

Évaluation des modifications quantitatives, qualitatives et fonctionnelles induites par la conservation de consortiums bactériens extraits de sols

Agnès RICHAUME^{(1)*}, Agnès POURCELOT⁽²⁾, Rachel RAMA⁽²⁾,
Sylvie NAZARET⁽¹⁾

⁽¹⁾ UMR CNRS 5557, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecologie Microbienne,
43, Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

⁽²⁾ BAYER CROPSCIENCE - BIOSCIENCE, 55 avenue René Cassin,
69266 Lyon Cedex 09, France

Abstract: Conservation of bacterial consortia: functional and genetic consequences. Conservation of bacterial consortia exhibiting a high functional diversity can be useful to study both genetic and functional diversity as well as to exploit functional capacities for example to study biotransformation of different molecules and to analyze chemicals possibly produced. In order to improve bio-tests based on the use of complex microbial community, the possibility to repeat analyses with bacterial consortia exhibiting similar capacities of transformation over time was necessary. That is why consequences of conservation methods, either -80°C freezing in glycerol or lyophilization were studied. Bacterial consortia were characterized according to quantitative, qualitative and functional criteria: i) bacterial density by direct counting using orange acridine staining, ii) genetic structure by Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, iii) respiratory activity by Substrate Induced Respiration measurements and iv) capacity to transform various toxic components in bio-tests. Bacterial consortia were extracted from two soils by mechanical dispersion. Culture of extracted consortia after conservation induced a slight decrease of bacterial density especially when they were lyophilized. Changes in respiratory capacities were also observed depending on soil. Although genetic structure of consortia became close after culture whatever the conservation method, differences in biotransformation capacities were observed depending on the toxic component tested. For atrazine, lyophilization induced a decrease in biotransformation capacity compared with frozen consortia. In conclusion, freezing has been shown to be the conservation method which allowed to minimize changes in transformation capacity in bacterial consortia.

bacterial consortium/ soil/ conservation/ biotransformation/ genetic structure

* Correspondance et tirés à part : richaume @ univ-lyon1.fr

Résumé : La conservation des consortiums bactériens présentant une grande diversité fonctionnelle peut s'avérer utile aussi bien au plan fondamental pour l'exploration de cette diversité, qu'au plan appliqué pour la biotransformation de molécules récalcitrantes. Ainsi, les capacités fonctionnelles de consortiums bactériens extraits de sols peuvent être exploitées pour la réalisation de tests sur diverses molécules et l'analyse des sous-produits générés par biotransformation. Dans ce cas, l'enjeu majeur est la possibilité de réaliser différents bio-tests avec des consortiums présentant des capacités fonctionnelles semblables au cours du temps. C'est pourquoi les conséquences du mode de conservation sur i) la densité bactérienne, ii) la structure génétique, iii) l'activité respiratoire et iv) les capacités de transformation de divers composés ont été étudiées après remise en culture de consortiums obtenus par dispersion mécanique à partir de deux sols. Les consortiums ont été conservés à -80 °C dans du glycérol ou à température ambiante après lyophilisation. Pour les deux sols, la remise en culture des consortiums entraîne une baisse de densité cellulaire (cas de la lyophilisation) et de légers changements dans la structure génétique des consortiums conservés par congélation. La congélation se révèle néanmoins le mode de conservation permettant le meilleur maintien des capacités de biotransformation au sein des populations cultivables.

consortium bactérien/ sol/ conservation/ biotransformation/ structure génétique

1. INTRODUCTION

Le sol abrite une microflore bactérienne à la fois abondante et variée. Ainsi, un gramme de sol peut contenir jusqu'à 10^{10} micro-organismes appartenant à environ un millier d'espèces différentes [15]. A cette grande diversité génétique est associée une diversité fonctionnelle importante définie comme le nombre de processus ou de fonctions réalisés au sein de la communauté. Ceci confère aux bactéries telluriques un rôle majeur non seulement dans les cycles biogéochimiques mais également dans la transformation et/ou la dégradation d'une grande variété de composés d'origine anthropique tels que les produits phytosanitaires (pesticides ou herbicides) [7], [11].

L'exploitation de la diversité fonctionnelle de consortiums bactériens extraits d'environnements complexes tels que le sol peut s'avérer intéressante aussi bien dans un cadre de recherches fondamentales que dans un contexte appliqué. Ainsi, au plan fondamental l'exploration de la diversité génétique et fonctionnelle de manière exhaustive peut permettre la constitution de « banques génétiques et fonctionnelles » actualisées grâce à l'application de nouveaux marqueurs pertinents (par exemple pour mettre en relation la variabilité de l'ADNr16S et celle de gènes de fonction, [13]). Le maintien des capacités fonctionnelles au sein des consortiums, après conservation, pourrait permettre une exploration à posteriori grâce aux nouvelles avancées techniques, et les banques constitueraient un état des lieux « mémoire » en cas de perturbations des environnements.

Conservation de consortiums bactériens : conséquences fonctionnelle et génétique

D'un point de vue appliqué, la diversité métabolique de la microflore du sol peut être exploitée dans des bio-tests, par exemple pour tester différentes molécules afin d'évaluer les conséquences des activités bactériennes sur la formation de sous-produits à partir de produits phytosanitaires.

Dans ce contexte, en collaboration avec Le Centre de Recherche de La Dargoire (CRLD-BAYER CropScience, Lyon, France), nous nous sommes intéressés à la conservation des capacités fonctionnelles des bactéries cultivables dans des consortiums extraits du sol. Notre objectif visait à déterminer les conséquences du mode de conservation des consortiums sur différents paramètres caractéristiques des communautés bactériennes : la densité, l'activité et la structure génétique afin de proposer un mode de conservation compatible avec une utilisation dans des bio-tests *i.e.* permettant de préserver les capacités fonctionnelles.

Deux modes de conservation classiquement utilisés en microbiologie ont été testés après extraction à partir de deux sols modèles (la lyophilisation et la congélation à -80 °C, [20], [21]) et les consortiums ont été analysés d'un point de vue quantitatif, fonctionnel et génétique en nous basant sur :

- le nombre de cellules,
- la capacité de minéralisation d'un substrat,
- les capacités de transformation de composés toxiques,
- l'analyse du polymorphisme de la longueur de l'intergène entre les gènes *rrs* et *rrl* (IGS) par la méthode ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis).

