



**HAL**  
open science

# Adaptation des bacillus polymyxa du sol à la rhizosphère du blé: Approche populationnelle de la diversité

Patrick Mavingui

## ► To cite this version:

Patrick Mavingui. Adaptation des bacillus polymyxa du sol à la rhizosphère du blé: Approche populationnelle de la diversité. Science des sols. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1992. Français. NNT: 1992NAN10028 . tel-01747473

**HAL Id: tel-01747473**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747473>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THÈSE  
présentée à  
L'UNIVERSITÉ DE NANCY I  
pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

par

**Patrick MAVINGUI**



*ADAPTATION DES BACILLUS POLYMYXA DU SOL  
À LA RHIZOSPHERE DU BLÉ:  
APPROCHE POPULATIONNELLE DE LA DIVERSITÉ*

Soutenue publiquement le 6 mars 1992  
devant la Commission d'Examen

Membres du jury

- M. A. HERBILLON, Professeur à l'Université de Nancy I, Président
- M. H. PETITDEMANGE, Professeur à l'Université de Nancy I
- M. P. NORMAND, Directeur de Recherche, CNRS, Lyon I, Rapporteur
- M. J. C. CLEYET-MAREL, Directeur de Recherche, I.N.R.A., Montpellier, Rapporteur
- M. A. BIANCHI, Directeur de Recherche, C.N.R.S., Marseille
- M. J. BALANDREAU, Directeur de Recherche, C.N.R.S., Nancy
- Mme G. LAGUERRE, Chargé de Recherche, I.N.R.A., Dijon
- M. T. HEULIN, Chargé de Recherche, C.N.R.S., Nancy

*AVANT-PROPOS*

# DÉDICACE

*A ma mère*

*A mon père*

*A mes frères et soeurs*

*A Albertine OUVANGUIHA*



## REMERCIEMENTS

Lancé en 1988, ce travail sur l'adaptation des *Bacillus* à l'environnement racinaire des Graminées a bénéficié de l'encadrement scientifique de T. HEULIN, et au delà de son soutien et de sa compréhension. Je tiens donc, au terme de cette étude, à le remercier vivement.

Mes remerciements vont également à G. LAGUERRE pour ses conseils techniques lors de mon séjour au Laboratoire de Microbiologie des Sols à DIJON, au responsable N. AMARGER et à l'ensemble des membres dudit laboratoire, en particulier à M. R. ALLARD.

J'exprime ma profonde gratitude aux membres du jury qui ont accepté de porter des critiques sur ce travail, au Professeur HERBILLON qui m'a accueilli au Centre de Pédologie Biologique du CNRS, au Professeur PETITDEMANGE qui dirige mes travaux sur les bactériocines, MM. NORMAND et CLEYET-MAREL qui ont consenti à être rapporteurs de cette thèse, à M. BIANCHI spécialiste de la microflore des eaux et des sédiments marins et à J. BALANDREAU qui m'avait accepté dans l'Equipe d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère.

Je suis reconnaissant à tous les membres de l'Equipe d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et du personnel du Centre de Pédologie Biologique du CNRS pour leur sympathie.



## *INTRODUCTION GÉNÉRALE*



## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans sa rhizosphère la plante modifie l'environnement physico-chimique de sa racine et fournit aux micro-organismes qui lui sont associés les nutriments nécessaires à leur croissance. La composition des composés exsudés et leur quantité varient suivant la plante étudiée. Ces exsudats racinaires constituent une pression de sélection à laquelle les bactéries telluriques colonisant la rhizosphère doivent s'adapter. Ainsi, la microflore rhizosphérique est quantitativement et qualitativement différente de celle du sol (CURL et TRUELOVE, 1986). De plus, elle varie selon l'espèce végétale considérée voire même en fonction du génotype à l'intérieur d'une même espèce (NEAL et al., 1973; VANCURA, 1988; MILLER et al., 1989).

Les Graminées hébergent dans leur rhizosphère une abondante microflore parmi laquelle les bactéries fixatrices d'azote libres sont fortement stimulées (BALANDREAU et KNOWLES, 1978). Ces bactéries comprennent le genre *Azospirillum* et les familles telles les *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonodaceae* et *Bacillaceae* qui semblent particulièrement adaptées à la niche rhizosphérique (BALANDREAU, 1986). Actuellement, l'étude des rhizobactéries fixatrices d'azote du genre *Bacillus* dans l'environnement racinaire des Graminées connaît un regain d'intérêt suite à la mise en évidence, par de nombreux travaux, de leurs effets de promotion de croissance des plantes après inoculation en conditions contrôlées ou de plein champ (CHANWAY et NELSON, 1990). Les *Bacillus* sont ainsi considérés comme des PGPR (pour «Plant Growth Promoting Rhizobacteria»).

Depuis la découverte par COHN (1872) du genre *Bacillus*, bactéries Gram positives, quatre espèces fixatrices d'azote sont fréquemment isolées du sol et la rhizosphère. Il s'agit de *Bacillus circulans* (LINE et LOUTIT, 1971; ABDEL WAHAB, 1975; BERGE, 1991), *Bacillus macerans* (LINE et LOUTIT, 1972), *Bacillus azotofixans* (SELDIN et al., 1984) et *Bacillus polymyxa* (WULLSTEIN et al., 1979; RENNIE et al., 1982; WEIHS et JAGNOW, 1988). Parmi ces espèces, *B. polymyxa* (MACE, 1889) a souvent été décrite comme possédant de nombreux caractères physiologiques favorables à la vie rhizosphérique. En effet, l'espèce *B. polymyxa* est capable de solubiliser les phosphates et réduire les oxydes de fer et de manganèse les rendant accessibles à la plante (TIWARI et al., 1989; MUNCH et OTTOW, 1983). Sa capacité dénitrifiante peut lui permettre d'utiliser la réduction dissimilative des nitrates comme mécanisme respiratoire en condition d'oxygène limitant, cas de la rhizosphère (MUNCH, 1991). De même, elle est capable de produire des spores résistantes aux conditions de stress (CLAUS et BERKELEY, 1986). La production d'exoenzymes, d'antibiotiques et ou de bactériocines peut lui conférer un pouvoir antagoniste vis à vis des champignons phytopathogènes et d'autres rhizobactéries (PRIEST, 1977, WEIHS et JAGNOW, 1988, BACKHOUSE et STEWART, 1989). Enfin, *B. polymyxa* produit des substances promotrices de croissance des plantes (SATTAR et GAUR, 1987).

L'isolement fréquente de *B. polymyxa* dans la rhizosphère du blé, parmi les bactéries fixatrices d'azote dominantes (LETHBRIDGE et al. 1982), a conduit plusieurs équipes de recherche à s'intéresser à la relation établie entre *B. polymyxa* et sa plante hôte après inoculation. Des chercheurs canadiens ont pu montrer qu'une lignée de substitution chromosomique de la variété de blé CADET (C-R5D) favorisait une bonne colonisation racinaire et une fixation d'azote par une souche de *B. circulans*, alors que la lignée non substituée ne le permettait pas (NEAL et LARSON, 1976). Ces résultats semblaient indiquer que l'association entre les racines du blé et les *Bacillus* fixateurs d'azote était spécifique. Les mécanismes régissant cette spécificité n'ont pas encore été décrits. Toutefois, l'ensemble des propriétés possédées par *B. polymyxa*, en particulier sa capacité à fixer l'azote de l'air et à solubiliser les phosphates, a motivé son utilisation comme rhizobactérie promotrice de croissance du blé (KUNDU et GAUR, 1980). Le blé est un partenaire de choix puisqu'il semble capable d'une part d'entretenir dans sa rhizosphère une microflore particulière et d'autre part de répondre spécifiquement à l'inoculation par des rhizobactéries (ASTRÖM et GHERARDSON, 1988). Récemment, l'inoculation de *B. polymyxa* s'est étendue à plusieurs espèces de graminées (HOLL et al., 1988) et même au delà à des espèces forestières (CHANWAY et al., 1991).

Dans l'Equipe d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère, un grand nombre de souches de *B. polymyxa* a été isolé de la rhizosphère du blé cultivé sur différents sols français. Dans la plupart des sols étudiés (6 parmi 7), *B. polymyxa* représentait la population dominante parmi les peuplements de fixateurs d'azote. La taille de sa population, correspondant à celle des fixateurs totaux, a été estimée entre 1 et  $5 \times 10^5$  bactéries par g de matière sèche, variant peu d'un sol à l'autre. L'inoculation d'un blé de printemps (cv. CASTAN) en conditions de plein champ par la souche *B. polymyxa* CF43 a conduit à des augmentations significatives de la hauteur du blé et du rendement en grains (BERGE, 1984). L'ensemble de ces résultats est en accord avec les données de la littérature et fait de *B. polymyxa*, espèce bien délimitée (PRIEST, 1981), un bon candidat à l'étude de l'adaptation d'une population bactérienne tellurique à l'environnement racinaire et des mécanismes impliqués.

Pour aucune des rhizobactéries ayant des effets bénéfiques sur la plante, une étude de la diversité n'a jusqu'ici été entreprise en milieu naturel. Pourtant la connaissance de la diversité pourrait représenter une étape nécessaire pour la compréhension des mécanismes, puisqu'elle renseigne sur la capacité des bactéries à s'adapter à des conditions particulières (par exemple dans la rhizosphère). De plus, elle peut orienter sur le choix de la souche adaptée à utiliser dans les expériences d'inoculation des plantes, en se basant sur des critères d'adaptation.

Les recherches concernant les mécanismes régissant l'adaptation des rhizobactéries à leur plante hôte ont porté sur peu d'individus bactériens appartenant à des espèces différentes, et en présence de différentes espèces végétales. Les résultats sont par conséquent difficiles à généraliser. Dans ce travail, nous nous proposons d'étudier l'adaptation de la population de *B. polymyxa* à l'environnement racinaire du blé. Nous avons opté pour une approche «populationnelle» qui consiste à comparer un certain nombre de souches de *B. polymyxa* isolées de la rhizosphère avec celles du sol. La variabilité phénotypique et

génétique émanant de cette étude comparative devrait permettre d'évaluer la diversité au sein de l'espèce en fonction de sa localisation dans le sol ou dans la rhizosphère et déduire les caractères d'adaptation de la population de *B. polymyxa* à cet environnement racinaire.

L'approche populationnelle que nous proposons nécessite de disposer d'un grand nombre de souches bactériennes représentatives de la population étudiée. Dans le premier chapitre un effort important a été mis sur l'isolement des souches de *B. polymyxa*. Ainsi, une méthode d'immunopiégeage utilisant comme «piège» les anticorps spécifiques de la bactérie à isoler a été développée. Les différentes étapes sont décrites et discutées. Ce travail a fait l'objet d'une publication (MAVINGUI et al., 1990). Les souches ont été isolées du sol non-rhizosphérique, du sol rhizosphérique et des racines (rhizoplan) du blé. L'identification des souches à l'espèce *B. polymyxa* a ensuite été réalisée par (1) les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques (galeries API) et (2) par les propriétés sérologiques.

Le deuxième chapitre présenté sous forme de publication en anglais, concerne l'étude de la diversité des trois «sous-populations» de *B. polymyxa* isolées des trois compartiments étudiés. La diversité a été évaluée par les caractères phénotypique (galeries API), sérologique (ELISA) et génétique (RFLP), puis comparée à l'aide de méthodes statistiques (UPGMA, comparaison de distribution).

Enfin le troisième chapitre a pour objectif de rechercher, à travers la diversité phénotypique, les caractères bactériens pouvant être impliqués dans la relation établie entre la population «adaptée» de *B. polymyxa* et les racines de blé. Le repérage de ces caractères devrait permettre de déduire les pressions de sélection exercées par la plante sur la population bactérienne qui lui est associée. Cette étude a été menée sur les caractères phénotypiques (galeries API) en utilisant le modèle statistique de l'analyse en composantes locales. Diverses activités enzymatiques ont été également étudiées.



## CHAPITRE 1

*ISOLEMENT ET IDENTIFICATION  
DES BACILLUS POLYMYXA  
DU SOL ET DE LA RHIZOSPHERE DU BLÉ*



ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES *BACILLUS POLYMYXA*  
DU SOL ET DE LA RHIZOSPHERE DU BLÉ.

## I.-INTRODUCTION

Le sol et la rhizosphère des plantes constituent un réservoir de micro-organismes qui ont toujours fait l'objet de nombreuses recherches de la part des écologistes microbiens. Depuis longtemps, les méthodes d'étude ont consisté à extraire le micro-organisme de sa niche écologique par l'utilisation de milieux sélectifs (KRIEG, 1981), afin d'étudier leurs propriétés. Le grand nombre de micro-organismes, leur diversité et la complexité des habitats où ils résident, rendent souvent difficile et fastidieux leur isolement. De plus, les milieux «sélectifs» classiques ne sont pas suffisamment spécifiques lorsqu'il s'agit d'isoler une population microbienne bien définie et non dominante dans le sol (WAKASAKI et KOIZUMI, 1982). De nombreux micro-organismes échappent à ces milieux et on ne connaît probablement pas la majorité des micro-organismes du sol.

L'avènement récent des techniques de biologie moléculaire appliquées en écologie microbienne a considérablement changé les approches dans ce domaine d'étude. En effet, ces techniques très sensibles et plus spécifiques permettent d'accéder directement au pool génétique du micro-organisme par extraction de l'ADN de milieux complexes tels que le sol, l'eau ou les tissus végétaux (STEFFAN et ATLAS, 1988; GUESDON et al., 1991). Ainsi, le microorganisme peut être identifié par l'hybridation moléculaire avec l'ADN ou l'ARN (HOLBEN et al., 1988; TORSVIK et al., 1990), sans que l'on soit obligé de l'isoler ni même de préserver sa viabilité. Ces méthodes ont permis à des auteurs de détecter directement dans de l'eau de lac, une population phénotypique et génétique particulière de *Pseudomonas* génétiquement modifiée (MORGAN et al., 1989). Plus récemment, l'utilisation de la PCR (Polymerase Chain Reaction) (SAIKI et al. 1985) a permis d'améliorer ces techniques d'hybridation. Elle possède l'avantage d'être beaucoup plus sensible sans pour autant perdre les qualités inhérentes à l'ensemble des méthodes basées sur l'étude directe des génotypes (spécificité de la cible). Utilisant la PCR, BEJ et al. (1991) ont réussi à détecter une cellule d'*Escherichia coli* dans 100 ml d'eau, alors que l'utilisation de milieux qui se révèlent souvent sélectifs en présence d'un nombre de germes plus grand ne le permettait pas. STEFFAN et ATLAS (1988) annoncent le repérage de 100 bactéries de *Pseudomonas cepacia*, manipulé génétiquement, dans 100g de sédiment soit parmi  $10^{11}$  bactéries totales. Un avantage non négligeable de la PCR est qu'elle peut s'appliquer aux organismes eucaryotiques et procaryotiques.

Cependant, ces méthodes moléculaires appliquées à l'étude des microorganismes dans leur habitat naturel sont insuffisantes pour la description des populations microbiennes et les méthodes classiques

de dilutions et d'étalements sur milieux appropriés seraient nécessaires. En écologie microbienne de la rhizosphère, des progrès sensibles ont été réalisés avec ces méthodes dans la description et l'étude des associations symbiotiques impliquant les *Rhizobiaceae*, les actinomycètes symbiotiques et les champignons mycorhiziens (DJORDJEVIC et al., 1987; SIMONET et al., 1990). Cependant, la majorité des micro-organismes libres, notamment les rhizobactéries, sont encore peu décrits et les interactions qu'ils établissent avec les plantes demeurent mal appréhendées (LAMBERT et JOOS, 1989). Les bactéries rhizosphériques du genre *Azospirillum* et du complexe *Pseudomonas* fluorescents, qui sont les mieux décrites de ces rhizobactéries (SCHIPPERS et al., 1987; MICHIELS et al., 1989), n'ont jamais fait l'objet d'étude de diversité dans leur environnement naturel.

Le but de notre travail est d'étudier la diversité génétique et phénotypique au sein de populations tellurique et rhizosphérique de *B. polymyxa*. L'objectif est d'évaluer dans quelle mesure la plante est capable d'exercer une sélection qualitative et/ou quantitative sur une population bactérienne associée, en la comparant à la population équivalente issue du sol, en absence de plante.

*B. polymyxa* constitue une espèce assez bien définie dans le genre *Bacillus* (PRIEST et al., 1981), et se prête donc à l'approche populationnelle que nous proposons. Cette espèce a été décrite parmi les bactéries fixatrices d'azote les plus abondantes de la rhizosphère du blé (RENNIE, 1980; LETHBRIDGE et al., 1982). Dans ce cas, leur isolement est facilité par l'utilisation des exsudats racinaires d'une plantule en germination comme milieu d'enrichissement, couplé à l'activité réductrice d'acétylène en «modèle spermosphère» (THOMAS-BAUZON et al., 1982). Cette méthode utilisant la plante comme piège n'est pas compatible avec l'isolement des populations non rhizosphériques en vue de l'étude comparative que nous proposons. La plante serait capable de sélectionner parmi les bactéries du sol les plus adaptées à la racine (MOAWAD et al., 1984; REINHOLD et al., 1985; HYNES et O'CONNEL, 1990), ce qui engendrerait un biais dans l'échantillonnage.

Des auteurs ont isolé des *Bacillus* du milieu naturel à partir des spores en raison de leur thermorésistance (WOOD et CASIDA, 1972; WAKASAKI et KOIZUMA, 1982) et leur résistance aux désinfectants chimiques (KORANSKY et al., 1978). LEDINGHAM et al. (1945) ont ainsi élaboré un protocole qui permet d'isoler d'un échantillon de sol ou de végétal pasteurisé, des spores de *B. polymyxa* sur la base de la production de gaz à partir de l'amidon ou de lactose. Cependant, le traitement par la chaleur peut entraîner des mutations dans le génome (KADOTA et al., 1978) et l'isolement par les spores a l'inconvénient d'éliminer les cellules végétatives qui sont les formes actives dans le cas d'une population bactérienne adaptée à une niche écologique riche en nutriments, comme la rhizosphère (LYNCH et WHIPPS, 1990).

En l'absence de milieux suffisamment électifs et sélectifs pouvant répondre à notre problématique, nous avons eu l'idée de recourir aux méthodes sérologiques et à l'immuno-isolement. Depuis ces vingt

dernières années, des techniques immuno-enzymatiques par exemple l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) ont été développées pour la détection et la numération des micro-organismes spécifiques (virus, bactéries et champignons) dans leur habitat naturel (CLARK et ADAMS, 1977; LEVANONY et BASHAN, 1990), mais aussi pour leur classification (OLSEN et RICE, 1984; FUHRMAN et WOLLUM II, 1985; KIRBY et RYBICKI, 1986). Ces méthodes sont basées sur la reconnaissance des déterminants antigéniques spécifiques (épitopes) présents à la surface de chaque microorganisme par des anticorps obtenus par immunisation d'un animal (lapin, cobaye etc...). L'efficacité de la méthode dépend de la spécificité des sérums et de la qualité des réactifs immunochimiques utilisés. Une réaction entre un antigène et son anticorps homologue sera d'autant plus forte que leur affinité est grande. Les paramètres du milieu réactionnel (pH, température) joueront un rôle non négligeable dans l'établissement et la stabilité des liaisons anticorps-antigènes. En effet, les forces unissant les antigènes aux anticorps ne sont pas différentes de celles régissant les interactions entre protéines. Il s'agit uniquement de forces non covalentes, donc relativement faibles et très dépendantes de la complémentarité stérique entre les sites antigènes et anticorps.

L'application de ces méthodes immunologiques à la séparation des cellules sanguines humaines s'est révélée particulièrement concluante (SCHLOSSMAN et HUDSON, 1973; LEA et al., 1985; HIRN et al., 1987). Le procédé consiste à revêtir un support solide (colonne d'immuno-adsorption, plaque de microtitration, billes magnétiques, etc...) d'anticorps mono ou polyclonaux, dirigés contre la cellule cible que l'on désire soit éliminer soit isoler d'un échantillon particulier. Pour le second choix, les traitements doivent être assez doux afin de préserver la viabilité cellulaire lors de l'étape de récupération. HRANITZKY et al. (1980) ont été les premiers à adapter l'immunoséparation à l'isolement des bactéries notamment le *Vibrio cholerae*, agent causal du choléra, directement d'eaux contaminées. Dans ce cas le support sur lequel était greffé l'anticorps servant de piège, était soit une plaque de microtitration soit des billes en polystyrène. Plus récemment, MORGAN et al. (1991) ont utilisé les anticorps monoclonaux flagellaires adsorbés sur des billes magnétiques en polystyrène pour capturer une souche de *Pseudomonas putida* manipulée génétiquement dans un échantillon d'eau de lac. L'immuno-isolement ou «immunopiégeage» a été surtout employé par les phytopathologistes pour isoler les bactéries pathogènes des tissus végétaux (VAN VUURDE et VAN HENTEN, 1983; VAN VUURDE, 1987).

En microbiologie du sol, cette méthode ne semble pas pour le moment avoir pris un grand essor. Cependant, BRUNEL et al. (1988) ont réisolé par immunopiégeage sept isolats de la souche *Bradyrhizobium japonicum* USDA 125, 10 ans après son inoculation dans un sol maintenu en jachère. Plus récemment, des travaux sur la méthode d'immunopiégeage nous ont permis d'isoler des souches de *Bacillus polymyxa* dans le sol et la rhizosphère du blé (MAVINGUI et al., 1990), où il ne représentait que  $10^4$  à  $10^5$  bactéries par g de sol sec, soit moins de 1% de la microflore totale estimée à  $10^8$  bactéries par g de sol sec. La méthode d'immunopiégeage pourrait donc constituer une bonne alternative pour l'isolement des populations bactériennes spécifiques et non dominantes dans le sol. Dans le cas des *Bacillus*, le choix et la qualité du sérum peut permettre d'isoler indifféremment les formes végétatives ou les spores. De plus,

l'immunopiégeage permet de s'affranchir des nécessités de la capture par la plante et de traiter plusieurs échantillons simultanément. Elle se prête donc bien à l'étude des populations non-rhizosphérique et rhizosphérique que nous proposons.

Dans ce chapitre seront décrits (1) l'isolement par la méthode d'immunopiégeage des populations de *B. polymyxa* du sol non-rhizosphérique, du sol rhizosphérique et du rhizoplan de blé et (2) l'identification des souches à l'aide des caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques (galeries API) et sérologiques (ELISA). Ces caractères feront l'objet d'une étude de diversité.

## II. - MATERIEL ET METHODES.

### A.- MATERIEL

1.- **Le sol.** Le sol utilisé est un sol brun, profond, peu lessivé de la région Lorraine dans l'est de la France. Il provient de parcelles d'essais de plantes cultivées à rotation classique colza/blé/blé, sur la commune de Dieulouard (54) appartenant à la Coopérative Agricole de Lorraine (C. A. L.). Les principales caractéristiques physicochimiques de ce sol sont présentées dans le tableau I.

Tableau I.- Caractéristiques physicochimiques de l'horizon 0-30 cm du sol de Dieulouard (54)

Granulométrie (%)		pH		CEC (meq/100g de sol)		N* (%)	C* (%)
Sable grossier	15,3	Eau	5,6	Ca	4,70	0,07	1,02
Sable fin	21,5	KCl	5,3	Mg	0,35		
Limons grossiers	25,8			K	1,99		
Limons fins	22,3			Na	0,41		
Argile	11,6			Total	7,45		
Classification : Eutric cambisol							

\* N : azote total; C : carbone organique.

Le sol a été prélevé dans un chemin en bordure de parcelles à la fin de l'automne 1989, puis tamisé immédiatement à l'aide d'un tamis de 5 mm. Le sol ainsi obtenu est conservé à 4 °C, à son niveau initial d'humidité de 10 % avant d'être utilisé.

**2.- Le blé.** Nous avons utilisé le blé de printemps (*Triticum aestivum* L.) cultivar Fidel, récolte 1989. Les semences certifiées, traitées au Betaxane et à l'Anthraquinone nous ont été fournies par la C. A. L. Le choix de ce cultivar nous a été dicté par souci d'homogénéité avec les autres thèmes de recherche conduits sur le blé dans l'Equipe d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère. Il est inscrit au catalogue français des semences depuis 1979.

Pour nos cultures en pots, nous avons utilisé les semences calibrées de la classe modale contenant des graines de poids compris entre 50 et 52 mg. Cette classe, la plus représentée pour un lot de mille grains, nous assure une certaine homogénéité de croissance des plantes.

### 3.- Les milieux de culture.

- La gélose nutritive (Prolabo, 35 g/l) est utilisée pour la culture, la purification des souches et la détermination de la microflore totale. Elle se compose comme suit :

Peptone	5 g/l
Extrait de viande de boeuf	3 g/l
Gélose	15 g/l
pH	6,8

- Le milieu LB de Luria et Bertani (MANIATIS et al., 1982), dont la concentration en NaCl a été diminuée, est utilisé pour la culture des souches en milieu liquide. Il se compose comme suit :

Tryptone	10 g/l
Extrait de levure	5 g/l
NaCl	5 g/l
pH	6,8

Les milieux gélose nutritive et LB sont autoclavés pendant 20 min à 120 °C.

- Le milieu à quatre sources de carbone (4SC) (HEULIN et al. 1987). Nous avons utilisé ce milieu pour dénombrer les fixateurs d'azote et tester l'activité réductrice d'acétylène des souches bactériennes. Il se compose de :

Glucose	5 g/l
Mannitol	5 g/l
Amidon	4,5 g/l
Malate de sodium	3,5 g/l
Extrait de levure	0,1 g/l
Solution «supersalts»	50 ml/l
Tampon phosphate	15 ml/l

Le pH est ajusté à 6,8 par de la soude normale. Le milieu est autoclavé 20 min à 110 °C. La solution «supersalts» et le tampon phosphate sont préparés de la façon suivante :

Solution A	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,43 g/l
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,30 g/l
	NaMoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,75 g/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8 g/l
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,026 g/l
	CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,07 g/l
Solution «supersalts»	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 g/l
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2 g/l
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,44 g/l
	E.D.T.A.	0,40 g/l
	Solution A	20 ml/l
Tampon phosphate	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40 g/l
	pH	6,8

La solution «supersalts» et le tampon phosphate sont autoclavés séparément pendant 20 min à 120 °C avant d'être conservés.

- Le milieu LG (LEDINGHAM et al. 1945) que nous avons modifié a été utilisé pour le dénombrement des spores totales de *Bacillus* et de spores de *Bacillus* producteurs de gaz. Une quantité de 10 g d'amidon est additionnée aux 50 ml de la solution «supersalts» et 15 ml de tampon phosphate du milieu 4SC pour 1000 ml d'eau distillée, le pH étant ajusté à 6,8. Pour le milieu gélosé, 15 g/l de gélose et 0,005% de colorant vital rouge neutre sont ajoutés. Les deux milieux sont autoclavés 20 min à 120 °C.

- Le milieu HW a été employé pour étudier les *B. polymyxa* fixateurs d'azote (Hino et Wilson, 1958). Nous l'avons modifié et utilisé pour la conservation à court terme des souches de *Bacillus*. Il est composé de :

Saccharose	40 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g/l
NaCl	0,02 g/l
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,03 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 g/l

CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,10 g/l
Extrait de levure	0,10 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,26 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,34 g/l
Gélose	15 g/l
pH	7,7

- Le milieu à base de saccharose adapté à *B. polymyxa* (MBS). Nous avons utilisé ce milieu pour isoler, au cours de l'immunopiegeage, les souches de *B. polymyxa* du sol et de la rhizosphère du blé. A la solution supersalts (50 ml) et au tampon phosphate (15 ml) du milieu 4SC on ajoute :

Saccharose	40 g/l
Extrait de levure	0,1 g/l
Gélose	15 g/l

Le pH est ajusté à 6,8 par de la soude normale. Les deux milieux HW et MBS sont autoclavés pendant 30 min à 110 °C.

**4.- Les souches bactériennes.** Les souches types ont été acquises de différentes collections internationales : *Bacillus polymyxa* ATCC 842, *Bacillus macerans* ATCC 8244 et *Bacillus circulans* NCIB 9374. La souche de *Bacillus polymyxa* CF43 a été isolée de la rhizosphère du blé par T. HEULIN (communication personnelle) avec le modèle spermosphère (THOMAS-BAUZON et al. 1982). Lors de son isolement, elle constituait la bactérie fixatrice d'azote la plus abondante et représentait 10<sup>5</sup> bactéries par g de sol rhizosphérique sec, soit environ 0,1% de la microflore cultivable. La souche de *Bacillus circulans* RSA20 provient de la rhizosphère du maïs (BERGE et al., 1991). La souche de *Pseudomonas fluorescens* PH12b a été isolée des racines de blé, var. Fidel cultivé en pot sur le sol limono-sableux de Dieulouard par P. HEBBAR (communication personnelle), sur milieu B de King (Sigma). Son abondance était estimée à 6 x 10<sup>6</sup> bactéries par g de racines sèches, soit environ 5 % de la microflore cultivable.

**5.- Le matériel et les produits pour l'immunopiegeage et l'ELISA.** Ce sont ceux classiquement utilisés dans les techniques immuno-enzymatiques (ADAMS, 1977; FURHMANN et WOLLUM II, 1985).

- Les plaques de microtitration. Elles sont revêtues par les anticorps dirigés contre une souche appartenant à l'espèce bactérienne à isoler. Deux types de plaques ont été testées : Costar (Polylabo, 2596) et Nunc (Maxisorp F96, 4 39453).

- Le laveur automatique (Dynatech, AM 56) et le lecteur (Dynatech, MR 5000) de microplaques sont utilisés lors de la quantification des anticorps fixés sur les microplaques et la réalisation des réactions sérologiques avec les souches pures en ELISA.

- Tampons et solutions :

\* Tampon de «coating». Le carbonate bicarbonate de sodium 1 M (CB). On dissout 35 g de carbonate de sodium anhydre (ou 95 g de carbonate de sodium hydraté) et 56 g de bicarbonate de sodium dans 800 ml d'eau distillée et l'on complète à 1000 ml. Le pH est ajusté à 9,5 par de la soude 3N. Il est utilisé à 0,1 M. Le tampon borate de sodium 0,05 M pH 8,4 (acide borique 3,1 g et borax 0,6 g dans 1000 ml d'eau distillée) a été également testé.

\* Le tampon phosphate (PBS), auquel on ajoute 0,5 % de Tween 20 (PBS-T) selon les cas, est utilisé pour réaliser les dilutions sériales des échantillons de sol ou de racines et pour le rinçage des microplaques. Sa composition est la suivante :

NaCl	7,2 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,8 g/l
pH	7,2

\* La solution de caséine à 0,5 % dans du PBS-Tween (PBS-TC) est employée pour saturer les sites anticorps et les sites non spécifiques de la plaque de microtitration.

\* Solution de désorption. Différentes solutions de désorption de bactéries fixées aux anticorps de microplaques ont été testées : KCl 0,1 M pH 5,5; CB 0,1 M pH 8,5 et de l'eau distillée pH 5.5. Ces solutions sont autoclavées pendant 20 min à 120 °C.

\* Le tampon diéthanolamine (Prolabo, 23 374 291) de dilution du substrat, le p-nitrophénylphosphate (Mannheim-Boehringer, 107 905) qui est le substrat de la phosphatase alcaline, est préparé en dissolvant 10 % de diéthanolamine dans de l'eau distillée. Le pH est ajusté à 9,8 par de l'acide chlorhydrique normale.

\* Le conjugué (GAR-PA, Biosys - B12507) contenant les IgG de chèvre dirigées contre les IgG (H + L) de lapin couplées à la phosphatase alcaline, est utilisé pour l'estimation du maximum de fixation des anticorps dans les plaques de microtitration et le dosage de la réaction immuno-enzymatique en ELISA.

## B.- METHODES

1.- Culture des plantes en phytotron. Le sol, réparti dans des pots cylindriques de 11 cm de diamètre et 15 cm de longueur, est utilisé à son niveau initial d'humidité de 10 %. Les semences de blé sont

mises à germer (8 semences par pot) 48 h en atmosphère de laboratoire. Lorsque le coléoptile apparaît, quatre plantules ayant une croissance homogène sont maintenues dans chaque pot. Les pots contenant les plantules et les pots sans plante sont transférés en chambre de culture de 1 m<sup>3</sup> de volume et aux paramètres climatiques suivants :

- température de jour  $21 \pm 1$  °C et de nuit  $15 \pm 2$  °C,
- éclairage de  $300 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  à la surface des pots, assurant une photopériode de 16 heures,
- humidité de l'air entre 80 et 90 %.

Les arrosages des plantes sont effectués avec de l'eau de robinet.

**2.- Echantillonnage.** Dans notre étude nous avons isolé des souches bactériennes dans les trois compartiments suivants :

\* le «sol non rhizosphérique» (SNR) est le sol sans aucune espèce de plante en croissance et donc sans système racinaire actif au moment du prélèvement. Cependant, il est probable que ce sol ait été au contact de racines de blé entrant dans la rotation des précédents culturaux (C. A. L., communication personnelle);

\* le «sol rhizosphérique» (SR) d'après Hiltner (1904) est défini comme «la fraction de sol sous l'influence des racines», excluant donc toute présence de ces dernières. Afin de récupérer le sol fortement adhérent aux racines et pour éviter le lavage des racines pour le récupérer (problème de dilution), nous avons choisi de broyer les racines avec le sol y adhérent, c'est à dire les particules de sol non décrochées après une agitation manuelle. Le poids de racines dans notre cas ne représente que 6 % du poids total de sol adhérent.

\* le «rhizoplan» (RP), selon CLARK (1949) désigne la surface racinaire et les bactéries qui y sont fortement adhérentes. Du fait des difficultés rencontrées pour la récupération de ces bactéries par simple lavage des racines, c'est le système racinaire de plantule de blé, lavé soigneusement à l'eau distillée stérile puis broyé qui a servi à l'isolement des souches du rhizoplan.

Trois échantillons de sol ont été prélevés séparément en trois points distants chacun de trois mètres sur le site de Dieulouard. Chaque échantillon de sol est réparti dans 3 pots affectés aux différents compartiments : 1 pot où seul le sol non-rhizosphérique sera prélevé au moment de l'isolement, 1 pot où l'on prélèvera les racines plus le sol y adhérent et 1 pot où l'on prélèvera exclusivement les racines. Au total 3 pots (répétitions minimales couvrant utilisées dans ce type d'échantillonnage) par compartiment sont utilisés pour chaque campagne d'isolement.

**3.- Préparation des échantillons pour l'immunopréciipitation.** Après 18 jours de croissance au phytotron, les plantules de blé atteignent le stade 2 à 3 feuilles et les racines parviennent à la base des pots.

Les 4 plantules de chaque pot sont réunies et considérées comme un seul échantillon. Les systèmes racinaires avec ou sans sol adhérent (2 à 5 g) sont broyés à l'aide d'un mortier stérile dans un volume minimum de PBS jusqu'à l'obtention d'un broyat homogène. La dilution  $10^{-1}$  est obtenue avec un volume total de 45 ml de PBS, puis des dilutions décimales sont réalisées. Les échantillons de sol non rhizosphérique sont traités de la même façon. Une fraction aliquote de la dilution  $10^{-1}$  est prélevée pour déterminer le poids de matière sèche de sol ou de racines (72 h, 60 °C).

**4. Préparation des sérums anti-CF43 et anti-RSA20.** Les cellules entières des souches *B. polymyxa* CF43 et *B. circulans* RSA20, utilisées comme facteur immunogène, sont obtenues à partir d'une culture de 16 h à 32 °C dans le milieu LB sous agitation. Après centrifugation 20 min à 10000 g suivie de 3 lavages dans du PBS stérile pH 7,2, le culot de cellules est repris dans un volume minimum de PBS de façon à obtenir une suspension de concentration  $10^9$  cellules/ml. La production de l'antisérum a été réalisée par A. DORIER (I. U. T. de Biologie appliquée, Lyon). Des lapins issus du croisement entre la race californienne et la race néozélandaise sont hyperimmunisés par une série d'injections de cellules bactériennes, puis le sérum est recueilli par ponction cardiaque. Pour le sérum anti-CF43, les IgG contenues dans le sérum de titre 1/2560 mesuré par agglutination, ont été partiellement purifiées par relarguage des protéines suite à la précipitation au sulfate d'ammonium (3,9 M). Les sels sont ensuite éliminés par dialyse contre le PBS (NaCl 8,0 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2,7g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,4g, eau déminéralisée 1000 ml, pH 7,4). La concentration finale en IgG du sérum polyclonal anti-CF43 ainsi purifié est de 12,7 mg/ml. Les anticorps obtenus sont essentiellement dirigés contre les antigènes somatiques. En effet un seul lavage des bactéries permet d'éliminer, dans le cas des *B. polymyxa*, la majorité des antigènes solubles contenus dans le milieu de culture (GOUZOU, thèse 1992).

**5. Protocole de l'immunopiéage.** Les différentes étapes de l'immunopiéage sont issues des méthodes immuno-enzymatiques (Fig. 1).

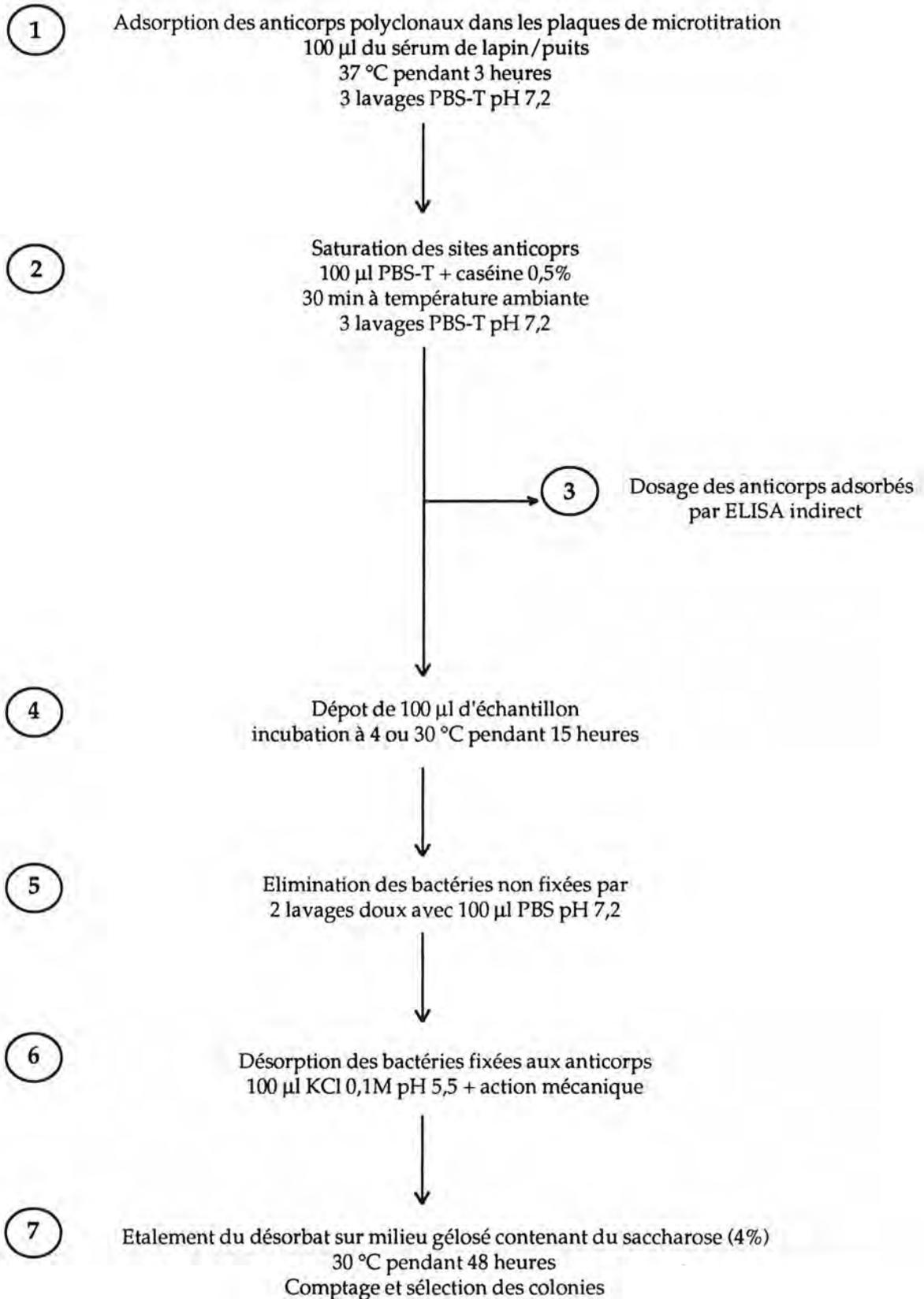
\* Sensibilisation ou «coating» des plaques. Les plaques en polyvinyle de type Costar sont lavées une nuit à l'éthanol 95 % filtré (Nalgène, 0,2  $\mu\text{m}$ ) pour éliminer les graisses, avant d'être séchées sous une hotte. Des dilutions décimales de sérum dans le tampon CB 0,1M, pH 9,5 sont déposées dans les puits (100  $\mu\text{l}$ ). Trois répétitions par dilution sont réalisées. Les plaques sont incubées 3 h à 37 °C.

\* Lavages. Les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS-T stérile pH 7,2 (100  $\mu\text{l}$ /puits).

\* Saturation des sites libres. Afin de réduire les fixations non spécifiques sur les sites-anticorps ou les sites libres de la plaque non occupés par les anticorps polyclonaux (AcPcx), 100  $\mu\text{l}$  de solution saturante PBS-TC stérile pH 7,2 sont déposés dans les puits. Les plaques sont laissées 30 min à la température de laboratoire.

\* Dosage des anticorps adsorbés par ELISA. Cette étape est effectuée en parallèle à

Figure 1. Protocole de l'immunopréciipage



l'immunopréciipitation proprement dit. Les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS-T à pH 7,2. Un volume de 100 µl de conjugué GAR-PA est déposé dans les puits. Les IgG de chèvre dirigés contre les IgG de lapin se comportent alors comme des antigènes et se fixent aux AcPcx de lapin anti-CF43 ou anti-RSA20. Après incubation pendant une nuit à 30 °C, suivie de 2 lavages automatiques avec du PBS-T et un lavage avec le PBS, 100 µl de substrat (p-nitrophénylphosphate, 1 mg/ml) sont déposés dans les puits. Les plaques sont laissées 20 min à température ambiante et à l'obscurité pour le développement de la réaction enzymatique. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps adsorbés. Des puits témoins ayant reçus le tampon CB sans AcPcx permettent d'évaluer la part de fixation du conjugué sur la plaque. L'absorbance est lue à 405 nm au spectrophomètre MR 5000.

\* **Dépot d'échantillons.** Des suspensions-dilutions de sol ou de racines sont déposées dans les puits (100 µl) d'autres plaques nouvellement sensibilisées avec des AcPcx. Les plaques sont incubées pendant 15 h. Deux températures d'incubation ont été testées : 4 et 30 °C. Pour les expériences avec les souches bactériennes pures ou mixtes, les bactéries sont mises en culture dans le milieu LB, une nuit à 30 °C. Après élimination des anticorps solubles contenus dans le milieu de culture par centrifugation 10 min à 10000 g, le culot est repris dans du PBS stérile pH 7,2. Des dilutions décimales sont réalisées dans le PBS et 100 µl sont déposés dans chaque puits. Le nombre de bactéries apportées par puits est tout d'abord estimé par dénombrement au microscope à contraste de phase. Le nombre définitif est déterminé par comptage des colonies (CFU), après étalement des suspensions sur gélose nutritive, en boîte de Pétri.

\* **Désorption des bactéries fixées.** Les puits des plaques sont traités par séries de 5. Différentes solutions de désorption ont été testées. Les puits sont vidés et deux lavages doux avec du PBS stérile pH 7,2 (100 µl) sont réalisés pour éliminer les bactéries non fixées. Un volume de 100 µl de solution de désorption est déposé et une action mécanique est effectuée à l'aide d'un embout de pipette stérile. Le désorbat de chaque puits est étalé sur le milieu à base de saccharose en boîte de Pétri pour les échantillon de sol et de racines, ou sur la gélose nutritive dans le cas des souches bactériennes pures ou en mélange. Les boites de Pétri sont incubées 48 à 72 h à 30 °C.

\* **Repérage des colonies de *B. polymyxa*.** Sur le milieu à base de saccharose, les *B. polymyxa* produisent un polysaccharide, le lévane. Les colonies paraissent alors légèrement transparentes à opaques. Elles sont visqueuses et forment un film élastique lorsque l'on prélève avec une anse de platine. Une préparation dans de l'eau physiologique montée entre lame et lamelle permet d'observer au microscope à contraste de phase, des bâtonnets droits à mobilité rigide et des spores réfringentes, ovoïdes, libres ou en position subterminale dans un sporange déformé. Les colonies ainsi repérées (bâtonnets avec ou sans spore) sont repiquées sur milieu LB. **Une seule et unique colonie par boîte de Pétri, c'est à dire par puits est prélevée afin d'éviter l'isolement de plusieurs souches bactériennes issues d'un même clone.** Après purification sur gélose nutritive, les isolats sont identifiés et les souches bactériennes sont conservées comme ci-après décrit .

**6. Numération des *B. polymyxa* immunopiégés.** Les boîtes de Pétri obtenues après immunopiégeage sont numérotées de 1 à 10 pour chacun des trois échantillons de SNR et de SR. Cinq boîtes par échantillon sont ensuite sélectionnées selon la table de nombres tirés au hasard (STATITCF). Pour le compartiment RP, 10 boîtes par échantillon sont sélectionnées parmi 20 de la même façon que précédemment. Toutes les colonies de chaque boîte sont scrupuleusement observées à l'aide d'une loupe optique. Les colonies soupçonnées présenter l'aspect de *B. polymyxa* sont retenues. Une culture de la souche *B. polymyxa* CF43 est utilisée comme référence afin d'aider le repérage des colonies apparentées. Le nombre approximatif de *B. polymyxa* est ainsi déterminé par CFU avant d'être confirmé par identification des isolats sélectionnés. Cette méthode de dénombrement de *B. polymyxa* est basée sur un comptage par défaut. En effet, outre l'inconvénient que revêt la numération par CFU qui ne prend en compte que les individus capables de croître sur le milieu utilisé, c'est à dire métabolisant le saccharose et produisant des polysaccharides (hétéroglycane et homofructane), certaines colonies de *B. polymyxa* échappent probablement à l'observation.

