

TRAVAUX DIRIGES DE MICROBIOLOGIE DU SOL

Par

Pierrette WEINHARD et Y. DOMMARGUES
Centre de Pédologie biologique du C.N.R.S.

Référence : n° 282

Mai 1972

Document à diffusion restreinte - Centre de Pédologie biologique du C.N.R.S. - HP. 5 -
54 - VANDOEUVRE-LES-NANCY

20 JUL. 1972

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° B 5541

ERRATUM

- P. 2 - 13ème ligne, ajouter après "Azotobacter" : "mais colorer à l'érythrosine".
Ajouter une 18ème ligne : "colorer à l'érythrosine".
- P. 11 - 8ème ligne à partir du haut, ajouter : "(sol frais d'une rhizosphère de graminée telle que le maïs, ou de légumineuse)".
5ème ligne à partir du bas, remplacer 3 par 5.
- P. 12 - 2ème ligne, ajouter " 10^{-1} , 10^{-2} " avant 10^{-3} .
6ème ligne : ajouter "à 14" après 4.
- P. 15 - 7ème ligne, remplacer 50 par 20.
- P. 16 - 7ème ligne à partir du bas : ajouter après "imprégné" "d'une solution".
6ème ligne à partir du bas : ajouter après "plomb" "à 10 %".
-

TRAVAUX DIRIGES DE MICROBIOLOGIE DU SOL

Par

Pierrette WEINHARD et Y. DOMMARGUES
Centre de Pédologie biologique du C.N.R.S.

COMPOSANTES DE LA MICROFLORE FIXATRICE D'AZOTE DU SOL

Examen microscopique de trois microorganismes : une Cyanophycée,
un Azotobacter, un Rhizobium p. 2-3

INTERACTIONS DE NATURE NON SYMBIOTIQUE ENTRE LA MICROFLORE ET LA VEGETATION

1. Effet rhizosphère : exemple de la sulfato-réduction p. 13-17
2. Effet-litière : exemple de la biodégradation d'un complexe
organo-métallique p. 10-12

MAITRISE DE L'ACTIVITE MICROBIENNE PAR L'AGRONOME

1. Indirectement par l'intermédiaire de l'action sur les propriétés physiques : exemple du drainage dans le cas de sols présentant des risques de sulfato-réduction p. 13-17
 2. Directement par introduction de microorganismes : exemple de l'inoculation des légumineuses avec Rhizobium, étude de l'efficacité de la symbiose :
 - au laboratoire p. 5-8
 - au champ p. 9
-

COMPOSANTES DE LA MICROFLORE FIXATRICE D'AZOTE DU SOL

Examen microscopique de :

- 1) deux espèces de microorganismes fixateurs libres de l'azote dans le sol :
 - Azotobacter vinelandii (chimio-organotrophe)
 - Cyanophycée (photosynthétique) sp.
- 2) une espèce symbiotique : Rhizobium (bactéroïde et forme libre).

I - Azotobacter vinelandii

a - Milieu de culture gélosé

L'Azotobacter est cultivé sur milieu POCHON et TARDIEUX, dont la composition est la suivante :

Solution saline standard ⁽¹⁾	50 ml
Mannitol	10 g
Extrait de terre	10 ml
Solution d'oligoéléments ⁽¹⁾	1 ml
Carbonate de calcium	0,5 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
Gélose	15 g

Le milieu pour Azotobacter (microorganisme fixateur libre) ne renferme pas d'azote combiné, contrairement au milieu pour Rhizobium (microorganisme fixateur symbiotique).

b - Examen microscopique en contraste de phase

- Prélever stérilement avec une anse de platine, un échantillon de culture d'Azotobacter âgée d'environ 24 h, que l'on dépose sur une lame bien propre sur une surface d'environ 1 cm².
- Mettre en contact une lamelle avec le bord de l'échantillon et la rabattre délicatement en chassant les bulles.
- Déposer une goutte d'huile à immersion et observer au microscope en utilisant les différents grossissements des objectifs à immersion.

(1) Voir annexe.

c - Caractéristiques morphologiques

Très gros cocci de plus de 5 μ , avec une capsule de gomme extracellulaire (polysaccharides) donnant aux colonies une apparence mucoïde et des inclusions de lipide $\alpha\beta$ -hydroxybutyrique (matériel de réserve caractéristique) visible chez les formes jeunes. Les cultures d'Azotobacter vinelandii produisant un pigment vert fluorescent alors que Azotobacter chroococcum produit un pigment brunâtre.