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Les sols

Les sols utilisés sont des sols ayant déjà fait l'objet d'étude au sein de l'UMR CNRS 5557, Ecologie Microbienne (Sol LCSA) et de l'unité de recherche du CRLD-BAYER CropScience - Lyon (Sol de Chazay) [14]. Les principales caractéristiques déterminées par le Centre Scientifique Agricole Régional (CESAR, Ceyzériat, Ain) sont rappelées dans le tableau I.

Tableau I : Caractéristiques des sols.

Sol	La Côte St André (LCSA), Isère, France	Chazay, Rhône, France
Mode d'occupation	Culture de maïs	Prairie
Structure	Particulaire - grumeleux fin	Grumeleux
Texture	Argilo-limoneux	Argilo-limoneux
Matière Organique* (%)	2	2,7
pH (H ₂ O)	7	7,2

* estimée à partir du dosage par oxydation sulfochromique (NF ISO14235).

2.2. Les consortiums bactériens

2.2.1. Extraction des consortiums

Deux consortiums ont été extraits à partir du sol LCSA (I1, I2), et trois à partir du sol de Chazay (I4, I5 et I6). La méthode d'extraction utilisée a été adaptée à partir de la dispersion mécanique des sols proposée par Bruckert [3]. Brièvement, 100 g de sol sont mis en suspension dans 400 ml d'eau déminéralisée stérile et placé sous agitation par retournement à 60 tours/min, pendant 1 heure en présence de 3 billes d'agate de diamètre égal à 2 cm et pesant 10 g chacune. La fraction organo-minérale a été récupérée par centrifugation (3 700 x g pendant 5 min) et soumises à deux autres étapes de dispersion dans les conditions décrites ci-dessus. Les surnageants issus des trois dispersions ont été centrifugés (10 000 x g pendant 30 min) afin de récupérer les cellules bactériennes. Les culots ont été regroupés dans un volume total de 100 ml d'eau déminéralisée stérile.

2.2.2. Conservation des consortiums

Les consortiums extraits des deux sols ont été répartis en 10 fractions de 8 ml : 5 sont destinées à la congélation, et les 5 autres à la lyophilisation.

Congélation : Après centrifugation (10 000 g pendant 15 min), les culots ont été remis en suspension dans un mélange de 1 ml d'eau/glycérol (v/v). Après une congélation rapide de la suspension par immersion dans de l'azote liquide, les consortiums ont été conservés à -80 °C pendant 15 et 30 jours.

Lyophilisation : Chaque sous-fraction a été plongée dans de l'azote liquide, puis placée dans un lyophilisateur (Modulyo, Edwards) jusqu'à évaporation totale. Les lyophilisats ainsi obtenus, ont été conservés à température ambiante pendant 15 et 30 jours.

2.2.3. Mise en culture des consortiums

Les consortiums congelés ont été placés à température ambiante jusqu'à leur totale décongélation, puis ils ont été repris dans un volume de 7 ml de milieu riche (Glucose 20 g/l, Extrait de levure DIFCO 5 g/l, (NH₄)₂ SO₄ 3 g.l⁻¹, CaCO₃ 4 g.l⁻¹, Farine de coton 15 g.l⁻¹, ZnSO₄, 7H₂O 0,03 g.l⁻¹, pH ajusté à 7). Les consortiums lyophilisés ont été remis en suspension dans un volume de 8 ml de milieu de culture. Cinq ml de chacun des consortiums ont étéensemencés dans 110 ml de milieu. Après 3 jours de culture dans un incubateur (*Multiron, HT, INFORS*) à 25 °C, sous agitation à 150 rpm, la suspension cellulaire a été divisée pour procéder aux analyses quantitatives, génétiques et fonctionnelles.

Conservation de consortiums bactériens : conséquences fonctionnelle et génétique

2.3. Analyse quantitative des consortiums

Des dénombrement directs après marquage des cellules à l'acridine orange ont été réalisés sur tous les consortiums avant conservation et sur les consortiums I2 et I4 après congélation et lyophilisation. Dans tous les cas, les dénombrements ont été réalisés avant et après 3 jours de culture en milieu riche selon le protocole décrit par Dassonville *et al.* (2004) [4].

2.4. Analyse fonctionnelle des consortiums

Afin de rendre compte d'éventuelles modifications fonctionnelles des consortiums, deux types d'analyses ont été effectuées: i) la mesure d'une activité globale : la respiration et ii) l'analyse des capacités de biotransformation de molécules modèles (cf § 2.4.2).

2.4.1. Activité respiratoire induite par un substrat (SIR)

La mesure de l'activité respiratoire potentielle a été effectuée en conditions non limitantes en substrat (*i.e.* en présence de glucose 0,3 % final) selon le protocole d'Anderson et Domsch (1978) [2]. Un volume de 1 ml de suspension cellulaire a été mis en présence d'une solution stérile de glucose à 0,3 %, dans un flacon plasma de 125 ml. Les flacons ont été incubés à 25 °C pendant 4 à 6 heures. Les quantités de CO₂ dégagées ont été mesurées par chromatographie en phase gazeuse (GC) à l'aide d'un micro-catharomètre (P series Micro GC, P200, Agilent) muni d'une colonne Pora Plot Q (Agilent), chauffée à 40 °C. L'activité respiratoire a été exprimée en µg C-CO₂ / ml / heure.

2.4.2. Capacité de biotransformation

La biotransformation a été testée sur 3 molécules à propriétés phytosanitaires : 2 molécules à propriétés phytosanitaires, faisant l'objet d'étude au Centre de Recherche de La Dargoire (CRLD-BAYER CropScience, Lyon, France) seront appelées « produit A » et « produit B » pour des raisons de confidentialité ; le troisième produit est un herbicide commercialisé, l'Atrazine, pour lequel le CRLD-BAYER CropScience possède des données concernant les produits de biotransformation.

Les tests de biotransformation ont été réalisés : i) directement à partir du sol, ii) sur les 5 consortiums frais (I1, I2, I4, I5 et I6) et iii) sur les consortiums I2 et I4 conservés par congélation et sous forme lyophilisée.