**7. Identification des souches.** L'identification des souches a été conduite selon la méthodologie proposée par la société API-bioMérieux (la Balme les Grottes, 38390 Montalieu Vercieu, France). En effet, cette société met à la disposition des microbiologistes un outil de taxonomie numérique basé sur les caractères morphologiques et biochimiques des bactéries à Gram-positif et Gram-négatif. Le genre auquel appartiennent les bactéries à identifier détermine le choix des galeries contenant les tests à employer. Dans le cas des bactéries du genre *Bacillus* qui nous intéressent, ce sont les galeries 50 CHB et 20 B qui sont les mieux adaptées. La démarche que nous avons suivi pour l'identification est la suivante :

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés de l'appartenance de nos souches au genre *Bacillus* (CLAUS et BERKELEY, 1986) par l'étude de certains caractères morphologiques et physiologiques à savoir :

- \* les caractéristiques des colonies (forme, hauteur et marge) ont été étudiées sur des cultures de 48 h en gélose nutritive,

- \* la présence de spores, leur forme, aspect, et position dans le sporange ont été observés avec la culture précédente au microscope à contraste de phase,

- \* la forme des cellules et leur mobilité ont également été observées au microscope à contraste de phase à partir d'une culture de 24 h en milieu liquide LB,

- \* la réaction de Gram est réalisée selon la méthode enzymatique de Cerny (1976). Du papier filtre stérile est imbibé de la solution de L-alanine-nitro-4-anilide-chlorhydrate (Merck) préparée extemporanément (4 % dans le tampon Tris pH 7,0), puis déposé sur les colonies présentes à la surface de la gélose nutritive. Après 5 minutes à la température de laboratoire, la présence ou l'absence de l'activité aminopeptidasique est visualisée directement. L'apparition de la coloration jaune résultant de la libération du nitro-4-aniline signifie que la souche est Gram-négative. Dans le cas contraire, c'est à dire absence de

coloration, la souche est Gram-positive.

\* la présence de la catalase est décelée en déposant une goutte d'eau oxygénée (1,5 %) sur une colonie de 24 h (gélose nutritive). L'apparition de bulles (O<sub>2</sub>) au niveau de la colonie indique que la souche est catalase positive, sinon elle est catalase négative.

\* la recherche de l'oxydase est réalisée en frottant une culture de 24 h en gélose nutritive sur un disque imprégné de diméthyl-p-phénylène diamine (bioMérieux). La souche est oxydase-positi ve si la colonie devient violet foncé puis noire, sinon elle est oxydase-négative.

La détermination de l'espèce a ensuite été effectuée par l'étude des propriétés biochimiques à l'aide des galeries API 50 CHB et 20 B (LOGAN et BERKELEY, 1981). Le kit API 50 CHB comporte une galerie 50 CH qui contient 49 glucides répartis dans des tubes et un coffret renfermant le milieu 50 CHB pour la préparation de l'inoculum bactérien. La fermentation des différents glucides par les souches bactériennes conduit à la production d'acides, laquelle est révélée par l'indicateur de pH «rouge de phénol» qui vire au jaune. Dans la galerie 20 B les tests sur les glucides fermentescibles communs à 50 CHB ont été éliminés de l'analyse, les tests oxydase et présence de spores ont été vus précédemment. Il n'a donc été pris en compte que les tests suivants:

- \* GEL : Hydrolyse de la gélatine par une protéase.
- \* NIT : Réduction du nitrate de potassium par une nitrate réductase assimilative ou dissimilative.
- \* ONPG: Hydrolyse de l'ortho-nitrophénol β-D-galactopyranoside par la β-galactosidase.
- \* URE : Présence de l'uréase.
- \* IND : Formation d'indole à partir du tryptophane.
- \* H<sub>2</sub>S : Formation d'H<sub>2</sub>S à partir de composés soufrés en présence de sels de fer.
- \* VP : Production d'acétoïne à partir de l'acide pyruvique.
- \* CIT : Alcalinisation du milieu de Simons contenant du citrate.

L'ensemble des résultats des galeries permettent d'établir un profil biochimique de la souche étudiée. Les profils sont soumis à une analyse numérique informatisée réalisée par A. PIAT à l'aide du logiciel APILAB mis au point par le service informatique API-bioMérieux, dirigé par J. M. BOEUFGRAS. Ce logiciel permet de comparer les profils obtenus à ceux correspondant aux genres et espèces bactériens de milieux divers (hopitaux, eaux, sol, matériel végétal etc.), répertoriés dans la base APILAB régulièrement mise à jour. Il en découle une proposition des noms du genre et de l'espèce auxquels la souche est apparentée.

Des caractères additionnels ont également été examinés pour affiner l'identification des *Bacillus* proposée par le système API-bioMérieux.

\* Production de gaz. Le catabolisme fermentaire des glucides produit dans certains cas du CO<sub>2</sub> conduisant à la formation de bulles dans les tubes de galeries API 50CHB par des bulles. Les souches sont alors notées «gaz +».

\* Réduction d'acétylène. Plusieurs espèces de *Bacillus* sont décrites comme fixatrices d'azote (RHODES-ROBERTS, 1981). Nous avons utilisé la méthode de réduction d'acétylène pour la mise en évidence de l'activité fixatrice d'azote de nos souches (Annexe 1). Des tubes contenant le milieu 4SC incliné sont inoculés par une culture bactérienne de 24 h à 30 °C, en milieu LB. On injecte à travers un bouchon en cahoutchouc (Suba seal, 3A3-29) assurant une fermeture hermétique du tube, 1 % (v/v) d'acétylène et 1 ml de propane. Ce dernier sert de gaz marqueur et permet de détecter d'éventuelles fuites. Après une période d'incubation de 7 jours à 30 °C, l'éthylène produit, témoignant d'une activité réductrice d'acétylène, est détecté à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (GIRDEL).

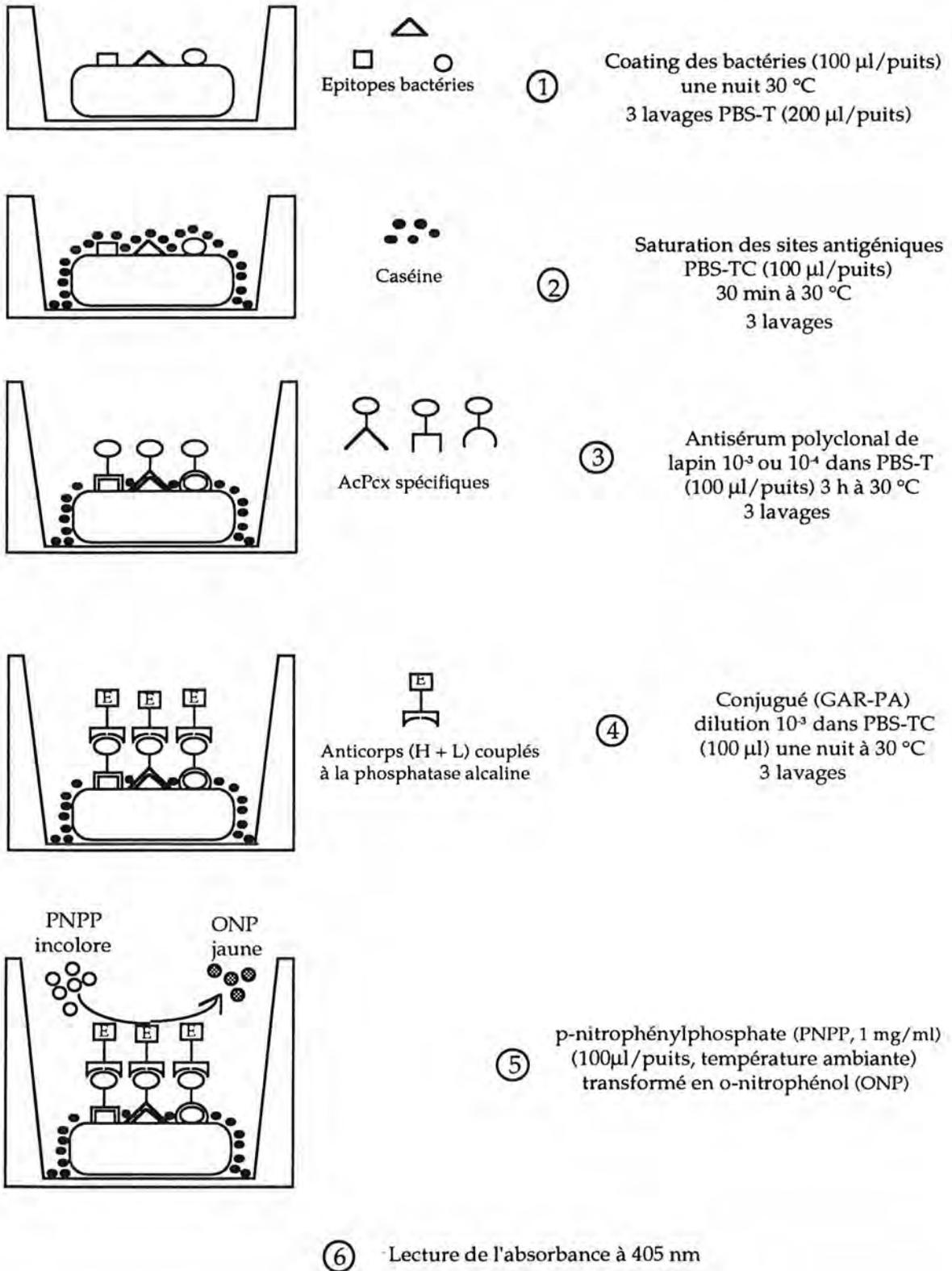
**8. Caractérisation sérologique des souches en ACP-ELISA.** Nous avons utilisé le protocole de l'ELISA indirect proposé par l'Equipe d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère (Figure 2). Ce protocole s'inspire de celui établi par ARSAC et CLEYET-MAREL (1986). Les suspensions bactériennes de concentration 10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> cellules/ml de tampon PBS sont déposées dans les puits (100 µl) des plaques de microtitration Nunc. Des puits n'ayant reçu que du PBS seul, c'est-à-dire sans bactéries, servent de témoins négatifs. Trois répétitions ont été réalisées par traitement. Après assèchement une nuit à 40 °C et 3 lavages automatiques avec des volumes de 200 µl de tampon PBS-T.

Les sites antigéniques des bactéries et les sites libres de la plaque sont saturés par une solution de PBS-TC. Un volume de 100 µl de sérum anti-CF43 ou anti-RSA20 dilué au 1/1000<sup>ème</sup> sont déposés dans les puits et les plaques sont incubées pendant 3 h à 37 °C. Trois lavages sont réalisés comme précédemment décrit et 100 µl de la solution de conjugué GAR-PA dans le tampon PBS-TC (1/10000) sont apportés par puits. A l'issue de l'incubation d'une nuit à 30 °C, les plaques sont lavées 2 fois avec du PBS-T et une fois avec du PBS. Une solution de 1 mg/ml du substrat p-nitrophénylphosphate dans le tampon diéthanolamine 1M (pH 9,8) est apportée dans chaque puits (100 µl). Les plaques sont laissées 20 min à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est lue à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Dynatech, MR 5000). La valeur moyenne des puits témoins est automatiquement retranchée de celles des échantillons. La lecture des 96 puits de la plaque se fait simultanément en 2,5 secondes après une agitation douce de quelques secondes. Ce temps de lecture très rapide permet de s'affranchir de l'arrêt de la réaction enzymatique et de disposer d'une souplesse sur le temps de lecture.

**9. Conservation des souches.** Au terme de la purification, trois colonies par isolat sont repiquées sur milieu HW incliné, en tube. Ces tubes servent à la conservation à court terme. Des précautions supplémentaires sont prises pour la conservation à long terme. Deux procédés de conservation ont été utilisés :

\* les isolats sont cultivés sur milieu gélosé MBS, en boîte de Pétri (48 h, 30 °C). Des carottes

Figure 2 : Schéma du protocole ACP- ELISA indirect utilisé au cours de la caractérisation sérologique des souches.



de gélose portant les colonies dont on a vérifié la pureté et la présence de spores, sont prélevées et transférées dans les tubes Eppendorf (3 carottes par tube). Les tubes sont laissés 24 h à -20 °C avant d'être stockés à -75 °C,

\* les bactéries sont mises en culture dans le milieu LB pendant 18 h à 30 °C et sous agitation douce. On additionne du glycérol (v/v) à la suspension bactérienne alors en phase exponentielle de croissance ( $10^8$  cellules/ml) dans des tubes de cryoconservation. Le mélange est homogénéisé au vortex (Bioblock, TOP-MIX 94323). Les tubes sont portés graduellement 24 h à 4 °C et -20 °C, puis transférés au congélateur -75 °C pour le stockage.

**10. Quantification de la microflore totale.** L'estimation de la microflore totale des compartiments SNR, SR, et RP est effectuée par étalement de suspensions-dilutions sur gélose nutritive. Trois répétitions par dilution ont été réalisées. La taille de la microflore totale est exprimée par le nombre de CFU rapporté au poids de matière sèche de sol ou de racines (72 h, 60 °C).

**11. Quantification de la microflore fixatrice d'azote.** Nous avons utilisé la méthode de réduction de l'acétylène. Des suspensions-dilutions de sol ou de racines (200 µl), sont inoculées à des tubes de 40 ml de volume contenant 6 ml de milieu gélosé 4SC incliné. Trois répétitions par dilution ont été réalisées. La taille de la microflore fixatrice d'azote est estimée par la méthode du nombre le plus probable (MPN), à partir des tubes où l'activité réductrice d'acétylène a été détectée. La correspondance entre les nombres caractéristiques des tubes positifs et la quantité de fixateurs d'azote est obtenue avec les tables de McCRADY (1918).

**12. Quantification des spores de *Bacillus polymyxa*.** Les *Bacillus polymyxa* sont capables de produire des spores résistantes à la chaleur. Nous avons utilisé cette capacité de thermorésistance de spores pour leur dénombrement dans les différents compartiments SNR, SR et RP. Un volume de 200 µl de suspensions-dilutions de sol ou de racines préalablement pasteurisées (10 min, 80 °C), sont inoculées à des tubes contenant 8 ml de milieu LG, contenant 10 g d'amidon et une cloche de Durham renversée. Trois à cinq répétitions par dilution ont été réalisées. Les tubes sont ensuite fermés hermétiquement à l'aide de bouchon en caoutchouc (Suba seal, 3A3-29). Après une période d'incubation de 3 jours à 30 °C, les tubes présentant une croissance bactérienne indiquée par un trouble du milieu et une production de gaz emprisonné dans la cloche de Durham, sont sélectionnés.

Nous avons poursuivi par la suite le protocole proposé par LEDINGHAM et al. (1945) pour dénombrier par MPN les spores de *B. polymyxa* dans les tubes où des bulles de gaz ont été détectées. En effet, ces auteurs ont décrit une procédure d'isolement de souches de *Aerobacillus polymyxa* à partir des échantillons pasteurisés de mouture de blé grâce à leur capacité fermentaire. Au sein du genre *Bacillus* les espèces *B. polymyxa*, qui renferme l'ancien *Aerobacillus polymyxa* (SMITH et al., 1952), et *B. macerans* sont les plus connues pour produire du gaz (CO<sub>2</sub>) à partir de l'amidon via la fermentation du glucose (CLAUS

et BERKELEY, 1986). Pour ce faire, le contenu des tubes (gaz+) est dilué dans du PBS stérile pH 7,2, puis étalé sur milieu LG gélosé contenant le colorant vital rouge neutre, en boîte de Pétri. A l'issue de la période d'incubation de 48 h à 30 °C, les colonies de *B. polymyxa* sont généralement colorées en rouge suite à l'incorporation par diffusion du rouge neutre. Ces colonies sont testées de nouveau pour leur capacité à produire du gaz, et quelques unes d'entre elles sont identifiées. Cette vérification est nécessaire pour éliminer la prise en compte des tubes contenant qui pourrait résulter de l'activité des spores de *Clostridium*.

**13. Traitements statistiques.** Deux méthodes d'analyse ont été effectuées à l'aide du logiciel STATGRAPHIC'S (Release 4.2 Uniware STSC, Inc. USA). Les données avec un nombre limité de répétitions du fait de la nécessité de réalisation de plusieurs traitements, ont été traitées par des tests non paramétriques (HOLLANDER ET WOLFE, 1973). L'effet global entre les traitements est d'abord examiné par le test H de Kruskal et Wallis, puis les groupes homogènes sont obtenus par le test de comparaison de Kolmogorov-Smirnov. Dans le cas de traitements avec suffisamment de répétitions dont les données brutes ou transformées répondent à une loi de distribution normale, une analyse de variance a été réalisée. Les groupes homogènes sont donnés par le test de Newman et Keuls. Pour l'ensemble des traitements statistiques, les risques de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> espèce ont été fixés respectivement à 5 et 10%. Les valeurs moyennes sont données avec les intervalles de confiance à 90 ou 95% calculés à partir des écart-types.

## II. - RESULTATS

### A - Détermination des paramètres critiques pour l'immunopiéage.

**1.- Adsorption d'anticorps polyclonaux (AcPcx) sur les plaques.** Six dilutions décimales du sérum de lapin contenant les AcPcx anti-CF43 sont testées. Les dilutions sont réalisées dans trois tampons différents : carbonate-bicarbonate de sodium pH 9,5 (CB), borate de sodium 0,05M pH 8,4 (BS) et le tampon phosphate 0,1M pH 7,2 (PBS). Deux types de plaques ont été comparées : Costar (Polyvinile) et Nunc (Polystyrène).

La figure 3 donne les résultats des absorbances en fonction des quantités de sites anticorps disponibles au moment de l'apport du conjugué GAR-PA. Les cinétiques en cloche sont caractéristiques des réactions anticorps-antigènes. De faibles quantités d'AcPcx sont adsorbées avec les dilutions élevées du sérum, tandis qu'un encombrement stérique d'AcPcx conduit à une chute des absorbances aux faibles dilutions. Les différences d'absorbance entre les plaques sont statistiquement significatives ( $p < 0,10$ ). Les absorbances les plus fortes sont obtenues avec les dilutions 1/10000 et 1/1000 sur la plaque Costar. Un effet significatif global ( $p < 0,06$ ) des tampons de dilutions du sérum a été également observé pour cette même plaque Costar. L'analyse plus fine des absorbances aux deux dilutions optimales 1/10000 et 1/1000 (Fig. 4) avec la plaque Costar révèle une quantité plus importante de sites anticorps pour la dilution 1/10000 ( $p < 0,10$ ). Parmi les trois tampons testés, le tampon carbonate-bicarbonate (CB) permet une adsorption satisfaisante d'AcPcx aux deux dilutions testées.

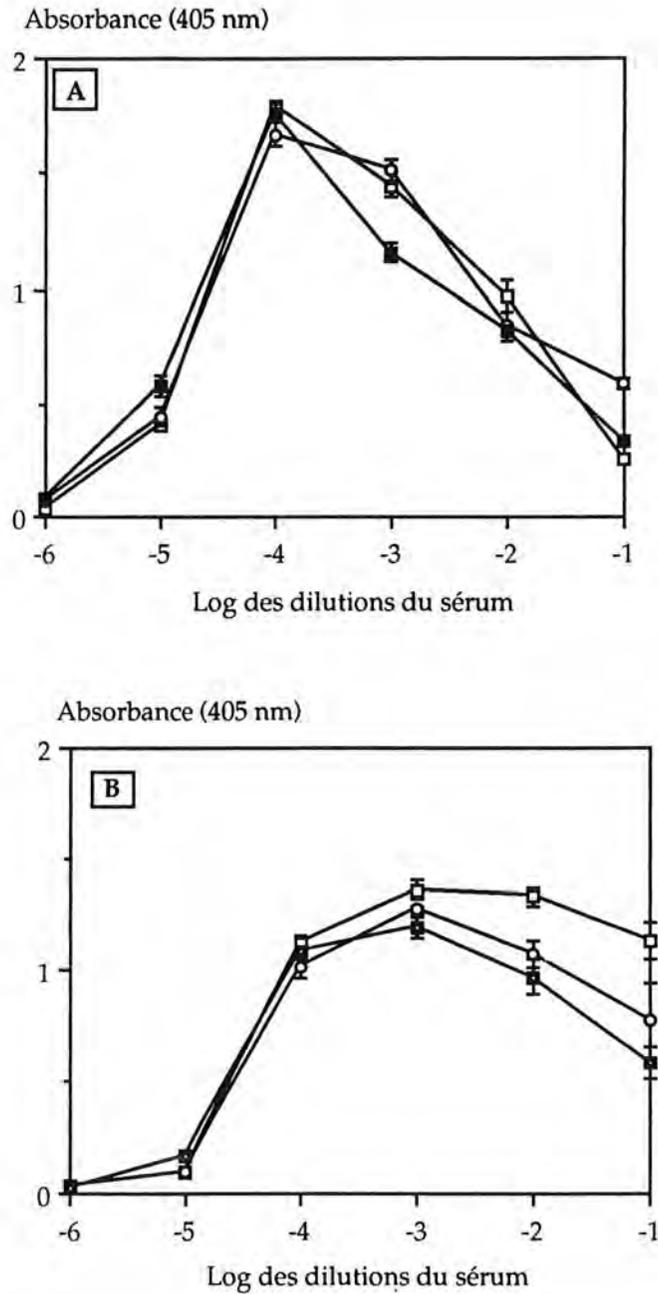


Figure 3. Dosage en ELISA des anticorps polyclonaux anti-*Bacillus polymyxa* CF43 adsorbés sur les microplaques Costar [A] et Nunc [B]. Le sérum contenant les anticorps a été dilué dans les tampons carbonate-bicarbonate de sodium 0,1M pH 9,5 (CB □), borate de sodium 0,1M pH 8,4 (BS ○) et le tampon phosphate 0,1M pH 7,2 (PBS ■). Les barres verticales représentent les intervalles de confiance à 95 % calculés à partir des écart-types.

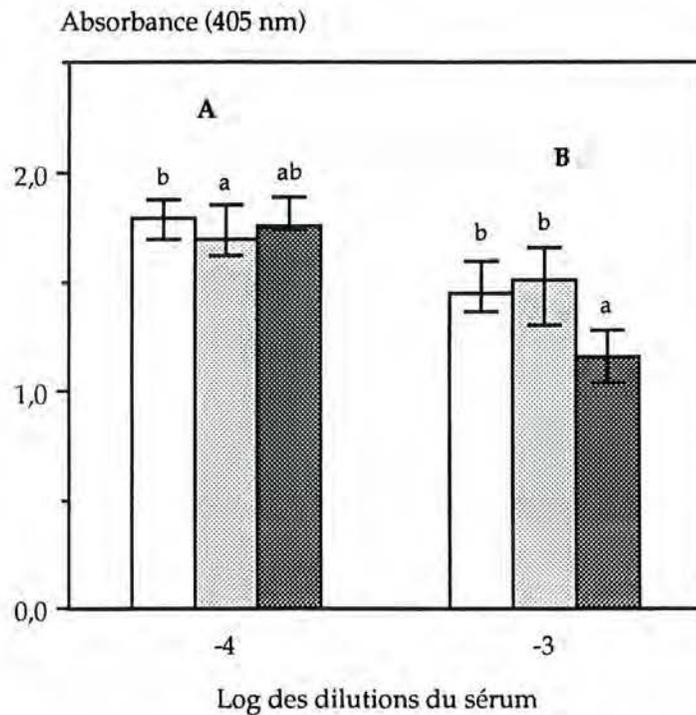


Figure 4. Comparaison des deux dilutions du sérum anti-*Bacillus polymyxa* CF43 donnant les absorbances les plus fortes en ELISA. Trois tampons de "coating" : carbonate-bicarbonate de sodium 0,1M pH 9,5 (□), borate de sodium 0,1M pH 8,4 (◻), le tampon phosphate 0,1M pH 7,2 (▣) et la plaque Costar ont été utilisés. a, b, ab, A et B indiquent que les valeurs médianes des absorbances sont issues d'échantillons d'une distribution significativement différente au risque 10 % (Test de Kolmogorov-Smirnov).

**2.- Désorption des bactéries fixées aux anticorps.** Les résultats précédents ont montré que l'optimum d'adsorption des AcPcx était obtenu avec le sérum dilué au 1/10000<sup>ème</sup> et que les plaques Costar étaient les meilleurs. Nous avons utilisé cette concentration en AcPcx au cours des deux expériences d'évaluation du taux de désorption des cellules de la souche homologue CF43. Des quantités de  $10^4$  et  $10^5$  cellules en culture pure avaient été déposées par puits avant d'être désorbées à l'issue de la période d'incubation de 15 h à 4 °C. La désorption est effectuée avec le tampon PBS 0,1M pH 7,2 et la solution de KCl 0,1M pH 5,5, accompagnée d'une action mécanique à l'aide d'un embout de pipette stérile (MAVINGUI et al., 1990). **La solution de désorption devait répondre à un critère essentiel, celui de permettre une désorption maximale des cellules attachées spécifiquement aux anticorps tout en préservant la viabilité cellulaire durant l'expérimentation.** Nous avons utilisé de l'eau distillée comme témoin afin de juger de l'efficacité des solutions testées.

L'ensemble des résultats de désorption est reporté sur la figure 5. Le taux de bactéries désorbées est nettement influencé par la quantité de bactéries dans l'inoculum et la solution de désorption. Les taux de désorption supérieurs à 40% sont atteints par des apports de  $10^5$  bactéries par puits, soit

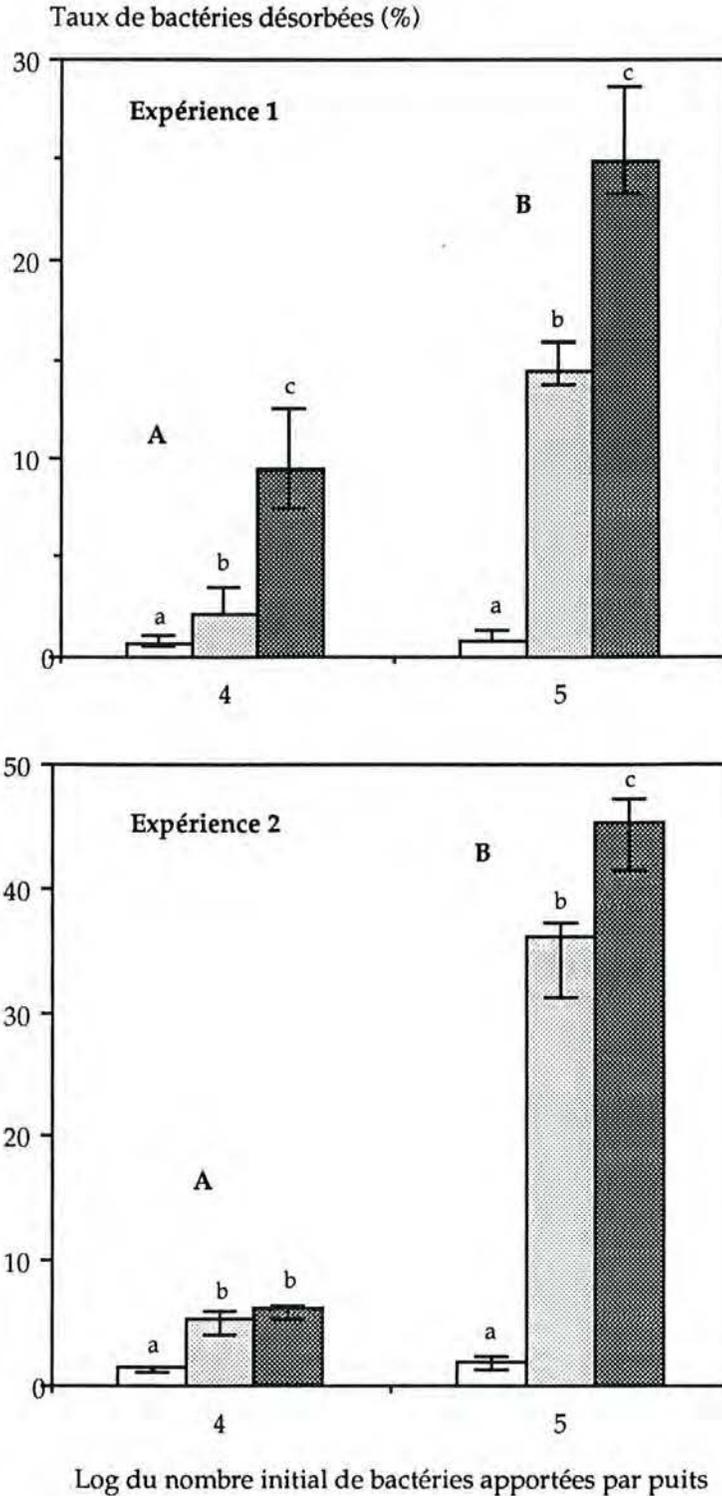


Figure 5. Effet des différentes solutions de désorption : eau distillée pH 5,5 (□); tampon phosphate 0,1M pH 7,2 (◻); solution de KCl 0,1M pH 5,5 (◼), sur le taux de désorption des cellules de *Bacillus polymyxa* CF43 en immunopéage avec le sérum anti-CF43 (dilution 1/1000). a, b, c et A et B indiquent que des valeurs médianes issues d'échantillons de distribution significativement différente au risque 10 % (Test de Kolmogorov-Smirnov).

$10^6$  bactéries/ml après désorption avec le KCl alors que ces taux ne dépassent pas 10 % pour des apports de  $10^4$  bactéries/puits. Le taux de désorption obtenu avec de l'eau distillée est négligeable et correspond essentiellement à l'action mécanique. Des variations importantes ont été relevées entre les expériences 1 et 2. Cet effet expérience, statistiquement significatif ( $p < 0,10$ ), pourrait être imputable à la conduite de l'expérimentation tout comme au matériel utilisé. Toutefois, les différences de taux de désorption entre le nombre de bactéries apportées par puits et les solutions de désorption, restent pour la plupart reproductibles dans les deux expériences.

**3.- Effet du nombre de lavages sur le taux de désorption.** Nous avons cherché à vérifier si le nombre de lavage pouvait améliorer le taux de récupération des bactéries. Pour cela,  $10^5$  et  $10^6$  cellules de la souche homologue CF43 étaient apportées dans les puits de plaque sensibilisée avec des AcPcx (dilution 1/10000 du sérum anti-CF43). Les cellules fixées étaient désorbées avec le KCl 0,1M pH 5,5.

Les résultats montrent que le maximum de désorption est obtenu dès le premier lavage (Fig. 6). Au deuxième et au troisième lavage, le taux de récupération représente moins de 1% du premier lavage. Nous retrouvons, à l'issue du premier lavage avec des apports de  $10^5$  cellules par puits, des niveaux de désorption similaires aux résultats précédents. Le taux de bactéries désorbées est plus faible pour un apport de  $10^6$  bactéries/puits. On n'a donc un optimum du taux de récupération pour  $10^5$  bactéries apportées (cela signifie qu'il faudrait diluer dans le cas où on a plus de  $10^6$  bactéries à l'immunopiage). Un seul lavage semble suffisant pour désorber le maximum de cellules fixées. Par conséquent, dans les expériences ultérieures, sera effectué un seul lavage au cours de l'étape de désorption des bactéries.

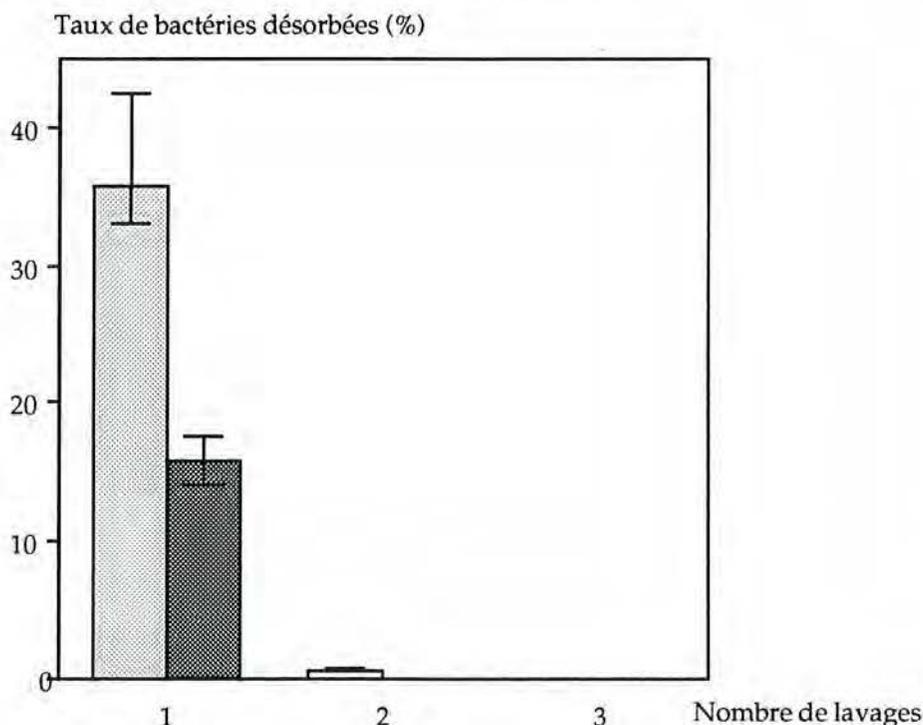


Figure 6. Effet du nombre de lavage sur le taux de désorption des cellules de *Bacillus polymyxa* CF43 en immunopiage. Les bactéries sont apportées à la concentration de  $10^5$  (□) et  $10^6$  (▨) cellules par puits.

**4.- Interaction AcPcx adsorbés - taux de désorption.** Nous avons vu lors de l'évaluation des AcPcx adsorbés sur les plaques (Fig. 4) que la dilution 1/10000 conduisait à une adsorption supérieure à celle de la dilution 1/1000. Nous avons, cependant, remarqué que les puits témoins ayant reçus le tampon CB sans AcPcx donnait lieu à des absorbances bien que très faibles, dues à l'adsorption du conjugué GAR-PA sur la plaque. Il s'est produit probablement le même phénomène dans les autres puits, à des degrés divers selon la dilution du sérum, au niveau des sites de plaque non occupés par les AcPcx. C'est pourquoi nous avons testé ces deux dilutions sur le taux de désorption des bactéries.

Les cinétiques de désorption de la figure 7 indiquent une évolution exponentielle du taux de récupération en fonction du nombre de bactéries dans l'inoculum. Un effet statistiquement significatif ( $p < 0,05$ ) est observé de la plus faible à la plus forte concentration en bactéries. Les taux de récupération les plus élevés sont obtenus avec les apports de  $10^5$  cellules dans les puits sensibilisés en AcPcx. Les taux résultant des puits où les AcPcx ont été substitués par de l'eau distillée et le tampon CB sont très faibles, représentant moins de 10 % du taux de récupération en présence des AcPcx. Ce résultat témoigne d'une faible fixation passive de bactéries sur la plaque.

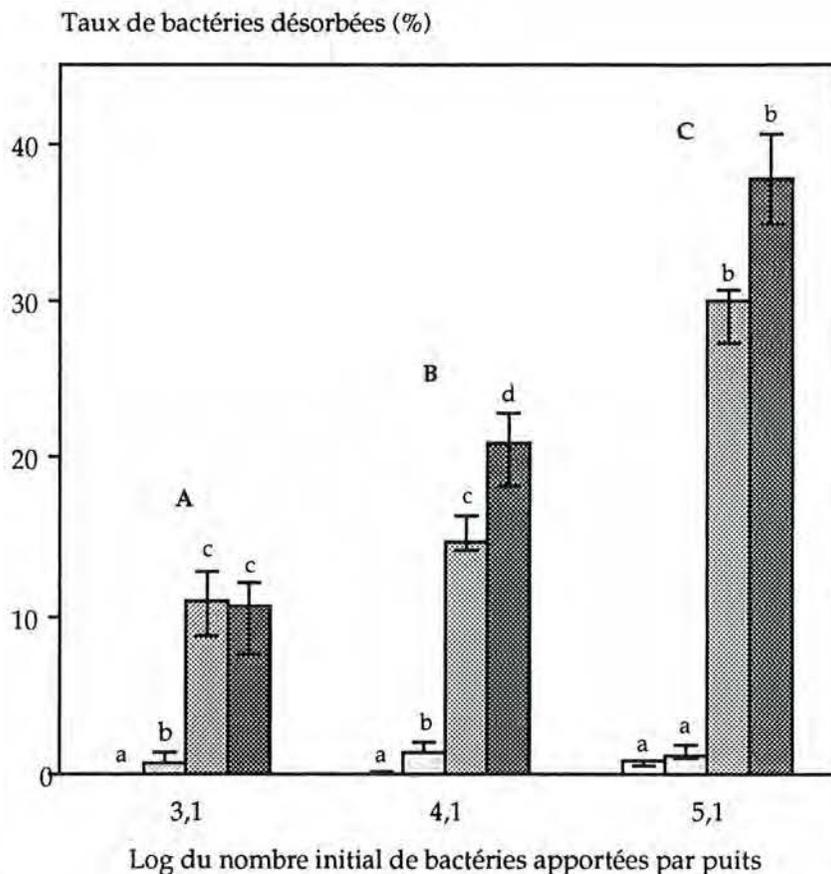


Figure 7. Evaluation du taux de désorption des bactéries dans les puits de plaque sensibilisée avec les dilutions anti-CF43 1/1000 (▨) et 1/10000 (□). Les puits où les anticorps ont été substitués par de l'eau distillée pH 5,5 (□) et le carbonate-bicarbonate 0,1M pH 9,5 (□) servent de témoins. a, b, c et A, B, C indiquent que les valeurs médianes sont issues d'échantillons de distribution significativement différente au risque 5 % (Test de Kolmogorov-Smirnov).

La comparaison des taux de récupération obtenus avec les dilutions AcPcx 1/10000 et 1/1000 indique un avantage significatif ( $p < 0,10$ ) en faveur de cette dernière avec des apports de  $10^4$  bactéries par puits. On peut également noter une tendance à un taux de récupération plus élevé pour cette même dilution AcPcx 1/1000 avec  $10^5$  bactéries par puits mais la différence n'est pas significative ( $p > 0,10$ ). Ces résultats montrent que le taux de récupération des bactéries ne dépend pas que des quantités d'anticorps. Au cours des expériences suivantes nous utiliserons donc le sérum dilué au 1/1000<sup>ème</sup>.

**5.- Spécificité du sérum polyclonal anti-CF43 en immunopiéage.** Dans un premier temps nous avons évalué la spécificité, au niveau de l'espèce, du sérum anti-CF43 en ACP-ELISA, en comparant les niveaux de réactivité de la souche homologe (CF43) et de la souche type *B. polymyxa* ATCC 842 avec ceux obtenus en présence de souches types des espèces proches, *Bacillus circulans* ATCC 9374 et *Bacillus macerans* ATCC 8244 (PRIEST et al., 1981). La conduite de l'ACP-ELISA a été effectuée suivant le protocole de la figure 2. La dilution 1/1000 du sérum de lapin anti-CF43 a été utilisée. Les résultats montrent que seules les souches de *B. polymyxa* CF43 et ATCC 842 réagissent avec le sérum anti-CF43 (Fig. 8). Ce qui suggère une spécificité du sérum au niveau de l'espèce. La confirmation de cette spécificité a été effectuée avec un nombre plus important de souches (BERGE, 1988). Le sérum anti-*B. circulans* RSA20 utilisé par ailleurs, donne une forte réaction avec la souche homologue. En considérant un seuil de réactivité de 0,5, ce dernier sérum présente une réaction croisée non négligeable avec la souche type de *B. circulans* NCIB 9374 alors que sa réactivité avec les souches de *B. polymyxa* CF43, ATCC842 et *B. macerans* ATCC 8244 est relativement faible.

Nous avons par la suite réalisé une expérience d'immunopiéage des souches *B. polymyxa* CF43 et *B. circulans* RSA20 avec  $10^5$  bactéries par puits, en présence de leur sérum respectif anti-CF43 et anti-RSA20 dilué au 1/1000<sup>ème</sup> (Fig. 9). Le taux de récupération le plus satisfaisant (19,7 %) est obtenu avec le sérum anti-CF43 partiellement purifié et sa souche homologue, ce qui montre sa bonne spécificité et son efficacité. Le sérum anti-RSA20 conduit à des résultats décevants aussi bien avec la souche homologue RSA20 qu'avec la souche hétérologue. La qualité de ce sérum total non purifié (voir page 68) semble ne pas convenir à l'immunopiéage. Les protéines autres que les immunoglobulines contenues dans ce sérum entier affecteraient l'efficacité de l'immunopiéage, Il convient de noter que les puits témoins sans sérum donnent lieu à une adsorption passive très négligeable.

**6.- Effet de la température d'incubation des échantillons de sol sur l'efficacité de l'immunopiéage de *B. polymyxa*.** Les liaisons anticorps-antigènes sur lesquelles reposent l'immunopiéage sont connues pour être sensibles à la température du milieu réactionnel. Nous avons testé l'effet de deux températures, 4 et 30 °C, sur l'efficacité de l'immunoisolement de *B. polymyxa* à partir d'un échantillon de sol non-rhizosphérique et rhizosphérique provenant de plantules de blé de 15 jours, cultivé en pot dans un phytotron. Les échantillons de sols ont été dilués au 1/1000<sup>ème</sup>, puis incubés pendant 15 h (MAVINGUI et al. 1990). Après désorption et étalement des bactéries sur milieu MBS, les *B. polymyxa*

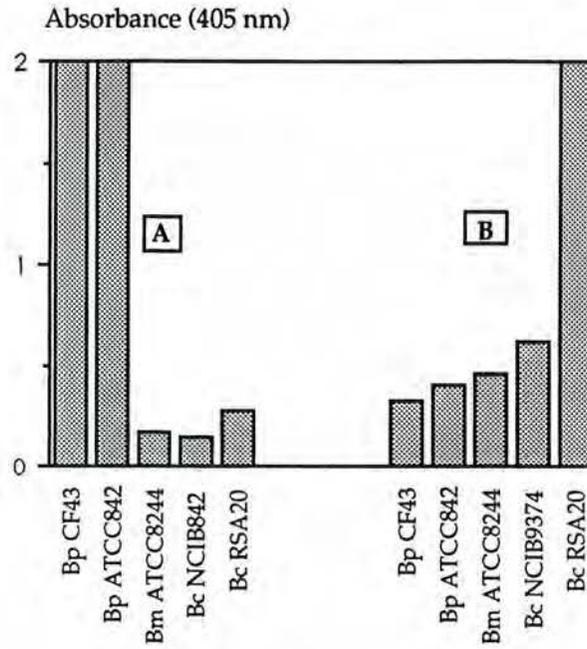


Figure 8. Spécificité des sérums polyclonaux anti-*Bacillus-polymyxa* CF43 [A] et anti-*Bacillus circulans* RSA20 [B] avec les souches homologues et hétérologues des espèces proches, évaluée en ACP-ELISA. Bp : *Bacillus polymyxa*; Bm : *Bacillus macerans* et Bc : *Bacillus circulans*.

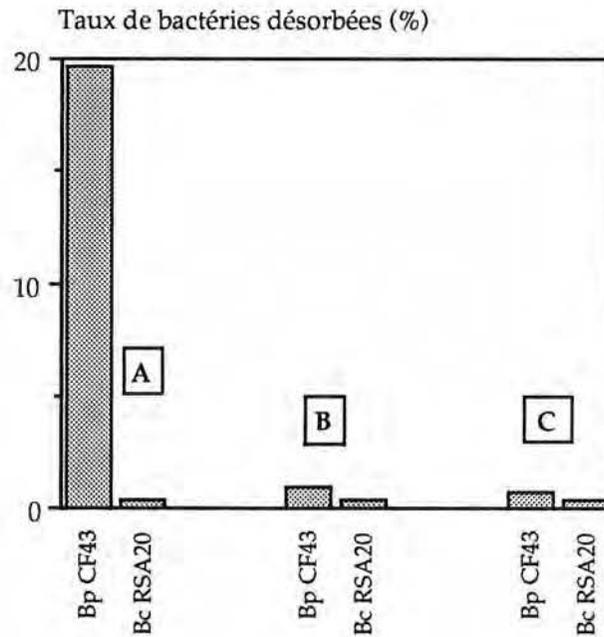


Figure 9. Spécificité et efficacité des sérums anti-*Bacillus-polymyxa* CF43 [A] et anti-*Bacillus circulans* RSA20 [B] en immunopiégeage avec les souches homologues. Les valeurs des puits témoins sans anticorps [C] permettent d'évaluer l'adsorption passive des bactéries sur la microplaque. Bp : *Bacillus polymyxa*; Bc : *Bacillus circulans*.

ont été dénombrés comme décrit dans le paragraphe «Matériel et Méthodes». Les bactéries totales et les *Bacillus* sporulants immunopiégés, indiqués par les colonies contenant les spores, avaient été dénombrés en parallèle afin de déterminer le niveau de récupération des *B. polymyxa* par rapport aux méthodes classiques.

Le nombre de *B. polymyxa* immunopiégés, à 4 °C, dans le sol non-rhizosphérique et rhizosphérique est respectivement de 2,7 et 4,4 10<sup>5</sup> bactéries par g de sol sec (Tableau II). Cela représente 15,5% du total de bactéries immunopiégées dans le sol non-rhizosphérique, et seulement 1% dans le sol rhizosphérique. Il convient de noter que dans ce sol rhizosphérique, le nombre de bactéries immunopiégées est plus élevé ( $p < 0,02$ ). De ce fait, il est probable qu'un encombrement plus important de sites anticorps ait eu lieu, gênant peut-être la fixation des cellules de *B. polymyxa*. A la température de 30 °C, nous n'avons pas observé de colonies apparentées à *B. polymyxa* dans les deux compartiments de sols étudiés. Cette température ne semble pas favorable, dans nos conditions expérimentales, à l'immunoisolement de *B. polymyxa*. On peut noter par ailleurs, un accroissement une fois encore significatif ( $p < 0,05$ ) du nombre de bactéries immunopiégées, qui atteint un facteur 10 dans le sol non-rhizosphérique. Cet accroissement semble donc incompatible avec l'immunoipiégeage de *B. polymyxa* dans le sol. L'incubation à 30 °C pendant 15 h aurait favorisé la multiplication de bactéries à croissance rapide, telles les bactéries de la famille des *Pseudomonadaceae* et des *Enterobacteriaceae*, qui auraient masqué la population de *B. polymyxa*, tout comme celle de l'ensemble de *Bacillus* sporulants dont le taux est plus faible à 30 °C. C'est pourquoi nous avons choisi de réaliser la suite des expériences d'immunoipiégeage à 4°C.

Tableau II.- Effet de la température d'incubation du sol non-rhizosphérique (SNR) et rhizosphérique (SR) d'un blé de printemps (*Triticum aestivum* L., var. Fidel) de 15 jours sur l'efficience de l'immunoipiégeage de *Bacillus polymyxa*.

