

50376
1972
51

N° d'ordre 328

50376
1972
51

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE

présentée à

l'Université des Sciences et Techniques de Lille

pour obtenir

le grade de Docteur Troisième Cycle

par

Sega SOUMARE

CARACTERISTIQUES MICROBIOLOGIQUES DES SOLS

DE LA REGION DU NORD DE LA FRANCE :

PARTICULARITES DU SPECTRE BACTERIEN

Membres du Jury: MM. J. GUILLAUME, Président

R. BLONDEAU , Rapporteur

L. LACOSTE

A. TAQUET

| Examineurs



Soutenue le 29 Juin 1972

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, PEREZ, ROIG, ROSEAU ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. DEFRETIN René	Professeur de Biologie Marine Directeur de l'Institut de Biologie Maritime et Régionale de Wimereux
------------------	---

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CAPET Marcel-Francis	Institut de Préparation aux Affaires
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques Générales
M. DEFRETIN René	Biologie Marine
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-Electricité-Electronique
M. GEHU Jean-Marie	Institut Agricole
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. JOLY Robert	Biologie Animale (Amiens)
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTEUIL Jean	Chimie Biologique

PROFESSEURS TITULAIRES (suite)

M. POUZET Pierre	Informatique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. FLATRES Pierre	Géographie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARBEAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. PRUDHOMME Rémy	Droit et Sciences Economiques
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODART Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LACOSTE Louis	Biologie
M. LANDAIS Jean	Chimie
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Mle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I.E.E.A.
M. PROUVOST Jean	Minéralogie

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. AUBIN Thierry	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) (suite)

M. BOILLY Fénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	I.E.E.A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COULON Jean	I.E.E.A.
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DRIEUX Baudoin	I.E.E.A.
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
M. FONTAINE Jacques	Génie Electrique
M. FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD de la MARRE Pierre	I.E.E.A.
M. JOURNEL Gérard	Sciences Appliquées
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
M. LAVAGNE Pierre	Sciences Economiques et Sociales
Mlle LEGRAND Denise	Mathématiques
Mlle LEGRAND Solange	Mathématiques (Calais)
Me LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Jean-Marie	Chimie
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
Me MAILLET Monique	Sciences Economiques
M. MAIZIERES Christian	I.E.E.A.
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
M. MANBRINI Jean	Biologie
M. MERIAUX Emile	Sciences de la Terre
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
M. MUSSCHE Guy	Sciences Economiques
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. OLIVEREAU Jean-Michel	Biologie
M. OUZIAUX Roger	Technologie des Machines
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PERROT Pierre	Chimie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislav	Physique
Me RENVERSEZ Françoise	Sciences Economiques et Sociales
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SALMER Georges	Radio Electricité Electronique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) (suite)

M. SEGUIER Guy	Electronique
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
M ^{le} SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-René	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Chimie Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique
M. WATERLOT Michel	Géologie

A mes parents...

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille. Je voudrais tout d'abord exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur J. GUILLAUME qui m'a accueilli dans son Laboratoire. Son enseignement moderne et critique de la Bactériologie m'a donné le goût de cette discipline et je lui suis profondément reconnaissant.

Je tiens aussi à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur R. BLONDEAU qui, avec une patience sans limites, et une attention particulière, a constamment guidé ces travaux. Je lui dois de nombreux conseils et une aide précieuse pour l'élaboration du texte de cette thèse. Sa bienveillance à mon égard a toujours été une source d'encouragements.

Je voudrais également adresser mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur L. LACOSTE pour la bienveillance qu'il m'a toujours témoignée. Je lui suis profondément reconnaissant de m'avoir utilement ouvert les portes de son Laboratoire.

J'apprécie vivement l'honneur que me fait Monsieur le Professeur A. TACQUET, qui malgré ses multiples occupations, a bien voulu participer à ce Jury.

L'analyse factorielle des correspondances a été effectuée au Laboratoire d'Informatique de l'I.U.T. de Lille ; je remercie Monsieur le Professeur P. POUZET, Directeur, ainsi que Monsieur J. LOSFELD qui m'a initié aux méthodes de la taxonomie numérique, et dont la compétence m'a été très utile.

Enfin, mes remerciements vont aussi aux chercheurs et au personnel technique des Laboratoires de Microbiologie, de Cryptogamie, de Physiologie végétale, auprès de qui j'ai toujours trouvé un soutien amical et une atmosphère de travail qui ont contribué à faciliter ma tâche.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
<u>PREMIERE PARTIE :</u>	
MISE AU POINT D'UNE METHODE POUR L'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES SOLS.....	6
PRELEVEMENT ET PREPARATIONS DES ECHANTILLONS DE SOL	8
ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES	9
1 - Détermination du pH	9
2 - Détermination du taux d'humidité	9
3 - Teneur en azote total	9
4 - Teneur en carbone organique	10
5 - Teneur en matières humiques	10
ANALYSES MICROBIOLOGIQUES	12
I - PREPARATION DES SUSPENSIONS-DILUTIONS DE SOL	12
1 - La dilution au 1/10	12
2 - La dilution au 1/100	13
3 - Les autres dilutions	14
II - EVALUATIONS DES MICROFLORES	14
1 - Numération des microflores bactériennes..	14
2 - Numération des Actinomycètes	15
3 - Numération des champignons	16
III - ETUDE DES GROUPEMENTS FONCTIONNELS	17
1 - Principe général de la méthode	18
2 - Germes protéolytiques	20
3 - Germes ammonifiants	20
4 - Germes amylolytiques	21
IV - ANALYSE DU SPECTRE BACTERIEN	22
1 - Isolement des souches	23
2 - Critères d'identification	23
V - ETUDE DES GROUPEMENTS NUTRITIONNELS	28
1 - Principe	29
2 - Technique utilisée	30

DEUXIEME PARTIE :

RESULTAT DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DES SOLS DE LA REGION DU NORD DE LA FRANCE	33
A - CARACTERISTIQUES MICROBIOLOGIQUES DES SOLS EN FONCTION DE LEUR NATURE PEDOLOGIQUE ET DE LA PRESENCE DES CULTURES	35
1 - Analyses physico-chimiques	37
2 - Etude des populations microbiennes et fongiques	38
3 - Etude des groupements fonctionnels	38
4 - Etude du spectre bactérien	41
5 - Etude des types nutritionnels	44
B - EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES MICROBIOLOGIQUES D'UNE TERRE EN FONCTION DE LA CROISSANCE DES PLANTES	49
1 - Analyses physico-chimiques	51
2 - Etude des microflores totales	51
3 - Etude des groupements fonctionnels	54
4 - Etude du spectre bactérien	56
5 - Etude des exigences nutritionnelles	56
C - DISCUSSIONS ET CONCLUSION	62

TROISIEME PARTIE :

APPLICATION DE LA TAXONOMIE NUMERIQUE A L'ETUDE DU SPECTRE BACTERIEN D'UNE TERRE	66
I - MATERIELS ET TECHNIQUES	69
1 - Choix de la microflore expérimentale	69
2 - Choix des tests pour la caractérisation des souches en analyse factorielle.....	71
3 - Principe de l'analyse factorielle des correspondances	76
a) Distance entre deux individus	77
b) Construction d'un nuage de points	77
c) Projection du nuage de points	78
d) Représentation simultanée	79

II - RESULTATS	80
1 - Réponses des souches en fonction des tests employés	80
2 - Résultats donnés par l'analyse factorielle	80
a) Groupements des souches en fonction de l'analyse factorielle	82
b) Résultats donnés par l'analyse des correspondances	88
3 - Comparaisons entre les résultats donnés par l'analyse factorielle et ceux obtenus à l'aide de notre méthode	91
III - DISCUSSIONS ET CONCLUSION	94
CONCLUSION GENERALE	96
RESUME.....	100
BIBLIOGRAPHIE.....	101

Si de nombreux chercheurs se sont penchés sur l'étude de la microflore "totale" des sols, c'est-à-dire sur les populations bactériennes et fongiques prises dans leur ensemble, ou sur l'analyse de leur activité globale, très peu de travaux se rapportent à l'étude systématique des principaux types de bactéries que l'on peut y rencontrer. Or, lors d'une expérimentation antérieure que nous avons effectuée à propos des modifications apportées à la microflore tellurique par les excréments racinaires des plantes, nous avons constaté la proportion particulièrement élevée des bactéries corynéformes du genre Arthrobacter. Etant donné que l'importance numérique de ces germes n'a pratiquement jamais été signalée, tout au moins pour les sols français, nous avons entrepris le présent travail dans le but essentiel de mettre en évidence les principaux groupements bactériens des microflores telluriques des terres de la région du Nord de la France.

Après avoir mis au point une méthodologie adaptée tout particulièrement à l'étude du "spectre bactérien" des sols, nous avons effectué ces analyses en apportant deux variantes à notre expérimentation : l'une étant fonction du site pédologique des prélèvements, l'autre de la présence d'une culture végétale. Parallèlement, nous avons suivi l'évolution de la microflore d'une "terre expérimentale" en fonction de deux espèces végétales et de l'âge des plantes.

Enfin, en appliquant une méthode d'analyse numérique à l'étude du spectre microbien d'un échantillon type de sol, nous avons essayé d'apporter quelques précisions supplémentaires sur la signification taxonomique des principaux genres bactériens présents dans ces microflores telluriques.

Le travail préliminaire qui nous a conduit à entreprendre cette analyse microbiologique de divers sols découle de certaines observations relatives aux caractéristiques microbiennes de la rhizosphère des plantules de colza, dont la richesse en germes corynéformes nous a paru surprenante (BLONDEAU, 1970). Désirant connaître l'étendue de ce phénomène, nous avons ainsi étudié la microflore rhizosphérique de quelques plantules choisies parmi les familles végétales très diverses. Cette analyse nous a conduit aux résultats suivants que nous allons brièvement rappeler.

L'expérience a été pratiquée en deux temps. Dans un premier temps, nous avons placé les graines en germination stérile, soit dans des tubes contenant du sable comme substrat, soit dans des tubes en culture hydroponique, afin de recueillir, après développement des plantules, leurs excréments racinaires. Dans un deuxième temps, une terre dite "expérimentale" choisie en fonction de l'étude envisager, a été imbibée par ces excréments et incubée pendant un certain temps. Quatre types de graines étaient choisies, une Crucifère : le colza, une Linée : le lin, une Papilionacée : le trèfle et une Graminée : le blé. La terre expérimentale avait été prélevée à partir d'un champ "inculte", c'est-à-dire n'ayant pas reçu de culture depuis un certain nombre d'années.

Après incubation de cette terre en présence de ces divers excréments racinaires, l'analyse du spectre bactérien nous a ainsi donné les résultats représentés dans le tableau ci-après.

Origine des excrétions racinaires	Type de culture	Total des souches isolées	Ar	Sp	Ps	b-	b+	Divers
Eau	-	50	15	14	5	4	5	7
Colza	sable	50	37	2	3	2	2	4
	hydroponique	50	39	3	2	1	0	5
Lin	sable	50	30	3	4	4	1	8
	hydroponique	50	33	3	3	3	2	6
Trèfle	sable	50	38	0	6	1	1	4
	hydroponique	50	36	0	7	5	0	2
Blé	sable	50	43	0	3	0	1	3
	hydroponique	50	39	0	3	2	1	5

Répartition des groupements bactériens dans la terre "expérimentale" incubée en présence d'eau (témoin), ou en présence des excrétions racinaires de diverses plantules.

Ce tableau indique les proportions respectives d'Arthrobacter (Ar), de Pseudomonas (Ps), de germes sporulés (Sp), colonisant la terre expérimentale, ainsi que le nombre de bâtonnets à gram négatif mais différents des Pseudomonas (b-), le nombre de bâtonnets à gram positif, mais ne représentant pas de spores (b+) et enfin, le nombre de bactéries non classées, qui sont surtout des cocci, des formes particulières, ou des germes à gram indéterminé.

Ces résultats prouvent que, quelle que soit la nature des exudats racinaires (colza, lin trèfle, blé) la même évolution du spectre bactérien est retrouvée, c'est-à-dire une stimulation des Arthrobacter, ainsi d'ailleurs qu'une inhibition des germes sporulés

Une expérience complémentaire a ensuite été effectuée afin de prouver que cette stimulation des germes corynéformes n'était pas imputable à la présence des sels minéraux provenant du milieu de culture des plantules et pouvant modifier ainsi la composition chimique des excréments racinaires utilisés. Cette expérience, qui a consisté à cultiver les graines en milieu hydroponique non nutritif, a donné des résultats identiques point par point aux précédents.

La stimulation des bactéries du genre Arthrobacter, observée dans la rhizosphère des plantules de colza, ne dépend donc pas de la nature de l'exudat racinaire, mais peut être généralisée à toutes les rhizosphères. Or ce sont les bactéries du genre Pseudomonas qui sont considérées habituellement comme typiquement rhizosphériques. D'autre part, certains travaux ont tendance à mettre en évidence l'existence d'une relation spécifique entre la nature végétale des rhizosphères et leur spectre bactérien, spécificité qui est absente dans nos résultats, malgré les nombreuses variantes apportées à nos conditions expérimentales.

Ainsi, nous avons pensé que le principal facteur qui conditionnait nos résultats était le spectre initial de la microflore tellurique employée, puisque nos analyses ont toujours été effectuées à partir d'une seule terre prélevée dans la région lilloise. La présence dans cette microflore, d'un groupement bactérien dominant tel que les Arthrobacter, peut en effet, expliquer la nature particulière de la microflore rhizosphérique, ainsi que l'absence, tout au moins apparente, de toute spécificité vis-à-vis de l'espèce végétale expérimentée.

Afin de nous rendre compte de l'importance relative de ces Arthrobacter au sein de la microflore tellurique des terres de notre région, nous avons ainsi entrepris d'effectuer une analyse systématique du spectre bactérien de sols de nature pédologique très variée. Par la même occasion, nous avons essayé de donner une valeur plus écologique à nos résultats en étudiant parallèlement des échantillons provenant de terres incultes et de terres cultivées.

1^e PARTIE

MISE AU POINT D'UNE METHODE

POUR L'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

DES SOLS

En raison de l'absence d'une méthodologie propre à l'étude que nous avons envisagée, axée plus particulièrement sur la recherche de certains germes, dont les Arthrobacter, les Bacillus et les Pseudomonas dans les sols, ainsi que sur les exigences nutritionnelles de leur microflore bactérienne, notre travail a d'abord consisté à mettre au point une technique d'analyse microbiologique de ces terres. Dans la première partie de cet ouvrage, nous allons donc décrire la méthode que nous avons utilisée, méthode qui comporte successivement les analyses suivantes

1) Après prélèvement, chaque échantillon de sol est d'abord soumis à certaines analyses physico-chimiques classiques : la détermination du pH, du taux d'humidité, du taux d'azote total, de carbone organique, et de matières humiques.

2) Le nombre de bactéries, d'Actinomycètes et de champignons est ensuite évalué par ensemencement sur milieux nutritifs gélosés, de volumes connus de certaines suspensions-dilutions, préparées à partir des terres.

3) Ces suspensions-dilutions sont utilisées également pour l'analyse de certains "groupements physiologiques" : la protéolyse, l'ammonification, l'amylolyse et leur activité est précisée par le calcul d'un "indice d'activité".

4) L'analyse du spectre bactérien est alors entreprise sur un certain nombre de souches isolées à partir des milieux pour numération et les principaux groupements bactériens sont répertoriés.

5) Enfin, les exigences nutritionnelles de ces souches sont analysées par la méthode des répliques sur velours.

Tous les résultats sont consignés sur des fiches récapitulatives, sur lesquelles sont effectuées les corrections dues à la teneur en eau des échantillons.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS
DE SOL

--:--:--:--:--:--:--:--:--

Pour chaque analyse de terre, cinq prélèvements sont effectués à différents endroits, dans la parcelle de terre choisie, à l'aide d'un récipient cylindrique de 10 cm de diamètre et de 30 cm de hauteur, qui est enfoncé dans le sol jusqu'à une profondeur de 10 cm.

Après homogénéisation, la terre est éventuellement séchée à température ambiante dans une étuve à ventilation, puis passée successivement sur des tamis à mailles de plus en plus petites. Le dernier tamis, dont les mailles ont 1mm d'ouverture, permet de recueillir un produit final, utilisable pour les expériences.

Sitôt ce tamisage terminé, les mesures de pH, de taux d'humidité sont opérées, ainsi que la préparation des suspensions-dilutions. Les échantillons de sol sont alors conservés dans des sacs en plastique au congélateur, afin que les analyses d'azote total, de carbone organique et de matières humiques, puissent être entreprises par la suite.

L'acide sulfurique concentré et à chaud agit comme oxydant sur les matières organiques azotées. Cette attaque, ou minéralisation, donne après distillation, une libération d'ammoniac qui est recueilli dans une solution titrée d'acide sulfurique : il y a formation de sulfate d'ammonium et le dosage en retour de l'acide sulfurique par une solution titrée de soude en présence d'un indicateur coloré, permet de connaître la quantité d'azote minéralisé.

Ces analyses ont toujours été faites à partir d'un échantillon de 2 g de terre, rapportés au poids sec.

4) Teneur en carbone organique

Elle est déterminée par la méthode de ANNE qui consiste en une oxydation à froid du carbone organique par le bichromate de potassium et un titrage en retour par un sel ferreux, en utilisant comme indicateur la diphenylamine. 1 g de terre, rapporté au poids sec, est utilisé pour chaque dosage.

5) Teneur en matières humiques

Elle est déterminée par la méthode de CHAMINADE. L'extraction de l'humus est opérée à partir de 20 g de terre ramenés au poids sec, qui sont mis en suspension dans une solution d'oxalate d'ammonium à 3 p. 100. Cette préparation est agitée de façon intermittente et, après 24 heures, filtrée sur papier.

La précipitation de l'humus est ensuite obtenue en ajoutant de l'acide sulfurique concentré et après sédimentation,

le précipité floconneux est recueilli sur filtre et lavé avec une solution d'acide sulfurique $\frac{N}{10}$ jusqu'à élimination complète de l'oxalate d'ammonium.

Ce précipité, redissout à l'aide d'une solution de soude $\frac{N}{10}$, est ensuite traité à chaud par une solution de permanganate de potassium pendant 10 minutes ; après addition de quantités connues d'acide sulfurique et d'acide oxalique, le titrage en retour s'effectue avec la solution de permanganate de potassium.

Pour l'étude des numérations de germes, des groupements physiologiques et du spectre bactérien dans les échantillons de sol le point de départ est identique : il consiste à préparer des suspensions-dilutions à partir desquelles seront effectués des ensemencements sur milieux gélosés pour l'évaluation des microflores et l'analyse du spectre bactérien, ou sur milieux liquides pour l'étude des groupements physiologiques. Ensuite, c'est à partir des mêmes souches isolées lors de l'analyse du spectre bactérien, que seront étudiées les exigences nutritionnelles de la microflore bactérienne.

Etant donné qu'elle est la base de toutes nos analyses, la façon de réaliser les suspensions de terre à ensemercer a la plus grande importance. En effet, pour que les résultats soient comparables, il est nécessaire que ces dilutions soient réalisées toujours de la même manière ; aussi nous avons apporté dans leur préparation un soin particulier.

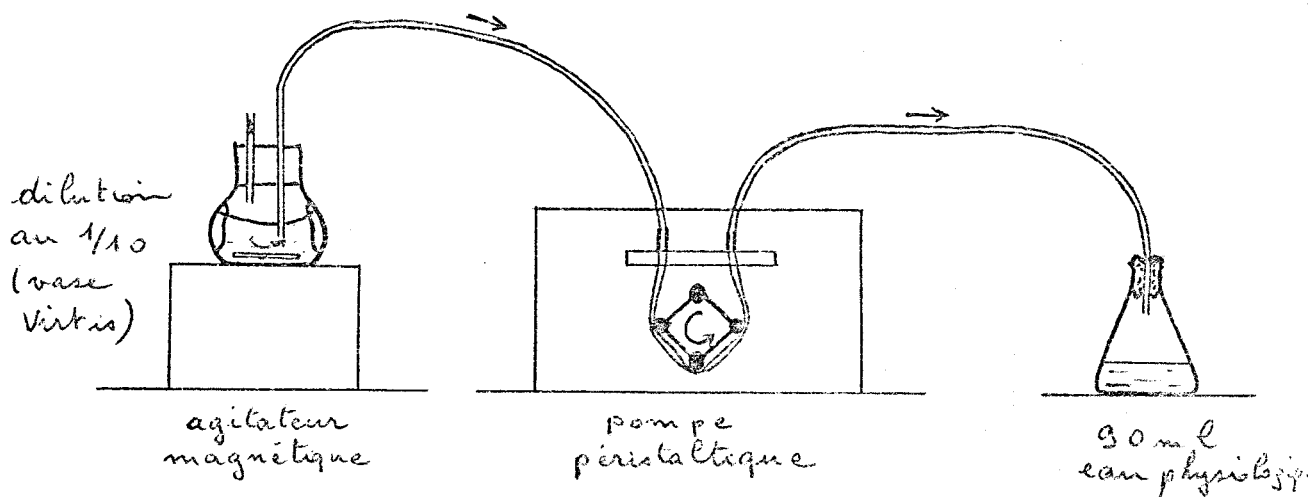
Afin d'obtenir une meilleure dissociation des particules de terre, la première suspension (10^{-1}) est préparée en homogénéisant à l'aide d'un appareil "VIRTIS 45" 10 g de sol à 90 ml d'eau physiologique stérile pendant 1 min à 36.000 tours/min. Nous avons préféré ce mode de dissociation mécanique à l'utilisation de dispersants chimiques pouvant entraîner des modifications dans la composition des milieux à ensemercer. De plus, nous avons pu vérifier au cours d'essais préliminaires que cette opération ne modifie pas le nombre des bactéries, ni celui des actinomycètes et des champignons.