II - Rhizobium sp.

a - Milieu de culture gélosé

(cf p. 5)

b - Examen microscopique en contraste de phase de la culture de Rhizobium

Procéder comme pour l'Azotobacter

c - Examen microscopique en contraste de phase d'un nodule de légumineuse

- Ecraser entre 2 lames un nodule de légumineuse, après l'avoir soigneusement lavé.

- Recouvrir d'une lamelle, observer en contraste de phase.

d - Caractéristiques morphologiques

(1) Formes non bactéroïdes (culture sur gélose)

Bâtonnets réguliers de 0,6 - 0,8 μ de large et 1 - 4 μ de long.

(2) Formes bactéroïdes (provenant du nodule)

Formes dont la taille est à peu près 10 fois celle des formes non bactéroïdes et dont les contours sont très irréguliers (formes en X, en Y, etc...)

III - Cyanophycée (Anabaena sp.)

a - Milieu de culture

La Cyanophycée est cultivée sur milieu GORHAM et al. préparé à partir des trois solutions suivantes :

ASM 1	K ₂ HPO ₄	1,740 g par litre
ASM 2	Fe Cl ₃	0,032 g " "
	EDTA	0,740 g " "
ASM 3	Mg Cl ₂	1,900 g " "
	Mg SO ₄ , 7H ₂ O	4,900 g " "
	Ca Cl ₂ , 2H ₂ O	1,470 g " "
	Na Cl	5,850 g " "

On prélève 10 ml de chaque solution que l'on dilue à 1 litre. Ajouter ensuite 1 ml de la solution d'oligoéléments ci-dessous :

$\text{Na}_2 \text{Mo}_4$	540 mg par litre	
$\text{Co Cl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	80 mg	"
$\text{Zn SO}_4, 10\text{H}_2\text{O}$	88 mg	"
$\text{Mn Cl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	720 mg	"

b - Examen microscopique en lumière normale

Utiliser les objectifs x 100

c - Caractéristiques morphologiques

Observer sur les filaments, des cellules à parois épaisses, optiquement vides, souvent plus grandes que les cellules voisines : ce sont les hétérocystes, siège de la fixation de N_2 .

BIBLIOGRAPHIE

- BREED (R.S.), MURRAY (E.G.D.) et SMITH (N.R.) - 1957 - Bergey's manual of determinative bacteriology (7ème édition). The Williams and Wilkins Company (Baltimore).
- DOMMERMUES (Y.) et MANGENOT (F.) - 1970 - Ecologie microbienne du sol. Masson, Paris.
- GIRARD (H.) et ROUGIEUX (R.) - 1958 - Techniques de microbiologie agricole (à l'usage des étudiants en agriculture et des techniciens des industries agricoles). Dunod, Paris.
- POCHON (J.) et BARJAC (H. de) - 1958 - Traité de microbiologie des sols. Applications agronomiques. Dunod, Paris.
- RENAUT (J.) et SASSON (A.) - 1970 - Les Cyanophycées du Maroc. Etude préliminaire de quelques biotopes de la région de Rabat. Bull. Sco. Sc. Nat. Phys. du Maroc, 50, 37-52.
- STANIER (R.Y.), DOUDOROFF (M.) et ADELBERG (E.A.) - 1971 - General microbiology (3ème édition). MacMillan and Company (London).
- STEWART (W.D.P.) - 1966 - Nitrogen fixation in plants. The Athlone Press (University of London).

EFFICIENCE DE LA SYMBIOSE RHIZOBIUM - LEGUMINEUSE

L'efficience de la symbiose fixatrice est son aptitude plus ou moins grande à fixer l'azote atmosphérique. La présente manipulation a pour but de montrer que cette efficience peut dépendre non seulement de la souche de Rhizobium mais aussi de l'espèce ou de la variété de légumineuse considérée. L'efficience d'une symbiose Rhizobium - légumineuse doit être testée en premier lieu au laboratoire, ensuite en serre et enfin in situ. Nous exposerons ici en détail la méthode de mesure au laboratoire et la méthode de mesure au champ.