Fraction de sol	Température d'incubation	Bactéries totales immunopiégées x 10 <sup>6</sup> g <sup>-1</sup> PMS*	<i>Bacillus</i> sporulants totaux immunopiégés x 10 <sup>6</sup> g <sup>-1</sup> PMS* (%)*	<i>Bacillus polymyxa</i> immunopiégés x 10 <sup>5</sup> g <sup>-1</sup> PMS* (%)*
SNR	4°C	1,7 ± 0,8	1,1 ± 0,5    64,7	2,7 ± 1,6    15,5
	30°C	38,2 ± 24,7	2,2 ± 2,0    5,7	0            0
SR	4°C	43,0 ± 24,7	12,8 ± 7,8    29,8	4,4 ± 1,7    1,0
	30°C	100,0 ± 40,0	4,5 ± 2,6    4,5	0            0

\*PMS : Poids de matière sèche de sol (72 h, 60°C). (%) de bactéries totales immunopiégées.

Les *Bacillus* sporulants ont été dénombré par observation au microscope à contraste de phase des spores de colonies isolées en boîte de Pétri.

Les moyennes de 4 répétitions sont données avec leur intervalle de confiance à 90 % calculé à partir de l'écart-type.

**7.- Effet d'une bactérie hétérologue sur l'immunopiégeage de *B. polymyxa* CF43.** Cette expérience a été menée dans le but d'étayer l'hypothèse du masquage de la population de *B. polymyxa* par des bactéries à croissance rapide. Nous avons réalisé une expérience d'immunopiégeage avec la souche homologue CF43 en présence de la souche *Pseudomonas fluorescens* PH12b. Cette dernière est utilisée pour mimer la microflore tellurique, d'autant que lors de son isolement elle représentait plus de 5 % de la microflore totale de la racine de blé.

La souche CF43 est apportée à la concentration constante de  $10^5$  cellules par puits, seule ou en mélange avec la souche PH12b. Pour la préparation de l'inoculum mixte, les suspensions-dilutions de la souche PH12b sont réalisées de façon à obtenir des proportions variées en CF43 (0,1; 1; 10; 50 et 100 %). Les mélanges sont réalisés dans les tubes Eppendorf et 100  $\mu$ l sont déposés dans chaque puits. Après les étapes d'incubation et de désorption, les bactéries récupérées sont étalées sur milieu contenant le saccharose, en boîte de Pétri incubée 48 h à 30°C. Les colonies des deux souches y sont facilement différenciables. En effet, les colonies de la souche CF43 sont grosses, régulières et légèrement transparentes, alors que celles de la souche PH12b sont petites, ponctiformes et opaques.

Le taux de récupération de la souche CF43 augmente en fonction de sa proportion dans l'inoculum (Fig. 10).

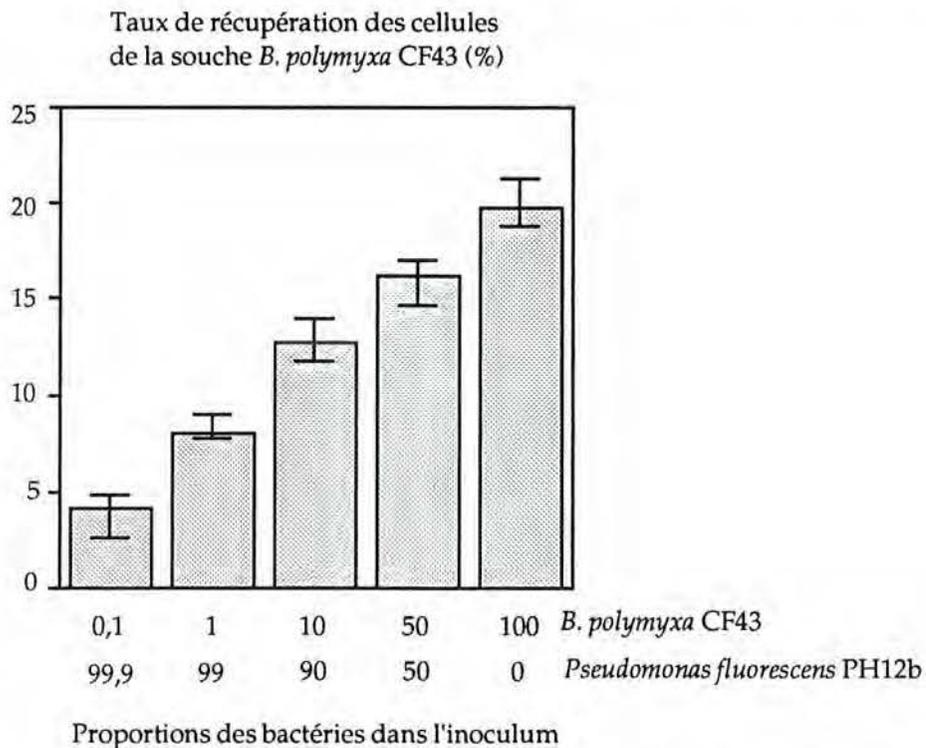


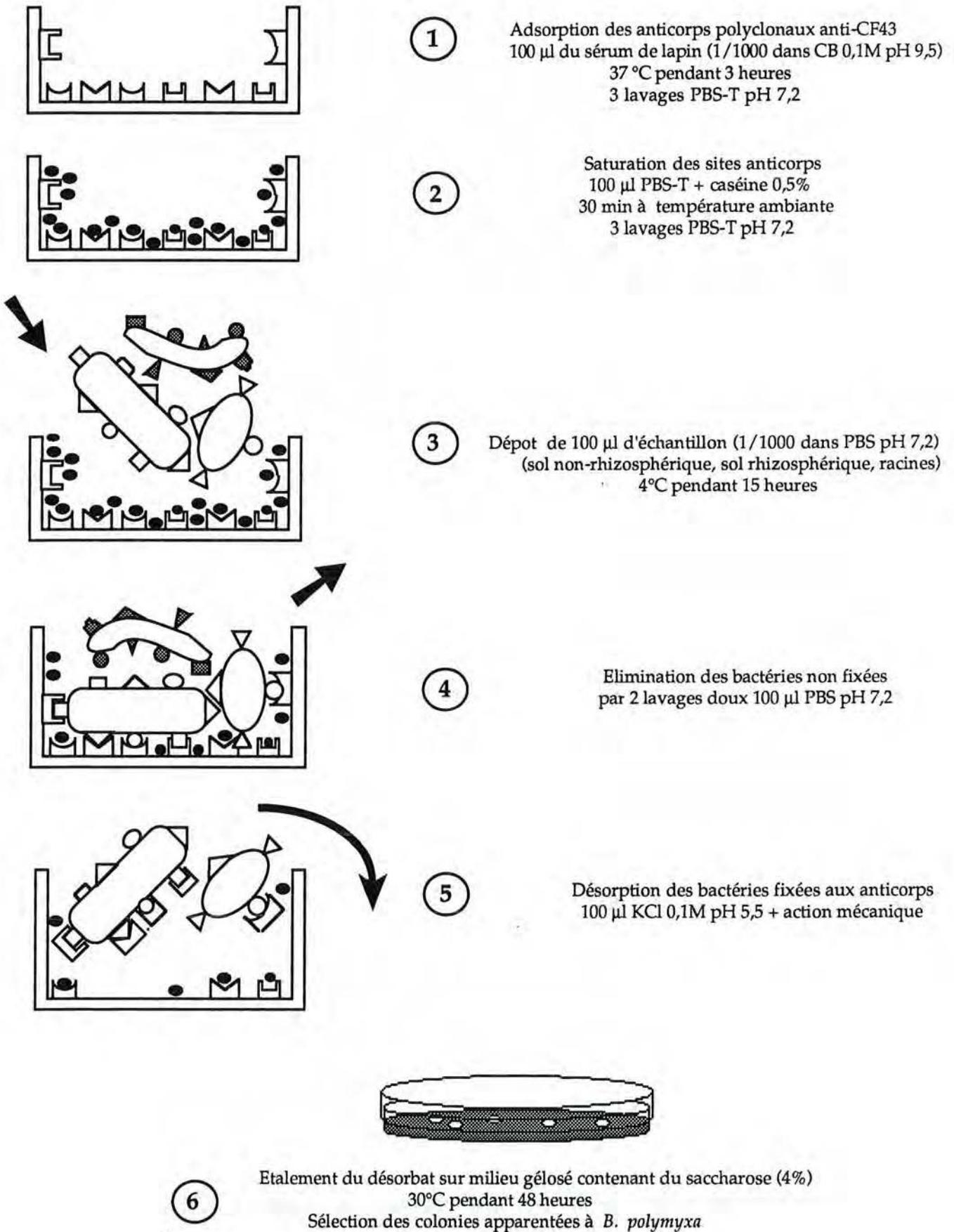
Figure 10. Effet de la souche hétérologue *Pseudomonas fluorescens* PH12b sur le taux de récupération des cellules de la souche homologue *B. polymyxa* CF43 en immunopiégeage. La plaque Costar a été sensibilisée avec le sérum anti-CF43 dilué au 1/1000 dans le tampon carbonate bicarbonate 0,1M pH 9,5.

Environ 20 % de cellules sont récupérées avec la souche CF43 seule contre seulement 4 % avec le mélange contenant la souche PH12b, dans lequel la CF43 ne représentait que 0,1% de bactéries apportées. La présence de la souche PH12b en concentration relativement élevée a donc entravé l'efficacité de l'immunopinage. Cependant, quelle que soit la concentration des cellules de la souche PH12b, nous ne récupérons jamais plus de 0,1% de cellules de celle-ci sur le milieu saccharose. Les anticorps polyclonaux utilisés semblent dans ce cas spécifiques. Le faible taux de récupération de la souche CF43 en présence d'un nombre non négligeable de cellules de la souche PH12b ne peut donc s'expliquer, dans ces conditions d'incubation à 4 °C, que par un masquage de sites anticorps par ces dernières, les rendant moins accessibles aux cellules de la souche CF43.

Ce résultat laisse présager des difficultés pouvant être rencontrées lors de l'immunopinage de *B. polymyxa* dans un milieu complexe tel que le sol, où la bactérie est non seulement en présence d'une microflore importante, mais peut se localiser à l'intérieur même des agrégats rendant plus délicate son extraction.

A l'issue de la mise au point de la méthode d'immunopinage, nous donnons sur la figure 11 le protocole final qui sera utilisé lors de la campagne d'immuno-isollement de souches de *B. polymyxa*.

Figure 11. Schéma du protocole final de l'immunopréciéage



**B.- Immunopiageage des souches de *B. polymyxa* du sol non rhizosphérique, du sol rhizosphérique et du rhizoplan.**

L'ensemble des résultats d'isolement est rassemblé dans le tableau III. La taille de la population de *B. polymyxa* est estimée à  $2,5$  et  $2,9 \times 10^5$  bactéries par g de sol sec respectivement dans le compartiment de sol non rhizosphérique et rhizosphérique. Tandis qu'une population de taille plus importante ( $p < 0,05$ ) correspondant à  $6,2 \times 10^5$  bactéries de *B. polymyxa* par g de racines a été immunopiéagée dans le rhizoplan. Lorsque que l'on rapporte le nombre de *B. polymyxa* à celui des bactéries totales immunopiéagées, le pourcentage de *B. polymyxa* est nettement plus élevé dans les racines (51,7 %), que dans le sol non-rhizosphérique (10,5 %). Tandis que 1% seulement de bactéries immunopiéagées dans le compartiment de sol rhizosphérique sont des *B. polymyxa*. On peut noter que le pourcentage de *Bacillus* sporulants totaux immunopiéagés répond à la même distribution que les *B. polymyxa*.

**Tableau III.- Taille de la population de *Bacillus polymyxa* immunopiéagée dans les compartiments de sol non-rhizosphérique (SNR), sol rhizosphérique (SR) et le rhizoplan (RP) d'un blé de printemps (*Triticum aestivum* L., var. Fidel) de 18 jours.**

Compartiments	Bactéries totales immunopiéagées $\times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ PMS}^*$	<i>Bacillus</i> sporulants totaux immunopiéagés $\times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ PMS}^*$ (%)	<i>Bacillus polymyxa</i> immunopiéagés $\times 10^5 \text{ g}^{-1} \text{ PMS}^*$ (%)
SNR n* = 15	$2,4 \pm 0,9^a$	$1,5 \pm 0,9^a$ 62,5	$2,5 \pm 1,6^a$ 10,5
SR n = 45	$26,1 \pm 4,0^b$	$8,1 \pm 0,5^b$ 21,0	$2,9 \pm 0,7^a$ 1,1
RP n = 30	$1,2 \pm 0,6^c$	$0,9 \pm 0,6^c$ 75,0	$6,2 \pm 0,7^b$ 51,7

\*PMS : Poids de matière sèche de sol ou de racines (72 h, 60°C). n représente le nombre de répétitions.

- (%) : en pourcent de bactéries totales immunopiéagées.
- Les moyennes sont données avec leur intervalle de confiance à 95 % calculé à partir de l'écart-type.
- Les groupes homogènes (a, b, c) sont obtenus par le test de Newman et Keuls ( $p < 0,05$ ).

Le faible taux de récupération de *B. polymyxa* du sol rhizosphérique semble s'expliquer par un nombre plus élevé de bactéries totales immunopiéagées dans ce compartiment. Dans le sol rhizosphérique les bactéries à croissance rapide utilisant les exsudats racinaires (*Pseudomonas*, Entérobactéries) semblent masquer les sites de fixation de *B. polymyxa* aux anticorps (voir l'expérience avec la souche PH12b au paragraphe A-7). Trois expériences différentes ont été nécessaires pour isoler un nombre suffisant de souches de *B. polymyxa* dans le sol rhizosphérique, ce qui nous a permis d'effectuer, une étude de la variabilité de la méthode d'immunopiageage (Tableau IV). Il apparaît une certaine hétérogénéité de la taille des peuplements bactériens immunopiéagés (bactéries totales, *Bacillus* sporulants totaux et *B. polymyxa*). Toutefois, les taux de récupération de *B. polymyxa* demeure du même ordre que ceux obtenus précédemment.

Tableau IV.- Taille de la population de *Bacillus polymyxa* immunopiéagée dans le compartiment de sol rhizosphérique d'un blé de printemps (*Triticum aestivum* L., var. Fidel) de 18 jours estimée dans différentes expériences.

Différentes expériences	Bactéries totales immunopiéagées x 10 <sup>6</sup> g <sup>-1</sup> PMS*	<i>Bacillus</i> totaux immunopiéagés x 10 <sup>6</sup> g <sup>-1</sup> PMS* (%)		<i>Bacillus polymyxa</i> immunopiéagés x 10 <sup>5</sup> g <sup>-1</sup> PMS* (%)	
1 n* = 15	28,8 ± 7,0 <sup>ab</sup>	7,0 ± 1,6 <sup>a</sup>	24,3	2,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,9
2 n = 15	31,5 ± 4,0 <sup>b</sup>	10,4 ± 1,7 <sup>b</sup>	33,0	3,0 ± 0,9 <sup>a</sup>	0,9
3 n = 15	22,7 ± 3,0 <sup>a</sup>	9,0 ± 2,1 <sup>ab</sup>	79,6	6,8 ± 2,8 <sup>b</sup>	3,0

\*PMS : Poids de matière sèche de sol (72 h, 60°C). n représente le nombre de répétitions.

• (%) : en pourcent de bactéries totales immunopiéagées.

• Les moyennes sont données avec leur intervalle de confiance à 95 % calculé à partir de l'écart-type.

• Les groupes homogènes (a, b, c) sont obtenus par le test de Newman et Keuls (p < 0,05).

Les souches apparentées à *B. polymyxa* et leur provenance dans les compartiments d'isolement sont répertoriées dans le tableau V.

Tableau V.- Répartition au sein des échantillons de sol correspondant aux trois sites de prélèvement, des souches de *Bacillus* immunopiéagées dans les compartiments de sol non rhizosphérique (SNR), sol rhizosphérique (SR) et rhizoplan (RP) de blé (*Triticum aestivum* L., var. Fidel) de 18 jours.

Site	SNR	SR	RP
1	PMD51, 52, 53, 54, 55, 57, 66, 67, 69, 70, 73, 74, 75, 76	PMD100, 101, 102, 112, 113, 120, 121, 123, 124, 127, 134	PMD200 à PMD219
2	PMD56, 58, 59, 60, 61, 68, 71, 72, 77, 78, 79, 80, 81, 82	PMD103, 105, 106, 114, 116, 117, 118, 119, 122, 125, 128, 133	PMD220 à PMD239
3	PMD62, 63, 64, 65, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93	PMD104, 107, 108, 109, 110, 111, 115, 126, 129, 130, 131, 132, 135, 136, 137	PMD240 à PMD259
n*	43	38	60

\* n : nombre de souches

La confirmation de leur identification à l'espèce *B. polymyxa* sera effectuée dans le paragraphe suivant (C).

**C.- Identification des souches.** Nous avons utilisé la taxonomie numérique et la caractérisation sérologique pour identifier tous les isolats obtenus sur milieu saccharose après immunopiégeage.

**1.- Taxonomie numérique.** Les souches types des espèces proches de *B. polymyxa* acquises dans les collections internationales, ont été incluses dans l'analyse pour servir de références afin de conforter les résultats de l'identification numérique.

L'appartenance des isolats au genre *Bacillus* a été vérifié sur la possession de caractéristiques génériques répertoriés dans le «Bergey's manual of systematic bacteriology» (vol. 2, 1986). Tous les isolats sont des bâtonnets droits de 1 à 2 µm de large et 4 à 5 µm de long, à mobilité «rigide» c'est à dire sans torsion cellulaire. Ils sont Gram positif, produisent une catalase active et forment des spores réfringentes, ovoïdes et en position subapicale dans un sporange déformé (Photo 1). Longtemps utilisées dans la taxonomie des *Bacillus*, la forme et la position de la spore dans le sporange permettent de conclure que nos isolats appartiennent au taxon contenant les espèces *Bacillus acidocaldarius*, *alvei*, *azotoformans*, *brevis*, *circulans*, *coagulans*, *larvae*, *lentimorbus*, *macerans*, *macquariensis*, *pantothenticus* et *polymyxa*. Ces caractères sont intéressants puisqu'ils réduisent le nombre d'espèces potentielles de 34 à 11 (CLAUS et BERKELEY, 1986).

La détermination de l'espèce a été réalisée à l'aide du logiciel APILAB à partir de profils biochimiques des isolats obtenus avec les galeries API 50 CHB et 20 B (Annexe III). L'ensemble des résultats d'identification est rassemblé dans les tableaux VI, VII, VIII, IX et X, pour lesquels une présentation générale est nécessaire afin d'en faciliter la lecture. Dans les tableaux de résultats, deux critères essentiels sont donnés:

\* Nom de l'espèce : il correspond à l'espèce (une ou plusieurs selon les cas) la plus proche à laquelle la souche est apparentée.

\* Le pourcentage d'identification : il rend compte du niveau de parenté de la souche à l'espèce proposée parmi plusieurs espèces possibles et fournit un critère à la sélection des commentaires sur la qualité de l'identification selon les modalités suivantes:

- % identification  $\geq 99,9$  % : excellente identification

-  $99,0 \leq$  % identification  $< 99,9$  : très bonne identification

-  $90,0 \leq$  % identification  $< 99,0$  : bonne identification

-  $80,0 \leq$  % identification  $< 90,0$  : identification acceptable

- % identification  $< 80,0$  %, mais la somme des deux pourcentages les plus grands des espèces proposées dépasse 80,0 % : «bonne identification au genre». L'identification est alors limitée aux espèces concernées et pourra être complétée par d'autres tests. Dans le cas contraire, c'est à dire la somme est  $< 80,0$  %, l'identification est qualifiée «d'inacceptable» et nécessite de s'entourer de précautions supplémentaires, telle l'utilisation d'autres méthodes d'identification.

Les tests à l'encontre sont également mentionnés pour témoigner de l'atypie de la souche par rapport à l'espèce proposée. Ils sont définis pour des fréquences inférieures à 0,25, c'est à dire qu'ils correspondent à des réponses négatives alors que plus de 75 % des individus repertoriés dans l'espèce utilisent le substrat concerné, et à des réponses positives tandis que moins de 25 % en sont capables.



**Photo 1 :** Formes végétatives et sporulées de *Bacillus* obtenues sur milieu gélosé à base de saccharose (4%) après immunopiégeage. Microscopie optique à contraste de phase (X 1000).

a.- **Souches de références** (Tableau VI). Les souches types *B. polymyxa* ATCC 842, *B. macerans* ATCC 8244 et *B. circulans* NCIB 9374 provenant de collections internationales ont été identifiées de façon satisfaisante à leurs espèces respectives. La souche CF43 a été également bien identifiée à l'espèce *B. polymyxa*, confirmant ainsi les résultats de T. HEULIN (communication personnelle). De même, BERGE (1988) a identifié la CF43 à l'espèce *B. polymyxa* par l'utilisation de galeries similaires (API 50 CHB et 20 B).

**Tableau VI.- Identification numérique des souches de *Bacillus* utilisées comme référence à l'aide des galeries API 50 CHB et API 20 B. Les profils biochimiques sont analysés avec la base de données APILAB.**

Nom des souches		Identification à l'espèce apparentée		Commentaires*	Tests à l'encontre
		Espèce	%		
ATCC 842	1	<i>B. polymyxa</i>	99,9	EX	
	2	<i>B. polymyxa</i>	99,8	TB	
ATCC 8244	1	<i>B. macerans</i>	99,9	EX	
	2	<i>B. macerans</i>	99,9	EX	
NCIB 9374		<i>B. circulans</i>	99,9	EX	
CF43	1	<i>B. polymyxa</i>	99,9	EX	
	2	<i>B. polymyxa</i>	99,9	BN	

\*EX pour excellente identification : % identification = 99,9 ; TB pour très bonne identification :  $99\% \leq \% \text{ identification} < 99,9\%$  ; BN pour bonne identification :  $90\% \leq \% \text{ identification} < 99\%$ . Les souches ont été identifiées au cours de deux expériences différentes (1, 2).

b.- **Souches immunopiégées du sol non rhizosphérique** (Tableau VII). La majorité des souches isolées du sol non rhizosphérique sont clairement identifiées à *B. polymyxa* avec des pourcentages d'identification souvent supérieurs à 99. Toutefois, nous notons la présence de plusieurs tests à l'encontre qui dénotent l'atypie relative des différentes souches. Trois souches sont mal une identifiées. Il s'agit de la souche PMD70 qui se situe soit dans l'espèce *B. polymyxa* soit dans celle de *B. circulans*, et des souches PMD75 et PMD84 dont les caractéristiques d'identification ne permettent pas de déterminer leur appartenance aux espèces *B. polymyxa* ou *B. macerans*. La confirmation de leur appartenance à l'une ou l'autre des deux espèces devra être effectuée à l'aide d'autres tests.

c.- **Souches immunopiégées du sol rhizosphérique** (Tableau VIII). Les souches issues du compartiment rhizosphérique présentent l'avantage d'être identifiées dans la quasi totalité et sans ambiguïté particulière à l'espèce *B. polymyxa*. Leur pourcentage d'identification au taxon est généralement évalué à 99,9.

Tableau VII.- Identification numérique des souches de *Bacillus polymyxa* isolées du sol non rhizosphérique, à l'aide des galeries API 50 CHB et API 20 B. Les profils biochimiques sont analysés avec la base de données APILAB.

Nom des Souches	Identification au taxon apparenté Espèce %	Commentaires*	Tests à l'encontre*
PMD51	<i>B. polymyxa</i> 99,9	TB	GEL
PMD52	<i>B. polymyxa</i> 99,7	TB	GEL
PMD57	<i>B. polymyxa</i> 99,3	TB	GEL
PMD58	<i>B. polymyxa</i> 95,5	BN	MDX, RHA, GEL
PMD59	<i>B. polymyxa</i> 97,8	BN	RHA, MDM, GEL
PMD60	<i>B. polymyxa</i> 99,3	TB	GEL
PMD61	<i>B. polymyxa</i> 99,7	TB	GEL
PMD62	<i>B. polymyxa</i> 99,7	TB	GEL
PMD63	<i>B. polymyxa</i> 99,7	TB	GEL
PMD64	<i>B. polymyxa</i> 99,8	TB	MDM, GEL
PMD65	<i>B. polymyxa</i> 88,8	AC	RHA, MDM, GEL
PMD66	<i>B. polymyxa</i> 84,7	AC	RHA, MDM, GEL
PMD67	<i>B. polymyxa</i> 97,8	BN	RHA, MDM, GEL
PMD70	<i>B. polymyxa</i> 69,5	BG	NAG, GEL
	<i>B. circulans</i> 30,4		
PMD75	<i>B. polymyxa</i> 62,0	BG	RHA, MDM, GEL
	<i>B. circulans</i> 38,0		
PMD76	<i>B. polymyxa</i> 96,4	BN	MDM
PMD77	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDM
PMD78	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDX, MDM
PMD79	<i>B. polymyxa</i> 99,8	TB	GEL
PMD80	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD81	<i>B. polymyxa</i> 98,0	BN	MDX, GEL
PMD82	<i>B. polymyxa</i> 99,4	TB	GEL
PMD83	<i>B. polymyxa</i> 99,5	TB	MDX, GEL
PMD84	<i>B. polymyxa</i> 77,0	BG	MDX, RHA, MDM
	<i>B. macerans</i> 22,9		
PMD85	<i>B. polymyxa</i> 99,8	TB	MDM, GEL
PMD86	<i>B. polymyxa</i> 99,6	TB	GEL
PMD87	<i>B. polymyxa</i> 84,7	AC	RHA, MDM, GEL
PMD90	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDX, MDM, GEL
PMD91	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDM, GEL
PMD92	<i>B. polymyxa</i> 99,0	TB	MDX, GEL
PMD93	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDX

\*EX pour excellente identification: % identification = 99,9 % ; TB pour très bonne identification: 99 % ≤ % identification < 99,9 % ; BN pour bonne identification : 90 % ≤ % identification < 99 % ; AC pour identification acceptable : 80 % ≤ % identification < 90 % ; BG pour bonne identification au genre. Tests à l'encontre (positif ou négatif , voir Annexe 2) GEL : liquéfaction de la gélatine ; MDX : acidification du β-méthyl-D-xyloside ; RHA : acidification du rhamnose ; MDM : acidification de l'α-méthyl-D-manoside ; NAG : acidification de N-acétylglucosamine.

Tableau VIII.- Identification numérique des souches de *Bacillus polymyxa* isolées du sol rhizosphérique, à l'aide des galeries API 50 CHB et API 20 B. Les profils biochimiques sont analysés avec la base de données APILAB.

Nom des Souches	Identification au taxon apparenté Espèce %	Commentaires*	Tests à l'encontre*
PMD100	<i>B. polymyxa</i> 97,6	BN	RHA, GEL
PMD101	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD102	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD103	<i>B. polymyxa</i> 95,9	EX	MDM
PMD105	<i>B. polymyxa</i> 97,9	EX	MDM
PMD106	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD107	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD108	<i>B. polymyxa</i> 99,8	TB	
PMD109	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD110	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDX
PMD111	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD112	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD113	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDM,
PMD114	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	GEL
PMD115	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDX
PMD116	<i>B. polymyxa</i> 99,5	TB	MDX, GEL
PMD117	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD118	<i>B. polymyxa</i> 99,8	TB	MDX, GEL
PMD119	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD120	<i>B. polymyxa</i> 99,2	TB	MDX, RHA, MDM
PMD121	<i>B. polymyxa</i> 99,0	TB	MDX, GEL
PMD122	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDX, GEL
PMD123	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDM
PMD124	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDM
PMD125	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD126	<i>B. polymyxa</i> 98,0	BN	RHA, MDM, GEL
PMD127	<i>B. polymyxa</i> 99,2	TB	GEL
PMD128	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDM
PMD129	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDX
PMD130	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDM
PMD131	<i>B. polymyxa</i> 95,8	BN	GEL
PMD132	<i>B. polymyxa</i> 98,4	BN	RHA, MDM
PMD133	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD134	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD135	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	
PMD136	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDX
PMD137	<i>B. polymyxa</i> 99,9	EX	MDM

\*EX pour excellente identification: % identification = 99,9 % ; TB pour très bonne identification: 99 % ≤ % identification < 99,9 % ; BN pour bonne identification : 90 % ≤ % identification < 99 % ; AC pour identification acceptable : 80 % ≤ % identification < 90 % ; BG pour bonne identification au genre. GEL: liquéfaction de la gélatine ; MDX : acidification du β-méthyl-D-xyloside ; RHA : acidification du rhamnose ; MDM : acidification de l'α-méthyl-D-manoside ; NAG : acidification de N-acétylglucosamine.

**d.- Souches immunopiégées du rhizoplan** (Tableau IX). Près de la moitié des souches isolées du rhizoplan est bien identifiée à *B. polymyxa*. Quatre souches ont un pourcentage d'identification de 99,9, quatre de 99,0 ou plus et 16 supérieur à 90,0. Cependant certaines souches du rhizoplan sont bien identifiées au genre *Bacillus* mais pourraient appartenir de par leurs caractéristiques aussi bien à l'espèce *B. polymyxa*, citée en première proposition, qu'aux espèces *B. macerans*, *licheniformis*, ou *subtilis* figurant en deuxième choix. Leur pourcentage d'identification à *B. polymyxa* est seulement compris entre 54,2 et 70,1 %. Il sera donc impératif d'affiner l'identification de ces souches par des tests complémentaires. Cependant il convient de noter que ces faibles pourcentages d'identification pourrait être imputable au test sorbitol qui est positif pour la plupart des souches du rhizoplan alors que seul 1% de *B. polymyxa* répertorié dans la base APILAB en est capable. Il en découle une forte atypie de ces souches isolées du rhizoplan.

**e.- Souches non identifiées à *B. polymyxa*** (Tableau X). Nous avons réuni dans ce tableau les souches isolées par immunopiégeage qui ne sont pas identifiées à l'espèce *B. polymyxa*. La souche PMD104 est la seule qui provient du sol rhizosphérique et son identification la situe soit dans l'espèce *B. circulans* 2 soit dans celui de *B. polymyxa*. Tandis que toutes les autres souches de cette catégorie sont d'origine non-rhizosphérique. Les souches PMD69, PMD73 et PMD74 pourraient appartenir soit à l'espèce *B. circulans* soit à *B. polymyxa*, alors que les souches PMD56 et PMD68 semblent bien identifiées respectivement à *B. circulans* 2 et *B. macerans*. Sept souches ont une «identification inacceptable» avec ou sans proposition d'espèce apparentée. Leur atypie semble très élevée et leur détermination nécessiterait l'utilisation d'autres méthodes d'identification.

Nous résumons dans le tableau XI la répartition du nombre de souches dans chacun des compartiments d'isolement en fonction des différentes catégories d'identification. La majorité des souches du sol non-rhizosphérique et rhizosphérique sont bien identifiées à *B. polymyxa*. Toutefois, quelques souches en particulier du sol non-rhizosphérique s'en éloignent considérablement ou appartiennent à d'autres espèces. L'identification de quelques souches du rhizoplan nécessite l'emploi de tests complémentaires. L'ensemble des profils biochimiques figure en annexe 2.

Avant d'aborder l'apport des tests complémentaires à l'identification des souches de *Bacillus*, nous pouvons constater parmi les espèces auxquelles se rapprochent le plus nos souches, que *B. licheniformis* ne figure pas dans les espèces qui produisent de spores déformant le sporange et pourrait donc être exclus. RASPOET et al. (1991) différencient nettement *B. polymyxa* de *B. licheniformis* sur la base des profils électrophorétiques de protéines membranaires.

Tableau IX.- Identification numérique des souches de *Bacillus polymyxa* isolées du rhizosplan, à l'aide des galeries API 50 CHB et API 20 B. Les profils biochimiques sont analysés avec la base de données APILAB.

Nom des Souches	Identification au taxon apparenté Espèce	%	Commentaires*	Tests à l'encontre*
PMD200	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD201	<i>B. polymyxa</i>	65,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,1		
PMD202	<i>B. polymyxa</i>	94,6	BN	SOR
PMD203	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD204	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD205	<i>B. polymyxa</i>	70,7	BG	MDX, SOR, GEL
	<i>B. subtilis</i>	10,4		
PMD206	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD207	<i>B. polymyxa</i>	94,6	BN	SOR
PMD208	<i>B. polymyxa</i>	93,5	BN	MDX, SOR
PMD209	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD210	<i>B. polymyxa</i>	70,7	BG	MDX, SOR, GEL
	<i>B. subtilis</i>	10,4		
PMD211	<i>B. polymyxa</i>	70,7	BG	MDX, SOR, GEL
	<i>B. subtilis</i>	10,4		
PMD212	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD213	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD214	<i>B. polymyxa</i>	98,9	BN	SOR, XLT, GEL
PMD215	<i>B. polymyxa</i>	58,5	BN	MDX, SOR, GEL
	<i>B. macerans</i>	35,5		
PMD216	<i>B. polymyxa</i>	93,5	BN	MDX, SOR
PMD217	<i>B. polymyxa</i>	99,9	EX	MDX
PMD218	<i>B. polymyxa</i>	99,4	TB	GEL
PMD219	<i>B. polymyxa</i>	99,0	EX	
PMD220	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD221	<i>B. polymyxa</i>	58,5	BN	MDX, SOR, GEL
	<i>B. macerans</i>	35,5		

Tableau IX. (suite)

Nom des Souches	Identification au taxon apparenté Espèce	%	Commentaires*	Tests à l'encontre*
PMD222	<i>B. polymyxa</i>	70,7	BG	MDX, SOR, GEL
	<i>B. subtilis</i>	10,4		
PMD223	<i>B. polymyxa</i>	97,3	BN	SOR
PMD224	<i>B. polymyxa</i>	93,5	BN	MDX, SOR
PMD225	<i>B. polymyxa</i>	70,7	BG	MDX, SOR, GEL
	<i>B. subtilis</i>	10,4		
PMD226	<i>B. polymyxa</i>	92,2	BN	MDX, SOR, XLT, GEL
PMD227	<i>B. polymyxa</i>	58,5	BN	MDX, SOR, GEL
	<i>B. macerans</i>	35,5		
PMD228	<i>B. polymyxa</i>	94,6	BN	SOR
PMD229	<i>B. polymyxa</i>	94,6	BN	SOR
PMD230	<i>B. polymyxa</i>	92,4	BN	MDS, SOR, XLT
PMD231	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD232	<i>B. polymyxa</i>	58,5	BN	MDX, SOR, GEL
	<i>B. macerans</i>	35,5		
PMD233	<i>B. polymyxa</i>	93,5	BN	MDX, SOR
PMD234	<i>B. polymyxa</i>	58,5	BN	MDX, SOR, GEL
	<i>B. macerans</i>	35,5		
PMD235	<i>B. polymyxa</i>	58,5	BN	MDX, SOR, GEL
	<i>B. macerans</i>	35,5		
PMD236	<i>B. polymyxa</i>	70,7	BG	MDS, SOR, GEL
	<i>B. macerans</i>	35,5		
PMD237	<i>B. polymyxa</i>	98,0	BN	MDX, GEL
PMD238	<i>B. polymyxa</i>	99,9	EX	MDX
PMD239	<i>B. polymyxa</i>	99,9	EX	MDX
PMD240	<i>B. polymyxa</i>	97,3	BN	SOR
PMD241	<i>B. polymyxa</i>	99,4	TB	SOR
PMD242	<i>B. polymyxa</i>	94,6	BN	SOR
PMD243	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD244	<i>B. polymyxa</i>	94,6	BN	SOR
PMD245	<i>B. polymyxa</i>	58,5	BG	MDX, SOR, GEL
	<i>B. macerans</i>	35,5		
PMD246	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
PMD247	<i>B. polymyxa</i>	97,8	BN	SOR

Tableau IX. Fin

Nom des Souches	Identification au taxon apparenté Espèce	%	Commentaires*	Tests à l'encontre*
PMD248	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD249	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD250	<i>B. polymyxa</i>	99,6	TB	SOR, XLT, GEL
PMD251	<i>B. polymyxa</i>	99,0	BN	SOR, XLT, GEL
PMD252	<i>B. polymyxa</i>	58,5	BN	MDX, SOR, GEL
	<i>B. macerans</i>	35,5		
PMD253	<i>B. polymyxa</i>	54,2	BG	MDX, SOR, GEL
	<i>B. macerans</i>	41,4		
PMD254	<i>B. polymyxa</i>	99,4	TB	SOR, XLT, GEL
PMD255	<i>B. polymyxa</i>	71,1	BG	MDX, SOR, GEL
	<i>B. macerans</i>	11,2		
PMD256	<i>B. polymyxa</i>	71,1	BG	MDX, SOR
	<i>B. macerans</i>	27,9		
PMD257	<i>B. polymyxa</i>	67,9	BG	MDX, SOR
	<i>B. licheniformis</i>	15,5		
PMD258	<i>B. polymyxa</i>	54,2	BG	MDX, SOR, GEL
	<i>B. macerans</i>	41,4		
PMD259	<i>B. polymyxa</i>	99,9	EX	

\*EX pour excellente identification: % identification = 99,9 % ; TB pour très bonne identification : 99 % ≤ % identification < 99,9 % ; BN pour bonne identification : 90 % ≤ % identification < 99 % ; AC pour identification acceptable : 80 % ≤ % identification < 90 % ; BG pour bonne identification au genre. GEL : liquéfaction de la gélatine ; MDX : acidification du β-méthyl-D-xyloside ; SOR : acidification du sorbitol ; XLT : acidification du xylitol.

Tableau X.- Identification numérique d'autres souches de *Bacillus* isolées du sol non rhizosphérique et rhizosphérique, à l'aide des galeries API 50 CHB et API 20 B. Les profils biochimiques sont analysés avec la base de données APILAB.

Nom des Souches	Identification au taxon apparenté Espèce %	Commentaires*	Tests à l'encontre*
PMD69	<i>B. circulans</i> 2 59,4	BG	NIT
PMD104	<i>B. polymyxa</i> 39,3	BG	DARA, LXYL, SOR
	<i>B. macerans</i> 75,0		
PMD53	<i>B. polymyxa</i> 25,0	INAC	
	<i>B. circulans</i> 2		
PMD54	<i>B. cereus</i> 1	INAC	
PMD55	<i>B. circulans</i> 2 non proposée	INAC	
PMD56	<i>B. circulans</i> 2 98,3	BN	GEL
PMD68	<i>B. macerans</i> 99,9	EX	LXYL
PMD71		INAC	
PMD72	<i>B. circulans</i> 2		
	<i>B. macerans</i>		
PMD73	<i>B. circulans</i> 2 63,7	BG	RIB, MLZ, VP, NIT
	<i>B. polymyxa</i> 36,3		
PMD74	<i>B. circulans</i> 2 57,4	BG	RIB, MLZ, VP, NIT
	<i>B. polymyxa</i> 41,9		
PMD88	<i>B. circulans</i> 2	INAC	
PMD89	<i>B. macerans</i>	INAC	
	<i>B. macerans</i>		
	<i>B. circulans</i>		

\*EX pour excellente identification : % identification = 99,9 % ; BN pour bonne identification : 90 % ≤ % identification < 99 % ; 80 % ≤ % identification < 90 % ; BG pour bonne identification au genre ; INAC pour identification inacceptable.

NIT : réduction des nitrates ; DARA : acidification du D-arabinose ; LXYL : acidification du L-xylose ; SOR : acidification du sorbitol ; GEL : liquéfaction de la gélatine ; RIB : acidification du ribose ; MLZ : acidification du mélezitose ; VP : production d'acétoïne à partir de l'acide pyruvique.

Tableau XI.- Répartition des souches de *B. polymyxa* dans les différentes catégories d'identification. Le nombre de souches étudiées figure entre parenthèses.

Compartiment	X (%) identification				
	X < 80	80 ≤ X < 90	90 ≤ X < 99,9	99 ≤ X < 99,9	X ≥ 99,9
SNR (31)*	3	3	5	13	4
SR (37)*	0	0	4	6	27
RP (60)*	34	0	16	6	4

\* SNR : Sol non-rhizosphérique ; SR : Sol rhizosphérique ; RP : Rhizoplan

f.- **Tests complémentaires.** Pour toutes les souches isolées dans ce travail, deux caractères supplémentaires ont été étudiés dans le but de confirmer ou d'infirmer les identifications fournies par le système API-bioMérieux.

\* **Production de gaz** (Annexe 2). L'aptitude à produire du gaz à partir de la fermentation des glucides en particulier le glucose peut revêtir une importance taxonomique puisque dans le genre *Bacillus* seules les espèces *B. polymyxa* et *B. macerans* en possèdent la capacité (CLAUS et BERKELEY, 1986). Toutes nos souches bien identifiées à *B. polymyxa* et celles dont *B. polymyxa* est l'une des espèces les plus proches produisent du gaz, ce qui les différencie nettement de l'espèce *B. circulans* au sein de laquelle aucune souche ne produit de gaz. Les souches PMD53, PMD73 et PMD74 isolées du sol non-rhizosphérique et identifiées à *B. circulans* 2 (Tableau X) ne sont pas non plus dotées du métabolisme de fermentation des glucides avec production de gaz, ce qui corrobore leur appartenance à cette espèce, alors que la souche PMD69 produisant du gaz pourrait appartenir à *B. polymyxa* (Tableau X). Il est important de noter qu'une autre espèce, *B. azotofixans*, a également été décrite comme productrice de gaz à partir du glucose (SELDIN et al., 1986). Cependant, nos souches diffèrent de celles isolées par SELDIN et al. par au moins six caractères biochimiques et ne peuvent vraisemblablement pas appartenir à cette espèce qui constitue un groupe d'hybridation ADN-ADN distinct de *B. polymyxa* (SELDIN et al., 1985).

\* **Réduction d'acétylène** (Annexe 2). Ce test nous a permis de montrer que les souches bien identifiées à *B. polymyxa* fixent toutes l'azote de l'air puisqu'elles réduisent l'acétylène en éthylène. Bien que la fixation d'azote n'ait pas de valeur taxonomique, au sein du genre *Bacillus* seules quatre espèces, *B. polymyxa*, *macerans*, *circulans* et *azotofixans* ont été décrites jusqu'ici comme fixatrices d'azote (RHODES-ROBERTS, 1981; SELDIN et al. 1984). Nos souches sont apparentées de près ou de loin à au moins l'une de ces espèces.

g.- **Le problème de la variabilité des tests.** Plusieurs travaux font état de la variabilité de certains tests des galeries API pouvant influencer sur la précision de l'identification numérique (SNEATH et COLLINS, 1974; LOGAN et al., 1978). Une bonne revue sur la reproductibilité des tests API a été réalisée par LOGAN et BERKELEY (1981). Ces auteurs ont rapporté les résultats comparatifs de plusieurs laboratoires sur le système API et ont mentionné dans l'ensemble une bonne reproductibilité des tests utilisés. Cependant, deux tests paraissent sujets à une variabilité plus importante; la production d'acétoïne (VP) et l'utilisation des nitrates (NIT). BERGE a rapporté dans sa thèse (1988) des variations de plusieurs tests d'acidification de sucres de la galerie 50 CHB. Au cours de notre expérimentation avec les galeries 50 CHB et 20 B, nous avons éprouvé la variabilité des tests avec les souches CF43, ATCC 842 et 5 souches de chacun des trois compartiments SNR, SR et RP, dans deux expériences différentes.

Les résultats ont conduit à une bonne reproductibilité de la majorité des tests. Les tests pour lesquels des variations ont été observées sont donnés dans le tableau XII. Nous retrouvons trois tests:  $\beta$ -méthyl-D-xyloside, gluconate et VP, dont l'inconstance avait déjà été signalée par LOGAN et BERKELEY (1981) et BERGE (1988). Dans le cas des tests gluconate et  $\beta$ -méthyl-D-xyloside, l'imprécision proviendrait de l'absence de netteté de la coloration due probablement à une réalcalisation trop rapide du milieu. Malgré la subjectivité de la lecture nous avons considéré que le test est dans ce cas positif. Alors qu'un résultat négatif concernant le test VP devrait être noté avec prudence, le test NIT et les deux tests complémentaires mentionnés ci-dessus ne nous ont pas posé de problème particulier.

**Table XII.- Variabilité de certains tests des galeries API évaluée au cours de deux identifications différentes de 17 souches apparentées à l'espèce *B. polymyxa*.**

Tests concernés	Nombre de souches variantes	Proportion ( %)
$\beta$ -méthyl-xyloside	5/17	29
Gluconate	7/17	41
VP	8/17	47

Comme le soulignaient LOGAN et BEKELEY (1984), l'identification numérique par le système API-bioMérieux peut être considérée comme fiable. De plus, elle permet d'identifier *B. polymyxa* à une espèce homogène et bien délimité (PRIEST et al., 1981).

**2.- Caractérisation sérologique.** Nous avons caractérisé sérologiquement nos souches en ACP-ELISA avec le sérum polyclonal anti-*B. polymyxa* CF43. En effet, Les propriétés sérologiques peuvent revêtir une valeur taxonomique (JONES et KRIEG, 1986). De plus, BERGE (1988) a montré que l'on pouvait obtenir une spécificité sérologique au niveau de l'espèce *B. polymyxa* en utilisant le sérum anti-*B. polymyxa* CF43 dilué au 1/1000<sup>ème</sup>. Dans ces conditions, l'auteur a observé que toutes les souches de *B. polymyxa* donnaient des réactions croisées avec le sérum polyclonal anti-CF43 alors que les souches de *B. macerans* et *B. circulans* n'en donnaient pas.

L'ensemble des réactions sérologiques est donné sur les figures 12 et 13. Les réponses obtenues sont très discriminantes au niveau de l'espèce. La souche homologue CF43 présente une réaction croisée très forte. La souche type *B. polymyxa* ATCC 842 réagit également avec le sérum anti-CF43 alors que les souches types *B. macerans* ATCC 8244 et *B. circulans* présentent des réactions croisées très négligeables. Pour les souches isolées par immunopiégeage et identifiées à *B. polymyxa* par le système API-bioMérieux, les réactions croisées sont très nettes et représentent plus de 50 % de réactivité de la souche homologue.

