

Enregistrement scientifique n°: 479

Symposium n°: 11

Présentation: Poster

Diversité bactérienne du sol et de la rhizosphère et effet d'une augmentation en CO₂ atmosphérique

Soil and rhizosphere bacterial diversity and effect of the atmospheric CO₂ content

MARILLEY Laurent¹⁾, **VOGT Gudrun**, **ARAGNO Michel**¹⁾

¹⁾Laboratoire de microbiologie, Université de Neuchâtel, Rue Emile-Argand 11, CH-2007 Neuchâtel

Introduction

Le sol ne constitue pas un environnement homogène, mais une mosaïque d'habitats avec pour chacun des populations bactériennes propres. La rhizosphère représente un compartiment d'intérêt majeur. Une part significative du CO₂ fixé par photosynthèse dans les organes aériens des plantes est relâchée dans le sol sous forme de rhizodépôts. Ces composés servent de substrats de croissance pour les micro-organismes. Ils influencent également les caractéristiques physico-chimiques du sol environnant: son acidité, son potentiel redox, sa teneur en eau, sa conductivité électrique (Lynch, 1990) et le taux d'oxygène libre disponible (Højberg & Sorensen, 1993). Les rhizodépôts conditionnent donc le développement de la microflore rhizosphérique. Mieux comprendre l'influence des exsudats racinaires sur le développement de la microflore racinaire permet de mesurer l'influence des changements environnementaux sur les populations bactériennes et finalement sur le fonctionnement de l'écosystème sol.

Actuellement, la concentration en CO₂ atmosphérique est en constante augmentation. Il est prévu qu'elle atteigne le double de sa valeur actuelle au milieu du siècle prochain. Le système FACE (*Free-Air-CO₂-Enrichment*) (Allen, 1992) permet une simulation à l'air libre de cette augmentation. Les parcelles d'étude sont donc soumises aux mêmes conditions (évapotranspiration et vent) que les parcelles témoins. Par le fait de la respiration des racines et des micro-organismes, la teneur en CO₂ du sol est supérieure à celle de l'atmosphère. Il faut donc s'attendre à détecter une influence de l'augmentation en CO₂ atmosphérique par l'intermédiaire des racines des plantes. En effet, il a été mesuré sous une atmosphère enrichie en CO₂ une augmentation de la biomasse racinaire (Rogers & Runion, 1994). Les rhizodépôts en découlant s'en trouveront donc modifiés, soit qualitativement, soit quantitativement. Ces modifications entraîneront donc des changements dans les communautés bactériennes associées à la rhizosphère.

Dans cette étude, nos objectifs sont d'analyser sous des conditions naturelles les changements de la diversité bactérienne en fonction de la proximité de la racine pour des monocultures de *Trifolium repens* (trèfle) et *Lolium perenne* (ray-grass). Nous avons donc partitionné le sol en trois fractions: le sol lointain, le sol adhérent aux racines et l'endorhizosphère-rhizoplan. On estime à 0.3%-20% la proportion de bactéries cultivables dans un échantillon de sol (Alexander, 1977; Torsvik et al., 1990). Dans la rhizosphère, ce pourcentage est compris entre 1 et 10% (Campbell & Greaves, 1990). Par conséquent, nous avons opté pour une approche basée sur une extraction d'ADN du sol, suivi par une amplification par PCR des gènes codant pour l'ARNr 16S, permettant ainsi de contourner les problèmes liés à la cultivabilité des micro-organismes. Après clonage du produit d'amplification, nous avons effectué une analyse de restriction des ADNr 16S. Les profils de restriction identiques sont groupés dans une unité taxonomique opérationnelle (OTU). Le nombre d'OTUs ainsi que le nombre de clones par OTU permettent de calculer un index de diversité. Les clones dominants ont été séquencés afin de déterminer leur position phylogénétique.