2) La dilution au 1/100

La dilution suivante (10^{-2}) est préparée en portant le récipient de l'homogénéiseur contenant la dilution au 1/10 (vase VIRTIS 16-094 de 285 ml) sur un agitateur magnétique, de façon à obtenir une suspension homogène continue ; on prélève alors stérilement par l'intermédiaire d'une tige de verre creuse, plongeant jusqu'à mi-profondeur du liquide en agitation, un volume de 10 ml, à l'aide d'une pompe péristaltique conçue spécialement pour cet usage (MATON). Ces 10 ml incorporés dans 90 ml d'eau physiologique stérile, donnent alors la dilution au 1/100.

Le schéma de ce dispositif expérimental est représenté dans la figure 1. Signalons par ailleurs, qu'il est possible d'améliorer ce système en fractionnant la suspension de terre entraînée par la pompe péristaltique à l'aide d'un bullage, circulant dans le tuyau. Cette opération permet une progression plus régulière de certaines particules de terre denses et difficilement entraînables.

figure 1



3) Les autres dilutions

Les dilutions suivantes, jusqu'à 10^{-8} généralement, sont réalisées selon la technique classique, en utilisant des pipettes stériles de 10 ml et en prenant soin de changer de pipette après chaque dilution.

II - EVALUATION DES MICROFLORES

Afin de connaître l'importance relative des populations microbiennes dans les échantillons, nous effectuons des numérations de bactéries, d'actinomycètes et de champignons. L'étalement de dilutions de terre adéquates sur des plaques gélosées permet, après incubation, le dénombrement de chaque catégorie de germes.

1) Numération des microflores bactériennes

Nous avons utilisé le milieu défini par BUNT et ROVIRA (1955) en y apportant cependant quelques modifications en fonction de l'analyse que nous envisageons : nous ajoutons du glucose à la concentration de 10‰ pour favoriser une meilleure croissance des colonies bactériennes, en vue de l'isolement des souches ; de plus, des essais ayant montré que certaines souches très exigeantes ne se développent convenablement qu'en présence d'extrait de sol, nous préparons directement le milieu dans une solution d'extrait de terre au lieu d'utiliser de l'eau distillée. Cet extrait de sol est obtenu par autoclavage à 110°C pendant 30 min, d'un mélange à parties égales de terre de jardin et d'eau distillée. Signalons par ailleurs que pour l'isolement des germes telluriques, certains auteurs comme CHALVIGNAC (1957) et GOUNOT (1967) utilisent uniquement l'extrait de sol gélosé, sans incorporation de sels minéraux et de glucose. Pour notre part, nous avons toujours employé le milieu de BUNT et ROVIRA modifié, dans la composition nutritive suivante :

$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$	0,5 g
PO_4HK_2	0,4 g
$\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
MgCl_2	0,1 g
Fe Cl_3	0,01 g
CaCl_2	0,1 g
Peptone	1 g
Extrait de levure	1 g
Glucose	1 g
Extrait aqueux de sol	1000 ml
Agar	15 g

Après dissolution par chauffage, le milieu est ajusté à pH7,4, réparti à raison de 100 ml par bouteille et autoclavé à 120° pendant 20 min.

Au moment de son utilisation, il est fondu au bain marie bouillant, puis coulé en boîtes de Petri. L'ensemencement s'effectue alors en étalant soigneusement sur toute la surface de la plaque gélosée 0.1ml de dilutions adéquates de sol (généralement 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) à raison de 10 boîtes par dilution.

2) Numération des Actinomycètes

Après avoir expérimenté plusieurs milieux préconisés pour l'évaluation des Actinomycètes, nous avons retenu celui du glycérol-asparaginate de sodium défini par POCHON et TARDIEUX (1962). En effet, le milieu à base de pomme de terre et de bichromate de potassium 1 %, recommandé par FAIVRE-AMIOT est très rapidement envahi par de larges colonies de Bacillus mycoïdes, rendant les numérations difficiles ; de même nous avons abandonné celui de KUSTER () plus complexe et plus sélectif, destiné surtout à l'isolement des Actinomycètes du genre Streptomyces.

La composition du milieu au glycérol-asparaginate de sodium utilisé est la suivante :

PO_4HK_2	1	g
Glycérol	10	ml
Asparaginate de sodium	1	g
Oligo-éléments	1	ml
Agar	15	g
Eau distillée	1000	ml

pH 7,0

Autoclavage à 110°C pendant 20 min

L'ensemencement se fait comme précédemment en étalant 0,1 m des dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} à la surface des plaques gélosées, à raison de 5 boîtes par dilution.

3) Numération des champignons

A la suite de plusieurs essais, nous avons préféré le milieu de CZAPEK aux milieux sélectifs de MARTIN (1950) à base d'acide citrique, de rose bengale ou de Streptomycine. La composition du milieu de CZAPEK est la suivante :

PO_4HK_2	1	g
NO_3Na	3	g
$\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	g
ClK	0,5	g
SO_4Fe	0,01	g
Saccharosé	30	g
Agar	18	g
Eau distillée	1000	ml

pH 6,5 à 6,7

Autoclavage à 110°C pendant 20 min

Cependant, l'azote étant fourni sous forme de nitrate, il a été nécessaire d'enrichir le milieu de 1 ‰ de peptones, pour permettre le développement d'un plus grand nombre d'espèces fongiques.

L'ensemencement est effectué dans la masse, à raison de 5 boîtes par dilution ; 0,1 ml des dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} sont déposés au fond des boîtes de Petri, dans lesquelles on coule ensuite le milieu préalablement fondu et maintenu au bain-marie à 45°.

Les boîtes servant à la numération des bactéries et des actinomycètes sont incubées à 28°C pendant 8 jours, alors que celles destinées à l'évaluation des champignons sont incubées à 24°C pendant 6 jours. La reconnaissance et le dénombrement des colonies sur les 3 milieux sont effectués à l'aide d'une loupe binoculaire. En fonction du taux d'humidité de chaque échantillon de sol, les nombres obtenus pour ces numérations sont corrigés et rapportés au poids de matière sèche, afin de permettre des comparaisons.

III - ETUDE DES GROUPEMENTS FONCTIONNELS

L'évaluation des microflores totales : bactéries, actinomycètes, champignons, est insuffisante à elle seule pour caractériser un sol et surtout pour juger de son activité biologique. Parmi les nombreuses techniques d'étude qui rendent compte de l'activité globale d'un sol, nous retiendrons tout particulièrement celles mises au point par POCHON et coll. (1962) et relatives à l'analyse des "groupements fonctionnels" appelés aussi "groupements physiologiques".

On entend par ces termes, des ensembles de germes remplissant dans le sol une fonction physiologique bien définie, constituant un chaînon du cycle de l'azote ou du carbone. Leur différenciation est basée sur le choix et l'utilisation de certains milieux électifs qui, par leur composition en éléments nutritifs, ne permettent que la prolifération de certains germes accomplissant une fonction précise.

Nous avons limité cette étude à l'analyse des trois principaux groupements fonctionnels : la protéolyse et l'ammonification qui concernent le cycle de l'azote et l'amylolyse pour le cycle de carbone.

1) Principe général de la méthode

Le milieu de base est constitué par la solution minérale de WINOGRADSKY diluée au 1/20, additionnée d'une solution d'oligo-éléments. L'électivité est ensuite conférée à chacun des trois milieux par l'incorporation d'un substrat énergétique défini.

Les milieux sont répartis dans des tubes de 16/160 à raison de 10 ml par tube pour l'ammonification et l'amylolyse, ou dans des tubes à hémolyse à raison de 2 ml par tube pour la protéolyse. Ils sont autoclavés à 110°C pendant 20 min.

L'ensemencement s'effectue en incorporant 1 ml des différentes dilutions de terre à analyser (de 10^{-2} à 10^{-8}), en utilisant 5 tubes pour chaque dilution. Les résultats sont lus après le 3ème jour et le 8ème jour d'incubation à 28°C et l'utilisation des tables statistiques de Mc CRADY permet de calculer le nombre de germes correspondant à chaque groupement physiologique.

Des essais préliminaires portant sur 4 échantillons de terre et représentés sur la figure 1, montrent en effet que pour ces courbes d'activité, les points les plus significatifs sont ceux qui sont obtenus le 3ème et le 8ème jour. Cependant, cette indication numérique ne permet pas d'apprécier l'activité des groupements. Aussi, nous avons essayé de traduire cette activité en données numériques, en calculant le rapport des chiffres obtenus le 3ème et le 8ème jour d'incubation des milieux sélectifs et en multipliant ce rapport par 100.

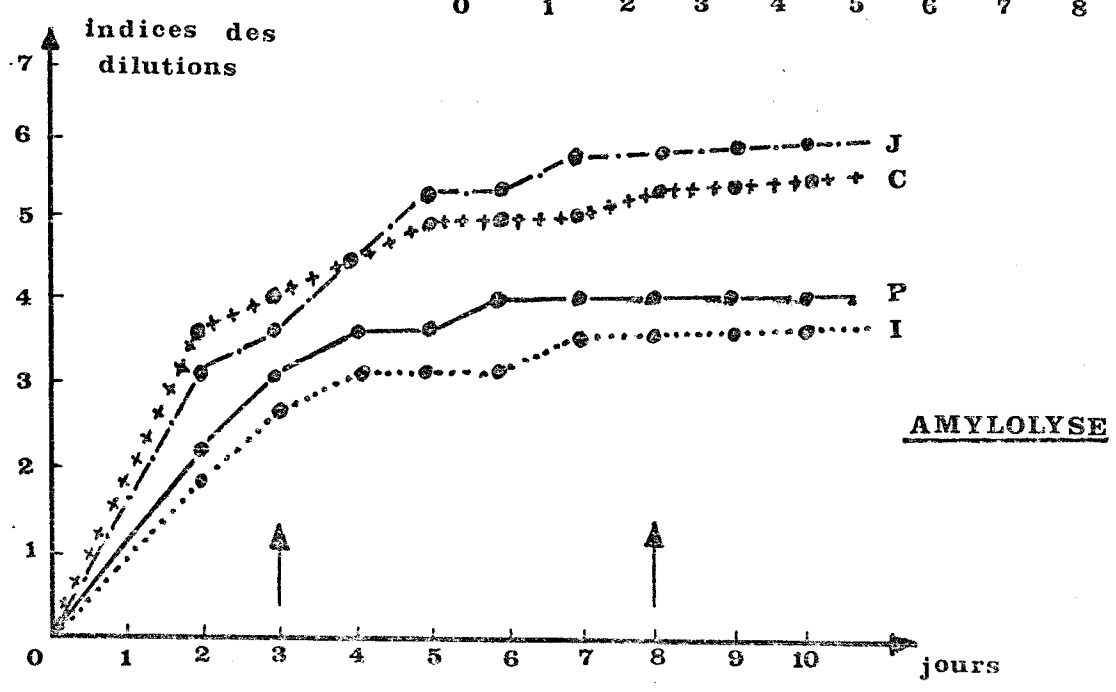
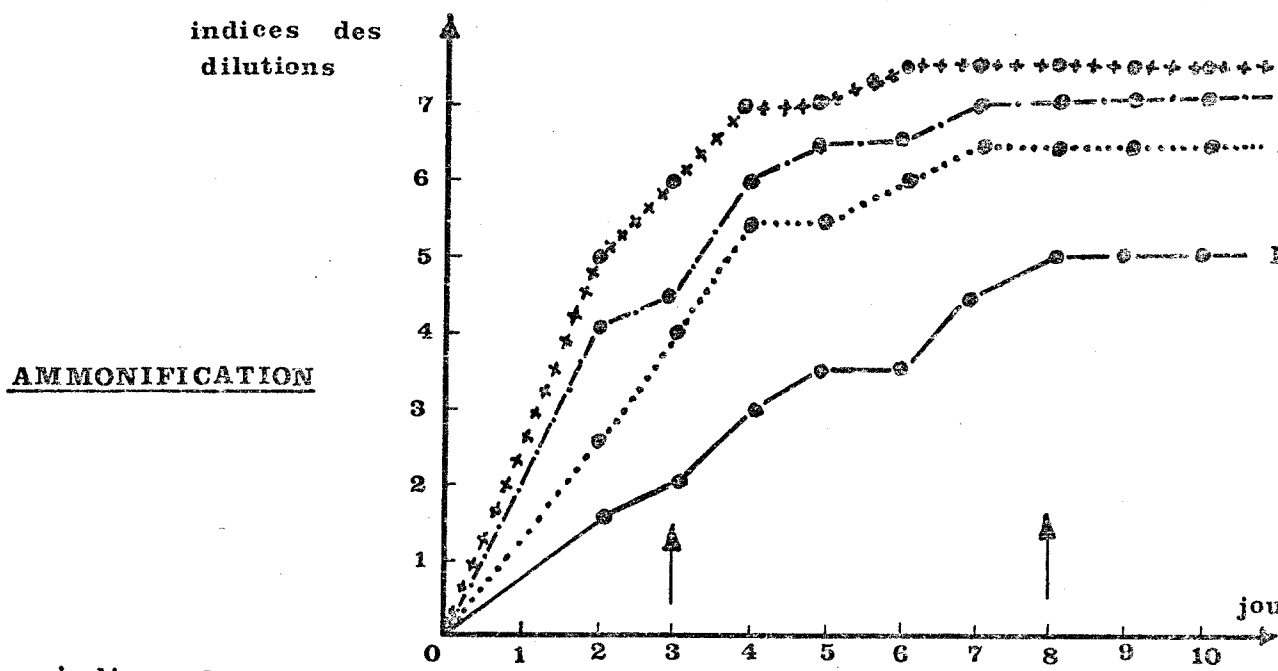
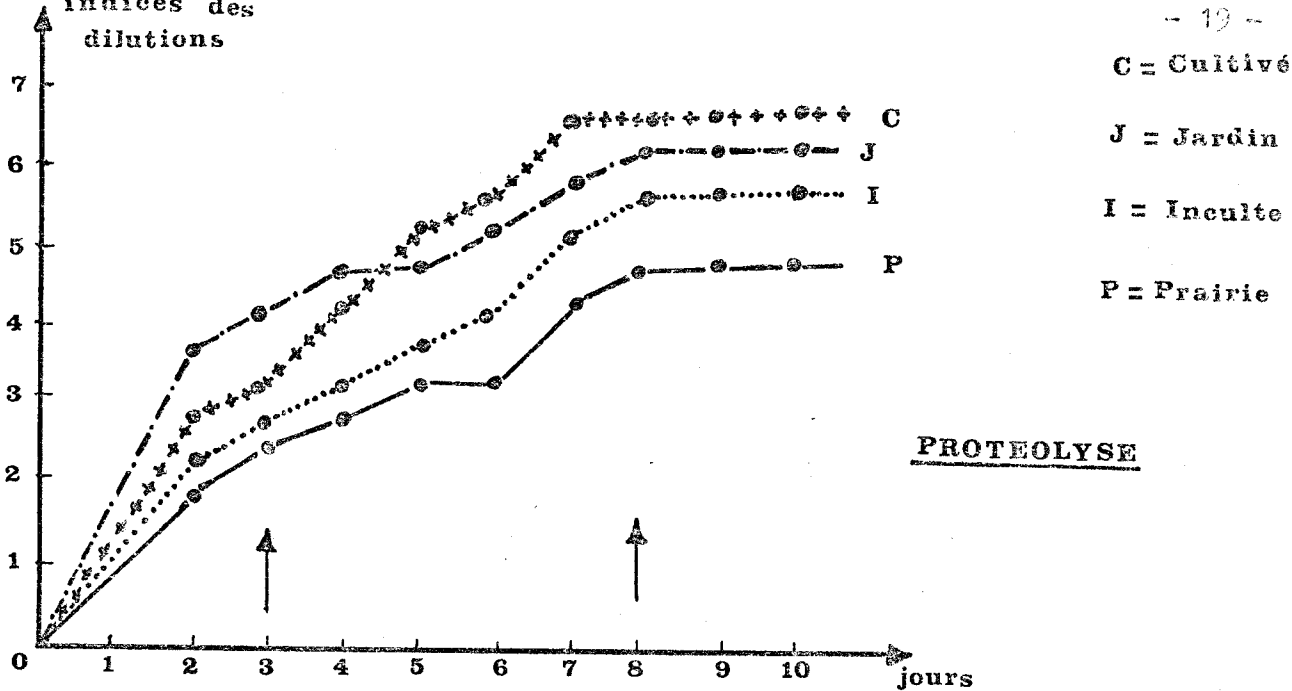


Figure 2 = ANALYSE DES GROUPEMENTS FONCTIONNELS

A PARTIR DE 4 ECHANTILLONS DE TERRE



Ainsi est défini ce que nous avons appelé "l'indice d'activité" des groupements, qui est indépendant du nombre total de germes responsables d'une fonction physiologique donnée.

2) Germes protéolytiques

On utilise le milieu de LAJUDIE et CHALVIGNAC (1956) rendu électif par addition de gélatine comme unique source de carbone et d'azote :

Solution saline de Winogradsky	50 ml
Gélatine	30 g
Oligo-éléments	1 ml
Eau distillée	1000 ml

Pour la lecture, les tubes sont d'abord refroidis au réfrigérateur. La liquéfaction de la gélatine traduit alors l'activité protéolytique dans les tubes positifs.

3) Germes ammonifiants

Le milieu électif utilisé renferme de l'asparagine comme source de carbone et d'azote :

Solution saline de Winogradsky	50 ml
Asparagine	0,2 g
Oligo-éléments	1 ml
Eau distillée	1000 ml

Après développement des cultures, l'activité ammonifiante se manifeste par la formation d'ammoniac, révélé par le réactif de Nessler.

4) Germes amylolytiques

On emploie le milieu de BARJAC et CHALVIGNAC (1957) à base d'amidon :

Solution saline de Winogradsky	50	ml
Amidon de riz	1,5	g
NO_3NH_4	1	g
Extrait de sol	10	ml
Oligo-éléments	1	ml
Eau distillée	1000	ml

L'hydrolyse de l'amidon, recherchée par le lugol, traduit l'activité amylolytique.

- Composition de la solution saline de Winogradsky :

Phosphate bipotassique	5	g
Sulfate de magnésium	2,5	g
Chlorure de sodium	2,5	g
Sulfate ferrique	0,05	g
Sulfate de manganèse	0,05	g
Eau distillée	1000	ml

- Composition de la solution d'oligo-éléments :

Molybdate de potassium	0,05	g
Borate de sodium	0,05	g
Perchlorure de fer (solution à 28 %)	1	goutte
Nitrate de cobalt	0,05	g
Sulfate de cadmium	0,05	g
Sulfate de cuivre	0,05	g
Sulfate de zinc	0,05	g
Sulfate de manganèse	0,05	g
Eau distillée	1000	ml

IV - ANALYSE DU SPECTRE BACTERIEN

Dans le contexte de l'expérimentation envisagée, cette analyse représente l'essentiel de notre travail : elle a pour objet d'étudier la répartition des principaux genres bactériens constituant la microflore dominante. Elle suppose une étude microbiologique des souches bactériennes et leur classification selon des critères définis. La difficulté d'une telle analyse réside surtout dans la diversité des méthodes de regroupement, ainsi que dans la variabilité des critères d'identification des bactéries. Ainsi BRISBANE et ROVIRA (1961) après avoir comparé trois méthodes permettant de grouper les germes isolés à partir d'une terre : la classification basée sur les associations de caractères, l'identification par l'utilisation de la clé de SKERMAN basée sur le Bergey's Manual et la classification suivant l'index d'affinité, obtient des résultats très variables qui confirment la difficulté du problème, aucune méthode ne convenant parfaitement.