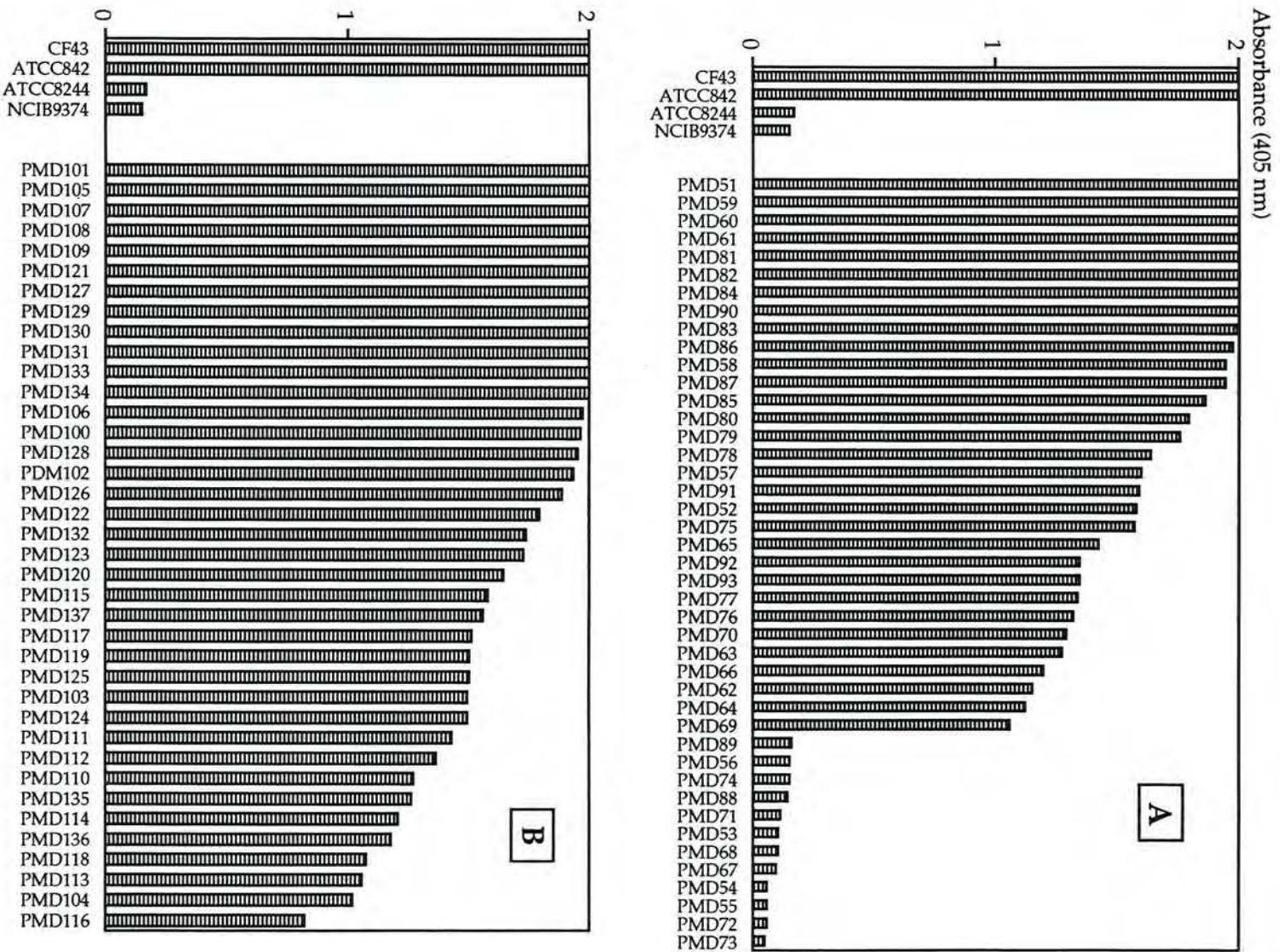


Figure 12. Réactions sérologiques avec le sérum polyclonal anti-*Bacillus polymyxa* CF43 des souches de *Bacillus* immunoprogées du sol non-rhizosphérique [A] et rhizosphérique [B], évaluée en ACP-ELISA. La souche homologue *Bacillus polymyxa* CF43 et les souches types hétérologues *Bacillus polymyxa* ATCC842, *Bacillus macerans* ATCC8244 et *Bacillus circulans* NCIB9374 permettent d'estimer la spécificité du sérum.

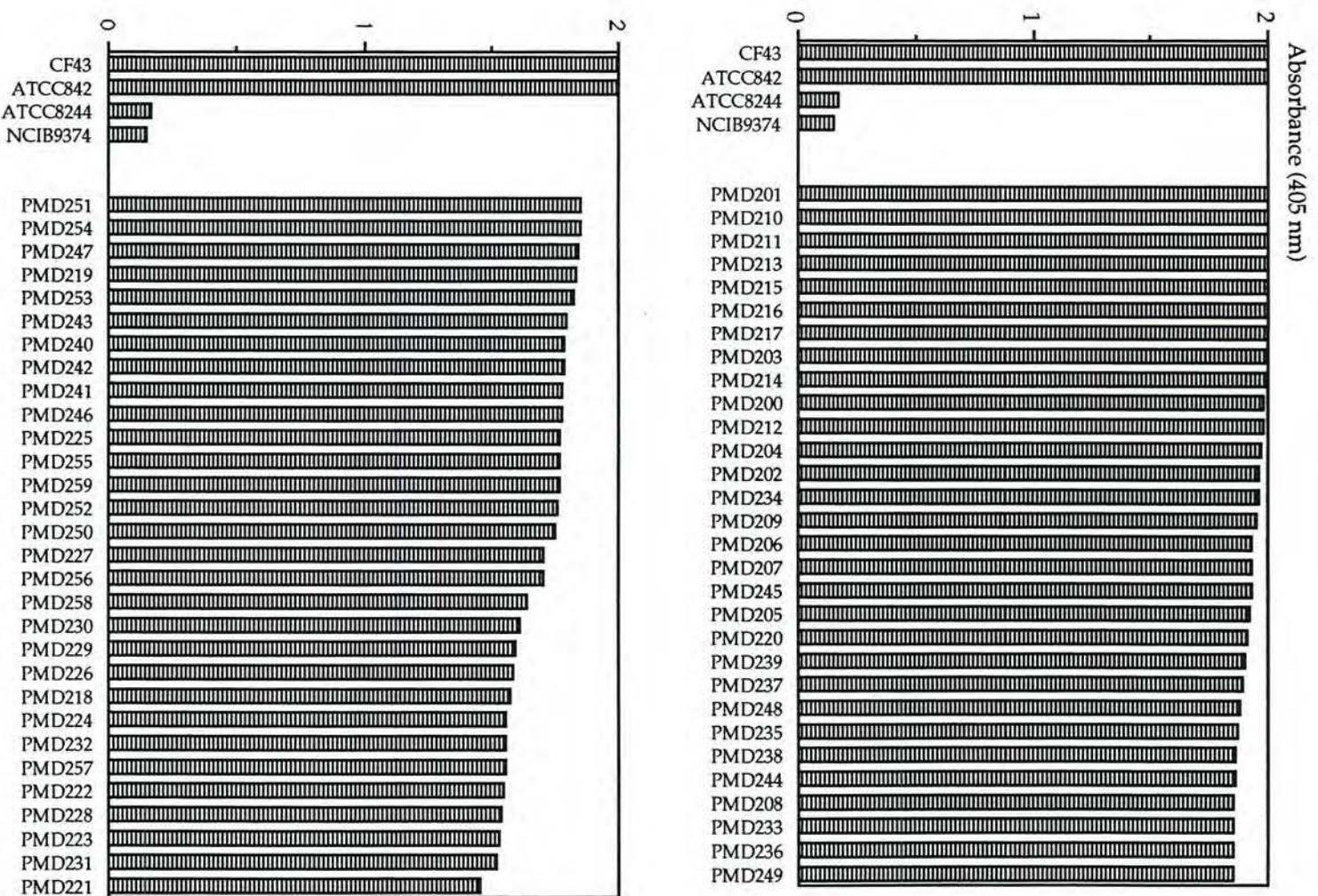


Figure 13. Réactions sérologiques avec le sérum polyclonal anti-*Bacillus polymyxa* CF43 des souches de *Bacillus* immunopigées du rhizoplan de blé, évaluée en ACP-ELISA. La souche homologue *Bacillus polymyxa* CF43 et les souches types hétérologues *Bacillus polymyxa* ATCC842, *Bacillus macerans* ATCC8244 et *Bacillus circulans* NCIB9374 permettent d'estimer la spécificité du sérum.

Une exception concerne la souche PMD67 isolée du sol non-rhizosphérique et identifiée à *B. polymyxa* mais ne donnant pas de réaction croisée en ELISA (Fig. 12A). Les souches PMD69 du sol non-rhizosphérique (Fig. 12A) et PMD104 du sol rhizosphérique (Fig. 12B), identifiées respectivement entre *B. circulans*, *B. macerans* et *B. polymyxa*, montrent des réactions croisées aussi fortes. Ceci suggère qu'elles pourraient appartenir à l'espèce *B. polymyxa*. Ce résultat est en accord avec leur capacité à produire du gaz à partir du glucose. Les souches du sol non-rhizosphérique bien identifiées à *B. circulans* ou *B. macerans* et les souches mal identifiées (profil inacceptable) présentées dans le tableau X ne sont pas reconnues par le sérum anti-CF43 (Fig. 12A), confirmant leur exclusion de l'espèce *B. polymyxa*.

**D.- Abondance relative de la population de *B. polymyxa* parmi les peuplements de bactéries telluriques et rhizosphériques.** La méthode d'immunopréciipitation nous a permis, outre l'isolement, de réaliser une approche quantitative des populations de *B. polymyxa* dans les trois compartiments étudiés. Nous avons cherché à déterminer la part relative de la population de *B. polymyxa* au sein de la microflore cultivable, des peuplements de fixateurs d'azote et des populations de *Bacillus* sporulants producteurs de gaz.

La taille de la microflore cultivable n'est pas significativement différente dans les trois compartiments, elle se situe entre  $1,9$  et  $3,8 \times 10^8$  bactéries par g de matière sèche (Tableau XIII). Il en est de même pour les populations de *Bacillus* sporulants producteurs de gaz, dont la taille est estimée entre  $1,4$  et  $3,4 \times 10^5$  spores par g de matière sèche. Les peuplements de fixateurs d'azote sont plus nombreux ( $p < 0,10$ ) dans le compartiment RP où ils sont estimés à  $17,0 \times 10^5$  bactéries par g de matière sèche, par rapport aux compartiments SR et SNR dans lesquels on a dénombré  $1,3$  et  $6,1 \times 10^5$  bactéries par g de matière sèche, respectivement. Ainsi, parmi les effets rhizosphérique et racinaire, définis respectivement comme les rapports entre les fractions SR et RP sur la fraction SNR, seul l'effet racinaire apparaît, mais de façon relativement faible (1,9 à 2,8).

Les populations de *B. polymyxa* représentent 0,1 % de la microflore cultivable des compartiments SNR et SR. Ce taux est deux fois plus élevé dans le compartiment racinaire. La contribution des populations de *B. polymyxa* au sein des peuplements de fixateurs d'azote paraît plus importante. En effet, les populations de *B. polymyxa* représentent de 40 à 100 % de bactéries fixatrices d'azote suivant le compartiment étudié (SNR, SR et RP). Ils représentent donc la population majoritaire parmi la microflore fixatrice d'azote dans le sol et la rhizosphère du blé. De même, les *B. polymyxa* sont plus abondants que les spores de *Bacillus* producteurs de gaz, quel que soit le compartiment étudié.

Tableau XIII.- Taille de la microflore cultivable, des peuplements de fixateurs d'azote et des populations de *B. polymyxa* dans le sol non rhizosphérique (SNR), le sol rhizosphérique (SR) et le rhizoplan (RP) du blé (*Triticum aestivum* L., var. Fidel) de 18 jours.

	Compartiments étudiés				
	SNR	SR	(SR/SNR)	RP	( R P / S N R )
Microflore cultivable = A $\times 10^8 \text{ g}^{-1} \text{ PMS}^*$	$1,9 \pm 1,2^a$	$3,1 \pm 1,6^a$	(1,6)	$3,8 \pm 1,8^a$	(2,0)
Peuplements de fixateurs d'azote = B $\times 10^5 \text{ g}^{-1} \text{ PMS}^*$	$6,1 \pm 1,5^b$	$1,3 \pm 1,0^a$	(-)	$17,0 \pm 11,0^c$	(2,8)
Spores de <i>Bacillus</i> producteurs de gaz = C $\times 10^5 \text{ g}^{-1} \text{ PMS}^*$	$1,8 \pm 0,9^a$	$1,4 \pm 1,0^a$	(-)	$3,4 \pm 3,1^a$	(1,9)
Populations de <i>Bacillus polymyxa</i> = D $\times 10^5 \text{ g}^{-1} \text{ PMS}^*$	$2,5 \pm 1,6^a$	$2,9 \pm 0,7^a$	(1,2)	$6,2 \pm 0,7^b$	(2,5)
Pourcentage de <i>B. polymyxa</i> par rapport à la microflore cultivable (D/A $\times 100$ )	0,1	0,1		0,2	

\* PMS : Poids de matière sèche de sol ou de racines (72 h, 60°C).

• Les moyennes sont données avec leur intervalle de confiance à 95 % calculé à partir de l'écart-type.

• Les groupes homogènes (a, b, c) sont obtenus par le test de Newman et Keuls ( $p < 0,05$ ).

• (SN/SNR) : effet rhizosphérique ; (RP/SNR) : effet racinaire.

(-) Pas d'effet

#### IV.- DISCUSSION

Les études de diversité des bactéries reposent sur l'isolement et la caractérisation d'un nombre suffisant de souches. Cependant, les méthodes classiques de dilutions et étalements sur milieux sélectifs ne permettent pas toujours d'accéder aux populations de bactéries non dominantes dans le sol, comme c'est le cas pour *B. polymyxa*. C'est pour surmonter ces difficultés que des méthodologies nouvelles d'immuno-isolement issues des techniques immunologiques ont été développées (HRANITZKY et al., 1980; BRUNEL et al., 1988). Nous avons utilisé la méthode d'immunopiégeage pour isoler les *B. polymyxa* dans le sol et dans la rhizosphère.

**A.- Adaptation de l'immunopiégeage à l'isolement de la souche *B. polymyxa* CF43.** L'utilisation de la méthode d'immunopiégeage pour l'isolement des populations de *B. polymyxa* dans leur milieu naturel a nécessité une mise au point préalable avec une souche pure. Les résultats que nous avons obtenus, en utilisant les plaques de microtitration comme support d'adsorption d'anticorps polyclonaux, montrent que le pourcentage de récupération se situe entre 10 et 40 % avec  $10^5$  bactéries apportées par puits, soit  $10^6$  bactéries par ml. En dessous ou au-dessus de cette concentration bactérienne le taux de récupération est plus faible, mais il est possible d'isoler au moins une bactérie parmi mille par puits, c'est à dire  $10^4$  bactéries par ml. Cela représente un seuil intéressant puisqu'il est similaire à celui de la détection de *B. polymyxa* en ELISA indirect (GOUZOU, 1992), avec dans le cas de l'immunopiégeage l'assurance de la viabilité de la bactérie. L'adsorption passive des bactéries sur la plaque, en absence d'anticorps reste dans tous les cas négligeable.

Des taux de récupération de plus de 50 % ont été trouvés avec des bactéries pathogènes, *Xanthomonas campestris* pv. *begonia* et *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, en concentration de  $10^2$  cellules par ml de culture pure et en présence d'anticorps polyclonaux (VAN VUURDE, 1987), ce qui correspond à un seuil de détection assez bas et donc plus intéressant. Ces différences dans les taux de récupération ne peuvent être comparées, car elles cachent des différences d'ordre biologique et méthodologique. Les espèces bactériennes utilisées sont morphologiquement et physiologiquement distinctes. Il en découle des différences dans la garniture antigénique qui contrôle la qualité et la spécificité du sérum, comme nous l'avons constaté nous même en testant deux sérums différents (Fig. 9). De même, la taille des cellules et leur viabilité, suite aux différents traitements, influent sur le pourcentage de récupération. De plus, la qualité et la surface du support recevant l'anticorps, ajoutées à la conduite de l'expérimentation accroissent certainement les différences. HRANITZKY et al. (1980) ont montré que les billes en polystyrène offraient une meilleure adsorption d'anticorps que les plaques de microtitration. Nous avons pu mettre en évidence des différences significatives entre deux types de plaques de microtitration pour l'adsorption d'anticorps. D'autre part, les réactions non spécifiques peuvent être diminuées avec une efficacité variable selon la nature du détergent utilisé (MORGAN et al., 1991). Ces auteurs, utilisant des billes en polystyrène revêtues d'anticorps monoclonaux pour immunopiéger des cellules de *Pseudomonas putida*, ont également montré que la désorption par agitation vigoureuse au vortex était moins létale qu'un traitement aux

ultrasons même de faible intensité. Ils obtenaient dans ces conditions des taux de récupération de l'ordre de 20 % en présence de  $3 \times 10^2$  bactéries par ml, avec une fixation passive de moins de 1 %. Dans tous les cas, il sera difficile d'atteindre un taux de récupération de 100%, même si l'on s'assure d'une fixation totale des cellules, à cause de la létalité cellulaire qui survient au cours de l'étape de désorption.

Cependant, des taux de récupération très élevés de 95 % ont été rapportés (CHESS et al., 1974) avec des cellules sanguines et des anticorps polyclonaux anti Fab, adsorbés sur gel de sépharose en colonne d'immuno-adsorption. Dans ce cas, la cellule cible fixée aux anticorps polyclonaux représentait l'entité dont on voulait se débarrasser, de telle sorte que les cellules à conserver désirées étaient récupérées par éluations successives. Cette variante d'immuno-isolement est intéressante dans son résultat et permet d'éviter les étapes de désorption à effet létal. Toutefois, si elle est réalisable pour une culture mixte à deux ou trois lignées cellulaires, elle serait fastidieuse voir impossible lorsqu'il s'agit d'un peuplement bactérien plus complexe.

L'ensemble de ces résultats suggère que la méthode d'immunopiégeage peut être perfectionnée et devra toujours être étalonnée en fonction de l'élément biologique étudié. Ainsi, au vu de nos résultats, nous estimons que le sérum et les conditions expérimentales que nous avons utilisés permettent l'immunopiégeage d'une culture pure de la souche *B. polymyxa* CF43.

**B.- L'efficacité de l'immunopiégeage repose sur la spécificité et la qualité du sérum.** Nous avons pu montrer en ELISA que le sérum polyclonal anti-*B. polymyxa* CF43 pourrait posséder une spécificité d'espèce lorsque la dilution est bien choisie, puisqu'une réaction croisée était obtenue avec la souche homologue et la souche type de *B. polymyxa* ATCC842, alors qu'aucune réaction croisée n'était observée avec les souches types des espèces proches, *B. macerans*, et *B. circulans*. De plus, comme nous le montrent les résultats de la caractérisation sérologique, plus d'une centaine de souches appartenant à l'espèce *B. polymyxa* mais isolées de compartiments différents et d'un site relativement éloigné géographiquement de celui de la souche homologue, réagissent avec le même sérum. BERGE (1988) avait déjà rapporté le caractère spécifique au niveau de l'espèce de ce sérum avec les souches de *B. polymyxa* isolées de 3 sols français. A ce titre, les anticorps polyclonaux anti-CF43 représentaient un bon matériel pour l'immunopiégeage de *B. polymyxa* dans le sol.

Nos résultats d'immunopiégeage de *B. polymyxa* CF43 en mélange avec la souche *B. circulans* RSA20 illustrent parfaitement l'efficacité obtenue avec le sérum anti-CF43 et la souche homologue, et par conséquent rendent compte de l'intérêt de disposer d'un sérum spécifique. Des résultats plus explicites ont été obtenus par HIRN et al. (1987). En effet, ces auteurs ont montré, sur deux lignées de cellules de la moelle osseuse, une tumorale et une saine, que l'immobilisation cellulaire sur des billes magnétiques était nettement plus importante (54 %) pour la lignée tumorale homologue, c'est à dire celle qui a induit l'anticorps monoclonal, comparée au taux d'immobilisation de 7 % obtenu avec la lignée saine hétérologue.

L'efficacité de l'immunopiégeage est aussi dépendante de la qualité du sérum. En effet, les

expériences d'immunopréciipage des souches homologues *B. polymyxa* CF43 et *B. circulans* RSA20 avec leur sérum respectif anti-CF43 et anti-RSA20, révèlent une efficacité nettement supérieure pour *B. polymyxa* CF43. Cette différence pourrait résulter entre autres de la meilleure qualité du sérum anti-CF43 puisqu'il a été partiellement purifié par précipitation au sulfate d'ammonium et dialysé contre le tampon phosphate, tandis que le sérum anti-RSA20 est utilisé sous sa forme brute. Les protéines autres que les immunoglobulines alors présentes dans ce dernier, pourraient affecter non seulement l'adsorption des anticorps sur la plaque, mais aussi leur affinité vis à vis des antigènes en diminuant la surface de contact entre les deux molécules.

Il paraît donc nécessaire de veiller à la bonne qualité du sérum et à sa spécificité pour prétendre à de résultats probants en immunopréciipage. Le choix du sérum devra tenir compte du matériel biologique étudié et du but visé. Il serait préférable d'obtenir une spécificité sérologique au niveau de l'espèce si l'on veut isoler une population bien définie, alors qu'une spécificité plus restreinte serait indispensable dans le cas d'une souche particulière. Certaines bactéries comme *Azospirillum lipoferum* (DE POLLI et al., 1980; LADHA et al., 1982; GAMARD, 1991) et *B. polymyxa* (BERGE, 1988; ce travail) peuvent conduire directement à des sérums spécifiques au niveau de l'espèce. Dans le genre *Rhizobium*, des spécificités sérologiques au niveau de l'espèce ont été obtenues après élimination de molécules non spécifiques par adsorptions successives contre des souches hétérologues (ROBERT et SCHMIDT, 1985; OLSEN et RICE, 1989). Cependant la spécificité au niveau de la souche est rarement atteinte et nécessite des préparations particulières (GRAHAM, 1971; NESME et al., 1987). Par exemple, POTTIER (1987) a purifié une fraction de protéines membranaires de la souche *Azospirillum lipoferum* 4B et a montré que le sérum polyclonal correspondant donnait des réactions sérologiques en ELISA plus spécifiques vis à vis des souches de cette espèce que le sérum préparé à partir des cellules entières. Toutes ces méthodologies pourraient permettre l'acquisition de sérums compatibles avec le niveau de spécificité désiré, et l'immunopréciipage en sera d'autant plus efficace et plus sensible.

**C. Immunopréciipage des souches de *B. polymyxa* dans le sol non rhizosphérique, le sol rhizosphérique et le rhizoplan de blé.** Nous avons montré que la température d'incubation influait considérablement sur l'efficacité de l'immunopréciipage de *B. polymyxa* dans le sol (MAVINGUI et al., 1990). L'efficacité de l'immunopréciipage est très fortement diminuée à la température de 30 °C par rapport à 4 °C. Cet effet défavorable serait attribuable principalement à la fixation sur les anticorps de bactéries "contaminante" à croissance rapide, telles les *Pseudomonas* et les *Entérobactéries* dont la multiplication, à cette température, serait favorisée pendant la période d'incubation assez longue de 15 h. Cet effet de masquage de sites anticorps a été confirmée par la relation clairement établie entre la baisse du pourcentage de récupération de la souche homologe *B. polymyxa* CF43 en culture pure, et des apports en nombre croissant de la souche hétérologue de *Pseudomonas fluorescens* PH12b. Un effet comparable a été observé avec les mêmes souches bactériennes par GOUZOU (1992). Dans ce dernier cas l'effet dépressif a été évalué par l'extinction de l'absorbance en ELISA et correspondait à une compétition pour l'occupation des sites, puisque les bactéries sont adsorbées sur la plaque par assèchement. Des périodes d'incubation

plus courtes pourraient diminuer cet inconvénient. En effet, VAN VUURDE et HENTEN (1983) rapportent des résultats satisfaisants de l'immuno-isolement à la température de 25 °C, mais à des temps d'incubation plus courts de l'ordre de 60 min. MORGAN et al. (1991) ont également obtenu des résultats encourageants au cours de l'immunopiégeage de *Pseudomonas putida* réalisé à 20 °C pour une période d'incubation de 15 min.

Cependant, nous avons obtenu des résultats satisfaisants avec l'immunopiégeage de souches de *B. polymyxa* à partir des échantillons de sol non rhizosphérique et rhizosphérique incubés pendant 15 h à 4 °C, dans des plaques de microtitration revêtues d'anticorps polyclonaux (MAVINGUI et al., 1990). Ces conditions d'incubation ont été appliquées par la suite pour isoler les populations de *B. polymyxa* dans les trois compartiments de sol non-rhizosphérique, sol rhizosphérique et du rhizoplan.

Il convient de clarifier la compartimentation des fractions d'isolement utilisée dans ce travail, afin de la replacer dans le contexte général de l'étude de la rhizosphère des plantes. Depuis que HILTNER (1904) avait défini la «rhizosphère» comme étant la fraction de sol sous l'influence des racines actives de plantes dont les composés libérés ou exsudés affectent l'activité microbienne, ce concept souffre toujours d'imprécision. En effet, l'interface sol-racine n'est pas clairement délimitée et dépend de la méthode de prélèvement. KATZNELSON (1946) complète ce concept en signifiant que tous les travaux sur la rhizosphère devraient s'effectuer en comparaison avec le sol non-rhizosphérique de mêmes caractéristiques physico-chimiques, afin d'estimer l'effet de la présence de la plante sur les populations de microorganismes. Le rapport des données entre la rhizosphère et le sol non-rhizosphérique est qualifié «d'effet rhizosphérique» (R/S). Cependant, cela ne résolvait toujours pas le problème de la délimitation précise de la rhizosphère, au contraire une autre ambiguïté apparaît puisqu'il est rare de trouver des échantillons de sol, du moins pour les horizons de surface, complètement dépourvus de racines. De nombreux travaux ont considéré la rhizosphère comme l'échantillon de racines plus le sol qui leur est fermement attaché (pour revue voir CURL et TRUELOVE, 1986). De ce fait, le volume de sol adhérant aux racines dépend du mode de prélèvement de cette rhizosphère et les résultats R/S qui en découlent sont très variables selon l'expérimentateur, même travaillant avec des plantes identiques (CLARK, 1947). Cet auteur propose en 1949 le terme «rhizoplan» pour désigner la surface racinaire sur laquelle se trouvent les microorganismes fortement attachés, et qui peuvent être qualitativement et quantitativement différents de ceux de la fraction «sol adhérent» incluant les cellules racinaires desquamées alors nommée «sol rhizosphérique». Mais il n'est pas simple de récupérer, même par lavages successifs et vigoureux, la totalité de la microflore du rhizoplan, car les microorganismes peuvent se localiser très en profondeur des cellules racinaires, on parle alors de «l'endorhizosphère». D'autres dénominations ont été utilisées tenant compte de la distance spatiale entre le sol et la racine, on parle de rhizosphère proche et de rhizosphère éloignée (RIVIERE, 1957; PAPAVIDAS et DAVEY, 1961). Ces auteurs ont pu montrer des différences qualitatives et quantitatives des populations microbiennes en fonction de la distance de l'échantillon de sol par rapport aux racines.

Tous ces travaux illustrent les difficultés à délimiter la rhizosphère et son environnement immédiat

ou éloigné. La compartimentation que nous utilisons ne doit donc pas être considérée comme rigide, elle est plutôt d'ordre méthodologique que physique. Nous avons dénommé le compartiment «non-rhizosphérique», un sol sans plante en croissance prélevé en bordure de parcelle qui n'a pas vu de blé depuis au moins trois ans. Sur ce même sol sont cultivées des plantules de blé en pot. Le compartiment «sol rhizosphérique» est constitué de racines plus le sol y adhérant et le compartiment «rhizoplan» représente l'ensemble des racines broyées, après élimination du sol adhérant par des lavages successifs. Les cultures en pot nous permettaient de prélever la quasi totalité du système racinaire et de contrôler en phytotron la croissance des plantes.

Les expériences d'immunopiégeage réalisées sur ces trois compartiments nous ont permis d'isoler un grand nombre de souches bactériennes appartenant au genre *Bacillus* et apparentées en particulier à l'espèce *B. polymyxa*. Le sérum polyclonal spécifique à l'espèce *B. polymyxa* s'est révélé particulièrement efficace.

L'abondance de la population de *B. polymyxa* isolée par immunopiégeage est équivalente dans le sol non rhizosphérique et rhizosphérique, évaluée respectivement à  $2,5 \times 10^5$  et  $2,9 \times 10^5$  bactéries par g de matière sèche. Tandis que dans le rhizoplan, cette population deux fois plus importante et estimée à  $6,2 \times 10^5$  bactéries par g de matière sèche. Ces tailles de populations de *B. polymyxa* sont très intéressantes, puisque les travaux portant sur le dénombrement direct de *B. polymyxa* ne sont pas, à notre connaissance, très nombreux (MAVINGUI et al. 1990). Les nombres de *B. polymyxa* dans le sol et la rhizosphère des plantes ont souvent été déduits parmi les bactéries fixatrices d'azote les plus abondantes de ces niches écologiques (RENNIE, 1980). C'est ainsi que DORNER (1924) a évalué la population de *B. polymyxa* entre  $10^3$  et  $10^5$  bactéries par g de sol non rhizosphérique sec. JURGENSEN et DAVEY (1971) ont rapporté des chiffres similaires dans le sol et la rhizosphère d'arbres forestiers. JACOBS et al. (1985) ont estimé la population de *B. polymyxa* entre 1 et  $7 \times 10^4$  bactéries fixatrices d'azote par g de racines sèches d'*Agropyrum desertorum*. Plusieurs travaux non publiés de notre laboratoire ont permis de déterminer que *B. polymyxa* représentait la population bactérienne la plus abondante parmi les fixateurs totaux d'azote de la rhizosphère du blé. Leur abondance, estimée par la méthode du nombre le plus probable des modèles spermosphères, était comprise entre 1 et  $5 \times 10^5$  bactéries par g de sol rhizosphérique sec. LETHBRIDGE et al. (1982) ont également rapporté que *B. polymyxa* constituait plus de 75 % des peuplements de fixateurs d'azote totaux du rhizoplan de blé, estimés entre  $10^4$  et  $10^6$  bactéries par g de racines sèches. Ces auteurs mentionnent que la grande variation de ces chiffres serait due à la disparité de la quantité de sol adhérent qui reste accroché, même après lavage, aux racines échantillonnées.

Tous ces travaux montrent une grande variabilité dans le dénombrement de populations de *B. polymyxa* dans le sol, la rhizosphère et les racines, même pour une seule espèce de plante. La quantification indirecte via les peuplements de fixateurs d'azote ne permet donc qu'une approximation de la population naturelle de *B. polymyxa*. De plus, les différences dans le stade de développement des plantes sont de nature à accroître les divergences (RIVIERE, 1957).

Nos travaux trouvent là leur intérêt puisque nous pouvons effectuer par la méthode d'immunopiégeage l'isolement et le dénombrement au pourcentage de récupération près de la population représentative de *B. polymyxa* dans le sol, la rhizosphère et les racines. Nous avons pu mettre en évidence une différence dans la taille des populations *B. polymyxa* dans ces trois compartiments. Cette différence, contrairement aux résultats de LETHBRIDGE et al. (1982), ne peut être expliquée par la disparité des poids de matières sèches entre les échantillons de sol et de racines, auxquels sont rapportés les nombres de bactéries, puisque la microflore totale estimée sur la même base est similaire dans les trois compartiments. Les racines de blé semblent donc déplacer quantitativement la population de *B. polymyxa*. Toutefois, cet effet racinaire, évalué à 2,5 par le rapport entre le rhizoplan et le sol non-rhizosphérique, est relativement faible puisque généralement compris entre 5 et 20, dans le cas des peuplements bactériens stimulés par la plante (ROVIRA et DAVEY, 1974).

L'efficacité de l'immunopiégeage dans les trois compartiments peut être évaluée par la proportion de *B. polymyxa* par rapport aux bactéries totales immunopiégées. Tenant compte d'une population moyenne en *B. polymyxa* de  $5 \times 10^5$  bactéries par g de matière sèche, soit 0,1 % de la microflore totale estimée entre  $1,9$  et  $3,8 \times 10^8$  bactéries par g de matière sèche, il aurait fallu observer 1000 colonies pour capturer un isolat de *B. polymyxa*. Ainsi, nous avons pu enrichir par immunopiégeage de plus 500 fois l'isolement de la population de *B. polymyxa* dans le compartiment racinaire, suivi de 100 fois du compartiment non rhizosphérique et de 10 fois du sol rhizosphérique. Le rendement relativement faible dans le sol rhizosphérique pourrait s'expliquer par une proportion plus importante de bactéries Gram négatives dans ce compartiment, comparé au sol non rhizosphérique (RIVIERE, 1961), semblant entraver comme nous l'avons vu tout au long de cette étude l'efficacité de l'immunopiégeage. Cependant, ce fait ne peut expliquer à lui seul le faible rendement dans le sol rhizosphérique, puisque le rhizoplan de blé donnant un rendement plus élevé, peut également héberger une forte proportion de bactéries Gram-négatives (KLEEBERGER et al., 1983). Il est possible que la population de *B. polymyxa* et les peuplements de bactéries Gram-négatives soient englobés dans une matrice polysaccharidique plus dense, rendant plus difficile leur extraction par simple agitation dans un tampon phosphate. GOUZOU (Thèse, 1992) dénombrent les *B. polymyxa* dans le sol rhizosphérique de blé, a obtenu une amélioration de l'absorbance en ELISA après dispersion du sol sablo-limoneux par des résines échangeuses d'ions sodiques (BARTOLI et al., 1991). Ce qui laisse supposer une récupération plus efficace de *B. polymyxa* dans les échantillons traités par rapport aux témoins. Il serait envisageable d'étudier l'effet des traitements dispersants ou floculants sur l'efficacité de l'immunopiégeage, mais ceux-ci devront être moins drastiques et prendre en compte la viabilité cellulaire, ce qui n'est pas toujours le cas lors des dénombrements bactériens par immunofluorescence ou ELISA (CROZAT et CLEYET-MAREL, 1984; GOUZOU et al., 1992).

La présence de bactéries non cibles (Gram-négatives et autres Gram-positives), fixées de façon non spécifique ou par quelques épitopes, a nécessité l'utilisation d'un milieu gélosé à base de saccharose, non pas spécifique mais électif et rendant facile le repérage des colonies de *B. polymyxa*. En effet, les *B. polymyxa* sont capables, sur milieu contenant du saccharose en quantité relativement importante, de produire en abondance un homopolysaccharide de fructose, le lévane (RAINBOW et ROSE, 1963; IMAN et

ABD-ALLAH, 1974). L'enzyme responsable de la synthèse de ce fructane, la lévane-saccharase a été très étudiée chez *Bacillus subtilis* où elle est secrétée dans le milieu extracellulaire (DEDONDER, 1966; STEINMETZ et AYMERICH, 1990). Des travaux préliminaires sur la mise en évidence des gènes de structure de la lévane-saccharase de *B. polymyxa*, semblent montrer que ce système enzymatique serait très proche de celui de *B. subtilis*, mais avec la particularité d'être constitutif (BEZZATE, 1989; STEINMETZ communication personnelle). Les colonies de *B. polymyxa* sur milieu gélosé contenant du saccharose présentent un aspect bombé, transparent à opaque, à bord régulier, ce qui les différencie souvent des colonies d'autres espèces, tout au moins parmi celles qui sont également récupérées par immunopréciipitation. Cependant, cette étape indispensable pour un immunopréciipitation efficace et moins laborieuse, comporte l'inconvénient de ne sélectionner que les individus produisant des polysaccharides de type hétéroglycane et homofructane ou lévane (souches lévane-saccharase positives). Ainsi, l'approche quantitative de l'immunopréciipitation ne permet que le dénombrement par défaut et donc approximatif de la population de *B. polymyxa*. Toutefois, les souches de *B. polymyxa* ne produisant pas de lévane n'ont, à notre connaissance, jamais été décrites. Etant donné le caractère probablement constitutif de la lévane-saccharase de *B. polymyxa*, (STEINMETZ communication personnelle) seules des mutations importantes dans les gènes de structure pourraient générer une souche négative pour la production de cette enzyme. Il est donc probable que les populations de *B. polymyxa* possédant la lévane-saccharase et isolées par immunopréciipitation soient représentatives des populations naturelles. Toutefois, il convient de noter que l'immunopréciipitation ne doit pas être considérée comme une méthode de dénombrement.

**D.- Identification numérique des souches.** Le développement de la taxonomie numérique basée sur un grand nombre de caractères physiologiques et biochimiques, et l'introduction de logiciels capables de traiter ces données ont permis des avancées considérables dans l'identification des bactéries appartenant au genre *Bacillus*. LOGAN et BERKELEY (1981) ont ainsi constitué 6 taxons avec 600 souches de *Bacillus*. Ces auteurs classent au sein d'un même phénogroupe les espèces *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans* et *B. macquariensis*.

Plusieurs travaux ont permis de nuancer la proximité des trois espèces *B. polymyxa-macerans-circulans*. Dans une étude également basée sur des caractères physiologiques et biochimiques, PRIEST et al. (1981) confirmant le nombre de taxons de LOGAN et BERKELEY, ont montré que les espèces *B. polymyxa* et *B. macerans* étaient plus proches entre elles que ne l'était *B. circulans* qui semble constituer un complexe d'espèces. Ces auteurs décrivent par ailleurs *B. polymyxa* comme une espèce plus homogène et bien distincte (Fig.13). De nombreuses autres études portant sur la composition en bases de l'ADN (GC %) (OUELLETTE et al., 1969; SEKI et al., 1978; PRIEST, 1981), l'hybridation ADN-ADN (SELDIN et DUBNA, 1985; NAKAMURA, 1987), les profils électrophorétiques d'enzymes (BAPTIST et al., 1978), la composition des acides gras (KANEDA, 1977), et la caractérisation sérologique (DAVIES, 1951; WOLF et BAKER, 1968) semblent également indiquer que l'espèce *B. polymyxa* constitue une entité bien délimitée et distincte des espèces *B. macerans* et *B. circulans*.

Nos résultats d'identification reposant sur l'analyse numérisée de API-bioMérieux peuvent être considérés comme fiables. Toutes nos souches, à l'exception de quelques unes d'origine non-rhizosphérique que nous excluons dorénavant de notre étude, appartiennent à l'espèce *B. polymyxa*.

Par conséquent, nous parlerons non pas de trois «populations», mais de trois «sous-populations» de *B. polymyxa* en référence à leur niche écologique d'isolement : sol non-rhizosphérique, sol rhizosphérique et rhizoplan.

E.- Valeur taxonomique de la caractérisation sérologique des *B. polymyxa*. Les propriétés sérologiques sont quelques fois utilisées dans la classification des *Bacillus* (DE BARJAC et BONNEFOI, 1962). Les anticorps dirigés contre les antigènes de spores de *B. polymyxa* ont montré une spécificité d'espèce alors que ceux des antigènes flagellaires et somatiques conduisaient à des résultats plus contrastés (DAVIES, 1951). Nos résultats en ELISA avec le sérum polyclonal de cellules entières, ont également montré une spécificité d'espèce chez *B. polymyxa*, tout au moins en comparaison des espèces *B. circulans* et *B. macerans* qui leur sont taxonomiquement proches. Un sérum dirigé contre les épitopes d'une souche de *B. polymyxa* isolé du riz avait également donné des résultats similaires (résultats non présentés). Ces résultats vont dans le même sens que ceux de BERGE (1988). Cependant, l'influence de la localisation géographique et de la plante hôte sur la sélection d'un séro groupe a été souvent évoquée (BALDANI et DÖBEREINER, 1980; BODDEY et al., 1986; BROMFIELD et al., 1986; FUHRMANN, 1990). L'ensemble des souches caractérisées dans nos travaux et ceux de BERGE proviennent de diverses régions géographiques (Suède et cinq régions de France) et ont été isolées tant dans le sol non-rhizosphérique que dans l'environnement rhizosphérique de blé. De plus, la souche type et les souches de référence étudiées lors de ces travaux proviennent de milieux certainement plus contrastés. L'espèce *B. polymyxa* semble donc constituer un ensemble sérologique assez homogène. Cependant il serait prudent de confirmer cette homogénéité sérologique en utilisant d'autres sérums, puisqu'une souche de *B. polymyxa* isolée dans ce travail ne croise pas avec le sérum anti-CF43, ce qui suggérerait l'existence d'un autre séro groupe.

La caractérisation sérologique de *B. polymyxa* nous a permis de confirmer l'appartenance de la majorité de nos souches à cette espèce, et d'intégrer deux souches de détermination imprécise. Les propriétés sérologiques chez cette espèce bactérienne pourraient revêtir une importance taxonomique au même titre que la caractérisation morphologique ou biochimique, les profils protéiques, les profils plasmidiques et le polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN (RFLP).

## V.- CONCLUSION

Au terme de ce chapitre, nous pouvons souligner que la méthode d'immunopiegeage a permis l'isolement spécifique d'un grand nombre de souches de *B. polymyxa*, dont l'identification a été confirmée par l'analyse numérique automatisée des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, puis par des tests complémentaires. De même, les propriétés sérologiques ont montré une spécificité au niveau de l'espèce *B. polymyxa*. Elles ont par conséquent une valeur taxonomique pour cette espèce. L'immunopiegeage constitue une bonne alternative pour l'isolement des populations bactériennes en nombre non dominant dans le sol, pour lesquelles les méthodes classiques ne sont pas toujours satisfaisantes. Les trois «sous-populations» de *B. polymyxa* isolées dans les trois compartiments, sol non-rhizosphérique et rhizosphérique et le rhizoplan, seront étudiées du point de vue de leur diversité génétique et phénotypique dans le chapitre suivant.



## CHAPITRE 2

*DIVERSITÉ PHÉNOTYPIQUE, SÉROLOGIQUE ET GÉNÉTIQUE  
DE LA POPULATION DE BACILLUS POLYMYXA  
DU SOL ET DE LA RHIZOSPHERE DU BLÉ*



**DIVERSITÉ PHÉNOTYPIQUE, SÉROLOGIQUE ET GÉNÉTIQUE  
DE LA POPULATION DE *BACILLUS POLYMYXA*  
DU SOL ET DE LA RHIZOSPHERE DU BLÉ**

**PRÉSENTATION DE LA PUBLICATION**

Le pouvoir adaptatif d'une espèce repose sur la diversité des individus qui la composent. A ce titre, l'étude de la diversité des microorganismes évoluant dans la rhizosphère des plantes apparaît comme une étape nécessaire à la mise en évidence de leur pouvoir adaptatif à cette niche écologique.

En effet, depuis la découverte de l'existence de la variabilité métabolique au sein des microorganismes telluriques, les écologistes microbiens s'attachent à étudier la diversité des populations naturelles afin d'acquérir des connaissances sur leur capacité à s'adapter aux conditions de l'environnement. C'est ainsi que des méthodes utilisant des indices de diversité ont été développées pour mesurer la variabilité des microorganismes dans les différentes niches écologiques (Pour revue voir ATLAS, 1984). De même, l'introduction du principe Adansonien et l'avènement de l'informatique dans le domaine de la microbiologie a conduit à la mise au point de méthodes classificatoires utilisant des algorithmes pour constituer des groupes d'individus, auxquels sont rattachés des caractères génétiques et phénotypiques. Les analyses de similarité ou de divergence entre les groupes formés permettent d'évaluer leur diversité. De plus, une telle partition ou hiérarchie peut être représentée par un arbre ou dendrogramme, ce qui rend facile l'interprétation des relations entre les différents groupes constitués (Pour revue voir SERRES et ROUX, 1984).

Dans la publication qui suit, nous avons utilisé les analyses de similarité, de divergence et l'analyse non paramétrique pour étudier la diversité phénotypique, sérologique et génétique des trois «sous-populations» de *B. polymyxa* isolées dans le sol non-rhizosphérique, le sol rhizosphérique et le rhizoplan de blé (Chapitre I). Pour cela, les analyses ont porté sur des caractères physiologiques et biochimiques (galeries API), sérologiques (ELISA) et génétiques (RFLP). L'objectif est de montrer, à travers la diversité de ces caractères, la sélection par les racines de blé d'une «sous-population» phénotypique et/ou génétique de *B. polymyxa* à partir de la population du sol.



**Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa*  
in soil and the wheat rhizosphere**

Running title: *Bacillus polymyxa* from soil and rhizosphere.

Patrick Mavingui<sup>1\*</sup>, Gisèle Laguerre<sup>2</sup>, Odile Berge<sup>1</sup> and Thierry Heulin<sup>1</sup>

1. Equipe d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère. Centre de Pédologie Biologique, UPR 6831 du CNRS associée à l'Université Nancy I, BP5, F-54501 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

Fax : 83 57 65 23

2. Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Microbiologie des Sols, 17 rue Sully, BV 1540, 21034 Dijon Cedex, France.

\*Name of corresponding author. Tel. 83 51 08 60

Accepté dans "Applied and Environmental Microbiology"

## ABSTRACT

Diversity among 130 strains of *Bacillus polymyxa* was studied; the bacteria were immunologically isolated from non-rhizosphere soil (32 strains), rhizosphere soil (38 strains) and the rhizoplane (60 strains) of wheat plantlets growing in a growth chamber. The strains were characterized phenotypically by 63 auxanographic (API 50 CHB and 20B strips) and morphological features, serologically by Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), and genetically by using Restriction Fragment-Length Polymorphism (RFLP) profiles of total DNA in combination with hybridization patterns using a ribosomal RNA gene probe. Cluster analysis of phenotypic characters using the unweighted pair group method with average (UPGMA) indicated 4 groups at 93% similarity. Clustering of *Bacillus polymyxa* strains from the various fractions showed that the strains isolated from non-rhizosphere soil fall into two groups (I and II), while the third group (III) was mainly comprised of strains isolated from rhizosphere soil. The last group (IV) included strains from rhizoplane exclusively. Strains belonging to a particular group exhibited a similarity level of 96%. Serological properties revealed a higher variability among strains isolated from non-rhizosphere and rhizosphere soil than among rhizoplane strains. RFLP patterns also showed a greater genetic diversity between strains isolated from non-rhizosphere and rhizosphere soil and therefore could not be clearly grouped. The RFLP patterns of sorbitol-positive strains isolated from the rhizoplane were identical. These results indicate that diversity within populations of *Bacillus polymyxa* isolated from non-rhizosphere and rhizosphere soil is higher than that from the rhizoplane. It therefore appears that the wheat roots may select a specific «subpopulation» from the soil *Bacillus polymyxa* population.

## INTRODUCTION

It is well established that beneficial interactions occur between plants and microorganisms living in their rhizosphere (29). Beneficial plant associated- microorganisms include symbionts, such as root nodulating bacteria *Rhizobium* and actinomycete *Frankia*, mycorrhizal fungi, and also non-symbionts known as rhizobacteria (29). Specific relationships between plant and associated microorganisms exist and have been well illustrated in the *Rhizobium*-symbiosis (14).

Beneficial free-living rhizobacteria belonging to the genus *Bacillus* have been isolated from the rhizosphere of *Graminae* (8, 9, 11, 39, 40). The presence of a nitrogen-fixing bacterium, *Bacillus polymyxa* (20), in the rhizosphere of wheat has also been reported (27, 35). Recently *Bacillus polymyxa* has been used as a potential growth promoting rhizobacterium of forage plant species (10, 21). The association between *Bacillus polymyxa* and plants such as perennial ryegrass (*Lolium perene* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) was found to be specific and probably involves coadaptation (10). The adapted bacterial populations living in a specialized ecological niche such as plant roots could be generated either by phenotypic selection, genomic rearrangements within individuals or gene transfers between microorganisms which occur in natural microbial populations (26, 46, 18).