I - Détermination au laboratoire de l'efficience de la symbiose

1 - Principe

On repique sur milieu gélosé dépourvu d'azote combiné des jeunes plantules de deux espèces de trèfle. Puis on inocule les racines de ces plantules avec une suspension de diverses souches de Rhizobium. Après un certain temps, on note la présence ou l'absence de nodules et on teste l'efficience des symbioses réalisées en utilisant les méthodes décrites ci-dessous.

2 - Matériel expérimental (1)

a - Plante

Trèfle violet (Trifolium pratense)

Trèfle incarnat (Trifolium incarnatum)

b - Souches de Rhizobium

Rhizobium trifolii, souches TA1, CC2480a, CC224, M37.

3 - Milieu de culture pour Rhizobium

On utilise le milieu gélosé de WRIGHT modifié :

Na Cl	0,2 g
Ca CO ₃	0,1 g
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
K ₂ H PO ₄	0,5 g
Mannitol	10,0 g
Gélose	15,0 g
Eau de levure	100 ml (voir annexe)
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

ajuster à pH 7,3 - stérilisation 15 minutes à 120°C.

(1) Ce matériel nous a été aimablement fourni par M. OBATON - I.N.R.A.
7, rue Sully, DIJON.

4 - Préparation des plantules de trèfle

a - Stérilisation des graines, germination

Les graines sont désinfectées par immersion 30 minutes dans le mélange suivant :

H ₂ O ₂ (110 volumes)	10 ml
Eau distillée stérile	90 ml
Teepol	4 gouttes

Elles sont ensuite mises à germer en boîte de Pétri sur couche de gélose à 3 % placées à 28°C, à l'abri de la lumière. Les plantules contaminées sont éliminées.

b - Milieu de culture pour la plante

Les plantules de trèfle sont repiquées stérilement sur le milieu gélosé de THORNTON-NUTMAN :

Phosphate dicalcique	1,0 g
Phosphate bipotassique	0,2 g
Sulfate de magnésium	0,5 g
Chlorure de sodium	0,2 g
Chlorure ferrique	0,01 g
Gélose	15,0 g
Eau distillée	1000 ml
Solution d'oligoéléments	2 ml

ajuster avec NaOH N/10 à pH 7 - stériliser 20 minutes à 120°C.

Le milieu est stérilisé dans les tubes bouchés avec une feuille de papier d'aluminium (méthode de GIBSON). Un trou d'aération est effectué et bouché au coton. Au sortir de l'autoclave, ils sont inclinés de façon à ce que l'agar vienne presque au contact du couvercle. Ce dernier est percé pour placer la graine prégermée. Du milieu non gélosé de THORNTON-NUTMAN est ajouté, de façon à ce que le niveau du liquide vienne aux 2/3 du tube (voir schéma page 7).

5 - Inoculation

Diluer chaque culture de Rhizobium dans un peu de milieu de THORNTON-NUTMAN stérile. Prélever stérilement avec une pipette quelques gouttes de la suspension et inoculer les racines des plantules. L'inoculation doit être pratiquée dès l'ouverture des premières feuilles. Un lot de plantes non inoculées sert de témoin. Le plan d'inoculation figure au paragraphe 7, ci-dessous.

6 - Culture des plantules

Les tubes contenant les plantules sont placés pendant toute la durée de l'expérience dans une chambre climatique ou une serre, la température ne devant pas dépasser 28°C, l'intensité lumineuse étant, si possible, supérieure à 20 000 Lux.