Pour notre part, étant donné la nature de la microflore des sols que nous voulions analyser, nous avons adopté une méthode simple, basée d'abord sur des examens microscopiques des souches bactériennes. Ces critères morphologiques permettent alors la répartition en plusieurs groupes, qui sont ensuite identifiés en fonction de leurs caractères taxonomiques déterminants, selon une nomenclature précise. Nous reviendrons d'ailleurs sur l'efficacité de ces critères quant à l'identification des germes du sol, en appliquant une méthode de taxonomie numérique à 100 souches bactériennes isolées à partir d'une terre.

1) Isolement des souches

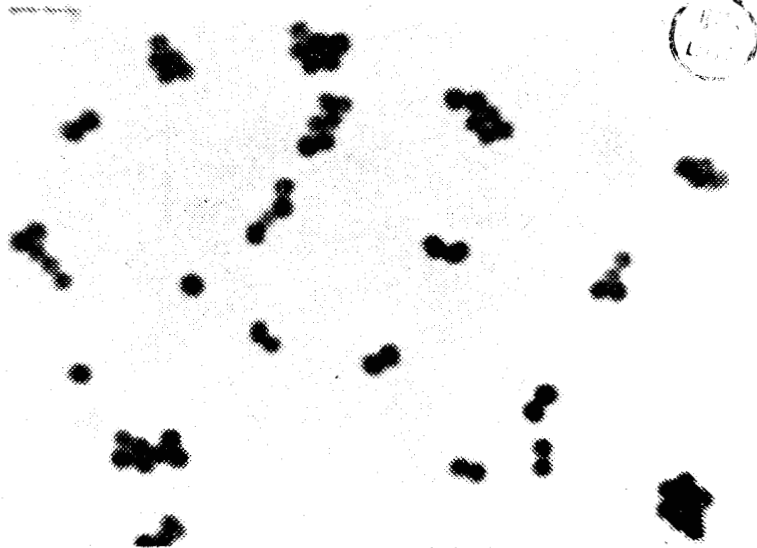
Etant donné qu'elle conditionne la valeur des résultats, la manière d'isoler les souches bactériennes qui seront ensuite déterminées, a la plus grande importance. Nous avons toujours opéré de la façon suivante : pour chaque terre, à partir des étalements réalisés sur le milieu modifié de BUNT et ROVIRA, nous sélectionnons d'abord au moins 2 ou 3 boîtes contenant des colonies bien séparées les unes des autres. Ensuite, sans faire de choix parmi ces colonies bactériennes, nous en prélevons une centaine en les numérotant de 1 à 100 et nous les repiquons sur le même milieu, mais réparti en tubes inclinés (en fait, nous avons toujours isolé plus de 100 souches par échantillon de sol, ceci afin de pouvoir éliminer éventuellement celles qui ne sont pas pures ou celles qui se révèlent par la suite être des Actinomycètes. Ces tubes sont alors remplacés par les souches portant un numéro supérieur à 100).

2) Critères d'identification

Le point de départ de notre méthode d'analyse du spectre bactérien consiste d'abord en une répartition selon des critères morphologiques. Après 24 heures et 5 jours d'incubation à 28°C, nous effectuons une coloration de gram pour chacune des souches précédemment isolées. L'examen microscopique de ces frottis permet alors de répartir les germes en plusieurs groupements principaux : les cocci, les bâtonnets droits à Gram positif, les germes sporulés, les germes pléomorphes produisant des "cystites" dans les cultures âgées, des bâtonnets droits ou coccobacillaires à Gram négatif, et



1



2

Caractéristiques morphologiques des Arthrobacter :

Photo 1 : souche C₄₀ après 24 h d'incubation à 28° C sur milieu gélosé modifié de Bunt et Rovira : on observe des formes en petits bâtonnets.

Photo 2 : La même souche après 5 jours d'incubation à 28° C : apparition de cellules coccoides ou "cystites".

enfin, des formes diverses ou particulières.

Cet examen morphologique permet très souvent, sans tests biochimiques complémentaires, d'identifier, parmi les germes sporulés : les Bacillus grâce à la présence de spores centrales et parmi les germes pléomorphes : les Arthrobacter.

Ce genre Arthrobacter, décrit pour la première fois par CONN et DIMMICK (1947) est un groupe hétérogène comprenant les Corynebactéries saprophytes non cellulotiques du sol. Aussi a-t-il été décrit sous divers noms, mais à la suite de travaux assez récents, MULDER et coll. (1963, 1966), GOUNOT (1967), MULLAKHAN BHAI et BHAT (1970), son individualité est désormais admise et sa caractérisation peut s'effectuer directement selon le critère morphologique de MULDER et coll. (1963). En effet, ces bactéries sont essentiellement caractérisées par une morphologie variable : elles apparaissent dans les stades jeunes comme des bâtonnets assez courts à gram négatif généralement ; par contre, les cultures âgées ne présentent plus que des cellules coccoïdes : les cystites, à gram positif. Précisons d'ailleurs que ces variations morphologiques sont non seulement fonction de l'âge des cultures, mais également de la richesse du milieu utilisé : MULLAKHANBHAI et BHAT (1967). Quoiqu'il en soit, la distinction entre ces deux stades est très nette et c'est cette caractéristique qui nous a toujours permis de reconnaître les Arthrobacter. (photos 1 et 2).

Parmi les bâtonnets à gram négatif, nous avons recherché les genres bactériens suivants, dont la présence est souvent signalée dans les études systématiques des germes telluriques : les Pseudomonas, Flavobacterium, Xanthomonas, Achromobacter, Acinetobacter, Alcaligenes, Agrobacterium.

Le genre Pseudomonas est décrit par la plupart des auteurs comme des bâtonnets droits à gram négatif, possédant une cytochrome oxydase, mobiles, aérobies stricts, oxydant le glucose en milieu de Hugh et Leifson et produisant souvent des pigments solubles. Pour THORNLEY (1960) et STANIER et coll. (1966), l'alcalinisation de l'arginine en anaérobiose par le genre Pseudomonas, constitue cependant le critère déterminant de ce groupe : l'arginine se dégradant en donnant comme produits intermédiaires la citruline et l'ornithine avec libération d'ammoniac qui alcalinise le milieu.

Pour le genre Flavobacterium qui est représenté par des bâtonnets droits à gram négatif, il produit généralement un pigment jaune-orangé insoluble sur les milieux gélosés. Pour certains auteurs ces germes ne sont pas mobiles (SCHEWAN, 1960), HENDRIE et coll. (1964) ; pour d'autres, ils sont mobiles : Bergey's Manual (1957), HOLDING (1960), THORNLEY (1967), BERLAND et coll. (1969). En outre, ils ne produisent pas d'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine, n'alcalinisent pas l'arginine en anaérobiose et peuvent être déficients en cytochrome oxydase. Les autres caractères tels le type respiratoire, l'oxydation du glucose en milieu de Leifson, sont comparables à ceux des Pseudomonas.

Les Xanthomonas constituent un genre voisin des Flavobacterium, ils s'en distinguent cependant par la synthèse d'un pigment jaune insoluble mais plus clair et par la production d'hydrogène sulfuré.

Le genre Achromobacter comprend des bactéries à gram négatif, généralement de forme coccobacillaire, non pigmentées. Selon Bergey's Manual (1957), HOLDING (1960), HENDRIE et coll. (1964), THORNLEY (1967), ils sont mobiles, aérobies stricts, légèrement oxydants et peuvent posséder une cytochrome oxydase ; selon

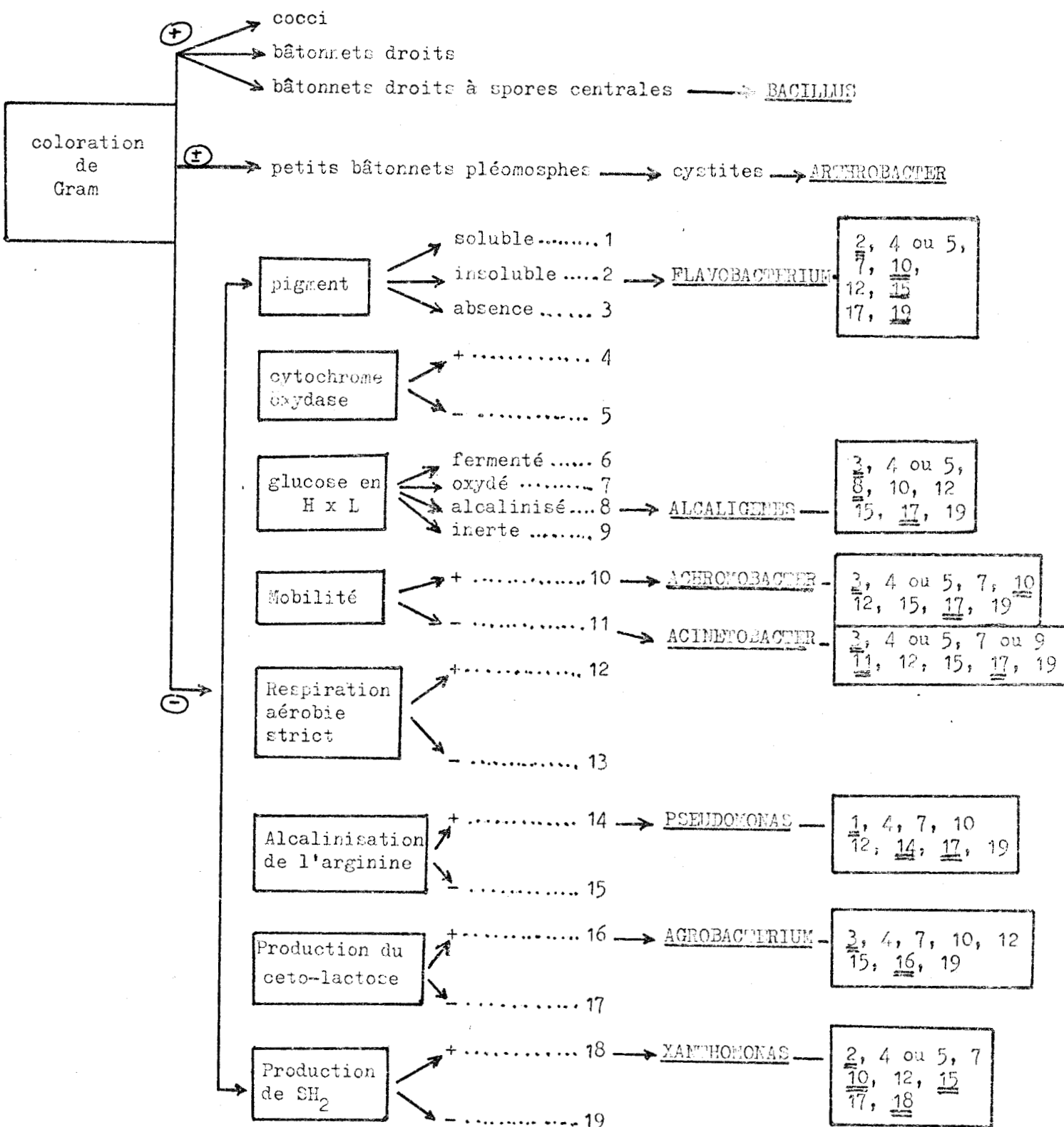
SCHEWAN (1960), BERLAND et coll. (1969), ils sont immobiles, oxydants ou inertes sur le glucose, sans toutefois l'alcaliniser ; les germes alcalinisant le glucose et le lait tournesolé étant considérés comme faisant partie du genre Alcaligenes.

Les Acinetobacter groupent, selon THORNLEY (1967), des formes coccobacillaires s'apparentant aux Achromobacter, mais s'en distinguant cependant par l'absence de mobilité.

Enfin, le genre Agrobacterium se rapporte à des bâtonnets gram négatif non pigmentés, possédant une cytochrome oxydase, mobiles, aérobies stricts et oxydants. Pour BERNAERTS et De LEY (1963), ce genre se caractérise essentiellement par sa faculté de transformer le lactose en céto-lactose.

Etant donné ces nombreuses définitions souvent contradictoires données par la littérature, pour nos analyses, nous avons considéré le genre Pseudomonas défini selon STANIER et coll. (1966), les genres Flavobacterium, Xanthomonas, définis selon BERLAND et coll. (1969), les genres Achromobacter et Alcaligenes selon Bergey's Manual (1957), le genre Acinethobacter selon THORNLEY (1967) et enfin le genre Agrobacterium selon BERNAERTS et De LEY (1963). La recherche de certains critères taxonomiques déterminants permettra alors de reconnaître chacun des groupes.

Ces différents critères sont résumés ci-après sous forme d'un schéma. Ainsi la production de pigments solubles, la présence de cytochrome-oxydase, l'alcalinisation de l'arginine en anaérobiose l'oxydation du glucose en milieu de Hugh et Leifson, constituent les principaux tests de reconnaissance des Pseudomonas, avec la mobilité et le type respiratoire. Les bâtonnets droits à gram négatif, mobiles, pouvant posséder une cytochrome oxydase et synthé-



Critères choisis pour l'identification
des Bactéries du sol.

+ = réaction positive

- = réaction négative. En ce qui concerne les bâtonnets à gram négatif, les chiffres suivant les différents tests correspondent à une numérotation en fonction des critères d'identification étudiés. Pour les genres bactériens, les numéros encadrés se rapportent ainsi aux réactions permettant de les caractériser, les tests soulignés étant considérés comme les plus significatifs.

tisant un pigment jaune insoluble, sont identifiés aux Flavobacterium, alors que ceux qui produisent de l'hydrogène sulfuré sont classées parmi les Xanthomonas. Les formes coccobacillaires non pigmentées, mobiles, légèrement oxydantes sont assimilées aux Achromobacter ; les souches alcalinisantes aux Alcaligenes et les formes non mobiles aux Acinetobacter. La production de céto-lactose à partir du lactose permet enfin de reconnaître les Agrobacterium parmi les germes non pigmentés.

Enfin, pour les groupements bactériens classés parmi les "Divers", nous n'en poursuivons pas l'identification, soit à cause de leur pourcentage très faible, soit à cause de la très grande hétérogénéité des souches isolées.

V - ETUDE DES GROUPEMENTS NUTRITIONNELS

L'analyse des exigences nutritionnelles est une méthode de distinction des différents germes telluriques en fonction de leur pouvoir de synthèse. Le principe de cette classification des bactéries a été énoncé par LOCHHEAD et CHASE (1943). Ces pouvoirs de synthèse sont très variables, puisque certains germes sont capables de proliférer sur des milieux strictement minéraux avec le glucose comme seule source de carbone, alors que d'autres exigent de nombreux facteurs de croissance, ou des substances encore mal définies présentes dans l'extrait de levure ou dans l'extrait de sol.

1) Principe

Parmi les sept types nutritionnels définis par LOCHHEAD et CHASE (1943) et en fonction des données ultérieures acquises dans ce domaine par KATNELSON et coll. (1956) et par GYLLENBERG (1957), nous en avons retenu six, qui sont les plus importants. Précisons également que nous avons repris les compositions préconisées par LOCHHEAD et CHASE, ainsi que les concentrations.

a) Milieu de base M : c'est un milieu minéral glucosé à 1‰.

$\text{PO}_4^{\text{HK}}_2$	1	g
NO_3K	0,5	g
$\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	g
CaCl_2	0,1	g
NaCl	0,1	g
$\text{Fe Cl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$	0,01	g
Glucose	1	g
Agar	15	g
Eau distillée	1000	ml

pH 6,8

Autoclavage à 100°C pendant 20 min.

b) Milieu A

Il est identique au milieu M, mais contient en plus une solution d'acides aminés (casaminoacids vitamin-free "Difco") stérilisée par filtration sur membrane Millipore 0,45 μ et incorporée à la concentration de 4 mg/ml.

c) Milieu V

C'est le milieu M auquel on ajoute une solution des vitamines hydrosolubles aux concentrations finales suivantes :

Thiamine	5 μ g/ml
Acide panthoténique	5 -
Riboflavine	5 -
Acide nicotinique	5 -
Pyridoxine	5 -
Acide p-amino-benzoïque	5 .
Acide folique	1 -
Vitamine B12	0,2 -
Biotine	0,1 -

d) Milieu AV : il est identique au milieu A, mais contient en plus les facteurs de croissance précédemment indiqués.

e) Milieu L : c'est le milieu M additionné d'une solution d'extrait de levure à la concentration de 10 mg/ml.

f) Milieu T : c'est le milieu L auquel on incorpore une solution d'extrait de sol, identique à celle qui constitue le milieu modifié de BUNT et ROVIRA.

2) Technique utilisée

La méthode classique consiste à cultiver les souches en milieu liquide. En raison du nombre de bactéries que nous devons analyser pour chaque échantillon de terre, nous avons préféré employer un procédé plus rapide : la méthode des répliques sur velours couramment utilisée en génétique bactérienne.

Cette méthode mise au point par LEDERBERG (1952) est en effet un procédé simple permettant de tester, pour toute une série de souches bactériennes, leur aptitude à proliférer sur des milieux de valeur nutritive différente. On utilise pour cela un morceau de velours stérile, tendu sur un tambour dont le diamètre est légèrement inférieur à celui d'une boîte de Petri. On applique sur le velours la plaque gélosée portant les colonies bactériennes, de manière à y laisser leur empreinte : il suffit ensuite d'appliquer successivement sur ce velours les plaques gélosées "vierges" de composition différente pour en déduire, après incubation, le pouvoir de synthèse des souches.

Pour nos analyses, les 100 souches précédemment isolées lors de l'étude du spectre bactérien de chaque échantillon de sol, sont d'abord ensemencées en stries sur le milieu gélosé complet de BUNT et ROVIRA à base d'extrait de terre, à raison de 20 souches par boîte de Petri. Après incubation à 28°C pendant 24 à 48 heures, elles sont repliquées en chambre stérile sur chacun des six milieux décrits, en respectant l'ordre des richesses nutritives croissantes des milieux.

La lecture des boîtes est possible après 48 heures d'incubation à 28°C. Dans certains cas, lorsque les résultats ne sont pas suffisamment significatifs, nous pratiquons un deuxième passage sur les mêmes milieux, afin d'éliminer les auto-apports de facteurs de croissance présents dans les inocula.

Pour chaque terre ainsi étudiée, les résultats relatifs aux différentes analyses sont finalement consignés sur une fiche récapitulative, présentée ci-après. En fonction de la teneur en eau des échantillons, des corrections sont apportées afin de permettre des comparaisons. En ce qui concerne le tableau relatif à l'étude du spectre bactérien, signalons que des colonnes ne sont titrées, afin de pouvoir répertorier la présence de groupements morphologiques de germes assez particuliers pouvant apparaître dans certains sols. De même, concernant le tableau d'analyse des types nutritionnels, nous pouvons faire ressortir les exigences nutritionnelles d'un genre bactérien autre que les Arthrobacter.

ANALYSE DE LA TERRE N°

du prélèvement	date	culture présente	culture précédente																																				
pH:	Humidité: %	C. organique: % N. organique: %	matières humiques:																																				
CROFLORE BACTERIENNE (en n ^b de germes/g)		ACTINOMYCETES (en n ^b /g)	CHAMPIGNONS (en n ^b /g)																																				
sans correction: .10		sans correction: .10	sans correction: .10																																				
après correction: .10		après correction: .10	après correction: .10																																				
GERMES PROTEOLYTIQUES		GERMES AMMONIFIANTS	GERMES AMYLOLYTIQUES																																				
<table><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>														<table><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>3j.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>8j.</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>					3j.				8j.				<table><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>3j.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>8j.</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>					3j.				8j.			
3j.																																							
8j.																																							
3j.																																							
8j.																																							
activité: sans correction: .10 après " : .10		activité: n ^b sans correction: .10 n ^b après " : .10	activité: n ^b sans correction: .10 n ^b après " : .10																																				

SPECTRE BACTERIEN

ouches	cocci	spores	cystites	b +	b -				divers
ctéri- on									
genres									
ouches									

GROUPEMENTS NUTRITIONNELS

exigences		M	A	V	A+V	EL	ET
Flore totale	%						
Arthrobacter	n						
	n						

CARACTERISTIQUES DE LA TERRE :



2^e PARTIE

RESULTATS DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

DES SOLS DE LA REGION DU NORD

DE LA FRANCE

Compte tenu des résultats que nous avons obtenus à partir des rhizosphères artificielles réalisées en laboratoire, résultats que nous avons rappelés brièvement dans l'introduction de ce mémoire et qui soulignent la prépondérance des Arthrobacter dans ces microflores rhizosphériques, nous avons voulu rechercher :

a) tout d'abord si la cause de ce phénomène était imputable au pourcentage élevé de ces Corynébactéries dans les sols de la région lilloise à partir desquels avaient été effectuées ces expériences en laboratoire,

b) ensuite s'il était possible de retrouver ces résultats en étudiant les échantillons de terre prélevés parallèlement dans des parcelles de sol démunies de végétation, ou présentant des cultures

A l'aide des méthodes que nous avons décrites dans le chapitre précédent, nous avons ainsi procédé aux deux séries d'analyses suivantes :

1 - En fonction du type de sol, un certain nombre d'échantillons de terre de nature pédologique variée sont choisis à différents endroits dans la région du Nord de la France : pour chaque site choisi nous effectuons un prélèvement dans une parcelle non cultivée et un prélèvement dans une parcelle cultivée, située à proximité de la précédente.