The potential for and extent of adaptation to the highly heterogeneous and fluctuating environment of cultivated soil, depends on their genetic diversity. Although diversity among free-living soil bacteria has been measured (49, 50), very little work has compared their phenotypic and genotypic diversity in the rhizosphere. The effect of plant roots on the size and the composition of soil bacteria has been well documented (32, 42). It has been shown that rhizoplane and rhizosphere soil of many crops contained higher numbers of microorganisms than the corresponding non-rhizosphere soil (43). Preferential stimulation of bacteria in the rhizoplane and rhizosphere has also been reported (44). A decrease in phenotypic diversity of bacterial populations in the rhizosphere soil and the rhizoplane as compared to non-rhizosphere soil of rosana western wheatgrass (*Agropyron smithii*) and fourwing salbush (*Atriplex canescens*) has been reported (33). These studies concerned the microbial communities, including several bacterial species and genera.

Very few attempts have so far been made to study the diversity of bacterial populations found within and around the rhizosphere; this may be due to the lack of suitable techniques available for isolating a sufficient number of strains belonging to the same species. In the present work the diversity of bacteria was evaluated within one species i.e. *Bacillus polymyxa*. This bacterium has been described as a clearly distinct species by several workers (12, 38) and was convenient for this study.

In this study we aimed to determine the diversity among the populations of *Bacillus polymyxa* associated with roots of wheat, by their phenotypic, serological and genetic characteristics. Three populations of *Bacillus polymyxa*, isolated by immunotrapping from (i) non-rhizosphere soil, (ii) rhizosphere soil, and (iii) the rhizoplane of spring wheat, were compared. The use of the immunotrapping technique previously described (31) allowed isolation of strains representing less than 1% of the culturable microflora. This approach may help in understanding the capacity of plants to select a bacterial population from soil and the mechanisms involved in plant-microbial interactions.

## MATERIALS AND METHODS

**Soil and plants.** The soil was a silty eutric cambisol (pH 5.5) sampled from a crop field in Eastern France (Dieulouard). The regular crop rotation in this field since 5 years is rape (*Brassica napus* L.) followed by wheat or maize. Three soil samples were collected from fallow sites, three meters apart around the crop field. The soil was sampled from the top 30 cm layer and passed through a 5 mm sieve. Three pots were filled with the soil of each sample. Spring wheat seedlings (*Triticum aestivum* L., cv. Fidel) were grown in pots (11 cm diameter) containing 1.5 kg of soil in a growth chamber with a 16 h photoperiod of 300 microeinsteins  $m^{-2}S^{-1}$ . Day and night temperatures were  $21 \pm 1$  and  $15 \pm 2^{\circ}C$ , respectively, with a relative humidity of  $85 \pm 5\%$ . Uncultivated pots were also maintained under similar conditions of temperature and humidity.

**Sampling and immunotrapping.** Plants were harvested at 18 days growth. The following fractions were considered: (i) the non-rhizosphere soil (NRS) i.e. the uncultivated soil, (ii) the rhizosphere soil (RS) i.e. macerates of roots plus the closely adhering soil and (iii) the rhizoplane (RP) i.e. macerates of roots

washed free of soil with sterile distilled water by gentle shaking treatment. Each pot containing four plants at the three leaves stage was pooled and considered as an individual sample. A 2.5 g of roots or 5 g of soil were macerated with a sterile mortar and pestle in 45 ml of phosphate buffer (0.72% [wt/vol] NaCl, 0.28% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.04% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) to obtain the first dilution. The subsequent tenfold serial dilutions in phosphate buffer were prepared and used for immunotrapping of bacteria according to Mavingui et al. (31). Microtiter plates were coated with partially purified rabbit polyclonal antibodies (10<sup>-3</sup> dilution). Dilution 10<sup>-3</sup> of soil or root sample was added (100 µl per well). After incubation at 4°C, plates were washed twice with phosphate buffer pH 7.2 and bacteria were desorbed with KCl 0.1 M pH 5.5 (100 µl per well). Desorbed bacteria were plated on sucrose (4%) agar medium. The typical production of exopolysaccharides (levane) by *B. polymyxa* colonies make easy their capture. Counts of bacterial populations were expressed as per g dry weight root or soil (60°C, 72 h).

**Bacterial strains and media.** Type strains of *Bacillus polymyxa* ATCC 842; *Bacillus macerans* ATCC 8244; *Bacillus circulans* NCIB 9374; and the strain *B. polymyxa* CF43 isolated from the rhizosphere of spring wheat in our laboratory were used as references. Modified Luria Bertani broth (LB; 0.1% [wt/vol] tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) was used as bacterial growth medium and nutrient agar (Prolabo) to estimate the culturable microflora.

**Identification and numerical analysis of phenotypic features.** A total of 63 characters were used to identify and determine similarity among the strains of *B. polymyxa*. The production of acid metabolites from 49 carbohydrates (API 50 CHB) and tests such as proteolysis of gelatin; activities of nitrate reductase, β-galactosidase, urease and tryptophanase; H<sub>2</sub>S formation; production of acetoin and citrate utilization (API 20B), were used (28). The tests were done according to the recommendations of API-bioMérieux (la Balme les Grottes, 38390 Montalieu Vercieu, France). Discs impregnated with dimethyl-p-phenylenediamine (bioMérieux) were used to test for the presence of cytochrome oxidase. The presence of catalase was tested by adding a drop of 1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> onto a young colony of *B. polymyxa* growing on nutrient agar; gas production (O<sub>2</sub>) indicated presence of the enzyme. The Gram test was carried out according to Cerny's enzymatical method (7). Cell shape, motility in a 24 h-old LB broth culture, and the presence of swelling endospores in 2-day-old colonies on nutrient agar were examined by using phase contrast microscopy.

Data of phenotypic features were submitted to a cluster analysis using the APILAB computer program. Proximity was measured using Gower's similarity coefficient with negative matches (17). The clusters were agglomerated using the unweighted pair group method with average (UPGMA) (47).

**Serological test.** Species-specific polyclonal antibodies (PcAbs) were raised in rabbits by hyperimmunisation with whole cells of the *B. polymyxa* strain CF43 (A. Dorier, I.U.T. Biologie appliquée, Lyon, France), then partially purified by precipitation with ammonium sulfate (3.9 M) and dialysis against a phosphate buffer saline (0.80% [wt/vol] NaCl, 0.27% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 0.40% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, pH 7.4). PcAbs were stored at -20°C until used. The indirect ELISA procedure was conducted as previously described using microtiter plates (Nunc Immuno-plate, Maxisorp F96) (4). A 10<sup>-4</sup> dilution of PcAbs was used. The bacterial concentration was maintained at 10<sup>5</sup> to 10<sup>6</sup> cells per well (100 µl) since the homologous reaction (CF43/antiCF43) was maximum at this bacterial concentration. The immunoenzymatic reaction was expressed by absorbance at 405 nm (Dynatech, MR 5000 spectrophotometer). Data of serological properties were log transformed to fit the normal distribution according to the Kolmogorov-Smirnov one sample test (22). The variability of the data was evaluated by using Bartlett's test and the coefficient of variations (45). This was executed on the STATGRAPHICS software computer program (Release 4.2 Uniware STSC, Inc. USA).

**Preparation of genomic DNA.** Bacterial cultures were grown overnight at 30°C in 50 ml of LB broth. Aliquots of 25 ml were pelleted at 9000 g for 20 min and stored at -20°C until use. The pelleted cells were washed once in 1 ml of TES buffer (20 mM Tris, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.9), centrifuged for 2 min at 9000 g and dissolved in 1.2 ml of TES. Cells were lysed by treating first with 300 µl of lysozyme (5 mg. ml<sup>-1</sup>) (Sigma, EC 3.2.1.17 L 6876), followed by incubation at 37°C for 60 min. Then 90 µl of sodium dodecyl sulfate (10% w/v in TES) were added, and incubation was performed for a further 15 min or until a clear lysate was produced. The lysate was incubated at 37°C for 60 min after the addition of 5 µl of RNase A (10 mg. ml<sup>-1</sup>) (9001-99-4, Sigma R 9009). Pronase E (100 µl of 25 mg. ml<sup>-1</sup> solution in TES) (9001-92-7, Sigma P 6911) was added to the lysate which was incubated overnight at 37°C. The cell lysate was extracted with 1 volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (50 : 48 : 2 vol.). The DNA was precipitated with isopropanol (v/v) and pelleted by centrifugation for 15 min at 9000 g. After dissolving in 500 µl of TE buffer

(10 mM tris, 1 mM EDTA, pH 8.0), the DNA was again precipitated with isopropanol supplemented with 0.3 M sodium acetate. The DNA was then washed in 70% ethanol, dried, dissolved in 100  $\mu$ l of TE buffer and stored at -4°C. The concentration and purity of the DNA were tested by using UV spectroscopy (Hitachi, U 2000 spectrophotometer ).

**Restriction fragment analysis.** Restriction digests of total DNA were performed as specified by the manufacturer (Boehringer Mannheim, France) but using an excess of the enzyme (5 U/ $\mu$ l DNA), followed by overnight incubation to ensure complete digestion. Restricted-DNA digests were electrophoresed by using horizontal 0.9% agarose (Sigma type II EEO 16877 ) slab gels, with TAE buffer (40 mM Tris, 4 mM Na-acetate, 1 mM EDTA, pH 7,9). Electrophoresis was carried out at 100 V for 5 h with 20 cm x 25 cm gels (Bethesda Research Laboratories model H4 apparatus) for total DNA restriction pattern analysis and at 100 V for 1 h with 6 cm x 8 cm minigels (Bethesda Research Laboratories model Horizon 58 apparatus) for hybridization analysis. The 1 kb DNA ladder (Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc.) was used as a molecular weight marker. Gels were stained with ethidium bromide and the DNA fragments photographed under UV illumination.

**DNA probe.** Plasmid pBA2 was used for DNA probe studies. This was obtained by cloning a 2.3 kb *Hind*III DNA fragment from *Bacillus subtilis* carrying the 16S rRNA genes into *Escherichia coli* with plasmid pBR322 (25). The pBA2 plasmid was prepared by standard methods of alkaline lysis and CsCl gradient (30)

**DNA transfer and hybridization.** DNAs were Southern blotted from the agarose gels onto nylon membrane (Genebind, Pharmacia LKB Biotechnologie, France) using the Vacugene 2016 apparatus according to the manufacturers specification (Pharmacia LKB Biotechnologie, France). Probe labelling with digoxigenin, hybridization, and detection of hybrid fragments were performed using a non-radioactive random primed DNA labelling and detection kit (Boehringer Mannheim, France).

**Sequence divergences and dendrogram.** Sequence divergences between the hybridization patterns were calculated by the Nei and Li method (36). Genetic relationships among the isolates was determined from the distance matrix derived from the UPGMA method (47) sequence divergence estimations by using a computer program devised by J. C. Miller.

## RESULTS

The population size of *Bacillus polymyxa* was  $2.5 \pm 1.6$  (mean  $\pm$  SE) and  $2.9 \pm 0.7 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup> dry weight of soil in non rhizosphere and rhizosphere soil, respectively. In the rhizoplane it was  $6.2 \pm 0.7 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup> dry weight of root. This represented less than 1% of the culturable microflora which was  $1.9 \pm 1.2$ ,  $3.1 \pm 1.6$  and  $3.8 \pm 1.8 \times 10^8$  CFU g<sup>-1</sup> dry weight of soil or root from non rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane, respectively. This was in agreement with previous reports (31). A total of 130 strains (Table 1) immuno-isolated from non-rhizosphere soil (NRS), rhizosphere soil (RS) and the rhizoplane (RP) of wheat were analysed for their phenotypic, serological and genetic characteristics.

**Phenotypical features.** All the strains were identified as *B. polymyxa* after analysis of 63 phenotypic characters (API 50CH and 20B) with the APILAB software program. The results of the cluster analysis performed on these 63 phenotypic characters are summarized in a simplified dendrogram (Fig. 1). When all 130 strains of *B. polymyxa* were grouped at a similarity level of 93%, the phenogram fell into two branches corresponding to (A) *B. polymyxa* strains isolated mainly from NRS and RS; all these strains are unable to metabolize sorbitol and (B) *B. polymyxa* strains mainly of RP origin, except the strain PMD90 from NRS, all RP strains of this branch are able to metabolize sorbitol.

The first division occurred in branch A at a level of 94.5% by separating group I from groups II and III which in turn were discriminated by a second subdivision at the 96% level. The groups I and II mainly contained strains isolated from NRS and the group III strains from RS. The last group IV comprised RP strains exclusively. The following points should be noted: (i) strains belonging to a same group formed a tight phenotypic cluster at a similarity level of 96%, (ii) six strains (PMD217, 218, 219, 237, 238, 259) isolated from RP but clustered under groups II and III were not able to metabolize sorbitol, and (iii) the reference strain CF43 isolated from the rhizosphere of wheat was clustered under group III with the RS strains.

A total of eight strains of *B. polymyxa* could not be included in any of the four groups. Of these, six belonged to branch A, four of which were isolated from NRS and two from RS. The remaining two strains belonged to branch B. One of them was isolated from RP and the other from NRS. This last NRS strain (PMD90) was the only isolate of branch B unable to use sorbitol.

**Serological properties.** All *B. polymyxa* strains cross-reacted equally well with the anti-CF43 serum at dilution  $10^{-3}$  (data not shown). The cross-reaction was 50 to 100% of the homologous reaction with strain CF43 (absorbance value 2.0). In contrast, the *B. macerans* ATCC 8244 and *B. circulans* NCIB 9374 type strains, did not cross-react. To investigate the serological variability among *B. polymyxa* strains, a  $10^{-4}$  diluted serum was used. Results from the serological properties measured by ELISA showed heterogeneity among the strains tested (Fig. 2). The variances were not homogeneous within each fraction namely NRS, RS and RP, as revealed by Bartlett's test ( $P < 0.05$ ) indicating the presence of at least two distinct statistical populations. The non parametric Kolmogorov-Smirnov two-sample test (22) showed that the strains isolated from NRS and RS with similar medians formed a distinct serological subgroup different ( $P < 0.001$ ) from the subgroup of RP strains (Table 2). In addition, the strains isolated from the former two fractions (NRS and RS) were more variable serologically than the RP strains as indicated by their higher coefficient of variations (Table 2).

**RFLP analysis.** From an initial sample of 130 *B. polymyxa* strains, a subsample of 36 strains (12 from each NRS, RS and RP fraction) represented in the phenotypic groups described in Fig. 1 was used for RFLP analysis. The results of the phenotypic cluster analysis performed on these 36 strains were in agreement with the previous clustering results when 130 strains were used (data not shown). In addition, incorporating of type strains in the subsample cluster analysis showed that *B. polymyxa* ATCC 842 type strain was related to the general clustering of *B. polymyxa* at a similarity level of 94%. In contrast, the *B. macerans* ATCC 8244 and *B. circulans* ATCC 9374 type strains were more distant (< 88% similarity).

The hybridization patterns of total DNA of the 36 strains are shown in Fig. 3. *B. polymyxa* ATCC 842 type strain shared several hybridizing restriction fragments in common with other *B. polymyxa* strains, but the *B. macerans* ATCC 8244 and *B. circulans* NCIB 9374 type strains displayed distinctly different profiles. The hybridization patterns revealed a higher heterogeneity between the strains isolated from NRS and RS than those from RP (Table 3). Ten and 9 different profiles were seen with NRS and RS strains, respectively. In contrast, with strains isolated from RP there were only 3 profiles with *Pst*I digests and 2 with *Bgl*III. Five profiles appeared common to the strains from NRS and RS. However, most of the strains isolated from RP (10 out of 12) had one profile (Table 3). The remaining two RP strains (PMD218 and

PMD259) were unable to metabolize sorbitol and were also differentiated from the other RP strains in phenotypic clustering (Fig. 1). It should be noted that two NRS strains, PMD92 and PMD93, with identical hybridization profiles were, however, separated phenotypically. The strain PMD63 isolated from NRS and *B. polymyxa* CF43 showed an identical profile.

The global cluster analysis of hybridization patterns with *Pst*I and *Bgl*III generated five groups (A, B, C, D, E) at the genetic distance level of 3.6% (Figure 4). The most distant group C was at the genetic distance level of 7.1%. Sequence divergence between strains belonging to the same group did not exceed 3.4%. All the strains isolated from RP were clustered under group A, whereas the strains originating from NRS and RS were distributed into 4 (A, B, C, D) of the 5 groups formed. The *B. polymyxa* strain CF43 was clustered under group D. The *B. polymyxa* ATCC 842 type strain constituted a distinct group E on its own. The *B. macerans* ATCC 8244 and *B. circulans* NCIB 9374 type strains, were even more distant and therefore excluded from the analysis.

An examination of total DNA *Hind*III restriction patterns confirmed the RFLP analysis based on hybridization with pBA2 probe. All the strains undifferentiated by hybridization pattern analysis were also not differentiated by their total DNA restriction patterns (Figure 5). All the strains closely related by the hybridization analysis (genetic distance < 1%) also shared identical or very similar total DNA restriction patterns. On the whole, strains grouped by the genotypic cluster analysis showed similarities in their total DNA fingerprint.

## DISCUSSION

The cluster analysis performed on phenotypic features of *Bacillus polymyxa* strains isolated in this study has shown that at the species level (i) the strains exhibited a high level of similarity (93%), and their identification was unambiguous and (ii) the diversity of strains depended on their origin, namely non-rhizosphere soil, rhizosphere soil or the rhizoplane. The majority (90%) of strains isolated from the rhizoplane could be clustered into one phenotypic group with a very low variability, however strains from non-rhizosphere and rhizosphere soil were more highly variable and were dispersed into three different groups. It appears that rhizoplane strains represent a homogeneous phenotypic subpopulation of

*B. polymyxa* distinct from the soil population. The isolation of bacterial strains, including immunotrapping technique, from all the three fractions was done with the same antiserum and the same culture medium by selecting similar colony types that produce exopolysaccharide on sucrose. Therefore it is unlikely that methodology had an effect on the selection of strains with specific properties in relation to the fraction studied.

The most distinguishing character of the strains isolated from the rhizoplane, containing the bacteria firmly attached to roots, was their ability to metabolize sorbitol. It can be hypothesized that sorbitol metabolism may play an important role in the establishment of the rhizobacteria in the vicinity of wheat roots, a positive adaptation. On the rhizoplane there is a strong competition for O<sub>2</sub> due to the root respiration. Under these conditions facultative aerobic bacteria, like *B. polymyxa* can grow anaerobically on highly reduced substrates such as sorbitol. Sorbitol has been detected in its monomeric form in the root cells of *Plantaginaceae* and shown to perform an osmoregulatory function (5). So far there has been no report of sorbitol in the root exudates of wheat (41). However, the competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* strains for pea nodulation was correlated with its ability to catabolize the amino acid homoserine, found in large quantities in pea root exudates (24). Monosaccharides such as inositol, glucose, glucuronic acid, galactose, galacturonic acid, arabinose and fucose contained in the exudates of several plants have been also shown to be specifically able to induce the virulence genes of the plant pathogen, *Agrobacterium tumefaciens* (1), leading its proliferation in the plant tissue.

Serological variability of *B. polymyxa* strains was also higher among the strains isolated from non-rhizosphere and rhizosphere soil as compared with rhizoplane strains. No cross-reaction was found with the *B. macerans* ATCC 8244 and *B. circulans* NCIB 9374 type strains, in accordance with the results obtained with agglutination tests by Porter et al. (37), although they were related taxonomically to *B. polymyxa* species (38). However, using *B. polymyxa* somatic antigens, cross-reactions with certain strains of *B. macerans* have been reported (13). Little is known about the serology of *B. polymyxa*. Porter et al. (37) using heated vegetative cells as antigens found that no one particular antiserum agglutinated all the strains of *B. polymyxa* although some antisera agglutinated 60% of the strains tested, suggesting the presence of several serogroups. Our results suggest that the strains of *B. polymyxa* isolated from non-rhizosphere and rhizosphere soil and from wheat roots belong to the same serogroup. This could be due to the specific immunological

method used which allows the isolation of strains closely related serologically (23). However, the strains of *B. polymyxa* isolated from the rhizoplane of wheat represent a distinct serological subgroup from that strains isolated from non-rhizosphere and rhizosphere soil. Several studies have demonstrated that in the case of *Bradyrhizobium*-soybean symbiosis, plant genotype can affect serogroup recovery and the distribution of *Bradyrhizobium japonicum* in the soil (6, 15). Moawad et al. (34) have shown that a particular indigenous *Bradyrhizobium japonicum* serogroup was found more frequently than two other serogroups in nodules of field-grown soybeans. The presence of a distinct subserogroup of *B. polymyxa* closely associated with wheat roots, *i.e.* the rhizoplane, may indicate subpopulation selection from an existing heterogeneous resident soil population by the host.

Based on the RFLP patterns, we found that the immuno-isolated strains are related to the *B. polymyxa* type strain ATCC 842. In contrast, the *B. macerans* ATCC 8244 and *B. circulans* NCIB 9374 type strains are clearly distant species. These results confirm the findings based on phenotypic and serological characteristics. Unprobed and probed RFLP patterns of rDNA used as a taxonomic tool for microbial classification have been previously reported (2, 19, 48). Stähl et al. (48) have demonstrated that the separation of *Lactobacillus* strains into two different species, using scanned RFLP patterns of total DNA, was in agreement with DNA-DNA hybridization data. Species of the genus *Bacillus* have also been separated by using RFLP of rDNA hybridized band patterns (16). Our studies showed that the RFLP band patterns of the ten strains isolated from the RP, and which were able to catabolize sorbitol, belonged to a single genotype. This dominant genotype from the vicinity of wheat roots (rhizoplane) was not found among the other twenty four soil (non-rhizosphere and rhizosphere) isolates tested. It could be postulated that this genotype resulted from a clone. However, this possibility seems unlikely because three independent rhizoplane samples (each sample containing four plants) were used for isolating *B. polymyxa* strains (PMD200, 205, 215, 216 from sample 1; PMD226, 230 from sample 2 and PMD253, 254, 256, 258 from sample 3) (Table 1). The genotype of the rhizoplane strain which was not isolated could exist as a minor constituent of the soil microbial population. The polymerase chain reaction method (3) may be useful if the frequency of this genotype in the soil is too low for its detection otherwise. However, all the *B. polymyxa* strains from the rhizoplane were clustered in a group (A) which also contained some strains from non-rhizosphere and rhizosphere soil, suggesting that they are closely related genetically. In contrast, strains isolated from non-rhizosphere and

rhizosphere soil were clustered under four different groups (A, B, C, D). This indicates that genotypic heterogeneity was higher among the strains isolated from non-rhizosphere and rhizosphere soil than from the rhizoplane.

Despite the lack of correlation between the genetic subdivisions of subsample strains and the groups obtained by phenotypic features, these methods are more sensitive indicators of diversity among the strains isolated from non-rhizosphere and rhizosphere soil with respect to the relative homogeneity of the rhizoplane strains. Torsvik et al. (50) have also shown that both phenotypic and genetic measured provide a good estimate of soil bacterial diversity. Using this approach we were able to differentiate the subpopulation of *Bacillus polymyxa* isolated from the rhizoplane from the soil and rhizosphere subpopulations. It appears the roots of wheat select a specific phenotypic, serologic and genotypic subpopulation of *Bacillus polymyxa* probably from the natural soil populations. This finding suggests, over the time frame of the study, that the diversity of this soil bacterial population is lowered following selection by the plant roots. Whether successive interactions between roots and soil microorganisms will result in stabilization of the diversity of the overall soil population needs to be verified.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr N. Amarger (INRA, Dijon, France) for providing the laboratory facilities and to Dr J. P. W. Young (John Innes Institute, Norwich, England) and P. Hebban (CNRS, Nancy, France) for their critical evaluation.

#### REFERENCES

1. Ankenbauer, R. G., and E.W. Nester. 1990. Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: Structural specificity and activities of monosaccharides. *J. Bacteriol.* 172:6442-6446.
2. Armstrong, J. L., N. L. Fowles and P. T. Rygiewicz. 1989. Restriction fragment length polymorphism distinguish ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 116:1-7.
3. Bej, A. K., S. C. McCarty, and R. M. Atlas. 1991. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: Comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2429-2432.

4. Berge, O., T. Heulin, W. Achouak, C. Richard, R. Bally, and J. Balandreau. 1991. *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. *Can. J. Microbiol.* 37:195-203.
5. Briens, M., and F. Larher. 1983. Sorbitol accumulation in *Plantaginaceae*; further evidence for a function in stress tolerance. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 110 S:447-458.
6. Caldwell, B. E., and E. E. Hartwig. 1970. Serological distribution of soybean root nodule bacteria in soils of south-eastern U.S.A. *Agronomy journal* 62:621-622.
7. Cerny, G. 1976. Method for the distinction of Gram-negative bacteria from Gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 53:223-225.
8. Chanway, C. P., and L. M. Nelson. 1990. Field and laboratory studies of *Triticum aestivum* L. inoculated with co-existent growth-promoting *Bacillus* strains. *Soil Biol. Biochem.* 22:789-795.
9. Chanway, C. P., L. M. Nelson, and F. B. Holl. 1988a. Cultivar-specific growth promotion of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) by coexistent *Bacillus* species. *Can. J. Microbiol.* 34:925-929.
10. Chanway, C. P., F. B. Holl, and R. Turkington. 1988. Genotypic coadaptation in plant growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa*. *Plant and Soil* 106:281-284.
11. Clark, F. E. 1949. Soil microorganisms and plant roots. *Advances in Agronomy.* 1:242-288.
12. Claus, D., and R. C. W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus*, Cohn, 174<sup>AL</sup>, p. 1105-1139. *In* P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds), 9th ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
13. Davies, S. N. 1951. The serology of *Bacillus polymyxa*. *J. Gen. Microbiol.* 5:807-816.
14. Djordjevic, M. A., D. W. Gabriel, and B. G. Rolfe. 1987. *Rhizobium*-the refined parasite of legumes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:145-168.
15. Fuhrmann, J. 1989. Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* as influenced by soybean cultivar and sampling location. *Soil Biol. Biochem.* 21:1079-1081.
16. Gottlieb, P., and R. Rudner. 1985. Restriction site polymorphism of ribosomal ribonucleic acid gene-sets in members of the genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:244-252.
17. Gower, J. C. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* 27:857-874.

18. **Graham, J. B., and C. A. Istock.** 1979. Gene exchange and natural selection cause *Bacillus subtilis* to evolve in soil culture. *Science* 204:637-639.
19. **Grimont, F., and P. A. D. Grimont.** 1986. Ribosomal ribonucleic acid restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 137:165-175.
20. **Hino, S., and P. W. Wilson.** 1958. Nitrogen fixation by a facultative *Bacillus*. *J. Bacteriol.* 75:403-408.
21. **Holl, F. B., C. P. Chanway, R. Turkington, and R. A. Radley.** 1988. Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* 20:19-24.
22. **Hollander, M., and D. A. Wolfe.** 1973. Nonparametric statistical methods. New York. Wiley.
23. **Hranitzky, K. W., A. D. Larson, D. W. Ragsdale, and R. J. Siebeling.** 1980. Isolation of 10 serovars of *Vibrio cholerae* from water by a serologically specific method. *Science* 210:1025-1026.
24. **Hynes, M. F., and M. P. O'Connell.** 1990. Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Can. J. Microbiol.* 36:864-869.
25. **Iglesis, A., P. Ceglowski, and T. A. Trautner.** 1983. Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*. Effects of the insertion of *Bacillus subtilis* rRNA genes into plasmids. *Mol. Gen. Genet.* 192:149-155.
26. **Kennedy, C.** 1989. The genetics of nitrogen fixation, P. 107-127. *In* D. A. Hopwood and K. F. Chater (eds), *Genetics of bacterial diversity*. Academic Press.
27. **Lindberg, T., and U. Granhall.** 1984. Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of temperate cereals and forage grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:683-689.
28. **Logan N. A., and R. C. W. Bekeley.** 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.* 130:1871-1882.
29. **Lynch, J. M.** 1990. Beneficial interactions between micro-organisms and roots. *Biotech. Adv.* 8:335-346.
30. **Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
31. **Mavingui, P., O. Berge, and T. Heulin.** 1990. Immunotrapping of *Bacillus polymyxa* in soil and in the rhizosphere of wheat. *Symbiosis* 9:215-221.
32. **Miller, H. J., G. Henken, and J. A. Van Veen.** 1989. Variation and composition of bacterial populations in the rhizospheres of maize, wheat, and grass cultivars. *Can. J. Microbiol.* 35:656-660.

33. Metzger, W. C., D. A. Klein, and E. F. Redente. 1986. Bacterial physiological diversity in the rhizosphere of range plants in response to retorted shale stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:765-770.
34. Moawad, H. A., W. R. Ellis, and E. L. Schmidt. 1984. Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:607-612.
35. Neal, J. L., and R. I. Larson. 1976. Acetylene reduction by bacteria isolated from the rhizosphere of wheat. *Soil Biol. Biochem.* 8:151-155.
36. Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5269-5273.
37. Porter, R., C. S. McCleskey, and M. Levine. 1937. The facultative sporulating bacteria producing gas from lactose. *J. Bacteriol.* 33:163-183.
38. Priest, F. G., M. Goodfellow, and C. Todd. 1981. The genus *Bacillus*: a numerical analysis, p 91-103. In R. C. W. Berkeley and M. Goodfellow (eds), *The aerobic endospore-forming bacteria : classification and identification*. Society for General Microbiology, Academic Press.
39. Rennie, R. J., and R. I. Larson. 1979. Dinitrogen fixation associated with disomic substitution lines of spring wheat. *Can. J. Bot.* 57:2771- 2775.
40. Rivière, J. 1963. Rhizosphère et croissance du blé. *Ann. Agronomiques* 14: 619-653.
41. Rovira, A. D. 1969. Plant root exudates. *Bot. Rev.* 5:35-57.
42. Rovira, A. D., and C. B. Davey. 1974. Biology of the rhizosphere, p. 153-204. In: E. W. Carson (ed.), *The plant root and its environment*. University Press of Virginia.
43. Rouatt, J. W., and H. Katznelson. 1961. A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plants. *J. Appl. Bacteriol.* 24:164-171.
44. Rouatt, J. W., H. Katznelson, and T. M. B. Payne. 1960. Statistical evaluation of rhizosphere effect. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 24:271-273.
45. Scherrer, B. 1984. *Biostatistique*. G. Morin (ed.), Chicoutimi, Québec, Canada.
46. Silverman, M., M. Martin, and J. Engebrecht. 1989. Regulation of luminescence in marine bacteria, p. 71-86. In D. A. Hopwood and K. F. Chater (eds), *Genetics of bacterial diversity*. Academic Press.
47. Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy*. W. H. Freeman & Co, San Francisco.

48. Ståhl, M., G. Molin, A. Persson, S. Ahrné, and S. Ståhl. 1990. Restriction endonuclease patterns and multivariate analysis as a classification tool for *Lactobacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:189-193.
49. Torsvik, V., J. Goksoyr, and F. L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782-787.
50. Torsvik, V., K. Salte, R. Sorheim, and J. Goksoyr. 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:776-781.

## LEGENDS

**Fig. 1.** Dendrogram of phenotypic similarities obtained with 130 strains of *Bacillus polymyxa* immunologically isolated from non-rhizosphere soil (NRS), rhizosphere soil (RS) and the rhizoplane (RP) of spring wheat (see table 1). The strains were distributed into two branches (A and B) and their percentages in the four groups (I, II, III, IV) are given in brackets. The strain *Bacillus polymyxa* CF43 was also isolated in the rhizosphere of wheat.

**Fig. 2.** Serological reactions obtained with *Bacillus polymyxa* strains from non-rhizosphere soil (NRS), rhizosphere soil (RS) and the rhizoplane (RP) of spring wheat, using the ELISA technique with polyclonal antibodies against *Bacillus polymyxa* CF43.

**Fig. 3.** Hybridization patterns of restriction digests from *Bacillus polymyxa* strains with the 16S rRNA gene probe pBA2, panel A: *Pst*I restriction digests, panel B: *Bgl*III restriction digests. The strain *B. polymyxa* CF43 (1) and type strains *B. polymyxa* ATCC 842 (2), *B. macerans* ATCC 8244 (3) and *B. circulans* NCIB 9374 (4) were also included. The sizes (in kilobases) and relative locations of the molecular weight marker are indicated on the left of each panel.

**Fig. 4.** Dendrogram of genetic divergences within strains of *Bacillus polymyxa*. The genetic analysis of the 5 groups (A, B, C, D, E) was based on the combined data of the *Pst*I and *Bgl*III digested total DNA, hybridized with the 16S rRNA gene probe pBA2.

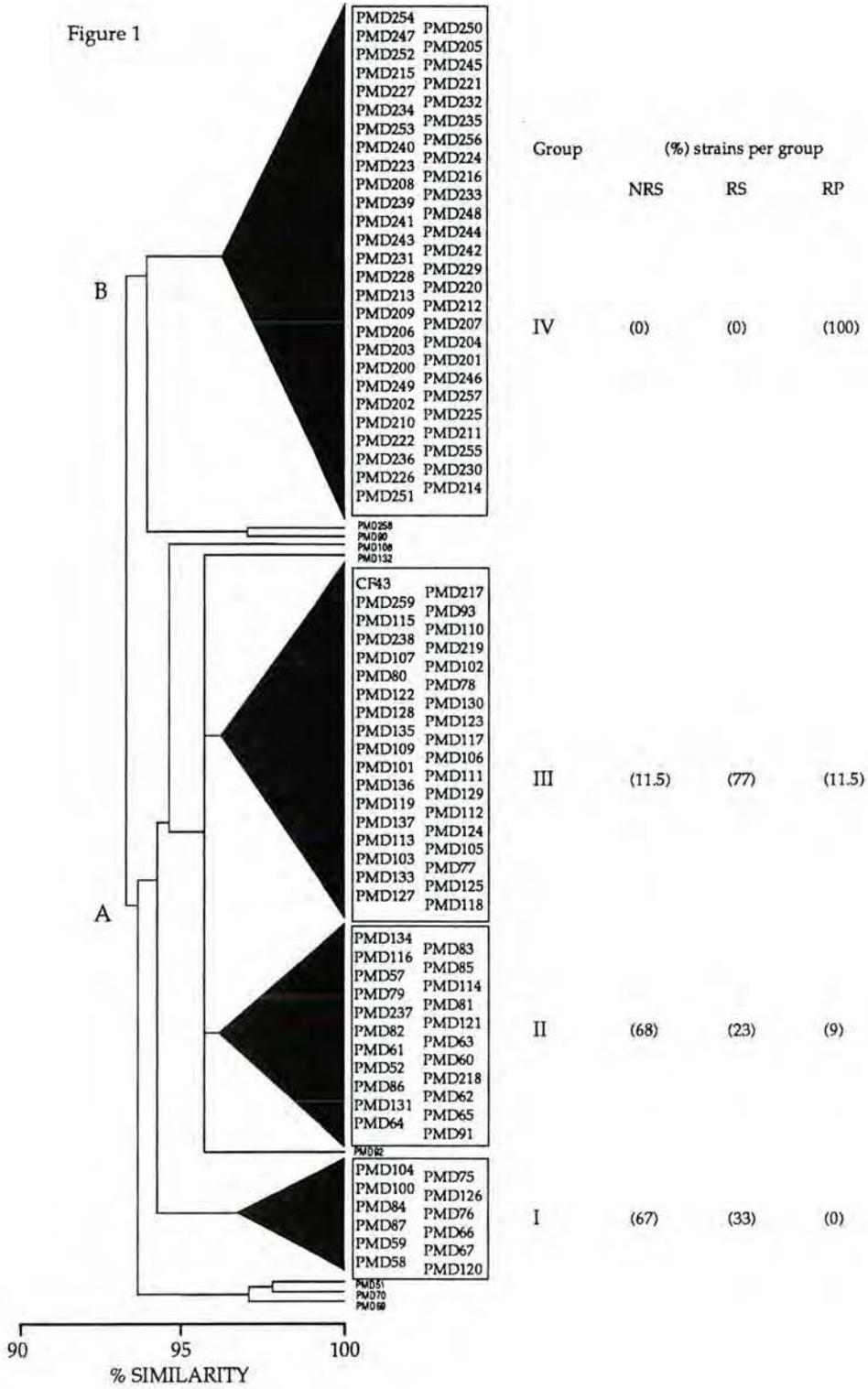
**Fig. 5.** Agarose gel electrophoresis of *Hind*III-digested total DNA of *Bacillus polymyxa* strains. The serial numbers of strains used are indicated on the top of the figure. A, B, C, D, and E corresponds to the groups indicated in Fig. 4.

TABLE 1. Origin and serial number of *Bacillus polymyxa* strains immuno-isolated from non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and the rhizoplane of 18-day-old spring wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Fidel).

Sample	NRS*	RS*	RP*
1	PMD51, 52, 57, 66 67, 69, 70, 75 76	PMD100, 101, 102, 112, 113, 120, 121, 123 124, 127, 134	PMD200 to PMD219
2	PMD58, 59, 60, 61, 77, 78, 79, 80, 81, 82	PMD103, 105, 106, 114, 116, 117, 118, 119, 122, 125, 128, 133	PMD220 to PMD239
3	PMD62, 63, 64, 65, 83, 84, 85, 86, 87 90, 91, 92, 93	PMD104, 107, 108, 109, 110, 111, 115, 126, 129, 130, 131, 132, 135, 136, 137	PMD240 to PMD259
n*	32	38	60

\* NRS: Non rhizosphere soil; RS: Rhizosphere soil; RP: Rhizoplane; n: number of strains.

Figure 1



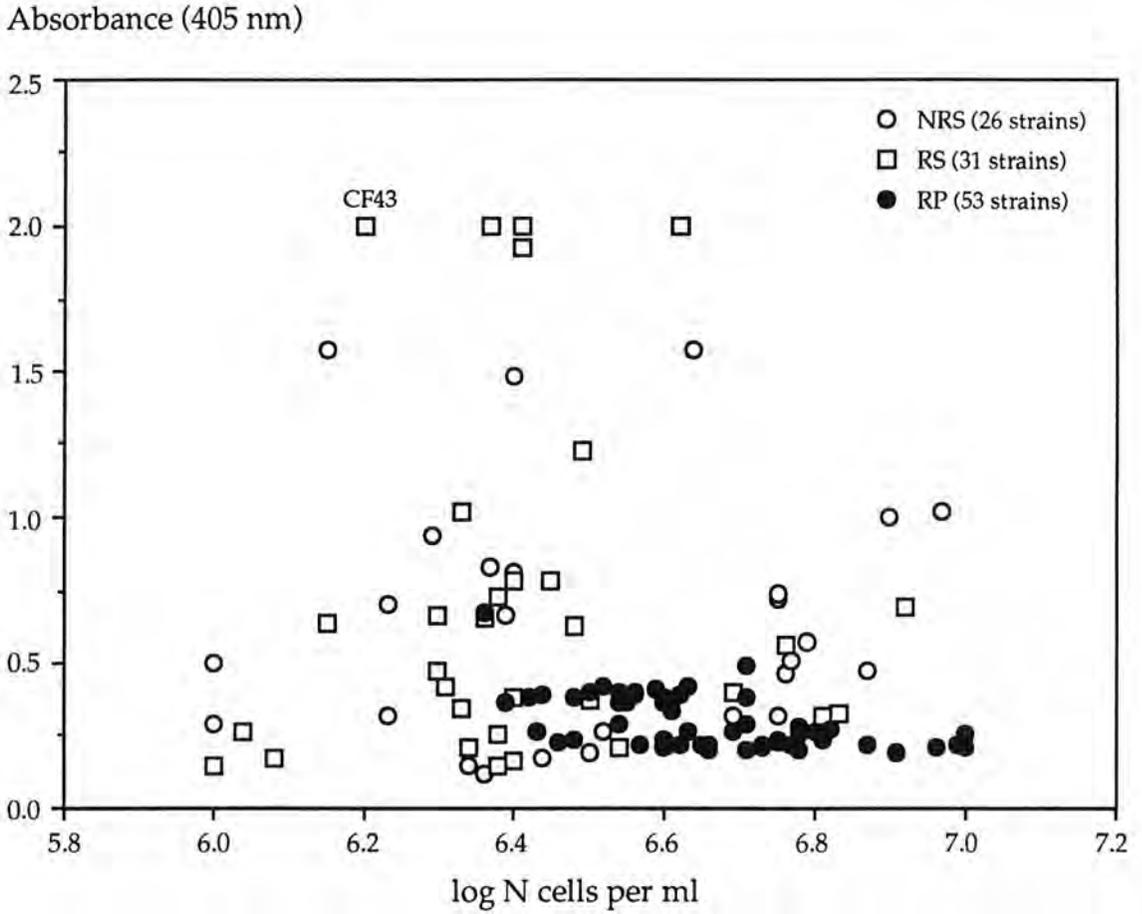


Fig. 2. Serological reactions obtained with *Bacillus polymyxa* strains from non-rhizosphere soil (NRS), rhizosphere soil (RS) and the rhizoplane (RP) of spring wheat, using the ELISA technique with polyclonal antibodies against *Bacillus polymyxa* CF43.

**TABLE 2. Serological variability between *Bacillus polymyxa* strains isolated from non-rhizosphere soil (NRS), rhizosphere soil (RS) and the rhizoplane (RP).**

Fraction	Number of strains tested	Median $\pm$ CI	Mean $\pm$ SD	Coefficient of variation (%)
NRS	26	0.54 $\pm$ 0.27	0.64 $\pm$ 0.42	66
RS	31	0.47 $\pm$ 0.22	0.67 $\pm$ 0.57	85
RP	53	0.26 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.09	31

Median ( $A_{405}$  values) with different capital letters attached are significantly different ( $p < 0.001$ ), as determined by Kolmogorov-Smirnov two-sample test.  
 CI : 95% confidence interval, SD : standard deviation.

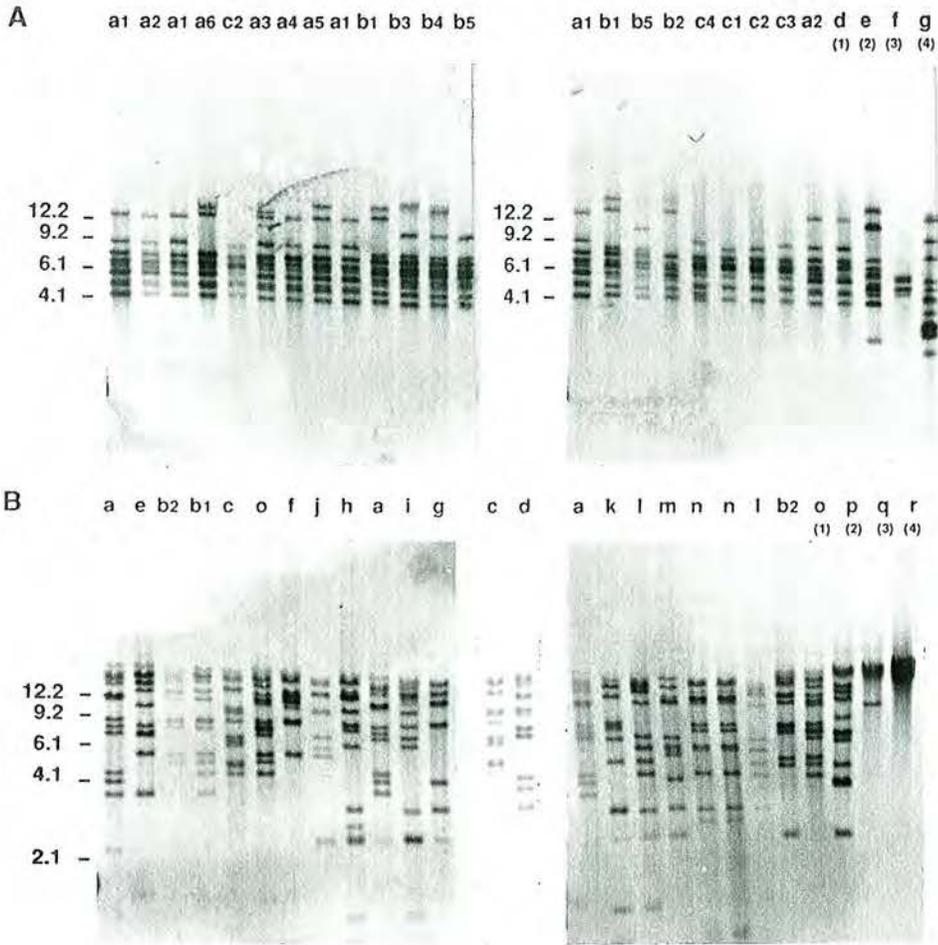


Fig. 3. Hybridization patterns of restriction digests from *Bacillus polymyxa* strains with the 16S rRNA gene probe pBA2, panel A: *Pst*I restriction digests, panel B: *Bgl*II restriction digests. The strain *B. polymyxa* CF43 (1) and type strains *B. polymyxa* ATCC 842 (2), *B. macerans* ATCC 8244 (3) and *B. circulans* NCIB 9374 (4) were also included. The sizes (in kilobases) and relative locations of the molecular weight marker are indicated on the left of each panel.

TABLE 2. Distribution of RFLP pattern groups (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p) and subgroups (1, 2, 3, 4, 5, 6) of *Bacillus polymyxa* strains in the soil samples.