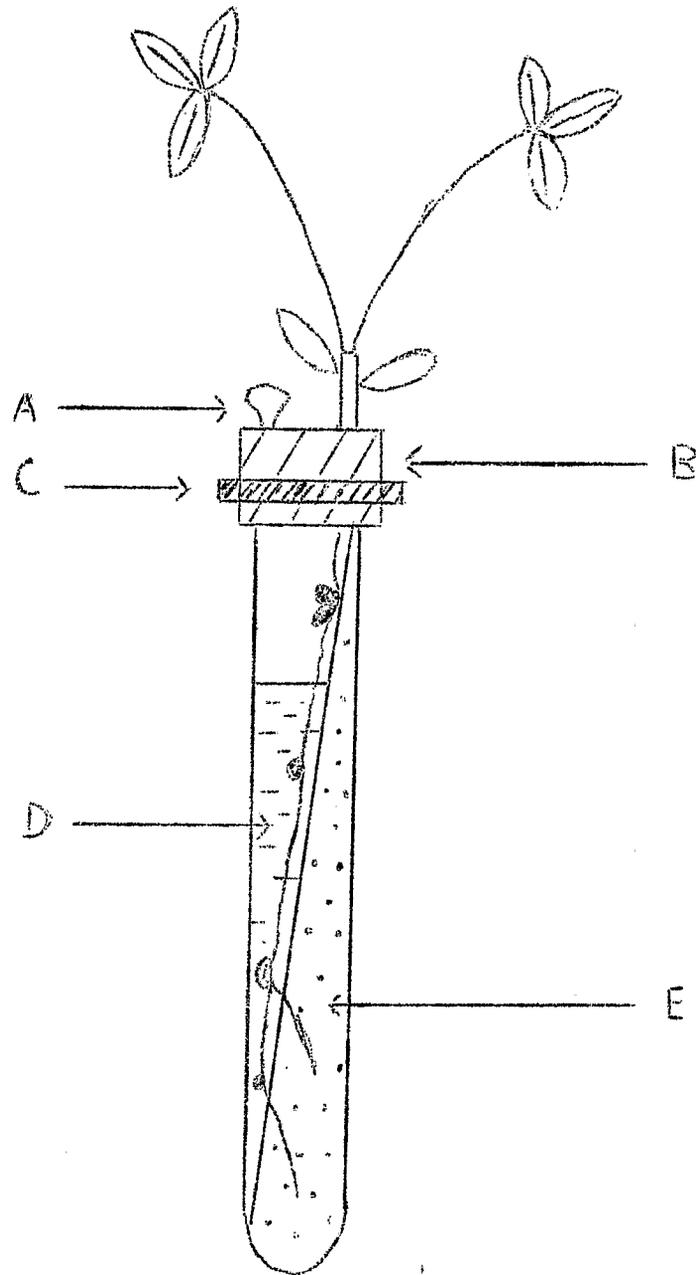


Schéma d'un tube de Gibson

- A - bouchon de coton pour l'arrosage
- B - cape d'aluminium
- C - bracelet de caoutchouc
- D - milieu nutritif de Thornton-Nutman liquide
- E - milieu nutritif de Thornton-Nutman gélosé

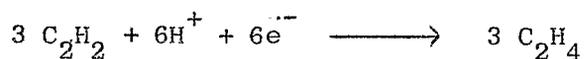
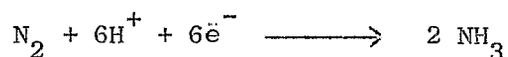
7 - Estimation de l'efficacité des souches

L'aspect de la croissance des plantes donne une idée approximative de l'efficacité de la symbiose fixatrice de l'azote. Une symbiose efficace se traduit par une plante vigoureuse et bien verte, pourvue de nombreux nodules. Une symbiose inefficace se traduit par une plante chétive et manquant de chlorophylle, l'absence de nodules ou la présence de nodules non efficaces.

L'estimation précise est basée sur ces 3 tests :

- détermination du poids sec de chaque plante (une symbiose inefficace peut multiplier le poids par 2 ou 3),
- dosage de l'azote sur chaque plante par la méthode de Kjeldhal,
- détermination de l'activité nitrogénasique.

Cette détermination est basée sur le fait que le complexe enzymatique de la fixation d'azote - la nitrogénase - catalyse les deux réactions suivantes :



La théorie prévoit donc la réduction de 3 molécules d'acétylène pour 1 molécule d'azote réduit. L'étude de la réduction de l'acétylène en éthylène apparaît donc comme un moyen simple d'évaluer l'activité nitrogénasique en raison de la facilité du dosage de l'éthylène en chromatographie en phase gazeuse.

Les cultures de trèfles inoculés ou non sont placées dans des enceintes fermées dans lesquelles on introduit 10 % d'acétylène. La lecture au chromatographe s'effectue après 1/2 h, 1 h, 2 h d'incubation à 30°C. On détermine ensuite par calcul la vitesse de fixation horaire. Cette vitesse est ramenée à 1 g de nodules secs.