Matériel et méthodes

Site d'étude. Le site d'étude est localisé à Eschikon, près de Zürich, en Suisse. Les parcelles sont des monocultures de *Trifolium repens* cv. Milkanova et de *Lolium perenne* cv. Bastion. Elles sont fertilisées avec du P₂O₅ (12 g/m²/an), du K₂O (29 g/m²/an), du Mg (1.6 g/m²/an), et du N (14 g/m²/an). Les plantes sont fauchées quatre fois par année. L'enrichissement en CO₂ est effectué par un système FACE (Allen, 1992), permettant de passer de la teneur ambiante de 350 ppm à une teneur de 600 ppm.

Récolte et partitionnement des échantillons. La récolte et le partitionnement des échantillons ont été effectués selon Marilley et al. (1998). Une carotte par échantillon (6 cm de diamètre et 15 cm de long) a été récoltée. Nous avons défini après partitionnement trois fractions de proximité racinaire différente: le sol lointain (BS), obtenu en séparant les racines de la carotte de sol; le sol rhizosphérique (RS), obtenu par lavage du sol adhérent aux racines et le rhizoplan-endorhizosphère, obtenu par broyage des racines lavées deux fois. Les deux premières étapes de partitionnement ont été suivies à la loupe binoculaire afin de s'assurer de la séparation des fractions.

Construction d'une bibliothèque d'ADNr 16S. La méthode a été précédemment décrite par Marilley et al. (1998). L'ADN est extrait selon la procédure de Lee et al. (1996) par une méthode d'extraction directe basée sur une digestion au lysozyme, puis par une lyse au SDS et des chocs thermiques. L'ADN extrait a ensuite été purifié par un traitement au CTAB, suivi d'une extraction au chloroforme et une centrifugation dans du polyéthylène-glycol. Après resuspension du culot dans du Tris-EDTA, de l'acétate d'ammonium est ajouté, puis l'extrait est centrifugé. L'ADN est finalement précipité à l'isopropanol.

L'ADNr 16S a été amplifié par PCR en utilisant des amorces universelles. Les produits PCR sont ensuite excisés d'un gel d'agarose, ligé au vecteur pGEM-T et les cellules compétentes transformées par le produit de la ligation. Les plasmides extraits à partir de 29 clones par fraction ont servi d'ADN-cible pour une seconde amplification par PCR de l'ADNr 16S. 4 µl de produit PCR est ensuite digéré dans un volume de réaction de

20 µl à l'aide de deux unités des enzymes de restriction *HaeIII* et *RsaI*, séparément. Les profils de restriction correspondant sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Calcul des index de diversité. Les clones montrant des profils de restriction identiques sont groupés par unité taxonomique opérationnelle (OTU). Le nombre d'OTUs de même que le nombre de clones par OTU ont servi au calcul de l'index de diversité de Shannon (Shannon & Weaver, 1949).

Séquençage partiel des ADNr 16S et construction d'un arbre phylogénétique. Les séquences d'ADNr 16S sont obtenues selon des protocoles standards à l'aide d'un séquenceur automatique. Les séquences sont ensuite alignées à l'aide du programme Clustal W (Thompson et al., 1994). La matrice de distance est calculée par l'algorithme de Jukes & Cantor (1969) et l'arbre construit selon la méthode UPGMA (Sneath & Sokal, 1973) par le progiciel Phylip.

Résultats et discussion

Les observations à la loupe binoculaire ont montré que le sol rhizosphérique adhère aux racines après la séparation sol-racines. Le sol consiste en une gaine entourant les racines pour *L. perenne* et en des particules de sol lâches pour les racines de *T. repens*. Ces observations confirment que cette fraction est placée sous l'influence directe des exsudats racinaires. Nous avons également pu observer que les apex demeurent intacts après ce lavage.

Le groupement des clones en OTUs a été basé sur l'utilisation combinée de deux enzymes de restriction. Moyer et al. (1996) ont déterminé à l'aide d'une simulation assistée par ordinateur le nombre de taxons identifiables par différentes combinaisons d'enzymes de restriction, à partir de 106 séquences d'ADNr 16S déposées dans les banques de données disponibles. Deux enzymes combinées permettent de discriminer plus de 96% des taxons. Parmi les taxons non déterminés, la moyenne des homologies de séquence valait 95.6%. En guise de référence, il est important de savoir qu'habituellement les micro-organismes ayant plus de 97% d'homologie de séquence ont des valeurs de réassociation ADN:ADN supérieure à 70% (Stackebrandt & Goebel, 1994). Cette valeur de 70% est un critère-clef pour la détermination d'une espèce. Même si l'utilisation de deux enzymes de restriction ne permet pas une détermination exhaustive de la diversité, elle permet cependant une estimation assez précise.

