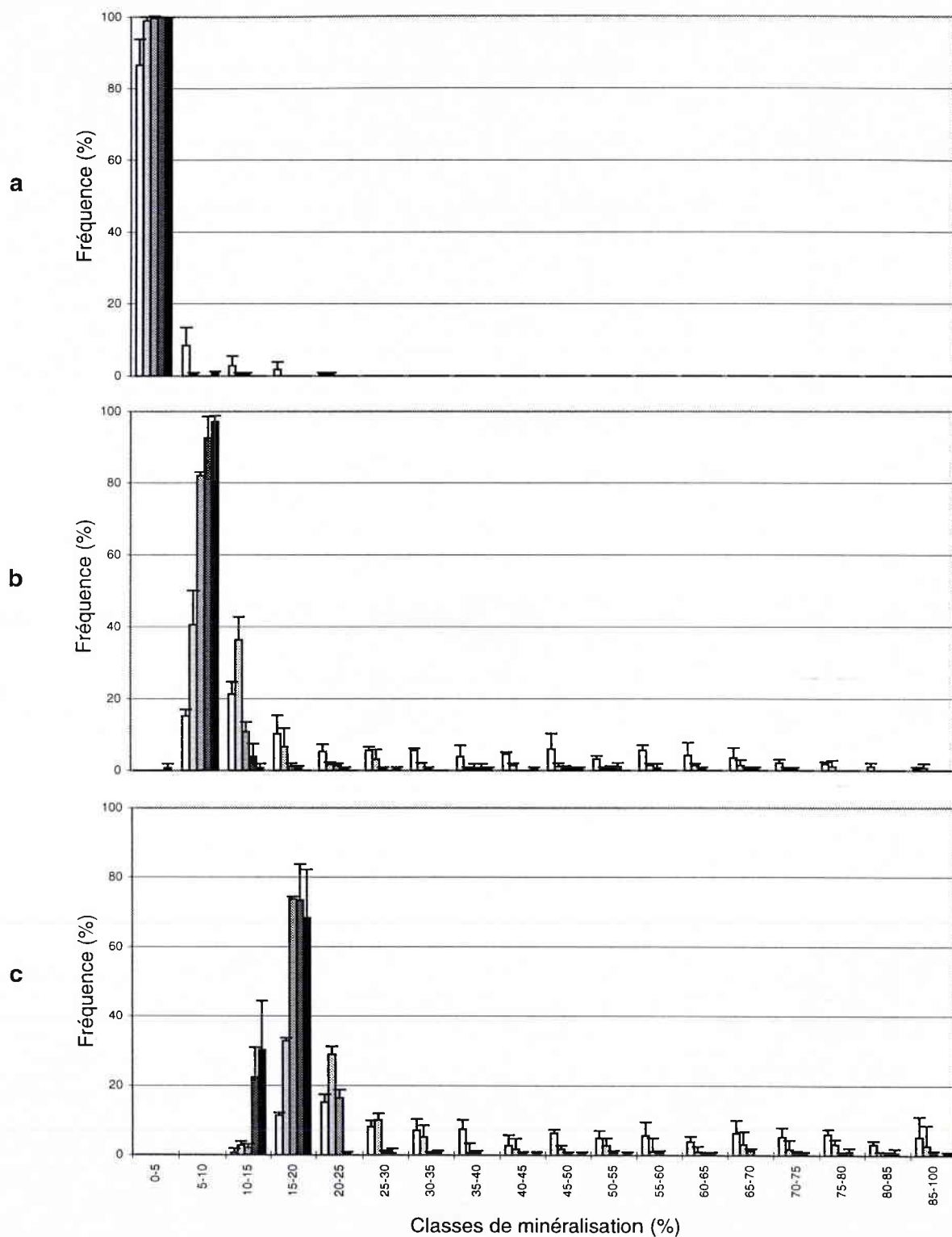
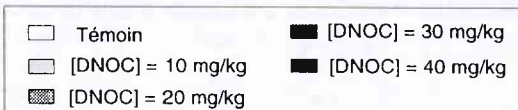


Figure III-31 : Distribution des agrégats provenant d'échantillons de sol témoin et traités au DNOC par classes de minéralisation exprimée en % par rapport à la radioactivité initiale pour les périodes 0-7 (a), 0-14 (b) et 0-28 (c) jours après 30 jours au contact du DNOC.



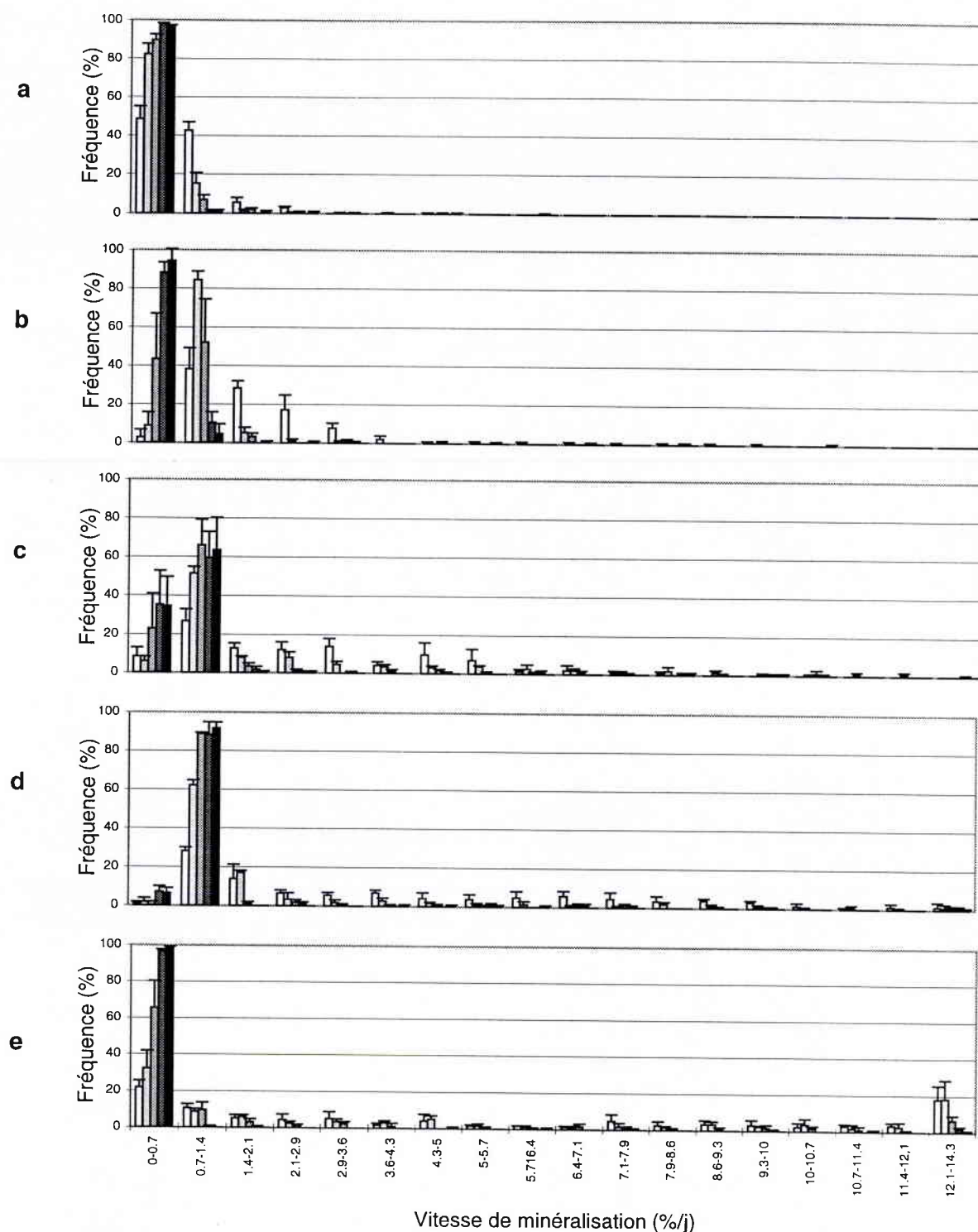
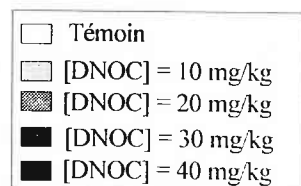
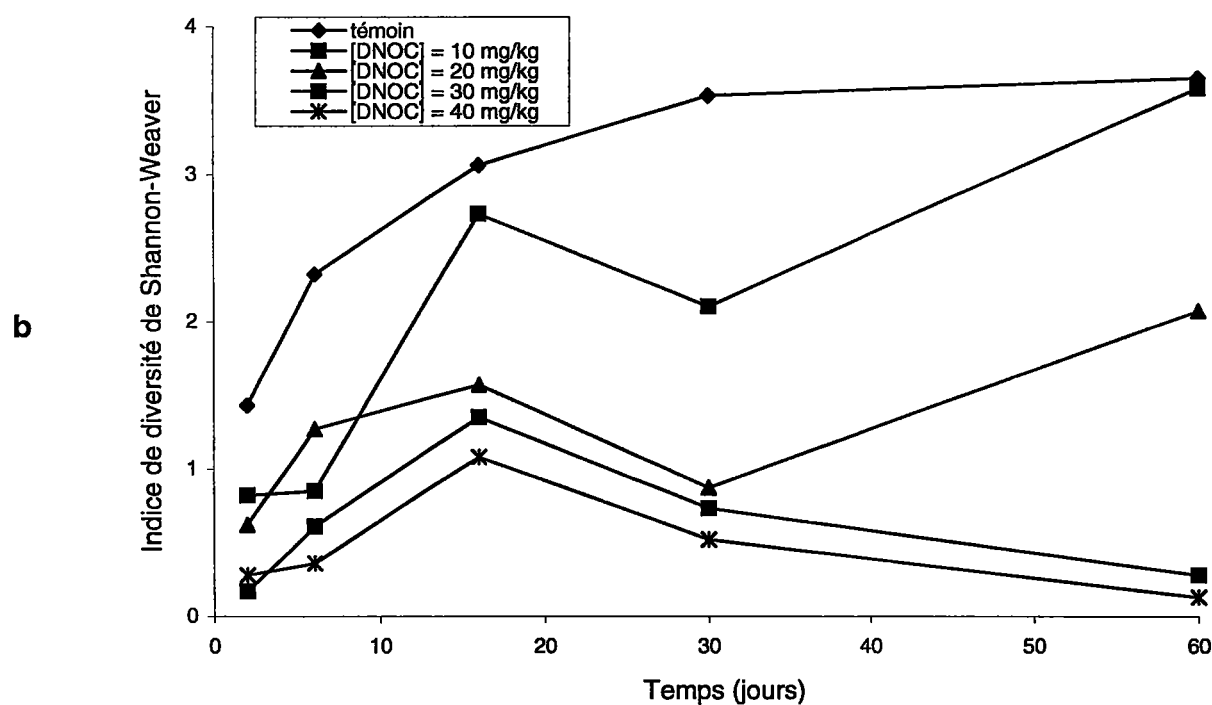
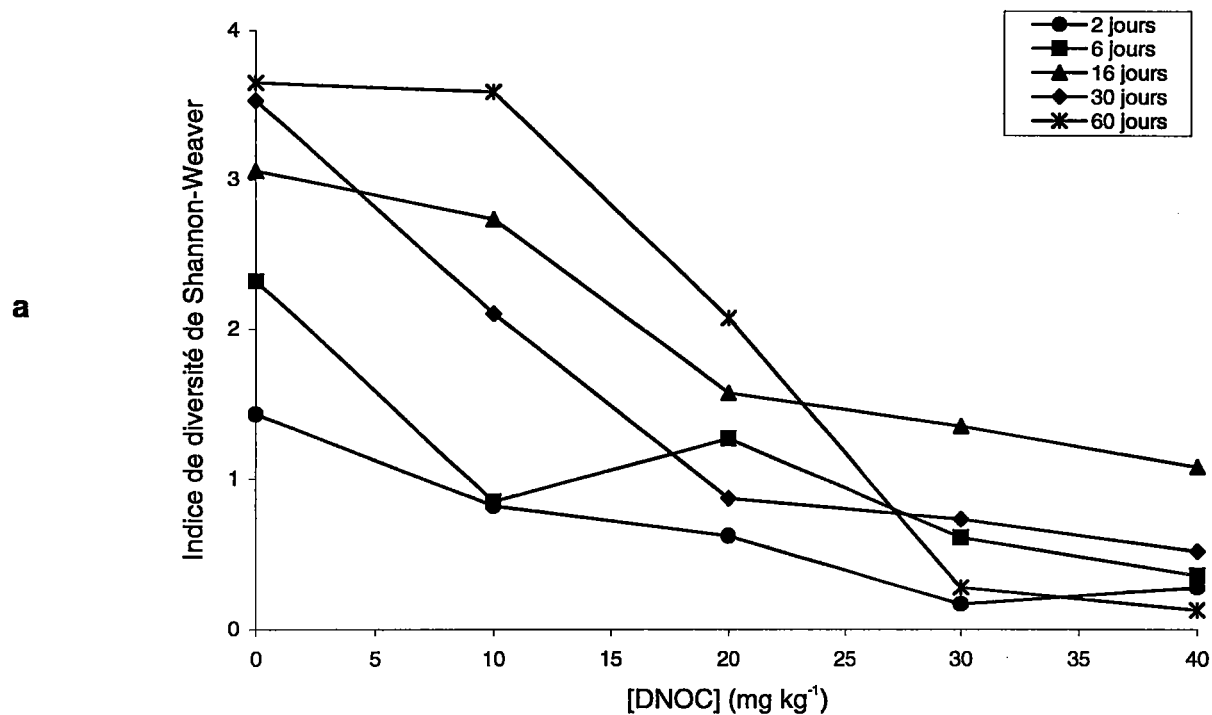


Figure III-32 : Distribution des agrégats provenant des échantillons de sol témoin et traités au DNOC par classes de minéralisation pour la période 7-14 jours exprimée en % par jour par rapport à la radioactivité initiale.

a : après 2 jours d'incubation avec le DNOC
 b : après 6 jours d'incubation avec le DNOC
 c : après 16 jours d'incubation avec le DNOC
 d : après 30 jours d'incubation avec le DNOC
 e : après 60 jours d'incubation avec le DNOC





c

Traitement	2 jours	6 jours	16 jours	30 jours	60 jours
Témoin	1.20	1.54	1.78	1.91	1.95
[DNOC] = 10 mg/kg	0.91	0.93	1.67	1.46	1.93
[DNOC] = 20 mg/kg	0.79	1.13	1.26	0.94	1.45
[DNOC] = 30 mg/kg	0.41	0.78	1.17	0.86	0.53
[DNOC] = 40 mg/kg	0.53	0.60	1.04	0.72	0.36

Figure III-33 : Modification de l'indice de diversité de Shannon-Weaver (a et b) (assorti de l'écart-type correspondant (c)) après un traitement au DNOC calculé sur la période 7-14 jours.

Cette tendance est confirmée par l'évolution de la valeur de l'indice de Shannon-Weaver calculée à partir des distributions précédentes (figure III-33). Cet indice est toujours initialement très faible, y compris pour les agrégats témoins; ce qui tendrait à accréditer l'hypothèse que le sol utilisé contenait initialement une microflore dégradante à la fois faiblement diversifiée et peu active. La conservation du sol à 4°C pendant trois mois en est probablement la raison principale. La mise en incubation préalable du sol semble progressivement réactiver une microflore dégradante, ce que traduisent à la fois le remplissage de classes d'activité de plus en plus élevée (figure III-32) et l'augmentation parallèle de l'indice de Shannon-Weaver (figure III-33). La présence du DNOC semble s'opposer à ce rétablissement microbien, temporairement jusqu'à 20 mg kg⁻¹, plus définitivement au delà de cette concentration. On peut donc penser que les différences qui caractérisent les observations relatives aux deux expériences s'expliquent essentiellement par une différence dans l'état biologique initial des échantillons de sol ayant servi dans chaque cas.

D. CONCLUSION

Nous avons montré que l'empreinte métabolique d'une communauté microbienne, déterminée au travers d'un profil d'utilisation de différents substrats carbonés et énergétiques basé sur le système de plaques de microtitration de type Biolog, offrait une base de classification des communautés microbiennes du sol plus en rapport avec leur rôle fonctionnel. Plusieurs exemples d'application sont rapportés dans la littérature comparant les caractéristiques métaboliques de communautés microbiennes issues d'habitats différents (Garland et Mills, 1991; Winding, 1994; Zak *et al.*, 1994; Garland, 1996). La question posée était de savoir si cette approche expérimentale, relayée par des techniques de statistique descriptive, possédait des caractéristiques de sensibilité permettant de déceler des dérives environnementales liées à des réarrangements microbiens, provoqués par la présence de pesticides dans le sol. L'exemple de Wünsche *et al.* (1995), concernant la modification des profils métaboliques de communautés microbiennes de sols fortement contaminés avec des hydrocarbures, ne permet pas de répondre entièrement à la question. Les processus d'adaptation en cause sont à l'origine de changements structuraux et métaboliques probablement très prononcés et sans commune mesure avec ceux qui accompagnent généralement la réponse d'une communauté microbienne d'un sol à la présence de pesticides. En nous appuyant sur l'exemple du DNOC, nous avons pu montrer que, même en réduisant le nombre de substrats et avec un traitement simplifié ne tenant pas compte des caractéristiques cinétiques de leur consommation, la diversité métabolique pouvait être un indicateur possible de l'impact écotoxicologique de composés chimiques.

Malgré tout, un certain nombre de critiques peuvent être formulées. La première concerne le caractère sélectif de la procédure lié à un mode de détection qui dépend d'une étape culturale. Une détection préférentielle de bactéries à stratégie de croissance de type r est donc probable.

En fait, ainsi que nous l'avons déjà dit à plusieurs reprises, cette caractéristique n'est pas réellement limitante tant que les espèces microbiennes en cause dans le test constituent un échantillonnage suffisamment vaste pour pouvoir être considéré comme représentatif du peuplement dont elles sont issues. On peut donc penser que le résultat du test sera d'autant moins probant que le milieu présente des caractéristiques d'oligotrophie plus prononcées favorisant les micro-organismes à stratégie de croissance de type K. La limite la plus sérieuse reste cependant l'impossibilité qu'il y a à interpréter les résultats en terme de changement de structure des communautés. Ainsi que le soulignent Haack *et al.* (1995), bien que la vitesse et l'intensité de la consommation des différents substrats soient, pour une communauté donnée, des paramètres reproductibles, ils ne traduisent pas la somme des activités individuelles des différents composants de la communauté. Une forte oxydation peut aussi bien être le résultat de l'activité simultanée de plusieurs espèces que celle d'une seule espèce particulièrement active.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons abordé un aspect différent des conséquences fonctionnelles liées à la présence d'un biocide dans le sol, celles qui affectent le déroulement d'une fonction particulière, en l'occurrence la dégradation du 2,4-D. Nous avons pu mettre en évidence que des agrégats millimétriques de sol présentent une grande variabilité dans le potentiel de dégradation du 2,4-D. Celle-ci trouve l'origine, d'une part dans une hétérogénéité de répartition spatiale des micro-organismes dégradants et des ressources carbonées originaires du sol, d'autre part dans des associations microbiennes répondant à des combinaisons différentes et enfin dans des capacités fonctionnelles éclatées en liaison avec le degré de convergence évolutive des gènes impliqués. Au cours du temps, on assiste à une redistribution de cette capacité que nous avons attribuée à un vieillissement du sol. Il correspond au phénomène habituel de remplacement progressif des espèces "zymogènes" par une microflore "autochtone" sans doute mieux préparée à utiliser le 2,4-D comme substrat alternatif aux composés aromatiques qui représentent l'essentiel de son approvisionnement carboné. Un traitement au DNOC s'avère toujours très pénalisant, y compris à la dose d'essai la plus faible pour laquelle la différence réside dans une plus grande progressivité de l'effet. Par ailleurs, pour cette dose réduite, une certaine réversibilité se manifeste au cours de la période de contrôle, liée soit à une dégradation de la molécule de DNOC, soit à l'apparition de souches plus tolérantes.

La comparaison des cinétiques de minéralisation dans des agrégats séparés et dans des massifs d'agrégats permet de souligner la forte interaction qui se manifeste entre agrégats et qui aurait pour conséquence à la fois une meilleure efficacité de transformation du 2,4-D et une meilleure capacité de restauration de cette activité à la suite d'un stress chimique.

Le DNOC perturbe également l'incorporation biologique dont l'importance dépend de la concentration et du temps d'exposition au DNOC. Cependant, la forte corrélation qui existe entre la minéralisation et l'incorporation biologique confirme que le DNOC agit préférentiellement sur la minéralisation du 2,4-D plutôt que sur l'incorporation biologique du carbone.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'utilisation répétée des produits phytosanitaires peut être considérée comme une source potentielle de pollution et faire craindre une évolution défavorable des écosystèmes agricoles. S'il est encore temps de la prévenir, encore faut-il mettre en œuvre une stratégie adaptée consistant à la fois à identifier les maillons de la biocénose les plus exposés et à caractériser les différents types de réponse, notamment en termes d'amplitude et de réversibilité, toute évolution pouvant être considérée comme acceptable tant qu'un retour à l'état initial reste possible. Or, sur ces deux points, nous sommes encore loin de pouvoir apporter des réponses satisfaisantes, d'une part en raison de notre méconnaissance actuelle du monde microbien dont le sol, point de passage obligé de la plupart des produits phytosanitaires, est l'habitat naturel, d'autre part à cause d'outils d'investigation inadaptés et/ou peu performants. On savait depuis longtemps que le sol était un réacteur biologique très performant couvrant un éventail de possibilités biochimiques encore largement inexploré. On a appris qu'il détenait un potentiel évolutif considérable et qu'il en était un lieu privilégié d'expression. On lui reconnaît des capacités à assurer une certaine permanence fonctionnelle dans des conditions extérieures changeantes, parfois même défavorables. Mais, ces différentes propriétés sont sous le contrôle d'organismes vivants et on peut aussi affirmer que le sol est une ressource périssable dont la protection doit rester l'objectif majeur. Il est donc nécessaire de préparer les instruments du diagnostic qui, seuls, permettront d'adapter les molécules et les usages à une production agricole dont les gains de productivité ne dépendent pas d'une altération progressive de l'outil de production.