L'efficacité des souches est résumée dans le tableau suivant :

Souches de Rhizobium	Trèfle violet	Trèfle incarnat
TAL	+	+
CC2480a	0	+
CC224	0	0
M37	+	0
Témoin (pas d'inoculation)	0	0

II - Détermination in situ de l'efficience de la symbiose

Le principe de cette méthode est basé sur l'appréciation de la vitesse de réduction de l'acétylène par la nitrogénase de la légumineuse en place. La plante est placée sous une cloche où l'on introduit de l'acétylène ($C_2Ca + H_2O$) et un gaz marqueur (C_3H_8).

Des prélèvements de gaz de la cloche sont effectués après 1 h et 2 h et transportés dans des fioles "pénicilline" en surpression au laboratoire où les lectures s'effectuent selon la technique de chromatographie en phase gazeuse évoquée précédemment.

BIBLIOGRAPHIE

- BALANDREAU (J.) et DOMMERGUES (Y.) - 1971 - Mesure in situ de l'activité nitrogénasique. C.R. Acad. Sci., Paris, 273, D, 2020-2023.
- JACKSON (M.L.) - 1960 - Soil chemical analysis. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J.
- WRIGHT (W.H.) - 1925 - Cité par POCHON (J.) - Manuel technique d'analyse microbiologique du sol, 1954, Masson, Paris.
- VINCENT (J.M.) - 1970 - A manual for the practical study of root-nodule bacteria. I.B.P. Handbook, n° 15, Blackwell Scientific Publications, London.

EFFET-LITIÈRE

Pour tester l'influence inhibitrice ou stimulatrice d'extraits aqueux de litières forestières sur la croissance microbienne, on étudie l'effet de ces extraits sur la croissance en milieu gélosé d'une microflore complexe.

1. Principe

On compare le nombre de colonies microbiennes appartenant à une microflore complexe se développant sur un milieu gélosé au citrate de fer ammoniacal enrichi en extraits aqueux de litières avec le nombre de colonies microbiennes de la même microflore se développant sur un milieu gélosé témoin de même composition mais non enrichi en extraits de litière. L'utilisation d'un milieu solide permet aux microorganismes composant la microflore complexe de se développer simultanément car les interactions entre ces microorganismes sont beaucoup plus discrètes qu'en milieu liquide : on réalise ainsi un modèle assez proche du sol, milieu caractérisé, on le sait, par un cloisonnement en microhabitats.

On étudiera 3 litières : litière d'épicéa, litière de hêtre, écorce de pin sylvestre, les tests étant effectués à un pH plus élevé que les pH des pâtes de litières, soit le pH 5,1.

Il en résulte qu'on utilisera les milieux suivants :

		pH d'origines des litières	pH du test	N ^o des milieux
Milieux à l'extrait de litière	Ecorce de pin	3,0	5,1	1
	Epicéa	4,1	5,1	2
	Hêtre	4,6	5,1	3
Milieu sans extrait de litière	Témoin	-	5,1	4

Remarque - Il peut paraître à première vue anormal de faire le test à un pH différent de celui des litières. En fait, cette façon de procéder est logique car l'inhibition de la microflore par les litières, in situ, peut être la conséquence de l'acidité et/ou de l'intervention de composés toxiques d'origine végétale. Dans le cas des sols à pH $\leq 5,0$, acidité du sol et des litières et composés toxiques interviennent simultanément ; dans les sols à pH $> 5,0$, ce sont surtout les composés toxiques qui interviennent, le pH étant tamponné par le sol.

Pour effectuer le test, nous nous sommes placés dans le deuxième cas, le pH du milieu adopté étant arbitrairement de 5,1.

2 - Matériel expérimental

a - Litières forestières

- Epicéa (Picea abies) récoltée au sol au mois d'octobre
- Hêtre (Fagus sylvatica) récoltée au sol au mois d'octobre
- Ecorce de pin (Pinus silvestris) récoltée sur l'arbre.

b - Microflore

- Microflore complexe : suspension-dilution du sol brun calcaire cultivé de Pixérécourt.

3 - Préparation des extraits à l'eau des litières

On agite 30 minutes 10 g de litière broyée (moulin à café électrique) avec 90 ml d'eau distillée stérile. Après centrifugation, les extraits à l'eau sont stérilisés sur filtre Millipore 0,45 μ .