Des OTUs dominantes (désignées par les lettres L et M) apparaissent clairement dans les fractions RE et RS de *Lolium perenne* et *Trifolium repens* (fig. 1.1). L'OTU L est dominant dans les fractions RS et RE de *Lolium perenne* et dans la fraction RS de *T. repens*. Dans la fraction RE du trèfle nous observons l'apparition d'une OTU dominante supplémentaire: l'OTU M, reléguant l'OTU L en deuxième position en termes de dominance. Les valeurs du tableau 1, tirées de la figure 1, montrent clairement que la diversité diminue en fonction du rapprochement à la racine: l'index de diversité de Shannon diminue lorsque l'influence de la racine augmente.

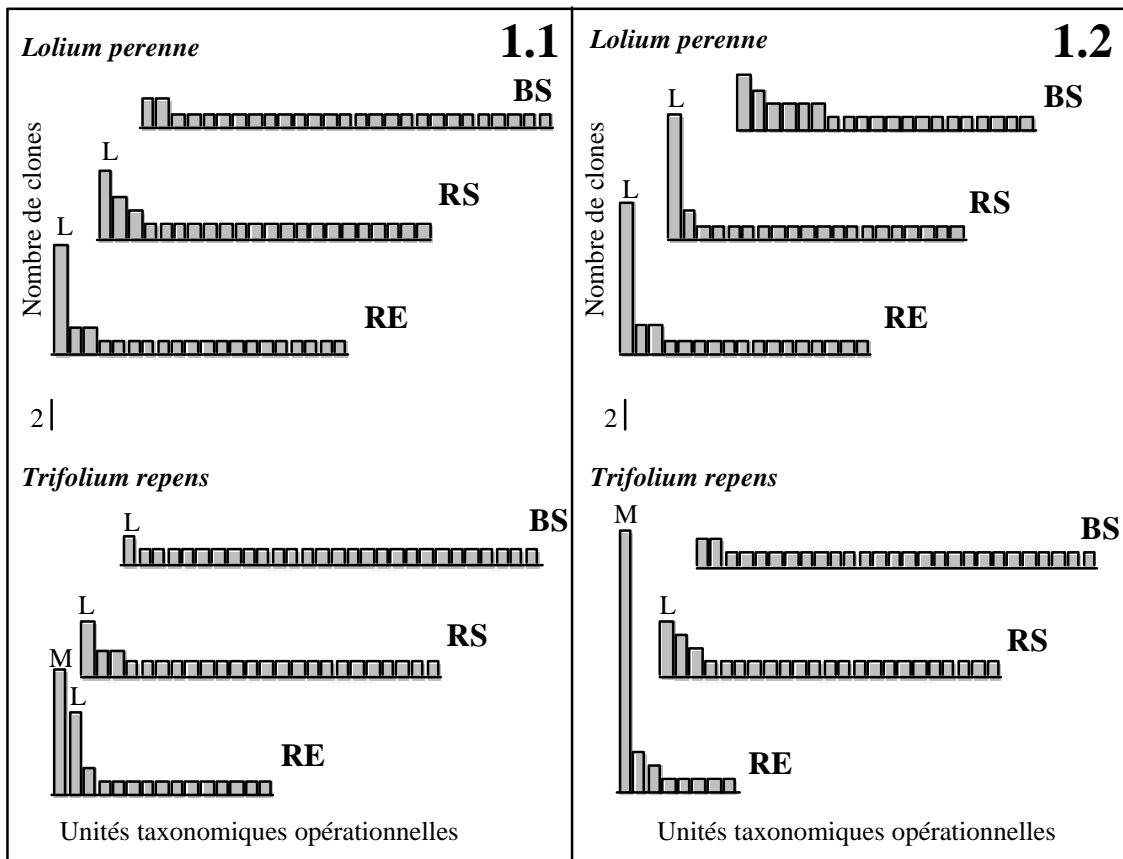


Figure 1. Unités taxonomiques opérationnelles par ordre du nombre de clones après digestion par *Hae*III et *Rsa*I. BS, sol lointain; RS, sol rhizosphérique; RE, rhizoplan et endorhizosphère. 1.1, contrôle (350 ppm CO₂). 1.2, enrichi (600 ppm CO₂).