C'est dans le cadre d'une recherche essentiellement méthodologique que nous avons voulu inscrire ce travail qui vaut davantage par le choix des différentes approches techniques que par celui de la molécule retenue, le DNOC, dont l'intérêt se situe plus dans la garantie d'une "efficacité" biologique que dans celui de la recherche d'une solution à un problème pratique réel. Par ailleurs, s'il est certain que les avancées récentes de la biologie moléculaire ouvrent de nouvelles voies dans l'analyse de la composition des communautés microbiennes naturelles, leur application à un milieu aussi complexe que le sol pose encore des problèmes qui ne permettent pas d'envisager l'abandon de techniques plus traditionnelles. La collecte de souches microbiennes à partir du sol et leur identification restent encore bien souvent la solution la plus sûre pour parvenir à une description des effets structuraux qui caractérisent la réaction des communautés microbiennes à la présence de biocides. Quant à l'approche fonctionnelle, elle permet de juger de l'état d'activité de la microflore et, pour cette raison, reste une référence en matière de jugement d'impact écotoxicologique. Il reste que toutes les fonctions sous contrôle microbien n'ont pas la même valeur en matière de sûreté de diagnostic

et de sensibilité. Nous avons fait l'hypothèse de l'existence d'une relation inverse entre la qualité d'indicateur d'une activité microbienne et la taille du groupe microbien concerné.

C'est cette raison qui nous a amené à faire référence à la dégradation du 2,4-D, dont on sait qu'elle est l'apanage d'un petit groupe de micro-organismes d'appartenance spécifique relativement diversifiée, comme révélateur de l'effet du DNOC.

Dans une première partie, nous avons considéré l'influence du DNOC sur la croissance de souches isolées de micro-organismes choisies dans trois groupes microbiens représentant probablement des complexités génétiques différentes. Deux d'entre eux ont une définition taxonomique, les souches de *Rhizobium* et de *Pseudomonas* alors que le troisième a une définition fonctionnelle, les micro-organismes dégradant le 2,4-D. Cette approche a longtemps été contestée pour la raison essentielle que les micro-organismes isolés peuvent présenter des formes métaboliques atypiques dont le fonctionnement peut être très éloigné de celui qu'elles manifestent dans des états de protection, dans un environnement physique et dans le cadre d'associations écologiques caractéristiques des milieux naturels. Il est évident que le recours aux cultures pures dans le seul but d'apprécier l'impact des produits phytosanitaires sur la microflore du sol pose des problèmes d'extrapolation auxquels nous n'avons pas l'intention de porter remède. Notre but était plutôt de concevoir cette approche, soit comme une recherche de souches particulièrement sensibles pouvant servir d'indicateurs précoces (sentinelles), soit dans le cadre d'un plan d'échantillonnage d'un nombre suffisamment élevé de souches microbiennes pour que la proportion d'entre elles qui manifeste une inhibition de croissance puisse être considérée comme un indice "statistique" en liaison avec l'impact potentiel, et donc l'activité biologique d'un produit. Les réponses que nous avons apportées sur ces points sont loin d'être concluantes probablement en raison d'un nombre trop limité de souches testées. De même, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de liaison particulière entre la valeur des paramètres biocinétiques du modèle de croissance retenu et les types de réponse des souches observés en présence de DNOC. Par contre, la relative diversité des réponses obtenues avec les souches dégradant le 2,4-D laisse penser que dans le sol la communauté dégradante est sujette à des modifications importantes de composition dont les conséquences en termes fonctionnels sont loin d'être négligeables ainsi qu'il ressort clairement des expérimentations rapportées dans la dernière partie. Sur cet exemple au moins, les observations faites à partir de souches isolées dans des conditions de laboratoire semblent trouver un prolongement fonctionnel dans le milieu naturel. Ce résultat ne suffit cependant pas à justifier une approche en définitive peu productive par rapport à l'investissement expérimental qu'elle nécessite.

Dans la seconde partie de ce travail, au delà de la description en termes structuraux du pouvoir déstabilisant du DNOC vis-à-vis des deux groupes microbiens représentant des fractions probablement très inégales de la microflore du sol, c'est la question de la pertinence du choix des communautés indicatrices qui se trouve posée. De leur richesse spécifique

peuvent dépendre d'une part leur représentativité et la justification qu'il y a à généraliser à l'ensemble de la microflore du sol des observations qui les concernent, d'autre part leur sensibilité, c'est-à-dire leur aptitude à réagir précocement à des stimuli de faible amplitude, enfin, l'importance des perturbations fonctionnelles qui en résultent. Par ailleurs, la prise en compte du temps nous a permis de placer notre analyse dans un contexte de réversibilité indissociable de tout jugement sur le caractère de tolérabilité des effets observés. Les principales conclusions auxquelles ce travail nous a permis d'arriver sont de nature différente. D'un point de vue technique, c'est l'analyse directe des diagrammes de distribution de fréquences des différentes espèces qui permet d'apprécier au mieux le sens et l'ampleur de l'impact écologique lié à la présence d'un polluant dans le sol. La principale limite est la lourdeur de l'approche expérimentale pour acquérir l'information nécessaire. En l'occurrence, en nous appuyant sur cette démarche, nous avons été en mesure de démontrer la réalité et la durée d'une perturbation qui n'apparaît pas de façon évidente à l'examen des variations de la taille des groupes microbiens concernés. Il ressort clairement de notre étude que le DNOC a des effets destructurants qui se manifestent sur les deux groupes microbiens que nous avons considérés et dont la valeur indicatrice semble par ailleurs tout à fait équivalente. Ainsi, sur les exemples présentés, l'ampleur des effets observés ne semblent pas liés à la richesse spécifique. Il apparaît nettement que le DNOC, surtout à la dose la plus élevée, contribue de façon égale à une diminution du nombre d'espèces de la microflore totale cultivable et de la microflore se développant sur milieu 2,4-D, tout en sélectionnant la croissance de bactéries Gram -. La seule différence entre ces deux groupes microbiens réside dans la rapidité de réponse qui se manifeste dès 7 jours dans le premier cas et après seulement deux semaines d'exposition dans le second. On constate d'ailleurs une certaine convergence dans l'évolution des indices de diversité, qu'ils soient calculés en fonction de critères morphologiques ou génotypiques. Enfin, nos observations confirment l'importance de la prise en compte du temps qui permet de juger de la progressivité ou chronicité des effets, notamment à des doses où un effet immédiat est peu marqué. Sur la durée de nos expérimentations dont certaines ont atteint deux mois, nous avons pu constater une certaine convergence, à long terme, des trajectoires évolutives pour des traitements initiaux à des concentrations différentes. Aucune de nos observations ne nous a conduit à envisager la possibilité d'une réversibilité se traduisant par une inversion de tendance en matière de diversité spécifique dont l'évolution naturelle semble être l'appauvrissement, y compris d'ailleurs, bien qu'à un degré moindre, dans les échantillons témoins.

Les observations précédentes trouvent un prolongement et une confirmation dans la dernière partie relative à un changement des capacités métaboliques de l'ensemble des bactéries cultivables ou de l'efficacité fonctionnelle des bactéries dégradant le 2,4-D. Nous avons en effet montré que la présence dans le sol d'un biocide, tel que le DNOC, était susceptible de modifier la signature métabolique d'une communauté microbienne, telle qu'on

peut la déterminer au travers d'un profil d'utilisation de différents substrats carbonés et énergétiques. Dans nos conditions expérimentales, ces changements se sont avérés suffisamment marqués pour avoir une signification biologique et être considérés comme de possibles indicateurs de l'impact écotoxicologique de composés chimiques toxiques. Cette approche relativement nouvelle nous semble intéressante par les différentes extensions d'usage qu'on peut envisager à des fins de prospection scientifique; à titre d'exemples, l'adjonction de substrats de nature aromatique plus en rapport avec ceux que l'on trouve plus communément dans le sol, ou des ensembles de substrats représentant des variations structurales sur un même motif moléculaire de base, destinés à davantage cibler une fonction particulière, ou encore des séries de substrats appartenant à des séquences métaboliques pour localiser des maillons fragilisés par la présence d'un biocide. Mais, cette approche vaut également par les perspectives d'application de routine, qui en font un candidat potentiel comme test à vocation réglementaire. On peut fixer néanmoins quelques limites à l'utilisation de cette technique. C'est, d'une part la sensibilité de détection de l'activité métabolique qui oblige à utiliser des concentrations en substrats sans rapport avec celles que l'on trouve habituellement dans les milieux naturels, notamment s'ils présentent des caractéristiques prononcées d'oligotrophie. C'est, d'autre part la difficulté qu'il y a à interpréter les résultats en terme de changements structuraux, la détection d'une activité métabolique pouvant être interprétée aussi bien comme liée au développement préférentiel d'une espèce unique ou, à l'inverse, à l'association bénéfique et productive de plusieurs individus. En réalité, cette technique à sa propre valeur prospective et constitue simplement un autre regard sur des phénomènes dont la difficulté d'appréhension justifie la diversité des approches.

Un second aspect des conséquences fonctionnelles liées à la présence d'un biocide dans le sol concerne celles qui affectent le déroulement d'une fonction particulière, en l'occurrence la dégradation du 2,4-D. Nous avons abordé cette question sur une base expérimentale différente de celle qui est communément acceptée. Nous avons considéré, non pas des échantillons "moyens" de sol, mais plutôt des agrégats ou microéchantillons considérés comme des entités fonctionnelles. Leurs caractéristiques de taille correspondent probablement à l'existence de communautés dégradantes construites sur des bases spécifiques (métaboliques et physiologiques), diversifiées et des organisations structurales différentes. Notre hypothèse de départ était l'existence d'une liaison entre ces disparités dans la composition et la construction de ces communautés dégradantes et leur sensibilité à un biocide. Il s'agissait au départ de jeter les bases d'une étude plus systématique concernant l'étude des relations "structure des communautés microbiennes-sensibilité". Notre démarche s'est révélée relativement fructueuse notamment en révélant une sensibilité inattendue de la fonction considérée en présence de DNOC. Ceci pourrait confirmer l'hypothèse assez souvent avancée d'une fragilisation et d'une sensibilisation des communautés microbiennes lorsque leur composition spécifique

subit une simplification ou, plus généralement, lorsque la fonction considérée ne regroupe naturellement qu'un nombre limité d'individus.

Ce travail démontre à l'évidence que certaines agressions chimiques, telles que celles qui résultent de la présence de DNOC, provoquent, au sein de la microflore du sol, des réajustements spécifiques et des adaptations fonctionnelles relativement prononcées. Ceux-ci trouvent, dans les dispositifs clos de laboratoire, un terrain privilégié d'expression. Les conditions naturelles en limitent probablement l'amplitude. On peut cependant se poser la question d'un effet de mémoire qui, à long terme, pourrait se traduire par des dérives préjudiciables à la capacité de production du sol. Malheureusement, aucun dispositif expérimental de longue durée ne permet aujourd'hui d'aborder cette question dans des conditions satisfaisantes.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Amy P.S., Haldeman D.L., Ringelberg D., Hall D.H., Russell C., 1992. Comparison of identification systems for classification of bacteria isolated from water and endolithic habitats within the deep subsurface. *Appl. Environ. Microbiol.*, 3367-3373.

Amy P.S., Schulke J.W., Frazier L.M., Seidler R.J., 1985. Characterization of aquatic bacteria and cloning of genes specifying partial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 : 1237-1245.

Anderson J.P.E., 1981. Methods to evaluate pesticide damage to the biomass of the soil microflora. *Soil Biol. Biochem.*, 13 : 149-153.

Anderson J.P.E., Domsch K.H., 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10 : 215-221.

Anderson T.H., Domsch K.H., 1985. Maintenance carbon requirements of actively-metabolizing microbial populations under in situ conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 17 : 197-203.

Anderson T.H., Domsch K.H., 1986. Carbon link between microbial biomass and soil organic matter. In *Perspectives in Microbial Ecology. Proceedings of the 4th International Symposium on Microbial Ecology*, pp. 467-475. Ljubljana, Yougoslavia.

Anderson T.H., Domsch K.H., 1989. Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. *Soil Biol. Biochem.*, 21 : 471-479.

Anderson T.H., Domsch K.H., 1990. Application of eco-physiological quotients ($q\text{CO}_2$ and $q\text{D}$) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biol. Biochem.*, 22 : 251-255.

Anderson T.H., Domsch K.H., 1993. The metabolic quotient for CO_2 ($q\text{CO}_2$) as a specific parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, 25 : 393-395.

Anderson T.H., Gray T.R.G., 1990. Soil microbial carbon uptake characteristics in relation to soil management. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 74 : 11-20.

Atlas R.M., 1984a. Diversity of Microbial Communities. *Adv. Microb. Ecol.*, 7 : 1-47.

Atlas R.M., 1984b. Use of microbial diversity measurements to assess environmental stress. In : *Current Perspectives in Microbial Ecology* (M.J. King et C.A. Reddy, Eds), pp. 540-545. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Atlas R.M., A. Horowitz, M. Krichevsky, .K. Bej, 1991. Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microb. Ecol.*, 22 : 249-256.

Avaniss-Aghajani E., Jones K., Chapman D., Brunk C., 1994. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *BioTechniques*, 7 : 144-149.

Azam F., Hodson R.E., 1981. Multiphasic kinetics For D-glucose uptake by assemblages of natural marine bacteria. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 6 : 213-222.

Bääth E., 1990. Thymidine incorporation into soil bacteria. *Soil Biol. Biochem* 22 : 803-810.

Bääth E., 1992a. Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after mhomogenization-centrifugation. *Soil Biol. Biochem.*, 24 : 1167-1172.

Bääth E., 1992b. Thymidine incorporation into macromolecules of bacteria extracted from soil by homogenisation-centrifugation. *Soil Biol. Biochem.*, 24 : 1157-1165.

Bääth E., 1994. Thymidine and Leucine incorporation in soil bacteria with different cell size. *Microb. Ecol.*, 27 : 267-278.

Bardgett R. D., Saggar S., 1994. Effects of heavy metal contamination on the short-term decomposition of labelled [^{14}C] Glucose in a pasture soil. *Soil Biol. Biochem.*, 26 : 727-733.

Barkay T., Tripp S.C., Olson B.H., 1985. Effect of metal-rich sewage sludge application on the bacterial communities of grasslands. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 : 333-337.

Beck T., 1984. Methods and application of soil microbiological analysis at the Landensanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (LBB) in Munich for the determination of some aspects of soil fertility. In : 5th Symp. on Soil Biology, Bucharest, Romania, pp. 13-20. Romanian Soc. of Soil Sci., Bucharest.

Becker R.A., Chambers J.M., Wilks A.R., 1988. *The New S Language : A programming environment for data analysis and graphics.* Wadsworth et Brooks/Cole Advanced Books and Software Pacific Grove, California.

Bell G.R., 1957. Some morphological and biochemical characteristics of a soil bacterium which decomposes 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Can. J. Microbiol.*, 3 : 821-840.

Benlloch S., Rodriguez-Valera F., Martinez-Murcia A.J., 1995. Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 18 : 267-280.

Beveridge T.J., Koval S.F., 1981. Binding of metals to cell envelopes of E.coli K-12. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 : 325-335.

Bianchi M.A. G., Bianchi A.J.M., 1982. Statistical sampling of bacterial strains and its use in bacterial diversity measurement. *Microb. Ecol.*, 8 : 61-69.

Biederbeck V.O., Campbell C.A., Smith A.E., 1987. Effects of long-term 2,4-D field applications on soil biochemical processes. *J. Environ. Qual.*, 16 : 257-262.

Bochner B.R., 1978. Device composition and method for identifying microorganisms. United States Patent n°4 : 129-483.

Boivin-Jahns V., Bianchi A., Ruimy R., Garcin J., Daumas S., Christen R., 1995. Comparison of phenotypical and molecular methods for the identification of bacterial strains isolated from a deep subsurface environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 : 3400-3406.

Bossio D.A., Scow K.M., 1995. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 : 4043-4050.

Bradley R.L., Fyles J.W., 1995. A kinetic parameter describing soil available carbon and its relationship to rate increase in C mineralization. *Soil Biol. Biochem.*, 27 : 167-172.

Bremer E., Van Kessel C., 1990. Extractability of microbial ^{14}C and ^{15}N following addition of variable rates of labelled glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to soil. *Soil Biol. Biochem.*, 22 : 703-713.

Brittain A.M., Karl D.M., 1990. Catabolism of tritiated thymidine by aquatic microbial communities and incorporation of tritium into RNA and protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 : 1245-1254.

Brock T.D., 1967. Bacterial growth rate in the sea : direct analysis by thymidine autoradiography. *Science, N.Y.*, 155 : 81-83.

Brookes P.C., McGrath S.P., 1984. Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. *J. Soil Sci.*, 35 : 341-346.

Brookes P.C., Heijnen E., McGrath S.P., Vance E.D., 1986a. Soil microbial biomass estimates in soils contaminated with metals. *Soil Biol. Biochem.*, 18 : 383-388.

Brookes P.C., McGrath S.P., Heijnen C., 1986b. Metal residues in soils previously treated with sewage-sludge and their effects on growth and nitrogen fixation by blue-green algae. *Soil Biol. Biochem.*, 18 : 345-353.

Carnahan A.M., Joseph S.W., Janda J.M., 1989. Species identification of *Aeromonas* strains based on carbonyl substrate oxidation profiles. *J. clin. Microbiol.*, 27 : 2128-2129.

Cartieaux F., 1995. Isolement et étude de la diversité des populations microbiennes dégradant le 2,4-D par l'amplification enzymatique in vitro de leur ADN. Diplôme de Maîtrise en Sciences et Techniques, Université Claude Bernard de Lyon.

Chander K., Brookes P.C., 1993. Residual effects of zinc, copper and nickel in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam. *Soil Biol. Biochem.*, 25 : 1231-1239.

Chaussod R., Nicolardot B., 1982. Mesure de la biomasse microbienne dans les sols cultivés. I.-Approche cinétique et estimation simplifiée du carbone facilement minéralisable. *Revue d'Ecologie et de Biologie des Sols*, 19 : 501-512.

Chaussod R., Nicolardot B., Soulas G., Joannes H., 1986. Mesure de la biomasse microbienne dans les sols cultivés. II.-Cinétiques de minéralisation de matière organique microbienne marquée au carbone 14. *Revue d'Ecologie et de Biologie des Sols*, 23 : 183-196.

Christensen H., Funck-Jensen D., 1989. Growth rate of rhizosphere bacteria measured directly by the tritiated thymidine incorporation technique. *Soil Biol. Biochem.*, 21 : 113-117.

Cooper S.L., Wingfield G.I., Lawley R., Greaves M.P., 1978. Miniaturized methods for testing the toxicity of pesticides to microorganisms. *Weed Res.*, 18 : 105-107.

Cserhati T., Illes Z., Nemes-Kosa S., 1992. Effect of benzonitrile ester herbicides on the growth of some soil bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 72 : 523-528.

Daugherty D.D. et Karel S., 1994. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Pseudomonas cepacia* DBO1 (pRO101) in a dual-substrate chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 : 3261-3267.

De Bruijn F.J., 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 2180-2187.

Dick R.P., 1992. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In *Defining soil quality for a sustainable environment*, (Doran J.M., Coleman D.C., Bezdicekand D.F., Stewart B.A., Eds.), pp. 149-157. Soil Science Society of Agronomy, Madison, USA.

Ditzelmuller G., Loidl M., Streichsbier F., 1989. Isolation and characterization of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31 : 93-96.

Dobbins D.C., Pfaender F.R., 1988. Methodology for assessing respiration and cellular incorporation of radiolabelled substrates by soil microbial communities. *Microb. Ecol.*, 15 : 257-273.

Domsch K.H., G. Jagnow, T.H. Anderson, 1983. An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. *Residue Rev.*, 85 : 65-105.

Duah-Yentumi S., Johnson D. B., 1986. Changes in soil microflora in response to repeated applications of some pesticides. *Soil Biol. Biochem.*, 18 : 629-635.

Edwards C.A., 1989. Impact of herbicides on soil Ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 8 : 221-248.

Ellis R.J., Thompson I.P., Bailey M.J., 1995. Metabolic profiling as a means of characterizing plant-associated microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 16 : 9-18.

Ferroni G.D., Leduc L.G., Choquet C.G., 1983. Preliminary studies on the use of heterotrophic activity method to evaluate acid-stress effects in aquatic environments. *Soil Biol. Biochem.*, 17 : 1379-1384.

Ferroni G.D., Leduc L.G., Winterhalder E.K., 1985. The measurement of mineralization activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 17 : 727-728.

Fisher S.G., Lerman L.S., 1983. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gel: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 1579-1583.

Fliessbach A., Martens R., Reber H.H., 1994. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.*, 26 : 1201-1205.

Fournier J.C., 1980. Enumeration of the soil microorganisms able to degrade 2,4-D by metabolism or co-metabolism. *Chemosphere*, 9 : 169-174.

Fournier J.C., 1989. Aspects du comportement de la microflore dégradant les produits phytosanitaires dans le sol. Thèse de Doctorat es Sciences Naturelles, Université de Perpignan, France.

Fournier J.C., Codaccioni P., Soulas G., 1981. Soil adaptation to 2,4-D degradation in relation to the application rates and the metabolic behavior of the degrading microflora. *Chemosphere*, 10 : 977-984.

Fournier J.C., Froncek B., Gamouh A., Collu T., 1992. Comparison of three methods to test the side-effects of pesticides on soil microbial biomass. In : *Proceedings of the International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology*; (Anderson J. P. E., Arnold D. J., Lewis F., Torstensson L. Eds.), pp. 18-23. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

Frostegård A., Tunlid A., Bååth E., 1992. Changes in soil phospholipid fatty acid patterns due to different environmental disturbance. In : *Proceedings of the International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology* (Anderson J. P. E., Arnold D. J., Lewis F., Torstensson L. Eds.), pp. 24-29. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

Führ A., Kubiak R., 1995a. Darstellung der Mikrobiellen im Boden mit Hilfe der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) von 16S rDNA PCR-Produkten. *Mitteilungen der Dt. Bodenkdl. Gesellschaft*, 75, 83-86.

Führ A., Kubiak R., 1995b. Direkte Populationanalyse natürlicher bakterieller Populationen im Boden mit Hilfe molekularbiologischer Techniken. Mitteilungen der Dt. Bodenkdl. Gesellschaft, 76, 601-604.

Fulthorpe R.R., Rhodes A.N., Tiedje J.M., Pristine soils mineralize 3-chlorobenzoate and 2,4-dichlorophenoxyacetate via different microbial populations, 1996. Appl. Environ. Microbiol., 62 : 1159-1166.

Fulthorpe R.; McGowan C., Maltseva O.V., Holben W.E., Tiedje J.M., 1995. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria contain mosaics of catabolic genes. Appl. Environ. Microbiol., 61 : 3274-3281.

Garland J.L., 1996a. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. Soil Biol. Biochem., 28 : 213-221.

Garland J.L., 1996b. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. Soil Biol. Biochem., 28 : 223-230.

Garland J.L., Mills A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. Appl. Environ. Microbiol., 57 : 2351-2359.

Giovannoni S.J., Britschgi T.B., Moyer C.L. et Field K.G., 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. Nature (London), 345 : 60-63.

Greaves M.P., 1982. Effect of pesticides on soil microorganisms. In : Experimental Microbial Ecology (Burns R. G. and Slater J. H. Eds.), pp. 613-630. Blackwell Scientific publications.