4 - Préparation des milieux de culture

a - Composition des milieux gélosés de base (milieu de ALLEN concentré 2 fois)

Sulfate d'ammonium	0,5 g
Nitrate de sodium	0,5 g
Phosphate bipotassique	0,5 g
Sulfate de magnésium ($Mg SO_4, 7H_2O$)	0,5 g
Chlorure de calcium ($Ca Cl_2, 6 H_2O$)	0,2 g
Citrate ferrique ammoniacal	10,0 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

On ajuste ce milieu à pH 5,1, puis on ajoute 40 g de gélose DIFCO.

b - Milieux à l'extrait de litière (n° 1, 2, 3)

On répartit les milieux dans des erlenmeyers ou ballons de 100 ml à raison de 30 ml par fiole. On stérilise 20 minutes à l'autoclave à 120°C. On ajoute aseptiquement au milieu gélosé 30 ml par erlenmeyer d'extrait d'écorce de pin, 30 ml d'extrait de litière d'épicéa, 30 ml d'extrait de litière de hêtre, tous ces extraits étant ajustés à pH 5,1.

c - Milieu sans extrait de litière (n° 4)

C'est le milieu gélosé de base dilué deux fois, réparti à raison de 60 ml dans des erlenmeyers ou ballons et stérilisés 20 minutes à l'autoclave à 120°C.

Remarque : Préparer 3 erlenmeyers par milieu, car on effectuera les ensemencements avec 3 dilutions différentes.

5 - Répartition des milieux en boîtes de Pétri, ensemencement

On introduit dans les 18 erlenmeyers contenant les milieux 1, 2, 3, 4 maintenus liquides au bain-marie à 47°, 4 ml d'une suspension-dilution du sol brun calcaire de Pixérécourt. Dans les 3 erlenmeyers

correspondant à un milieu donné, on effectue l'ensemencement avec les différentes dilutions soit : 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Après homogénéisation, le contenu de chaque erlenmeyer est réparti, à raison de 15 ml environ, dans 4 boîtes de Pétri stériles.

6 - Lecture des résultats

Après incubation de 4 jours à 28°C on dénombre les colonies développées sur chaque boîte de Pétri et l'on calcule pour chaque litière le pourcentage :

$$\frac{\text{Nombre de colonies sur les 4 boîtes contenant le milieu à l'extrait de litière}}{\text{Nombre de colonies sur les 4 boîtes contenant le milieu témoin}} \times 100$$

BIBLIOGRAPHIE

BECK (Geneviève), DOMMERGUES (Y.) et VAN DEN DRIESSCHE (R.) - 1969 - L'effet-litière. II - Etude expérimentale du pouvoir inhibiteur des composés hydrosolubles des feuilles et des litières forestières vis-à-vis de la microflore tellurique. Oecol. Plant., 4, 237-266.

HARDER (E.C.) - 1919 - U.S. Geol. Survey Professional Papers, n° 113.
Cité par ALLEN, 1957 in Experiments in soil Bacteriology. Burgess Publishing Company, Minnesota.

SULFATO-REDUCTION AU NIVEAU DE LA RHIZOSPHERE
ET AU NIVEAU DE LA SPERMOSPHERE

I - Principe du dispositif expérimental

Le dispositif expérimental - que l'on peut concevoir sur le type factoriel $3^2 \times 2$ - a pour but d'étudier l'influence sur l'activité des bactéries sulfato-réductrices des trois facteurs suivants à 2 ou 3 niveaux :

1. Facteur exsudat : (sol seul), absence de plante ou de graine ; présence de plantes ; présence de graines.
2. Facteur sulfate : sol salin riche en sulfate ; sol non salin ; sol non salin enrichi en sulfate.
3. Facteur anaérobiose : sol non compacté ni engorgé ; sol compacté et engorgé (anaérobiose stricte).

D'où les 18 unités expérimentales qui font l'objet du tableau ci-dessous :

Sol	Enrichissement en sulfate	Présence d'une graine ou d'une plante	Engorgement et compaction du sol	N° des unités expérimentales
Sol salin	0	0	0	1
			+	2
		Plantule	0	3
			+	4
		Graine	0	5
			+	6
Sol non salin	0	0	0	7
			+	8
		Plantule	0	9
			+	10
		Graine	0	11
			+	12

suite du tableau :

Sol non salin	+	0	0	13
			+	14
		Plantule	0	15
			+	16
		Graine	0	17
			+	18

N.B. - 0 traitement non appliqué (témoin)
+ traitement appliqué.