2 - A partir d'échantillons de terre prélevés à différents moments de l'année dans un même champ expérimental compartimenté en trois parcelles : l'une restant sans végétation, les deux autres portant chacune une culture.

Les résultats obtenus dans ces deux séries d'analyses microbiologiques sont exposés dans les deux paragraphes suivants. Etant donné l'existence de nombreux points communs entre les deux types d'analyses, nous avons regroupé dans un troisième paragraphe, les discussion et conclusion.

A - CARACTERISTIQUES MICROBIOLOGIQUES DES SOLS
EN FONCTION DE LEUR NATURE PEDOLOGIQUE
ET DE LA PRESENCE DES CULTURES

Cette analyse a donc pour but essentiel de répertorier les principaux groupements bactériens présents dans des sols de nature pédologique différente et de comparer, pour chacun de ces sols, le spectre microbien de la microflore d'une parcelle cultivée, subissant une rotation annuelle de cultures, par rapport à celui d'une parcelle sans végétation ou recouverte d'une végétation permanente sauvage.

Cette étude a porté essentiellement sur 14 échantillons de terre prélevés tous dans la région du Nord de la France. Dans le tableau I sont précisées l'origine géographique et la nature physique de chaque échantillon, ainsi que la nature de la végétation en place au moment du prélèvement. Dans le cas des parcelles cultivées, la majorité des "terres rhizosphériques" proviennent de champs de blé. Par contre, nous avons une certaine hétérogénéité dans le choix des "sols incultes", qui, ou bien ne portent aucune végétation, ou bien sont couverts d'une végétation naturelle non proliférante.

lieu des prélèvements	Nature du sol	Végétation	Abrévi- ations	pH	% humidité	% C	% N	C/N	% matières humiques
Douaisis	argile	prairie permanente culture d'avoine	Do i	7,1	8,2	1,90	0,18	10,5	0,30
			Do c	7,5	11,8	1,08	0,13	8,3	0,06
Boulonnais	argile	prairie abandonnée culture de blé	Bo i	6,8	12,6	2,60	0,12	21,6	0,17
			Bo c	6,5	7,2	0,91	0,10	9	0,06
Pévèle	limons sur argile	prairie permanente culture de blé	Pe i	5,9	22,5	2,50	0,15	16,6	0,20
			Pe c	5,5	13,7	0,90	0,10	9	0,07
Mélantois	limons sur craie	parcelle sans végé- tation culture de blé	Me i	7,1	11	0,95	0,08	11,8	0,08
			Me c	7,3	12,7	0,88	0,08	11	0,07
Vallée de la Lys (Théroutanne)	limons de la Lys	parcelle en friche culture de blé	Ly i	7,7	4,7	1,24	0,12	10,3	0,07
			Ly c	7,5	6,8	1,16	0,12	9,6	0,05
Dunkerquois	sable et argile	parcelle sans végé- tation graminées diverses	Du i	7,0	9,6	1,50	0,09	15	0,25
			Du c	7,2	10,1	1,03	0,10	10,3	0,08
Dunes internes (Zuydcoote)	sable	parcelle en friche culture de chicorée	Di i	6,6	1,4	3,09	0,15	20,6	0,21
			Di c	6,9	3,1	1,28	0,10	12,8	0,14



TABLEAU I

Caractéristiques physico-chimiques des terres analysées

1) Analyses physico-chimiques

Les résultats de ces analyses sont consignés dans le tableau I, où les pourcentages de carbone organique, d'azote total et de matières humiques sont exprimés par rapport au poids de matières sèches de chaque échantillon.

Remarquons que la valeur du pH ne semble pas en relation avec la présence des cultures végétales. Ces valeurs sont en général neutres, ou légèrement acides, sauf pour les sols limoneux du Pévèle qui ont un pH nettement acide.

Par contre, pour les analyses chimiques, les teneurs en carbone organique, azote total et matières humiques sont généralement plus élevées dans les terres incultes que dans les sols rhizosphériques, indépendamment du substrat et de la nature des cultures végétales. En particulier, par rapport aux parcelles non cultivées, ce sont les taux de carbone organique et de matières humiques qui subissent une baisse importante dans les échantillons rhizosphériques. Ces résultats sont dûs aux incorporations d'engrais minéraux azotés responsables également de la diminution des rapports C/N dans les parcelles portant des cultures. En effet, l'incorporation d'engrais minéraux seuls accélère les processus de minéralisation des matières organiques du sol, ce qui entraîne une baisse du rapport C/N. Ainsi, ces analyses chimiques sont à prendre en considération pour l'interprétation de l'activité de certains groupements physiologiques du cycle de l'azote et du carbone.

2) Etude des populations microbiennes et fongiques

Les résultats de ces numérations de germes, rapportés à 1 g de terre sèche, sont figurés dans le tableau II. Ce tableau montre tout d'abord l'importance relative des bactéries par rapport aux Actinomycètes ou aux champignons.

En ce qui concerne les populations bactériennes, les échantillons provenant des parcelles cultivées présentent toujours une microflore plus abondante. Ce phénomène classique, dû à l'effet rhizosphère, s'explique par la concentration relativement élevée des sécrétions racinaires dans ces sols. Cet effet rhizosphère est particulièrement net dans le cas des échantillons prélevés dans la région de Zuydcoote, contenant une proportion assez importante de sable fin.

Par contre, l'évolution des Actinomycètes et des champignons ne semble pas être en relation avec la présence des excrétions racinaires. On peut cependant, en fonction de la nature du sol, noter l'importance de ces Actinomycètes dans les échantillons argileux et leur faible proportion, tout comme les champignons, dans les sols sableux.

3) Etude des groupements physiologiques

En général, quel que soit l'échantillon de terre analysé, les germes ammonifiants sont les plus abondants parmi les trois groupements physiologiques étudiés (tableau III). Mais qu'ils soient ammonifiants, protéolytiques ou amylolytiques, le nombre de germes déterminé par les tables statistiques de Mc CRADY, ne semble pas être en rapport avec le type de sol, ni avec la présence des cultures.

	Bactéries (nombre x 10 ^{6/g})	Actinomycètes (nombre x 10 ^{6/g})	Champignons (nombre x 10 ^{4/g})
Do { i { c	23,8 27,5	24,8 12,5	163 190
Bo { i { c	20,8 27,0	16,5 8,6	26,5 19,3
Pe { i { c	15,5 61,4	2,5 3,3	20,6 30,3
Me { i { c	34,2 53,2	3,4 3,2	24,7 32,0
Ly { i { c	68,2 85,8	4,9 2,5	32,3 16,0
Du { i { c	9,8 21,2	2,5 2,6	1,5 1,9
Di { i { c	7,1 56,7	1,5 2,1	1,8 2,4

TABEAU II

Les microflores bactériennes et fongiques présentes dans les terres étudiées
(les résultats sont exprimés en nombre de germes présents par g de terre sèche)

		nombre de germes protéolytiques (x 10 ⁵ /g)	nombre de germes ammonifiants (x 10 ⁵ /g)	nombre de germes amylolytiques (x 10 ⁵ /g)	indices d'activité	
					protéolyse	amylolyse
Do	i	27,2	141	14,1	10	6
	c	9,0	39	14,1	15	14
Bo	i	27,3	125	14,8	5	10
	c	18,3	86	8,6	7	16
Pe	i	10,3	45	4,5	6	8
	c	9,2	92	6,9	8	21
Me	i	28,0	280	2,8	10	5
	c	57,2	286	4,0	12	20
Ly	i	5,2	367	8,3	10	7
	c	53,6	268	5,3	16	20
Du	i	14,4	5,5	2,7	19	6
	c	6,2	10	4,5	22	10
DI	i	3,5	2,5	0,7	10	7
	c	5,1	5,0	0,3	15	16

TABLEAU III

Les groupements fonctionnels de la microflore des terres étudiées (les résultats sont exprimés en nombre de germes présents par gramme de terre sèche)



Cependant, le calcul des indices d'activité permet, sauf pour l'amylolyse des terres limoneuses provenant du Mélantois, de constater que l'activité des groupements fonctionnels est toujours plus forte lorsque le sol porte une culture végétale. Ces indices d'activité, qui ne sont pas proportionnels au nombre de germes, expriment plutôt des vitesses de réactions métaboliques, qui sont donc plus élevées autour du système racinaire des plantes que dans les parcelles non cultivées. Cette intense activité microbienne dans les échantillons rhizosphériques permet d'expliquer en partie la stimulation des groupements physiologiques, ainsi que les faibles teneurs en carbone organique et en matières humiques, par rapport aux terres incultes. Signalons que les apports d'engrais minéraux interviennent également en accentuant ce phénomène.

4) Etude du spectre bactérien

L'analyse du spectre bactérien des échantillons fait ressortir l'importance numérique des bactéries coryneformes du genre Arthrobacter (tableau IV). Dans 11 échantillons parmi les 14 étudiés, ces Arthrobacter constituent la flore dominante, en raison de leur pourcentage plus élevé que les autres groupes de germes. De plus, dans une région donnée, leur proportion est toujours plus forte quand le sol porte une culture végétale, et dans deux cas : à partir des prélèvements provenant du Pévèle et des dunes littorales, pourtant de nature pédologique très différente, ils représentent nettement plus de la moitié de la microflore bactérienne totale.

	Cocci	<u>Bacillus</u>	<u>Arthrobaacter</u>	batonnets Gran positif	batonnets Gran négatif	Divers
Do	i	34	26	6	25	8
	c	37	42	5	9	7
Bo	i	14	30	4	46	6
	c	6	48	8	28	9
Pe	i	12	45	12	23	8
	c	6	66	5	14	9
Me	i	13	43	6	30	8
	c	4	47	9	35	5
Ly	i	7	38	24	19	12
	c	4	45	7	36	8
Du	i	23	25	9	33	10
	c	10	44	8	28	9
Di	i	20	47	10	18	5
	c	8	65	10	13	3

TABEAU IV

Spectre bactérien des terres étudiées
(100 souches bactériennes sont analysées pour chaque échantillon)



Cette stimulation des Arthrobacter s'effectue d'ailleurs aux dépens des Bacillus dont le pourcentage diminue généralement de moitié dans les sols rhizosphériques. Dans un cas cependant, à partir des échantillons prélevés dans le Douaisis, ces Bacillus, plus nombreux proportionnellement que les Arthrobacter, ont légèrement augmenté dans la parcelle cultivée. Remarquons par ailleurs que cette même terre du Douaisis s'est révélée particulièrement riche en Actinomycètes (tableau II) dont certaines souches étaient productrices d'antibiotiques, donnant de larges zones d'inhibition sur plaques gélosées. Un phénomène d'antibiose semblerait ainsi intervenir en favorisant la prolifération des Bacillus.

Signalons également que dans tous les échantillons analysés, la majorité des souches d'Arthrobacter isolées produisent un pigment jaune-orangé insoluble.

Quant aux bactéries à gram négatif, dont le pourcentage est relativement important dans certains sols (Boulonnais, Mélan-tois, Dunkerquois) elles ne semblent pas être stimulées dans les sols rhizosphériques riches en Arthrobacter, sauf dans les terres limoneuses du Mélan-tois et de la vallée de la Lys. De plus, elles constituent un groupe taxonomique très hétérogène, souvent représenté par les genres Pseudomonas, Flavobacterium, Achromobacter et Acinetobacter ; les genres Agrobacterium, Xanthomonas et Alcaligenes sont toujours absents ou très rares.

Cependant, en fonction de la nature pédologique du sol, nous avons noté parfois une abondance relative de certains germes

à gram négatif : ainsi la microflore des échantillons du Boulonnais s'est révélée particulièrement riche en Flavobacterium (30 % pour Bo i et 19 % pour Bo c), celle du Douaisis en Acinetobacter (9 % pour Do i), celle du Mélantais et de la vallée de la Lys en Pseudomonas (10 % pour Me i et 11 % pour Ly c) et en Achromobacter (11 % pour Me c) comme pour celle du Dunkerquois (10 % pour Du c).

Enfin, signalons l'absence presque complète dans tous les cas, des cocci, la faible proportion des bâtonnets à gram positif, et la présence fréquente de germes coryneformes différents des Arthrobacter, classés dans la catégorie des "Divers".

5) Etude des types nutritionnels

Du tableau V, il ressort que la majorité des souches bactériennes isolées des différentes terres ont des potentialités de synthèse très élevées, puisque dans tous les cas, plus de la moitié des germes peuvent proliférer sur le milieu M avec comme unique source de carbone le glucose. Cependant, les bactéries provenant des sols rhizosphériques se distinguent nettement par une proportion plus élevée de souches exigeantes en acides aminés (type nutritionnel A) par rapport à celles isolées des terres non cultivées. Ces différences se retrouvent d'ailleurs parmi les Arthrobacter lorsqu'on les considère séparément (tableaux VI et VII). Ici encore, ces résultats peuvent s'expliquer par la présence dans les sols rhizosphériques, d'excrétions racinaires riches en acides aminés, qui ont pour effet de stimuler les souches exigeantes en acides aminés aux dépens des germes prototrophes.

	M	A	V	A V	L	T
Do	i	17	1	12	3	3
	c	27	2	13	3	3
Bo	i	8	2	4	0	4
	c	16	0	10	4	6
Pe	i	18	2	13	0	1
	c	26	3	15	1	3
Me	i	17	0	7	1	2
	c	25	1	12	3	3
Ly	i	12	2	8	4	7
	c	26	1	7	5	6
Du	i	10	1	4	4	5
	c	19	0	4	2	3
Di	i	13	2	7	2	7
	c	19	3	15	5	5

TABLEAU V
types nutritionnels des flores telluriques étudiées
(100 souches bactériennes sont analysées pour chaque échantillon)



	nombre de souches analysées	exigences nutritionnelles						
		M	A	V	AV	L	T	
Do	{ i	13	3	1	9	0	0	
	{ c	15	12	1	12	2	0	
Bo	{ i	26	2	0	1	0	1	
	{ c	30	8	0	5	3	2	
Pe	{ i	32	4	0	7	0	2	
	{ c	38	15	2	10	1	0	
Me	{ i	32	10	0	0	0	1	
	{ c	27	17	0	2	0	1	
Ly	{ i	28	2	0	6	0	2	
	{ c	23	8	1	7	2	4	
Du	{ i	18	4	1	0	1	1	
	{ c	33	7	0	1	2	1	
Di	{ i	38	2	2	2	1	2	
	{ c	40	8	2	15	0	0	

TABLEAU VI

Types nutritionnels des Arthrobacter isolés



Références	M	A	V	AV	L	m
Do (i (c	50	11,5	4	34,5	0	0
	36	28,5	2,3	28,5	4,7	0
Bo (i (c	86,7	6,7	0	3,3	0	3,3
	62,5	16,6	0	10,5	6,2	4,1
Pe (i (c	71,1	9	0	15,5	0	4,5
	57,5	22,7	2,2	15,1	1,5	0
Me (i (c	74,4	23,3	0	0	0	2,3
	57,8	36	0	4,2	0	2
Ly (i (c	73,7	5,3	0	15,7	0	5,3
	51,1	17,8	2,2	15,5	4,5	8,9
Du (i (c	72	16	4	0	4	4
	75	15,9	0	2,3	4,5	2,3
Di (i (c	80,8	4,3	4,2	4,3	2,1	4,3
	61,5	12,3	3,1	23,1	0	0

TABLEAU VII

Pourcentages des types nutritionnels des Arthrobacter isolés



Notons également la rareté des bactéries du type nutritionnel V, et des germes très exigeants ne proliférant qu'en présence d'extrait de levure (milieu L) ou d'extrait de terre (milieu T). Signalons d'ailleurs que nous avons classé certaines souches dans ce type nutritionnel T sans que leurs exigences vis-à-vis de ce milieu soit nette : il s'agit le plus souvent, de souches qui prolifèrent difficilement sur les milieux gélosés employés.

Finalement, quelles que soient l'origine pédologique des sols et la nature des cultures végétales en place, les flores bactériennes analysées, parmi lesquelles les Arthrobacter sont prédominants, manifestent toujours des potentialités de synthèse très élevées : elles appartiennent dans leur grande majorité, aux trois types nutritionnels M, A, AV, avec cependant une stimulation relative du type A dans les sols rhizosphériques, aux dépens du type nutritionnel M.

B - EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES MICROBIOLOGIQUES

D'UNE TERRE EN FONCTION DE LA

CROISSANCE DES PLANTES

Le but de cette étude est triple : nous apporter des renseignements sur l'évolution d'une microflore tellurique donnée, d'abord en fonction de la présence d'une végétation, ensuite en fonction de la nature des cultures végétales et enfin, en fonction de l'âge des plantes.

Bien sûr, il faudra prévoir de nombreuses convergences avec les analyses présentées dans le chapitre précédent, mais les conditions expérimentales sont ici beaucoup plus strictes. Tous les prélèvements sont effectués à partir d'une terre non cultivée depuis plusieurs années, ce qui nous permettra d'éliminer le rôle éventuel des apports d'engrais dans les échantillons rhizosphériques. La parcelle de sol expérimentée (6 x 18 m environ), située dans le territoire de la Cité Scientifique, a d'abord été labourée en automne, afin de supprimer la végétation sauvage qui s'y était installée. Puis nous avons pris soin d'empêcher toute prolifération de plante, jusqu'à la période des semis (28.3.71). A ce moment, le champ est divisé en trois parties égales de 6 x 6 m : la parcelle centrale sert de témoin où toute végétation sera continuellement éliminée ; les parcelles latérales sont ensemencées : l'une avec une graminée, le blé et l'autre avec une crucifère, le radis. Les prélèvements de terres ont été effectués simultanément dans

les trois parcelles, en juin correspondant à la saison où les champs sont en pleine croissance végétative et où les excrétions racinaires sont quantitativement plus intenses, et en octobre, qui correspond à la période de senescence des cultures. Pour la parcelle témoin, les échantillons sont prélevés comme précédemment, dans 4 ou 5 endroits différents, à l'aide d'un récipient cylindrique qui est enfoncé jusqu'à une profondeur de 10 cm. Pour les parcelles cultivées, ces prélèvements sont pratiqués au niveau des aires racinaires des plantes, afin de récupérer la terre rhizosphérique.

1) Analyses physico-chimiques

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VIII. Chaque échantillon est désigné par une abréviation composée d'une lettre : T pour la parcelle témoin, B ou R pour les parcelles ensemencées avec le blé ou le radis, et d'un chiffre : 1, 2, 3, ou 4, correspondant à l'ordre des prélèvements dans le temps.

Il ressort de ces résultats que si le pH n'a pratiquement pas varié dans la parcelle témoin, il a par contre diminué assez fortement dans les échantillons rhizosphériques et d'une valeur identique. On peut aussi noter que les teneurs relatives en carbone organique, azote total et matières humiques, sont faibles dans tous les cas ; mais contrairement aux analyses du chapitre précédent, le calcul du rapport C/N fait ressortir une valeur plus élevée pour les parcelles cultivées.

2) Etude des microflores totales

Les résultats obtenus par les numérations de bactéries, Actinomycètes et champignons, sont rassemblés dans le tableau IX.

Nous constatons, pour chacune des microflores, qu'il existe une certaine stabilité dans la parcelle témoin, tout au moins pendant la période étudiée. Par contre, pour les parcelles cultivées, leur évolution est différente suivant la microflore considérée : pour les Actinomycètes et les champignons, nous obtenons une diminution relative de leur population, alors que pour les bactéries, l'effet rhizosphère est très net, en particulier

Références des échantillons	Dates des prélèvements	pH	% humidité	% C	% K	C/N	% matières humiques
T ₁	8 - 2 - 71	7,3	10,6	0,96	0,08	12	0,08
T ₂	3 - 5 - 71	7,1	11	0,95	0,08	11,8	0,08
T ₃	28 - 6 - 71	7,2	11,8	0,94	0,08	11,7	0,07
B ₃	28 - 6 - 71	6,5	12,3	0,90	0,05	18	0,04
R ₃	28 - 6 - 71	6,4	11,8	0,90	0,06	15	0,3
T ₄	15 - 10 - 71	7,2	5,1	0,94	0,08	11,7	0,07
B ₄	15 - 10 - 71	6,6	6,3	0,90	0,06	15	0,04
R ₄	15 - 10 - 71	6,5	2,2	0,88	0,07	12,5	0,04

TABLÉAU VIII

Caractéristiques physico-chimiques des parcelles de terre expérimentées.