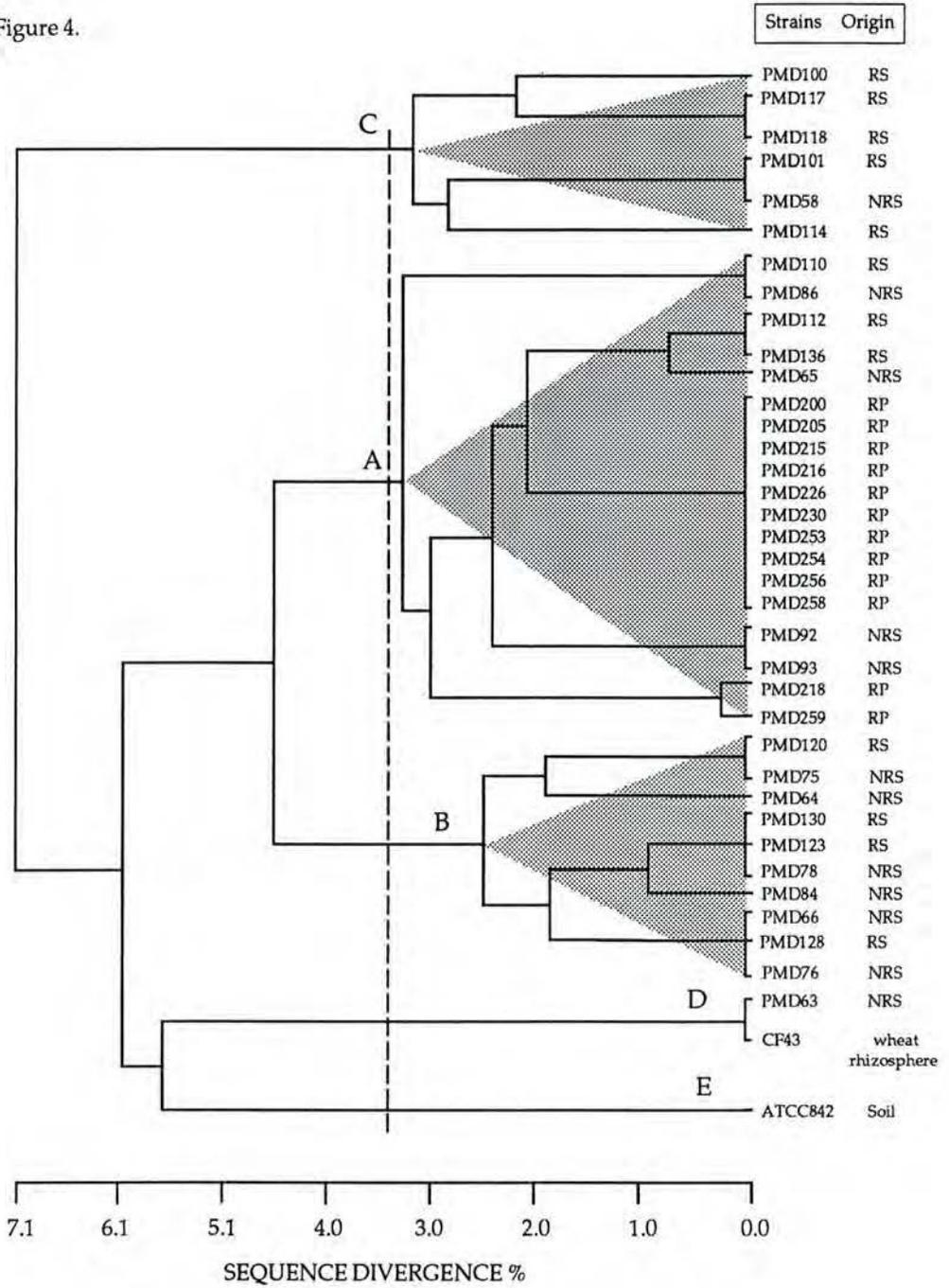
Genotypic group (1)	pBA2 hybridization patterns		Strains	Soil samples (2)	
	<i>Pst</i> I	<i>Bgl</i> III		Fraction	Origin
A	a1	a	200	RP	1
A	a1	a	205	RP	1
A	a1	a	215	RP	1
A	a1	a	216	RP	1
A	a1	a	226	RP	2
A	a1	a	230	RP	2
A	a1	a	253	RP	3
A	a1	a	254	RP	3
A	a1	a	256	RP	3
A	a1	a	258	RP	3
A	a1	b1	65	NRS	3
A	a2	b2	136	RS	3
A	a2	b2	112	RS	1
A	a3	c	259	RP	3
A	a4	c	218	RP	1
A	a5	d	86	NRS	3
A	a5	d	110	RS	3
A	a6	e	92	NRS	3
A	a6	e	93	NRS	3
B	b1	f	120	RS	1
B	b1	f	75	NRS	1
B	b2	g	64	NRS	3
B	b3	h	130	RS	3
B	b3	h	123	RS	2
B	b3	h	78	NRS	2
B	b4	i	84	NRS	3
B	b5	j	66	NRS	1
B	b5	j	128	RS	2
B	b5	j	76	NRS	1
C	c1	k	100	RS	1
C	c2	l	117	RS	2
C	c2	l	118	RS	2
C	c3	m	114	RS	2
C	c4	n	101	RS	1
C	c4	n	58	NRS	2
D	d	o	63	NRS	3
D	d	o	CF43*	Rhizosphere	
E	e	p	842*	Soil	

(1) Groups derived from cluster analysis of hybridization patterns with *Pst*I and *Bgl*III (see Fig. 4).

(2) Soil sampling is defined in table 1.

\*CF43 is a *Bacillus polymyxa* strain isolated from the rhizosphere of wheat; 842 is the type strain of *Bacillus polymyxa* from ATCC.

Figure 4.



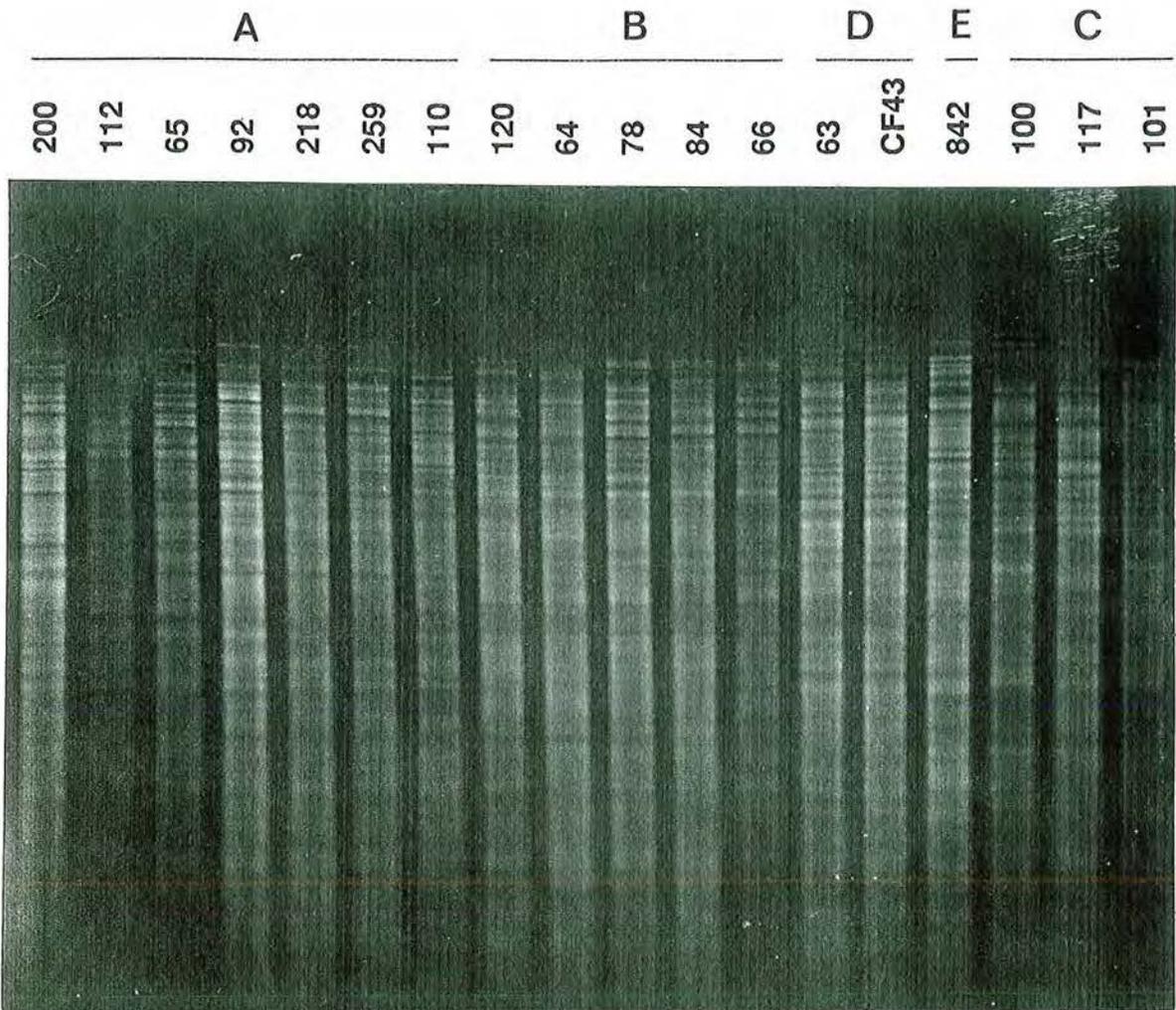


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of *Hind*III-digested total DNA of *Bacillus polymyxa* strains. The serial numbers of strains used are indicated on the top of the figure. A, B, C, D, and E corresponds to the groups indicated in Fig. 4.



## CHAPITRE 3

*RECHERCHE DE CARACTÈRES D'ADAPTATION  
DES BACILLUS POLYMYXA  
À L'ENVIRONNEMENT RACINAIRE DU BLÉ.*

<p><b>RECHERCHE DE CARACTÈRES D'ADAPTATION DES <i>BACILLUS POLYMYXA</i> À L'ENVIRONNEMENT RACINAIRE DU BLÉ.</b></p>
---

## I.- INTRODUCTION

L'étude de la diversité de la population naturelle de *B. polymyxa* a permis de mettre en évidence l'existence de sous-populations en relation avec la niche écologique d'isolement, en particulier l'environnement racinaire du blé où l'utilisation du sorbitol par les bactéries pourrait jouer un rôle majeur. Cette observation conduit naturellement à la question suivante : «la proximité de la racine induit-elle la possession de caractères d'adaptation et de compétitivité par la sous-population bactérienne concernée ?», autrement dit «la plante exerce-t-elle une pression de sélection sur la population bactérienne qui lui est associée ?». L'un des moyens de répondre à cette question est de comparer les populations hors et dans la rhizosphère afin de repérer les caractères différents et donc susceptibles de contribuer à l'établissement de relations privilégiées entre les deux partenaires : plante et bactérie.

Ce type d'approche a déjà été rapporté dans la littérature. Les résultats de ces études font état de différences de la taille des populations microbiennes des racines et de la rhizosphère. Elles montrent aussi que la plante accumule dans son voisinage racinaire une microflore présentant des différences morphologiques, physiologiques, biochimiques et génétiques avec celle du sol. Cependant, les facteurs déterminant la distribution et la dominance tout comme les mécanismes de régulation conduisant à l'adaptation de certaines populations de bactéries libres dans la rhizosphère demeurent pour la plupart non élucidés. Une des raisons majeures de la lenteur de ce progrès réside dans le fait que, jusqu'à présent, la majorité des recherches a porté sur des peuplements microbiens comprenant familles, genres et espèces différents et non sur des populations. Il apparaît que de telles approches ne peuvent pas expliquer les processus impliqués dans l'adaptation de ces microorganismes dans la rhizosphère, du fait des différences génétiques et phénotypiques intrinsèques, et souvent trop importantes, entre les individus appartenant à des espèces différentes.

C'est pour ces raisons que nous avons opté pour une démarche «populationnelle» qui consiste à comparer les individus d'une même espèce bactérienne, hors et dans la rhizosphère, isolées avec la même méthode afin de réduire les variations inhérentes à la disparité des groupes bactériens et rendre moins fastidieux le repérage des caractères liés à la proximité des racines. La connaissance de la diversité phénotypique intraspécifique et des besoins nutritionnels de la bactérie pourraient ainsi permettre de visualiser les caractères variables potentiellement adaptatifs et d'en déduire les pressions de sélection exercées par la plante.

Comme pour la plupart des plantes, les graminées exsudent des molécules simples comme les glucides, les acides aminées et organiques, et des molécules complexes tels les polyosides ou libèrent au travers des cellules desquamées des substances organiques qui constituent la principale source d'énergie et de carbone des bactéries vivant dans leur rhizosphère (VANCURA, 1988). La nature de ces nutriments, leur concentration et disponibilité, et la capacité des bactéries telluriques à les utiliser vont conditionner la compétitivité et l'adaptation à la niche racinaire. Ainsi, la composition de la microflore bactérienne varie suivant la plante étudiée. Dans les associations symbiotiques, des molécules exsudées par les plantes et dégradées de façon privilégiée par une souche donnée, en plus d'autres substrats, peuvent lui conférer un avantage par rapport à d'autres. Par exemple, la compétitivité à noduler le pois par certaines souches de *Rhizobium leguminosarum* ayant un profil plasmidique particulier, a été corrélée avec leur aptitude à cataboliser l'homosérine, un acide aminé exsudé par la légumineuse (HYNES et O'CONNEL, 1990). D'autres molécules pouvant jouer un rôle similaire ont déjà été caractérisées. C'est le cas de la calystégine favorisant la colonisation du liseron des haies (*Calystegia sepium*) par *Rhizobium meliloti* (TEPFER et al., 1988), la trigonelline présente dans les exsudats racinaires des légumineuses et également catabolisée par *Rhizobium meliloti* (BOIVIN et al., 1990), et un grand nombre de composés réunis sous le nom générique de rhizopines -en référence aux opines intervenant dans la pathogénicité *Agrobacterium*-dicotylédones (FARRAND, 1989)- qui seraient impliqués dans les relations *Rhizobium*-légumineuses. Tous ces composés et les échanges spécifiques qu'ils semblent induire reposent sur des bases génétiques faisant intervenir des relations de type «gène à gène».

Dans les relations établies entre les graminées et les rhizobactéries libres, l'existence de tels composés n'a pas, à notre connaissance, été décrite. Toutefois, parmi les rhizobactéries libres les plus étudiées se trouvent les *Azospirillum* et les *Pseudomonas* pour lesquels une multitude de caractères favorables à la vie rhizosphérique a été rapportée. Ils sont capables d'utiliser la majorité des composés exsudés par les plantes (MYERS et HUBBELL, 1987). Certains auteurs ont même rapporté l'utilisation des opines par des *Pseudomonas* (ROSSIGNOL et DION, 1985), lesquels se sont avérés quelquefois plus compétitifs vis à vis de ces substrats qu'*Agrobacterium tumefaciens* (BELL et coll., 1990a et 1990b). Les bactéries du genre *Azospirillum* et les *Pseudomonas* sont de bons colonisatrices de la rhizosphère et des racines où elles peuvent pénétrer les cellules du cortex (endorhizosphère) (LEVANONY et al, 1989), grâce à des enzymes pectinolytiques (ULRICH, 1976; ROMBOUTS et PILNIK, 1980; KHAMMAS et KAISER, 1991). Ils présentent un chimiotactisme positif vis à vis des exsudats racinaires (SCHER et al., 1985; HEINRICH et HESS, 1985; MANDIMBA et al., 1986; RAI, 1991) et produisent des composés antagonistes (antibiotique, bactériocine...) contre d'autres microorganismes. Ils peuvent générer des formes de résistance en réponse à des stress, à l'exemple des kystes d'*Azospirillum* qui résistent à la dessiccation (LAMM et NEYRA, 1981; HUBERT, 1991). Toutefois, aucune relation spécifique entre ces rhizobactéries libres et les Graminées n'a jusqu'ici été établie. De plus, tous ces caractères d'adaptation ont été trouvés chez un nombre restreint d'individus et sur des espèces diverses, souvent en présence de plantes différentes, ce qui rend difficile le repérage de relations spécifiques.

En ce qui concerne les bactéries du genre *Bacillus*, des données sur ces caractères favorables à la vie rhizosphérique ont été également rapportées (voir introduction générale). Cependant, l'existence d'une relation privilégiée avec les Graminées reste, comme dans le cas des *Azospirillum* et *Pseudomonas*, à l'état d'hypothèse. L'approche populationnelle que nous avons développée vise à ouvrir des pistes dans la connaissance de la relation fréquemment rencontrée entre *B. polymyxa* et le blé. Nous nous sommes focalisés dans ce dernier chapitre sur le métabolisme des composés simples (glucides, acides aminés et organiques...) généralement exsudés par les plantes en regardant les différences qui pourraient exister entre la sous-population racinaire de *B. polymyxa* et celle issue du sol non-rhizosphérique. La mise en évidence de différences dans l'utilisation de ce type de molécules sur un grand nombre de souches, pourrait apporter une voie d'étude de ces mécanismes.

Dans un premier temps nous avons exploité, à l'aide d'une méthode discriminante, les données recueillies lors de l'étude de la diversité phénotypique pour analyser les caractères métaboliques variables. Nous avons, par la suite, recherché les caractères classiques comme la capacité à produire des enzymes particulières (cellulolytique, pectinolytique, protéolytique, chitinolytique) et l'antagonisme vis à vis d'un champignon pathogène du blé.

## II.- MATERIEL ET METHODES

**A.- Analyse en composantes locales.** Afin d'identifier les caractères phénotypiques variables au sein des souches de *B. polymyxa* isolées dans le sol et la rhizosphère du blé, nous avons utilisé la méthode «d'analyse en composantes locales» (LELU, 1989). Cette méthode complète la classification hiérarchique ascendante, puisqu'elle permet de classer simultanément les facteurs (caractères biochimiques : galeries API 50 CHB et 20 B) et les objets (souches), sans a priori sur leur origine (sol non-rhizosphérique, sol rhizosphérique et rhizoplan). Les classes obtenues sont d'un type particulier puisqu'elles peuvent être recouvrantes, c'est à dire qu'un individu peut appartenir à plusieurs classes à la fois. De plus, dans chaque classe les individus et les facteurs sont triés par ordre de pertinence décroissante, ce qui permet de dégager les éléments les plus typiques.

**B.- Mise en évidence des activités enzymatiques.** Les souches de *B. polymyxa* utilisées au cours de cette étude sont cultivées une nuit sur milieu liquide LB à 30 °C, sous une agitation douce. Pour les souches témoins (positive et négative), les paramètres cultureux (température, temps d'incubation) ont été appliqués selon les recommandations des collections internationales d'où elles proviennent. Les suspensions bactériennes atteignaient des concentrations de  $10^7$  à  $10^8$  cellules par ml lors de leur utilisation. La composition des milieux figure en annexe 4.

**1.- Activité cellulolytique.** L'aptitude cellulolytique des souches a été évaluée par la méthode de TEATHER et WOOD (1982). L'inoculum bactérien est déposé en 4 points équidistants (10 µl / points) sur milieu gélosé contenant soit la carboxyméthylcellulose (0,5%) soit la MN300 (1 %) qui est une cellulose peu soluble et dont le taux de cristallinité est de 82 % (CONINCK-CHOSSON, 1988). La souche cellulolytique *Cellulomonas uda* DSM 20108 a été utilisée comme témoin positif. A l'issue de la période d'incubation de 48 h, la surface de la gélose est recouverte par une solution aqueuse du colorant rouge Congo (0,1%) pendant 15 min, puis une solution molaire de NaCl pendant 5 min à la température ambiante qui entraîne la formation d'un complexe polysaccharidique rouge. L'activité carboxyméthylcellulase se traduit l'absence de coloration autour de la colonie. Les zones de lyse dans le milieu très opaque contenant la MN300, s'observent directement.

**2.- Activité pectinolytique.** Dans un premier temps, la capacité à dégrader la pectine a été mise en évidence par la méthode de HANKIN et al. (1971). Elle a consisté à ensemercer en 4 points équidistants (10 µl de suspension bactérienne/point) un milieu gélosé contenant de la pectine «ruban rouge» (0,5 %), en boîte de Pétri. Cette pectine peu méthylée est destinée à la mise en évidence des enzymes de dépolymérisation. Les boîtes sont incubées 48 h à 30 °C. L'activité pectinolytique est détectée en submergeant la gélose par une solution aqueuse de bromure d'hexadécyltriméthyl-ammonium (0,1%) qui précipite la pectine. L'absence de précipité autour de la colonie traduit l'attaque de la pectine par la bactérie. La souche pectinolytique *Erwinia chrysanthemi* DSM 30179 est utilisée comme témoin positif.

Nous avons par la suite mesuré l'activité de la pectate lyase de 6 souches de *B. polymyxa* (2 par compartiment), et des souches *B. polymyxa* CF43 et *Erwinia chrysanthemi* DSM 30179. Les pectates lyases de *B. polymyxa* sont connues pour être excrétées dans le milieu extracellulaire (NAGEL et VAUGHN, 1961a). Les extraits enzymatiques sont obtenues de la façon suivante : une préculture dans le milieu LB, additionné de pectine «ruban rouge» (0,1 %) pour induire les enzymes pectinolytiques, est inoculée à 40 ml de milieu contenant 0,5 % de la pectine «ruban rouge». A l'issue de l'incubation d'une nuit à 30 °C, la culture est centrifugée 10 min à 10000 g, puis le surnageant est filtré (Nalgène, 0,45 µm). La pectate lyase est dosée par la technique de ROMBOUTS (1972). Le milieu réactionnel pour le dosage contient de l'acide polygalacturonique (0,5%) et l'extrait enzymatique. L'ensemble est incubé à 30 °C et les mesures sont effectuées au spectrophotomètre UV (Beckman DU 70) après 15 min. Cette durée correspond à la limite au delà de laquelle la réaction n'est plus d'ordre 0 par rapport au substrat. Le produit réactionnel absorbe dans l'ultra-violet à 235 nm (ALBERSHEIM et al., 1960), à cause de la double liaison entre C<sub>4</sub> et C<sub>5</sub> du résidu galacturonique insaturé (HASEGAWA et NAGEL, 1962). L'activité enzymatique spécifique est définie alors comme la quantité d'enzyme produisant une micromole du produit de la réaction par minute et par mg de protéines (voir formule en annexe 1). La quantité de protéines de l'extrait enzymatique est déterminée par la technique de BRADFORD (1976) en utilisant le réactif BIO-RAD.

**3.- Activité chitinolytique.** Nous avons utilisé la technique de O'BRIEN et COLWELL (1987) pour tester l'activité chitinolytique de nos souches. Elle consiste à évaluer l'activité de la chitobiase encore appelée N-acétyl β-D-glucosaminidase en présence de la 4-méthylumbelliferyl-N-acétyl-β-D-glucosaminide (4-MUFGlcNAc). La fluorescence due à la méthylumbelliférone libérée témoigne de l'action de l'enzyme. Le test suppose que la présence de la chitobiase est concomitante de celle d'une chitinase (endochitinase), dont l'action sur la chitine libère majoritairement des résidus chitobiose, qui sont dégradés par la chitobiase. La conduite du test se fait de la façon suivante : deux à trois colonies d'une culture bactérienne de 48 h sur gélose nutritive sont déposées au centre d'un papier filtre (Whatman), en frottant vigoureusement. Un volume de 20 µl de la solution 4-MUFGlcNAc est déposé sur chaque point bactérien. Après une période d'incubation de 20 min à 37 °C, une goutte d'une solution saturée de carbonate bicarbonate permettant d'amplifier la réaction est déposée sur chaque préparation bactérienne. La lecture de la fluorescence est effectuée sous UV à 366 nm en présence d'un témoin constitué du substrat seul. L'intensité plus ou moins forte de la fluorescence permet d'établir un classement des souches réactives. L'absence de fluorescence indique que la souche est chitobiase moins. La souche type chitinolytique *Serratia marcescens* DSM 30121 a été utilisée comme témoin positif.

**C.-Inhibition *in vitro* du champignon *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*.** L'effet antifongique de nos souches a été étudié sur milieu gélosé, en boîte de Pétri (WELLER et al., 1985). Les milieux PDA (Potato dextrose agar, 39 g/l, Difco) et B de King (37 g/l, bioMérieux) ont été utilisés. Les bactéries sont ensemencées en 4 points équidistants en bordure de la boîte de Pétri (10 µl/point), et mises à croître 48 h à 30 °C. Des rondelles de 5 mm de diamètre sont découpées à l'aide d'un emporte-pièce dans la gélose du milieu PDA contenant le champignon. Ces rondelles sont déposées au centre de la boîte contenant les bactéries. Les boîtes sont incubées pendant 6 jours à 24 °C et à l'obscurité. La formation de zones d'inhibition de la croissance du champignon à la proximité de la bactérie traduit l'effet antifongique de celle-ci. La souche du champignon *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* isolée du blé au champ, nous a été fournie par P. LUCAS (INRA de Rennes, Le Rheu). Nous avons confirmé sa pathogénicité sur des plantules de blé, sur vermiculite en tube.

**D.- Traitements statistiques.** Les données ont été analysées à l'aide du logiciel STATXACT mis à notre disposition par H. RAYMONDAUD (CFPPA-Pixérécourt). Le test H de Kruskal Wallis (HOLLANDER et WOLFE, 1973) a été utilisé pour traiter les données avec catégories ordonnées, et le test CHI-DEUX dans le cas des données de type présence-absence.

## II.- RESULTATS ET DISCUSSION

**A.- Caractères trophiques d'adaptation à l'environnement racinaire du blé.** L'analyse en composantes locales répartit les souches de *B. polymyxa* en sept classes principales, structurant plus de 90 % des 126 individus testés. La composition de chaque classe en fréquence de souches avec les caractères distinctifs est présentée dans le tableau XIV. Il apparaît, comme dans l'étude de diversité du chapitre précédent, que la distribution des souches dans les classes est fortement corrélée avec leur niche écologique d'origine. La majorité des souches isolées du rhizoplan (98 %) se trouvent dans les classes 5, 8 et 9. Les classes 8 et 9 étant spécifiques puisqu'ils contiennent exclusivement les souches du rhizoplan. Les souches du sol non rhizosphérique sont contenues principalement dans les classes 1 et 4. Enfin, les souches du sol rhizosphérique sont incluses essentiellement dans les classes 3, 5 et 10. La classe 5 contient à la fois les souches du sol rhizosphérique et du rhizoplan.

Au delà de la répartition des souches dans les différents neurones, l'analyse en composantes locales permet de faire l'hypothèse que les classes particulières 8 et 9 contiennent les souches les plus adaptées à la racine de blé. Ainsi, le phénotype exprimant l'utilisation du sorbitol peut être identifié comme l'un des caractères d'adaptation.

Tableau XIV.- Fréquence des souches de *B. polymyxa* de chaque compartiment (SNR, SR, RP) dans les différentes classes (4, 1, 3, 10, 5, 9, 8) avec leurs caractères distinctifs. Le nombre de souches étudiées figure entre parenthèses.

Compartiments étudiés	Classes						
	4	1	3	10	5	9	8
SNR (29)	28*	52	3	0	7	0	0
SR (37)	8	8	27	24	24	0	0
RP (60)	0	0	0	2	42	28	28
Caractères phénotypiques	RHA MDM	MDX	MDM GEL	MDX GEL	GEL	SOR MDX	SOR

SNR : sol non rhizosphérique; SR : sol rhizosphérique; RP : rhizoplan.

\* 28 % des souches parmi 29 du SNR sont classées dans le neurone 4.

RHA : L-Rhamnose; MDM :  $\alpha$ -Méthyl-D-Mannoside; MDX :  $\beta$ -Méthyl-D-Xyloside; GEL : Gélatine; SOR : Sorbitol.

Cependant, on peut également noter que si la racine de blé a sélectionné le phénotype sorbitol, elle a aussi contre sélectionné d'autres phénotypes tels que l'utilisation de L-rhamnose et de  $\alpha$ -méthyl-D-mannoside, puisque leur fréquence plus élevée dans les souches du sol non rhizosphérique diminue dans celles du sol rhizosphérique pour disparaître complètement parmi les souches du rhizoplan (Tableau XV). Par ailleurs, la production de protéase (liquéfaction de la gélatine) semble être un caractère d'adaptation à l'environnement racinaire, alors que l'utilisation de  $\beta$ -méthyl-D-xyloside n'est pas discriminante pour l'ensemble des souches de *B. polymyxa*, bien qu'une forte proportion de souches du sol non rhizosphérique soient capables d'utiliser ce glucide. De plus, le test d'acidification de  $\beta$ -méthyl-D-xyloside nous semble peu précis à cause de son caractère instable, comme cela a été mentionné lors de l'identification des souches. On notera que la méthode d'analyse en composantes locales montre, comme celle de la classification hiérarchique par le système API-bioMérieux, que la répartition des souches est corrélée avec leur origine écologique (sol non-rhizosphérique, sol rhizosphérique et rhizoplan). Cependant, l'analyse en composantes locales a apporté un élément supplémentaire par rapport à l'analyse classificatoire, puisqu'elle permet d'affecter aux différents groupes de souches les caractères différentiels.

Dans ce tableau XV sont rassemblés les phénotypes variables mis en évidence par l'analyse en composantes locales et l'analyse du dendrogramme (Chapitre 2). La plupart de ces phénotypes ont déjà été commentés, nous ajouterons simplement qu'il apparaît ici que le xylitol semble être sélectionné, comme le sorbitol mais à un degré plus faible, par la racine de blé. La réduction des nitrates en  $N_2$  étant un marqueur de la vie rhizosphérique au même titre que la l'activité gélatinase. **Toutes ces variations phénotypiques semblent attester d'une sélection de la population de *B. polymyxa* lorsqu'elle est soumise au crible de la racine. Le résultat de la pression de sélection exercée par les racines du blé pourrait être l'adaptation de la population de *B. polymyxa* à cet environnement. Le sorbitol nous paraît être un élément déterminant dans cette sélection, et dans une moindre mesure le xylitol. Ces deux polyols ont un point commun, c'est d'être catabolisé par une même enzyme : la sorbitol déshydrogénase (CHALUMEAU, 1975).**

Tableau XV.- Pourcentages des souches positives aux tests biochimiques dans les compartiments de sol non rhizosphérique (SNR) et rhizosphérique (SR) et le rhizoplan (RP). Le nombre de souches testées figure entre parenthèses.

Caractères biochimiques	Compartiments étudiés		
	SNR (32)	SR (37)	RP (60)
$\alpha$ -méthyl-Mannoside	41	34	0
L-Rhamnose	31	13	0
$\beta$ -méthyl-Xyloside	72	58	28
Nitrate*	12	71	45
Gélatine	9	76	53
Sorbitol	0	0	88
Xylitol	0	0	12

Les différents tests biochimiques proviennent des galeries API 50 CHB et 20 B.

\* Nitrate : réduction des nitrates en  $N_2$ .

Toutefois, aucun de ces glucides n'a été décrit parmi les composés exsudés par le blé. On peut penser a posteriori, au vu de nos résultats, que les méthodes d'analyse et de dosage souvent utilisées n'étaient pas assez sensibles pour permettre leur détection. De nombreux travaux, utilisant des méthodes enzymatiques plus spécifiques et de la chromatographie ionique plus sensible, ont rapporté la présence de sorbitol dans les feuilles de Rosaceae où il constitue le produit majeur de la photosynthèse, transloqué par la suite dans les fruits (ANDERSON et al., 1962; WEBB et BURLEY, 1962). Le sorbitol a été également trouvé dans les racines de *Plantaginaceae* sous sa forme monomérique assurant une fonction d'osmorégulation, notamment

en réponse à un stress salin (BRIENS et LARHER, 1983). De même, le sorbitol a été détecté dans les graines de maïs où il pourrait être, d'après les auteurs, un précurseur d'une grande partie des réserves d'amidon et de polysaccharides des parois (CAREY et al., 1982).

Nous avons donc cherché à détecter la présence du sorbitol et éventuellement du xylitol dans les exsudats de jeunes plantules de blé cultivées en milieu hydroponique, en conditions stériles. Un traitement de plante inoculée avec une souche de *B. polymyxa* de chaque compartiment a été également effectué pour mimer une microflore bactérienne connue pour influencer sur la quantité et la nature des exsudats (voir le détail du dispositif expérimental en annexe). L'analyse des composés exsudés, effectuée en HPLC, a été réalisée par A. HEYRAUD (CERMAV-CNRS, Grenoble). Les résultats ne révèlent malheureusement la présence ni du sorbitol ni du xylitol (Tableau XVI). Toutefois, on note l'existence de composés classiquement trouvés dans les exsudats de blé mais aussi un composé particulier : le panose trimère ramifié de glucose (Tableau XVI). Ces composés diminuent ou disparaissent totalement dans les traitements inoculés par les souches *B. polymyxa* PMD75 du sol non-rhizosphérique et *B. polymyxa* PMD 216 du rhizoplan (résultats non reportés).

Tablea XVI.- Glucides trouvés dans les exsudats du blé.

	Plantule stérile de blé de 7 jours	Données de la littérature*
Glucose	+	+
Fructose	+	+
Maltose	+	+
Xylose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Arabinose	+	+
Ribose		+
Rhamnose		+
Panose	+	
Sucres réduits et:ou cyclitols	+	

\* D'après LESPINAT et BERLIER (1975)

Une attention mérite également d'être portée sur les caractères que nous avons qualifié de marqueurs d'adaptation à l'environnement rhizosphérique. Il s'agit de l'activité gélatinase et de la réduction des nitrates en azote moléculaire  $N_2$  (Tableau XV). En effet, la liquéfaction de la gélatine correspond à une production de protéases extracellulaires active par les souches bactériennes concernées. Ces protéases jouent un rôle important dans la dégradation des protéines des graines et exsudats des plantes (VANCURA et HANZLIKOVA, 1972), par les bactéries rhizosphériques qui assimilent ainsi les acides aminés nécessaires à leur croissance. L'effet stimulant des racines sur les bactéries protéolytiques a déjà été rapporté par VAGNEROVA et MACURA (1974). Les *B. polymyxa* produisent essentiellement des métaloprotéases car elles sont activées par les ions  $Zn^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  et inhibées par des complexants de ces ions tel que l'EDTA (FOGARTY et GRIFFIN, 1973a). Les métaloprotéases utilisent une large gamme de peptides et protéines comme substrats, et aucune spécificité n'a jusqu'ici été démontrée (MOHINARA, 1974), mais il est probable que l'on soit en présence de plusieurs types de protéase. C'est dans ce contexte que de nombreuses protéases à spectre d'action parfois réduit ont été mis en évidence chez *B. polymyxa*. La dispace est capable de disperser certaines lignées cellulaires de mammifères (MATSUMURA et al., 1975; NAGATA et MATSUMURA, 1986), et une autre protéase digère la myosine, protéine courante des cellules d'eucaryotes (MORITA et YASUI, 1973). Plus récemment, une lyse des cellules de *Escherichia coli* par des surnageants de culture de *Bacillus*, comprenant la souche type de *B. polymyxa* ATCC 842, a été rapportée (DEAN et WARD, 1991). Cette activité lytique semblait corrélée avec la capacité protéolytique des souches, ce qui conduit ces auteurs à conclure au rôle probable des protéases dans la lyse des cellules de *E. coli*. Dans un tout autre registre, une équipe polonaise a purifié deux protéases neutres extracellulaires de deux souches *B. polymyxa* D/13 K-1 et ATCC 10401 produisant respectivement les antibiotiques polymyxine E et polymyxine D (WOYCZIKOWSKA et al., 1973). Les deux protéases ont décomposé la polymyxine E mais se sont avérées sans action sur la polymyxine D. Tous ces travaux suggèrent que les protéases de *B. polymyxa* pourraient être impliquées dans les mécanismes de compétitivité dans la rhizosphère à savoir : utilisation de protéines comme source de nutriments, antagonisme vis à vis d'autres bactéries du sol et autoprotection contre des molécules antagonistes qu'ils produisent, telle que la polymyxine. **Les souches protéolytiques de *B. polymyxa* sélectionnées par les racines de blé seraient partiellement plus compétitives que les souches du sol non-rhizosphérique.**

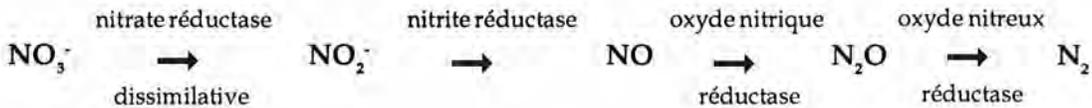
En ce qui concerne la réduction des nitrates en  $N_2$  qui correspond à la dénitrification, elle est démontrée de façon indirecte. En effet, le test de la galerie API 20 B sur lequel repose nos observations est destiné à la mise en évidence de la réduction des nitrates ( $KNO_3$ ) en nitrites, lesquels sont révélés par le développement de la coloration rouge consécutive à l'addition du réactif de Griess. L'absence de coloration, après que l'on se soit assuré de la disparition des nitrates par adjonction du zinc (réducteur), traduit que la bactérie a réduit les nitrates au delà du stade nitrites. Deux voies sont alors possibles au niveau de la bactérie (KNOWLES, 1982; KOREISHI et HINO, 1984; TIEDJE, 1988; RICE et TIEDJE, 1989). Il s'agit de :

- la réduction assimilative au cours de laquelle les nitrates sont réduits en nitrites puis en ammonium qui rentre dans la production d'acides aminés. La chaîne de réaction peut être schématisée de la façon suivante:



Cette même chaîne de réaction correspond également à la réduction dissimilative anaérobie mixte (respiratoire et fermentaire) régulée par l'oxygène, alors que la réduction assimilative est quand à elle inhibée par l'ammonium,

- la dénitrification, également réduction dissimilative, est un processus métabolique purement respiratoire et strictement anaérobie, au cours duquel les nitrates ou nitrites premiers accepteurs d'électrons sont réduits en produits azotés gazeux selon la chaîne de réaction suivante:



Dans notre cas, les conditions partiellement anaérobies du test, la consommation des nitrates et des nitrites et la présence de gaz dans les tubes suggèrent fortement que la dénitrification soit le mécanisme en jeu. De plus, *B. polymyxa* est une bactérie anaérobie facultative qui peut exploiter la dénitrification comme processus respiratoire relayant la respiration aérobie. Récemment, la capacité dénitrifiante de *B. polymyxa* a été clairement établie par MUNCH (1991). Cet auteur a montré que l'oxygène influait sur la production par la souche de *B. polymyxa* S55 des oxydes nitreux, NO et N<sub>2</sub>O. Par ailleurs, des résultats préliminaires de l'étude de la dénitrification de la souche type de *B. polymyxa* ATCC 842 et la souche *B. polymyxa* CF43 semblent montrer que les deux bactéries possèdent l'enzyme N<sub>2</sub>O-réductase, puisque l'adjonction de l'acétylène entraîne l'accumulation du N<sub>2</sub>O dans le milieu de culture. L'acétylène inhibant, par compétition la réduction du N<sub>2</sub>O en N<sub>2</sub>, en raison de l'analogie structurale des deux substrats. Ce travail qui se poursuit actuellement, a été réalisé en collaboration avec R. LENS (Laboratoire d'Ecologie Microbienne du Sol, Université de Lyon I, URA CNRS- 1450).

L'intérêt de l'aptitude dénitrifiante des bactéries réside dans le fait qu'elles sont capables de s'adapter à la pression de sélection imposée par l'environnement rhizosphérique des plantes, qui constitue un milieu assez pauvre en oxygène. A ce titre, la proportion plus importante de souches dénitrifiantes de *B. polymyxa* isolées du rhizoplan peut être corrélée avec le fait que sur le rhizoplan une compétition pour l'oxygène est supérieure à celle qui prévaut dans le sol.

**B. - Cellulolyse.** La cellulose, homopolymère de  $\beta$ -1,4-D-glucoses, est le polysaccharide le plus répandu dans la nature. Elle constitue la principale macromolécule glucidique des parois cellulaires des végétaux.

Les enzymes cellulolytiques (exo et endo  $\beta$ -1,4-glucanases, et  $\beta$ -D-glucosidase ou cellobiase) sont certainement importantes pour les microorganismes telluriques, quand on sait que 20 % de photosynthétats d'une plante sont relargués par les racines sous formes de débris des cellules du cortex, de mucilage et d'exsudats solubles. La dégradation de ces macromolécules par les enzymes extracellulaires comme les cellulases, les lipases et les protéases (paragraphe précédent) conduit à la libération de composés de faible poids moléculaires qui servent de nutriments à la microflore tellurique (pour revue, CURL et TRUELOVE, 1986). AHMADE et BAKER (1987) ont rapporté qu'un mutant de *Trichoderma harzianum*, hyperproducteur de cellulase, colonisait mieux les racines de blé que la souche sauvage. C'est dans ce contexte que nous avons voulu comparer la capacité cellulolytique de nos souches en fonction de leur compartiment d'isolement.

Les *B. polymyxa* produisent des enzymes cellulolytiques (FOGARTY et GRIFFIN, 1973a). De plus, les gènes de la cellobiase et de l'endo- $\beta$ -1,4-glucanase de *B. polymyxa* ont déjà été identifiés et clonés avec succès chez *Escherichia coli* (GONZALEZ-CANDELAS et al., 1989; BAIRD et al., 1990). Nous avons cherché à vérifier si les souches de *B. polymyxa* pouvaient différer, en proportion dans les trois compartiments d'isolement, pour leur aptitude à produire des enzymes cellulolytiques. Pour cela, nous avons utilisé de préférence une cellulose soluble et facilement dégradable, la carboxyméthylcellulose, car les cellulases de *B. polymyxa* semblent majoritairement liées à la paroi cellulaire et très peu excrétées dans le milieu (BAIRD et al., 1990).

Les résultats montrent que toutes les souches, quel que soit le compartiment d'isolement, présentent une activité carboxyméthylcellulasique (Tableau XVII-A), avec des diamètres similaires de lyse (Photo 2). La souche cellulolytique *Cellulomonas uda* 20108 a donné un diamètre de lyse deux fois plus important. L'activité cellulolytique détectée par la carboxyméthylcellulose n'est pas discriminante pour les souches du sol et de la rhizosphère. Cependant, l'activité carboxyméthylcellulasique ne reflète pas l'efficacité des souches pour la dégradation de la cellulose native, de nature plutôt microcristalline. De plus, les souches de *Bacillus polymyxa* ne sont pas connues pour être de véritables cellulolytiques contrairement à celles appartenant au genre *Cellulomonas*. Nous avons pu montrer, en utilisant une cellulose plus cristallisée (la MN300), que le pouvoir dégradant des souches de *B. polymyxa* est beaucoup moins élevé que celui de la souche de *cellulomonas uda* 20108 (Tableau XVII-B). Les zones de lyses causées par *B. polymyxa* paraissent nettement plus réduites. De plus, certaines souches du sol non rhizosphérique et rhizosphérique ayant exhibées une activité carboxyméthylcellulasique ne dégradaient visiblement pas la MN300. Les deux souches du rhizoplan donnant des zones de lyse plus nettes. **L'activité cellulolytique en relation avec d'autres enzymes telles les pectinases peut permettre aux souches de *B. polymyxa* les plus proches des racines, comme celles du rhizoplan, d'utiliser les macromolécules glucidiques présents dans cet**

Tableau XVII.- Etude de l'activité cellulolytique des souches de *B. polymyxa* du sol non rhizosphérique (SNR), du sol rhizosphérique (SR) et du rhizoplan (RP).

Les souches bactériennes sont ensemencées en 4 points équidistants sur milieu gélosé contenant de la carboxyméthylcellulose **A** ou de la MN300 **B**. Les diamètres de lyse sont mesurés après une période d'incubation de 48h à 30 °C.

\* 20108 est la souche type cellulolytique de *Cellulomonas uda* de la collection allemande DSM.

**A**

Compartiments étudiés	Nombre de souches testées	(%) souches positives	Diamètre moyen de lyse (mm)
SNR	29	100	18,8
SR	37	100	17,0
RP	60	100	17,4
20108*			35,0

**B**

Souches	Origine	Diamètre de lyse (mm)
51	SNR	0
75	SNR	2
85	SNR	2
101	SR	0
105	SR	0
110	SR	0
200	RP	3
220	RP	4
240	RP	3
20108*	DSM*	8

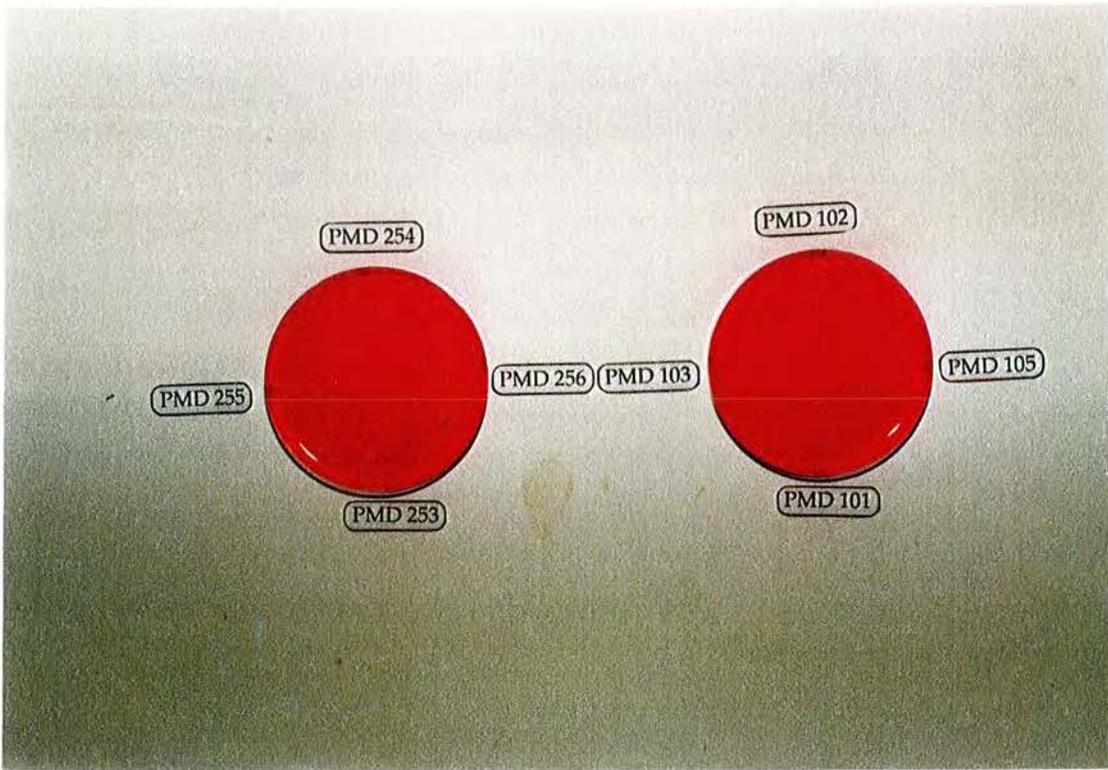


Photo 2. Recherche du pouvoir cellulolytique des souches de *B. polymyxa*. Mise en évidence des zones de lyse après 48 heures de croissance à 30 °C.