II - Matériel expérimental

1. Plante : maïs I.N.R.A. 260

2. Sols

a - Sol salin (contenant des sulfates à dose élevée) : sol salin de Nakta, Tunisie ; pH 7,8.

b - Sol non salin (ne contenant pas de sulfates à dose élevée) : sol brun calcaire de Pixérécourt, Est de la France ; pH 7,8.

c - Sol non salin enrichi en sulfates : sol brun calcaire de Pixérécourt enrichi en sulfates.

Dans le sol de la rhizosphère, dans le sol de la spermosphère et dans le sol sans plante ni graine, on déterminera en fin d'expérience :

- 1) la densité des bactéries sulfato-réductrices
- 2) la teneur en sulfures (méthode semi-quantitative).

III - Détails opératoires

1 - Récipients de culture

L'expérience étant effectuée avec n répétitions, prévoir n x 18 récipients de culture. Les récipients peuvent être constitués par des tubes de verre, de matière plastique ou de boîtes de PVC, telles que celles utilisées par DOMMERGUES et al. Ces boîtes parallépipédiques de 200 mm de hauteur et de 15 x 50 mm de section renferment environ 150 g de sol.

2 - Stérilisation et germination des graines

Immersion pendant 20 minutes dans une solution à 10 % d'eau oxygénée à 110 volumes additionnée d'une goutte de Tæopol. Les graines non rincées sont mises à germer en boîte de Pétri de 10 cm de diamètre contenant de l'eau gélosée stérile à 3 %, à la température du laboratoire, les boîtes étant placées à l'abri de la lumière. Au bout de 3 à 4 jours,

les jeunes plantules de maïs (mesurant de 1 à 2 cm de long) sont prêtes pour le repiquage dans le sol. Eliminer les plantules contaminées.

3 - Traitement préalable du sol

Le sol est amené à l'humidité équivalente soit avec la solution nutritive de BÖRNER-RODEMACHER (n° 1 à 12), soit avec la solution nutritive de BÖRNER-RODEMACHER enrichie en sulfate de sodium à la dose de 50 g/1000 ml (n° 13 à 18).

Composition de la solution nutritive de BÖRNER-RODEMACHER (décrit par CHALVIGNAC, 1968)

Ca (NO ₃) ₂	0,5 g
K NO ₃	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	0,25 g
Fe SO ₄ , 7 H ₂ O	0,073 g
Mn Cl ₂ , 4 H ₂ O	0,005 g
BO ₃ H ₃	0,002 g
Solution d'oligoéléments (1)	1 ml
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

ajuster à pH 7.

Le sol contenu dans les récipients de culture est protégé contre la lumière par un écran opaque (feuille de polyéthylène noir). Tous les récipients sont placés dans une enceinte climatique où l'intensité lumineuse est supérieure à 20 000 Lux.

4 - Repiquage des plantules, semis, régime hydrique

Dans le sol des unités expérimentales 3, 4, 9, 10, 15, 16, on repique les jeunes plantules stériles; dans le sol des unités expérimentales 5, 6, 11, 12, 17, 18, on sème les graines stériles non germées à deux profondeurs (2 et 5 cm). Les unités expérimentales 1, 2, 7, 8, 13, 14 ne reçoivent ni plantule ni graine : ce sont les témoins (sol non rhizosphérique, sol non spermosphérique).

Lorsque les plants (unités expérimentales n° 3, 4, 9, 10, 15, 16) atteignent une dizaine de cm de hauteur, soit une semaine environ après le repiquage, le sol est compacté (par vibration ou choc) et engorgé.

Dans le cas du semis de graines non germées, le compactage et le tassement doivent avoir lieu aussitôt après le semis.

IV - Analyses

Lorsque la sulfato-réduction apparaît au niveau des racines

(1) Voir annexe.

ou des graines (10 à 15 jours après l'engorgement et le compactage du sol) on procède à certaines analyses du sol dans un rayon de 2 à 3 mm autour des racines ou des graines et du sol témoin.

1 - Détermination de la densité des sulfato-réducteurs

Mise en évidence de la formation de sulfure dans un milieu de culture contenant des sulfates et ensemencé avec des dilutions de terre.