Le biotest utilisé, appelé « Soil Slurry », a été mis au point par l'Equipe de Biotransformation du CRLD-BAYER CropScience. Il s'agit d'incuber les consortiums (préalablement cultivés 3 jours en milieu riche) pendant 15 jours ou un mois en présence de 0,1mM final des produits testés. Les produits de dégradation ont été analysés en chromatographie liquide couplée à

un spectromètre de masse (LC/MS), après 15 jours et après 1 mois d'incubation des consortiums en présence des molécules testées. La capacité de biotransformation est estimée à partir du nombre des sous-produits.

Les témoins inclus dans ces essais sont les suivants :

- *Témoin « produit »* : Il s'agit de milieu de culture stérile contenant 100 µM de produit final permettant de mettre en évidence les sous-produits éventuellement issus de transformations abiotiques.
- *Témoin « milieu »* : Il s'agit de milieu de culture stérile inoculé avec les consortiums permettant de mettre en évidence les produits qui ne sont pas issus de la transformation des molécules testées.

2.5. Analyse de la structure génétique des consortiums

Nous avons utilisé une méthode d'empreintes génétiques dite ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) pour l'étude de la structure génétique des consortiums bactériens associés au sol initial et après extraction et des consortiums après conservation par lyophilisation ou congélation. Cette méthode exploite le polymorphisme de la longueur de l'espace intergénique (IGS) entre les gènes *rrs* (codant pour l'ARNr16S) et *rrl* (codant pour l'ARNr 23S). Le polymorphisme de taille de l'IGS varie pour la grande majorité des espèces de procaryotes entre 74 pb (espèces appartenant aux Firmicutes à faible teneur en base GC) et 1529 pb (sous-division des α -Proteobactéries). A partir de l'ADN extrait des consortiums bactériens, les IGS sont amplifiés à l'aide d'amorces universelles (S-D-Bact-1522-b-S-20 : 5'-TGCGGCTGGATCCCCCTCCTT-3' et L-D-Bact-132-a-A-18 : 5'-CCGGGTTCCTCCCAT TCGG-3') permettant de cibler l'ensemble des taxons présents au sein de l'échantillon. L'une des amorces est marquée par le fluorochrome HEX (6-carboxyhexafluorescein) permettant après amplification de séparer les fragments d'ADN par électrophorèse sur séquenceur automatique (ABI 373, Perkin Elmer) générant un profil de bandes de taille et d'intensité variable, l'intensité représentant l'abondance d'individus possédant une séquence de cette taille. L'utilisation du séquenceur automatique permet une meilleure résolution des bandes (séparation théorique à 1 pb), une meilleure comparaison des profils grâce à l'incorporation d'un standard interne fluorescent (GeneScan 1000 bp-ROX; Perkin Elmer) dans chaque échantillon, et la lecture automatisée des profils (présence/absence, intensité de fluorescence des bandes). Le principe d'application de cette méthode à des communautés bactériennes d'origine environnementale est présenté dans la figure 1.

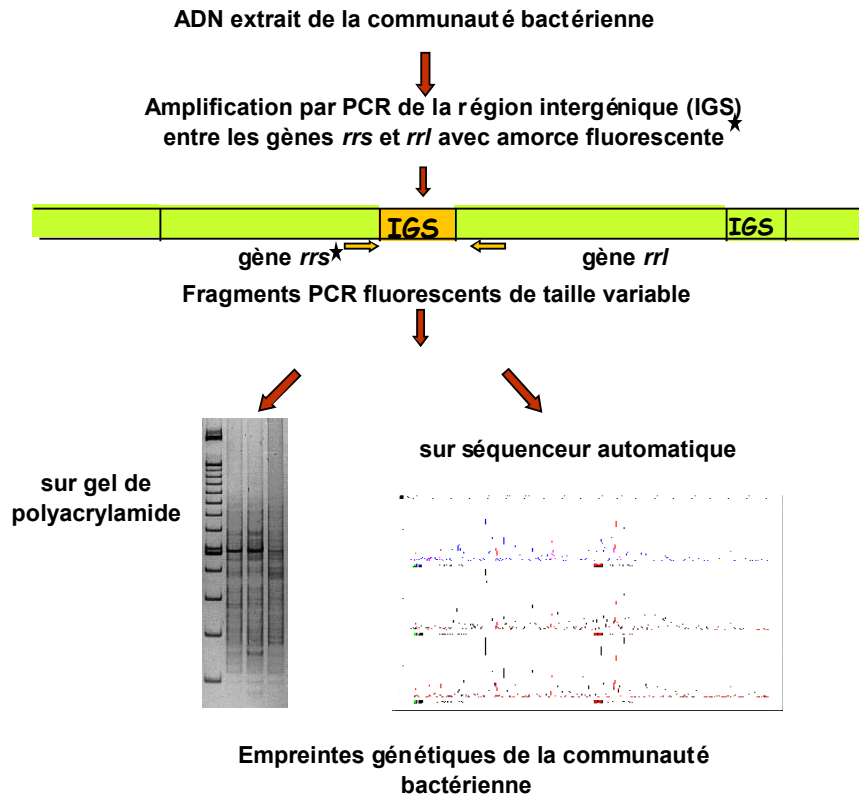


Figure 1 : Principe de la méthode ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis).

Les données des profils ARISA sont convertis par le logiciel PrepRISA en un tableau de données intégrant la taille des bandes et l'intensité des bandes. Une analyse en composante principale réalisée sur une matrice de covariance obtenue à partir de ce tableau de données est ensuite réalisée, permettant de rendre compte des différences ou similitude entre communautés bactériennes. Seul le plan factoriel des axes 1 et 2 est présenté car la variabilité expliquée par ces deux axes nous renseigne sur les différences entre traitements. Sur l'axe 3 la variabilité observée correspond à de la variabilité entre répétitions au sein d'un même traitement.

3. RÉSULTATS

3.1. Analyse quantitative des consortiums

La densité cellulaire des consortiums a été déterminée par comptage direct des cellules marquées à l'acridine orange i) sur les consortiums frais extraits des deux sols avant et après culture pendant 3 jours (fig. 2A) et ii) après conservation par congélation et lyophilisation pendant 15 ou 30 jours avant et après 3 jours de culture (fig. 3).