Greaves M.P., Davies H. A., Marsh J.A. P., Wingfield G.I., 1976. Herbicides and Soil Microorganisms. C.R.C. Crit. Rev. Microbiol., 5 : 1-38.

Greaves M.P., Malkomes H.P., 1980. Effects on Soil Microflora. In : Interactions between Herbicides and the Soil (R. J. Hance Ed.), pp. 223-253. Academic Press London.

Greer L.E., Robinson J.A., Shelton D.R., 1992. Kinetic comparison of seven strains of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 58 : 1027-1030.

Greer W.C., Hawari J, Samson R., 1990. Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. Arch. Microbiol., 154 : 317-322.

Grossbard E., 1976. Effects on the soil microflora. In Herbicides : Physiology, Biochemistry, Ecology (L. J. Audus Ed.), pp. 99-147. Academic Press London.

Haack S. K., Garchow H., Klug M.J., Forney L. J., 1995. Analysis of factors affecting the accuracy, reproductibility and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 : 1458-1468.

Haack S.K., Garchow H., Odelson D.A., Forney L.J., Klug M.J., 1994. Accuracy, reproductivity, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 : 2483-2493.

Hadrys H., Balick M., Schierwater B., 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.*, 1 : 55-63.

Harden T. Joergensen R.G., Meyer B., Wolters V., 1993. Soil biomass estimated by fumigation-extraction and substrate-induced respiration in two pesticide-treated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 25 : 679-683.

Hart M.R., Brookes P.C., 1996. Effects of two regosterol-inhibiting fungicides on soil regosterol and microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 28 : 885-892.

Hicks R.J., Stotzky G., Van Voris P., 1990. Review and Evaluation of the effects of Xenobiotic Chemicals on Microorganisms in Soil. *Adv. Appl. Microbiol.*, 35 : 195-253.

Hirsch P.R., Jones M.J., McGrath S.P., Giller K.E., 1993. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii populations. *Soil Biol. Biochem.*, 25 : 1485-1490.

Holben W.E., Harris D., 1995. DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. *Mol. Ecol.*, 4, 627-631.

Hoyle D, Beveridge T.J., 1983. Binding of metallic ions to the outer membrane of E.coli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 : 749-752.

Jaunet T., Laguerre G., Lemanceau P., Frutos R., Notteghem J.L., 1995. Diversity of *Pseudomonas fuscovaginae* and other Fluorescent Pseudomonads isolated from diseased rice. *Phytopathology*, 85 : 1534-1541.

Jenkinson D.S., 1966. Studies on the decomposition of plant material in soil. II. Partial sterilization of soil and the soil biomass. *J. Soil Sci.*, 17 : 280-302.

Jenkinson D.S., Powlson D.S., 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 8 : 209-213.

Jensen H.L., Lautrup-Larsen G., 1967. Microorganisms that decompose nitro-aromatic compounds, with special reference to dinitro-ortho-cresol. *Acta Agricultura Scandinavia*, 17 : 115-126.

Joergensen R.G., Schmaedeke F., Windhorst K., Meyer B., 1995. Biomass and activity of microorganisms in a fuel oil contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.*, 27 : 1137-1143.

Johnsen K., Andersen S., Jacobsen C.S., 1996. Phenotypic and genotypic characterization of Phenanthrene-degrading fluorescent *Pseudomonas* biovars. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 : 3818-3825.

Jones S.E., Jones A. Ll., Johnson D.B., 1992. Effects of differential pesticide inputs on the size and composition of soil microbial biomass : results from the Boxworth and SCARAB projects. In *Proceedings of The International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology*, pp. 30-36, Sigtuna, Sweden.

Jones S.E., Johnson D.B., 1996. The effects of the insecticide dimethoate on soil bacteria in field and laboratory systems. In : 2nd International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology, Pesticides, soil microbiology and soil quality, pp. 24-25, Dijon, France.

Ka J.O., Holben W.E., Tiedje J.M., 1994. Genetic and phenotypic diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading bacteria isolated from 2,4-D-treated field soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 : 1106-1115.

Klingler J.M., Stowe R.P., Obenhuber D.C., Groves T.O., Mishra S.K., Pierson D.L., 1992. Evaluation of the biolog automated microbial identification system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 2089-2092.

Korner J., Laczko E., 1992. A new method for assessing soil microorganism diversity and evidence of vitamin deficiency in low diversity communities. *Biol. Fertil. Soils*, 13 : 58-60.

Laguerre G., Allard M.R., Revoy F., Amarger N., 1994a. Rapid identification of Rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 : 56-63.

Laguerre G., Rigottier-Gois L., Lemanceau P., 1994b. *Fluorescent Pseudomonas* species categorized by using polymerase chain reaction (PCR)/restriction fragment analysis of 16S rDNA. *Mol. Ecol.*, 3 : 479-487.

Lane D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In : *Nucleic Acid Technics in bacterial Systematics* (Stackebrandt E. et Goodfellow M., Wiley J.et sons, Eds.), Chichester G.B.

Lelliott R.A., Billing E., Hayward A.C., 1966. A determinative scheme for fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. *J. Appl. Bacteriol.*, 29 : 470-489.

Lemanceau P., Corborand T., Gardan L., Latour X., Laguerre G., Boeufgras J et Alabouvette C., 1995. Effect of two plant species, flax (*Linum usitissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 : 1004-1012.

Li W.K.W., 1983. Consideration of errors in estimating kinetic parameters based on Michaelis-Menten formalism in microbial ecology. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 26 : 55-76.

Lindgaard-Joergensen P., Riemann B., 1989. ^3H -thymidine incorporation preliminary investigations of a method to forecast the toxicity of chemicals in biodegradability tests. *Chemosphere*, 19 : 1447-1455.

Lobaugh S., Farrow F., Feng X., Ogram A., 1994. The effects of triclopyr on 2,4-D mineralization in two soils. *J. Environ. Sci. Health*, B29 (3) : 59-471.

Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., De Bruijn F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 : 2286-2295.

MacDonald R.M., 1986. Sampling soil microfloras : dispersion of soil by ion exchange and extraction of specific microorganisms from suspension by elutriation. *Soil Biol. Biochem.*, 18 : 399-406.

Malkomes H.-P., 1986. Einfluss der Glucosemenge auf die reaktion der kurzzeit-atmung im boden gegenüber pflanzenschutzmitteln, dargestellt am beispiel eines herbizids. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*. 38 : 113-120.

Malkomes H.-P., 1987. Respiration and dehydrogenase as side-effects indicators. In : *Pesticides Effects on Soil Microflora* (Somerville L., Greaves M. P., Eds.), pp. 81-96. Taylor and Francis.

Malkomes H.P., Wölher B., 1983. Testing and evaluating some methods to investigate side effects of environmental chemicals on soil microorganisms. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 7 : 284-294.

Manifi M., Kneifel W., 1990. Rapid methods for differentiating Gram-positive from Gram-negative aerobic and facultative anaerobic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 69 : 822-827.

Mårtensson A.M., 1992a. Assessing anthropogenic impact on nitrogen-fixing legumes. In : *Proc. Int. Symp. Environ. Aspects Pesticides Microbiology* (J.P. Anderson, Ed.), pp. 121-126.

Mårtensson A.M., 1992b. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biol. Biochem.*, 24 : 435-445.

Martinez-Murcia A.J., Acinas S.G., Rodriguez-Valera F., 1995. Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17 : 247-256.

Matheson V.G., 1994. Genetic diversity of soil bacterial populations capable of degrading 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Ph.D. thesis. West Virginia University, Morgantown.

Mauchline W.S., Keevil C.W., 1991. Development of the BIOLOG substrate utilization system for identification of *Legionella* spp.. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 : 3345-3349.

Meyer J.M., Abdallah M.A., 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physico-chemical properties. J. Gen. Microbiol., 107 : 319-328.

Miller J.M., Rhoden D.L., 1991. Preliminary evaluation of Biolog, a carbone source utilization method for bacterial identification. J. clinical Microbiol., 29 : 1143-1147.

Mills A.L., Wassel R. A., 1980. Aspects of diversity measurement for microbial communities. Appl. Environ. Microbiol., 40, 578-586.

Moorman T.B., 1986. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. Weed Sci., 34 : 628-633.

Moorman T.B., 1989. A review of pesticide effects on microorganisms and microbial processes related to soil fertility. J. Prod. Agric., 2 : 14-23.

Moyer C.L., Dobbs F.C., Karl D.M., 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. Appl. Environ. Microbiol., 60 : 871-879.

Moyer C. L., Tiedje J.M., Dobbs F.C., Karl D.M., 1996. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes : efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. Appl. Environ. Microbiol., 62 : 2501-2507.

Muyzer G., Waal E.C., Uitterlinden A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol., 59, 695-700.

Myers R.M., Maniatis T., Lerman L.S., 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. Methods Enzymol., 155 : 501-527.

Nannipieri P., Muccini L., Ciardi C., 1983. Microbial biomass and enzyme activities: Production and persistence. Soil Biol. Biochem., 15 : 679-685.

Navarro E., Simonet P., Normand P., Bardin R., 1992. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. Arch. Microbiol., 157 : 107-115.

Nehez M., Paldy A., Selyes A., 1977. Some data on the decomposition of dinitro-*o*-cresol by microorganisms. Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 12 : 73-79.

Nicolardot B., Chaussod R., Catroux G., 1984. Décomposition de corps microbiens dans des sols fumigés au chloroforme : effet du type de sol et de micro-organismes. Soil Biol. Biochem., 16 : 453-458.

Palleroni N.J., 1984. Gram-negative aerobic rods and cocci : family I Pseudomonadaceae. In : Bergey's manual of bacteriology (Krieg, Holt, William and Wilkings, Eds.), pp.141-148.

Panikov N.S., Blagodatsky S.A., Blagodatskaya J.V., Glagolev M.V., 1992. Determination of microbial mineralization activity by modified Wright and Hobbie method. Biol. Fert. Soils, 14 : 280-287.

Parsons T.R., Strickland J.D.H., 1962. On the production of particulate organic carbon by heterotrophic processes in sea water. Deep-Sea Research, 8 : 211-222.

Pemberton J.M., Corney B., Don R.H., 1979. Evolution and spread of pesticide degrading ability among soil microorganisms. In : Plasmids of medical, environmental and commercial importance (Timmis K.N., Puhler A., Eds.), pp. 287-299. Biomedical Press, Elsevier/North Holland, Amsterdam.

Pennanen T., Frostegård A., Fritze H., Bääth E., 1996. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. Appl. Environ. Microbiol., 62 : 420-428.

Perucci P., 1992. Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. Biol. Fert. Soils, 14 : 54-60.

Pielou E.C., 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. J. Theoret. Biol., 13 : 131-144.

Pirt S.J., 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell, Oxford.

Pollard P. C., Moriarty D. J. W., 1984. Validity of the tritiated thymidine method for estimating bacterial growth rates : measurement of isotope dilution during DNA synthesis. Appl. Environ. Microbiol., 48 : 1076-1083.

Ponsonnet C., Nesme X., 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. Arch. Microbiol., 161 : 300-309.

Ramsay A.j., 1984. Extraction of bacteria from soil : efficiency of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography. Soil Biol. Biochem., 16 : 475-481.

Reber H.H., 1992. Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. Biol. Fert. Soils, 13 : 1-186.

Reysenbach A.L., Giver L.J., Wickham G.S., Pace N.R., 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol., 58 : 3417-3418.

Riemann B., Lindgaard-Jorgensen P., 1990. Effects of toxic substances on natural bacterial assemblages determined by means of [³H] Thymidine incorporation. Appl. Environ. Microbiol., 56 : 75-80.

Ritz K., Griffiths B., 1994. Potential application of community hybridization technique for assessing changes in the population structure of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, 26 : 963-971.

Rochelle P.A., Cragg B.A., Fry J.C., Parkes R.J., 1994. Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis; *FEMS Microbiol. Ecol.*, 15 : 215-226.

Rouard N., Dictor M.C., Chaussod R., Soulas G., 1996. Side-effects of herbicides on the size and activity of the soil microflora: DNOC as a test case. *European Journal of Soil Science*, 47 : 000-000.

Sandmann E.R.I.C., Loos M.A., 1987. Aromatic metabolism by a 2,4-D degrading *Arthrobacter* sp.. *Can. J. Microbiol.*, 34 : 125-130.

Schmidt T. M., Delong E. F., Pace N. R., 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. bacteriol.*, 173 : 4371-4378.

Schuster E., Schröder D., 1990. Side-effects of sequentially and simultaneously applied pesticides on non-target soil microorganisms : laboratory experiments. *Soil Biol. Biochem.*, 22 : 375-383.

Shannon C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *Bell. Syst. Technol. J.*, 27 : 379-423.

Shannon C.E., Weaver W., 1949. The mathematical theory of communities. University of Illinois Press, Urbana.

Silva M. C., Batt C.A., 1995. Effect of cellular physiology on PCR amplification efficiency. *Mol. Ecol.*, 4 : 11-16.

Sneath P.H.A., Sokal R.R., 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification (Freeman W.H. and Co.,Eds.). San Francisco, CA. USA.

Soulas G., 1993. Evidence for the existence of different physiological groups in the microbial community responsible for 2,4-D mineralization. *Soil Biol. Biochem.*, 25 : 443-449.

Soulas G., Chaussod R., Verguet A., 1984. Chloroform fumigation technique as a means of determining the size of specialized soil microbial populations. *Soil Biol. Biochem.*, 16 (5) : 497-501.

Soulas G., Fournier J.C., 1981. Soil aggregate as a natural sampling unit for studying behaviour of microorganisms in the soil: application to pesticide degrading microorganisms. *Chemosphere*, 10 : 431-440.

Soulas G., Fournier J.C., 1987. Radiorespirometric measurements of microbial responses. In : *Pesticide Effects on Soil Microflora* (Somerville L., Greaves M.P., Eds.), pp. 171-182. Taylor and Francis.

Soulas G., Lagacherie B., 1990. Modelling of microbial processes that govern degradation of organic substrates in soil, with special reference to pesticides. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 329 : 369-373.

Sparling G.P., Feltham C.W., Reynolds J., West A.W., Singleton P., 1990. Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content and a reassessment of the K_{ec} -factor. *Soil Biol. Biochem.*, 22 : 301-307.

Sparling G.P., West A.W., 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial C: calibration in situ using microbial respiration and ^{14}C labelled cells. *Soil Biol. Biochem* 20 : 337-343.

Stackebrandt E., Liesack W., Goebel B.M., 1993. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *Genetic diversity of a natural microbial community*, 7 : 232-236.

Stanier R.Y., Palleroni N.J., Doudoroff M., 1966. The aerobic *Pseudomonads*, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43 : 159-271.

Stenson T.I., Walker N., 1956. Observations on the bacterial oxidation of chlorophenoxyacetic acids. *Plant Soil*, 8 : 17-32.

Stefanic F., Eliade G., Chirnoageanu I., 1984. Researches concerning a biological index of soil fertility. In : 5th Symp. on Soil Biology, pp. 35-45, Romanian National Soc. of Soil Sci., Bucharest.

Swofford D.L., 1993. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3-1.1. Illinois Natural History Survey, Champaign.

Tabor H., Tabor C.W., Hafner E. W., 1976. Convenient method for detecting $^{14}\text{CO}_2$ in multiple samples : application to rapid screening for mutants. *J. bacteriol.*, 128 : 485-486.

Tate K.R., Ross D.J., Feltham C.W., 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial C: effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biol. Biochem.*, 20 : 329-335.

Teintze M., Hossain M.B., Barnes C.L., Leong J., Van Der Helm D., 1981. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochem.*, 20 : 6446-6457.

Thomas D.R., Richardson J. A., Dicker R.J., 1974. The incorporation of tritiated thymidine into DNA as a measure of the activity of soil micro-organisms. *Soil Biol. Biochem.*, 6 : 293-296.

Torsvik V., Salte K, Sorheim R., Goksoyr J., 1990a. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 : 776-781.

Torsvik V., Goksoyr J., Daae F.L., 1990b. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 : 782-787.

Torsvik V., Goksoyr J., Daae F.L., Sorheim R., Michalsen J., Salte K., 1994. Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities. In : *Beyond the Biomass*, (Ritz K., Dighton J., Giller K.E., Eds.), pp. 39-49. British Society of Soil Science (BSSS), a Wiley-Sayce publication.

Tunlid A., White D., 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. In : *Soil Biochemistry* (Stotzky G. and Bollag J. M., Eds.), pp. 229-262, vol. 7. Marcel Dekker, N. Y..

Vallaëys T., 1992. Isolement d'une communauté microbienne dégradant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique à partir d'un sol de Dijon. Caractérisations cinétique et génétique des souches impliquées. Thèse de doctorat, Université des Sciences et techniques de Lille Flandres-Artois, UFR Biologie.

Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 19 : 703-707.

Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 19 : 6823-6831.

Vonk J.W., 1991. Testing of pesticides for side-effects on nitrogen conversions in soil. *Toxicol. Environ. Chem.*, 30 : 241-248.

Voroney R.P., Paul E.A., 1984. Determination of the K_C and K_N in situ for the calibration of the fumigation-incubation method. *Soil Biol. Biochem.* 16 : 9-14.

Wagner G.H., 1975. Microbial growth and carbon turnover. In : *Soil Biochemistry* (Paul E.A., McLaren A.D., Eds.), pp. 269-305, vol. 3. Marcel Dekker, N.Y.

Wainwright M., 1978. A review of the effects of pesticides on microbial activity in soils. *J. Soil Sci.*, 29 : 287-298.

Walker R.L., Newman A.S., 1956. Microbial decomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Appl. Microbiol.*, 4 : 201-206.

Wardle D.A., Ghani A., 1995. A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biol. Biochem.*, 27 : 1601-1610.

Wardle D.A., Parkinson D., 1990. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant and Soil*, 122 : 21-28.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173 : 697-703.

Weller R., Ward D.M., 1989. Selective recovery of 16S rRNA sequences from natural microbial communities in the form of cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 : 1818-1822.

Winding A., 1994. Fingerprinting bacterial soil communities using biolog microtitre plates. In : *Beyond the Biomass* (Ritz K., Dighton J., Giller K.E., Eds.), pp. 85-94. BSSS, a Wiley-Sayce publication.

Wright R.T., Hobbie J.E., 1965. The uptake of organic solutes in lake water. *Limnology and Oceanography*, 10 : 22-28.

Wright R.T., Hobbie J.E., 1966. Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ecology*, 47 : 447-464.

Wünsche L., Babel W., 1996. The suitability of the Biolog automated microbial identification system for assessing the taxonomical composition of terrestrial bacterial communities. *Microbiol. Res.*, 151 : 133-143.

Wünsche L., Brüggeman L., Babel W., 1995. Determination of substrate utilization pattern of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17 : 295-306.

Xueqing Xia, Bollinger J., Ogram A., 1995. Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Mol. Ecol.*, 4 : 17-28.

Zak J.C., Willig M.R., Moorhead D.R., Wildman H.G., 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.*, 26 : 1101-1108.

Zelles L., Bai Q.Y., Ma R.X., Rackwitz R., Winter K., Beese F., 1994. Microbial biomass, metabolic activity and nutritional status determined from fatty acid patterns and poly-hydroxybutyrate in agriculturally-managed soils. *Soil Biol. Biochem.*, 26 : 439-446.

Zelles L., Scheunert I., Korte F., 1985. Side effects of some pesticides on non-target soil microorganisms. *J. Environ. Sci. Health*, 20 : 457-488.

Zelles L., Scheunert I., Korte F., 1986. Comparison of methods to test chemicals for side effects on soil microorganisms. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 12 : 53-69.

Zelles L., Bai Q.Y., Ma R.X., Rackwitz R., Winter K., Beese F., 1994. Microbial biomass, metabolic activity and nutritional status determined from fatty acid patterns and poly-hydroxybutyrate in agriculturally-managed soils. *Soil Biol. Biochem.*, 26 : 439-446.

Zelles L., Scheunert I., Korte F., 1985. Side effects of some pesticides on non-target soil microorganisms. *J. Environ. Sci. Health*, 20 : 457-488.

Zelles L., Scheunert I., Korte F., 1986. Comparison of methods to test chemicals for side effects on soil microorganisms. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 12 : 53-69.

ANNEXES

ANNEXE I

CARACTERISTIQUES DES SOLS

A. Sol du site expérimental de l'abbaye de Cîteaux (Côte d'Or)

Il s'agit d'un sol limono-argileux prélevé dans l'horizon de surface (0-20 cm).

I. Granulométrie (sans décalcification, 5 fractions)

Argile	=	210	g kg ⁻¹
Limon fin	=	283	g kg ⁻¹
Limon grossier	=	284	g kg ⁻¹
Sable fin	=	139	g kg ⁻¹
Sable grossier	=	84	g kg ⁻¹

II. Humidité

Humidité équivalente à 1000 g	=	19,8 g / 100 g
-------------------------------	---	----------------

III. Carbone organique

Carbone organique (méthode Anne)	=	7,60 g kg ⁻¹
Matières organiques	=	13,10 g kg ⁻¹

IV. Azote organique total

Azote Kjeldahl	=	0,82 g kg ⁻¹
----------------	---	-------------------------

V. Rapport du carbone organique et de l'azote Kjeldahl

C organique (Anne)/Azote Kjeldahl	=	9,27
-----------------------------------	---	------

VI. Acidité de l'eau

pH	=	7,70
----	---	------

VII. Teneur en calcaire total

CaCO ₃ total	=	13 g kg ⁻¹
-------------------------	---	-----------------------

VIII. Capacité d'échange cationique

C.E. cationique (méthode Metson)	=	9,6 M.Eq. %
----------------------------------	---	-------------

B. Sol d'un champ d'essai de l'INRA de Dijon (Côte d'Or)

Il s'agit d'un sol limono-argileux prélevé dans l'horizon de surface (0-20 cm) qui n'a jamais été traité au 2,4-D.