Références des échantillons	Bactéries (nombre x 10 ⁶ /g)	Actinomycoètes (nombre x 10 ⁶ /g)	Champignons (nombre x 10 ⁴ /g)
T ₁	30,8	3,5	20
T ₂	34,2	3,4	24,7
T ₃	32,6	3	22,5
B ₃	115	2,6	8,8
R ₃	68	2,3	9,4
T ₄	32	3,6	23,5
B ₄	79,5	3,2	17,5
R ₄	60	2,5	12,5

TABLÉAU IX

Evolution des microflores bactériennes et fongiques.



pour le blé. Cette différence est probablement due à la morphologie du système racinaire fasciculé du blé, permettant ainsi une réponse plus intense de la population bactérienne vis-à-vis des excrétions radicellaires.

3) Etude des groupements fonctionnels

Le tableau X résume l'évolution des trois groupements physiologiques analysés : dans tous les échantillons, nous constatons que les germes ammonifiants sont relativement plus nombreux que les germes protéolytiques et amylolytiques.

Pour la parcelle témoin, il est à noter que la population de chaque groupe fonctionnel diminue en fonction des dates de prélèvements. Cependant, ces résultats ne semblent pas influencer sur les indices d'activité qui restent pratiquement constants.

En ce qui concerne les parcelles cultivées, le nombre de germes de chaque groupement physiologique est généralement plus élevé que dans la terre témoin correspondante, de même que leurs activités, sauf pour l'amylolyse de la microflore rhizosphérique du radis, dont l'indice d'activité reste toujours faible. En fonction de l'espèce végétale expérimentée, qu'ils soient ammonifiants, protéolytiques ou amylolytiques, ces germes fonctionnels sont légèrement plus nombreux dans les terres rhizosphériques du blé ; mais ces résultats ne sont que relatifs, car la microflore bactérienne totale de ces échantillons est aussi plus importante (tableau IX).

Références des échantillons	Nombre de germes proteolytiques (10 x 5/g)	Nombre de germes ammonifiants (x 10 5/g)	Nombre de germes anolytiques (x 10 5/g)	Indices d'activité		
				protéolyse	ammonification	amylolyse
T ₁	40	150	2,8	10	4	4
T ₂	28	180	2,5	9	5	5
T ₃	15	120	2,5	9	4	5
B ₃	45	280	30	14	16	6
R ₃	35	250	17	12	14	2
T ₄	10	100	1,5	8	4	3
B ₄	25	250	25	12	14	6
R ₄	20	250	15	10	14	2

TABLÉAU X

Evolution des groupements fonctionnels



4) Etude du spectre bactérien

Quelle que soit la culture considérée (tableau XI), l'analyse du spectre bactérien révèle toujours une augmentation du nombre d'Arthrobacter, une diminution des Bacillus et des bâtonnets à gram positif dans les terres rhizosphériques. L'inhibition des Bacillus semble cependant plus marquée lorsque les cultures sont en pleine croissance végétative.

Parmi les bâtonnets à gram négatif, dont le nombre est aussi plus élevé dans les échantillons rhizosphériques que dans les témoins, les genres les plus fréquemment isolés sont les Pseudomonas et les Flavobacterium. Mais la présence de ces germes ne paraît pourtant pas en liaison avec l'installation d'une végétation, puisque leurs pourcentages respectifs restent comparables dans les terres témoins et dans les parcelles cultivées (environ 10 % de Pseudomonas, et 5 % de Flavobacterium).

5) Etude des exigences nutritionnelles

Le tableau XII donne le pourcentage des types nutritionnels des microflores bactériennes isolées à partir de trois parcelles de terre.

Il ressort de ces résultats que ces microflores se caractérisent par la présence d'une forte proportion de germes du type nutritionnel M, traduisant ainsi leur pouvoir de synthèse très élevé. Cependant, par rapport à la parcelle témoin, on note dans les échantillons rhizosphériques, une diminution de ce type au profit des souches exigeantes en acides aminés (type nutritionnel A)

Références	Cocci	Bacillus	Arthrobacter	bâtonnets Gram négatif	bâtonnets Gram positif	Divers
T ₁	2	15	42	27 { 8 P 6 F	8	6
T ₂	0	13	43	30 { 10 P 7 F	6	8
T ₃	0	15	45	22 { 6 P 5 F	9	9
B ₃	0	5	50	36 { 13 P 6 F	4	5
R ₃	0	6	52	34 { 10 P 4 F	3	5
T ₄	1	16	45	23 { 8 P 3 F	7	8
B ₄	0	8	52	32 { 9 P 3 F	5	3
R ₄	0	10	55	28 { 7 P 5 F	4	3

TABEAU XI

Evolution du spectre bactérien

P = Pseudomonas

F = Flavobacterium



Par ailleurs, notons dans tous les prélèvements, l'absence presque totale de bactéries exigeantes en vitamines (type V) et le pourcentage relativement important, mais stable, de souches du type nutritionnel AV. Quant aux germes "très exigeants" (type L et T) leur faible proportion et leur évolution peu significative ne permettent pas de comparaisons.

Ces mêmes caractéristiques nutritionnelles se retrouvent également parmi les Arthrobacter considérés séparément (tableaux XIII et XIV) : par rapport à la parcelle témoin inculte, la proportion des Arthrobacter du type nutritionnel M diminue dans les échantillons rhizosphériques au profit des souches exigeantes en acides aminés, et ceci indépendamment de la plante expérimentée. Notons également que le pourcentage des Arthrobacter exigeants en acides aminés, relativement plus élevé dans la rhizosphère du blé que dans celle du radis, est plus important quand les plantes sont en pleine croissance, tout comme le type nutritionnel A des microflores bactériennes (tableau XII). Cependant, l'abondance des Arthrobacter dans les sites rhizosphériques ne semble pas liée à la nature de l'espèce végétale, puisque pour les deux plantes analysées, nous obtenons des résultats tout à fait comparables. Il ne semble donc pas y avoir de spécificité des microflores rhizosphériques en fonction de la plante.

Références des échantillons	Nombre de souches analysées	M	A	V	AV	L	T
T ₁	42	30	4	0	4	3	1
T ₂	43	32	7	0	3	0	1
T ₃	45	32	5	0	6	1	1
B ₃	50	24	15	0	5	2	4
R ₃	52	31	12	0	7	0	2
T ₄	45	33	4	0	4	2	2
B ₄	52	27	13	1	4	3	4
R ₄	55	35	10	1	5	1	3

TABLERAU XII

Types nutritionnels des Arthrobaacter isolés.



Références	M	A	V	AV	L	T
T ₁	65	11	0	15	4	5
T ₂	73	10	0	13	2	2
T ₃	68	13	0	13	2	4
B ₃	52	28	1	12	3	4
R ₃	60	24	0	10	3	3
T ₄	66	10	0	12	6	6
B ₄	57	23	1	13	4	2
R ₄	61	20	1	14	1	3

TABLEAU XIII

Evolution des types nutritionnels de la microflore bactérienne.



Références	K	A	V	AV	L	T
T ₁	71,4	9,5	0	9,5	7,1	2,5
T ₂	74,4	16,2	0	7	0	2,4
T ₃	71,1	11,1	0	13,3	2,2	2,2
B ₃	48	30	0	10	4	8
R ₃	59,6	23	0	13,4	0	4
T ₄	73,4	8,9	0	8,9	4,4	4,4
B ₄	52	25	2	7,6	5,8	7,6
R	63,6	18	18	9	1,8	5,8

TAB. XIV

Pourcentages des types nutritionnels
des souches d'Arthrobacter.



C - DISCUSSIONS ET CONCLUSION

A la suite de ces deux types d'analyses des microflores telluriques en fonction de la nature pédologique des prélèvements et en fonction de la présence d'une culture, nous pouvons faire les remarques suivantes :

1) La population bactérienne est toujours plus importante dans les sols rhizosphériques que dans les terres non cultivées. Cette stimulation des bactéries dans la rhizosphère est un phénomène général constaté par la plupart des auteurs : citons par exemple les travaux assez récents de LEVAL et REMACLE (1969) sur le peuplier, et ceux de RIVIERE (1970) sur le maïs. Les sécrétions racinaires, responsables de cet effet rhizosphère, provoquent également des modifications dans le spectre bactérien, l'activité physiologique ainsi que les exigences nutritionnelles des germes.

2) En ce qui concerne les Actinomycètes et les champignons, les résultats que nous obtenons sont peu significatifs et ne permettent pas de comparaison. Cependant, leur nombre ne semble pas en relation directe avec la présence des cultures. Notons d'ailleurs que KUSTER (1967) trouve plus d'Actinomycètes dans les sols de prairies que dans les terres rhizosphériques correspondantes.

3) A propos des groupements fonctionnels, nos résultats font ressortir une augmentation de l'activité ammonifiante et protéolytique dans les sols cultivés, tout comme l'ont signalé KATZNELSON

(1956 et 1957) pour le blé, l'avoine, le riz, BALIKA (1958) pour le seigle et la vesce, POCHON et coll. (1960) pour le maïs, CHALVIGNAC (1965) pour le lin et BLONDEAU (1972) pour le colza. KING et WALLAC (1956) pour l'avoine, trouvent cependant une diminution de l'activité protéolytique.

Toutes les terres analysées se distinguent par contre par une faible activité amylolytique. Si ROUATT (1959) note pour le blé la présence de nombreux germes amylolytiques, la plupart des auteurs précédemment cités démontrent soit un effet nul, soit une inhibition de ces germes qui ne semble donc pas caractéristique de la rhizosphère.

4) L'étude du spectre bactérien nous a permis de constater une très forte proportion d'Arthrobacter dans toutes les terres analysées. Or, à part le cas des limons souterrains, on n'a jamais signalé leur prépondérance dans les sols superficiels en France. Des travaux ont déjà montré leur importance relative dans certaines régions ; ils forment 45 % de la microflore des terres canadiennes (ROUATT et KATZNELSON, 1961) ; leur pourcentage est aussi assez élevé dans divers sols hollandais et nigériens (MULDER et coll., 1963), ainsi que dans les sols néo-zélandais (ROBINSON et Mc DONALD, 1964). Ces résultats confirment certaines observations effectuées par TAYLOR (1938) : après avoir analysé différentes terres prélevées dans le cercle Arctique, le Sud Canadien, les Côtes Atlantiques et les îles du Pacifique, il constata que 89 sur les 90 échantillons étudiés avaient une microflore dominante constituée de germes coryneformes à morphologie très variable. De même, BURGESS (1958) pense qu'ils représentent 60 à 80 % de la flore totale du sol.

Mais l'augmentation du nombre des Arthrobacter dans les terres rhizosphériques constituent un résultat surprenant, car ces germes ne sont pas considérés habituellement comme rhizosphériques.

La majorité des auteurs : ULJASHOVA (1966) pour la tomate, SKYRING et QUALDING (1969) pour diverses graminées, De LEVAL de REMACLE (1969) pour le peuplier, RIVIERE (1970) pour le maïs, ROVIRA et SANDS (1971) pour le blé, soulignent plutôt l'importance des bactéries de la famille des Pseudomonadacées dans la rhizosphère.

Nous ne pouvons cependant pas mettre en cause nos conditions expérimentales, puisque nous y avons introduit plusieurs variantes. Certains auteurs ont d'ailleurs signalé la présence des Arthrobacter autour du système racinaire des plantes : SPERBER et ROVIRA (1959) trouvent que 63 % des bactéries de la rhizosphère du trèfle et 78 % de celle du ray-grass sont des Arthrobacter ; MITCHELL et HURWITZ (1965) notent également leur abondance dans celle de la tomate et du riz, ainsi que BLONDEAU (1972) dans celle des plantules de colza.

Phénomène curieux : nos résultats font apparaître une diminution très nette des Bacillus dans les microflores rhizosphériques riches en Arthrobacter, exactement comme dans les cas où les Pseudomonas constituent la microflore rhizosphérique. Ainsi RIVIERE (1970) ne trouve que 8,2 % de Bacillus dans la rhizosphère du maïs, alors que la terre témoin en contient 58,8 %. Même dans les sols particuliers comme les zones désertiques, ELVAN et DIAB (1970), notent un phénomène identique pour la rhizosphère de Artemisia monosperma.

5) A propos des groupements nutritionnels, nous avons constaté que la plupart des bactéries telluriques sont prototrophes. Dans les échantillons rhizosphériques, leur proportion reste toujours élevée, mais le pourcentage des souches exigeantes en acides aminés augmente assez notablement. Par contre, quels que soient les échantillons, les bactéries de type nutritionnel V, L ou T sont toujours peu nombreuses, et les valeurs obtenues sont souvent peu significatives.

Dans les terres rhizosphériques, nous avons aussi noté que la stimulation des bactéries exigeantes en acides aminés s'effectue au détriment des germes prototrophes. Les travaux de STREZELCZYKE (1961), CHALVIGNAC (1965), VASANTHARAJAN et BHAT (1967) conduisent aux mêmes observations. Mais nous ne pouvons généraliser ce phénomène, car de nombreux auteurs trouvent que cette stimulation des souches de type nutritionnel A s'établit plutôt aux dépens des germes très exigeants de type L ou T (TARDIEUX et coll., 1960 et 1961 ; SULOCHANA, 1962 ; LOCHEAD et coll., 1965 ; VERONA et coll., 1966).

En considérant les Arthrobacter séparément, nous retrouvons sur le plan nutritionnel, des proportions identiques et la même évolution en fonction de la présence des cultures. Des revues bibliographiques de MORIS (1960), MULDER et coll. (1963 et 1966), GOUNOT (1967) et VELDKAMP (1970) soulignent d'ailleurs les pouvoirs de synthèse souvent élevés des Arthrobacter d'origine tellurique et leur facilité d'adaptation aux diverses conditions écologiques.

En conclusion de ce chapitre, nous constatons donc que les sols de la région du Nord de la France contiennent une flore microbienne très riche en Arthrobacter. Cette particularité du spectre bactérien de ces terres explique la forte proportion des Arthrobacter dans les microflores rhizosphériques et l'absence de spécificité, tout au moins apparente, de ces germes vis-à-vis de la nature des cultures végétales.

3^e PARTIE

APPLICATION DE LA TAXONOMIE NUMERIQUE

A L'ETUDE DU SPECTRE BACTERIEN

D'UNE TERRE

Nous avons vu précédemment que l'originalité de notre méthode d'analyse microbiologique des terres consistait à en étudier ce que nous avons appelé "le spectre bactérien", c'est-à-dire les principaux groupes de germes taxonomiquement définis. Si la connaissance des familles bactériennes colonisant un sol ne peut nous renseigner sur son "état physiologique", caractérisé par la recherche des groupements fonctionnels que l'on ne doit en aucun cas soustraire d'une analyse microbiologique correcte, elle correspond néanmoins à un état d'équilibre de la microflore à un temps donné et dans des conditions écologiques précises. Mais la répartition de ces flores dominantes en genres bactériens dépend essentiellement des critères de détermination adoptés et de l'importance accordée à tels ou tels caractères taxonomiques. Ainsi la connaissance de ces familles bactériennes du sol pose d'abord un problème d'identification de germes, étant donné la diversité des clés utilisables.

Or, dans nos analyses, l'étude de ce spectre bactérien reposait sur la recherche d'un nombre limité de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Il nous a semblé intéressant de vérifier suivant une méthode différente utilisant un grand nombre de critères de la taxonomie bactérienne classique, si ce spectre microbien, tel que nous l'avons défini, correspondait bien à une réalité, dans le contexte d'une population, au sens écologique du terme.

Nous nous sommes donc proposé de tester notre méthode en comparant les résultats qui en découlent avec ceux de la taxonomie numérique. A partir de la microflore bactérienne d'une terre donnée, nous avons ainsi effectué une analyse factorielle des correspondances sur ordinateur. Avant de présenter les résultats relatifs à cette étude, nous décrirons d'abord, en raison de leur particularité, les techniques et les principes qui sont à la base de cette analyse factorielle.

I - MATERIELS ET TECHNIQUES

1) Choix de la microflore expérimentale

La collection de souches nécessaires à cette étude a été isolée à partir d'une terre prélevée dans le Mélantois. Après étalement de suspensions-dilutions sur milieu gélosé modifié de BUNT et ROVIRA, suivant la technique décrite dans la première partie de ce mémoire et incubation pendant 7 jours à 28°C, la numération de la flore bactérienne a donné une valeur voisine de 35×10^6 germes par gramme de sol (rapportée au poids sec).

A partir de plaques gélosées présentant des colonies nettement séparées les unes des autres, nous avons alors constitué notre collection de souches en prélevant les bactéries et en les ensemençant sur le milieu gélosé identique au précédent, mais réparti en tubes inclinés. Les souches sont ensuite numérotées de 1 à 100, après vérification de leur nature spécifiquement bactérienne, ainsi que de leur pureté par examen des cultures sur milieu gélosé, et par observation microscopique de frottis après coloration de Gram. Signalons aussi que nous avons été contraint d'éliminer certaines, à cause de leur faible pouvoir de prolifération sur les milieux gélosés, tout au moins dans nos conditions expérimentales. Etant donné la particularité du travail prévu à partir de cette collection, comportant notamment des séries de repiquages et d'ensemencements, nous risquons en effet d'obtenir pour de telles bactéries des résultats uniformément négatifs et non significatifs.

En appliquant les critères de détermination définis précédemment, nous avons alors analysé le spectre bactérien qui nous a conduit aux résultats suivants :

- 42 souches présentent des cystites sur des frottis préparés à partir de cultures âgées et correspondent donc au genre Arthrobacter.

- 14 sont des bâtonnets à gram positif avec des spores centrales : ce sont des Bacillus.

- 15 sont à gram négatif, mobiles, possédant une cytochrome oxydase et présentant une pigmentation jaunâtre caractéristique du genre Flavobacterium.

- 4 sont à gram négatif, alcalinisent l'arginine en anaérobiose et possèdent les autres caractères des Pseudomonas.

- Parmi les 25 souches qui restent et qui n'ont pu être classées, 14 sont des bâtonnets à gram positif d'aspect polymorphe, 11 des formes diverses.

Afin de faciliter les analyses ultérieures, nous avons ajouté devant le numéro de chaque souche une lettre correspondant à son groupe : ainsi les numéros des Bacillus sont précédés de la lettre B, ceux des Flavobacterium de la lettre F et ceux des Pseudomonas de la lettre P. En ce qui concerne les Arthrobacter, quand les cystites observées sont nettement sphériques et typiques du genre, nous avons fait précéder le numéro des souches par la lettre C ; quand elles sont d'aspect polymorphe allongé ou globuleux c'est la lettre G qui est affectée aux numéros. Etant donné que nous ne savons pas si la morphologie de ces cystites a une signification taxonomique, nous avons voulu attendre les résultats de l'analyse factorielle avant de nous prononcer sur la nature de ces germes.

2) Choix des tests pour la caractérisation des souches en analyse factorielle

Les tests utilisés sont énumérés dans le tableau XV.

Du point de vue théorique, il est évident que la précision de cette méthode numérique d'identification sera d'autant plus grande que le nombre de tests est plus élevé, à condition toutefois que ces épreuves ne donnent pas que des résultats uniformément négatifs ou positifs pour toutes les souches. Aussi, en fonction de notre propre expérience et d'après les résultats obtenus à partir des collections de germes telluriques par BRISBANE et ROVIRA (1965) NIGEL Da SILVA et coll. (1965), GYLLENBERG et RAURAMAA (1966), SKYRING et QUADLING (1968) et SUNDMAN (1968 et 1969), nous avons sélectionné un total de 47 tests.

Pour les modalités opératoires concernant ces tests et la caractérisation des souches, sauf indications contraires, les milieux de culture utilisés sont toujours stérilisés à 115°C pendant 20 min ; tous les ensemencements sont effectués à partir d'inocula liquides âgés de 48 heures et les souches sont incubées à 28°C.

1	réaction de Gram	
2	présence de cystites	
3	présence de spores centrales	
4	production de pigments insolubles	
5	production de pigments solubles	
6	présence d'une cytochrome oxydase	
7	présence d'une catalase	
8	présence d'une uréase	
9	présence d'une phosphatase (acide)	
10	hydrolyse de l'amidon	
11	hydrolyse de la gélatine	
12	résistance au KCN 0,5 %	
13	alcalinisation de l'arginine en anaérobiose	
14	production de SH ₂ à partir de la cystéine	
15	production de céto-lactose à partir du lactose	
16	réduction des nitrates en nitrites	
17	mobilité	
18	type respiratoire	
19	fermentation du glucose	} milieu de HUGH et LEIFSON
20	oxydation du glucose	
21	oxydation de l'arabinose	
22	oxydation du xylose	
23	oxydation du mannitol	
24	oxydation du fructose	
25	oxydation du maltose	} milieu de CHRISTENSEN
26	oxydation du saccharose	
27	utilisation du citrate	
28	utilisation de l'acétate	
29	utilisation du succinate	
30	utilisation du Tween 80	
31	dissolution du CaH PO ₄	
32	résistance à la pénicilline (100 ui/ml)	} milieu de BUNT et ROVIRA liquide
33	résistance à la streptomycine (25 µg/ml)	
34	résistance au chloramphénicol (25 µg/ml)	
35	résistance au NaCl (3 %)	
36	résistance au NaCl (10 %)	
37	croissance à pH 9,0	
38	croissance à pH 4,0	
39	croissance à 37°C	
40	croissance à 4°C	
41	réduction du bleu de méthylène	
42	production d'NH ₄ à partir des peptones	
43	production d'indole à partir des peptones	
44	croissance sur azote minéral	
45	exigences en acides aminés	} milieu liquide de LOCHHEAD
46	exigences en acides aminés et vitamines	
47	exigences en extrait de levure ou extrait de terre	

TABLEAU XV

Tests choisis pour la caractérisation des souches.