Tableau 1. Index de diversité de Shannon

| Fractions | <i>Lolium perenne</i> | | <i>Trifolium repens</i> | |
|---------------------------------|-----------------------|---------|-------------------------|---------|
| | Contrôle | Enrichi | Contrôle | Enrichi |
| Sol lointain BS | 1.42 | 1.25 | 1.44 | 1.42 |
| Sol rhizosphérique RS | 1.27 | 1.14 | 1.34 | 1.31 |
| Rhizoplan et endorhizosphère RE | 1.17 | 1.03 | 0.98 | 0.55 |

Dans la fraction BS de *T. repens* et de *L. perenne*, la valeur de l'index de diversité de Shannon vaut respectivement 1.44 et 1.42 (tab. 1). La valeur maximale de l'index de diversité de Shannon pour le nombre de clones choisis étant 1.46, nous constatons que la diversité est très importante dans cette fraction. La dominance d'un OTU dans la fraction RS peut s'expliquer par l'influence des rhizodépôts. Selon différentes études, on estime qu'une part significative du carbone fixé par photosynthèse est libéré dans le sol rhizosphérique sous forme de rhizodépôts (Lynch & Whipps, 1990). La composition de ces rhizodépôts n'est pas bien connue, mais on sait que certains de ces composés agissent comme des molécules attractives à très basse concentration. Dans la rhizosphère, malgré l'important flux de carbone dérivant des racines, les micro-organismes sont soumis à des facteurs sélectifs ou électifs qui réduisent leur diversité. Dans la fraction RE, cette diversité est plus faible que dans la fraction RS. Cette fraction n'est en fait pas en un échantillon de sol, mais elle se compose de racines broyées. La colonisation de cet habitat particulier est soumise à des contraintes supplémentaires liées à la capacité des bactéries à adhérer et/ou à pénétrer les tissus racinaires.

Les résultats obtenus à partir des fractions provenant des parcelles situées sous enrichissement en CO₂ sont présentés dans la figure 1.2. Cette figure et les index de diversité de Shannon correspondants (tab. 1) confirment la baisse de diversité due à l'environnement racinaire. Les OTUs dominantes sont à nouveau L et M. L'OTU L ne se retrouve par contre pas dans la fraction RE de *T. repens*. Par comparaison avec les parcelles contrôles, ces résultats montrent que la diversité est plus faible dans les fractions provenant des parcelles enrichies en CO₂. Ceci se mesure pour la fraction RE de *T. repens* et pour les fractions RE et RS de *L. perenne*.

Cette baisse de diversité peut s'expliquer par le fait que le taux net photosynthétique est limité par la concentration en CO₂ atmosphérique. Sous enrichissement en CO₂, ce taux augmente, induisant une modification qualitative et/ou quantitative des exsudats racinaires. Le caractère sélectif ou électif de la rhizosphère est par conséquent plus important, modifiant la composition des populations bactériennes présentes dans cette dernière. L'activité microbienne sera donc changée, avec en retour des conséquences pour la plante qu'il s'agit encore de déterminer.

Le séquençage partiel des OTUs dominantes a permis de construire un arbre phylogénétique présenté dans la figure 2. Les OTUs dominantes font partie du groupe des Protéobactéries. Nous constatons que les clones classés dans l'OTU L se situent dans le groupe des *Pseudomonas* spp. et que les clones classés dans l'OTU M présentent une homologie élevée avec *Rhizobium leguminosarum*. Ces résultats confirment que la méthode de biologie moléculaire choisie est bien adaptée à l'étude du sol. En effet *R. leguminosarum* est décrit comme un endosymbionte des racines de *T. repens* et *Pseudomonas* spp. a souvent été décrit comme bactérie de la rhizosphère.