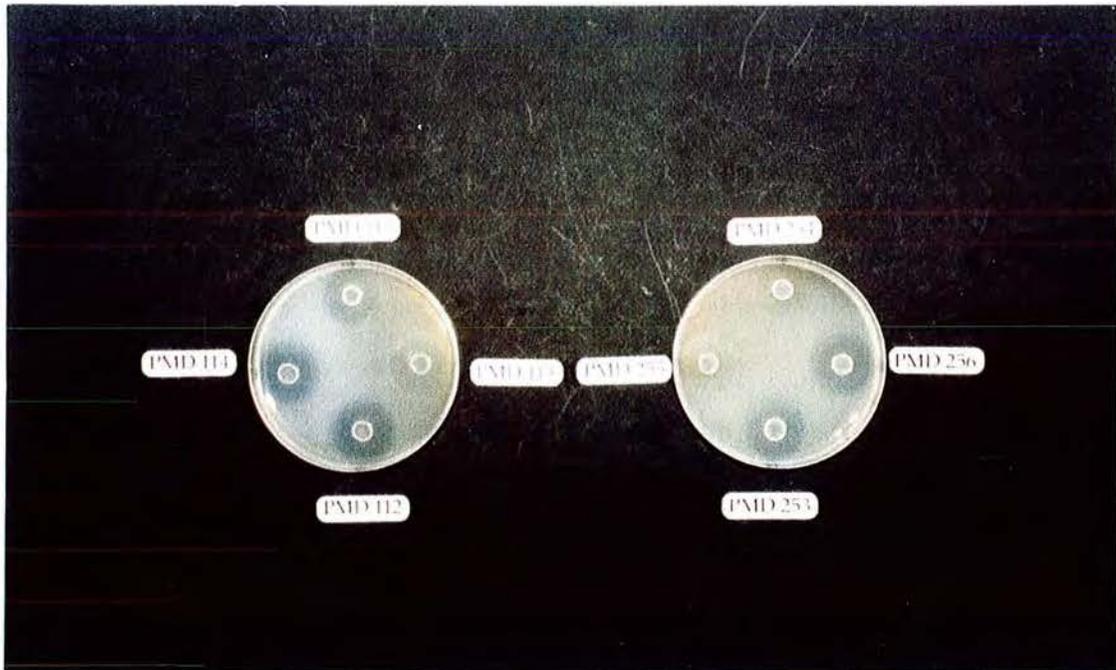


Photo 3. Recherche du pouvoir pectinolytique des souches de *B. polymyxa*. Mise en évidence des zones de lyse après 48 heures de croissance à 30 °C.

**environnement.**

**C. - Pectinolyse.** Les substances pectiques sont des macromolécules glucidiques d'origine exclusivement végétale, ou elles participent à l'organisation de la lamelle moyenne et de la paroi primaire en formant un ciment qui lie les cellules les unes aux autres. Elles constituent, à ce titre, une barrière de protection. C'est pour ces raisons que les enzymes pectinolytiques des rhizobactéries pourraient leur permettre de pénétrer les cellules du cortex de la racine et coloniser ainsi l'endorhizosphère.

Pour tester la capacité pectinolytique de nos souches, nous avons tout d'abord utilisé une pectine peu méthylée qui permet la mise en évidence des enzymes de dépolymérisation (polygalacturonases et pectines-transéliminases). Les résultats obtenus montrent que toutes les souches de *B. polymyxa*, quel que soit le compartiment d'isolement, présentent une activité dépolymérisante de la pectine en milieu gélosé, au même titre que la souche type pectinolytique de *Erwinia chrysanthemi* DSM 30179 (Photo 3). Le diamètre des zones de lyse est dans l'ensemble équivalent (Tableau XVIII). LAJUDIE et DUMANOIR (1976) ont rapporté des résultats similaires avec 13 souches de *B. polymyxa* de la collection de l'Institut Pasteur, en utilisant le même substrat. Cependant, le test sur milieu gélosé ne permet pas de distinguer les souches selon leur niveau d'attaque de la pectine.

Tableau XVIII.- Etude de l'activité pectinolytique des souches de *B. polymyxa* du sol non rhizosphérique (SNR), du sol rhizosphérique (SR) et du rhizoplan (RP).

Les souches bactériennes sontensemencées en 4 points équidistants sur milieu gélosé contenant de la pectine faiblement méthylée "ruban rouge", qui permet la mise en évidence d'enzymes de dépolymérisation. Les diamètres de lyse sont mesurés après une période d'incubation de 48 h à 30 °C.

Compartiments étudiés	Nombre de souches testées	(%) souches positives	Diamètre moyen de lyse (mm)
SNR	29	100	15,7
SR	37	100	14,5
RP	60	100	15,6
30179*			13,0

\* 30179 est la souche type pectinolytique de *Erwinia chrysanthemi* de la collection allemande DSM.

Il nous a semblé intéressant d'évaluer les niveaux d'activité pectinolytique en milieu liquide. En effet, de nombreux travaux ont montré que les souches de *B. polymyxa* excrètent dans le milieu extracellulaire d'importante quantité d'enzymes pectinolytiques de type endo, notamment la pectate lyase encore appelée transéliminase (NAGEL et VAUGHN, 1961; NAGEL et WILSON, 1970).

Les résultats des mesures des activités de la pectate lyase sont données dans le tableau XIX. Il y a une diversité dans les niveaux d'activité de la pectate lyase. La souche *Erwinia chrisanthemi* DSM 30179 possède l'activité la plus faible. Ce résultat est surprenant, puisque cette souche est connue pour excréter de grandes quantités de pectate lyase dans le milieu extracellulaire. Il est probable que la température de 30 °C, au lieu de 28 °C, appliquée pour sa croissance soit la cause de cette faible production enzymatique. Une souche de *B. polymyxa* isolée du sol non-rhizosphérique et deux souches du sol rhizosphérique présentent les activités les plus élevées, alors que les deux souches du rhizoplan ont des activités deux fois plus faibles. Ces résultats laissent penser que les activités pectate lyases plus faibles des souches du rhizoplan éviteraient une destruction trop importante des racines de la plante et empêcheraient ainsi l'établissement d'une relation de type pathogène. En effet, il convient de souligner qu'une pathogénicité de *B. polymyxa* a déjà été décrite chez la pomme de terre et la tomate (JACKSON et HENRY, 1946; CARUSO et al., 1984). Il n'est pas impossible que les enzymes pectinolytiques produites par *B. polymyxa* en soient la cause, car ces enzymes sont impliquées dans de nombreux cas de pathogénicité (COLLMER et KEEN, 1986). Cependant à l'état actuelle de nos connaissances nous ne pouvons établir la relation entre la pectinolyse et l'adaptation à l'environnement racinaire. On peut signaler le rôle nutritionnel des enzymes pectinolytiques bactériennes, puisque des souches de *B. polymyxa* et d'*Azospirillum irakense* sont capables de fixer l'azote de l'air en présence de la pectine comme seule source de carbone KHAMMAS (1991).

**D. - Chitinolyse.** Les parois cellulaires d'un grand nombre de champignons phytopathogènes contiennent de la chitine, un polymère de N-acétyl-D-glucosamine (CHET et HUTTERMANN, 1980; SIVAN et CHET, 1989). Plusieurs travaux, portant sur l'étude du contrôle biologique de pathogènes ont rapporté le rôle important joué par des enzymes chitinolytiques d'origine bactérienne, dans la protection des plantes (CHET et al., 1991). CAMPBELL (1983) ainsi que CAMPBELL et EPHGRAVE (1983) ont montré une lyse des hyphes mycéliens du champignon *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*, agent causal du piétin échaudage du blé, par des *Bacillus*, suivi d'une réduction importante de la maladie. Les bactéries pectinolytiques peuvent donc être considérées comme de bonnes de bon compétiteur dans la rhizosphère des plantes.

Nous avons évalué la capacité chitinolytique de nos souches par la mesure de l'activité de la chitobiase. L'activité chitobiasique de divers genres bactériens a été corrélée avec leur aptitude à dégrader la chitine sur milieu gélosé (O'BRIEN et COLWELL, 1987). De plus, ces auteurs ont montré que le test chitobiasique était plus sensible, puisque des souches incapables de dégrader la chitine en milieu gélosé se sont avérées positives pour l'activité chitobiasique.

Tableau XIX.- Activité de la pectate lyase de 6 souches de *B. polymyxa* du sol non-rhizosphérique (SNR), sol rhizosphérique (SR) et du rhizoplan (RP).

Souches	Origine	Absorbance (205 nm)	Protéines (mg/l)	AS-PL*	IC
PMD65	SNR	0,622	22,8	11,89 <sup>b</sup>	[11,62 ; 11,91]
PMD66	SNR	1,106	16,7	28,85 <sup>d</sup>	[28,84 ; 28,91]
PMD112	SR	0,643	13,7	20,35 <sup>c</sup>	[20,30 ; 20,37]
PMD128	SR	1,307	17,5	32,41 <sup>d</sup>	[32,40 ; 32,42]
PMD216	RP	0,428	17,2	10,86 <sup>b</sup>	[10,81 ; 10,88]
PMD230	RP	0,343	14,4	10,33 <sup>b</sup>	[10,31 ; 10,34]
CF43*	Blé	0,453	6,6	29,7 <sup>d</sup>	[29,51 ; 29,90]
30179*	DSM*	0,279	19,1	6,33 <sup>a</sup>	[6,32 ; 6,37]

L'activité pectate lyase des extraits enzymatiques du surnageant de culture des souches est dosée en présence du substrat acide polygalacturonique.

\* AS-PL : Activité spécifique de la pectate lyase qui correspond à la quantité d'enzyme produisant une micromole de composé galacturonique insaturé par minute et par mg de protéine. Les valeurs représentent les médianes de 3 répétitions dont les intervalles de confiance (IC) sont donnés à 95 %.

CF43 : est la souche de *B. polymyxa* isolée de la rhizosphère du blé par T Heulin.

La souche type d'*Erwinia chrysanthemi* 30179 provient de la collection allemande (DSM).

a, b, c, d : les chiffres affectés de lettres différentes sont issus d'échantillons de distributions significativement différentes au risque 5 % (Test de Kolmogorov-Smirnov).

Les résultats montrent que les souches du rhizoplan sont les plus actives et toutes sont chitobiasique positive (Tableau XX). Dans le sol non-rhizosphérique et rhizosphérique la proportion des souches chitobiasique positive est respectivement de 72,5 % et 81,1 %, et l'on note la présence de souches dépourvues de l'activité chitobiasique. La différence est statistiquement significative ( $p < 0,001$ ) entre les compartiments rhizoplan et sol non rhizosphérique.

Les souches de *B. polymyxa* du rhizoplan, de par leur activité chitinolytique plus élevée et plus fréquente, pourraient être plus antagonistes vis à vis de champignons phytopathogènes que les souches du sol non-rhizosphérique. Toutefois, il serait intéressant de relier l'activité chitobiasique au pouvoir antifongique des souches.

Tableau XX.- Pourcentages des souches de *B. polymyxa* positives pour l'activité chitinasique dans les compartiments de sol non rhizosphérique (SNR) et rhizosphérique (SR) et le rhizoplan (RP).

Compartiments étudiés	Nombres de souches testées	+++	++	+	-	(%) souches positives
SNR	29	7	6	8	8	72,5 <sup>a</sup>
SR	37	10	13	7	7	81,1 <sup>a</sup>
RP	60	31	20	9	0	100 <sup>b</sup>

Le test est réalisé avec des colonies bactériennes appliquées sur papier filtre. L'activité chitobiasique est évaluée par l'intensité de la fluorescence résultant de la libération de la méthylombelliférone. +++ Fortement positive; ++ moyennement positive; + Faiblement positive; - négative.

a, b : ces pourcentages sont issus d'échantillons de distributions significativement différentes au risque 0,1 % (Test de Kruskal-Wallis avec catégories ordonnées).

**E. - Effet antifongique.** De nombreux microorganismes sont antagonistes de pathogènes de plantes. Nous avons recherché le pouvoir inhibiteur des souches de *B. polymyxa* vis à vis du champignon *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* (Ggt.) un agent pathogène responsable du piétin échaudage du blé, dont les dégâts importants causent parfois des pertes considérables de rendements des cultures (LUCAS et al., 1989). Le test d'inhibition a été réalisé *in vitro*, en boîte de Pétri.

La majorité des souches de *B. polymyxa* testées inhibent la croissance du *Ggt* (Photo 4) Cependant, la proportion de souches antagonistes varie en fonction du compartiment d'isolement (Tableau XXI). Le pourcentage augmente au fur et à mesure que l'on s'approche de la racine. Toutes les souches du rhizoplan sont actives vis à vis du champignon, et la différence est statistiquement significative entre le rhizoplan et le compartiment du sol non rhizosphérique. Il convient de noter l'existence d'une corrélation entre l'aptitude chitinolytique et le pouvoir antifongique, puisque toutes les souches chitinolytiques inhibent le *Ggt* et certaines souches non chitinolytiques n'inhibent pas non plus ce champignon (Annexe 2). Cependant, quelques souches non chitinolytiques se sont avérées inhibitrices du *Ggt*, ce qui suggère l'intervention d'autres mécanismes antagonistes. Cette observation corrobore les différences observées dans la variation de l'effet inhibiteur selon le milieu utilisé. En effet, si certaines souches sont antagonistes dans les deux milieux PDA et King B, d'autres ne le sont que dans l'un des deux (Annexe 2).

Tableau XXI. Proportion des souches antagonistes vis à vis du champignon *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*, dans les compartiments de sol non rhizosphérique (SNR), de sol rhizosphérique (SR) et du rhizoplan.

Compartiments étudiés	Nombre de souches testées	+	-	(%) souches antagonistes
SNR	29	21	8	72,5 <sup>a</sup>
SR	37	34	3	92 <sup>b</sup>
RP	60	60	0	100 <sup>b</sup>

Le test d'inhibition est réalisé in vitro sur milieu PDA (potato dextrose agar) et King B. Les diamètres d'inhibition sur chacun des milieux sont reportés en annexe. Une souche est déclarée négative si aucune zone d'inhibition n'est observée sur les deux milieux à la fois.

a, b : ces pourcentages sont issus d'échantillon de distributions significativement différentes (Test du CHI-carré).

L'explication de cette observation réside sans doute dans la différence de composition de ces milieux induisant des mécanismes différents. En effet, on sait par de nombreux travaux (KLOEPPER et al., 1980a) que le milieu B de King pauvre en fer provoque une compétition entre les microorganismes pour ce substrat. Ainsi, les bactéries capables de produire des chélateurs de fer encore appelés sidérophores, immobilisent la faible quantité disponible de fer ferrique, le rendant ainsi inaccessible pour les autres microorganismes. Le fer est un élément essentiel pour la germination des spores et la croissance des champignons (ELAD et BAKER, 1985). Les souches inhibitrices du champignon dans le milieu B de King

alors qu'elles ne sont pas inhibitrices dans le PDA (un milieu riche en fer), pourraient l'être par production de sidérophores (KLOEPPER et al., 1980b; VANDENBERGH et al., 1983). A l'inverse, les souches qui ne sont inhibitrices que sur PDA produiraient d'autres substances inhibitrices tels les antibiotiques (THOMASHOW et WELLER, 1988) ou les chitinases (voir paragraphe précédent). Pour les souches présentant une activité inhibitrice dans les deux milieux, la conjonction des différentes molécules (sidérophore, antibiotique et chitinase) pourrait y être impliquée (WELLER et COOK, 1988). Tous ces résultats sont parfaitement corrélés les uns les autres. Cependant, les expériences *in vitro* ne sont pas toujours en accord avec les résultats *in vivo*, et de loin avec ceux obtenus *in situ* (BROADBENT et al., 1971). UTKHETE et SHOLBERG (1986) ont montré que sur 24 isolats de *Bacillus subtilis* inhibiteurs *in vitro* de 14 champignons phytopathogènes, une moitié seulement reproduisait l'effet antagoniste *in vivo*. Ces travaux indiquent que dans les conditions naturelles interviennent d'autres facteurs biotiques et abiotiques non pris en compte en milieu contrôlé (HORNBY, 1979). Toutefois, nos résultats semblent indiquer l'existence d'une corrélation entre la fréquence élevée des souches inhibant *in vitro* le *Ggt* et leur présence à la proximité racinaire, ce qui va dans le sens d'une plus forte compétitivité de ces souches par rapport à celles du sol non-rhizosphérique. La relation entre les souches isolées du rhizoplan et les racines de blé serait donc plus bénéfique pour les deux partenaires.



Photo 4. Inhibition du champignon *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* par des souches de *Bacillus polymyxa* sur milieux PDA et B de King.

### III. - CONCLUSION

L'utilisation de la méthode d'analyse en composantes locales est en parfaite cohérence avec les études de diversité par l'analyse de similarité ou de divergence. La population de *B. polymyxa* se répartit selon l'origine écologique d'isolement. La racine de blé exerce effectivement une pression de sélection sur la population de *B. polymyxa* du sol, puisque sa présence entraîne des variations phénotypiques notables. Une «sous population» du compartiment racinaire se distingue par ses propriétés biochimiques et physiologiques. L'utilisation du sorbitol semble être le caractère le plus important dans le processus de sélection par les racines de blé et donc de l'adaptation des souches de *B. polymyxa* à cette niche écologique. La présence de ce glucide n'a pu être décelée dans les exsudats de jeunes plantules de blé stériles ou inoculées par les souches de *B. polymyxa*. Il serait intéressant de rechercher le sorbitol dans les fractions racinaires et sur des plantes à l'âge correspondant aux plantes utilisées lors de l'isolement des souches, c'est à dire trois semaines. Enfin, d'une manière générale la proximité de la racine de blé (rhizoplan et sol rhizosphérique) conduit, dans une échelle de temps relativement courte, à l'expression plus fréquente et plus active chez les souches de *B. polymyxa* de caractères phénotypiques (trophiques et compétitifs) particuliers, mais en même temps à l'extinction d'autres caractères.

## *CONCLUSIONS GÉNÉRALES*



## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de l'adaptation des bactéries telluriques à l'environnement racinaire des plantes. Cette recherche a été motivée par l'utilisation, ces vingt dernières années, des bactéries pour l'inoculation des plantes d'intérêt agronomique afin d'augmenter leur rendement. La connaissance de l'écologie de la bactérie à apporter à la plante est vite apparue comme une nécessité suite à la variabilité des résultats de l'inoculation.

### *Choix du modèle*

Nous avons fait le choix du tandem Blé-*B. polymyxa* pour la particularité émanant de cette association. En effet, *B. polymyxa* est l'espèce fixatrice d'azote dominante dans la rhizosphère du blé, et cette plante répond favorablement à l'inoculation par cette bactérie. D'autre part, *B. polymyxa* semble établir des relations spécifiques avec ses plantes hôtes. La nature de cette spécificité n'a pas encore été établie. Une étude réalisée au sein de l'Equipe d'Ecologie Microbienne a montré que l'espèce *B. polymyxa* était plus fréquente parmi les bactéries fixatrices d'azote dans la rhizosphère du blé alors que l'espèce *B. circulans* se rencontrait souvent dans la rhizosphère du maïs. La structure de la population de *B. polymyxa* (taille, propriétés sérologiques, phénotypes) variait peu d'un sol à l'autre. De plus, l'utilisation du ribose s'est révélée spécifique pour la population des *B. polymyxa* par rapport aux *B. circulans*. Ces résultats suggéraient la sélection par le blé de la population de *B. polymyxa* adaptée parmi la microflore diversifiée du sol. La recherche proposée dans ce travail visait à expliquer les modalités de cette sélection par la plante et l'adaptation de la population bactérienne concernée.

### *Démarche suivie*

Notre objectif était d'étudier l'adaptation des *B. polymyxa* à l'environnement racinaire du blé. Nous avons choisi de mener cette étude à l'aide d'une "approche populationnelle" qui consiste à évaluer la diversité de la population isolée des racines par rapport à celle du sol. De cette comparaison, nous avons cherché à repérer les caractères variables en fonction de l'origine. Ces caractères d'adaptation devaient ensuite nous permettre de déduire les pressions de sélection exercées par les racines du blé.

### *Résultats prééminents*

Les résultats du premier chapitre concernent l'isolement et l'identification des souches de *B. polymyxa* du sol, en absence de plante, et de la rhizosphère que nous avons divisé en deux compartiments : le sol rhizosphérique (racines plus le sol y adhérent) et le rhizoplan (racines débarrassées de sol adhérent).

### *Isolement des souches de B. polymyxa*

L'absence de milieux sélectifs nous a conduit à mettre en oeuvre la méthode d'immunopiégeage utilisant comme piège les anticorps polyclonaux dirigés contre les épitopes d'une souche de *B. polymyxa*. Cette méthode s'est révélée spécifique, efficace, et rapide puisqu'une campagne d'isolement s'effectue en quatre jours. De plus, plusieurs échantillons pouvaient être traités simultanément. Ainsi, nous avons isolé 130 souches de *B. polymyxa* dans les trois compartiments étudiés : 32 souches du sol non-rhizosphérique, 38 du sol rhizosphérique et 60 du rhizoplan. Le facteur d'enrichissement était compris entre 10 et 500. L'approche quantitative de l'immunopiégeage permet d'estimer la population de *B. polymyxa* entre 2 et  $6 \times 10^5$  bactéries par g de matière sèche, ce qui représente environ 0,1 % de la microflore totale estimée entre 2 et  $4 \times 10^8$  bactéries par g de matière sèche. La méthode spécifique d'immunopiégeage constitue donc une bonne alternative pour l'isolement des populations bactériennes non dominantes dans le sol. Si la population de *B. polymyxa* ne semble pas importante par rapport à la microflore cultivable, elle est cependant dominante parmi les peuplements de fixateurs d'azote où elle constitue jusqu'à 50 % du total. La microflore fixatrice d'azote est stimulée par les racines de blé, puisqu'elle y est plus abondante que dans le sol (facteur 10). Les racines de blé semble également déplacer la population de *B. polymyxa*, mais l'effet racinaire est relativement faible (facteur 2). Ces résultats témoignent d'un effet quantitatif de la plante hôte sur la microflore fixatrice d'azote et dans une moindre mesure sur celle de *B. polymyxa*.

### *Position taxonomique des souches*

Le deuxième volet abordé dans le premier chapitre portait sur la confirmation de l'appartenance de nos souches à l'espèce *B. polymyxa*. De cette identification dépendait la suite de l'approche populationnelle de la diversité que nous proposons. L'ensemble des résultats de l'identification numérique par les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques et la caractérisation sérologique conduit indiscutablement au classement de nos souches dans l'espèce *B. polymyxa*. Il n'a pas été nécessaire de recourir à l'hybridation ADN-ADN pour confirmer nos résultats d'autant plus qu'au cours de l'étude du polymorphisme des fragments de restriction d'ADN dans le chapitre concernant la diversité, nous avons démontré la proximité de nos souches avec celle de la souche type de *B. polymyxa*, les souches types des espèces proches de *B. macerans* et *B. circulans* paraissant plus éloignées. Nos résultats permettent de conclure que les souches isolées dans ce travail appartiennent à l'espèce *B. polymyxa*. De ce fait, les trois «sous-populations» de *B. polymyxa* d'origine écologique différente se prêtent donc bien à l'étude de la diversité à l'intérieur d'une même espèce.

### *Visualisation de la diversité*

L'étude de la diversité a fait l'objet de notre second chapitre. Les principales observations sont les suivantes :

- La diversité des souches de *B. polymyxa* isolées du sol est nettement plus importante que celle des souches isolées des racines, et ce quels que soient les caractères étudiés (génétique, phénotypique ou sérologique).

- Du point de vue des caractères phénotypiques, les souches se répartissent de façon cohérente avec leur niche écologique d'origine. Les souches isolées des racines forment un groupe distinct excluant la présence des souches du sol.

- Les propriétés sérologiques indiquent que les souches isolées des racines possèdent une garniture antigénique plus homogène que celle des souches du sol, puisqu'elles présentent un niveau équivalent de réactivité en ELISA.

- Au niveau génétique, le polymorphisme des fragments de restriction d'ADN total, ou hybridés par une sonde chromosomique codant pour les ARN ribosomiques, fait apparaître un profil identique pour les souches isolées des racines alors que celui des souches provenant du sol varie d'une souche à l'autre. Ce résultat est d'autant plus intéressant que peu d'études ont décrit des variations au niveau des ARN ribosomiques connus pour être très conservés entre les individus d'une même espèce.

La principale conclusion à laquelle nous aboutissons au terme de ce chapitre est l'existence d'une diversité génétique sérologique et phénotypique de la population tellurique de *B. polymyxa*. Les trois niveaux de diversité sont corrélés avec la localisation des souches dans les trois compartiments étudiés. Cette diversité est plus élevée dans le sol puis diminue lorsque la population de *B. polymyxa* est soumise au crible de la racine. Les racines de blé exercent donc une pression de sélection sur la population de *B. polymyxa* du sol qui lui est associée.

#### *Potentialités d'adaptation des B. polymyxa à l'environnement racinaire du blé*

La pression de sélection exercée par les racines de blé sur la sous-population associée devrait se traduire au niveau de la bactérie par la présence de caractères d'adaptation à cette niche racinaire. L'étude de ces caractères traitée dans le troisième chapitre montre une différence dans les capacités trophiques des souches isolées des racines par rapport à celles du sol. Le fait le plus marquant est que la majorité des souches (90%) d'origine racinaire est capable d'utiliser le sorbitol comme source de carbone alors qu'aucune souche isolée du sol n'en possède pas l'aptitude. Ce phénotype peut être identifié comme un caractère d'adaptation à l'environnement racinaire du blé. D'autre part, la fréquence des souches capables de produire des enzymes hydrolytiques telles que les chitinases et d'inhiber la croissance du champignon *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*, agent pathogène responsable du piétin échaudage du blé, est plus élevée pour les souches isolées des racines. Par contre, certains phénotypes tels l'utilisation du rhamnose et du méthyl-manoside présents au sein des souches du sol disparaissent totalement parmi les souches isolées des racines. Ces caractères ne semblent pas importants dans l'adaptation aux racines. L'ensemble de ces faits nous permettent de conclure que la sous-population de *B. polymyxa* isolée des racines de blé semble plus adaptée à cette niche écologique que celle du sol.

### *Perspectives*

Ce travail est une contribution à l'étude de l'adaptation des bactéries du genre *Bacillus* à l'environnement racinaire des Graminées. L'approche populationnelle que nous avons développée a été rendue possible grâce à la méthode d'immnopiégeage, qui a également été utilisée avec succès pour l'isolement d'une centaine de souches de *B. polymyxa* de la rhizosphère du blé dur cultivé sur des sols algériens (GUEMOURI S., soutenance du diplôme de magistère en janvier 1992). Le modèle choisi a permis de montrer l'existence d'une diversité au sein de la population tellurique de *B. polymyxa*. La pression de sélection exercée par les racines de blé se traduit par une baisse de la diversité de la sous population de *B. polymyxa* isolée de cet environnement racinaire. Il est probable que cette diminution de la diversité soit un indice d'adaptation. L'utilisation du sorbitol semble être l'un des caractères d'adaptation à "court terme".

Les questions auxquelles nous aboutissons et les recherches qui en découlent sont les suivantes :

- Quels sont les mécanismes de cette adaptation? nous avons identifié le sorbitol et dans une moindre mesure le xylitol comme étant les caractères variables et spécifique à la sous-population isolée des racines. La recherche par les outils moléculaires sur l'expression des gènes contrôlant le métabolisme de ces glucides pourrait être envisagée. Au niveau de la plante, un effort devrait être porté sur la recherche dans les exsudats racinaires des composés identifiés aux phénotypes bactériens d'adaptation. De la même façon que nous avons mis en évidence des différences entre la sous-population isolée des racines et celle provenant du sol pour certaines activités enzymatiques et le pouvoir antagoniste vis à vis d'un champignon phytopathogène, des investigations devraient être faites sur d'autres caractères impliqués dans l'adaptation des bactéries à l'environnement racinaire tels le chimiotactisme vis à vis des exsudats, l'adhésion aux racines etc.

- L'adaptation à "court terme" telle que nous l'avons observée sur des jeunes plantules est-elle la même au cours du cycle annuel de la plante? la démarche que nous avons développée pourra être effectuée dans les différents stades de développement de la plante, germination, tallage, montaison, floraison et à la maturité. Les variations quantitatives et qualitative des exsudats au cours du développement de la plante pourrait modifier la structure de la population de *B. polymyxa*. La boucle pourra être fermée en étudiant également la phase de "minéralisation des racines" après récolte pendant laquelle les bactéries protéolytiques, cellulolytiques, pectinolytiques sont abondantes. Dans cette voie il serait intéressant d'analyser le contenu des plasmides qui portent souvent les gènes impliqués dans ces processus métaboliques ainsi que dans l'expression des caractères d'antagonisme telle la production d'antibiotiques et de bactériocines. Pour ce dernier caractère, une étude est en cours en collaboration avec M. et Mme PETITDEMANGE. Les résultats préliminaires semblent montrer que les souches de *B. polymyxa* isolées dans cette étude possèdent la capacité à produire des bactériocines et il apparaît une diversité entre les souches. Nous cherchons actuellement à croiser les souches entre elles afin de repérer une éventuelle spécificité suivant le compartiment d'isolement.

*RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES*



## Références bibliographiques

- ABDEL WAHAB A. M., 1975 - Nitrogen fixation by *Bacillus* strains isolated from the rhizosphere of *Ammophila arenaria*. **Plant & Soil**, **42**, 703-708.
- AHMADEJ. S. et BAKER R., 1987 - Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, **77**, 358-362.
- ALBERSHEIMP., NEUKOMH. et DEUEL H., 1960 - Über die bildung von ungesättigten abbauprodukten durch ein pektinabbauendes. **Enzym. Helv. Chim. Acta**, **43**, 1422-1426.
- ARSAC J. F. et CLEYET-MAREL J. C. - 1986. Serological and ecological studies of *Rhizobium* spp. (*Cicer arietinum* L.) by immunofluorescence and ELISA technique: Comparative ability for nodule formation between *Rhizobium* strains. **Plant & Soil**, **94**, 411-423.
- ASTRÖM B. et GERHARDSON B., 1988 - Differential reactions of wheat and pea genotypes to root inoculation with growth-affecting rhizosphere bacteria. **Plant & Soil**, **109**, 263-269.
- ATLAS R. M., 1984 - Diversity of microbial communities. **Adv. Microb. Ecol.**, **7**, 1-47.
- BACKHOUSE D. et STEWART A., 1989 - Interactions between *Bacillus* species and sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. **Soil Biol. Biochem.**, **21**, 173-176.
- BAIRD S. D., JOHNSON D. A. et SELIGY V., 1990 - Molecular cloning, expression, and characterization of endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Bacillus polymyxa* and *Bacillus circulans*. **J. Bacteriol.**, **172**, 1576-1586.
- BALANDREAU J., 1986 - Ecological factors and adaptive processes in N<sub>2</sub>-fixing bacterial populations of the plant environment. **Plant & Soil**, **90**, 73-92.
- BALANDREAU J., et KNOWLES R., 1978 - The rhizosphere. *In*: Interactions between nonpathogenic soil microorganisms and plants. DOMMERGUES Y. R. et KRUPA S. V. (Eds.) Elsevier Sci. Pub. Co., New York, 243-266.
- BALDANI V. L. D. et DÖBEREINER J., 1980 - Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biol. Biochem.**, **12**, 433-439.

- BAPTIST J. N., MANDEL M. et GHERNA R. L., 1978 - Comparative zone electrophoresis of enzymes in the genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**, 229-244.
- BARTOLI F., BURTIN G. et HERBILLON A. J., 1991. Disaggregation and clay dispersion of Oxisols: Na resin, a recommended methodology. *Geoderma* **49**, 301-317.
- BEJ A. K., McCARTY S. C. et ATLAS R. M., 1991 - Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex Polymerase Chain Reaction: Comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2429—2432.
- BELL C. R., CUMMINGS N. E., CANFIELD M. L. et MOORE L. W., 1990b - Competition of octopine-catabolizing *Pseudomonas* spp. and octopine-type *Agrobacterium tumefaciens* for octopine in chemostats. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2840-2846.
- BELL C. R., MOORE L. W. et CANFIELD M. L., 1990a - Growth of octopine-catabolizing *Pseudomonas* spp. under octopine limitation in chemostats and their potential to compete with *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2834-2839.
- BERGE O., 1984 - Effet de l'inoculation du blé par une bactérie fixatrice d'azote. DEA, ENSAIA, Nancy, 95 p.
- BERGE O., 1988 - Etude et inoculation des *Bacillus* fixateurs d'azote de la rhizosphère du maïs. Thèse Doct. I. N. P. L.-Nancy, 220 p.
- BERGE O., HEULINT et BALANDREAU J., 1991 - Diversity of diazotroph populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) growing on different French soils. *Biol. Fertil. Soils*, **11**, 210-215.
- BEZZATE S., 1989 - Clonage d'un gène de *Bacillus polymyxa* codant pour une activité saccharolytique exocellulaire. D.E.A. Université d'Orsay, Paris XI, 16 p.
- BODDEY R. M., BALDANI V. L. D., BALDANI J. I. et DÖBEREINER J., 1986 - Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant & Soil*, **95**, 109-121.
- BOIVIN C., CAMUTS., MALPICA C. A., TRUCHET G. et ROSENBERG C., 1990 - *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced conditions. *Plant cell*, **2**, 1157-1170.

- BRADFORD M. M., 1976 - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- BROADBENT P., BAKER K. F. et WATERWORTH Y., 1971 - Bacteria and *Actinomycetes* antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust. J. Biol. Sci.*, **24**, 925-944.
- BROMFIELD E. S. P., SINHA I. B. et WOLYNETZ M. S., 1986 - Influence of location, host cultivar, and inoculation on the composition of naturalized populations of *Rhizobium meliloti* in *Medicago sativa* nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 1077-1084.
- BRUNEL B., CLEYET-MAREL J. C., NORMAND P. et BARDIN R., 1988 - Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2636-2642.
- CAMPBELL R. et EPHGRAVE J. M., 1983 - Effect of bentonitic clay on the growth of *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* and on its interaction with antagonistic bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 771-777.
- CAMPBELL R., 1983 - Ultrastructure studies of *Gaeumanomyces graminis* in the water films on wheat roots and the effect of clay on the interactions between this fungus and antagonistic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **29**, 39-45.
- CAREY E. E., DICKINSON D. B., WEI L. Y. et RHODES A. M., 1982 - Occurrence of sorbitol in *Zea mays*. *Phytochemistry*, **21**, 1909-1911.
- CARUSO F. L., ZUCK M. G. et BESSETTE A. E., 1984 - Bacterial seedling blight of tomato caused by *Bacillus polymyxa*. *Plant Disease*, **68**, 617-620.
- CERNY G., 1976 - Method for the distinction of Gramnegative from Grampositive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **3**, 223-225.
- CHALUMEAU H., 1975 - Etude biochimique et génétique du catabolisme du sorbitol chez *Bacillus subtilis* marburg. *Thèse Doct. Univ.- Paris VII*, 84 p.
- CHANWAY C. P. et NELSON L. M., 1990 - Field and laboratory inoculation studies of triticum aestivum L. inoculated with co-existent growth-promoting *Bacillus* strains. *Soil Biol. Biochem.*, **22**, 789-795.
- CHANWAY C. P., RADLEY R. A. et HOLL F. B., 1991 - Inoculation of conifer seed with plant growth promoting *Bacillus* strains causes increased seedling emergence and biomass. *Soil Biol. Biochem.*, **23**, 575-580.

- CHESS L., MACDERMOTT R. P. et SCHLOSSMAN S. T., 1974 - Immunological functions of isolated human lymphocyte subpopulations. I. Quantitative isolation of human T and B cells and response to mitogens. *J. immunol.*, **113**, 1113-1121.
- CHEI I. et HUTTERMANN A., 1980 - Chemical composition of hyphal walls of *Fomes annosus*. *Eur. J. Forest Pathol.*, **10**, 65-70.
- CHEI I., ORDENTLICH A., SHAPIRA R. et OPPENHEIM A., 1991 - Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *In: The rhizosphere and plant growth*, vol. 14. KEISTER D. L. and CREGAN P. B. (Eds.). Kluwer Academic Publ., Netherlands.
- CLARK F. E., 1947 - Rhizosphere microflora as affected by moisture changes. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **12**, 239-242.
- CLARK F. E., 1949 - Soil microorganisms and plant roots. *Adv. Agron.*, **1**, 241-288.
- CLARK M. F. et ADAMS A. N., 1977 - Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, **34**, 475-483.
- CLAUS D. and BERKELEY R. C. W., 1986 - Genus *Bacillus*, COHN, 174AL, p. 1105-1139. *In: SNEATH P. H. A., MAIR N. S., SHARPE M. E. and HOLT J. G. (Eds.). 9th ed. Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- COHN H. J., 1872 - Untersuchungen über bakterien. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 1875, **1 (Heft 2)**, 127-224.
- COLLMER A. et KEEN N. T., 1984 - The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **24**, 383-409.
- CONINCK-CHOSSON J., 1988 - Aerobic degradation of cellulose and adsorption properties of cellulases in *Cellulomonas uda* JC3. Effects of crystallinity of substrate. *Biotechnol. Bioen.*, **31**, 495-501.
- CROZAT Y. et CLEYET-MAREL J. C., 1984 - Problèmes méthodologiques posés par l'extraction et la récupération des bactéries telluriques pour leur quantification par immunofluorescence. *Agronomie*, **4**, 603-610.
- CURLE A. et TRUELOVE B., 1986 - The rhizosphere. *In: Advanced series in agriculture sciences*, vol. 15. YARON B., BOMMER D. F. R., SABEY B. R., THOMAS G. W., VAADIA Y. and VAN VLECK L. D. (Eds). p. 288.

- DAVIES S. N., 1951 - The serology of *Bacillus polymyxa*. *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 807-816.
- DE BARJACH H et BONNEFOI A, 1962 - Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* type *B. thuringiensis*. *Entomophaga*, **7**, 5-30.
- DE-POLLI H., BOHLOOL B. B. et DÖBEREINER J., 1980 - Serological differentiation of *Azospirillum* species belonging to different host-plant specificity groups. *Arch. Microbiol.*, **126**, 217-222.
- DEAN C. R. et WARDO P., 1991 - Nature of *Escherichia coli* lysis by culture supernatants of *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1893-1898.
- DEDONDER R., 1966 - Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol.*, **8**, 500-505.
- DJORDJEVIC M. A., GABRIEL D. W. et ROLFE B. G., 1987 - *Rhizobium*-The refined parasite of legumes. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **25**, 145-168
- DORNER W., 1924 - Beobachtungen über das Verhalten der sporen und vegetativen formen von *Bacillus amylobacter* A. M. et Bredemann bei nachweis und reinzucht-ver-suchen. *Lands. Jahrb. Schweiz.*, **38**, 175-202.
- ELAD Y. et BAKER R., 1985 - Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing Pseudomonads on chlamidiospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **75**, 1047-1052.
- FARRAND S. K., 1989 - Conjugal transfer of bacterial gene on plants. In : Gene transfert in the environment. LEVY S. B. et MILLER R. V.(Eds.). McGraw-Hill Publ. Co., 261-286.
- FOGARTY W. M. et GRIFFIN P. J., 1973a - Physicochemical properties of the native zinc and manganese-prepared metalloprotease of *Bacillus polymyxa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **26**, 191-195.
- FOGARTY W. M. et GRIFFIN P. J., 1973b - Some preliminary observations on the production and properties of a cellulolytic enzymes elaborated by *Bacillus polymyxa*. *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 1297, 1298.
- FUHRMANN J., 1989 - Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* as influenced by soybean cultivar and sampling location. *Soil. Biol. Biochem.*, **21**, 1079-1081.
- FURHMANN J. et WOLLUM II A. G, 1985 - Simplified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for routine identification of *Rhizobium japonicum* antigens. *Appl. Eviron. Microbiol.*, **49**, 1010-1013.

- GAMARD P., 1991 - Etude de populations d'*Azospirillum* dans la rhizosphère. Caractérisation sérologique et activité dénitrifiante. **Thèse Doct. Univ.-Lyon I**, 173 p.
- GONZLES-CANDELAS L., ARISTOYM. C., POLAINA J. and FLORS A., 1989 - Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing  $\beta$ -glucosidase activity in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 55, 3173-3177.
- GOUZOU L., 1992 - Devenir d'une population bactérienne inoculée dans la rhizosphère du blé et ses effets sur la plante : Cas de *Bacillus polymyxa*. **Thèse Doct. Univ.-Nancy I**. 176 p.
- GOUZOU L., BURTIN G., PHILIPPY R., BARTOLI F. et HEULIN T., 1992 - Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere: preliminary examination. **Accepté à Geoderma**.
- GRAHAM P. H., 1971 - Serological studies with *Agrobacterium radiobacter*, *A. tumefaciens*, and *Rhizobium* strains. **Arch. Microbiol.**, 78, 70-75.
- GUESDON J. L., BERTHIER Y., CHEVRIER D., VERDIER V. et LEMATTRE M., 1991 - L'hybridation moléculaire et les techniques de marquage des acides nucléiques. **Phytoma**, 430, 18-22.
- HANKIN L., ZUCKER M. et SANDS D. C., 1971 - Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Appl. Microbiol.**, 22, 205-209.
- HASEGAWA S. et NAGEL C. W., 1962 - The characterization of an a-b-unsaturated digalacturonic acid. **J. Biol. Chem.**, 237, 619-621.
- HEINRICH D. et HESS D., 1985 - Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. **Can. J. Microbiol.**, 31, 26-31.
- HEULIN T., GUCKERT A. et BALANDREAU J., 1987 - Stimulation of root exudation of rice seedlings by *Azospirillum* strains : carbon budget under gnotobiotic conditions. **Biol. Fertil. Soils**, 4, 9-14.
- HILTNER L., 1904 - Über neuere erfahrungen und problem auf dem gebiet der bodenbakteriologie und unter besonderer berücksichtigung und brache. **Arb Dtsch Landwirt. Ges**, 98, 59-78.
- HIRN J., BRAILLY H., MAWASC., MARANINCHID. et DELAAGE M. A., 1987 - Utilisation des anticorps monoclonaux fixés sur des billes flottantes pour l'élimination de cellules malignes de la moëlle osseuse avant la greffe. **Bio-Sciences**, 6, 136-138

- HOLBEN W. E., JANSSON J. K., CHELMB. K. et TIEDJE J. M., 1988 - DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 703-711.
- HOLL F. B., CHANWAY C. P., TURKINGTON R. et RADLEY R. A., 1988 - Response of created wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.*, **20**, 19-24.
- HOLLANDER M. et WOLFE D. A., 1973 - Nonparametric statistical methods. John Wiley & Sons (eds), New York. 503 p.
- HORNBY D., 1979 - Take-all decline : a theorist's paradise. *In : Soil-borne plant pathogens*. SCHIPPERS B. et GAMS W. (Eds.). Academic Press, New York, 133-156.
- HRANITZKY K. W., LARSON A. D., RAGSDALE D. W. and SIEBELING R. J., 1980 - Isolation of O1 serovars of *Vibrio cholerae* from water by serologically specific method. *Science*, **210**, 1025-1026.
- HUBERT J. L., 1991 - Obtention et caractérisation de kystes d'*Azospirillum* pour l'inoculation de plantes cultivées. Thèse de Doctorat d'Université de Nancy I, 124p.
- HYNES M. F. et O'CONNEL M. P., 1990 - Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Can. J. Microbiol.*, **36**, 864-869.
- IMANG. I. et ABD-ALLAH N. M., 1974 - Fructosan, a new soil conditioning polysaccharide isolated from the metabolites of *Bacillus polymyxa* AS-1 and its clinical applications. *Egypt. J. Bot.*, **1**, 19-26.
- JACOBS M. J., FUNKE B. R. et MERILL S. D., 1985 - Enumeration and characterization of nitrogen-fixing bacteria in a stripmine site. *Plant & Soil*, **84**, 3-10.
- JONES D. et KRIEG N. R., 1986 - Serology and chemotaxonomy. *In : Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. SNEATH P. H. A., MAIR N. S., SHARPE M. E. and HOLT J. G. (Eds) 8th ed. . The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 979-982.
- JURGENSEN M. F. et DAVEY C. B., 1971 - Nonsymbiotic nitrogen-fixing microorganisms in forest and tundra soils. *Plant & Soil*, **34**, 341-356.
- KADOTA H., UCHIDA A., SAKO Y. et HARADA K., 1978 - Heat-induced DNA injury in spores and vegetative cells of *Bacillus subtilis*. *In : Spores Volume VII*. CHAMBLISS et VARY (Eds), . Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C. 27-30.

- KANEDA T., 1977 - Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. **Bacteriol. Rev.**, **41**, 391-418.
- KATZNELSON H., 1946 - The rhizosphere effect of mangels on certain group of micro-organisms. **Soil. Sci.**, **62**, 343-354.
- KHAMMAS K. M., 1991 - Interactions nutritionnelles entre bactéries fixatrices d'azote et bactéries pectinolytiques. **Thèse Doct. Univ.- Paris VII**, 196 p.
- KHAMMAS K. M. et KAISER P., 1991 - Chracterization of a pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. **Plant & Soil**, **137**, 75-79.
- KIRBYR. and RYBICKIE.P., 1986 - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) as mean of taxonomic analysis of *Streptomyces* and related organisms. **J. Gen. Microbiol.**, **132**, 1891-1894.
- KLEEBERGER A., CASTORPH H. and KLINGMÜLLER W., 1983 - The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to gram-negative bacteria. **Arch. Microbiol.**, **136**, 306-311.
- KLOEPPER J. W., LEONG J., TEINTZE M. et SCHROTH M. N., 1980a - Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, **286**, 885-886.
- KLOEPPER J. W., LEONG J., TEINTZE M. et SCHROTH M. N., 1980b - *Pseudomonas* siderophores : a mechanism explaining disease-suppressive soils. **Curr. Microbiol.**, **4**, 317-320.
- KNOWLES R., 1982 - Denitrification. **Microbial Rev.**, **46**, 43-70.
- KORANSKY J. R., ALLEN S. D. and DOWELL V. R., 1978 - Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, **35**, 762-765.
- KOREISHIT. et HINOS., 1984 - Assimilatory nitrate reductase of some soil bacteria. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, **30**, 317-327.
- KRIEGN. R., 1981 - Enrichment and isolation. *In*: **Manual of methods for general bacteriology**. GERHARDT P., MURRAYR. G. E., COSTILOW R. N., NESTER E. W., WOOD W. A., KRIEGN. R. and PHILLIPS G. B. (Eds.). . Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C. 112-142.
- KUNDU B. S. et GAUR A. C., 1980 - Establishment of nitrogen-fixing and phosphate-solubilising bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. **Plant & Soil**, **57**, 223-230.