I. Granulométrie (sans décalcification, 5 fractions)

Argile	=	334	g kg^{-1}
Limon fin	=	322	g kg^{-1}
Limon grossier	=	219	g kg^{-1}
Sable fin	=	101	g kg^{-1}
Sable grossier	=	24	g kg^{-1}

II. Humidité

Humidité équivalente à 1000 g	=	24,6 g / 100 g
-------------------------------	---	----------------

III. Carbone organique

Carbone organique (méthode Anne)	=	12	g kg^{-1}
Matières organiques	=	20,6	g kg^{-1}

IV. Azote organique total

Azote Kjeldahl	=	1,40	g kg^{-1}
----------------	---	------	--------------------

V. Rapport du carbone organique et de l'azote Kjeldahl

C organique (Anne)/Azote Kjeldahl	=	8,57
-----------------------------------	---	------

VI. Acidité de l'eau

pH	=	7,3
----	---	-----

VII. Teneur en calcaire total

CaCO_3 total	=	10 à 30	g kg^{-1}
-----------------------	---	---------	--------------------

VIII. Capacité d'échange cationique

C.E. cationique (méthode Metson)	=	20,1	M. Eq. %
----------------------------------	---	------	----------

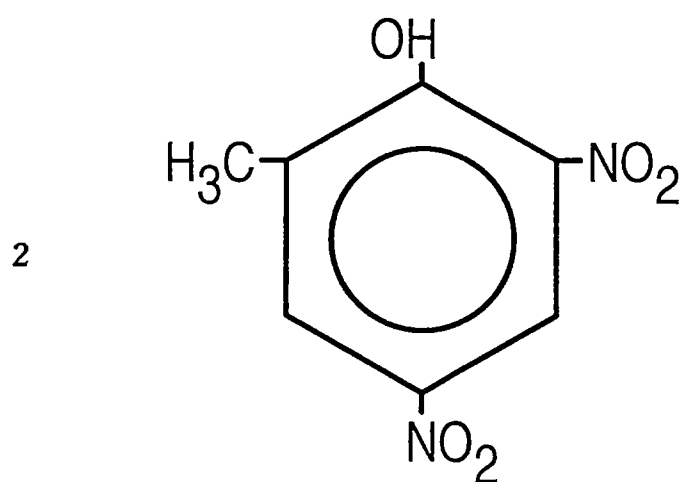
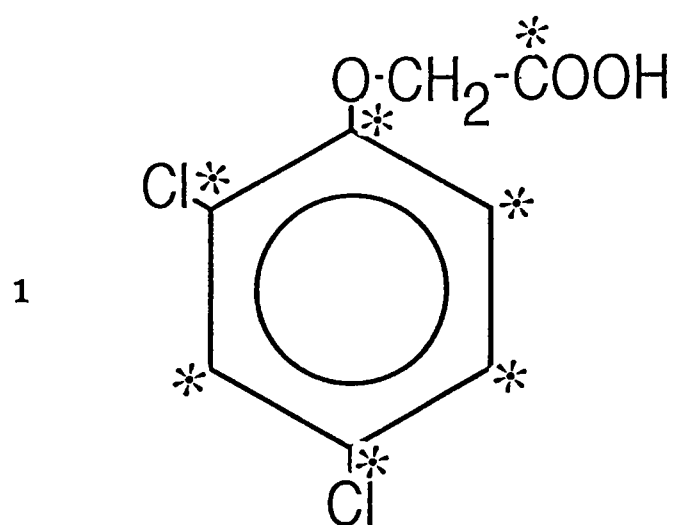


Figure II-1 : Structure chimique de la molécule de 2,4-D (1) et de DNOC (2).

* = position du marquage au ^{14}C .

ANNEXE II a

LES PRODUITS PHYTOSANITAIRES

A. Les produits froids

I. le 2,4-D ou acide dichloro-2,4 phénoxyacétique

Cet herbicide est une hormone de synthèse (analogue structural de l'acide β -indolacétique connu sous le nom d'auxine, hormone de croissance végétale). Il est utilisé pour lutter contre les dicotylédones, mauvaises herbes des graminées.

- Origine : Fluka (France)
- Poids moléculaire : $221,04 \text{ g mole}^{-1}$
- Solubilité : 620 mg l^{-1} dans l'eau à 20°C et à $\text{pH} = 7$
- Pureté chimique : 95 %
- Dose agronomique : $1 \text{ à } 5 \text{ kg ha}^{-1}$
- Absorbance dans le domaine de l'ultra-violet avec un maximum à 283 nm.

II Le DNOC ou 2-méthyl-4,6-dinitrophénol ou 4,6-dinitro-o-crésol

Cet herbicide appartient à la famille des herbicides phénoliques ou colorants nitrés. Ils agissent en tant qu'agents découplants au niveau des phosphorylations oxydatives.

- Origine : Chem Service (France)
- Poids moléculaire : $198,13 \text{ g mole}^{-1}$
- Solubilité : 130 mg l^{-1} dans l'eau à 15°C et à $\text{pH} = 7$
- Pureté chimique : 99 %
- Dose agronomique : $2 \text{ à } 5 \text{ kg ha}^{-1}$

B Les produits radioactifs

I Le 2,4-D [$1\text{-}^{14}\text{C}$]

Cette molécule, marquée sur le carbone du groupement carboxyle de la chaîne latérale, est en solution dans du benzène.

- Origine : Sigma (France)
- Activité spécifique : $13,9 \text{ mCi mmole}^{-1}$ ou $514,3 \text{ MBq mmole}^{-1}$
- Concentration : $0,05 \text{ mCi ml}^{-1}$ ou $1,85 \text{ MBq ml}^{-1}$
- Pureté radiochimique : 98 %

II Le 2,4-D [Cycle U- ^{14}C]

Cette molécule, marquée uniformément sur les atomes de carbone du cycle aromatique est mise en solution dans de l'éthanol.

-Origine	:	Isotopchim (France)
-Activité spécifique	:	10 mCi mmole ⁻¹ ou 370 MBq mmole ⁻¹
-Concentration	:	0,1 mCi ml ⁻¹ ou 3,7 MBq ml ⁻¹
-Pureté radiochimique	:	99%

ANNEXE II b

AUTRES PRODUITS

A. Hydroxyde de baryum

-Origine	:	Prolabo (France)
-Formule	:	$\text{Ba(OH)}_2, 8\text{H}_2\text{O}$
-Poids moléculaire	:	$315,48 \text{ g mol}^{-1}$
-Solubilité	:	56 g l^{-1} dans l'eau à 15°C
-Densité	:	2,18 à 16°C

Cette solution est préparée à une concentration supérieure à sa solubilité dans l'eau, de façon à obtenir une solution saturée.

B. Hydroxygénocarbonate de sodium radioactif

-Origine	:	ICN Biomedicals (Californie)
-Formule	:	$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$
-Activité spécifique :		$10 \text{ mCi mmole}^{-1}$ ou $370 \text{ MBq mmole}^{-1}$
-Concentration	:	$0,123 \text{ mCi mg}^{-1}$ ou $4,55 \text{ MBq mg}^{-1}$

ANNEXE III

LES MILIEUX DE CULTURES

A. Solutions de base

I. Tampon phosphate (Grelet, 1951)

1. Solution A (stock)

KH_2PO_4	22,68	g
Na_2HPO_4	47,20	g
H_2O distillée déminéralisée qsp	1	litre

2. Solution B (stock)

$\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,23	g
$\text{FeSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,28	g
$\text{ZnSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,18	g
K_2SO_4	1,74	g
H_2O déminéralisée qsp	1	litre

3. Solution C (stock)

$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	1,47	g
H_2O déminéralisée qsp	1	litre

Le milieu prêt à l'emploi est préparée extemporanément à partir du mélange des trois solutions. La quantité d'eau ajoutée correspond à une dilution au 1/10 de chaque solution stock. Le pH de la solution finale est 6,7.

II. Tampon phosphate A

K_2HPO_4	150	g l^{-1}
KH_2PO_4	50	g l^{-1}
H_2O déminéralisée qsp	1	litre

III. Solution de sels minéraux

$\text{FeSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	500	mg l^{-1}
H_3BO_3	10	mg l^{-1}
$\text{MgCl}_2, 4 \text{ H}_2\text{O}$	20	mg l^{-1}

ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,4 mg l ⁻¹
CuSO ₄	200 mg l ⁻¹
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	50 mg l ⁻¹
NiCl ₂ , 6 H ₂ O	10 mg l ⁻¹
EDTA	250 mg l ⁻¹
H ₂ O déminéralisée qsp	1 litre

IV. Solution d'azote

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,51 mole l ⁻¹
---	---------------------------

V. Solution de magnésium

MgSO ₄ , 7 H ₂ O	1 mole l ⁻¹
--	------------------------

VI. Solution d'extrait de levure (Difco, Michigan, USA)

$$C = 5 \text{ g l}^{-1}$$

VI. Solution d'extrait de sol

5 kg de sol limono-argileux, provenant du site expérimental de Cîteaux (Côte d'Or), prélevé dans l'horizon de surface, sont autoclavés 2 heures à 120°C en présence de 5 litres d'eau déminéralisée. La solution obtenue après décantation à 4°C pendant 1 nuit est centrifugée 10 minutes à 6000 g. Le surnageant obtenu est filtré sur filtre millipore 1,2 µm. La teneur en carbone organique de cet extrait est déterminée à l'aide d'un analyseur de carbone Dorhmann DC 80. L'extrait de sol est conservé au congélateur à -20°C en flacon de 1 litre.

VII. Solution de glycérol (Prolabo)

-Poids moléculaire	92,09 g mole ⁻¹
-Densité	1,25
-Pureté	98 %

B. Milieux

Les milieux sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Certaines solutions, celle de cycloheximide et de chlorure de calcium par exemple, sont stérilisées séparément, par filtration sur millipore, avant d'être incorporées au milieu.

Les milieux sont répartis stérilement en boîtes de Pétri à raison de 20 ml (milieu solide) ou en tube à raison de 3 ml (milieu liquide).

I. Milieu minéral

-Tampon phosphate A	10	ml
-(NH ₄) ₂ SO ₄	5	ml
-MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,84	ml
-Solution de sels minéraux	0,50	ml
-Extrait de levure	1	ml
-H ₂ O déminéralisée qsp	1	litre

II. Milieu 2,4-D liquide

Même composition que précédemment avec :

-2,4-D	20 ou 200	mg l ⁻¹
--------	-----------	--------------------

III. Milieu 2,4-D solide

Même composition que précédemment avec :

-Agar bactériologique type E (Biokar diagnostics, France)	15	g l ⁻¹
--	----	-------------------

IV. Milieu à base d'extrait de sol

-Extrait de sol ($[C] = 350 \text{ mg l}^{-1}$)	980	ml
-Tampon Grelet (<i>mélange des 3 solutions stock</i>)	20	ml
-Agar bactériologique type E	15	g

V. Milieu NA (Difco, Michigan, USA)

-Extrait de boeuf	3	g
-Bacto-Peptide	5	g
-Bacto-Agar	15	g
-H ₂ O déminéralisée qsp	1	litre

VI. Milieu liquide LB (Luria Bertani Broth)

-Tryptone (Difco, Michigan, USA)	10	g
-Extrait de levure (Difco, Michigan, USA)	5	g
-NaCl	5	g
-H ₂ O déminéralisée qsp	1	litre

VII. Milieu solide LB (Luria Bertani Broth)

Même composition que précédemment avec :

-Agar bactériologique type E	15	g l ⁻¹
------------------------------	----	-------------------

VIII. Milieu liquide King B (Biomérieux)

-Bio-Polytone	20	g
-K ₂ HPO ₄	1,5	g
-MgSO ₄ , 7 H ₂ O	1,5	g
-Glycérol	10	ml
-H ₂ O déminéralisée qsp	1	litre

IX. Milieu solide King B (Biomérieux)

Même composition que précédemment avec :

-Agar bactériologique type E	15	g l ⁻¹
------------------------------	----	-------------------

X. Milieu liquide TY

-Bactotryptone (Difco, Michigan, USA)	5	g
-Extrait de levure (Difco, Michigan, USA)	3	g
-H ₂ O déminéralisée qsp	1	litre

Après autoclavage de ce milieu à 120°C pendant 20 minutes, ajouter 1% de CaCl₂ (c = 0,6 M) préalablement autoclavé.

XI. Milieu solide TY

Même composition que précédemment avec :

-Agar bactériologique type E	15	g l ⁻¹
------------------------------	----	-------------------

ANNEXE IV

LES REACTIFS ET LES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

A. Les produits et les milieux réactionnels

I. Tampons de base

1. Tampon de dilution

a. *Proteinase K* (tampon 1)

Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane (Prolabo, France)	10	mM
--	----	----

pH = 8,2 (ajusté avec une solution d'HCl à 1N)

Ce tampon est livré stérile.

b. *Amorces et nucléotides* (tampon 2)

Tris-HCl (Prolabo, France)	2	mM
----------------------------	---	----

NaCl	5	mM
------	---	----

Na ₂ EDTA	0,1	mM
----------------------	-----	----

Ce tampon est livré stérile.

2. Tampon de Gitshier 5 X (tampon 3)

Tris-HCl (Prolabo, France)	335	mM
----------------------------	-----	----

(NH ₄) ₂ SO ₄	83	mM
---	----	----

β-mercaptoéthanol	150	mM
-------------------	-----	----

MgCl ₂	33,5	mM
-------------------	------	----

EDTA	33,5	mM
------	------	----

pH = 8,8 (ajusté avec une solution d'HCl concentré)

Cette solution est stérilisée par filtration.

3. Tampon d'amplification (tampon 4) (pH = 9)

Tris-HCl (Prolabo, France)	10	mM
----------------------------	----	----

MgCl ₂	1,5	mM
-------------------	-----	----

KCl	50	mM
-----	----	----

Triton x 100	0,1	% (poids/volume)
--------------	-----	------------------

BSA	0,2	mg ml ⁻¹
-----	-----	---------------------

Tableau IV-1 : Sites de coupure des enzymes de restriction utilisées.

ENZYME	ACTIVITE (U / µl)	SITE DE COUPURE	FOURNISSEUR
<i>Alu</i> I	10	AG [▽] CT	Appligene
<i>Hae</i> III	10	GG [▽] CC	Appligene
<i>Hinf</i> I	10	G [▽] ANTC	Appligene
<i>Cfo</i> I	10	GCG [▽] C	Appligene
<i>Nde</i> II	5	[▽] GATC	Appligene
<i>Msp</i> I	10	C [▽] CGG	Appligene
<i>Dde</i> I	10	C [▽] TNAG	Appligene
<i>Rsa</i> I	12	GT [▽] AC	Appligene
<i>Nci</i> I	10	CC [▽] (G, C)GG	Boehringer
<i>Sau</i> 96 I	10	G [▽] GNCC	Boehringer
<i>Scr</i> FI	10	CC [▽] NGG	Boehringer
<i>Taq</i> I	10	T [▽] CGA	Appligene

4. Tampon de digestion (tampon 5)

Les tampons spécifiques à chaque enzyme sont fournis prêt à l'emploi par Appligene.

5. Tampon électrophorétique

a. TAE 10 X (tampon 6)

Tris-HCl (Prolabo, France)	40	mM
Acétate-Na	4	mM
EDTA	1	mM
pH = 7,9		

b. TBE 10 X (tampon 7)

Tris-HCl	89	mM
EDTA	2,5	mM
Acide Borique	89	mM
pH = 8,2		

6. Tampon de dépôt (tampon 8)

Saccharose	40	%
Bleu de bromothymol	0,1	%
TAE (5X) qsp	100	%

II. Les enzymes (composition des solutions stock)

1. La protéinase K (Boehringer-Mannheim, France)

c = 1 mg l⁻¹ dans de l'eau milliQ stérile.

2. La Taq Polymérase (Appligene-Oncor, France)

Cet enzyme (c = 5 U ml⁻¹) est un polypeptide de 94 kDa qui catalyse la réaction de polymérisation génique.

3. Les enzymes de restriction (Appligene-Oncor, France)

Les enzymes « 4 bases » utilisés, dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 1, ont été choisis de préférence à des enzymes de « 6 bases » pour augmenter la probabilité de coupure des fragments géniques courts, tels que les gènes codant pour les ARN 16S (1,5 kb).

III. Autres réactifs

1. Les amorces (Eurogentec, Belgique)

a. PCR/REP

REP IR-1 c = 50 µM

REP IR-2 $c = 50 \mu\text{M}$

b. PCR/RFLP

fD1 $c = 20 \mu\text{M}$

rD1 $c = 20 \mu\text{M}$

1492r $c = 20 \mu\text{M}$

Ce sont des séquences oligonucléotidiques synthétiques de 18 à 28 nucléotides avec une proportion de 50 à 60 % de G / C.

La complémentarité à l'extrémité 3' entre les paires d'amorces doit également être évitée pour empêcher la formation de dimères d'amorces, qui réduirait la quantité d'ADN cible produite.

Elles sont mises en solution dans le tampon 3.

2. Les nucléotides (Pharmacia LKB biotechnology, Orsay, France)

dNTP (désoxynucléoside triphosphate): mélange équimolaire ($c = 25 \text{ mM}$) de dATP, dCTP, dTTP et dGTP.

3. Les solutions

-Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Fluka, France)	100 % (solution stock)
-MgCl ₂	25 mM
-BSA (Sérum Albumine Bovine) (Boehringer, Mannheim)	1,7 mg ml ⁻¹
-Bromure d'éthidium	2 µg ml ⁻¹

4. Huile de paraffine (Prolabo, France)

La solution est préalablement stérilisée avant utilisation.

5. Marqueurs de poids moléculaire

a. Marqueur 1kb (Bethesda Research laboratories Life Technologies, France)

Poids moléculaire des fragments d'ADN : 17,72; 11,20; 10,18; 9,16; 8,14; 7,13; 6,11; 5,10; 4,07; 3,05; 2,04; 1,64; 1,02 kb.

b. Marqueur BVIII (Boehringer-Mannheim, France)

Poids moléculaire des fragments d'ADN : 1114; 900; 692; 501; 489; 404; 320; 242; 190; 147; 124; 110; 67; 37; 34 pb.

6. Gels

a. Agarose ordinaire (Sigma, type II medium EEO, USA)

Ce produit est utilisé, soit à 1,5 % dans du tampon TAE 1X (tampon 6) pour la PCR-REP, soit à 0,9 % dans du tampon TBE 1X (tampon 7) pour vérifier l'amplification du gène de l'ARNr 16S.

b. Agarose Metaphor (Tebu, France)

Ce produit, utilisé à 3,5 % dans du tampon TBE X1 (tampon 7), permet d'obtenir un gel dont le tamis moléculaire est suffisamment fin pour retenir les fragments les plus petits.

B. Les protocoles expérimentaux

I. Protocole de lyse des cellules bactériennes

Les bactéries sont cultivées dans 3 ml de milieu TY liquide pendant une nuit à 28°C. L'équivalent de 100 µl de cette culture bactérienne à une absorbance ($\lambda = 620$ nm) de 2 a été prélevé, puis centrifugé pendant 5 minutes à 15115 g (13000 rpm). Le culot bactérien est remis en suspension dans 100 µl d'eau milliQ stérile auxquels sont ajoutés 100 µl de tampon 1 et 13 µl de solution de Protéinase K. Ce mélange est incubé une nuit à 55°C (température optimale d'activité de l'enzyme). La protéinase K est ensuite dénaturée pendant 10 minutes au bain-marie à 100°C. Les suspensions cellulaires lysées à la protéinase K sont centrifugées 10 minutes à 15115 g (13000 rpm) pour éliminer les débris cellulaires puis conserver à -20°C.

II. Protocole d'amplification par PCR des séquences inter-REP

L'ADN de 5 µl de suspension bactérienne traitée à la protéinase K est amplifié dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 5 µl de tampon Gitshier, 1 µl de solution de chacune des amorces REP IR-1 et REP IR-2, 6,5 µl de solution de $MgCl_2$, 1,25 µl de la solution stock de dNTP, 2,5 µl de solution de BSA, 2,5 µl de solution de DMSO et 0,2 µl de solution de *Taq* Polymérase. Le mélange réactionnel est recouvert de 2 à 3 gouttes d'huile de paraffine pour éviter l'évaporation durant la PCR. Un témoin sans ADN est réalisé en parallèle avec 5 µl d'eau milliQ stérile.

Les conditions d'amplification sont les suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 6 minutes, suivi de 30 cycles à 94°C pendant 1 minute, 40°C pendant 1 minute, 65°C pendant 8 minutes et enfin élongation finale à 65°C pendant 16 minutes.

5 µl d'amplifiat mélangés à 1 µl de tampon de charge (tampon 8) sont déposés dans chaque puits du gel d'agarose (8 x 6 cm, 14 puits) à 1,5 % dans du tampon TAE 1X (tampon 6). Aux deux extrémités du gel sont déposés 1,5 µl de marqueur de poids moléculaire 1kb. La migration électrophorétique des fragments amplifiés est réalisée pendant 30 minutes à 100 Volts. Après électrophorèse, le gel est révélé par immersion pendant 10 minutes dans un

bain de bromure d'éthidium et rincé 5 minutes dans un bain d'eau déminéralisée. Les fragments d'ADN contenant l'intercalant sont visualisés sous rayonnement ultra-violet (302 nm) et photographiés sur film polaroid (type 665) ou à l'aide d'un imageur vidéo (Vilber Lourmat) équipé du logiciel Bioprint. Chaque image est stockée en mémoire et traitée par un logiciel d'analyse d'image (Photoshop et/ou Bioprofil).

III. Protocole d'amplification par PCR de l'ADNr 16S

La réaction d'amplification est réalisée dans un volume final de 50 µl contenant 5 µl de suspension cellulaire traitée à la protéinase K, 2,5 µl de solution de chacune des amorces diluée au 1/10 dans du tampon 2, 5 µl de tampon 4, 0,4 µl de solution de dNTP diluée au 1/10 dans du tampon 2, 0,25 µl de solution de *Taq* Polymérase et 34,35 µl d'eau milliQ stérile. Le mélange réactionnel est agité puis recouvert de quelques gouttes d'huile de paraffine.

Le cycle d'amplification comprend une dénaturation initiale de 3 minutes à 95°C, suivi de 35 cycles à 94°C pendant 1 minute, 60°C pendant 1 minute, 72°C pendant 2 minutes et enfin une extension finale de 3 minutes à 72°C.

Afin de vérifier le bon déroulement de l'amplification, on s'assure de la production de fragments d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose de 8 x 6 cm dans une cuve horizontale 60 (Gibco, BRL). 5 µl de chaque produit de PCR, mélangé à 1 µl de tampon de charge (tampon 8), ont été analysés par électrophorèse en gel horizontal (6 x 8 cm, 14 puits) d'agarose à 0,9 % dans du tampon TBE (tampon 7) sous une tension de 100 Volts (5,5 V/cm) pendant 30 minutes. Le gel est coloré puis photographié comme décrit précédemment.

IV. Protocole d'analyse du polymorphisme de l'ADNr 16S par PCR-RFLP

Pour faciliter la digestion de l'ADN amplifié par l'enzyme *Rsa* I, dont l'optimum d'activité nécessite un milieu faiblement salin, les amplifiats ont été dialysés en déposant 10 µl de produit de PCR sur un filtre millipore (1 cm de diamètre, 0,025 µm de porosité) à la surface d'eau déminéralisée contenue dans une boîte de Pétri de 5 cm de diamètre.

8 µl de la solution dialysée sont introduits dans un tube eppendorf de 1 ml contenant 1 µl de tampon spécifique de l'enzyme utilisé (tampon 5) et 1 µl d'enzyme testé. Le mélange réactionnel est incubé une nuit à 37°C dans un bain marie à sec. La totalité du produit de la digestion est déposée avec 2 µl de tampon de charge (tampon 8) dans chaque puits d'un gel (11 x 14 cm, 20 puits) d'agarose à 3,5 % (Metaphor) dans du tampon TBE 1X (tampon 7). De part et d'autre du gel sont déposés 4 µl de marqueur de poids moléculaire B VIII. La migration est réalisée pendant 4 heures à 80 volts. Le gel est ensuite coloré et photographié comme décrit précédemment.