- Les caractères morphologiques : réaction de gram, présence de cystites ou de spores centrales sont notés après examen microscopique de frottis effectués le premier et le cinquième jour de culture à 28°C sur le milieu gélosé modifié de BUNT et ROVIRA. La production de pigments solubles ou insolubles est déterminée après ensemencement sur le milieu à base de glycérol déjà décrit précédemment.

- Pour la mise en évidence des différentes enzymes, nous avons utilisé les méthodes suivantes :

. La présence d'une cytochrome oxydase est recherchée à partir de cultures âgées de 24 h, à l'aide du papier réactif "Pathotec-CO" imprégné de diméthyl p-phénylène diamine et d' α -naphthol.

. L'uréase est mise en évidence en incubant à 37°C pendant 2 heures une émulsion de chaque souche en présence de papier réactif "Pathotec-U" imprégné d'urée et de phénophtaléine.

. Pour la phosphatase acide, nous avons utilisé les solutions de réactifs "phosphatases Kit acides" (Merieux) : après incubation des bactéries à 37°C pendant une heure dans une solution tamponnée de phénylphosphate disodique (substrat), la présence de l'enzyme est révélée à l'aide de 4 amino-antipyrine et de ferri-cyanure de potassium.

. La catalase est mise en évidence à partir d'émulsions denses de cultures bactériennes dans de l'eau distillée, à l'aide de l'eau oxygénée.

. Enfin, l'hydrolyse de la gélatine et de l'amidon est recherchée respectivement sur des milieux à base de gélatine nutritive et d'amidon de riz après 7 jours de culture à 28°C.

- L'alcalinisation de l'arginine en anaérobiose est notée après 15 jours d'incubation en milieu semi-solide de THORNLEY (1960) l'anaérobiose étant réalisée en ajoutant, après ensemencement, 1 ml de vaseline stérile à chaque tube. La production de SH_2 est recherchée dans un milieu semi-gélosé renfermant de la cystéine et du citrate de fer ammoniacal après 15 jours de culture à 28°C . Quant à la production de céto-lactose à partir du lactose (BERNAERTS et DE LEY, 1963), elle est révélée à l'aide du réactif de BENEDICT sur des cultures âgées de 48 heures. De même, la réduction des nitrates en nitrites est détectée après un temps d'incubation analogue des souches sur milieu gélosé à base de KNO_3 , à l'aide d'acide sulfamilique et d'-naphtol amine. La recherche de la mobilité et du type respiratoire est effectuée respectivement en gélose molle et en gélose profonde, après 2 à 3 jours de culture.

- Pour l'utilisation des sucres (glucose, arabinose, xylose, mannitol, fructose, saccharose, maltose) nous avons employé la technique de HUGH et LEIFSON (1953) en incorporant 0,5 ml de la solution sucrée à 10 % stérilisée par filtration sur membrane de porosité $0,45\mu$; les résultats sont lus au bout de 5 jours. Quant à l'utilisation de l'acétate, du citrate et du succinate de sodium, incorporés à la concentration de 3 %, c'est le milieu de CHRISTENSEN que nous avons choisi. La dégradation du Tween est testée par la méthode de SIERRA (1957), alors que la dissolution du CaHPO_4 est mise en évidence par la technique de KATZNELSON et BOSE (1959).

- Le milieu liquide de BUNT et ROVIRA a été employé pour l'étude de la résistance aux antibiotiques (pénicilline 100 ui/ml, streptomycine $25\mu\text{g/ml}$, chloramphénicol $25\mu\text{g/ml}$), au chlorure de sodium 3 % et 10 %, au cyanure de potassium 0,5 %, aux pH 9,0 et

4,0, et aux températures d'incubation 37°C et 4°C, les lectures étant toujours effectuées après 5 jours de culture.

- La réduction du bleu de méthylène est recherchée à partir du milieu standard "ULRICH MILK" (**B B L**) ; la production d'ammoniac à partir des peptones est révélée à l'aide du réactif de NESSLER, alors que la production d'indole est mise en évidence après 48 heures d'incubation des souches dans de l'eau peptonée exempte d'indole, à l'aide du réactif de KOVACS.

- La détermination des exigences en facteurs de croissance des souches est effectuée après deux passages successifs dans le milieu liquide de LOCHHEAD ; en fonction de l'exigence considérée (acides aminés, acides aminés et vitamines, extrait de levure ou extrait de terre), le milieu est complété de la même façon que pour l'étude des exigences nutritionnelles par la méthode des répliques sur velours décrite précédemment.

Les résultats de ces tests sont notés par (+) ou par (-) selon que les réactions effectuées sont positives ou négatives, indépendamment de leur vitesse et de leur intensité. En fonction de l'analyse factorielle envisagée, ces résultats sont finalement transcrits sous forme d'une matrice logique dans laquelle les épreuves sont codées 1 ou 0 afin d'être dépouillées ensuite sur ordinateur.

3) Principes de l'analyse factorielle des correspondances

Il n'est pas question de présenter ici l'analyse factorielle en toute rigueur, ni l'analyse des correspondances. Nous nous contenterons d'en rappeler les principes généraux, en nous inspirant des revues bibliographiques de SOKAL et SNEATH (1963) et de celles de BENZECRI (1970).

On désigne par "analyse factorielle générale" quelques principes qui sont à la base des diverses méthodes d'analyses plus spécialisées, comme l'analyse en composantes principales et l'analyse des correspondances. Le but de ces méthodes quantitatives est de proposer une représentation synthétique d'un vaste ensemble d'individus définis selon un nombre important de caractères.

Ainsi, dans notre étude, nous avons employé l'analyse factorielle des correspondances et nous avons défini le tableau de correspondances du type suivant :

caractères ou tests

	1	k	p = 45
individus ou bactéries	i	n _{i k}	n _{i.}
	j	n _{j k}	n _{j.}
	n	n.k	
	= 100		

Ce tableau comporte n individus ou vecteurs - lignes qui sont représentés par les 100 souches bactériennes étudiées, et p caractères ou vecteurs - colonnes correspondant aux 45 tests effectués.

ni. = nombre de tests positifs pour la souche bactérienne i.
 nj. = nombre de tests positifs pour la souche bactérienne j.
 n.k = nombre de souches qui donnent une réponse positive au test k.
 nik = réaction de la souche i au test k (soit 0 ou 1).
 njk = réaction de la souche j au test k (soit 0 ou 1).

a) Distance entre deux individus

Le principe de l'analyse factorielle se ramène ainsi au calcul des distances entre les individus. Ces distances sont choisies de telle façon qu'elles soient faibles pour deux individus présentant deux vecteurs- lignes comparables (c'est-à-dire donnant les mêmes réponses aux 45 tests) et qu'elles soient importantes si les deux individus présentent des vecteurs- lignes sans rapport (c'est-à-dire donnant des réactions différentes vis-à-vis des 45 tests). Les diverses méthodes d'analyse factorielle se distinguent entre elles par le choix de ces distances. Dans le cas de l'analyse des correspondances, ces distances sont notées de la manière suivante :

$$n_{i.} = \sum_{k=1}^P n_{ik} \text{ (somme des termes de la } i^{\text{ème}} \text{ ligne)}$$

$$n_{.j} = \sum_{k=1}^P n_{jk} \text{ (somme des termes de la } j^{\text{ème}} \text{ ligne)}$$

$$n_{.k} = \sum_{i=1}^n n_{ik} \text{ (somme des termes de la } k^{\text{ème}} \text{ colonne)}$$

le carré de la distance entre les individus i et j est donnée par la formule :

$$d^2(i, j) = \sum_{k=1}^P \frac{1}{n_{.k}} \left[\frac{n_{ik}}{n_{i.}} - \frac{n_{jk}}{n_{j.}} \right]^2$$

b) Construction d'un nuage de points

La connaissance de la distance entre chaque couple de bactéries est une manière d'appréhender le maximum d'informations sur le problème posé. Par exemple, à partir de ces distances calculées, on pourrait construire un nuage de points représentant la

distribution de la population bactérienne étudiée : ainsi une série de points groupés ensemble ($i, i', i'' \dots$) correspondront à un type de bactéries qui ont des affinités comparables, alors que deux groupes $\dot{i}$ et $\dot{j}$ séparés par une distance importante, représenteront deux types de bactéries ayant des caractères différents en fonction des tests effectués.



Malheureusement, si la description de ce nuage de points est très simple sur le plan théorique, sa visualisation sur le plan pratique est impossible, puisque sa construction devrait se faire dans un espace à grand nombre de dimensions. Dans notre analyse, les 100 souches bactériennes devraient être représentées dans un espace à $45 - 1 = 44$ dimensions.

c) Projection du nuage de points

Nous allons donc projeter ce nuage de points sur un axe (espace à une dimension), sur un plan (espace à deux dimensions), ou dans un espace à trois dimensions, en choisissant judicieusement l'espace sur lequel nous projetons. C'est l'application de l'analyse factorielle qui permettra de déterminer le meilleur espace comme étant celui sur lequel la déformation du nuage est minimum.

On obtient ainsi des types de graphiques ou "diagrammes" comme ceux que nous représenterons dans la suite de cette étude.

d) Représentation simultanée

Le schéma de calculs proposé est exactement symétrique, car on peut, toujours en calculant des distances, construire un nuage de points correspondant à la distribution des tests qui ont servi à caractériser les individus. Mais la méthode de l'analyse factorielle des correspondances permet aussi d'obtenir directement des représentations simultanées, c'est-à-dire des diagrammes sur lesquels sont projetés à la fois et les individus et les caractères qui les distinguent les uns des autres.

Les nombreux calculs que nécessite l'application de cette analyse numérique impliquent l'emploi de l'ordinateur et de programmes appropriés. Les résultats que nous présentons, ont été obtenus à l'aide des programmes conçus par le laboratoire de Monsieur le Professeur BENZECRI (I.S.U.P. Paris) et adaptés à l'ordinateur I.B.M. 360.25 du Département d'Informatique de l'I.U.T. de Lille.

II - RESULTATS

1) Réponses des souches en fonction des tests employés

Les résultats figurés dans le tableau XVI indiquent le nombre de réactions positives données par les 100 souches bactériennes en fonction des 47 tests effectués. A chaque test, nous avons fait correspondre un numéro qui est le même que celui du tableau XV, et un nom de code comportant quatre lettres. Cette notation, nécessitée par la forme des programmes de l'ordinateur utilisé, sera également employée pour certaines représentations graphiques.

Précisons que les chiffres donnés dans ce tableau n'ont qu'une valeur relative. De plus, une valeur nulle ou égale à 100, c'est-à-dire une réponse uniformément négative ou positive d'un test pour toutes les souches, est un résultat sans signification taxonomique dans le cadre de cette étude. Ainsi, nous pouvons constater que les tests numéro 15 et 43 : la production de céto-lactose et la production d'indole, n'apportent aucune information : nous pouvons donc les éliminer pour la suite de l'analyse factorielle qui se réduit finalement à l'utilisation de 45 caractères.

2) Résultats donnés par l'analyse factorielle

L'analyse factorielle effectuée à partir de nos résultats, nous a conduit à considérer trois plans particulièrement significatifs, c'est-à-dire donnant le maximum d'information sur la population bactérienne : les plans déterminés respectivement par les axes (1 et 2), (1 et 3), (1 et 4). La projection sur chacun de ces plans des 100 souches en fonction des 45 tests effectués,

N° des tests	Notation des tests	nombre de réponses positives
1	GRAM	74
2	CYST	29
3	SPOR	16
4	PIGI	29
5	PIGS	5
6	COXY	36
7	CATA	50
8	UREA	20
9	PHAC	21
10	AMYL	45
11	GELA	70
12	RCYA	54
13	ARGI	4
14	CSH2	4
15	CETO	0
16	NITR	51
17	MOBI	46
18	AERO	81
19	GLUF	55
20	GLUX	11
21	ACAR	60
22	ACXY	80
23	ACOL	94
24	ACFR	55
25	ACMA	33
26	ACSA	41
27	UCIT	56
28	UACE	90
29	USUC	66
30	UTWE	41
31	DICA	37
32	RPEN	26
33	RSTR	10
34	RCHL	14
35	NaO3	64
36	Na10	6
37	CpH9	78
38	CpH4	2
39	CT37	29
40	CT04	10
41	REDB	28
42	PNH4	32
43	INDO	0
44	MGOO	56
45	MGAO	28
46	MGAV	9
47	MGLT	7

TABLEAU XVI

Pourcentage de réponses positives données par les souches en fonction des tests employés.



nous a donné les "diagrammes individus" (1 x 2) (1 x 3) (1 x 4) sur lesquels nous allons analyser la distribution de la population, ainsi que le regroupement des souches.

a) Groupeement des souches en fonction des résultats de l'analyse factorielle

A partir de l'examen simultané de ces trois diagrammes-individus, représentés ci-après, nous avons pu délimiter un certain nombre de "classes" comprenant des souches qui restent généralement groupées dans chacun des trois plans considérés. Rappelons que le numéro de chaque bactérie est précédé d'une lettre qui indique son groupe défini par notre méthode habituelle d'étude du spectre microbien.

Ainsi, nous avons pu différencier 4 "classes" au sein de la population bactérienne : les "classes" A, B, F et P, présentant d'ailleurs une répartition inégale autour du centre de gravité fictif du nuage d'individus, matérialisé par l'origine (OR). Sur le diagramme (1 x 2) les classes A, B et F se distinguent très nettement les unes des autres ; cependant dans ce plan, la classe F semble confondue avec P, et c'est seulement en considérant les plans (1 x 3) et (1 x 4) que leur discrimination devient plus apparente.

Mais d'après leur mode de regroupement dans les trois systèmes d'axes, les individus qui composent chacune de ces quatre classes, semblent pouvoir se subdiviser en "sous-classes". Dans le tableau XVII, nous avons donné la liste des souches qui constituent chacune des sous-classes ainsi obtenues.

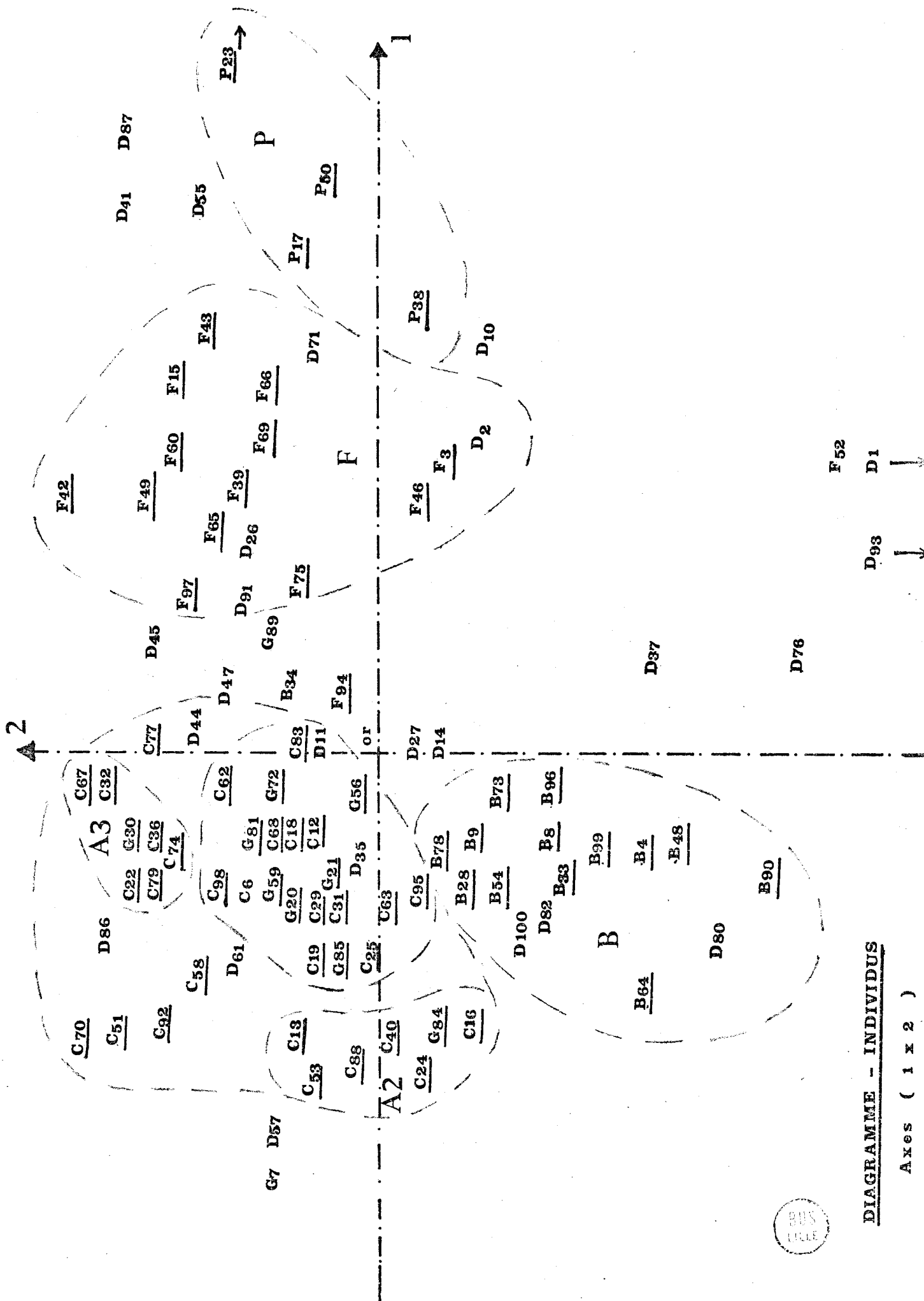
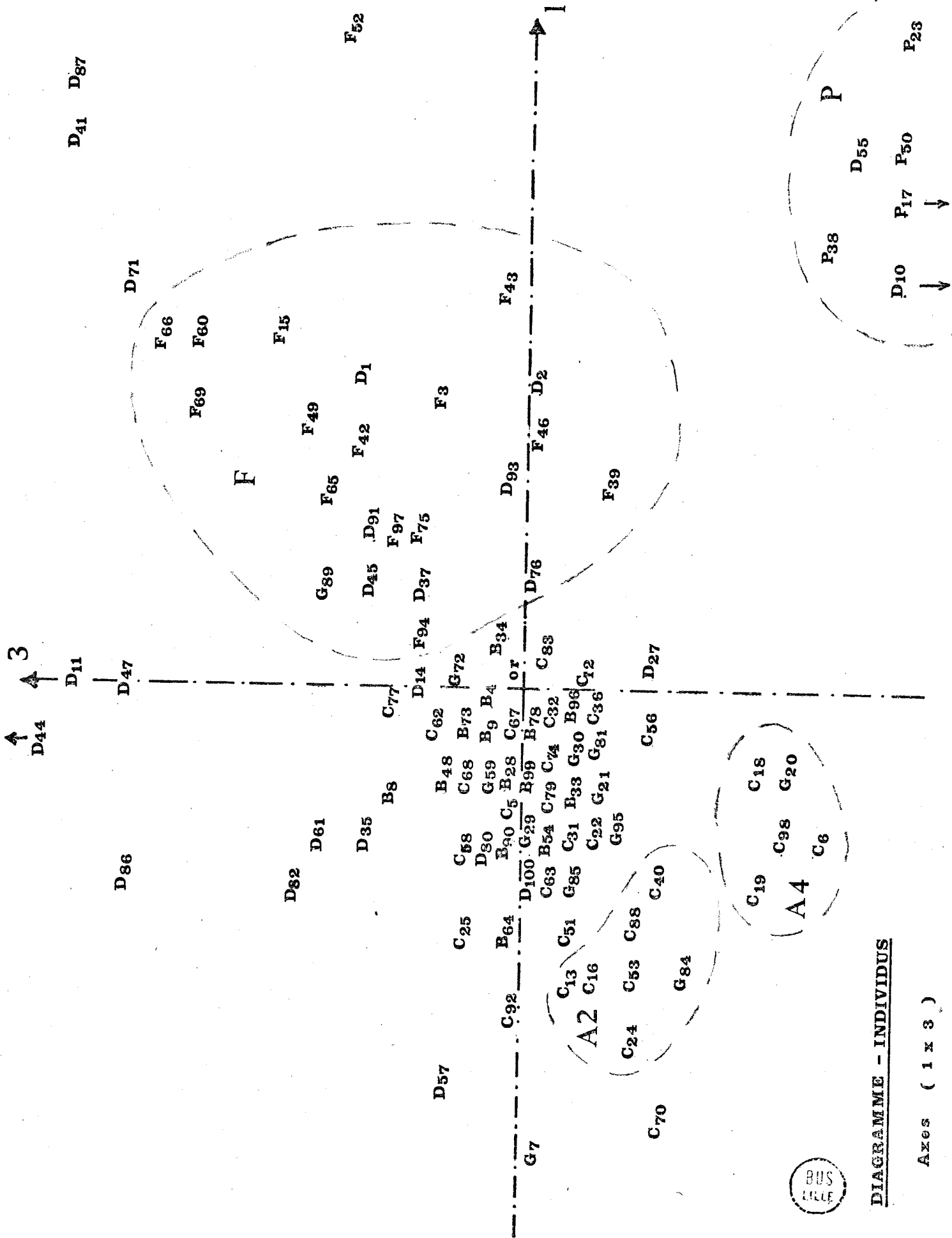