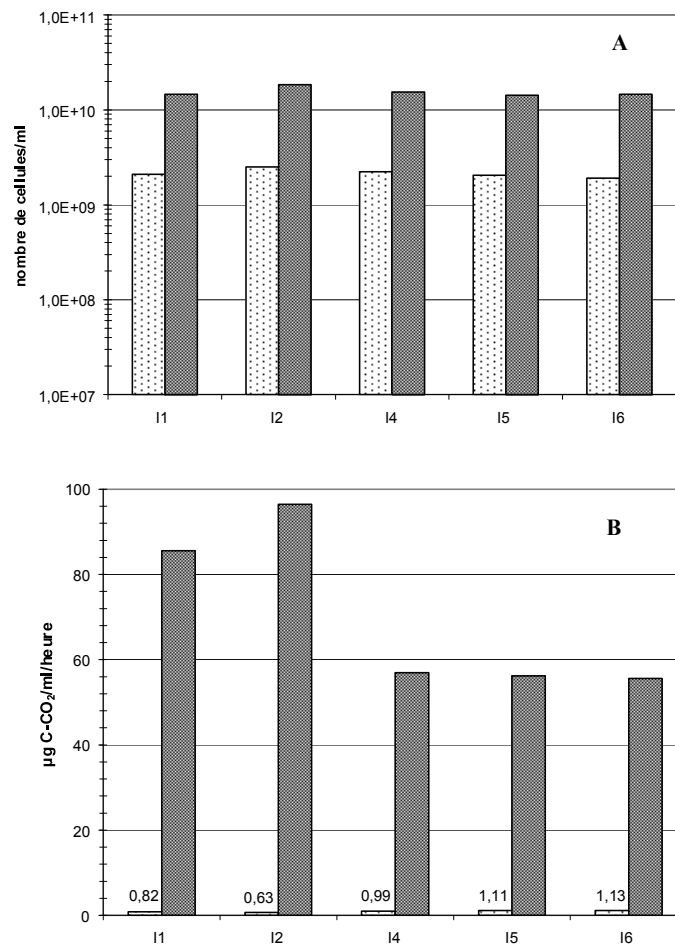


Figure 2 : Analyse quantitative (A) et mesure de la capacité de minéralisation (B) des consortiums frais extraits du sol LCSA (I1 et I2) et du sol de Chazay (I4, I5 et I6) avant (▨) et après 3 jours de culture en milieu riche (■).

Les dénombrements effectués à partir des différents consortiums extraits des deux sols (fig. 2A) indiquent une bonne reproductibilité de l'extraction des bactéries. Les densités cellulaires initiales sont de l'ordre de 2.10^9 cellules/ml pour les consortiums extraits des sols LCSA et de Chazay. La remise en culture des consortiums frais induit une augmentation d'un facteur d'environ 5 quels que soient le sol d'origine et le consortium considéré.

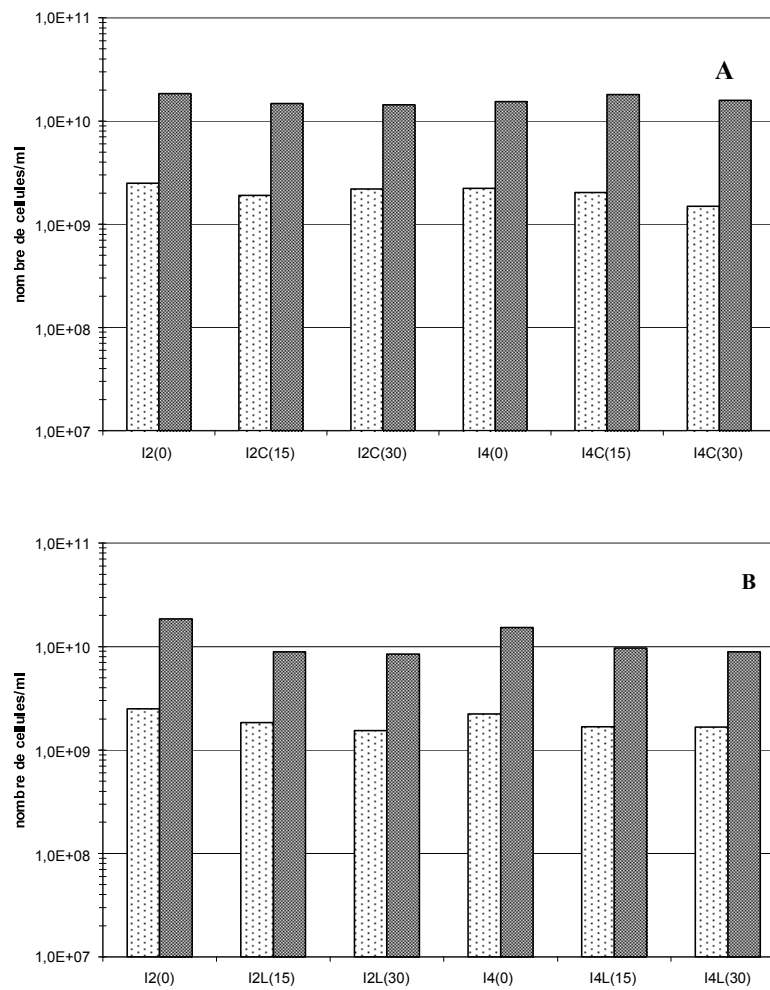


Figure 3 : Analyse quantitative des consortiums extraits des sols LCSA (I2) et du sol de Chazay (I4) sans conservation (0), après 15 ou 30 jours (15 et 30 respectivement) de conservation par congélation (A) ou par lyophilisation (B). = dénombrement avant culture ; = dénombrement après 3 jours de cultures en milieu riche.

La conservation des consortiums par congélation ne provoque pas de modification significative de la densité cellulaire. Dans ce cas, la densité après culture en milieu riche n'est pas modifiée par rapport à celle obtenue pour des consortiums frais (fig. 3A). La lyophilisation, induit, avant remise en culture, une baisse de densité des consortiums initiaux conservés 15 ou 30 jours de l'ordre de 34 % pour le sol LCSA et de 25 % pour le sol de Chazay (fig. 3B). Cette diminution de la densité cellulaire est encore plus marquée après remise en culture et atteint de 50 % environ pour les consortiums extraits du sol LCSA et de l'ordre de 35 % pour ceux extraits du sol de Chazay (fig. 3B).