ANNEXE V

TESTS D'IDENTIFICATION BIOCHIMIQUES DES *PSEUDOMONAS*

A. Produits et réactifs de base

I. Réactif de la cytochrome C oxydase

Solution de chlorhydrate ou oxalate de N,N-diméthyl paraphénylène diamine (Sigma, France) utilisé à 1% dans de l'eau minéralisée.

II. Tampon Sörensen

H ₂ KPO ₄ (M/10) (solution A)	13,6	g l ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ (M/10) (solution B)	17,79	g l ⁻¹
H ₂ O déminéralisée qsp	1	litre
pH = 7,05		

Le tampon est préparé en mélangeant 0.4 l de A et 0.6 l de B.

B. Milieux de culture

Tous les milieux sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes puis répartis en tubes à raison de 5 ml ou en boîtes de Pétri à raison 20 ml.

I. Milieu King B (Annexe III)

II. Milieu dénitrification

NA ₂ HPO ₄	2,8	g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	2,7	g l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	g l ⁻¹
Extrait de levure (Difco, michigan, USA)	5	g l ⁻¹
Glycérol	10	g l ⁻¹
KNO ₃	10	g l ⁻¹
Agar	2	g l ⁻¹
H ₂ O déminéralisée qsp	1	litre

III. Milieu arginine (Thornley)

Arginine mono HCl (Sigma, France)	10	g l ⁻¹
Bactopeptone (Difco, michigan, USA)	1	g l ⁻¹
NaCl	5	g l ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,3	g l ⁻¹
Rouge de phénol	0,01	g l ⁻¹
Agar	3	g l ⁻¹
H ₂ O déminéralisée qsp	1	litre

IV. Milieu gélatine

Extrait de levure (Difco, michigan, USA)	3	g l ⁻¹
Bactopeptone (Difco, michigan, USA)	5	g l ⁻¹
Gélatine (Prolobo, France)	120	g l ⁻¹
H ₂ O déminéralisée qsp	1	litre

pH = 7

V. Milieu tryptophane (Api)

Extrait de levure (Difco, michigan, USA)	6,7	g l ⁻¹
Agar noble (Difco)	1,5	g l ⁻¹
Tryptophane (Sigma, France)	5	g l ⁻¹
Tampon Sørensen qsp	1	litre

VI. Milieu ARJ (Ayers, Rupp et Johnson)

NH ₄ H ₂ PO ₄	1	g l ⁻¹
Kcl	0,2	g l ⁻¹
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2	g l ⁻¹
Bleu de bromothymol	0,08	g l ⁻¹
Glucide testé	5	g l ⁻¹
ou L+ tartrate de Na	10	g l ⁻¹
Agar	3	g l ⁻¹
H ₂ O déminéralisée qsp	1	litre

pH = 7.2

VIII. Milieu polysacchases

Extrait de levure (Difco, michigan, USA)	2	g l ⁻¹
Bactopeptone (Difco, michigan, USA)	5	g l ⁻¹

NaCl	5	g l ⁻¹
Saccharose	50	g l ⁻¹
Agar	15	g l ⁻¹
H ₂ O déminéralisée qsp	1	litre
pH = 7.2 à 7.4		

C. Protocoles

I. Mise en évidence de la Cytochrome C oxydase

Une anse de culture bactérienne a été appliquée sur un morceau de papier Whatman sur lequel a été déposé une goutte de réactif.

La présence de la cytochrome C oxydase est indiquée par une coloration rouge qui apparaît dans les 10 secondes.

II. Production d'un pigment fluorescent

Certains *Pseudomonas* produisent des pigments fluorescents (pyoverdine) sur des milieux particuliers contenant une faible concentration de fer. Ces pigments sont hydrosolubles, insolubles dans le chloroforme, gris vert, fluorescents aux ultra-violets. Ils présentent la propriété d'émettre une lumière visible lorsqu'ils reçoivent un flux de rayons Ultra-Violets. Ces bactéries transforment un flux de faible longueur d'onde en un flux de longueur d'onde plus élevée.

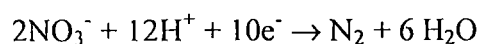
Un tube de gélose inclinée contenant du milieu King B a été ensemencé, puis incubé pendant 48 heures à 25°C.

L'examen du tube sous lampe UV à la longueur d'onde de 365 nm (lampe de Wood) permet de vérifier la production d'un pigment fluorescent vert-jaune, en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

III. Dénitrification (Stanier et *al.*, 1966)

A partir d'une préculture en tube de 10 ml contenant 5 ml de milieu, un tube de 10 ml de milieu est ensemencé par piqûre centrale. Il est ensuite recouvert de 2 ml de gélose stérile pour assurer une atmosphère anaérobie.

La lecture est réalisée après 5 jours d'incubation à 25 °C. Le soulèvement de la gélose indique la production de N₂ selon la réaction :



IX. Utilisation des di et polysaccharides

Une boîte de Pétri contenant du milieu « polysaccharide » estensemencé par piqûre centrale puis incubé à 25°C pendant 3 jours.

La présence d'une lévane réductase est mise en évidence par l'apparition d'une culture abondante, bombée, muqueuse et brillante résultant de la polymérisation du fructose par coupure du saccharose.

ANNEXE VI

**PARAMETRES CINETIQUES DE CROISSANCE
DES SOUCHES BACTERIENNES
CALCULES SELON LE MODELE MONOMOLECULAIRE
DE GOMPERTZ**

TRAITEMENT												
	Témoin				[DNOC] = 50 mg l ⁻¹				[DNOC] = 250 mg l ⁻¹			
Souche	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
<i>S. meliloti</i>	2,04	10,62	6,02	-0,02	0,59	73,24	114,8 4	-0,002	1,43	66,76	147,42	-0,003
<i>R. elti</i>	2,64	10,84	8,23	-0,04	2,64	18,31	16,16	-0,04	1,43	66,76	147,42	-0,003
<i>R. sp. eg 1</i>	2,22	13,79	10,24	-0,02	4,30	23,63	19,84	-0,05	1,43	66,76	147,42	-0,003
<i>R. sp. eg 2</i>	1,60	9,96	6,38	-0,004	2,37	13,84	10,17	-0,02	1,43	66,76	147,42	-0,003
<i>A. tumefaciens</i>	1,19	6,39	2,95	-0,003	1,02	6,98	3,08	0,001	3,05	17,43	13,91	-0,04
C1	1,48	3,40	2,36	0,01	1,32	3,22	2,05	0,02	1,31	3,16	2,07	0,02
C60	0,88	13,07	2,44	0,03	3,49	5,35	4,07	-0,12	4,17	5,90	4,38	-0,15
C42	1,81	6,11	2,36	-0,02	0,90	7,67	2,25	-0,03	0,95	6,15	1,31	0,04
C47	1,12	6,75	2,57	-0,03	0,81	9,18	2,63	-0,03	0,58	2,90	1,02	0,05
C52	1,55	10,02	7,58	0,008	1,47	9,31	6,66	0,009	1,39	9,45	7,08	0,010
C49	1,34	12,09	3,50	0,014	1,36	11,31	2,70	0,01	1,25	12,77	3,99	0,010
C55	1,71	8,06	2,58	0,007	1,62	7,70	2,34	0,007	1,88	6,99	3,03	-0,007
C40	1,77	6,07	3,19	0,007	1,58	6,54	3,63	0,008	1,01	17,51	3,66	0,01
C22	1,60	3,76	2,53	0,009	1,60	3,67	2,47	0,008	1,75	3,99	3,15	-0,001

P₁, P₂, P₃ et P₄ représentent respectivement le plateau, l'abscisse du point d'inflexion de la courbe, l'inverse du taux de croissance et la vitesse de maintenance.

ANNEXE VII

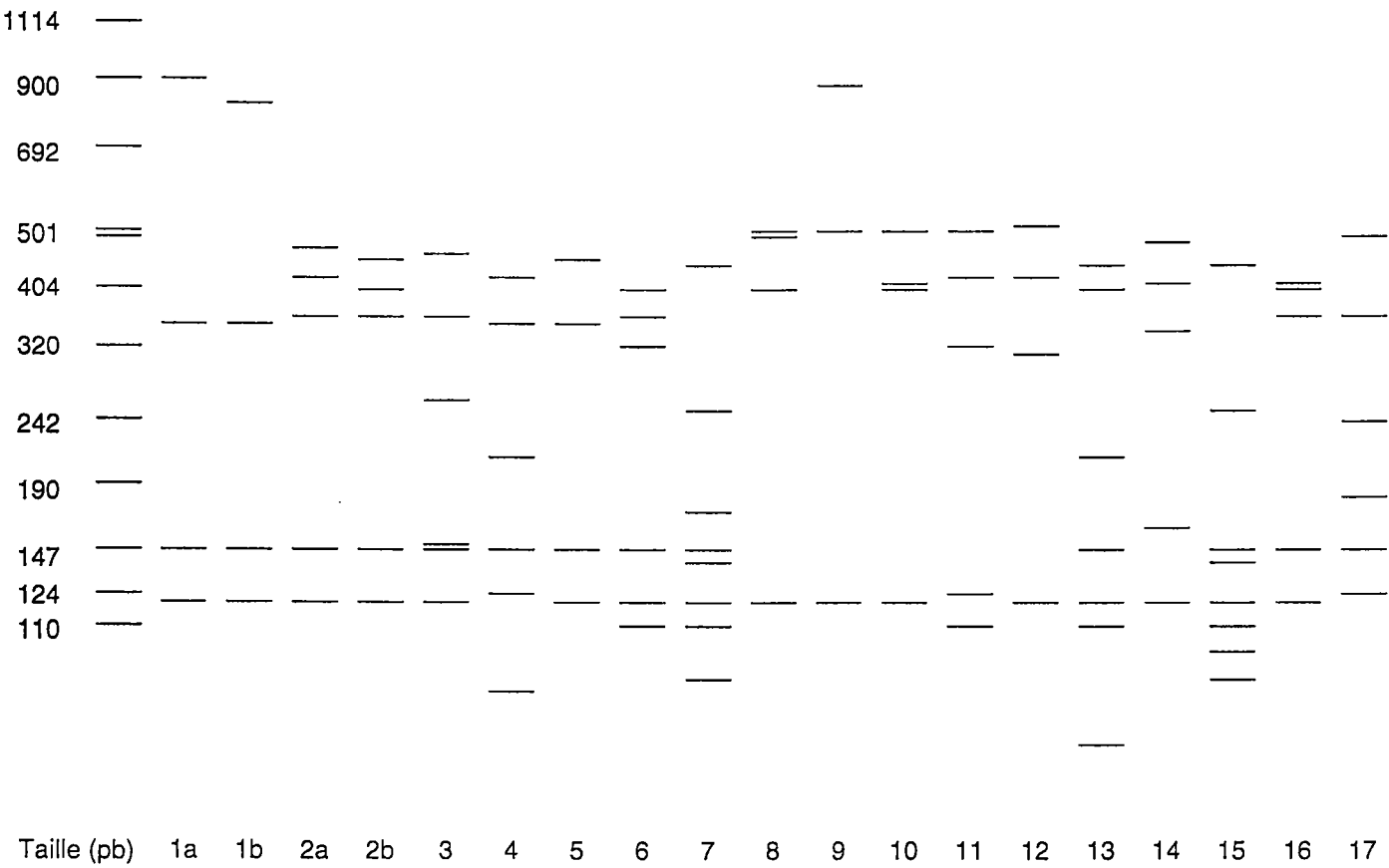
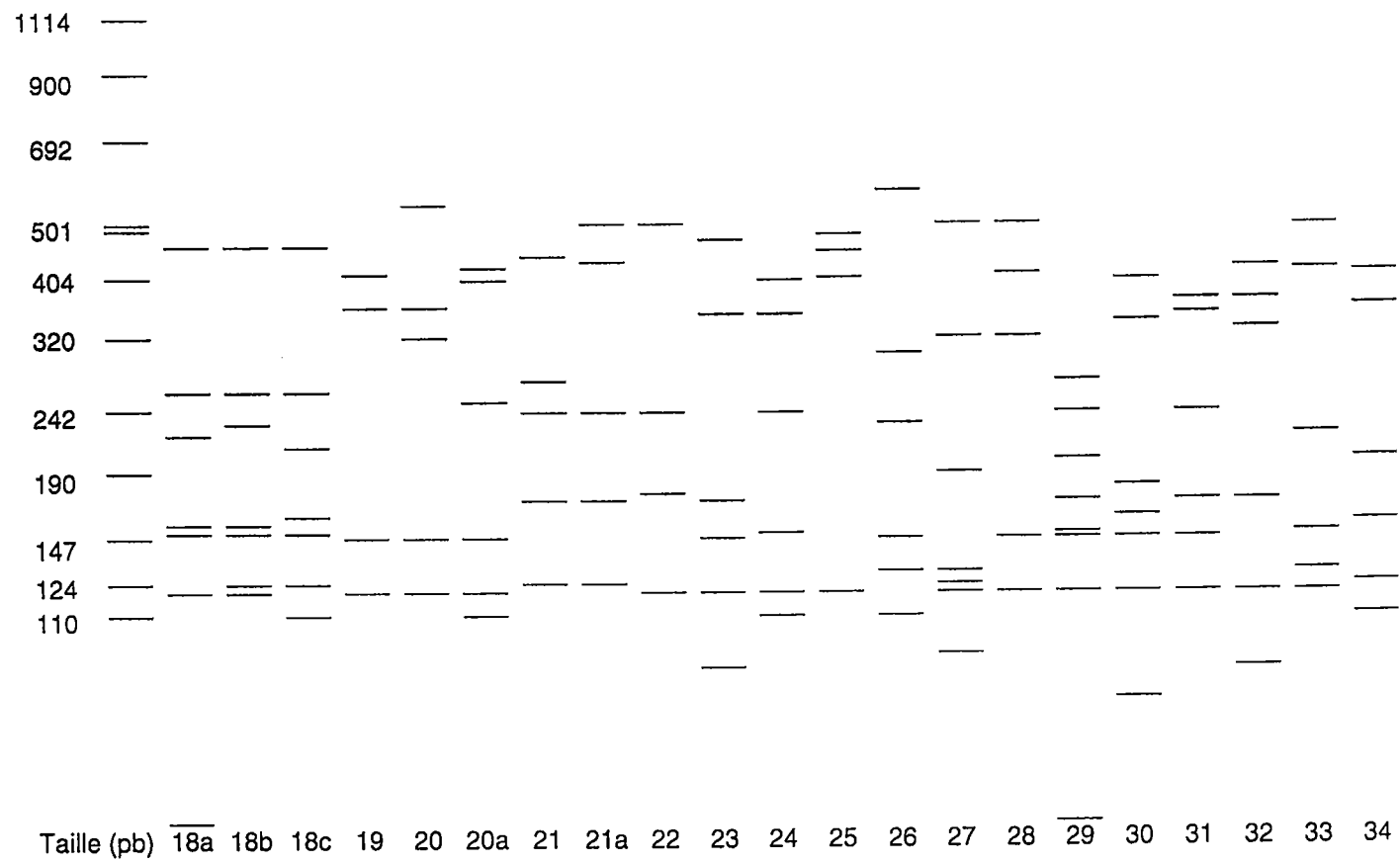
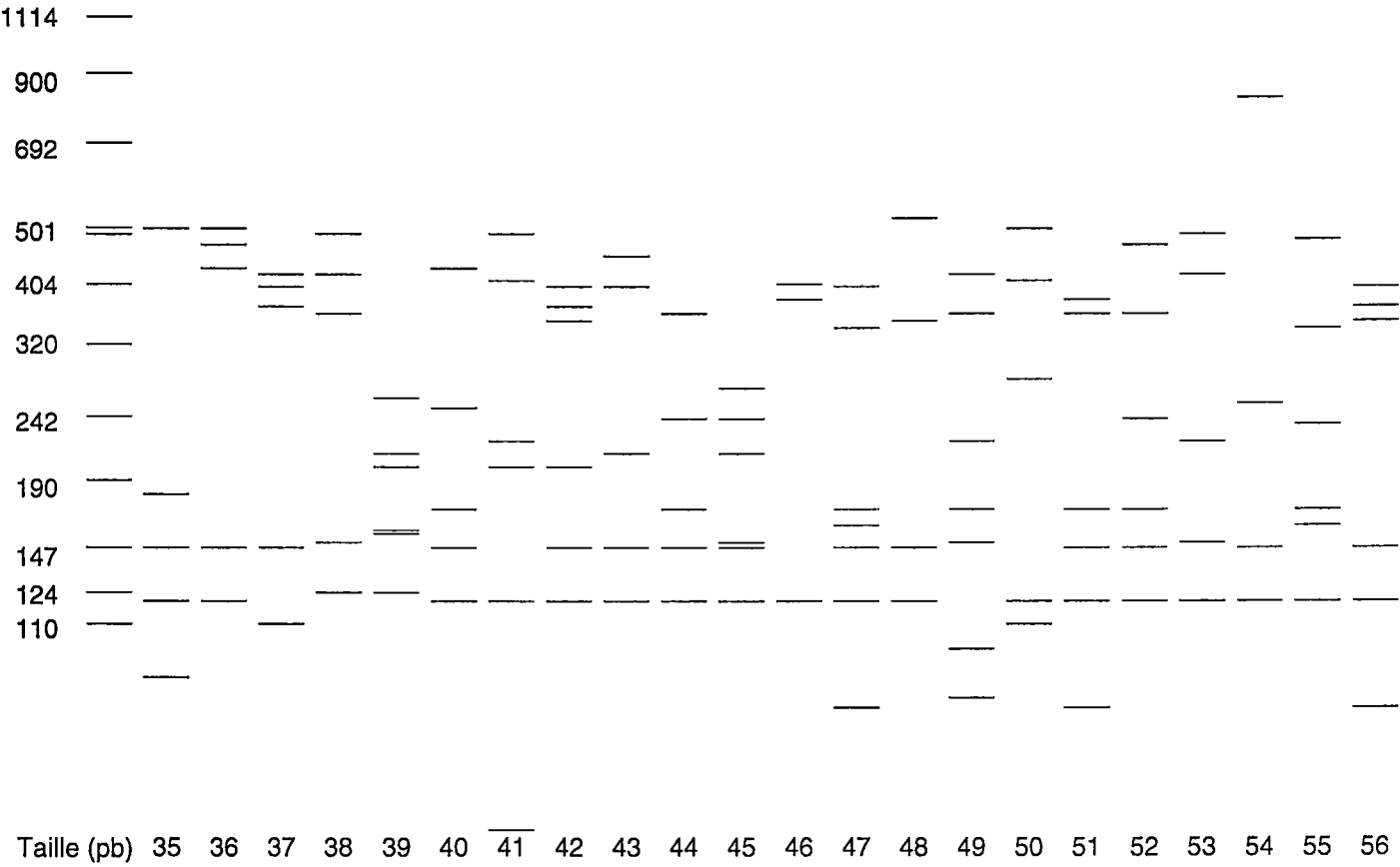


Figure VII-1 : Représentation schématique des profils de restriction du gène de l'ADNr 16S amplifié par PCR et digéré par *RsaI* à partir des souches bactériennes isolées de sols témoin et traités au DNOC ou au 2,4-D. La première colonne indique la position et la taille en paires de bases (pb) des bandes du marqueur de poids moléculaire.





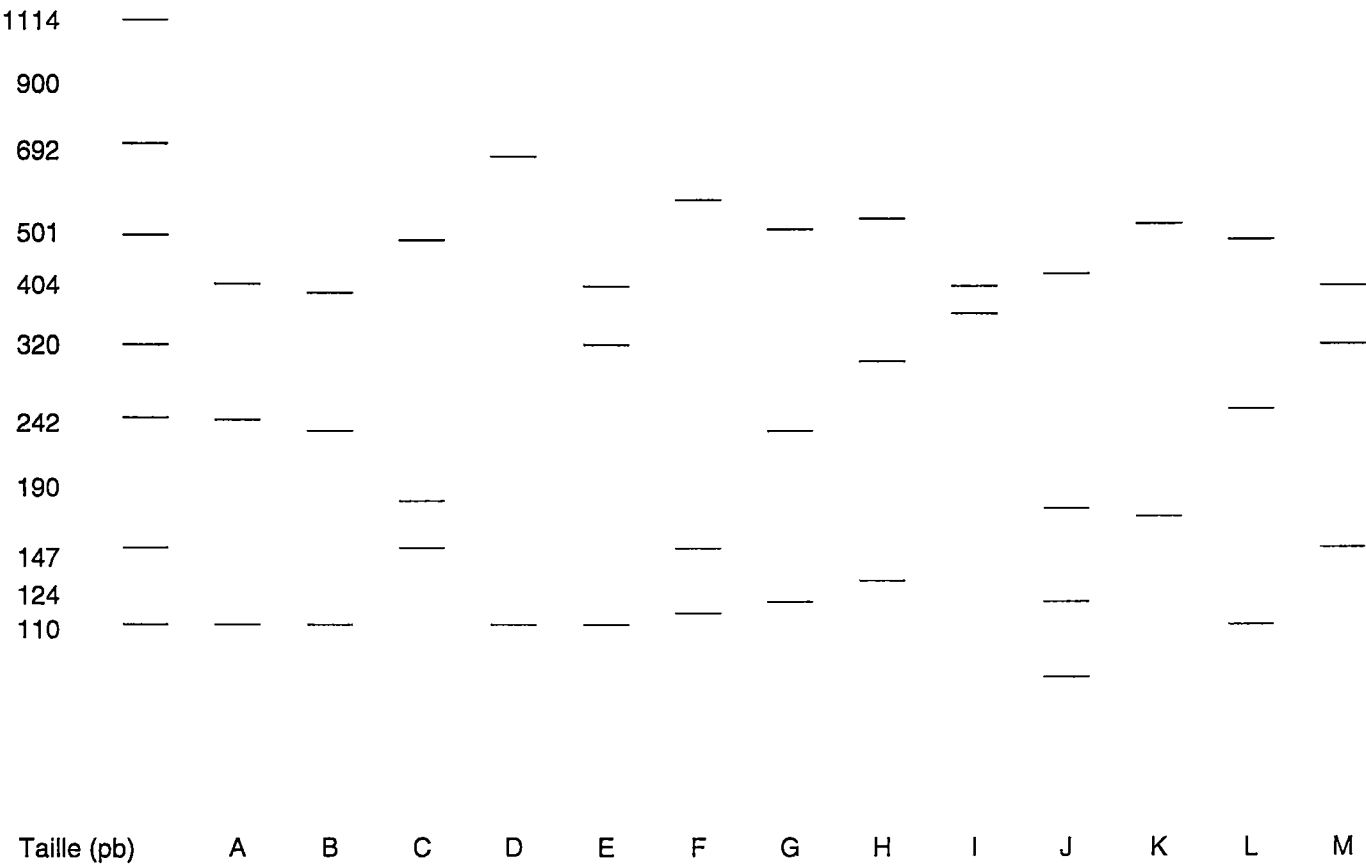


Figure VII-2 : Représentation schématique des profils de restriction du gène de l'ADNr 16S amplifié par PCR et digéré par *RsaI* à partir des isolats se développant sur milieu minéral additionné de 2,4-D. La première colonne indique la position et la taille en paires de bases (pb) des bandes du marqueur de poids moléculaire.