Milieu de culture de POSTGATE (1966)

KH_2PO_4	0,5 g
NH_4Cl	1,0 g
CaSO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	2,0 g
Lactate de Na	3,5 g
Extrait de levure	1,0 g
Acide ascorbique	1,0 g
Acide thioglycollique	1,0 g
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

ajuster à pH 7,0 - 7,5

Répartir 5 ml de milieu par tube de 12 x 120 mm, boucher au coton et stériliser 20 minutes à 120°C, puis introduire un clou de fer stérilisé à l'alcool à 90° dans chaque tube.

Ensemencement : 1 ml de dilution de sol de 10^{-2} à 10^{-6} ; 5 tubes par dilution.

Incubation : 14 jours à 28° (sous vide en dessiccateur).

Pour chaque dilution, compter les tubes où il y a formation de sulfure de fer noir et calculer le nombre de germes par gramme de sol à l'aide de la table de Mc CRADY (POCHON et TARDIEUX).

2 - Analyse chimique qualitative des sulfures dans le sol (NECKERS et WALKER, 1952)

Placer 2 g de sol dans un tube à essai - mélanger à 1 g de zinc en grain - insérer une spirale de cuivre dans le tube pour éliminer les bulles. Ajouter 2 ml HCl. Attendre 5 secondes que l'air du tube soit déplacé puis placer à l'entrée un filtre circulaire imprégné d'acétate de plomb. Retirer le papier après 15 secondes.

Estimation de la coloration :

légèrement marron	: très peu de sulfures
marron	: peu de sulfures
tache brune, bord marron	: moyennement "
tache noire, bord argenté	: beaucoup "

BIBLIOGRAPHIE

- CHALVIGNAC (M.A.) - 1958 - Effet rhizosphère comparé du lin en culture hydroponique et en terre. Ann. Inst. Pasteur, 95, 474-479.
- DOMMERMUES (Y.), COMBREMONT (R.), BECK (G.) et OLLAT (C.) - 1969 - Note préliminaire concernant la sulfato-réduction rhizosphérique dans un sol salin tunisien. Rev. Ecol. Biol. Sol, 6, 299-313.
- DOMMERMUES (Y.), JACQ (V.) et BECK (G.) - 1969 - Influence de l'engorgement sur la sulfato-réduction rhizosphérique dans un sol salin. C.R. Acad. Sci., Paris, 268, 605-608.
- JACQ (V.) et DOMMERMUES (Y.) - 1970 - Influence de l'intensité d'éclairement et de l'âge de la plante sur la sulfato-réduction rhizosphérique. Zentbl. Bakt. Parasitkde, 125, 661-669.
- JACQ (V.) et DOMMERMUES (Y.) - 1971 - Sulfato-réduction spermosphérique. Ann. Inst. Pasteur, 121, 199-206.
- NECKERS (J.W.) et WALKER (C.R.) - 1952 - Fieldtest for active sulfides in soil. Soil Sci., 74, 467-470.
- POCHON (J.) et TARDIEUX (F.) - 1962 - Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Ed. de la Tourelle, Paris.
- POSTGATE (J.R.) - 1966 - Media for sulphur bacteria. Laborat. Practice, 15, 1239-1244.
-

A N N E X E

Préparation de l'eau de levure (BONNIER et BRAKEL, 1968)

Levure de boulanger fraîche	100 g
Eau distillée	1000 ml

Stérilisation 20 minutes à 120°C - Filtration sur papier Chardin. Le filtrat constitue l'eau de levure. Cette eau de levure est soit utilisée immédiatement, soit de nouveau stérilisée à 120°C.

Solution d'oligoéléments (POCHON et TARDIEUX, 1962)

Molybdate de potassium	0,05 g
Borate de sodium	0,05 g
Perchlorate de fer	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

Faire passer un courant de CO₂ dans la solution.

Solution saline standard de WINOGRADSKY (POCHON et TARDIEUX, 1962)

PO ₄ HK ₂	5,0 g
SO ₄ Mg	2,5 g
Cl Na	2,5 g
(SO ₄) ₃ Fe ₂	0,05 g
SO ₄ Mn	0,05 g
Eau	1000 ml

BIBLIOGRAPHIE

BONNIER (C.) et BRAKEL (J.) - 1968 - Lutte biologique contre la faim.
Duculot, Gembloux.

POCHON (J.) et TARDIEUX (P.) - 1962 - Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Ed. de la Tourelle, Saint-Mandé.