La congélation s'avère être le mode de conservation permettant de minimiser les modifications de la densité cellulaire.

3.2. Analyse fonctionnelle des consortiums

3.2.1. Activité respiratoire

La capacité de minéralisation a été évaluée en mesurant l'activité respiratoire potentielle des consortiums (exprimée en $\mu\text{g C-CO}_2$ dégagé/ml/h) pour les consortiums frais (fig. 2B), et après conservation 15 et 30 jours par congélation et par lyophilisation (fig. 4). L'activité respiratoire induite par un substrat a été mesurée après culture des consortiums, pendant 3 jours en milieu riche.

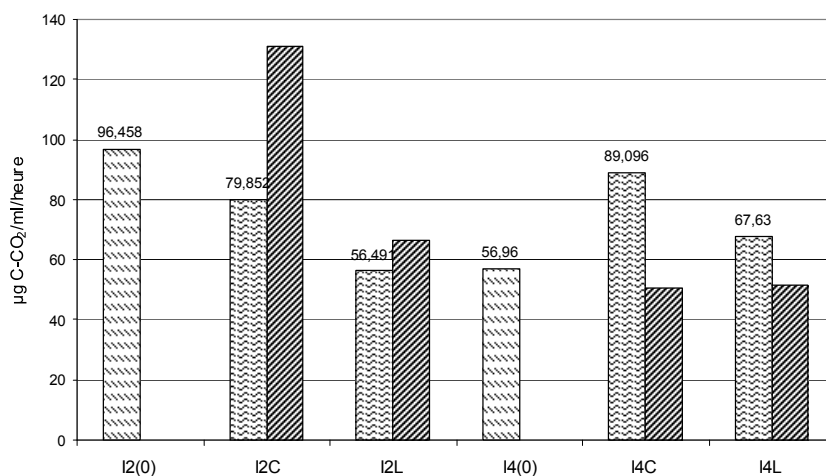


Figure 4 : Mesure de la capacité de minéralisation des consortiums extraits des sols LCSA (I2) et de Chazay (I4) après remise en culture sur milieu riche. (0) = consortiums frais, C = consortiums conservés à -80°C et L = consortiums conservés par lyophilisation.

▨ = aucune conservation, ▩ = 15 jours de conservation, ▧ = 30 jours de conservation.

Conservation de consortiums bactériens : conséquences fonctionnelle et génétique

Les consortiums extraits du sol LCSA présentent des capacités de minéralisation du glucose supérieures à celles des consortiums extraits du sol de Chazay (fig. 2B). Par ailleurs, on constate une bonne reproductibilité entre consortiums différents après remise en culture.

La figure 4 montre, pour le consortium extrait du sol LCSA, que la conservation 15 jours par congélation ou par lyophilisation induit une diminution des capacités de minéralisation après remise en culture par rapport au consortium frais. Cette diminution est plus marquée dans le cas de la conservation par lyophilisation avec une perte de 41 % contre 17 % lorsque le consortium est conservé par congélation.

Pour le consortium extrait du sol de Chazay, on note une augmentation des capacités de minéralisation par rapport au consortium frais après 15 jours de conservation par congélation mais une diminution après 30 jours de conservation. Pour ce consortium, la conservation par lyophilisation modifie peu l'activité respiratoire par rapport au consortium frais.

L'influence du mode de conservation sur la capacité de minéralisation des consortiums dépend des caractéristiques initiales de la communauté bactérienne.

3.2.2. Biotransformation

Les témoins « produit » et « milieu » réalisés pour les produits testés ont montré qu'il n'y a pas, dans les conditions expérimentales, de transformation abiotique et que les sous-produits ne peuvent être synthétisés par les consortiums à partir du seul milieu de culture. La comparaison des sous-produits de biotransformation obtenus directement à partir des sols et des consortiums frais (tabl. II) montre, pour l'atrazine, un maintien des capacités de biotransformation.

Tableau II : Capacités de biotransformation de produits phytosanitaires évaluées par des biotests d'une durée de 15 (BT15) ou 30 jours (BT30) sur les sols LCSA (S1) ou de Chazay (S2) et sur les consortiums frais cultivés 3 jours en milieu riche (I1, I2, I3, I4, I5, I6). nd = sous-produits non analysés.

Produit testé		Nombre de sous-produits obtenus à partir de sol ou de consortiums frais						
		S1	I1	I2	S2	I4	I5	I6
Atrazine	BT15	6	6	6	6	6	6	6
	BT30	6	6	6	6	6	6	6
A	BT15	8	4	4	8	4	4	4
	BT30	8	7	7	8	8	8	8
B	BT15	8	nd	7	10	6	nd	nd
	BT30	9	9	9	10	8	8	8

Dans le cas des produits A et B, on observe des capacités de biotransformations différentes de celles des sols soit par la durée nécessaire pour obtenir le même nombre de sous-produits identiques quant à leur mobilité en chromatographie liquide et leur spectre de masse (cas de la transformation du produit A par les consortiums I4, I5 et I6 et de la transformation du produit B par les consortiums I1 et I2), soit par des capacités différentes traduites par un nombre de sous-produits identique inférieur à celui obtenu pour le sol (cas de la transformation du produit A par les consortiums I1 et I2 et de la transformation du produit B par les consortiums I4, I5 et I6).

La conservation des consortiums conduit globalement à une perte de la capacité de biotransformation des produits testés par rapport à celle des sols initiaux sauf pour l'atrazine dans le cas de consortiums conservés par congélation (tabl. III).

Tableau III : Capacités de biotransformation de produits phytosanitaires évaluées par des biotests d'une durée de 15 (BT15) ou 30 jours (BT30) réalisés sur les consortiums extraits du sol LCSA (I2) ou de Chazay (I4) après 15 jours de conservation par congélation ou lyophilisation et remis en culture 3 jours en milieu riche. S1 et S2 = biotests effectués directement à partir des sols LCSA et Chazay, respectivement.

Produit testé		S1	S2	Nombre de sous-produits obtenus à partir de consortiums conservés 15 jours par			
				Congélation		Lyophilisation	
				I2	I4	I2	I4
Atrazine	BT15	6	6	6	6	5	4
	BT30	6	6	6	6	5	4
A	BT15	8	8	3	3	2	2
	BT30	8	8	7	7	7	6
B	BT15	8	10	4	5	3	3
	BT30	9	10	5	7	4	6

Les capacités de biotransformation de l'atrazine sont maintenues dans les consortiums extraits à partir des deux sols et après conservation par congélation et remise en culture.