DIAGRAMME - INDIVIDUS

Axes (1 x 2)



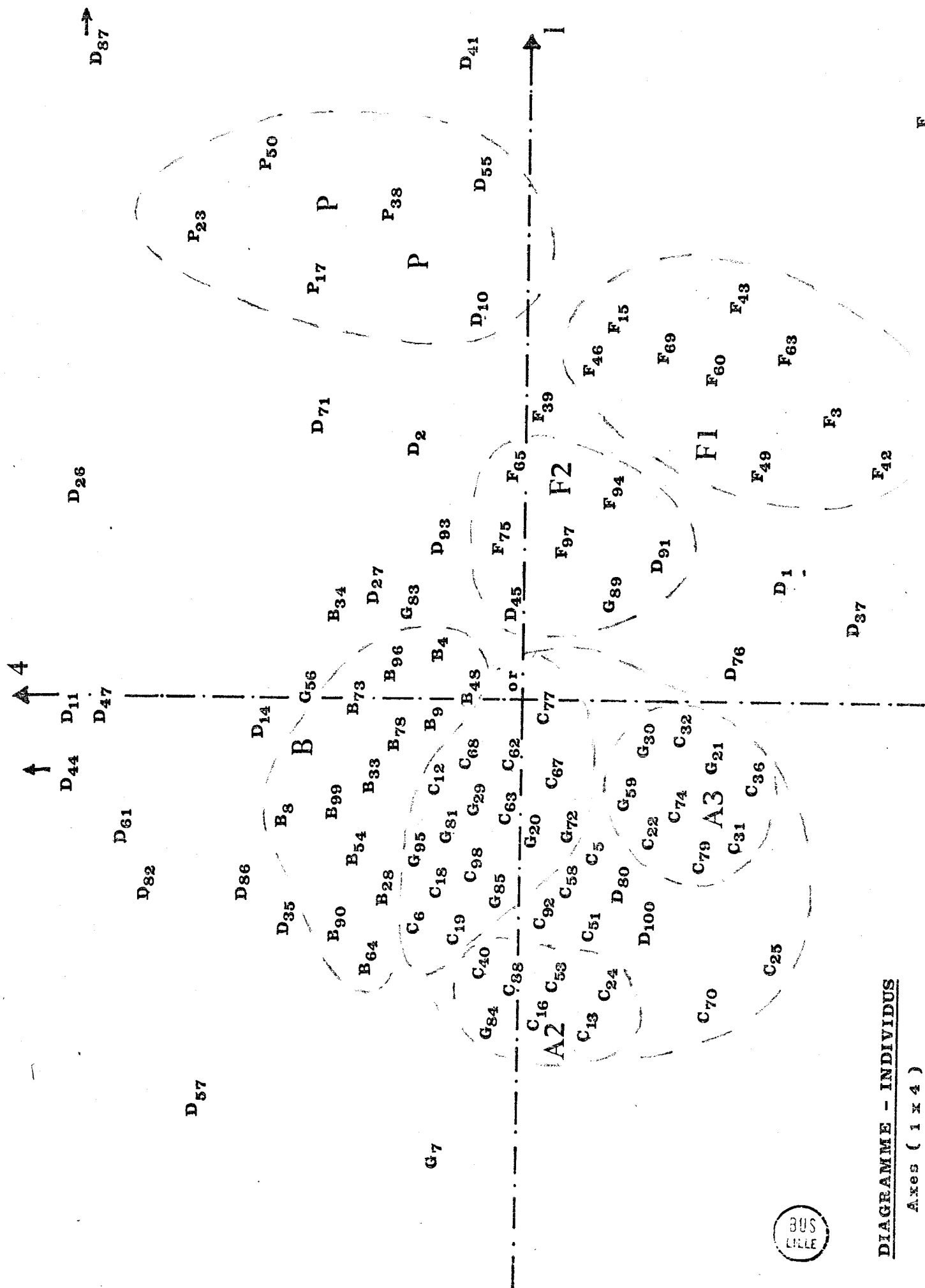


DIAGRAMME - INDIVIDUS

AKG (IX4)

- A partir des 40 individus de la classe A, nous voyons qu'il est possible de reconnaître quatre sous-classes : la sous-classe A1 comprenant des souches restant toujours groupées quel que soit le système d'axes considéré, et présentant donc des affinités très étroites entre elles ; la sous-classe A2, peu apparente dans le diagramme (1 x 2), mais facilement différenciable dans le plan (1 x 3), la sous-classe A3, reconnaissable surtout dans le diagramme (1 x 2), et la sous-classe A4 dans le système d'axes (1 x 3).

Signalons que 5 souches de la classe A (C51, C58, C70, C77, C92) n'ont pu être regroupées, en raison de leur manque d'affinité avec l'une de ces sous-classes.

- Quant aux 14 individus de la classe B, en considérant les trois diagrammes précédents, nous constatons qu'en dehors de la souche B34, ils ne forment pratiquement qu'un seul groupe. Cependant, après une analyse factorielle complémentaire portant sur les "non tests" (c'est-à-dire à partir de l'inverse des résultats des 45 tests), analyse dont nous ne rapportons pas les diagrammes afin de faciliter la lecture de ce mémoire, nous avons pu différencier la présence de deux sous-classes B1 et B2 (diagramme non-tests 1 x 2).

- Les 17 individus de la classe F peuvent également se subdiviser en deux sous-classes F1 et F2, reconnaissables surtout dans le plan (1 x 4). Mais une souche F39, ne semble pas présenter d'affinité avec ces deux sous-classes.

- Enfin, étant donné le nombre restreint d'individus de la classe P (6 souches), groupés principalement dans le diagramme (1 x 3), aucune sous-classe n'est apparente.

Classes	sous-classes	souches
A	A1	C5, C12, G21, C25, G29, C31, G56, G59, C62, C63, C68, G72, G81, G83, G85, G95
	A2	C13, C16, C24, C53, G84, C88
	A3	C22, G30, C32, C36, C67, C74, C79
	A4	C6, C18, C19, G20, C98
	souches non classées	C51, C58, C70, C77, C92
B	B1	B8, B9, B28, B54, B64, B73, B78
	B2	B4, B33, B48, B90, B96, B99
	souche non classée	B34
F	F1	G3, F15, F42, F43, F46, F49, F60, F66, F69
	F2	D45, F65, F75, G89, D91, F94, F97
	souche non classée	F 39
P	-	D10, P17, P23, P38, P50, D55

TABIEAU XVII

Groupements des souches en fonction de l'analyse factorielle (diagrammes individus (1x2) (1x3) (1x4) et diagrammes non-tests correspondants)



- Ces quatre classes nous ont ainsi permis de rassembler un total de 77 souches sur notre collection bactérienne. Parmi les 23 souches qui restent, étant donné leur large distribution dans les diagrammes, il n'a pas été possible de constituer de classe suffisamment significative.

b) Résultats donnés par l'analyse des correspondances

Grâce à la représentation simultanée des diagrammes individus et des diagrammes caractères, la méthode de l'analyse factorielle va nous permettre de rechercher les relations entre les classes bactériennes précédemment définies et les tests qui les différencient les unes des autres. Par contre, cette première analyse ne suffit pas pour caractériser les sous-classes : pour cela, il est nécessaire d'effectuer la même étude numérique à partir de chacune des classes bactériennes obtenues. Ce travail est actuellement en cours au laboratoire d'Informatique, et n'ayant pas ses résultats au moment de la rédaction de ce mémoire, nous nous limiterons uniquement à l'analyse des correspondances en fonction des classes.

Etant donné que la distribution des tests est pratiquement la même que les diagrammes (1 x 3) et (1 x 4) relatifs aux caractères, nous avons surtout étudié ces correspondances à l'aide des graphiques (1 x 2) et (1 x 3). Rappelons que le nom de chaque test est représenté par une abréviation de quatre lettres, dont la signification est donnée dans les tableaux XV et XVI. Précisons également que sur ces diagrammes, les tests qui sont rassemblés autour de l'origine sont peu spécifiques, les plus significatifs

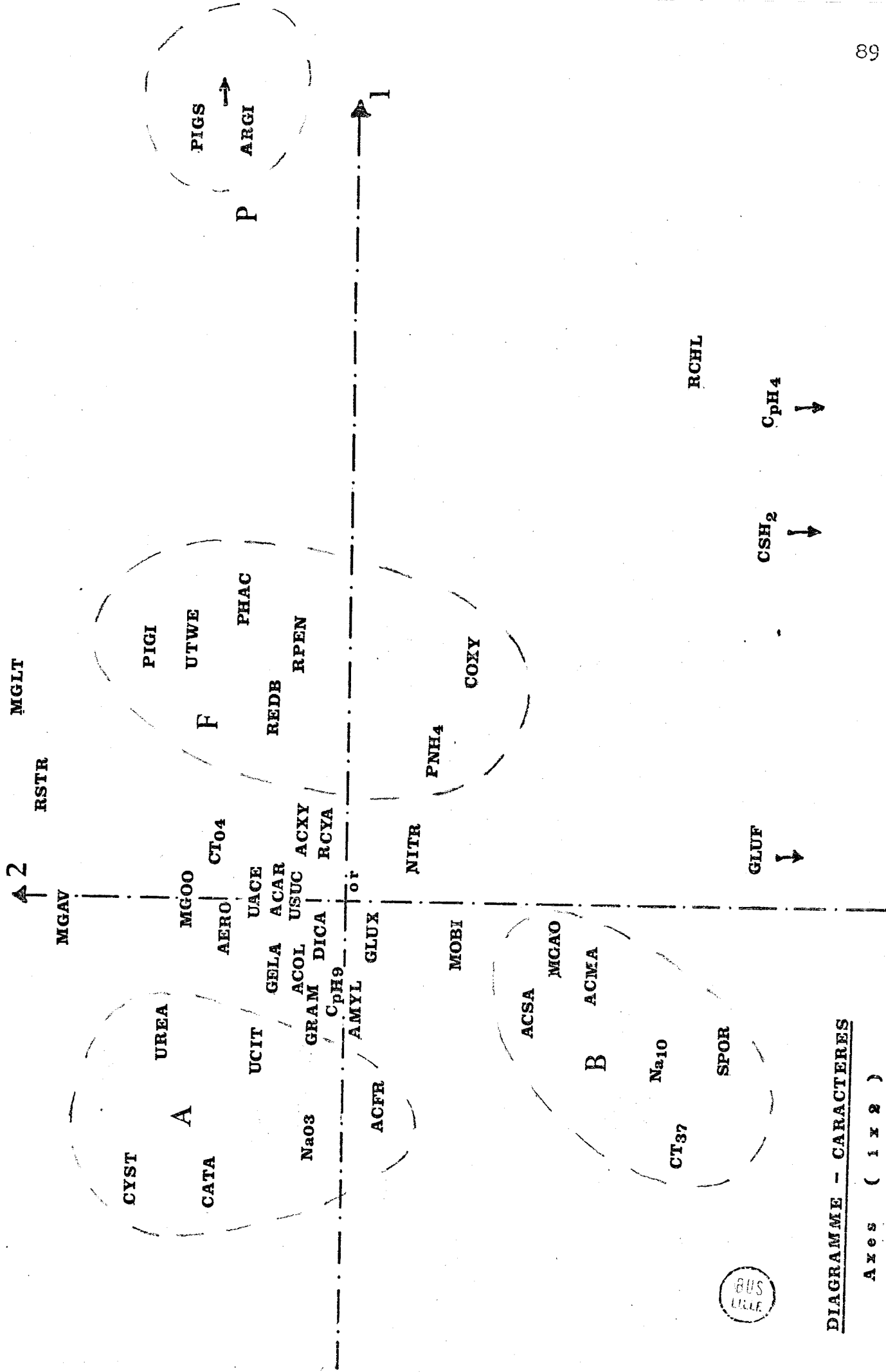


DIAGRAMME - CARACTERES

Axes (1 x 2)



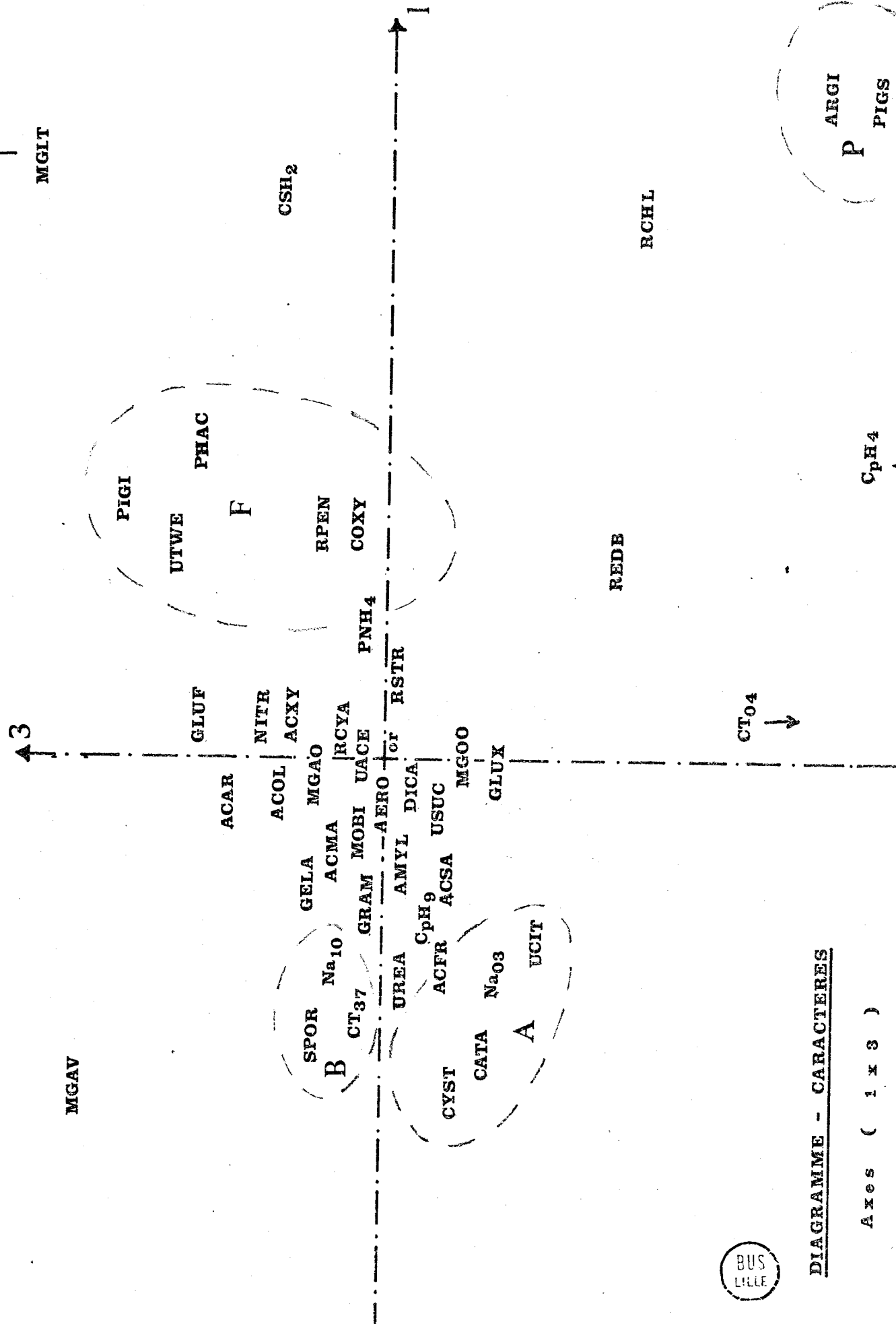


DIAGRAMME - CARACTERES

Axes (1 x 3)



étant ceux qui sont les plus éloignés de cette origine, et occupant la position de plan correspondant à une classe bactérienne.

Ainsi, l'examen simultané des diagrammes caractères (1 x 3) et des diagrammes individus correspondants, montre que la classe A peut être différenciée à l'aide de 5 tests : en premier lieu CYST (présence de cystites) et CATA (présence d'une catalase), puis UCIT (utilisation de citrate) et NaO_3 (résistance à NaCl 3 %) et enfin ACFR (acidification du fructose) qui n'est cependant que relativement spécifique.

De la même façon, à la classe B correspondent les tests SPOR (présence de spores centrales) et CT37 (croissance à 37°C).

La classe F semble se caractériser par la production de pigments insolubles (PIGI), l'utilisation du Tween 80 (UTWE) et, dans une certaine mesure, la présence d'une phosphatase acide (PHAC).

Enfin, la classe P est identifiable à l'aide des tests PIGS (production de pigments solubles) et ARGI (alcalinisation de l'arginine en anaérobiose). Ces deux réactions semblent cependant très spécifiques en raison de leur position toujours excentrique sur les diagrammes.

3) Comparaisons entre les résultats donnés par l'analyse factorielle et ceux obtenus à l'aide de notre méthode.

Ces comparaisons sont résumées dans le tableau XVIII. La première colonne indique le nombre de souches correspondant à chacune des classes A, B, F et P déterminées par l'analyse factorielle et la deuxième colonne, le nombre de souches que nous avons classées parmi les Arthrobacter, les Bacillus, les Flavobacterium, les Pseudomonas.

classes ou genres bactériens	nombre de souches groupées après analyse factorielle	nombre de souches caractérisées par notre méthode	souches classées selon notre méthode mais non groupées après analyse factorielle	souches non classées selon notre méthode mais groupées après analyse factorielle
A = <u>Arthrobacter</u>	40	42	2	0
B = <u>Bacillus</u>	14	14	0	0
F = <u>Flavobacterium</u>	17	15	1	3
P = <u>Pseudomonas</u>	6	4	0	2

tableau XVIII

Comparaison des résultats donnés par l'analyse factorielle avec les résultats obtenus à l'aide de la méthode précédemment décrite.



Nous constatons que dans l'ensemble, les résultats de l'analyse factorielle confirment notre répartition initiale des souches, puisque les 14 *Bacillus* correspondent exactement à la classe B ; parmi les 42 souches qui présentent des cystites et que nous avons appelées Arthrobacter, deux seulement ne sont pas groupées dans la classe A (G7 et G89). Pour les 15 souches à gram négatif ayant une cytochrome oxydase, mobiles et produisant des pigments insolubles, que nous avons identifiées comme Flavobacterium, une seule (F52) ne fait pas partie des 17 individus de la classe F, qui comprend cependant en plus trois autres souches D45, G89 et D91. Par contre, les quatre souches arginine + que nous avons appelées Pseudomonas, correspondent bien à la classe P, qui regroupe en plus deux autres individus (D10 et D55) qui ne sont pas arginine +. Signalons enfin que parmi les 100 souches étudiées, 23 n'ont pu être classées par l'analyse factorielle, tout comme les 25 individus que nous avons rassemblés dans les "Divers".

Afin de mieux visualiser ces comparaisons, nous avons, dans le diagramme individus (1 x 2), souligné toutes les souches pour lesquelles l'analyse numérique a confirmé l'appartenance aux genres bactériens définis par notre méthode d'étude du spectre microbien.

III - DISCUSSIONS et CONCLUSION

Notre intention, en entreprenant cette analyse numérique, était de comparer les groupements de germes telluriques, définis suivant des méthodes microbiologiques propres basées sur un nombre limité de critères et ceux donnés par une méthode numérique utilisant un nombre important de caractères. A partir des résultats obtenus, nous pouvons faire les remarques suivantes :

1) Le spectre bactérien d'une terre, tel que nous l'avons jusqu'ici étudié en employant un nombre réduit d'observations et en regroupant les souches par genres, correspond à une réalité écologique, puisque l'analyse factorielle, à quelques souches près, donne une répartition en "classes" identique à la précédente. Ces groupements, dans le cas de l'échantillon de sol expérimenté, sont représentés par les Arthrobacter, les Bacillus, Les Flavobacterium et les Pseudomonas.