ANNEXE VIII

TABLEAUX DE CONTINGENCE

Tableau 1 : Répartition des morphotypes de la microflore totale pour les populations isolées de sol témoin et de sol traité au DNOC ou au 2,4-D.

Morphotype	Traitements											
	A1	B1	D1	E1	A2	B2	D2	E2	A3	B3	D3	E3
1	4	2	1	8	3	1	1	10	2	4	3	8
2	2	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
3	4	7	2	6	4	2	5	6	2	3	6	4
4	2	0	2	2	0	7	0	0	0	0	0	1
5	16	4	8	9	2	5	4	3	8	15	9	5
6	2	1	2	0	5	1	5	2	1	0	0	2
7	4	2	6	0	3	1	4	0	1	1	4	0
8	1	2	0	0	2	0	6	0	7	0	0	0
9	7	2	4	7	2	3	3	5	11	4	13	7
10	0	9	22	0	7	4	24	0	1	5	17	0
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1	0	0	2	2	0	2	1	1	1	3	3
13	1	1	0	0	0	0	0	0	3	2	2	2
14	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	4
15	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
16	0	0	1	0	1	3	0	0	0	1	0	0
17	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
18	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
23	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
29	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0

A, B, D et E correspondent respectivement aux échantillons de sol témoin, traité au DNOC à 15 et 50 mg kg⁻¹ et au 2,4-D à 50 mg kg⁻¹. Le chiffre qui suit, 1, 2 ou 3, indique respectivement le temps de prélèvement du sol à 7, 16 et 62 jours d'incubation.

Tableau 2 : Répartition des types RFLP de la microflore totale pour les populations isolées de sol témoin et de sol traité au DNOC ou au 2,4-D.

Type RFLP	Traitements											
	A1	B1	D1	E1	A2	B2	D2	E2	A3	B3	D3	E3
1a	4	6	21	0	3	5	29	1	5	5	21	1
1b	0	1	6	0	2	1	5	1	0	0	1	1
2a	0	2	0	1	5	1	3	1	2	4	0	5
2b	0	1	1	0	0	2	1	2	3	0	1	1
3	12	6	4	9	1	4	2	6	8	5	2	4
4	1	3	0	1	4	3	0	0	0	1	0	1
5	1	1	0	0	1	0	5	2	0	1	3	2
6	6	1	0	2	1	0	0	4	1	0	0	0
7	4	5	2	6	8	6	0	3	9	0	0	6
8	4	0	2	4	7	2	3	0	4	5	7	0
9	1	3	0	2	4	2	0	2	1	1	0	0
10	0	4	1	0	0	2	0	0	0	8	2	3
11	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
12	2	0	4	0	0	1	3	0	1	2	6	0
13	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
14	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
15	0	0	0	1	4	0	0	3	2	0	0	2
16	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
17	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
18a	2	0	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0
18b	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18c	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	2	2	0	3	1	0	0	2	0	0	0	0
20	2	3	0	9	2	0	0	5	0	0	0	0
20a	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
21	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
21a	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
22	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
39	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0

A, B, D, E représentent respectivement les échantillons de sol témoin, traité au DNOC à 15 et 50 mg kg⁻¹ et au 2,4-D à 50 mg kg⁻¹. Le chiffre qui suit, 1, 2 ou 3, indique respectivement le temps de prélèvement à 7, 16 et 62 jours d'incubation.

Tableau 3 : Répartition des types RFLP isolés sur milieu minéral additionné de 2,4-D à partir du sol témoin et traité au DNOC à deux concentrations (15 et 50 mg kg⁻¹).

Type RFLP	Traitements							
	A1	D1	A2	B2	D2	A3	B3	D3
1b	4	1	2	2	1	0	1	1
21a	0	0	1	0	0	0	0	0
1a	2	0	3	5	13	1	2	11
9	0	0	3	0	0	1	0	0
A	0	0	1	0	0	0	0	0
2b	0	2	1	2	3	2	1	0
19	0	2	1	0	2	1	0	0
40	0	0	1	0	0	0	0	0
20	12	14	1	2	0	0	0	0
3	0	0	5	2	4	5	2	2
4	0	0	1	1	0	0	0	0
B	0	0	1	0	0	0	0	0
6	3	3	3	1	0	0	0	0
43	0	0	2	2	0	0	0	0
C	0	0	1	0	0	0	0	0
12	0	0	0	1	4	0	6	8
7	5	2	0	1	2	1	0	0
8	0	1	1	2	1	0	0	1
D	0	0	0	1	0	0	1	0
31	0	0	0	1	0	0	1	0
21	1	0	0	1	0	1	0	0
14	0	0	0	1	0	1	0	0
E	0	0	0	0	0	1	0	0
10	0	0	0	0	0	2	0	0
41	0	0	0	0	0	0	4	1
F	0	0	0	0	0	0	2	0
5	0	0	0	0	0	0	0	1
G	0	0	0	0	0	0	0	1
2a	0	0	0	0	0	0	2	0
H	1	0	0	0	0	0	0	0
16	0	1	0	1	0	1	0	0
56	0	0	0	0	0	1	0	0
I	0	0	0	1	0	1	0	0
J	0	2	0	0	0	0	0	0
K	0	0	0	0	0	1	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	1
L	0	0	0	0	0	2	0	0
47	1	0	0	0	0	0	0	0
M	0	1	0	0	0	0	0	0

A, B et D correspondent respectivement aux échantillons de sol témoin et traité au DNOC à 15 et 50 mg kg⁻¹ et le chiffre qui suit, 1, 2 ou 3, indique respectivement le prélèvement du sol à 7, 16 et 62 jours d'incubation.

ANNEXE IX

ANALYSE FACTORIELLE DE CORRESPONDANCES

A. Effet du DNOC sur des souches isolées de bactéries

Nombre d'observations (lignes) = 14
Nombre de variables (colonnes) = 9
Nombre de variables actives (colonnes) = 9

Variables = 1p₁, 1p₂, 1p₃, 2p₁, 2p₂, 2p₃, 3p₁, 3p₂, 3p₃ (p₁, p₂, p₃ représentent respectivement le plateau, l'abscisse du point d'inflexion et l'inverse du taux de croissance, précédé par le chiffre 1, 2, 3 correspondant respectivement aux paramètres cinétiques des courbes du témoin, du traité au DNOC à 50 et 250 mg l⁻¹).

1. Valeurs propres

1^{ère} ligne = valeurs propres (variances sur les axes principaux).
2^{ème} ligne = contribution à l'inertie totale (% expliqués par les axes principaux).

AXE 1	AXE 2	AXE 3
0,198	0,116	0,017
56,2	31,1	4,8

2. Vecteurs propres

Vecteurs propres = coefficients des variables dans l'équation linéaire des axes principaux.

VARIABLE	AXE 1	AXE 2	AXE 3
1p ₁	-1,875	-0,568	-1,128
1p ₂	-2,005	-0,587	-0,195
1p ₃	-1,248	-0,640	-1,540
2p ₁	-1,952	-1,184	2,598
2p ₂	-0,649	1,005	-1,082
2p ₃	0,188	2,222	0,763
3p ₁	-3,314	-0,994	5,939
3p ₂	0,275	-0,547	-0,410
3p ₃	0,927	-0,499	0,373

3. Coordonnées des variables sur les premiers axes factoriels

1^{ère} colonne = coordonnées des variables sur les axes.
2^{ème} colonne = cosinus carrés (qualité de la représentation).
3^{ème} colonne = contribution relative à l'inertie expliquée par l'axe.

	POIDS (%)	AXE 1			AXE 2			AXE 3		
1p ₁	1,47	-0,833	0,697	5,2	-0,194	0,038	0,5	-0,147	0,022	1,9
1p ₂	7,92	-0,891	0,908	31,8	-0,200	0,046	2,7	-0,025	0,001	0,3
1p ₃	4,12	-0,555	0,610	6,4	-0,218	0,094	1,7	-0,200	0,080	9,8
2p ₁	1,64	-0,867	0,679	6,3	-0,404	0,147	2,3	0,338	0,103	11,1
2p ₂	13,09	-0,288	0,361	5,5	0,342	0,510	13,2	-0,141	0,086	15,3
2p ₃	12,70	0,083	0,012	0,4	0,757	0,965	62,7	0,099	0,017	7,4
3p ₁	1,29	-1,473	0,732	14,2	-0,339	0,039	1,3	0,772	0,201	45,5
3p ₂	24,83	0,122	0,217	1,9	-0,187	0,506	7,4	-0,053	0,041	4,2
3p ₃	32,94	0,412	0,825	28,3	-0,170	0,141	8,2	0,048	0,011	4,6

4. Coordonnées des individus sur les axes factoriels

- 1^{ère} colonne = coordonnées des individus sur les axes.
2^{ème} colonne = cosinus carrés (qualité de la représentation en %).
3^{ème} colonne = contribution relative à l'inertie expliquée par l'axe.

	POIDS (%)	AXE 1			AXE 2			AXE 3		
<i>S. meliloti</i>	25,94	0,164	0,081	3,5	0,553	0,916	68,1	0,032	0,003	1,6
<i>R. elti</i>	16,21	0,298	0,599	7,3	-0,242	0,396	8,2	-0,009	0,000	0,1
<i>R. sp. eg 1</i>	17,20	0,229	0,561	4,6	-0,195	0,407	5,6	-0,015	0,002	0,2
<i>R. sp. eg 2</i>	15,26	0,352	0,542	9,6	-0,322	0,454	13,6	0,007	0,000	0,0
<i>A. tumefaciens</i>	3,67	-0,305	0,400	1,7	-0,235	0,238	1,7	0,116	0,057	2,9
C1	1,33	-0,902	0,804	5,5	-0,107	0,011	0,1	0,137	0,019	1,5
C60	2,87	-1,110	0,766	17,9	-0,206	0,026	1,0	0,527	0,173	47,1
C42	1,90	-0,834	0,905	6,7	0,029	0,001	0,0	-0,239	0,074	6,4
C47	1,80	-0,946	0,788	8,2	0,188	0,031	0,6	-0,353	0,109	13,3
C52	3,57	-0,652	0,762	7,7	0,013	0,000	0,0	-0,175	0,055	6,4
C49	3,36	-0,728	0,842	9,0	-0,046	0,003	0,1	-0,223	0,079	9,9
C55	2,35	-0,888	0,967	9,4	-0,098	0,012	0,2	-0,010	0,000	0,0
C40	2,94	-0,471	0,534	3,3	-0,139	0,046	0,5	-0,180	0,078	5,7
C22	1,61	-0,837	0,772	5,7	-0,120	0,016	0,2	0,227	0,057	4,9

B. Effet du DNOC sur la diversité de la microflore totale

Nombre d'individus sélectionnés = 56
 Nombre d'individus actifs = 56
 Nombre de variables = 8

1. Valeurs propres

	Valeur propre	%	% cumulé	histogramme
1	0,439	25,78	25,78	*****
2	0,304	17,86	43,64	*****
3	0,278	16,33	59,97	*****
4	0,189	11,07	71,04	*****
5	0,175	10,24	81,28	*****
6	0,138	8,08	89,37	*****
7	0,111	6,53	95,90	*****
8	0,070	4,10	100,00	*****

Total = 1,704

2. Vecteurs propres

1^{ère} colonne : coordonnées des vecteurs propres.
 2^{ème} colonne : part (en %) de la variable dans la construction du facteur.

Variable	Facteur 1		Facteur 2		Facteur 3		Facteur 4		Facteur 5	
A1	-0,914	10,13	-1,161	16,34	-2,031	50,02	0,580	4,13	0,595	4,29
B1	-0,844	7,64	0,189	0,38	0,046	0,02	0,884	8,38	-1,685	30,44
D1	1,089	12,16	-0,848	7,38	0,296	0,90	0,138	0,19	-0,695	4,95
A2	-1,234	18,12	0,048	0,03	1,777	37,55	1,010	12,12	1,170	16,28
B2	-0,615	3,26	0,150	0,19	0,333	0,96	-1,138	11,16	-1,724	25,65
D2	1,221	18,40	-0,727	6,53	0,443	2,42	0,334	1,38	-0,238	0,7
A3	-0,688	4,85	-0,106	0,12	0,133	0,18	-2,438	61,95	0,823	6,94
B3	0,291	0,93	2,507	68,86	-0,851	7,93	0,230	0,58	0,172	0,32
D3	1,383	24,51	0,116	0,17	-0,033	0,01	0,095	0,12	0,902	10,42

3. Coordonnées des variables sur les premiers axes factoriels

1^{ère} colonne : coordonnées des variables sur les axes.
 2^{ème} colonne : % de la variabilité de la variable expliquée par le facteur.
 Qualité : qualité de la représentation d'une variable sur les axes sélectionnés (somme sur les facteurs de la 2^{ème} colonne).

Variable	Qualité	Facteur 1		Facteur 2		Facteur 3		Facteur 4		Facteur 5	
A1	98,7	-0,606	17,66	-0,641	19,73	-1,072	55,24	0,254	3,09	0,249	2,97
B1	68,4	-0,560	22,13	0,104	0,77	0,024	0,04	0,384	10,41	-0,704	35,01
D1	61,0	0,722	37,31	-0,468	15,69	0,156	1,75	-0,060	0,26	-0,290	6,04
A2	98,2	-0,818	33,20	0,026	0,03	0,938	43,58	0,438	9,53	0,489	11,86
B2	58,9	-0,407	10,11	0,083	0,42	0,176	1,88	-0,494	14,86	-0,721	31,63
D2	70,3	0,809	51,04	-0,401	12,54	0,234	4,26	0,145	1,64	-0,100	0,77
A3	89,5	-0,456	12,62	-0,058	0,21	0,070	0,30	-1,067	69,17	0,344	7,18
B3	94,4	0,193	1,62	1,383	83,35	-0,449	8,78	0,100	0,43	0,072	0,23
D3	64,3	0,917	54,68	0,064	0,27	-0,017	0,02	0,041	0,11	0,377	9,23

4 Coordonnées des individus sur les premiers axes factoriels

1^{ère} colonne : coordonnées des individus sur les axes.
 2^{ème} colonne : cosinus carrés (qualité de la représentation en %).
 3^{ème} colonne : contribution de l'individu à l'axe (en %).
 Qualité (Qlt.) : qualité de la représentation de l'individu sur les axes sélectionnés (somme sur ces facteurs des cosinus carrés).

	Qlt.	Facteur 1			Facteur 2			Facteur 3			Facteur 4			Facteur 5		
1a	97,8	0,71	80,6	26,1	-0,27	12,1	5,7	0,14	3,2	1,6	0,03	0,1	0,1	-0,11	1,8	1,5
1b	74,7	0,63	28,3	3,4	-0,51	18,6	3,2	0,49	17,3	3,3	0,17	2,0	0,6	-0,35	8,5	2,6
2a	72,3	-0,30	11,1	0,8	0,49	31,0	3,2	0,44	24,7	2,8	0,16	3,2	0,5	0,14	2,5	0,4
2b	95,6	-0,05	0,2	0,0	-0,14	1,9	0,1	0,20	3,7	0,3	-0,94	81,5	9,9	-0,30	8,3	1,1
3	95,6	-0,32	23,7	2,4	-0,12	3,0	0,4	-0,50	57,6	9,4	-0,21	10,4	2,5	-0,06	0,9	0,2
4	88,5	-0,83	50,3	4,4	0,21	3,3	0,4	0,45	14,7	2,0	0,34	8,5	1,7	-0,40	11,6	2,5
5	52,5	0,63	34,8	2,5	-0,14	1,8	0,2	0,09	0,7	0,1	0,39	13,3	2,2	0,15	1,9	0,3
6	99,9	-0,92	28,0	4,0	-0,76	19,2	4,0	-1,14	43,0	9,7	0,33	3,5	1,2	0,43	6,2	2,2
7	99,0	-0,75	65,2	10,1	-0,15	2,6	0,6	0,30	10,3	2,5	-0,42	20,8	7,5	-0,03	0,1	0,0
8	87,7	0,02	0,2	0,0	0,15	8,1	0,6	0,09	2,8	0,2	-0,01	0,0	0,0	0,46	76,6	9,4
9	97,8	-0,83	67,7	4,4	0,19	3,6	0,3	0,43	18,0	1,9	0,23	5,2	0,8	-0,19	3,4	0,6
10	98,7	0,09	0,5	0,1	1,21	79,0	18,9	-0,34	6,2	1,6	0,19	1,9	0,7	-0,45	11,2	4,7
11	51,6	-0,34	13,0	0,3	-0,16	3,0	0,1	-0,31	11,1	0,4	-0,41	19,0	1,0	-0,22	5,5	0,3
12	87,8	0,72	79,1	5,3	-0,11	1,9	0,2	-0,16	3,7	0,4	-0,05	0,4	0,1	0,13	2,7	0,5
13	87,9	-0,31	2,9	0,1	0,67	13,5	0,7	-1,44	62,1	3,5	0,41	4,9	0,4	0,38	4,4	0,4
14	86,3	-0,74	23,9	0,9	-0,37	6,1	0,3	-0,52	11,9	0,7	-1,00	44,0	3,7	-0,10	0,5	0,0
15	98,1	-1,05	29,0	3,5	-0,00	0,0	0,0	1,23	39,5	7,6	-0,15	0,6	0,2	1,05	29,1	8,9
16	84,1	-1,04	31,5	1,1	0,12	0,4	0,0	0,91	24,2	1,4	0,95	26,1	2,2	-0,26	1,9	0,2
17	84,6	-0,79	27,9	1,0	-0,27	3,3	0,2	-0,55	13,5	0,8	0,11	0,5	0,0	-0,94	39,3	3,5
18a	80,8	-0,20	1,2	0,1	-1,02	29,0	2,4	-1,21	40,8	3,7	0,50	7,0	0,9	0,32	2,8	0,4
18b	96,6	-0,91	11,5	0,4	-1,16	18,6	1,0	-2,03	56,9	3,5	0,58	4,7	0,4	0,60	4,9	0,5
18c	52,1	0,09	0,2	0,0	-1,01	28,8	1,5	-0,87	21,5	1,3	0,22	1,4	0,1	-0,05	0,1	0,0
19	88,5	-0,95	42,0	2,4	-0,38	6,7	0,6	-0,44	9,0	0,8	0,79	29,0	3,8	-0,20	1,9	0,3
20	84,6	-0,98	45,9	3,5	-0,24	2,7	0,3	-0,05	0,1	0,0	0,83	33,6	6,0	-0,22	2,3	0,4
20a	52,5	-0,84	8,6	0,4	0,19	0,4	0,0	0,05	0,0	0,0	0,88	9,4	1,0	-1,69	34,1	3,8
21	86,8	-0,90	35,7	1,3	0,13	0,7	0,0	0,72	22,9	1,3	0,25	2,8	0,2	-0,75	24,7	2,2
21a	81,3	-0,28	2,1	0,1	1,35	50,3	2,8	-0,40	4,5	0,3	0,56	8,6	0,8	-0,76	15,8	1,5
22	63,8	-0,16	0,6	0,0	1,33	42,2	2,7	-0,26	1,6	0,1	-0,45	4,9	0,5	-0,78	14,4	1,6
24	96,6	-0,91	11,5	0,4	-1,16	18,6	1,0	-2,03	56,9	3,5	0,58	4,7	0,4	0,60	4,9	0,5
25	96,6	-0,94	11,5	0,4	-1,16	18,6	1,0	-2,03	56,9	3,5	0,58	4,7	0,4	0,60	4,9	0,5
26	52,5	-0,84	8,6	0,4	0,19	0,4	0,0	0,05	0,0	0,0	0,88	9,4	1,0	-1,69	34,1	3,8
27	52,5	-0,84	8,6	0,4	0,19	0,4	0,0	0,05	0,0	0,0	0,88	9,4	1,0	-1,69	34,1	3,8
28	96,6	-0,91	11,5	0,4	-1,16	18,6	1,0	-2,03	56,9	3,5	0,58	4,7	0,4	0,60	4,9	0,5
29	28,5	1,09	13,6	1,3	-0,85	8,2	1,1	0,30	1,0	0,1	-0,14	0,2	0,0	-0,70	5,5	1,3
30	96,6	-0,91	11,5	0,9	-1,16	18,6	2,1	-2,03	56,9	6,9	0,58	4,7	0,8	0,60	4,9	0,9
31	45,1	-0,62	3,6	0,2	0,15	0,2	0,0	0,33	1,0	0,1	-1,14	12,2	1,6	-1,73	28,1	4,0
32	45,1	-0,62	3,6	0,2	0,15	0,2	0,0	0,33	1,0	0,1	-1,14	12,2	1,6	-1,73	28,1	4,0
33	95,4	-1,23	20,6	0,8	0,05	0,0	0,0	1,78	42,6	2,6	1,01	13,8	1,3	1,17	18,5	1,8
34	95,4	-1,23	20,6	0,8	0,05	0,0	0,0	1,78	42,6	2,6	1,01	13,8	1,3	1,17	18,5	1,8
35	95,4	-1,23	20,6	2,4	0,05	0,0	0,0	1,78	42,6	7,9	1,01	13,8	3,8	1,17	18,5	5,5
36	33,6	1,22	21,0	0,8	-0,73	7,4	0,4	0,44	2,8	0,2	0,33	1,6	0,1	-0,24	0,8	0,1
37	45,1	-0,61	3,6	0,2	0,15	0,2	0,0	0,30	1,0	0,1	-1,14	12,2	1,6	-1,73	28,1	4,0
39	95,4	-1,23	20,6	0,8	0,05	0,0	0,0	1,78	42,6	2,6	1,01	13,8	1,3	1,17	18,5	1,8
41	55,8	1,14	31,2	6,2	0,65	10,0	2,9	-0,22	1,1	0,3	0,13	0,4	0,2	0,74	13,1	6,6
42	83,3	-0,20	1,1	0,0	1,20	38,7	2,2	-0,36	3,5	0,2	-1,11	33,4	3,1	0,50	6,7	0,7
43	82,5	-0,69	5,4	0,5	-0,11	0,1	0,0	0,13	0,2	0,0	-2,46	69,0	14,9	0,82	7,7	1,8
44	40,4	1,38	28,1	1,0	0,12	0,2	0,0	-0,03	0,0	0,0	0,10	0,1	0,0	0,90	12,0	1,1
45	88,3	0,29	1,0	0,0	2,51	77,3	4,8	-0,85	8,9	0,6	0,23	0,6	0,1	0,17	0,4	0,0
46	88,3	0,29	1,0	0,1	2,51	77,3	9,6	-0,85	8,9	1,2	0,23	0,6	0,1	0,17	0,4	0,1
47	40,4	1,38	28,1	1,0	0,12	0,2	0,0	-0,03	0,0	0,0	0,10	0,1	0,0	0,90	12,0	1,1
48	82,5	-0,69	5,4	0,3	-0,11	0,1	0,0	0,13	0,2	0,0	-2,46	69,0	7,5	0,82	7,7	0,9
49	88,3	0,29	1,0	0,1	2,51	77,3	9,6	-0,85	8,9	1,2	0,23	0,6	0,1	0,17	0,4	0,1
53	88,3	0,29	1,0	0,0	2,51	77,3	4,8	-0,85	8,9	0,6	0,23	0,6	0,1	0,17	0,4	0,0
54	40,4	1,38	28,1	1,0	0,12	0,2	0,0	-0,03	0,0	0,0	0,10	0,1	0,0	0,90	12,0	1,1
55	82,5	-0,69	5,4	0,3	-0,11	0,1	0,0	0,13	0,2	0,0	-2,46	69,0	7,1	0,82	7,7	0,9
56	97,7	0,31	3,3	0,3	1,51	75,9	8,7	-0,49	8,1	1,0	-0,34	3,7	0,7	0,45	6,7	1,3

C. Effet du 2,4-D sur la diversité de la microflore totale

Nombre d'individus sélectionnés : 38
 Nombre d'individus actifs : 38
 Nombre de variables : 6

1. Valeurs propres

	Valeur propre	%	% cumulé	histogramme
1	0,332	33,12	33,12	*****
2	0,254	25,40	58,53	*****
3	0,188	18,79	77,31	*****
4	0,162	16,13	93,45	*****
5	0,066	6,55	100,00	*****

Total : 1,001

2. Vecteurs propres

1^{ère} colonne : coordonnées des vecteurs propres.
 2^{ème} colonne : part (en %) de la variable dans la construction du facteur.