Les capacités de biotransformation des autres produits testés sont globalement maintenues dans les consortiums mais, elles sont fortement diminuées à la suite de la conservation et de la remise en culture.

3.3. Analyse de la structure génétique des consortiums

L'étude de la structure génétique des consortiums bactériens a été effectuée sur différents échantillons des sols de Chazay et de la LCSA :

- la communauté indigène des sols sans étape préalable d'extraction des cellules,

Conservation de consortiums bactériens : conséquences fonctionnelle et génétique

- le consortium bactérien des sols directement après l'extraction des cellules,
- les consortiums bactériens après 15 jours de conservation par lyophilisation ou congélation i) avant remise en culture et ii) trois jours après culture en milieu riche.

Le regroupement des répétitions d'analyse des consortiums extraits avant et après remise en culture et après conservation sur les plans factoriels de l'ACP indique la bonne reproductibilité méthodologique de la méthode ARISA mais également du protocole d'extraction des consortiums (fig. 5 et 6).

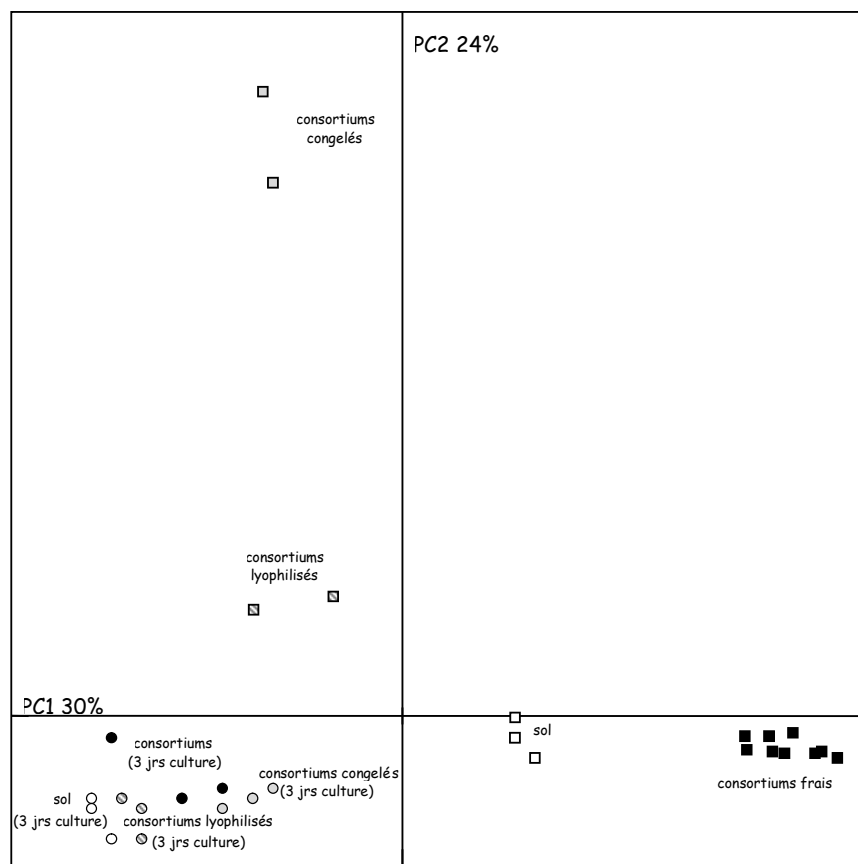


Figure 5 : Plan factoriel (CP1 X CP2) de l'analyse en composante principale (ACP) réalisée sur les profils ARISA du sol de Chazay (□), des consortiums frais (■), des consortiums congelés (◻) et lyophilisés (◼) avant l'étape de culture. Les symboles ronds indiquent qu'il y a eu 3 jours de culture en milieu riche.

Pour le sol de Chazay, le plan factoriel de l'ACP effectuée sur les profils des différents consortiums bactériens (fig. 5) met en évidence une différence

entre la structure de l'extrait cellulaire et la communauté indigène du sol visible sur l'axe 1, une modification de la structure génétique des consortiums quel que soit le mode de conservation (séparation sur l'axe 1 et l'axe 2) ainsi qu'une modification de la structure génétique de tous les consortiums après remise en culture (séparation sur l'axe 1). Une culture de 3 jours en milieu riche sélectionne, dans le sol et dans les consortiums extraits, les mêmes populations bactériennes puisque les profils se regroupent sur le plan factoriel.

Pour le sol de LCSA, le plan factoriel (axe1 X axe2) de l'ACP effectuée sur les profils des différents consortiums bactériens met en évidence un effet similaire à celui précédemment observé pour le sol de Chazay en ce qui concerne l'extraction, l'incubation et la conservation (fig. 6). Il est à noter cependant une plus grande variabilité au niveau des profils des consortiums après incubation et après incubation et conservation.