2) De plus, l'analyse numérique a permis de révéler à l'intérieur des classes différenciées, l'existence de sous-classes que nos méthodes microbiologiques ne permettaient pas de déceler, et il sera intéressant de connaître les caractères qui nous permettront de les distinguer rapidement.

3) L'analyse factorielle précise également que les souches corynéformes présentant des cystites globuleuses, sont à considérer comme des Arthrobacter, car elles restent généralement groupées avec les souches produisant des cystites typiques. Ce résultat prouve que la morphologie particulière de ces cystites (sphériques, allongées ou globuleuses) n'a pas de signification taxonomique stricte et confirme les travaux de MULDER et coll. (1963), GOUNOT (1967), MULLAKHANBAI et BHAT (1967) suivant lesquels les Arthrobacter peuvent présenter des cystites de formes très variables, dépendant non seulement des souches, mais aussi des conditions culturelles.

4) En ce qui concerne les correspondances entre les groupement bactériens et les tests permettant de les différencier, l'analyse factorielle a fait ressortir l'intérêt de certains caractères physiologiques ou biochimiques qui pourront être utilisés comme complément pour l'identification des germes telluriques.

Ainsi pour les Arthrobacter, si la présence de cystites reste le critère sélectif le plus rapide et le plus sûr, dans certains cas, la présence d'une catalase, la résistance au NaCl 3 %, l'utilisation du citrate, et l'acidification du fructose, peuvent confirmer un diagnostic hésitant.

De même pour les Bacillus, en dehors de la présence de spores centrales, la croissance à 37°C et dans une certaine mesure la résistance à NaCl 10 %, peuvent aider dans leur détermination. Cette faculté de pouvoir proliférer à 37°C est d'ailleurs soulignée comme test spécifique par SUNDMAN (1970), alors que GYLLENBERG et coll. (1966), ainsi que SKYRING et coll. (1968) en restent à la seule considération de la présence de l'endospore.

Pour les Flavobacterium, nous avons vu que l'utilisation du Tween 80 pouvait représenter un critère d'identification utile ; cependant, il serait intéressant de vérifier l'intérêt de ce test en étudiant des Flavobacterium telluriques d'origine différente.

5) Enfin, cette analyse factorielle nous a montré que le genre Pseudomonas défini par le test arginine, correspond à un groupement bactérien dont les limites sont probablement trop restreintes. Nous pensons que cette définition doit être élargie afin d'inclure également certains germes arginine-, à gram négatif, produisant un pigment soluble et ayant une cytochrome oxydase. Le nombre restreint de souches de Pseudomonas que nous avons isolées de l'échantillon de terre analysé ne nous permet cependant pas de préciser les limites exactes, ni la signification écologique de ce groupe.

CONCLUSIONS GENERALES

Le but du travail que nous avons entrepris a consisté essentiellement à mettre en évidence les principaux groupements bactériens présents dans la microflore des sols de la région du Nord de la France.

Afin de mener à bien cette étude, nous avons tout d'abord mis au point une méthodologie particulièrement adaptée à ce genre de travail. Cette méthodologie comporte des analyses, dont certaines comme la détermination des caractéristiques physico-chimiques, l'évaluation du nombre de bactéries, d'actinomycètes et de champignons, ainsi que l'évaluation des groupements fonctionnels de germe sont assez classiques, alors que d'autres, telles que l'analyse du spectre bactérien et de ses exigences nutritionnelles, le sont beaucoup moins.

A l'aide de ces méthodes, nous avons procédé à l'étude de 14 échantillons de terre de nature pédologique très variée. Dans chaque site choisi, les prélèvements ont été effectués simultanément dans une parcelle inculte et dans une parcelle cultivée, située à proximité de la précédente. Dans la même optique de travail, nous avons ensuite analysé l'évolution d'une microflore tellurique en fonction du développement de deux plantes : une graminée : le blé, et une crucifère : le radis. De ces recherches, il découle que :

- 1) La population bactérienne comprise entre 10 et 30 millions de germes par gramme pour les sols incultes augmente de façon sensible dans les terres cultivées où elle atteint généralement 20 à 60 millions de germes par gramme.

2) En ce qui concerne les Actinomycètes et les champignons, les chiffres obtenus présentent parfois des variations plus importantes en fonction des échantillons. De plus, il ne semble pas que leur nombre soit en rapport direct avec la présence d'une végétation.

3) Si les groupements fonctionnels de germes ne sont pas plus importants numériquement dans les sols rhizosphériques, l'indice d'activité que nous leur avons attribué y est par contre toujours plus élevé, que ce soit pour les germes ammonifiants, protéolytiques ou amylolytiques.

4) Les corynébactéries du genre Arthrobacter constituent dans tous les cas la flore bactérienne dominante des terres analysées. Leur proportion, dans certains échantillons, atteint plus de 50 p. 100 des bactéries isolées. Parmi les autres genres répertoriés, nous avons toujours retrouvé des proportions assez élevées de Bacillus, et d'une façon plus fluctuante, des Flavobacterium, des Pseudomonas, des Achromobacter et des Acinetobacter. Quant aux cocci, il se sont révélés très rares, quels que soient les prélèvements considérés.

5) La densité de ces Arthrobacter, déjà très élevée dans les terres incultes, augmente encore lorsque le sol supporte une culture. Par contre, la présence des sécrétions racinaires dans ces échantillons rhizosphériques provoque une diminution relative du nombre de Bacillus.

6) L'étude des types nutritionnels des souches bactériennes isolées, prouve que celles-ci, dans leur grande majorité, ne manifestent aucune exigence particulière en facteurs de croissance ; cependant, dans les sols rhizosphériques, la proportion de ces germes probiotrophes diminue également au profit des souches exigeantes en acides aminés. Les mêmes caractéristiques nutritionnelles se retrouvent parmi les souches d'Arthrobacter lorsqu'on les considère séparément.

Afin de prouver que la technique employée pour l'établissement du spectre bactérien repose sur des critères significatifs, et que celui-ci constitue une réalité écologique, nous avons effectué, à partir d'une collection de 100 souches bactériennes isolées d'une terre de référence, une étude numérique basée sur l'analyse factorielle des correspondances. Les résultats obtenus ont permis de confirmer que le spectre bactérien, tel que nous le définissons, est parfaitement utilisable pour une étude microbiologique complète, car il traduit une certaine distribution de la population bactérienne d'une terre. De plus, cette analyse factorielle a fourni des renseignements complémentaires qui nous permettront de parfaire notre technique d'analyse des sols



R E S U M E .

Les caractéristiques microbiologiques d'une série d'échantillons de terre prélevés dans la région du Nord de la France ont été étudiées en fonction, soit du site pédologique des prélèvements, soit de la présence d'une culture végétale. Le spectre bactérien de ces échantillons a révélé la présence constante de nombreux Arthrobacter dont la proportion augmente quand les échantillons proviennent de parcelles cultivées. Dans ce dernier cas, leurs potentialités de synthèse sont cependant légèrement modifiées. Les Bacillus, Flavobacterium, Achromobacter et Acinetobacter constituent les autres genres bactériens dominants.

Une étude numérique de la microflore tellurique, basée sur l'analyse factorielle des correspondances, et traitée sur ordinateur d'après un programme de Benzecri, a permis finalement de mettre en évidence l'intérêt écologique de l'étude du spectre bactérien.

BIBLIOGRAPHIE

- 102 -
- BALICKA N. - Activité biologique comparée des rhizosphères du
sègle et de la vesce en culture pure ou mixte. - Ann. Inst.
Pasteur., 1968, 95, 480 - 491.
- BARJAC H. & CHALVIGNAC M.A. - Nouvel essai sur la détermination
du pouvoir amylolytique. - Ann. Inst. Pasteur., 1957, 87, 85p
- BENZECRI J.P. - Problèmes et méthodes de la taxonomie. - Revue de
statistique appliquée., 1970, 28, 73-98.
- BERLAND B.R., BLANCHI M.G. & MAESTRINI S.Y. - Etudes des bactéries
associés aux algues marines en culture. Détermination des
espèces. - Mar. Biol. Germ. 1969, 2, 350-355.
- BERNAERTS M.J. & DELEY J. - A biochemical test for crown-gall
bacteria. - Nature, Lond. 1963, 197, 406-407.
- BLONDEAU R. - Les Arthrobacter de la microflore des plantules de
Colza. - Ann. Inst. Pasteur, Lille, 1970, 21, 295-305.
- BLONDEAU R. - Contribution à l'étude des interactions plantes-
bactéries au niveau de la rhizosphère. - Thèse Sc. Nat.
Lille, 1972, 209 p.
- BREES R.S., MURRAY E.G.D. & SMITH N.R. - Bergey's Manual of
Determinative Bacteriology. - 7e edit., Williams and
Wilkins, Baltimore, 1957.
- BRISPANE P.G. & ROVIRA A.D. - A comparaison of methods for
classifying rhizosphère bacteria. - J. Gen. Microbiol.,
1961, 26, 379-392.
- BUNT J.S. & ROVIRA A.D. - Microbiological studies of some suban-
tarctic soils. - J. Soil Sci., 1955, 6, 119-128.
- BURGES A. - Micro-organisms in the soil. - Hutchinson and co.,
Ltd, London., 1958, 532 p.
- BUTTIAUX R., BEERENS H. & TACQUET A. - Manuel de techniques bac-
tériologiques. - Ed. Medicales Flammarion, Paris, 1969, 707p.

- CHALVIGNAC M.A. - Contribution à l'étude de la rhizosphère du lin.
Thèse, Paris, 1965, 127 p.
- CHALVIGNAC M.A. - Validité de l'extrait de terre pour la numération
de la flore totale. - Pédologie, 1957, 7, 109-111.
- CLARK F.E. - Bacteria in soil. - Soil Biology, Burges A, and Raw.
F. eds, London and New-York Press., 1967, 15-47.
- DOMMERGUES Y. & MANGENOT F. - Ecologie microbienne du sol. - Masson
ed., Paris, 1970, 796 p.
- ELWAN S.H. & DIAB A. - Studies in desert microbiology. IV. Bacte-
riology of the root region of a fodder xerophyte in relation
to environment. - U.A.R.J. Bot., 1970, 13, 159-169.
- GONTCHAROFF N. - Clé d'identification des bactéries liétérotrophes
aérobies ou anaérobies facultatives. (Sous embranchement
EUBACTERIA). - Dunod. Paris, 1971, 97 p.
- GOUNOT A.M. - La microflore des limons argileux souterrains : son
activité productrice dans la biocoenose cavernicole. -
Annales de Spéléologie, 1967, 22, fasc. 1, 121 p.
- GOUNOT A.M. - Rôle biologique des Arthrobacter dans les limons
souterrains. Ann. Inst. Pasteur, 1967, 113, 923-945.
- GYLLENBERG H. - The "rhizosphère effect" of graminaceous plants
in virgin soils. - Physiol. Plant., 1955, 8, 644-652.
- GYLLENBERG H. & RAURAMAA V. - Taxometric models of bacterial soil
populations. Acta. Agr. Scand. 1966, 16, 29-38.
- HENDRIE S., HOGKISS W. & SCHEWAN J.M. - Considerations on organisms
of the Achromobacter - Alcaligènes group. - Ann. Inst. Pasteur
Lille, 1964, 15, 43-54.
- HOLDING A.J. - The properties and classification of predominant
Gram negative bacteria in soil. - J. Appl. Bacteriol. 1960,
23, 515-524.

- HUGH R. & LEIFSON E. - The taxonomic significance of fermentative versus oxydative metabolism of carbohydrate by various Gram négative bacteria. - J. Bact. 1953, 66, 24-26.
- KATZNELSON H., ROUATT J.W. & PAYNE T.M.B. - Recent studies on the microflora on the rhizosphère. - Rapp. VI Cong. Intern. Sci. Sol Paris, 1956, 3, 151-156.
- KATZNELSON H. & ROUATT J.W. - Studies on the incidence of certain physiological groups of bacteria in the rhizosphère. - Can. J. Microbiol., 1957, 3, 265-269.
- KATZNELSON H. & BOSE B. - Metabolic acticity and phosphate-dissolving capability of bacteril isolates from wheat roots, rhizosphère, and non rhizosphère soil. Can. J. Microbiol. 1959, 5, 79-85.
- KING H. de L. & WALLACE R.H. - Morphological and physiological groups of soil bacteria from the roots of barley and oats. Can. J. Microbiol., 1956, 2, 473-481.
- KÜSTER E. - The Actinomycètes. - Soil Biology, Burges A, and Raw F, eds London and New-York press, 1967, 11-124.
- LAJUDIE J. & CHALVIGNAC M.A. - Appréciation de l'activité protéolytique de la microflore du sol. - Ann. Inst. Pasteur, 1956, 90, 359-361.
- LEDERBERG J. & LEDERBERG E.M. - Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. - J. Bact. 1952, 63, 187-190.
- LEVAL J. & REMACLE J. - A microbiological study of the rhizosphère of poplar. - Plant and Soil., 31, 31-47.
- LOCHHEAD A.G. & CHASE F.E. - Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora. - Soil. Sci., 1943, 55, 185-195.
- LOCHHEAD A.G. & ROUATT J.W. - The "rhizosphère effect" on the nutritional groups of soil bacteria. - Proc. Soil. Soc. Ann., 1955, 12, 48-49.

- LOCHHEAD A.G. - Qualitative studies of soil microorganisms : XV : capability of the predominant bacterial flora for synthesis of various growth factors. - Soil. Sci., 1957, 84, 395-403.
- MARGARET S.H., MITCHELL T.G. & SHEWAN J.M. - The identification of yellow pigmented Rods. - Identification Methods for microbiologists, partie B, Academic Press, 1968, 67-78.
- MARTIN J.P. - Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. - Soil Sci., 1950, 69, 215-217.
- MITCHELL R. & HURWITZ E. - Suppression of Phytium by lytic rhizosphere bacteria. - Phytopath., 1965, 55, 156-158.
- MOORE H.B. & PICKETT M.J. - The Pseudomonas-Achromobacter group. - Can. J. Microbiol., 1960 a, 6, 35-42.
- MORRIS J.G. - Soil bacteria : nutritional requirements of predominant bacterial flora. - J. Gen. Microbiol., 1960, 22, 564-582.
- MULDER E.G. & ANTHEUNISSE J. - Morphologie, physiologie et écologie des Arthrobacter. - Ann. Inst. Pasteur, 1963, 105, 46-74.
- MULDER E.G., ADMSE A.D., ANTHEUNISSE J., DEINEMA H., WOLDENDORP J.W. & ZEVENHUIZEN L.P.T.M. - The relationship between Brevibacterium linens and bacteria of the genus Arthrobacter. - J. Appl. Bact., 1966, 29, 44-71.
- MULLAKHANBHAI M.F. & BHAT J.V. - A numerical taxonomical study of Arthrobacter. - Curr. Sci. India, 1967, 36, 155-118.
- MULLAKHANBHAI M.F. & BHAT J.V. - Morphogenèses in Arthrobacter species. - Proc. indian Acad. Sci. B., 1967, 65, 231-237.
- NIGEL DA SILVA G.A. & HOLT G. - Numerical taxonomy of certain coryneform bacteria - J. Bact. 1965, 90, 921-927.
- POCHON J. & TARDIEUX P. - Techniques d'analyse en Microbiologie du sol. - Editions de la Tourelle, 1962, 108 p.

- POCHON J., ROCHE A., CHARPENTIER M. & TARDIEUX P. - Effet rhizosphérique du maïs (*Zea Mayx* L.) en culture hydroponique aux premiers stades de croissance. I : Groupements bactériens physiologiques. - Trans. 7th. Inter. Congr. Soil Sci., 1960, 3, 558-561.
- RIVIERE J., FROUARD Y. & CATROUX G. - Influence d'enfouissements répétés de tiges de maïs sur la microflore bactérienne des sols. - Ann. Agron., 1970, 21, 403-420.
- ROUATT J.W. - Initiation of the "rhizosphere effect". - Canad. J. Microbiol., 1959, 5, 67-71.
- ROUATT J.W. & KATZNELSON H.A. - A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plants. - J. Appl. Bact., 1961, 24, 164-171.
- SANDS D.C. & ROVIRA A.D. - Pseudomonas fluorescens Biotype G, the dominant fluorescent *Pseudomonas* in South Australian Soils and wheat rhizosphères. - J. Appl. Bacteriol. 1971, 34, 261-275.
- SCHEWAN J.M., HOBBS G. & HODGKISS W. - A determinative scheme for identification of Pseudomonas and other gram negative bacteria. J. Appl. Bacteriol. 1960, 23, 379-390.
- SIERRA G. - A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. - Anatomie van Leeuwenhoek, 1957, 23, 15-22.
- SKYRING G.W. & QUADLING C. - Soil bacteria : comparisons of rhizosphere and non-rhizosphere populations. - Can. J. Microbiol., 1969, 15, 473-488.
- SKYRING G.W. & QUADLING C. - Soil bacteria : principal component analyses of description of named cultures. - C.J. Microbiol. 1969, 15, 141-150.
- SNEATH P.H.A. - New approaches to bacterial taxonomy : use of computers. - Ann. Rev. Microbiol., 1964, 18, 335-346.

- SKYRING G.W., QUALDING C. & ROUATT J.W. - Soil bacteria : principal component analyses of physiological descriptions of some names cultures of Agrobacterium, Arthrobacter and Rhizobium. Canad. J. of Microbiol., 1971, 17, 1299-1312.
- SPERBER J.I. & ROVIRA A.D. - A study of the bacteria associated with the roots of subterranean clover and wimmera rye-grass. J. Appl. Bact., 1959, 22, 85-95.
- STANIER R.Y., PALLERONI N.J. & DOUDOROFF M. - The aérobie Pseudomonas : a Taxonomy study. - J. Gen. Microbiol., 1966, 43, 159-271.
- STRZELCZYK E. - Studies on the incidence of certain "nutritional" and physiological groups of bacteria in rhizosphere and non rhizosphere soil. - Acta Microbiol. Polon., 1961, 10, 169-181.
- SULOCHANA C.B. - Amino acids in root exudates of cotton. - Plant and soil., 1962, 16, 312-326.
- SULOCHANA C.B. - B vitamins in root exudates of cotton. Plant and soil, 1962, 16, 327-334.
- SUNDMAN V. - Characterization of bacterial populations by means of factor profiles. - Acta. Agric. Scand. 1968, 18, 22-32.
- SUNDMAN V. - Four bacterial soil populations characterized and compared by a factor analytical method. - Can J. Microbiol., 1970, 16, 455-464.
- TARDIEUX P., LAJUDIE J. & CHALVIGNAC M.A. - Effet rhizosphérique du maïs (Zea Mays L.) en culture hydroponique aux premiers stades de croissance. II/ Morphologie des bactéries et types nutritionnels. - Trans. 7th Intern. Congr. Soil. Sci., 1960, 3, 562-567.
- TARDIEUX P., CHALVIGNAC M.A., CHARPENTIER M., LAJUDIE J., TARDIEUX A. & POCHON J. - Interactions microorganisms-maïs en culture hydroponique aux premiers stades de croissance. - Ann. Inst. Pasteur 1961, 100, 243-247.
- TAYLOR C.B. - Soil Bacteria. - Soil Sci., 1938, 46, 307-321.

- THORNLEY M.J. - The differentiation of Pseudomonas from other gram negative bacteria on the basis of arginin metabolism. - J. Appl. Bact., 1960, 23, 37-52.
- THORNLEY M.J. - A taxonomic study of Acinethobacter. - J. Gen. Microbiol., 1967, 49, 211-257.
- THORNLEY M.J. - Properties of Acinetobacter and Related Genera. - Identification Methods for Microbiologists, partie B, Academic Press, ed, 1968, 29-48.
- ULJASHOVA R.M. - La composition spécifique de la microflore en culture hydroponique et en terre, de la tomate (en russe). Mikrobiologiya, 1966, 35, 871-877.
- VASANTHARRAJAN V.N. & BHAT J.V. - Interrelations between soil microorganisms and mulberry. I. Phytohormone production by soil and rhizosphère bacteria and their effect on plant growth. - Plant and Soil., 1967, 27, 261-272.
- VELDKRAMP H. - Saprophytic coryneforma bacteria. - Annu. Rev. Microbiol., 1970, 24, 209-240.
- VERONA O., GAMBOGI P. & MAZZANTI P. - Ricerche sulla rizosfera di Vicia faba L. - Agric. Ital., 1966, 66, 28-44.