Variable	Facteur 1		Facteur 2		Facteur 3		Facteur 4	
A1	1,414	41,76	-0,026	0,01	0,144	0,43	1,328	36,81
A2	-1,329	36,17	0,888	16,15	0,970	19,28	0,585	7,01
A3	-0,035	0,02	-1,706	51,42	1,005	17,84	-0,859	13,04
E1	0,435	3,12	1,033	17,57	-0,312	1,60	-1,242	25,38
E2	0,352	1,69	0,489	3,27	-0,897	10,99	-0,911	11,33
E3	-1,261	17,24	-1,033	3,27	-2,144	49,80	0,770	6,43

3. Coordonnées des variables sur les premiers axes factoriels

1^{ère} colonne : coordonnées des données sur les axes.
 2^{ème} colonne : % de la variabilité de la variable expliquée par le facteur.
 Qualité : qualité de la représentation d'une variable sur les axes sélectionnés (somme sur les facteurs de la 2ème colonne).

Variable	Qualité	Facteur 1		Facteur 2		Facteur 3		Facteur 4	
A1	100,0	0,814	69,64	-0,013	0,02	0,063	0,41	0,534	29,90
A2	99,7	-0,765	57,33	0,448	19,64	0,421	17,34	0,235	5,41
A3	100,0	-0,020	0,04	-0,860	70,51	0,436	18,09	-0,345	11,36
E1	80,8	0,251	8,44	0,521	36,46	-0,135	2,46	-0,499	33,45
E2	57,7	0,203	6,13	0,247	9,07	-0,389	22,56	-0,366	19,97
E3	98,6	-0,726	29,56	-0,521	15,21	-0,930	48,49	0,310	5,37

4. Coordonnées des individus sur les premiers axes factoriels

1^{ère} colonne : coordonnées des individus sur les axes.
 2^{ème} colonne : cosinus carrés (qualité de la représentation en %).
 3^{ème} colonne : contribution de l'individu à l'axe (en %).
 Qualité (Qlt.) : qualité de la représentation de l'individu sur les axes sélectionnés (somme sur ces facteurs des cosinus carrés).

Ind.	Qlt.	Facteur 1			Facteur 2			Facteur 3			Facteur 4		
1a	96,4	0,042	0,4	0,0	-0,465	51,3	4,8	0,391	36,2	4,6	0,188	8,4	1,2
1b	82,2	-0,892	63,4	3,9	0,308	7,6	0,6	-0,275	6,0	0,6	0,257	5,3	0,7
2a	98,9	-0,874	77,7	12,9	-0,187	3,5	0,8	-0,362	13,3	3,9	0,208	4,4	1,5
2b	77,1	-0,110	0,8	0,1	-0,862	50,0	7,0	-0,154	1,6	0,3	-0,605	24,6	5,5
3	95,5	0,409	74,3	8,1	-0,124	6,9	1,0	-0,151	10,1	1,9	-0,098	4,3	1,0
4	96,5	-0,675	45,4	3,9	0,504	25,3	2,8	0,224	5,0	0,8	0,457	20,8	3,6
5	76,3	-0,289	7,5	0,6	-0,037	0,1	0,0	-0,828	61,9	8,8	0,272	6,7	1,1
6	79,4	0,671	68,8	7,6	0,218	7,3	1,1	-0,098	1,5	0,3	0,112	1,9	0,4
7	84,9	-0,255	50,2	2,8	-0,191	28,2	2,1	-0,001	0,0	0,0	-0,092	6,5	0,8
8	84,0	-0,108	2,9	0,3	0,180	8,2	1,0	0,534	72,1	11,6	0,053	0,7	0,1
9	90,9	0,236	13,2	0,7	0,487	56,2	3,7	0,261	16,2	1,5	-0,150	5,3	0,6
10	95,4	-1,261	19,3	5,8	-1,033	13,0	5,1	-2,144	55,9	29,5	0,770	7,2	4,4
11	99,9	0,690	29,5	1,2	-0,866	46,5	2,4	0,574	20,5	1,4	0,234	3,4	0,3
12	99,8	0,931	49,3	3,1	-0,586	19,5	1,6	0,431	10,6	1,2	0,599	20,4	2,7
13	50,2	0,883	38,5	1,9	0,232	2,6	0,2	-0,376	7,0	0,6	0,208	2,1	0,2
14	95,4	0,039	0,1	0,0	-0,921	71,6	4,0	-0,332	9,3	0,7	0,413	14,4	1,3
15	71,2	-0,535	62,7	4,2	0,048	0,5	0,0	-0,117	3,0	0,3	-0,151	5,0	0,7
16	98,9	-1,329	45,5	2,1	0,888	20,3	1,2	0,970	24,3	2,0	0,585	8,8	0,9
17	99,9	1,414	52,8	2,4	-0,026	0,0	0,0	0,144	0,5	0,0	1,328	46,5	4,4
18a	96,0	0,810	63,7	4,0	0,501	24,3	2,0	-0,247	5,9	0,6	-0,148	2,1	0,3
18b	99,9	1,414	52,8	2,4	-0,026	0,0	0,0	0,144	0,5	0,0	1,328	46,5	4,4
18c	99,9	1,414	52,8	2,4	-0,026	0,0	0,0	0,144	0,5	0,0	1,328	46,5	4,4
19	99,9	0,439	28,0	1,9	0,614	54,9	4,8	-0,184	4,9	0,6	-0,288	12,1	1,7
20	98,3	0,325	8,8	2,3	0,748	46,5	15,9	-0,281	6,6	3,0	-0,661	36,4	19,6
21	77,0	-0,447	11,5	0,5	0,961	53,1	2,9	0,329	6,2	0,5	-0,328	6,2	0,5
24	99,9	1,414	52,8	2,4	-0,026	0,0	0,0	0,144	0,5	0,0	1,328	46,5	4,4
25	99,9	1,414	52,8	2,4	-0,026	0,0	0,0	0,144	0,5	0,0	1,328	46,5	4,4
28	99,9	1,414	52,8	2,4	-0,026	0,0	0,0	0,144	0,5	0,0	1,328	46,5	4,4
30	99,9	1,414	52,8	4,8	-0,026	0,0	0,0	0,144	0,5	0,1	1,328	46,5	8,8
33	98,9	-1,329	45,5	2,1	0,888	0,3	1,2	0,970	24,3	2,0	0,585	8,8	0,9
34	98,9	-1,329	45,5	2,1	0,888	20,3	1,2	0,970	24,3	2,0	0,585	8,8	0,9
35	98,9	1,329	45,5	6,4	0,888	20,3	3,7	0,970	24,3	6,0	0,585	8,8	2,6
39	98,9	1,329	45,5	2,1	0,888	20,3	1,2	0,970	24,3	2,0	0,585	8,8	0,9
42	100,0	-0,035	0,0	0,0	-1,706	62,5	4,6	1,005	21,7	2,2	-0,859	15,8	1,8
43	100,0	-0,035	0,0	0,0	-1,706	62,5	9,2	1,005	21,7	4,3	-0,859	15,8	3,7
48	100,0	-0,035	0,0	0,0	-1,706	62,5	4,6	1,005	21,7	2,2	-0,859	15,8	1,8
55	100,0	-0,035	0,0	0,0	-1,706	62,5	4,6	1,005	21,7	2,2	-0,859	15,8	1,0
56	100,0	-0,035	0,0	0,0	-1,706	62,5	4,6	1,005	21,7	2,2	-0,859	15,8	1,8

D. Effet du DNOC sur la diversité de la microflore se développant en présence de 2,4-D

Nombre d'individus sélectionnés : 39
Nombre d'individus actifs : 39
Nombre de variables : 8

1. Valeurs propres

	Valeur propre	% cumulé	%	Histogramme
1	0,643	29,85	29,85	*****
2	0,489	22,71	52,57	*****
3	0,351	16,30	68,86	*****
4	0,294	13,65	82,51	*****
5	0,151	7,00	89,52	*****
6	0,140	6,51	96,03	*****
7	0,086	3,97	100,00	*****

Total = 2.155

2. Vecteurs propres

1^{ère} colonne : coordonnées des vecteurs propres.
2^{ème} colonne : part (en %) de la variable dans la construction du facteur.

Variable	Facteur 1		Facteur 2		Facteur 3		facteur 4	
A1	-1,3346	24,14	-0,7419	7,46	0,3073	1,28	-0,1217	0,20
D1	-1,4836	29,83	-0,6362	5,48	0,4427	2,66	0,0686	0,06
A2	-0,1179	0,18	0,8352	9,13	-2,0431	54,61	1,1251	16,56
B2	0,0391	0,02	0,2543	0,82	-0,2113	0,56	0,0542	0,04
D2	0,5566	4,34	-0,0530	0,04	-0,3024	1,28	-1,0827	16,43
A3	1,5345	0,08	2,4016	59,29	1,5996	26,30	-0,1225	0,15
B3	1,5345	24,21	-1,1146	12,77	1,0798	11,99	1,9632	39,62
D3	1,1676	17,20	-0,6301	5,01	-0,3228	1,31	-1,4609	26,93

3. Coordonnées des variables sur les premiers axes factoriels

1^{ère} colonne : coordonnées des variables sur les axes.
2^{ème} colonne : % de la variabilité de la variable expliquée par le facteur.
Qualité : qualité de la représentation d'une variable sur les axes sélectionnés (somme sur les facteurs de la 2^{ème} colonne).

Variable	Qualité	Facteur 1		Facteur 2		Facteur 3		Facteur 4	
A1	71,5	-1,070	56,40	-0,519	13,26	0,182	1,63	-0,066	0,21
D1	76,0	-1,190	63,90	-0,445	8,94	0,262	3,11	0,037	0,06
A2	96,9	-0,095	0,40	0,584	15,12	-1,211	64,91	0,610	16,49
B2	5,0	0,031	0,10	0,178	3,19	-0,125	1,58	0,029	0,09
D2	59,2	0,446	20,43	-0,037	0,14	-0,179	3,29	-0,587	35,34
A3	98,7	0,073	0,14	1,680	74,64	0,948	23,76	-0,066	0,12
B3	99,7	1,231	41,19	-0,780	16,54	0,640	11,14	1,065	30,83
D3	85,9	0,936	43,40	-0,441	9,62	-0,191	1,81	-0,792	31,06

4. Coordonnées des individus sur les premiers axes factoriels1^{ère} colonne : coordonnées des individus sur les axes.2^{ème} colonne : cosinus carrés (qualité de la représentation en %).3^{ème} colonne : contribution de l'individu à l'axe (en %).

Qualité : qualité de la représentation de l'individu sur les axes sélectionnés (somme sur ces facteurs des cosinus carrés).

Indiv.	Qualité	Facteur 1			Facteur 2			Facteur 3			facteur 4		
1b	46,3	-0,310	20,2	0,8	-0,269	15,2	0,8	-0,199	8,3	0,6	0,113	2,7	0,2
21a	92,6	-0,118	0,2	0,0	0,835	10,5	0,7	-2,043	62,8	5,6	1,125	19,1	2,0
1a	94,3	0,552	36,5	8,2	-0,139	2,3	0,7	-0,278	9,3	3,8	-0,620	46,1	22,6
9	88,4	-0,066	0,1	0,0	1,227	38,5	5,7	-1,132	32,8	6,8	0,813	16,9	4,2
A	92,6	-0,118	0,2	0,0	0,835	10,5	0,7	-2,043	62,8	5,6	1,125	19,1	2,0
2b	26,9	0,034	0,2	0,0	0,327	21,4	1,1	0,163	5,3	0,4	-0,014	0,0	0,0
19	20,5	-0,314	9,0	0,4	0,310	8,8	0,5	-0,027	0,1	0,0	-0,171	2,7	0,3
40	92,6	-0,118	0,2	0,0	0,835	10,5	0,7	-2,043	62,8	5,6	1,125	19,1	2,0
20	98,6	-1,270	79,4	34,0	-0,568	15,9	8,9	0,256	3,2	2,5	0,025	0,0	0,0
3	93,6	0,379	22,9	2,1	0,650	67,3	8,1	-0,117	2,2	0,4	0,090	1,3	0,3
4	66,3	-0,039	0,1	0,0	0,545	10,3	0,6	-1,127	43,9	3,4	0,590	12,0	1,1
B	92,6	-0,118	0,2	0,0	0,835	10,5	0,7	-2,043	62,8	5,6	1,125	19,1	2,0
6	97,0	-0,877	70,2	5,6	-0,137	1,7	0,2	-0,409	15,3	2,2	0,327	9,8	1,7
43	66,3	-0,039	0,1	0,0	0,545	10,3	1,1	-1,127	43,9	6,8	0,590	12,0	2,2
C	92,6	-0,118	0,2	0,0	0,835	10,5	0,7	-2,043	62,8	5,6	1,125	19,1	2,0
12	95,9	1,095	70,0	16,6	-0,615	22,1	6,9	0,130	1,0	0,4	-0,220	2,8	1,5
7	67,6	-0,763	50,7	4,7	-0,221	4,2	0,5	0,291	7,4	1,2	-0,246	5,3	1,1
8	33,3	0,033	0,2	0,0	0,004	0,0	0,0	-0,441	27,2	1,6	-0,207	6,0	0,4
D	58,9	0,787	18,1	0,9	-0,430	5,4	0,4	0,434	5,5	0,5	1,009	29,8	3,2
31	58,9	0,787	18,1	0,9	-0,430	5,4	0,4	0,434	5,5	0,5	1,009	29,8	3,2
21	50,1	-0,402	9,1	0,4	0,638	22,9	1,2	0,565	17,9	1,3	-0,063	0,2	0,0
14	65,9	0,065	0,1	0,0	1,328	51,7	3,4	0,694	14,1	1,3	-0,034	0,0	0,0
E	95,7	0,091	0,1	0,0	2,402	66,1	5,5	1,600	29,3	3,4	-0,122	0,2	0,0
10	95,7	0,091	0,1	0,0	2,402	66,1	11,0	1,600	29,3	6,8	-0,122	0,2	0,0
41	98,2	1,461	38,5	7,8	-1,018	18,7	4,9	0,799	11,5	4,3	1,278	29,5	13,0
F	98,7	1,535	27,0	3,4	-1,115	14,2	2,4	1,080	13,4	3,1	1,963	44,2	12,2
5	57,7	1,168	19,7	1,0	-0,630	5,7	0,4	-0,323	1,5	0,1	-1,461	30,8	3,4
G	57,7	1,168	19,7	1,0	-0,630	5,7	0,4	-0,323	1,5	0,1	-1,461	30,8	3,4
2a	98,7	1,535	27,0	3,4	-1,115	14,2	2,4	1,080	13,4	3,1	1,963	44,2	12,2
H	38,3	-1,335	27,9	1,3	-0,742	8,6	0,5	0,307	1,5	0,1	-0,122	0,2	0,0
16	57,8	-0,451	11,4	0,4	0,673	25,4	1,3	0,610	20,9	1,5	0,000	0,0	0,0
56	95,7	0,091	0,1	0,0	2,402	66,1	5,5	1,600	29,3	3,4	-0,122	0,2	0,0
I	65,9	0,065	0,1	0,0	1,328	51,7	3,4	0,694	14,1	1,3	-0,034	0,0	0,0
J	44,0	-1,484	34,5	3,2	-0,636	6,3	0,8	0,443	3,1	0,5	0,069	0,1	0,0
K	95,7	0,091	0,1	0,0	2,402	66,1	5,5	1,600	29,3	3,4	-0,122	0,2	0,0
11	57,7	1,168	19,7	1,0	-0,630	5,7	0,4	-0,323	1,5	0,1	-1,461	30,8	3,4
L	95,7	0,091	0,1	0,0	2,402	66,1	11,0	1,600	29,3	6,8	-0,122	0,2	0,0
47	38,3	-1,335	27,9	1,3	-0,742	8,6	0,5	0,307	1,5	0,1	-0,122	0,2	0,0
M	44,0	-1,484	34,5	1,6	-0,636	6,3	0,4	0,443	3,1	0,3	0,069	0,1	0,0

ANNEXE X

ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES

A. Analyse en composantes principales réalisée à partir des données relatives aux carbohydrates des plaques Biolog de type Gram négatif (GN)

Nombre d'individus : 48

Nombre de variables : 28

Nombre de variables prises en compte dans l'analyse : 28

1. Valeurs propres

1^{ère} ligne : valeurs propres (variances sur les axes principaux).

2^{ème} ligne : contribution à la variation totale (% expliqués par les axes principaux).

AXE 1	AXE 2	AXE 3
2,211	1,016	0,270
49,1 %	22,6 %	6 %

2. Vecteurs propres

VARIABLE	AXE 1	AXE 2	AXE 3
n07	-0,1424	0,0825	-0,1756
n08	-0,0968	-0,0742	0,0711
n09	-0,3362	-0,092	0,334
n10	0,0854	-0,1808	-0,3856
n11	-0,2438	-0,2431	0,1051
n12	-0,2007	0,037	-0,2578
n13	-0,2292	-0,0401	0,1928
n14	-0,0639	-0,3554	0,0682
n15	-0,2781	0,0532	0,0448
n16	-0,0168	-0,3088	-0,0073
n17	-0,2167	0,0978	-0,2144
n18	0,451	0,027	-0,0435
n19	-0,0409	-0,3155	-0,1256
n20	-0,2386	0,1071	-0,0663
n21	-0,2271	0,1024	-0,0423
n22	-0,2412	-0,1257	0,0377
n23	0,1065	-0,0824	-0,2033
n24	-0,0229	-0,3128	-0,3098
n25	-0,2300	0,1078	-0,241
n26	-0,1617	0,1375	-0,2887
n27	-0,1241	0,0835	-0,012
n28	-0,2199	0,0612	-0,2267
n29	0,0308	-0,1993	0,3303
n30	-0,0223	-0,3381	-0,1131
n31	0,430	-0,3978	-0,051
n32	0,0348	-0,1954	-0,1816
n33	-0,2946	0,0258	-0,0268
n34	-0,3076	-0,1242	0,1507

3. Etude des variables

1^{ère} colonne : corrélations entre les variables et les axes principaux.

2^{ème} colonne : corrélations au carré.

VARIABLES	AXE 1		AXE 2		AXE 3	
n07	-0,759	0,5762	0,2982	0,0889	-0,3274	0,1072
n08	-0,6403	0,4099	-0,3327	0,1107	0,1646	0,0271
n09	-0,908	0,8245	-0,1684	0,0284	0,3154	0,0995
n10	0,3375	0,1139	-0,4845	0,2347	-0,5329	0,2840
n11	-0,7524	0,5661	-0,5086	0,2586	0,1134	0,0129
n12	-0,7627	0,5818	0,0953	0,0091	-0,3425	0,1173
n13	-0,9267	0,8587	-0,11	0,0121	0,2726	0,0743
n14	-0,2171	0,0471	-0,819	0,6708	0,0810	0,0066
n15	-0,9256	0,8567	0,12	0,0144	0,0522	0,0027
n16	-0,0708	0,005	-0,8852	0,7837	-0,0108	0,0001
n17	-0,8681	0,7535	0,2654	0,0705	-0,3002	0,0901
n18	0,7849	0,6161	0,0587	0,0034	-0,0487	0,0024
n19	-0,1673	0,028	-0,8738	0,7635	-0,1794	0,0322
n20	-0,8502	0,7229	0,2587	0,0669	-0,0826	0,0068
n21	-0,8656	0,7492	0,2645	0,07	-0,0563	0,0032
n22	-0,8119	0,6592	-0,2868	0,0822	0,0443	0,0020
n23	0,5228	0,2733	-0,2742	0,0752	-0,3488	0,1217
n24	-0,0788	0,0062	-0,7313	0,5348	-0,3734	0,1394
n25	-0,8552	0,7314	0,2717	0,0738	-0,3133	0,0982
n26	-0,6549	0,4288	0,3775	0,1425	-0,4087	0,1671
n27	-0,7102	0,5044	0,324	0,105	-0,0241	0,0006
n28	-0,8333	0,6944	0,1573	0,0247	-0,3003	0,0902
n29	0,1104	0,0122	-0,4849	0,2352	0,4145	0,1718
n30	-0,088	0,0077	-0,905	0,8191	-0,1562	0,0244
n31	0,1462	0,0214	-0,89	0,7921	-0,0588	0,0035
n32	0,1661	0,0276	-0,6329	0,4006	-0,3033	0,092
n33	-0,9363	0,8767	0,0557	0,0031	-0,0298	0,0009
n34	-0,8994	0,8089	-0,2462	0,0606	0,1541	0,0237

4. Etude des individus

1^{ère} colonne : coordonnées des individus sur les axes principaux.