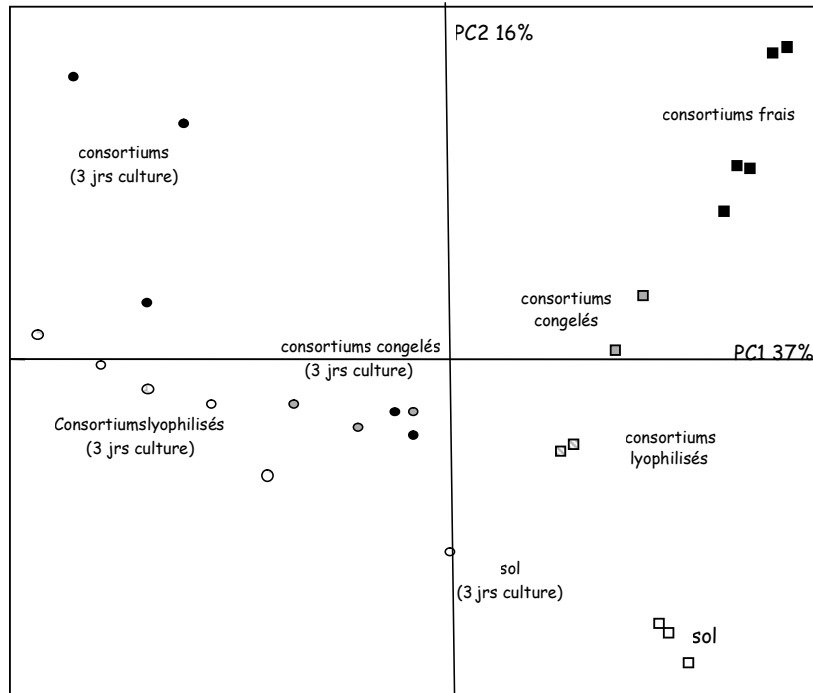


Figure 6 : Plan factoriel (CP1 X CP2) de l'analyse en composante principale (ACP) réalisée sur les profils ARISA du sol de LCSA (□), des consortiums frais (■), des consortiums congelés (□) et lyophilisés (□) avant l'étape de culture. Les symboles ronds indiquent qu'il y a eu 3 jours de culture en milieu riche.

L'extraction et la conservation par congélation ou lyophilisation modifient la structure génétique des consortiums. Pour chaque sol, la remise en

culture conduit à des structures génétiques similaires indiquant la sélection de populations communes dans les différents consortiums.

4. DISCUSSION-CONCLUSION

Le devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement constitue une préoccupation majeure pour l'industrie agro-chimique en raison des conséquences néfastes sur l'environnement (*i.e.* risques écologiques), et de l'altération de l'efficacité du produit. La richesse des aptitudes métaboliques au sein de la microflore tellurique confère à cette dernière un rôle majeur dans la dégradation des produits phytosanitaires [1], [10], [17]. Le Centre de Recherche de La Dargoire (CRLD-BAYER CropScience, Lyon, France) s'intéressait à l'utilisation de la richesse métabolique de la microflore du sol pour évaluer les conséquences des activités bactériennes sur la formation de sous-produits à partir de produits phytosanitaires. Cependant, la présence de particules minérales et organiques limitant l'analyse des sous-produits formés, il était nécessaire d'une part, de disposer de cellules bactériennes extraites possédant des capacités métaboliques représentatives du sol d'origine et d'autre part, de s'assurer du maintien du potentiel métabolique au cours de la conservation des cellules extraites. Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué l'efficacité d'un protocole d'extraction et de deux modes de conservation sur la densité, l'activité et la structure génétique de consortiums bactériens extraits de deux sols et utilisés dans des biotests.

La reproductibilité du protocole d'extraction a été validée quelles que soient les analyses effectuées sur les consortiums extraits et remis en culture. L'extraction des cellules grâce à une dispersion mécanique du sol est reconnue comme étant la stratégie la plus efficace et la plus appropriée pour des études nécessitant un maintien de la viabilité des cellules, de leur potentiel de croissance ou de leur statut métabolique [12]. Le protocole d'extraction utilisé ne permet cependant pas l'extraction exhaustive de la communauté bactérienne tellurique. L'analyse de la structure génétique des consortiums extraits avant remise en culture met en effet en évidence la disparition de certaines populations (fig. 5 et 6) pour les deux sols étudiés.

Les modes de conservation des consortiums choisis sont ceux classiquement utilisés en microbiologie pour des cultures pures : la congélation dans un liquide cryoprotecteur et la lyophilisation [8]. Il est rare que la conservation concerne un mélange de cellules ou des consortiums. De plus, les études s'intéressant aux conséquences des différents modes de conservation concernent pratiquement systématiquement des cultures pures. L'objectif principal était de proposer une méthode simple permettant le maintien des capacités fonctionnelles au sein de consortiums après réactivation. L'étude de la struc-

ture génétique des consortiums après conservation et avant revitalisation montre, quel que soit le mode de conservation, des modifications liées uniquement à la conservation. Dans le cas du sol de Chazay celles-ci sont plus importantes lorsque le consortium est conservé sous forme lyophilisée. Il semble donc que la conservation induise la disparition ou la sélection de certaines populations. De telles modifications des équilibres microbiens sont relativement inattendues puisque lors de la période de conservation, les cellules ne sont pas dans des conditions favorables à la croissance. Des biais méthodologiques tels que la lyse préférentielle de certaines cellules (membrane cellulaire fragilisée) suite au stress occasionné par la congélation (en raison de l'efficacité partielle du liquide cryoprotecteur et/ou de l'état physiologique initial des cellules par exemple) ou par la lyophilisation pourrait être à l'origine de ces observations [21]. Par ailleurs, la conservation peut également induire des modifications du génome telles que la perte de plasmide ou la mobilité de portion du génome [6].

La revitalisation des consortiums par trois jours de culture dans un milieu riche montre que la congélation permet l'obtention de densités cellulaires proches de celles obtenues après culture des consortiums frais quel que soit le sol d'origine. La lyophilisation induit une diminution pouvant être liée à une perte de viabilité due à la nature du milieu de réhydratation comme cela a été montré dans le cas de la revitalisation de souches de bactéries malolactiques [21]. Les analyses de structure génétique effectuées sur les consortiums bactériens montre que des populations bactériennes identiques ont été sélectionnées quelle que soit la communauté bactérienne d'origine, communauté indigène du sol, extrait cellulaire ou extrait après conservation. La remise en culture tend donc à homogénéiser la structure génétique probablement en raison de la sélection de populations bactériennes présentant une stratégie écologique de type *r* c'est à dire capables de se développer rapidement en réponse à l'abondance de substrat facilement disponible quel que soit le mode de conservation et/ou de type *L* dans le cas de la conservation par lyophilisation [9].

Du point de vue fonctionnel, le maintien des capacités de biotransformation dépend de la nature des produits testés *i.e.* des capacités métaboliques impliquées. Dans le cas de la conservation d'une communauté bactérienne ferroxydante, Zagury *et al.* ont montré qu'il y avait perte de la capacité de biolixiviation des métaux après congélation [20]. Dans le cas de l'atrazine, les capacités de dégradation sont maintenues au sein de consortiums présentant des structures génétiques différentes quel que soit le sol d'origine suggérant la possibilité d'une redondance fonctionnelle. La dégradation ayant été observée à la fois chez certains isolats bactériens et dans des consortiums relativement simples obtenus par culture d'enrichissement, la redondance est donc envisageable [16]. La conservation et la remise en culture des consor-

tiums conservés par congélation permettent le maintien du potentiel génétique nécessaire à la dégradation soit *via* la sélection des populations exprimant la totalité des gènes impliqués, soit *via* la sélection de populations agissant en synergie [5]. A l'inverse, la lyophilisation conduit à une diminution de la capacité de dégradation quel que soit le consortium initial.