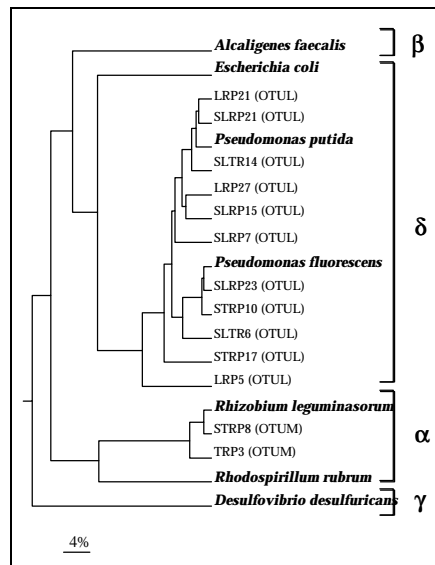


Figure 2. Relations phylogénétiques des séquences partielles des ADNr 16S des OTUs dominantes L et M avec des membres des *Proteobacteria*. La matrice de distance et l'arbre phylogénétique ont été calculés respectivement avec l'algorithme de Jukes et Cantor et la méthode UPGMA. La barre désigne le nombre de substitutions pour 100 nucléotides.

Les méthodes de biologie moléculaire offrent de nouveaux outils pour l'investigation des communautés bactériennes. Bien que les limites de la méthode soient multiples (différences dans les rendements d'extractibilité et d'amplificabilité par PCR des ADN, biais lors de la ligation, etc...), nos résultats montrent que la diversité varie en fonction de la proximité à la racine. L'augmentation de la teneur en CO₂ atmosphérique accentue la sélectivité ou l'électivité de la rhizosphère. Le séquençage de la bibliothèque d'ADNr 16S est actuellement en cours, ce qui permettra d'analyser plus précisément les remaniements des communautés au sein des différents groupes phylogénétiques.

Remerciements

Ce travail a été financé par le crédit N° 3100-040693.94/1 du Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique. Nous sommes reconnaissants envers le Prof. J. Noesberger et U. Hartwig pour leur assistance technique. Un grand merci également à A. Ogram pour son aide dans le choix de la méthode d'extraction de l'ADN du sol. Nous remercions également M. P. Blanc pour la correction du manuscrit.

Références

- Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology. John Wiley & Sons, N.Y.
- Allen, L. H. Jr. 1992. Free-Air CO₂ Enrichment field experiments: an historical overview. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 11, 121-134.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. & Daae, F. L. 1990. High diversity in DNA of soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782-787.
- Campbell, R. & Greaves, M. P. 1990. Anatomy and community structure of the rhizosphere. *In: The Rhizosphere*. Ed. J. M. Lynch. pp. 11-34. John Wiley & Sons Ltd, Essex.
- Lynch, J. M. 1990. Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. *In: The Rhizosphere*. Ed. J. M. Lynch. pp. 1-10. John Wiley & Sons Ltd, Essex.
- Lynch, J. M. & Whipps, J.M. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129, 1-10.
- Højberg, O. & Sørensen, J. 1993. Microgradients of microbial oxygen consumption in a barley rhizosphere model system. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 431-437.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. *In: Mammalian protein metabolism*. Ed. H. N. Munro. pp. 21-132, Academic Press, New York.
- Marilley, L., Vogt, G., Blanc, M., & Aragno, M. 1998. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. *Plant and Soil* (In press).
- Rogers, H. H., & Runion, G. B. 1994. Plant responses to atmospheric CO₂ enrichment with emphasis on roots and the rhizosphere. *Env. Pollution* 83, 155-189.
- Shannon, C. E. & Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communications. University of Illinois Press, Urbana, III.
- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy. W. H. Freeman & Co., San Fransisco.
- Moyer, C. L., Dobbs, F. C. & Karl, D. M. 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbiological mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaiï. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 871-879.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846-849.
- Thompson, J. D., Higgins, D.G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

Mots-clés: rhizosphère, diversité bactérienne du sol, ADNr 16S, CO₂ atmosphérique
Keywords: rhizosphere, soil bacterial diversity, 16S rDNA, atmospheric CO₂ content