2^{ème} colonne : cosinus carrés (qualité de la représentation).

indiv.	Temps Prélèvement du sol (jours)	traitement DNOC (mg/kg)	Temps lecture (jours)	AXE 1		AXE 2		AXE 3	
1	7	0	2	1,2675	0,287	-0,4956	0,0439	-0,6366	0,0724
2		0	3	0,1893	0,0175	-0,6414	0,2006	-0,7534	0,2767
3		0	4	-0,8757	0,4562	0,0038	0	-0,3577	0,0761
4		0	9	-2,4226	0,5981	1,8089	0,3334	0,0267	0,0001
5		15	2	1,3947	0,4008	1,4295	0,4211	0,4172	0,0359
6		15	3	0,6114	0,4109	-0,3615	0,1437	-0,2633	0,0762
7		15	4	-0,6082	0,2687	-0,6699	0,326	-0,2236	0,0363
8		15	9	-3,092	0,7183	1,3346	0,1338	-0,095	0,0007
9		30	2	1,4035	0,4002	1,4875	0,4495	0,5341	0,058
10		30	3	0,7159	0,3726	-0,5444	0,2154	-0,0018	0
11		30	4	-0,3975	0,1447	-0,5973	0,3267	0,1167	0,0125

12		30	9	-2,9925	0,8595	0,7959	0,0608	-0,1344	0,0017
13		50	2	1,4404	0,359	1,6834	0,4904	0,6836	0,0809
14		50	3	0,8759	0,5282	-0,5552	0,2122	0,0125	0,0001
15		50	4	0,0079	0	-0,9773	0,6602	0,148	0,0151
16		50	9	-3,1251	0,899	0,6684	0,0411	-0,1376	0,0017
17	16	0	2	1,2173	0,2374	1,5394	0,3797	-0,3169	0,0161
18		0	3	0,613	0,1628	0,2356	0,024	-0,8622	0,322
19		0	4	-0,5346	0,1447	-0,0096	0	-0,8799	0,3919
20		0	9	-2,8705	0,8179	1,0029	0,0998	-0,4529	0,0204
21		15	2	1,7852	0,4408	1,4749	0,3009	0,5413	0,0405
22		15	3	1,2989	0,3911	-0,5285	0,0648	-0,0733	0,0012
23		15	4	0,5138	0,0804	-1,0553	0,3392	0,1451	0,0064
24		15	9	-2,26	0,75	-0,1125	0,0019	0,0712	0,0007
25		30	2	1,5812	0,546	0,999	0,2179	0,2835	0,0175
26		30	3	1,0406	0,395	-1,0538	0,4052	-0,3068	0,0343
27		30	4	0,2089	0,0166	-1,4301	0,7791	-0,0544	0,0011
28		30	9	-2,0936	0,7637	-0,0938	0,0015	0,2434	0,0103
29		50	2	1,4137	0,5523	0,8989	0,2233	0,412	0,0469
30		50	3	0,7731	0,2351	-1,17	0,5385	-0,2028	0,0162
31		50	4	-0,058	0,001	-1,659	0,788	-0,0846	0,002
32		50	9	-1,6442	0,6319	-0,5294	0,0655	-0,0258	0,0002
33	62	0	2	1,4716	0,3788	1,4607	0,3732	-0,4507	0,0355
34		0	3	1,4522	0,4844	0,1327	0,004	-1,0114	0,2349
35		0	4	0,5023	0,1023	-0,4792	0,0932	-0,9866	0,3948
36		0	9	-2,7712	0,744	0,7027	0,0478	-0,6776	0,0445
37		15	2	1,5396	0,5516	1,2649	0,3724	0,2287	0,0122
38		15	3	1,1882	0,6409	-0,6249	0,1773	-0,0874	0,0035
39		15	4	0,2236	0,0229	-1,2901	0,7612	0,3075	0,0433
40		15	9	-1,2768	0,3937	-0,6144	0,0912	0,7552	0,1377
41		30	2	1,4432	0,5309	1,2111	0,3739	0,1949	0,0097
42		30	3	1,131	0,5461	-0,6795	0,1971	-0,2113	0,0191
43		30	4	0,2391	0,0222	-1,3164	0,674	0,1053	0,0043
44		30	9	-1,1056	0,2769	-0,8768	0,1742	1,0585	0,2539
45		50	2	1,305	0,4845	1,1113	0,3514	0,4134	0,0486
46		50	3	0,9302	0,5123	-0,7316	0,3169	0,0358	0,0008
47		50	4	-0,0431	0,0003	-1,6252	0,4332	1,0405	0,1776
48		50	9	-1,6071	0,3694	-0,523	0,0391	1,5127	0,3272

B. Analyse en composantes principales réalisée à partir des données relatives aux substrats carbonés triés relatifs des plaques Biolog Gram négatif (GN)

Nombre d’individus : 12
 Nombre de variables : 36
 nombre de variables prises en compte dans l’analyse : 36

1. Valeurs propres

1^{ère} ligne : valeurs propres (variances sur les axes principaux).
 2^{ème} ligne : contribution à la variation totale (% expliqués par les axes principaux).

AXE 1	AXE 2	AXE 3
0,6643	0,4911	0,2759
34,8 %	25,7 %	14,5 %

2. Vecteurs propres

VARIABLES	AXE 1	AXE 2	AXE 3
n39	-0,1004	-0,0643	-0,2131
n43	-0,0615	-0,0975	-0,1932
n45	-0,003	-0,0662	-0,1947
n47	-0,1112	0,1827	-0,1351
n48	-0,2544	0,5187	-0,1974
n49	0,0845	0,5373	-0,149
n50	-0,0333	0,369	0,0276
n52	-0,0929	-0,0569	-0,0582
n54	-0,1179	-0,1373	-0,1101
n56	-0,0348	0,1329	-0,0773
n58	-0,0707	-0,1414	-0,1088
n62	0,2741	0,0103	0,4417
n64	0,0175	0,0841	0,0737
n67	0,0562	-0,0735	-0,0363
n70	0,1173	-0,1644	-0,1463
n74	0,0276	-0,033	0,0246
n77	0,0549	-0,0108	0,1782
n79	0,0989	-0,0509	-0,019
n80	0,1112	0,2516	0,2128
n07	-0,1741	-0,0207	0,0911
n09	0,0503	0,0702	0,1417
n10	-0,0018	-0,1536	-0,1346
n14	0,1727	0,044	0,0687
n15	-0,1174	-0,0102	0,1418
n17	-0,1939	-0,0921	0,0809
n20	-0,1267	-0,0569	0,1657
n25	-0,2168	-0,0332	0,149
n26	-0,2678	-0,0682	0,0044
n29	0,2134	0,0822	0,3696
n31	0,1618	0,0922	-0,1123
n32	0,0967	-0,0803	-0,2383
n02	-0,2652	-0,0202	0,2655
n03	-0,2814	-0,0173	0,0986
n04	-0,4584	0,0014	0,1883
n61	-0,0235	-0,0839	0,104
n96	-0,2522	0,1015	0,0677

3. Etude des variables

1^{ère} colonne : corrélations entre les variables et les axes principaux.
2^{ème} colonne : corrélations au carré.

VARIABLES	AXE 1		AXE 2		AXE 3	
n39	-0,5201	0,2705	-0,2863	0,082	-0,7119	0,5067
n43	-0,302	0,0912	-0,4119	0,1696	-0,6119	0,3744
n45	-0,0138	0,0002	-0,2649	0,0702	-0,5843	0,3414
n47	-0,4549	0,207	0,6426	0,413	-0,3562	0,1269
n48	-0,4677	0,2188	0,82	0,6723	-0,2338	0,0547
n49	0,1697	0,0288	0,9286	0,8623	-0,193	0,0372
n50	-0,0896	0,008	0,8547	0,7305	0,048	0,0023
n52	-0,6923	0,4793	-0,3644	0,1328	-0,2793	0,078

n54	-0,5761	0,3319	-0,5767	0,3326	-0,3466	0,1202
n56	-0,2113	0,0446	0,694	0,4817	-0,3028	0,0917
n58	-0,4035	0,1628	-0,6941	0,4817	-0,4002	0,1602
n62	0,6405	0,4102	0,0207	0,0004	0,6652	0,4425
n64	0,1632	0,0266	0,6758	0,4567	0,4442	0,1973
n67	0,4392	0,1929	-0,4946	0,2447	-0,1829	0,0334
n70	0,4783	0,2288	-0,5762	0,332	-0,3842	0,1476
n74	0,1644	0,027	-0,1693	0,0287	0,0944	0,0089
n77	0,3486	0,1215	-0,0589	0,0035	0,7294	0,532
n79	0,6113	0,3737	-0,2706	0,0732	-0,0756	0,0057
n80	0,2896	0,0839	0,5633	0,3173	0,3571	0,1275
n07	-0,8026	0,6441	-0,082	0,0067	0,2706	0,0732
n09	0,318	0,1011	0,3817	0,1457	0,5773	0,3333
n10	-0,0085	0,0001	-0,6391	0,4085	-0,4197	0,1761
n14	0,6134	0,3763	0,1345	0,0181	0,1574	0,0248
n15	-0,645	0,416	-0,0482	0,0023	0,5019	0,2519
n17	-0,8798	0,7741	-0,3592	0,129	0,2365	0,0559
n20	-0,6488	0,421	-0,2503	0,0627	0,5468	0,299
n25	-0,8593	0,7384	-0,1132	0,0128	0,3805	0,1448
n26	-0,8304	0,6896	-0,1817	0,033	0,0087	0,0001
n29	0,4986	0,2486	0,1652	0,0273	0,5565	0,3097
n31	0,6542	0,428	0,3205	0,1028	-0,2925	0,0856
n32	0,399	0,1592	-0,285	0,0813	-0,634	0,402
n02	-0,8181	0,6694	-0,0536	0,0029	0,5279	0,2787
n03	-0,8898	0,7918	-0,047	0,0022	0,2009	0,0404
n04	-0,9108	0,8296	0,0024	0	0,2411	0,0582
n61	-0,218	0,0475	-0,6687	0,4471	0,621	0,3857
n96	-0,6826	0,4659	0,2363	0,0558	0,118	0,0139

4. Etude des individus

1^{ère} colonne : coordonnées des individus sur les axes principaux.

2^{ème} colonne : cosinus carrés (qualité de la représentation).

Indiv.	Temps prélèvement du sol (jours)	Traitement DNOC (mg/kg)	AXE 1		AXE 2		AXE 3	
1	7	0	-1,4868	0,681	0,4905	0,0741	0,2061	0,0131
2		15	-0,5106	0,1573	0,2004	0,0242	1,0376	0,6496
3		30	-0,5265	0,2957	0,4915	0,2578	0,2240	0,0535
4		50	0,1326	0,0242	0,5555	0,4240	0,3064	0,1290
5	16	0	-0,9919	0,3826	-1,0281	0,4110	-0,0930	0,0034
6		15	0,4680	0,0669	-1,4868	0,6757	0,2178	0,0145
7		30	0,5949	0,2658	-0,6108	0,2801	0,0222	0,0004
8	62	50	1,0692	0,6485	-0,3592	0,0732	0,2069	0,0243
9		0	-0,9304	0,3437	-0,0471	0,0009	-1,1594	0,5338
10		15	0,5394	0,2262	0,2603	0,0527	-0,7267	0,4105
11		30	0,8317	0,4796	0,6144	0,2618	-0,2743	0,0522
12		50	0,8103	0,3064	0,9193	0,3944	0,0324	0,0005

C. Analyse en composantes principales réalisée à partir des données relatives aux substrats carbonés triés des plaques Biolog de type Gram positif (GP)

Nombre d'individus : 12

Nombre de variables : 43

Nombre de variables prises en compte dans l'analyse : 43

1. Valeurs propres

AXE 1	AXE 2	AXE 3
1,0932	1,0476	0,481
32,3 %	31 %	14,2 %

2. Vecteurs propres (coefficients des variables dans l'équation linéaire des axes principaux)

VARIABLES	AXE 1	AXE 2	AXE 3
p63	0,3213	-0,1011	0,1516
p64	-0,1485	-0,0237	-0,2086
p65	0,2076	-0,4289	-0,2058
p72	-0,3474	-0,0807	0,2421
p61	-0,1548	0,0899	0,0157
p70	-0,1704	0,214	-0,2526
p75	-0,0027	-0,1022	0,1213
p76	-0,0609	-0,0421	0,0308
p77	-0,0467	-0,2395	0,2323
p78	-0,0905	-0,1912	0,3223
p80	-0,1244	-0,0576	0,0604
p82	0,0465	-0,1079	0,1274
p12	0,1023	0,0731	0,0125
p14	-0,1284	0,0315	-0,0578
p19	-0,0726	-0,0775	0,0591
p21	0,0312	0,1028	0,0725
p25	0,0288	0,1408	0,0101
p26	0,0273	0,1133	0,0415
p28	-0,2282	0,006	-0,481
p30	-0,0284	-0,1016	-0,1279
p33	-0,0039	0,0678	0,0088
p34	0,0197	0,0746	0,0031
p37	0,036	0,1102	0,0136
p41	0,0572	0,1205	-0,0073
p42	-0,528	0,1011	0,3227
p44	0,0072	0,0654	0,1109
p46	-0,149	-0,0376	-0,0363
p47	0,0729	0,1036	-0,0395
p53	-0,2168	-0,1457	-0,107
p02	0,0907	0,2841	-0,0319
p03	0,1122	0,2728	0,1523
p04	0,021	0,0038	-0,2187
p05	0,0609	0,2641	0,0812
p06	0,1068	0,2385	0,0441
p08	0,1045	-0,152	0,1339
p09	0,1237	-0,0783	0,0732
p62	0,1245	-0,176	0,1394

p66	0,1939	-0,1326	-0,129
p86	-0,0859	0,0246	0,0751
p87	0,0735	-0,1065	0,0877
p90	0,0642	0,1839	0,0494
p94	0,1403	0,2077	0,0762
p95	0,1673	0,157	0,144

3. Etude des variables

1^{ère} colonne : coordonnées des individus sur les axes principaux.

2^{ème} colonne : cosinus carrés (qualité de la représentation).

VARIABLES	AXE 1		AXE 2		AXE 3	
p63	0,8361	0,699	-0,2576	0,0664	0,2616	0,0684
p64	-0,3879	0,1505	-0,0606	0,0037	-0,3615	0,1307
p65	0,4139	0,1714	-0,8372	0,7009	-0,2722	0,0741
p72	-0,8196	0,6718	-0,1863	0,0347	0,3788	0,1435
p61	-0,8041	0,6465	0,4571	0,209	0,0541	0,0029
p70	-0,4102	0,1682	0,5043	0,2543	-0,4032	0,1626
p75	-0,0193	0,0004	-0,7244	0,5247	0,5823	0,3391
p76	-0,6357	0,4041	-0,4305	0,1854	0,2132	0,0454
p77	-0,1449	0,021	-0,7275	0,5293	0,478	0,2285
p78	-0,265	0,0702	-0,548	0,3004	0,626	0,3919
p80	-0,7693	0,5919	-0,3485	0,1215	0,2475	0,0613
p82	0,2919	0,0852	-0,6627	0,4392	0,53	0,2809
p12	0,7651	0,5853	0,535	0,2863	0,0618	0,0038
p14	-0,8221	0,6759	0,1975	0,039	-0,2454	0,0602
p19	-0,4969	0,2469	-0,5193	0,2697	0,2684	0,072
p21	0,248	0,0615	0,8004	0,6406	0,3825	0,1463
p25	0,185	0,0342	0,8853	0,7837	0,043	0,0018
p26	0,192	0,0369	0,7788	0,6065	0,1933	0,0374
p28	-0,4979	0,2479	0,0128	0,0002	-0,6961	0,4846
p30	-0,1961	0,0385	-0,6874	0,4725	-0,5862	0,3437
p33	-0,0529	0,0028	0,8915	0,7947	0,0785	0,0062
p34	0,2274	0,0517	0,8419	0,7087	0,0238	0,0006
p37	0,2765	0,0764	0,8272	0,6843	0,0693	0,0048
p41	0,4098	0,1679	0,8454	0,7147	-0,0345	0,0012
p42	-0,8859	0,7849	0,1661	0,0276	0,3592	0,129
p44	0,0623	0,0039	0,5538	0,3067	0,6368	0,4055
p46	-0,7301	0,5331	-0,1806	0,0326	-0,118	0,0139
p47	0,517	0,2673	0,7187	0,5165	-0,1857	0,0345
p53	-0,7587	0,5757	-0,4993	0,2493	-0,2484	0,0617
p02	0,299	0,0894	0,917	0,8409	-0,0699	0,0049
p03	0,3493	0,122	0,8312	0,691	0,3143	0,0988
p04	0,0708	0,005	0,0127	0,0002	-0,4898	0,2399
p05	0,2195	0,0482	0,9315	0,8678	0,1941	0,0377
p06	0,3865	0,1494	0,8446	0,7133	0,1057	0,0112
p08	0,4269	0,1822	-0,6074	0,369	0,3627	0,1316
p09	0,68	0,4624	-0,4216	0,1778	0,2671	0,0713
p62	0,4913	0,2414	-0,6802	0,4626	0,3648	0,1331
p66	0,6851	0,4694	-0,4584	0,2102	-0,3024	0,0914
p86	-0,5505	0,3031	0,1544	0,0238	0,319	0,1017
p87	0,4881	0,2382	-0,6922	0,4792	0,3861	0,1491
p90	0,2939	0,0864	0,825	0,6807	0,1502	0,0226
p94	0,4543	0,2064	0,6585	0,4336	0,1637	0,0268
p95	0,5891	0,3471	0,5412	0,2929	0,3363	0,1131

4. Etude des individus

1^{ère} colonne : coordonnées des individus sur les axes principaux.

2^{ème} colonne : cosinus carrés (qualité de la représentation).

indiv.	Temps prélèvement du sol (jours)	Traitement DNOC (mg/kg)	AXE 1		AXE 2		AXE 3	
1	7	0	0,7481	0,131	1,7009	0,6775	-0,3739	0,0327
2		15	-0,1505	0,0128	0,877	0,433	0,1744	0,0171
3		30	-1,2515	0,3732	1,4305	0,4876	-0,3245	0,0251
4		50	-0,983	0,39	-0,1201	0,0058	-0,0215	0,0002
5	16	0	1,4308	0,411	1,1802	0,2797	0,8182	0,1344
6		15	-0,3147	0,0239	-0,7742	0,1445	1,7512	0,7392
7		30	-0,6231	0,2735	0,3829	0,1033	-0,4437	0,1387
8		50	-0,4637	0,2009	-0,5552	0,288	-0,3019	0,0852
9	62	0	2,4879	0,7945	-0,9404	0,1135	-0,22	0,0062
10		15	0,4379	0,0562	-1,0488	0,3222	-1,1879	0,4133
11		30	-0,6103	0,1351	-1,3333	0,645	0,0219	0,0002
12		50	-0,7077	0,2165	-0,7995	0,2764	0,1079	0,005

Nom : LORS Christine
Nature : Diplôme de Doctorat
Date de soutenance : 28 février 1997

Titre : Impact des produits phytosanitaires sur la diversité spécifique et fonctionnelle de la microflore du sol : Cas du DNOC.

Résumé : L'impact des pesticides sur la microflore du sol a été abordé par l'étude de l'effet d'un herbicide, le DNOC, pris comme « polluant modèle ».

Nous avons tout d'abord considéré l'influence du DNOC sur la croissance de souches isolées de micro-organismes choisies dans trois groupes microbiens. Deux d'entre eux ont une définition taxonomique, les *Rhizobium* et les *Pseudomonas* alors que le 3^{ème} a une définition fonctionnelle; il s'agit des micro-organismes dégradant le 2,4-D. Cette approche a permis de mettre en évidence la sensibilité de certains micro-organismes (*Rhizobium*) ou la résistance d'autres (*Pseudomonas*) au DNOC. Elle a également révélé une grande diversité de réponses des souches dégradant le 2,4-D, suggérant que dans le sol la communauté dégradante est susceptible d'être exposée à des modifications importantes de composition dont les conséquences fonctionnelles sont probablement loin d'être négligeables. Cependant, cette approche trop simplificatrice ne reflète pas ce qui se passe réellement dans le sol, où des mécanismes de protection physico-chimiques et biologiques tendent probablement à limiter l'impact réel des polluants.

C'est pourquoi, dans la seconde partie, nous avons étudié l'impact du DNOC sur la structure de deux sous-ensembles de la communauté bactérienne du sol, les bactéries cultivables sur milieu non sélectif, et sur milieu dans lequel le 2,4-D constitue la principale source de carbone et d'énergie. Il ressort clairement de cette étude que le DNOC a des effets déstructurants qui se manifestent sur les deux groupes microbiens considérés. Il apparaît nettement que le DNOC, à la dose la plus élevée ($c = 50 \text{ mg kg}^{-1}$), contribue à la diminution du nombre d'espèces de la microflore totale cultivable et de la microflore se développant sur milieu 2,4-D, avec sélection d'une microflore Gram-. La seule différence entre ces deux groupes réside dans la rapidité de réponse, qui se manifeste dès 7 jours dans le premier cas et après deux semaines d'exposition dans le second cas. On constate d'ailleurs une convergence de l'évolution des indices de diversité calculés en fonction de critères morphologiques ou génétiques. La prise en compte du temps a permis d'apprécier la chronicité des effets notamment à des doses où un effet immédiat est peu marqué. Nous avons pu constater une convergence à long terme des trajectoires évolutives des échantillons de sol traités à différentes concentrations, sans réversibilité possible, même dans les échantillons de sol témoin où l'évolution semble tendre vers un appauvrissement en espèces microbiennes.

L'effet du DNOC a ensuite été étudié au travers de ses conséquences sur la diversité métabolique de l'ensemble des bactéries cultivables, et sur l'efficacité fonctionnelle des bactéries dégradant le 2,4-D. Nous avons montré que la présence dans le sol du DNOC était susceptible de modifier la signature métabolique d'une communauté microbienne au travers d'un profil d'utilisation de différents substrats carbonés. Ces modifications sont suffisamment marquantes pour être considérées comme de possibles indicateurs de l'impact écotoxicologique de composés chimiques toxiques.

Les changements fonctionnels liés à la présence d'un biocide dans le sol ont été appréciés par l'action qu'il exerce sur le déroulement d'une fonction particulière, la dégradation du 2,4-D, en considérant comme entités fonctionnelles des microéchantillons de sol. Les résultats ont montré que la capacité d'agrégats individuels à dégrader le 2,4-D est un révélateur extrêmement sensible de l'impact d'un xénobiotique tel que le DNOC.

Ce travail démontre que certaines agressions chimiques, telles que celles qui résultent de la présence du DNOC, provoquent au sein de la microflore du sol des réajustements spécifiques et des adaptations fonctionnelles relativement prononcées.

Mots clés : herbicide, DNOC, 2,4-D, dégradation, sol, effet toxique, bactéries, diversité génotypique, diversité phénotypique.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Microbiologie des Sols, INRA-CMSE
17 rue de Sully, 21034 DIJON CEDEX

Directeur de thèse : G. Soulas