Pour les produits phytosanitaires A et B, la conservation conduit à une perte partielle plus ou moins importante des capacités de dégradation par rapport à celles observées à partir des sols initiaux. Dans le cas du produit A, on constate que la perte des capacités de dégradation peut être compensée par une augmentation de la durée du contact produit-cellules bactériennes dans le biotest. Ceci peut s'expliquer par l'élimination d'espèces ou de populations intervenant en synergie avec celles encore présentes dans les consortiums et la nécessité d'adaptation de ces dernières pour mettre en place des voies métaboliques conduisant à une restauration partielle des capacités fonctionnelles. Dans le cas du produit B, la perte des capacités de dégradation est plus marquée lorsque les consortiums sont conservés sous forme lyophilisée. Bien que nous ignorions la nature chimique du produit, il est possible qu'il s'agisse d'une molécule dont la dégradation repose sur l'action complémentaire d'un nombre restreint d'espèces dont certaines perdent leur viabilité ou dont les capacités métaboliques ne peuvent être réactivées à l'issue d'une période de conservation par lyophilisation. Bien que la conservation par congélation ne permette pas le maintien de la totalité du potentiel de dégradation de ce produit, la perte de fonctionnalité est néanmoins réduite.

Cette étude a permis de montrer qu'il est possible de conserver et d'utiliser de manière simple et reproductible, les capacités fonctionnelles de consortiums bactériens extraits à partir du sol alors que ces derniers ne représentent pas exhaustivement la communauté tellurique. La perte de certaines espèces lors de l'extraction et/ou en raison des conditions de conservation se traduit de différentes façons en ce qui concerne le maintien de la diversité métabolique permettant la dégradation de produits phytosanitaires :

- Soit il n'y a pas d'effet. De multiples espèces offrent le même service d'où une compensation possible de la réduction ou de la perte de performance comme le rapportent Yachi et Loreau [19].
- Soit il y a diminution des capacités fonctionnelles. La disparition de certaines espèces peut en effet se traduire par des effets négatifs sur les processus d'un écosystème [18].

La conservation de consortiums bactériens par congélation semble donc la plus appropriée pour l'exploitation ultérieure des capacités métaboliques des bactéries telluriques dans des biotests.

RÉFÉRENCES

- [1] Alexander M., Biodegradation of biochemicals of environmental concern, *Science* 211 (1981) 132-138.
- [2] Anderson J.P.E., Domsch K.H., A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil, *Soil Biol. Biochem.* 10 (1978) 215-221.
- [3] Bruckert S., Analyse des complexes organo-minéraux des sols, in : Masson (éds), *Pédologie*, 1979, pp. 193-197.
- [4] Dassonville F., Godon J.J., Renault P., Richaume A., Cambier P., Microbial dynamics in an anaerobic soil slurry amended with glucose, and their dependence on geochemical processes, *Soil Biol. Biochem.* 36 (2004) 1417-1430.
- [5] De Souza M.L., Newcombe D., Alvey S., Crowley D.E., Hay A., Sadowsky M.J., Wackett L.P., Molecular basis of a bacterial consortium: Interspecies catabolism of atrazine, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 178-184.
- [6] Faure D., Frederick R., Wloch D., Portier P., Blot M., Adams J., Genomic changes arising in long-term stab cultures of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 186 (2004) 6437-6442.
- [7] Fulthorpe R.R., Rhodes A.N., Tiedje J.M., Pristine soils mineralize 3-chlorobenzoate and 2,4-dichlorophenoxyacetate via different microbial populations, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1159-1166.
- [8] Gherna R.L., Preservation, in: Gerhardt P., Costilow R.N. (éds), *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology, 1981, pp 208-217.
- [9] Golovlev E.L., Ecological strategy of bacteria: specific nature of the problem, *Microbiology* 70 (2001) 379-383.
- [10] Häggblom M. M., Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds, *FEMS Microbiology Letters* 103 (1992) 29-71.
- [11] Hill I.R., Microbial transformation of pesticides, in: Hill I.R., Wright S.J.L. (éds), *Pesticide Microbiology, microbial aspects of pesticide behaviour in the environment*, Academic Press, London, New-York and San Francisco, 1978, pp.137-202.
- [12] Lindahl V., Bakken L.R., Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil, *FEMS Microbiology Ecology* 16 (1995) 135-142.
- [13] Philipps C.J., Harris D., Dollhopf S.L., Gross K.L., Prosser J.I., Paul E.A., Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 5410-5418.
- [14] Ranjard L., Poly F., Combrisson J., Richaume A., Gourbière F., Thioulouse J., Nazaret S., Cell density and genetic relatedness studies of bacterial pools associated to various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprint approach (RISA) *Microbiol. Ecol.* 39 (2000) 263-272.
- [15] Rosello-Mora R., Amann R., The species concept for prokaryotes, *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (2001) 39-67.
- [16] Smith D., Alvey S., Crowley D.E., Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil, *FEMS Microbiology Ecology* 53 (2005) 265-273.
- [17] Soulas G., Lagacherie B., Modelling of microbial processes that govern degradation of organic substrates in soil with special references to pesticides, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* 329 (1990) 369-373.

Conservation de consortiums bactériens : conséquences fonctionnelle et génétique

- [18] Wohl D.L., Arora S., Gladstone J.R., Functional redundancy supports biodiversity and ecosystem function in a closed and constant environment, *Ecology* 85 (2004) 1534-1540.
- [19] Yachi S., Loreau M., Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis, *Proc. Nat. Acad. Sc.* 96 (1999) 1463-1468.
- [20] Zagury G.J., Narasiah K.S., Tyagi R.D., Brzezinski R., Conservation et réactivation de communautés bactériennes ferroxydantes impliquées dans la biolixiviation des sols contaminés, *Can. J. Civ. Eng.* 24 (1997) 1050-1058.
- [21] Zhao G., Zhang G., Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying, *J. Appl. Microbiol.* 99 (2005) 333-338.