- LADHA J. K., BARRAQUIO W. L. et WATANABE I., 1982 - Immunological techniques to identify *Azospirillum* associated with wetland rice. **Can. J. Microbiol.**, **28**, 478-485.
- LAJUDIE J. et DUMANOIR V. R., 1976 - Recherche de l'activité pectinolytique chez le genre *Bacillus*. **Ann. Microbiol. Inst. Pasteur**, **127 A**, 423-427.
- LAMBERT B. et JOOS H., 1989 - Fundamental aspects of rhizobacterial plant growth promotion research. **Trends Biotechnol.**, **7**, 215-219.
- LAMMR. B. et NEYRAC. A., 1981 - Characterization and cyst production of *Azospirilla* isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. **Can. J. Microbiol.**, **27**, 1320-1325.
- LEA T., VARTDAL F., DAVIES C et UGELSTAD j., 1985 - Magnetic monosized polymer particles for fast and specific fractionation of human mononuclear cells. **Scand. J. Immunol.**, **22**, 207-216.
- LEDINGHAM G. A., ADAMSG. A. et STANIERR. Y., 1945 - Production and properties of 2,3-butanediol. I. Fermentation of wheat mashes by *Aerobacillus polymyxa*. **Can. J. Research**. **23**, 48-71.
- LELU A., 1989 - A neural model for highly dimensional data analysis. *In: Data analysis, learning symbolic and numeric knowledge*. DIDAY E. (Ed.). Nova Science Publi., New York.
- LES PINAT P. A. et BERLIER Y., 1975 - Les facteurs externes agissant sur l'excrétion racinaire. **C. R. al. «Rhizosphère»**. **Bull. Soc. Fr.**, **122**, 21-30.
- LETHBRIDGE G., DAVIDSON M. S. et SPARLING. G. P., 1982 - Critical evaluation of the acetylene reduction test for estimating the activity of nitrogen-fixing bacteria associated with the roots of wheat and barley. **Soil. Biol. Biochem.**, **14**, 27-35.
- LEVANONY H. et BASHAN Y., 1990 - Avidin-biotin complex incorporation into Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for improving the detection of *Azospirillum brasilense* Cd. **Current Microbiol.**, **20**, 91-94.
- LEVANONY H., BASHAN Y., ROMANO B., and KLEIN E., 1989 - Ultrastructural localisation and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat root by immuno-gold labelling. **Plant & Soil**, **117**, 207-218.
- LINEM. A. et LOUTITM. W., 1971 - Non symbiotic nitrogen-fixing organisms from New-Zealand tussock-grasslands soils. **J. Gen. Microbiol.**, **66**, 309-318.

- LINE M. A. et LOUITIT M. W., 1972 - Studies on non-symbiotic nitrogen fixation in New-Zealand tussock-grasslands soils. *N. Z. J. Agricult. Res.*, **16**, 87-94.
- LOGAN N. A., BERKELEY R. C. W., et NORRIS J. R., 1978 - Results of an international reproductibility trial using the API system applied to the genus *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, **32**, 28-29.
- LOGAN N. A., et BERKELEY R. C. W., 1981 - Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1871-1882.
- LUCAS P., SARNIGET A., COLLET J. M. ET LUCAS M., 1989 - Réceptivité des sols au piétin échaudage (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) : influence de certaines techniques culturales. *Soil Biol. Biochem.*, **21**, 1073-1078.
- LYNCH J. M. et WHIPPS J. M., 1990 - Substrate flow in the rhizosphere. *Plant & Soil*, **129**, 1-10.
- MACE E., 1889 - Traité pratique de bactériologie, 1st ed. Balliere J.-B. et Fils, Paris, 1144 p.
- MANDIMBA G., HEULIN T., BALLY R., GUCKERT A. et BALANDREAU J., 1986 - Chemotaxis of free living nitrogen-fixing bacteria towards maize mucilage. *Plant & Soil*, **90**, 129-139.
- MANIATIS T., FRITSCH E. F. et SAMBROOK J., 1982 - Media and antibiotics. In «Molecular cloning». A laboratory manual. Cold Spring Laboratory, 68.
- MATSUMURA T., YAMANAKA T., HASHIZUME S., IRIE Y. et NITTA K., 1975 - Tissue dispersion, cell harvest and fluid suspension culture by the use of bacterial neutral protease. *Jap. J. Exper. Med.*, **45**, 377-382.
- MAVINGUI P., BERGE O. et HEULIN T., 1990 - Immunotrapping of *Bacillus polymyxa* in soil and in the rhizosphere of wheat. *Symbiosis*, **9**, 215-221.
- McCRADY M. H., 1918 - Table for rapid interpretation of fermentation tubes results. *Can. Pub. Health J.*, **9**, 275-286.
- MICHIELSK., VANDERLEYDEN J. et VAN GOOL A., 1989 - *Azospirillum* plant root association: a review. *Biol. Fertil. Soils*, **8**, 356-368.
- MILLER H. J., HENKENG. et VAN VEEN J. A., 1989 - Variation and composition of bacterial populations in the rhizospheres of maize, wheat, and grass cultivars. *Can. J. Microbiol.*, **35**, 656-660.

- MOAWAD H. A., ELLIS W. R. et SCHMIDT E. L., 1984 - Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybean. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 607-612.
- MORGAN J. A. W., WINSTANLEY C., PICKUP R. W., JONES J. G. et SAUNDERS J. R., 1989 - Direct phenotypic and genotypic detection of a recombinant *Pseudomonad* population released into lake water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2537-2544.
- MORGAN J. A. W., WINSTANLEY C., PICKUP R. W., JONES J. G. et SAUNDERS J. R., 1991 - Rapid immunocapture of *Pseudomonas putida* cells from lake water by using bacterial flagella. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 503-509.
- MORIHARA K., 1974 - Comparative specificity of microbial proteinases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **41**, 179-243.
- MORITA J. I et YASUI T., 1973 - Digestion of myosin by a bacterial protease. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1123-1130.
- MUNCH J. C. et OTTOW J. C. G., 1983 - Réduction des oxydes ferriques amorphes et cristallisés. *Sciences du sol*, **3-4**, 205-215.
- MUNCH J. C., 1991 - Nitrous oxide emission from soil as determined by the composition of denitrifying microbial population. In : **Diversity of environmental biogeochemistry**. BERTHELIN J. (Ed.). Elsevier, Amsterdam, 309-316.
- MYERS M. L. et HUBBELL D. H., 1987 - Plant cell carbohydrates as substrates for *Azospirillum brasiliense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2745-2748.
- NAGATA M et MATSUMURA T., 1986 - Action of the bacterial neutral protease, dispase, on cultured cells and its application to fluid suspension culture with a review on biomedical application of this protease. *Jap. J. Exper. Med.*, **56**, 297-307.
- NAGEL C. W. et VAUGHN R. H., 1961a - The characteristics of a polygalacturonase produced by *Bacillus polymyxa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 344-352.
- NAGEL C. W. et VAUGHN R. H., 1961b - The degradation of oligogalacturonides by the polygalacturonase of *Bacillus polymyxa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 328-332.

- NAGEL C. W. et WILSON T. M., 1970 - Pectic acid lyases of *Bacillus polymyxa*. **Appl. Microbiol.**, **20**, 374-383.
- NAKAMURA L. K., 1987 - *Bacillus polymyxa* (Prazmowski) Mace 1889 deoxyribonucleic acid relatedness and base composition. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **37**, 391-397.
- NEAL J. L., LARSON R. I., 1976 - Acetylene reduction by bacteria isolated from the rhizosphere of wheat. **Soil Biol. Biochem.**, **8**, 151-155.
- NEAL J. L., LARSON R. I. et ARTKINSON, 1973 - Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. **Plant & Soil**, **39**, 209-212.
- NESME X., MICHEL M. F. et DIGAT B., 1987 - Population heterogeneity of *Agrobacterium tumefaciens* in galls of *populus* L. from a single nursery. **Appl. Environ. Microbiol.**, **53**, 655-659.
- O'BRIEN M. et COLWELL R. T., 1987 - A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide. **Appl. Environ. Microbiol.**, **53**, 1718-1720.
- O'SULLIVAN M., STEPHENS P. M. et O'GARA F., 1991 - Extracellular protease production by Fluorescent *Pseudomonas* spp and the colonization of sugarbeet roots and soil. **Soil Biol. Biochem.**, **23**, 623-627.
- OLSEN P. E. et RICE W. A., 1984 - Minimal antigenic characterisation of eight *Rhizobium meliloti* strains by indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Can. J. Microbiol.**, **30**, 1093-1099.
- OUELLETTE C. A., BURRIS R. H. et WILSON P. W., 1969 - Deoxyribonucleic acid base composition of species of *Klebsiella*, *Azotobacter* and *Bacillus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, **35**, 275-286.
- PAPAVIZAS G. C. et DAVEY C. B., 1961 - Extent and nature of the rhizosphere of *Lupinus*. **Plant & Soil**, **14**, 215-236.
- POTTIER M., 1987 - Recherche d'un anticorps spécifique d'*Azospirillum lipoferum* 4B à partir de protéines membranaires. DAA Aménagement rural ENSAIA-INPL. 44 p.
- PRIEST F. G., 1977 - Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriol. Rev.**, **41**, 711-753.
- PRIEST F. G., GOODFELLOW M. et TODD C., 1981 - The genus *Bacillus*: A numerical analysis. In : **The aerobic endospore-forming bacteria. Classification and identification**. BERKELEY R. C. W. and GOODFELLOW M. (Eds.). Soc. Gen. Microbiol., Academic Press, London. 91-103.

- RAIR., 1991 - Strain-specific salt tolerance and chemotaxis of *Azospirillum brasilense* and their associative N-fixation with finger millet in saline calcareous soil. **Plant & Soil**, **137**, 55-59.
- RAINBOW C., et ROSE A. H., 1963 - Biochemistry of industrial microorganisms. Academic Press, New York, p. 483.
- RASPOET D., POT B., DE DEYN D., DE VOS P., KESTERS K. et DE LEY J., 1991. Differentiation between 2,3-butanediol producing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus polymyxa* strains by fermentation product profiles and whole-cell protein electrophoretic patterns. **System. Appl. Microbiol.**, **14**, 1-7.
- RAY T. C., CALLOW J. A. et KENNEDY J. F., 1988 - Composition of root mucilage polysaccharides from *Lepidium sativum*. **J. Exp. Botany**, **39**, 1249-1261.
- REINHOLD B., HUREK T. et FENDRIKI., 1985 - Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.**, **162**, 190-195.
- RENNIE R. J., 1980 - Dinitrogen-fixing bacteria: computer-assisted identification of soils isolates. **Can. J. Microbiol.**, **26**, 1275-1283.
- RENNIE R. J., DE FRITAS J. R., RUSCHEL A. P. et VOSE P. B., 1982 - Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp). **Can. J. Microbiol.**, **28**, 462-467.
- RHODES-ROBERTS M. E., 1981 - The taxonomy of some nitrogen-fixing *Bacillus* species with special reference to nitrogen fixation. *In* : **The aerobic endospore-forming bacteria. Classification and identification**. BERKELEY R. C. W. and GOODFELLOW M. (Eds.). Soc. Gen. Microbiol., Academic Press, London. 315-335.
- RICE C. W. et TIEDJE J. M., 1989 - Regulation of nitrate assimilation by ammonium in soils and in isolated soil microorganisms. **Soil Biol. Biochem.**, **21**, 597-602.
- RIVIERE J., 1957 - Etude microbiologique de la rhizosphère du blé. I. Groupes fonctionnels microbiens et stades de croissance. **Ann. Inst. Pasteur**, **92**, 279-282.
- RIVIERE J., 1961 - Action des microorganismes de la rhizosphère sur la croissance du blé. I. Répartition des genres et des groupes fonctionnels. **Ann. Inst. Pasteur**, **101**, 611-613.
- ROBERT F. M. et SCHMIDT E. L., 1985 - Somatic serogroups among 55 strains *Rhizobium phaseoli*. **Can. J. Microbiol.**, **31**, 519-523.

- ROMBOUTS F. M. et PILNIK W., 1980 - Pectic enzymes, p. 227-282. *In: Economic microbiology: microbial enzymes and bioconversions, vol 5.* ROSE A. H. (ed). Academic Press, London, New York.
- ROMBOUTS F. M., 1972 - Occurrence and properties of bacteria pectate lyases. Doctoral Thesis, Wageningen.
- ROSSIGNOL G. et DION P., 1985 - Octopaline, nopaline, and octopinic acid utilization in *Pseudomonas*. *Can. J. Microbiol.*, **31**, 68-74.
- ROVIRA A. D. et DAVEY C. B., 1974 - Biology of the rhizosphere. *In: The plant root and its environment.* CARSON E. W. (Ed.). University Press of Virginia. 153-204.
- SAIKI R. K., SCHARFS., FALOONA F., MULLIS K. B., HORN G. T., ERLIH H. A. et ARNHEIM N., 1985 - Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- SATTAR M. A. et GAUR A. C., 1987 - Production of auxins and gibberellins by phosphate-dissolving microorganisms. *Zentralbl. Mikrobiol.*, **142**, 393-395.
- SCHER F. M., KLOPPER J. W. et SINGLETON C. A., 1985 - Chemotaxis of fluorescens *Pseudomonas* spp to soybean seed exudations in vitro and in soil. *Can. J. Microbiol.*, **31**, 570-574.
- SCHIPPERS B., BAKKER A. W. et BAKKER P. A. H. M., 1987 - Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **25**, 339-358.
- SCHLOSSMANS F. et HUDSON L., 1973. Specific purification of lymphocyte populations on a digestible immunosorbent. *J. immunol.*, **110**, 313-315.
- SEKIT., CHUNG C-K., MIKAMI H. et OSHIMA Y., 1978 - Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**, 182-189.
- SELDIN L. et DUBNAU D., 1985 - Deoxyribonucleic acid homology among *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*, *Bacillus azotofixans*, and other nitrogen-fixing *Bacillus* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**, 151-154.
- SELDIN L. et PENIDO E. G. C., 1986 - Identification of *Bacillus azotofixans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **52**, 403-409.

- SELDIN L., VAN ELSAS J. D., et PENIDO E. G. C., 1984 - *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 451-456.
- SERRES E. et ROUX M., 1986 - Pratique de la classification automatique. L'exemple de *Leishmania*. In : *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. (Coll. int. CNRS/INRS, 2-6 juillet 1984). IMEEE, Montpellier, 27-40.
- SIMONET P., NORMAND P., HIRSCH A. et AKKERMANS A., 1990 - The genetics of the *Frankia* actinorhizal symbiosis. In : *Molecular of symbiotic nitrogen fixation*. CRC Press, **269**. GRESSHOFF P. M. (Ed.). 77-109.
- SIVAN A. and CHET I., 1989 - Cell wall composition of *Fusarium oxysporum*. *Soil. Biol. Biochem.*, **21**, 869-876.
- SMIBERT R. M. and KRIEG N. R., 1981 - General characterization. In : *Manual of methods for general bacteriology*. GERHARDT P., MURRAY R. G. E., COSTILOW R. N., NESTER E. W., WOOD W. A., KRIEG N. R. and PHILLIPS G. B. (Eds.). Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C. 20006, 409-443.
- SMITH N. R., GORDON R. E. et CLARK F. E., 1952 - Aerobic sporeforming bacteria. U. S. D. A. Agric. Monogr. n° 16, p. 148.
- SNEATH P. H. A. et COLLINS V. G., 1974. A study in test reproductibility between laboratories: Report of a *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **40**, 481-527.
- STEFFAN R. J. et ATLAS R. M., 1988 - DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2185-2191.
- STEINMETZ M et AYMERICH S., 1990 - The *Bacillus subtilis* *sac-deg* constellation: How and why?. In : *Genetics and biotechnology of Bacilli*, vol. 3. ZUKOWSKI M., GANESAN A. T. and HOCH J. A. (eds). Academic Press, San Diego. 303-311
- TEATHER R. M. and WOOD P. J., 1982 - Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Microbiol.*, **43**, 777-780.
- TEPFER D., GOLDMANN A., PAMBOUKDJIAN N., MAILLE M., LEPINGLE A., CHEVALIER D., DENARIE J. et ROSENBERG C., 1988 - A plamid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from roots exudates of *Calystegia sepium*. *J. Bacteriol.*, **170**, 1153-1161.

- THOMAS-BAUZON D., WEINHARD P., VILLECOURT P et BALANDREAU J., 1982 - The spermosphere model. I. Its use in growing, counting, and isolating N<sub>2</sub>-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.*, **28**, 922-928.
- THOMASHOW L. S. et WELLER D., 1988 - Role of phenazin antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.*, **170**, 3499-3508.
- TIEDJE J. M., 1988 - Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *In: Biology of anaerobic microorganisms*. ZEHNDER A. J. B. (Ed.). Wiley J. and Sons, 179-244.
- TIWARI V. N., LEHRI L. K. et PATHAK A. N., 1989 - Effect of inoculation crops with phospho-microbes. *Expl. Agric.*, **25**, 47-50.
- TORSVIK V., GKSOYR J. et DAAE F. L., 1990 - High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 782-787.
- ULRICH J. M., 1976 - Pectic enzymes of *Pseudomonas cepacia* and penetration of polygalacturonase into cells. *Physiol. Plant Pathol.*, **5**, 37-44.
- VAGNEROVA K. et MACURA J., 1974 - Relationships between plant roots, proteolytic organisms and activity of protease. *Fol. Microbiol.*, **19**, 525-535.
- VAN VUURDE J. L. W., 1987 - New approach in detecting phytopathogenic bacteria by combined immunoisolation and immunoidentification assays. *EPPO Bulletin*, **17**, 139-148.
- VAN VUURDE J. W. L. et VAN HENTEN C., 1983 - Immunosorbent immunofluorescence microscopy (ISIF) and immunosorbent dilution-plating (ISDP): New methods for the detection of plant pathogenic bacteria. *Seed Sc. & Technol.*, **11**, 523-533.
- VANCURA V et HANZLIKOVA A., 1972 - Root exudates of plants. IV. Difference in chemical composition of seed and seedlings exudates. *Plant & Soil*, **36**, 271-282.
- VANCURA V., 1988 - Plant metabolites in soil. *In: Soil microbial associations, control of structures and functions*. VANCURA V. et KUNC F. (Eds.). Elsevier Amsterdam, 57-157.
- VANDENDERGH P. A., GONZALEZ C. F., WRIGHT A. M. et KUNKA B. S., 1983 - Iron-chelating compounds produced by soil Pseudomonads : correlation with growth inhibition. *Appl. Envir. Microbiol.*, **46**, 128-132.

- WAKISAKA Y. et KOIZUMI K., 1982 - An enrichment isolation procedure for minor *Bacillus* populations. *J. Antibiotics*, **35**, 450-457.
- WEIHS V. et JAGNOW G., 1988 - Occurrence of *Bacillus polymyxa* in the rhizosphere of grasses and cereals in the north-east of western-Germany and some of its characteristics. *In* : **Book of Abstr. 7th Inter. Cong. on Nitrogen fixation**. Cologne, F. R. G. Abstr. 8-28.
- WELLER D. M., HOWIE W. J. et COOK R. J., 1988 - Relationship between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and suppression of take-all of wheat by Fluorescent Pseudomonads. *Phytopathology*, **78**, 1094-1100.
- WELLER D. M., ZHANG B. X. et COOK R. J., 1985 - Application of a rapid screening test for selection of bacteria suppressive to take-all of wheat. *Plant Disease*, **69**, 710-713.
- WOLF J. et BAKER A. N., 1968 - The genus *Bacillus*: Aids to identification of its species. *In* : **Identification methods for microbiologists, part B**. GIBBS B. M. and SHAPTON D. A. (Eds.). Academic Press, London, New York. 93-109.
- WOOD R. T. et CASIDA L. E., 1972 - Soil enrichment for the isolation of sporangial subgroup II *Bacillus* species, and observations concerning a coil-forming member of this group. *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1031-1038.
- WOYCZIKOWSKA B., PASS L., GIRDWOYN M. et RACZYNSKA-BOJANOWSKA K., 1973 - Proteolytic degradation of polymyxins by the enzymes of *Bacillus polymyxa*. *Acta Biochim. Polon.*, **20**, 285-296.
- WULLSTEIN L. H., BRUENING M. L. et BOLLEN W. B., 1979 - Nitrogen fixation associated with sand grain root sheaths (rhizosheaths) of certain xeric grasses. *Physiol. Plant*, **46**, 1-4.



*ANNEXES*



ANNEXE 1

Article publié dans la revue Symbiosis

"Immunotrappig of *Bacillus polymyxa* in soil  
and in the rhizosphere of wheat"



## Immunotrapping of *Bacillus polymyxa* in Soil and in the Rhizosphere of Wheat\*

P. MAVINGUI, O. BERGE and T. HEULIN

*Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère. Centre de Pédologie Biologique, UPR 6831 du C.N.R.S., associée à l'Université de Nancy I, BP5 54501 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.*

### Abstract

A serological method for immunoisolation of *Bacillus polymyxa* from root-free soil and rhizosphere soil of wheat was developed. Microtiter plates were coated with rabbit polyclonal antibodies anti-*B. polymyxa* CF43 at 37°C for 3 hours. Root-free soil or rhizosphere soil was added and incubated at 4°C for 15 hours, and then microtiter plates were washed. The bound bacteria were desorbed with KCl 0.1 M pH 5.5 and plated on sucrose agar medium. Using classical method of enumeration, the population size of *B. polymyxa* in the rhizosphere of wheat is about  $10^5$  bacteria per g of soil, i.e. less than 0.1% of total microflora. When immunotrapping method was used as enrichment step, this percentage in root-free soil and in the rhizosphere soil fractions was respectively up to 20% and about 1%.

### Introduction

The first description of a  $N_2$ -fixing anaerobe *B. polymyxa* was reported by Bredemann (1908). The confirmation of the  $N_2$ -fixing capacity of this bacteria, using  $^{15}N$  occurred in 1958 (Hino and Wilson). Very little attention was paid to this  $N_2$ -fixing species, due to taxonomical problems (Rivière, 1963, Jurgensen and Davey, 1971), until the last 15 years. Today, the evidence of the association of *B. polymyxa* with the roots of wheat is well established (Lindberg and Granhall, 1984, Chanway et al., 1988, Heulin et al., 1990). In our laboratory, we are now interested in the comparison of biochemical and serological phenotypes of *B. polymyxa* populations isolated from (1) soil (root-free soil) and (2) from the rhizosphere of wheat, in order to

---

\*Reviewed

investigate the effect of plant environment on the bacterial phenotypes. There is no problem for isolating well-adapted *B. polymyxa* in the rhizosphere of wheat, using the spermosphere model technique (Thomas-Bauzon et al., 1982). By contrast, it is necessary to improve another technique, due to lack of selective medium, for isolating *B. polymyxa* from root-free soil.

The immunotrapping technique, previously used in specific separation and isolation of human bone cells (Chess et al., 1974) was adapted to the isolation of bacteria from water, soil and plant samples (Hranitzky et al., 1980, Van Vuurde, 1987, Brunel et al., 1988). This technique consists in solid support coated with antibodies to trap bacteria recognized by these antibodies. In this work, immunotrapping technique was used for the isolation of *B. polymyxa* from root-free soil and rhizosphere soil.

## Materials and Methods

### Materials

*Soil.* Wheat seedlings (cv. Fidel) were grown both under laboratory (pots) and field conditions. Rhizosphere soil (root plus adhering soil) was sampled from the pots after a 12 days growth period and from the field after a 80 days cultivation period. Root-free soil was maintained in similar conditions to the corresponding rhizosphere soil (temperature, humidity). Soil extracts were obtained by suspending 5 g of macerated fresh soil samples in 45 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS) and stirring with a vortex mixer (Top-Mix 94323, Bioblock Scientific) at 2400 r.p.m. for 5 min. The above soil suspensions ( $10^{-1}$  dilution) were then diluted decimally in PBS.

*Bacteria and media.* The strain CF43 of *B. polymyxa* isolated from the rhizosphere of wheat (Heulin et al., 1990) was grown in Luria Bertani broth (Tryptone  $10 \text{ g l}^{-1}$ , yeast extract  $5 \text{ g l}^{-1}$ , NaCl  $5 \text{ g l}^{-1}$ ). Sucrose agar medium was chosen for selection of *B. polymyxa*: sucrose  $40 \text{ g l}^{-1}$ , yeast extract  $0.1 \text{ g l}^{-1}$ , agar  $15 \text{ g l}^{-1}$ , supersalts solution  $50 \text{ ml l}^{-1}$  and phosphate buffer  $15 \text{ ml l}^{-1}$ . Supersalts solution and PBS were prepared as previously described (Heulin et al., 1987). The pH was adjusted to 6.8 and sterilized at  $110^\circ\text{C}$  for 20 min.

*Immunoassay reagents and equipment.* Coating buffer: Na-carbonate bicarbonate  $0.1 \text{ M}$  pH 9.5. Substrate buffer: diethanolamine 10% adjusted to pH 9.8 with HCl. Phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2: NaCl  $7.2 \text{ g l}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $2.8 \text{ g l}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.4 \text{ g l}^{-1}$ . PBS-Tween: PBS plus 0.05% Tween 20. PBS-casein: PBS-Tween plus 0.5% casein. Microtiter plates: Costar 2596 (PolyLabo). Optical density of hydrolysed enzymatic substrate (4-nitrophenylphosphate ref. 107905, Boehringer Mannheim) was measured by spectrophotometer (Dynatech MR 700) at 405 nm.

### Methods

*Preparation of polyclonal antibodies (PcAbs).* The rabbit antiserum used was prepared by A. Dorier (I.U.T. Biologie Appliquée, Lyon) against the strain CF43 of *B. polymyxa*. PcAbs were partially purified by precipitation with ammonium sulfate (3.9 M) and then dialysed against PBS.

*PcAbs coating.* Microtiter plates were washed overnight with ethanol. PcAbs anti-CF43 were coated at 37°C for 3 hours (0.1 ml per well). Plates were washed three times with 0.1 ml PBS-Tween and then incubated with 0.1 ml PBS-casein at room temperature for 30 min. Plates were washed twice with PBS-Tween and once with PBS (0.1 ml per well). The estimation of coated antibodies was made according to ELISA technique (Clark and Adams, 1977, Arzac and Cleyet Marel, 1986). Goat anti-rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase (GAR:ref. A7539 Sigma) diluted at  $10^{-3}$  was added (0.1 ml per well) and incubated overnight at 30°C. Then paranitrophenylphosphate ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$  diethanolamine buffer) was applied (0.1 ml per well). Optical density was measured at 405 nm.

*Immunotrapping assay.* Microtiter plates were coated with partially purified rabbit PcAbs anti-CF43 as described above. Soil samples or bacterial suspension were added (0.1 ml per well). After incubation at 4°C for 15 hours, plates were washed twice with PBS (0.1 ml per well) and the bound bacteria were desorbed with either KCl 0.1 M pH 5.5 or PBS or Na-carbonate bicarbonate 0.1 M pH 8.5 or with distilled water pH 5.5. Mechanical treatment with pipette tips, used to dispense solutions, during few minutes was very important for effective desorption. Desorbed bacteria were plated on sucrose agar medium and incubated at 30°C. Typical production of exopolysaccharides by *B. polymyxa* made easy their selection.

*Identification.* *B. polymyxa* strains were identified by morphological and biochemical tests: cells rod shaped, rigid motility, ellipsoidal refractile spores located in subterminal position in swollen sporangia, Gram positif according to the Cerny's method (1976) and acidification of 49 carbohydrates using API 50 CH system (API-system, la Balme les Grottes-38390 Montalieu-Vercieu-France).

### Results

Each step of immunotrapping technique was separately examined:

1. dilution of rabbit PcAbs anti-CF43 to coat microtiter plates,
2. chemical and physical treatments for desorption step,
3. incubation temperature of soil samples,
4. dilution of soil samples.

1. Dilution in carbonate bicarbonate (C-B) from  $10^{-1}$  to  $10^{-6}$  of rabbit PcAbs anti-CF43 were coated to microtiter plates (Costar 2596) and then goat anti-rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase was added ( $10^{-3}$  dilution). In these conditions the two optimal dilutions were  $10^{-4}$  and  $10^{-3}$ .

2. Microtiter plates were coated with rabbit PcAbs anti-CF43 ( $10^{-4}$  dilution) and dilutions of bacterial suspensions in PBS pH 7.2 were added. The best recovery yield was obtained with KCl 0.1 M pH 5.5 when  $10^5$  *B. polymyxa* CF43 per well were added (Fig. 1). IgG enzymatic digestions (papain, pepsin) or modification of hydrophobic bindings in presence of organic solvents did not increase the percentage of bacterial recovery (data not shown).

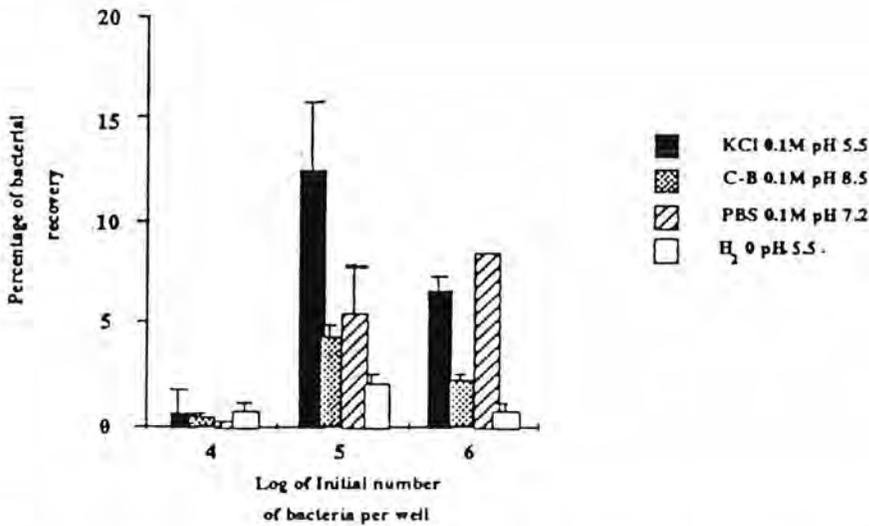


Figure 1. Determination of the optimal treatment for the desorption of attached *B. polymyxa* to rabbit PcAbs anti-CF43 ( $10^{-4}$  dilution) after plating on sucrose-agar medium.

Under optimal conditions ( $10^5$  *B. polymyxa* CF43 per well, KCl 0.1 M pH 5.5), 12.5% of total bacteria were recovered after the first washing step, and less than 0.01% after two consequential washings. The control treatment consists in wells coated with Na-carbonate bicarbonate, without PcAbs. So, non-specific attachment of bacteria to the wells was about 0.05%, compared with 12.5% in presence of PcAbs in the wells.

3. Immunotrapping efficiency was affected by incubation temperature of microtiter plates containing root-free soil or rhizosphere soil samples. In both cases, total number of immunotrapped bacteria was higher when incubation temperature was 30°C (Table 1). This temperature, applied during 15 hours, results in a selection of the fast-growing bacteria (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*). This ten fold increase of

bacterial population size during incubation at 30°C was inconsistent with isolation of *B. polymyxa*. At 4°C, the percentage of recovered *B. polymyxa* after plating on sucrose agar medium was 13% of total immunotrapped bacteria in wells, only for the root-free soil fraction. When using rhizosphere soil, this percentage of *B. polymyxa* was about 1% of total immunotrapped bacteria.

Table 1. Effect of incubation temperature of root-free soil and rhizosphere soil of a 12-day-old wheat (cv. Fidel) on immunotrapping efficiency of *B. polymyxa*

Samples	Incubation temperatures	Number of recovered bacteria ( $\times 10^6$ gdw $^{-1}$ )	Total <i>Bacillus</i> (% recov. bact.)	Recovered <i>B. polymyxa</i> ( $\times 10^5$ cfu gdw $^{-1}$ )	(%)
Root-free soil	4°C	0.2±0.08	60±11	0.2±0.1	13±11
	30°C	3.7±0.2	1.0±0.9	0	0
Rhizosphere soil	4°C	32±24	3±1	4±1.3	1.0±0.3
	30°C	380±110	3±4	0	0

gdw $^{-1}$ : per g dry weight of soil at 60°C for 48 h.

4. The determination of the best soil sample dilutions was made with a  $10^{-3}$  of rabbit PcAbs anti-CF43 at 4°C and using KCl 0.1 M pH 5.5 for the desorption step. Once more, the best efficiency of the method was observed with root-free soil sample, up to 22% of total immunotrapped bacteria, when  $10^{-3}$  dilution of soil is used (Table 2). With the rhizosphere soil sample, this percentage was lower than 1%, whatever the dilutions used.

Table 2. Effect of serial dilutions of root-free soil and rhizosphere soil of wheat (cf. Fidel) at grain maturation stage on immunotrapping efficiency of *B. polymyxa*

Samples	Dilutions	Number of recovered bacteria ( $\times 10^5$ gdw $^{-1}$ )	Total <i>Bacillus</i> (% recov. bact.)	Recovered <i>B. polymyxa</i> ( $10^4$ cfu gdw $^{-1}$ )	(%)
Root-free soil	$10^{-1}$	7.8±0.1	64±24	0.1±0.02	1.2±0.8
	$10^{-2}$	4.9±0.4	94±2	0.4±0.2	0.4±0.7
	$10^{-3}$	3.9±0.2	83±8	4.2±1.3	22.0±15.0
Rhizosphere soil	$10^{-1}$	ND	ND	ND	ND
	$10^{-2}$	5.7±1.5	7±4	0	0
	$10^{-3}$	22.0±15.0	6±5	0	0

## Discussion and Conclusion

In root free soil, the population size of *B. polymyxa* was about 0.2 to  $0.5 \times 10^5$  bacteria per g dry weight of soil (Table 1 and 2), corresponding to 0.1% of total microflora. Using immunotrapping technique as enrichment step, this percentage of *B. polymyxa* was between 10 to 20% (Table 1 and 2). The stimulation factor of the

method was about 100 fold. The estimation of the population size of *B. polymyxa* in the rhizosphere of wheat,  $4 \times 10^5$  bacteria per g dry weight of soil (Table 1), is in agreement with literature data (Heulin et al., 1990) between 1 to  $5 \times 10^5$  bacteria per g dry weight of soil. According to these authors, the percentage of *B. polymyxa* in this environment is also about 0.1% of total microflora. But here, the immunotrapping method was not so efficient compared with the root-free soil: only 1% of the immunotrapped bacteria were *B. polymyxa* (10 fold stimulation).

The immunotrapping method described here is suitable for isolation of *B. polymyxa* from root-free soil fraction, outside the rhizosphere. It was one of the main objective of this work. With rhizosphere soil samples, the efficiency of the method was not as satisfactory as with root-free samples, probably due to higher dilution of *B. polymyxa* among fast-growing bacteria in the rhizosphere of wheat. Phenotypical and serological diversity of representative populations of *B. polymyxa*, isolated in and outside the rhizosphere of wheat will be investigated.

#### REFERENCES

- Arsac, J.F. and Cleyet-Marel, J.C. 1986. Serological and ecological studies of *Rhizobium* ssp. (*Cicer arietinum* L.) by immunofluorescence and ELISA technique: competitive ability for nodule formation between *Rhizobium* strains. *Plant and Soil*, **94**: 411–423.
- Bredemann, G. 1908. Investigations on the variation and the nitrogen fixation capacities of *Bacillus asterosporus* A. M. performed on 27 strains of different origin. *Zentbl. Bakt. Abt.*, **22**: 44–89.
- Brunel, B., Cleyet-Marel, J.L., Normand, P., and Bardin, R. 1988. Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 2636–2642.
- Cerny, G. 1976. Method for the distinction of Gram-negative bacteria from Gram-positive bacteria. *Europ. J. Microbiol.*, **73**: 395–402.
- Chanway, C.P., Holl, F.B., and Turkington, R. 1988. Genotypic coadaptation in plant growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa*. *Plant and Soil*, **106**: 281–284.
- Chess, L., MacDermott, R.P., and Schlossman, S.T. 1974. Immunologic functions of isolation human lymphocyte subpopulations. I. Quantitative isolation of human T and B cells and response to mitogens. *J. Immunol.*, **113**: 1113–1121.
- Clark, M.F. and Adams, A.N. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, **34**: 475–483.
- Heulin, T., Guckert, A., and Balandreau, J. 1987. Stimulation of root exudation of rice

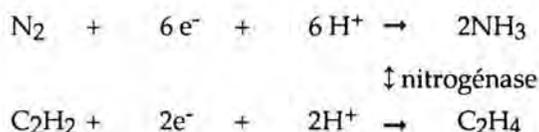
- seedlings by *Azospirillum* strains: carbon budget under gnotobiotic conditions. *Biol. Fertil. Soils.*, **4**: 9-14.
- Heulin, T., Berge, O., Hebbar, P., and Balandreau, J. 1990. Inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by N<sub>2</sub>-fixing *Bacillus* strains isolated from the rhizosphere of wheat. Submitted to *Appl. Environ. Microbiol.*
- Hino, S. and Wilson, P.W. 1958. Nitrogen fixation by a facultative *Bacillus*. *J. Bacteriol.*, **75**: 403-408.
- Hranitzky, K.W., Larson, A.D., Ragsdale, D.W., and Siebeling, R.J. 1980. Isolation of serovars of *vibrio cholerae* from water by serologically specific method. *Science*, **210**: 1025-1026.
- Jurgensen, M.F. and Davey, C.B. 1971. Non-symbiotic N<sub>2</sub>-fixing microorganisms in forest and tundra soils. *Plant and Soil*, **34**: 341-356.
- Lindberg, T. and Granhall, U. 1984. Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of temperate cereals and forage grasses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**: 683-689.
- Rivière, J. 1963. Rhizosphère et croissance du blé. *Ann. Agron.*, **14**: 619-653.
- Thomas-Bauzon, D., Weinhard, P., Villecourt, P., and Balandreau, J. 1982. The spermosphere model. I. Its use in growing, counting, and isolating N<sub>2</sub>-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.*, **28**: 922-928.
- Van Vuurde, J.W. 1987. New approach in detecting phytopathogenic bacteria by combined immunoisolation and immunoidentification assays. *EPPO Bulletin*, **17**: 139-148.



<b>ANNEXE 2</b>
-----------------

### Mesure de l'activité réductrice d'acétylène

Les bactéries fixatrices d'azote possèdent une enzyme, la nitrogénase qui transforme l'azote moléculaire de l'air  $N_2$  en ammonium assimilable par les plantes. La nitrogénase présente cependant une polyvalence vis à vis de plusieurs substrats. Ainsi, des activités catalytiques ont été notées sur des composés ayant dans leur structure des liaisons nitriles. La nitrogénase se révèle donc capable de transformer l'acétylène en éthylène.



Afin de mettre en évidence l'activité d'acétylène des souches bactériennes et estimer les peuplements de fixateurs d'azote (MPN), les tubes sont incubés sous 1 % de  $C_2H_2$  (soit  $0,4 \text{ cm}^3$  de  $C_2H_2$  pur)) et en présence d'un marqueur interne ( $1 \text{ cm}^3$  d'un mélange contenant  $5 \text{ cm}^3$  de  $C_3H_8$  pur et  $1288 \text{ cm}^3$  d'air, par tube). L'injection des différents gaz a lieu simultanément à l'inoculation des échantillons dans les tubes. Le dosage de l'éthylène produit est effectué après une période d'incubation de 7 jours à  $30^\circ\text{C}$ .

Le chromatographe en phase gazeuse (GIRDEL) utilisé pour le dosage est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne remplie de 10 % de  $NA_3PO_4$  sur support Sphérosil XOB O75 100-150  $\mu\text{m}$  permettant une bonne séparation des pics de  $C_2H_4$ ,  $C_3H_8$  et  $C_2H_2$  (dans l'ordre de sortie).

L'étalonnage de l'appareil est effectué par l'injection de  $0,5 \text{ cm}^3$  d'un mélange de  $C_2H_4$  ( $1 \text{ cm}^3$ ) et de  $C_3H_8$  ( $1 \text{ cm}^3$ ) contenu dans un flacon de  $1290 \text{ cm}^3$ , conduisant à l'obtention d'un pic de  $C_2H_4$  (de hauteur H) et de  $C_3H_8$  (H') à la même atténuation.

L'injection d'un même volume ( $0,5 \text{ cm}^3$ ) de l'atmosphère des tubes contenant les échantillons permet le calcul d'un pic de  $C_2H_2$  (ah) et  $C_3H_8$  (a'h') (a et a' étant les atténuations, h et h' les hauteurs de pic).

La quantité de l'éthylène produit est calculée de la façon suivante :

$$C_2H_2 = 10^{-3}/22,4 \times m/p \times ah/a'h' \times H/H' \text{ mole}$$

m : quantité du mélange propane-air injecté dans les tubes ( $1 \text{ cm}^3$ )

p : quantité de propane pur injecté dans le flacon du mélange propane-air ( $5 \text{ cm}^3$ )

V : volume du flacon du mélange propane-air ( $1293 \text{ cm}^3$ )

ANNEXE 3

**Profils biochimiques des souches**

**Activités enzymatiques**

**Inhibition du *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici***

**Profils biochimiques des souches, production de gaz et réduction d'acétylène :**

**Symboles utilisés :**

- + : test positif
- (+) : test ayant varié une fois sur deux
- blanc : test négatif
- nd : non déterminé

BPa : *Bacillus polymyxa* ATCC 842

BMa : *Bacillus macerans* ATCC 8244

BCa : *Bacillus circulans* NCIB 9374

BPb : *Bacillus polymyxa* (API-bioMérieux)

BMb : *Bacillus macerans* (API-bioMérieux)

BCb1 : *Bacillus circulans* 1 (API-bioMérieux)

BCb2 : *Bacillus circulans* 2 (API-bioMérieux)

1,2 indiquent deux déterminations différentes

**Activité enzymatique :**

Cellulase

Pectinase

Chitinase (0 test négatif ; + faiblement positif ; 2+ moyennement positif  
3+ fortement positif)

**Inhibition du *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) :**

0 : pas d'inhibition

1 : zone d'inhibition 1-4 mm

2 : zone d'inhibition 5-8 mm

2 : zone d'inhibition 9-12 mm

NOMS DES SOUCHES		CF43	CF43	BP <sub>a</sub>	BP <sub>a</sub>	BMa	BMa	BC <sub>a</sub>	BC <sub>a</sub>		BP <sub>b</sub>	BM <sub>b</sub>	BC <sub>b1</sub>	BC <sub>b2</sub>	
	N°	1	2	1	2	1	2	1	2						
GLYCEROL	1	+		++		++		++		+		97	89	71	58
ERYTHROL	2											4	0	0	0
D-ARABINOSE	3					+		+				0	78	1	16
L-ARABINOSE	4	+		++		++		++		+		100	100	99	71
RIBOSE	5	+		++		++		+				100	100	42	96
D-XYLOSE	6	+		++		++		++		+		100	100	99	87
L-XYLOSE	7											0	5	0	0
ADONITOL	8											0	5	1	8
β ME-XYLOSIDE	9	+		++		++		++		+		90	84	85	71
GALACTOSE	10	+		++		++		++		+		100	100	99	87
D-GLUCOSE	11	+		++		++		++		+		100	100	100	100
D-FRUCTOSE	12	+		++		++		++		+		100	100	99	75
D-MANNOSE	13	+		++		++		++		+		100	100	99	91
L-SORBOSE	14											0	5	0	0
RHAMNOSE	15											19	94	57	25
DULCITOL	16											4	0	0	0
INOSITOL	17											14	36	99	1
MANNITOL	18	+		++		++		++		+		100	100	99	71
SORBITOL	19					+		++		+		1	75	99	8
α ME-D-MANNOSIDE	20											14	50	99	1
α ME-D-GLUCOSIDE	21	+		++		++		++		+		100	80	99	66
N AC GLUCOSAMINE	22							+		+		4	21	99	91
AMYGDALINE	23	+		++		++		++		+		100	100	100	100
ARBUTINE	24	+		++		++		++		+		100	94	99	83
ESCULINE	25	+		++		++		++		+		100	100	100	100
SALICINE	26	+		++		++		++		+		95	100	100	100
CELLOBIOSE	27	+		++		++		++		+		95	100	99	87
MALTOSE	28	+		++		++		++		+		95	100	100	100
LACTOSE	29	+		++		++		++		+		100	100	99	87
MELIBIOSE	30	+		++		++		++		+		100	95	100	100
SACCHAROSE	31	+		++		++		++		+		100	100	100	100
TREHALOSE	32	+		++		++		++		+		90	100	100	100
INULINE	33	+		++		++		++		+		75	100	99	33
MELEZITOSE	34					+		++		+		61	89	99	25
D-RAFFINOSE	35	+		++		++		++		+		100	89	99	91
AMIDON	36	+		++		++		++		+		100	100	100	100
GLYCOGENE	37	+		++		++		++		+		100	100	100	100
XYLITOL	38							+		+		9	0	85	1
GENTIBIOSE	39	+		++		++		++		+		80	94	100	100
D-TURANOSE	40	+		++		++		++		+		100	89	99	87
D-LYXOSE	41											0	0	0	0
D-TAGATOSE	42											0	21	0	0
D-FUCOSE	43											0	0	0	0
L-FUCOSE	44											0	47	1	16
D-ARABITOL	45											0	68	57	2
L-ARABITOL	46					+		++		+		0	0	85	2
GLUCONATE	47							+		+		33	47	99	71
2 CETO-GLUCONATE	48											0	0	57	1
5 CETO-GLUCONATE	49											4	0	28	1
ONPG	50	+		++		++		++		+		100	100	85	75
CIT.	51											52	30	42	16
H <sub>2</sub> S	52											0	0	1	8
URE	53											0	0	1	8
IND.	54											0	0	1	8
V.P.	55	+		++		++		++		+		99	73	57	18
GEL.	56	+		++		+		+		+		95	50	14	18
NIT.	57	+		++		++		++		+		71	36	42	16
GAZ	58	+		++		++		++		+					
GRAM	59	+		++		++		++		+					
CATALASE	60	+		++		++		++		+					
OXYDASE	61														
SPORE	62	+		++		++		++		+					
ARA	63	+		++		++		++		+					
Cellulase	64	+		nd		nd		nd		nd					
Pectinase	65	+		nd		nd		nd		nd					
Chitinase	66	3+		3+		nd		nd		nd					
Inhib. G.g.t sur PDA	67	2		2		nd		nd		nd					
Inhib. G.g.t sur King B	67	3		3		nd		nd		nd					

NOM DES SOUCHES		PMD 51	PMD 52	PMD 53	PMD 54	PMD 55	PMD 56	PMD 57	PMD 58	PMD 59	PMD 60	PMD 61	PMD 62	PMD 63	PMD 64
TESTS	N°														
GLYCEROL	1	+	+					+	+	+	+	+	+	+	+
ERYTHROL	2														
D-ARABINOSE	3														
L-ARABINOSE	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIBOSE	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-XYLOSE	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-XYLOSE	7														
ADONITOL	8														
β ME-XYLOSIDE	9	(+)	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
GALACTOSE	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-GLUCOSE	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-FRUCTOSE	12	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-MANNOSE	13	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
L-SORBOSE	14														
RHAMNOSE	15					+			+	+					
DULCITOL	16														
INOSITOL	17														
MANNITOL	18	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+
SORBITOL	19														
α ME-D-MANNOSIDE	20									+					+
α ME-D-GLUCOSIDE	21	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+
N AC GLUCOSAMINE	22					+									
AMYGDALINE	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARBUTINE	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESCULINE	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SALICINE	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CELLOBIOSE	27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MALTOSE	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSE	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELIBIOSE	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACCHAROSE	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOSE	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INULINE	33	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELEZITOSE	34														
D-RAFFINOSE	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMIDON	36	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYCOGENE	37	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XYLITOL	38														
GENTIBIOSE	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-TURANOSE	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-LYXOSE	41														
D-TAGATOSE	42														
D-FUCOSE	43														
L-FUCOSE	44					+									
D-ARABITOL	45														
L-ARABITOL	46														
GLUCONATE	47		(+)					+			(+)				
2 CETO-GLUCONATE	48														
5 CETO-GLUCONATE	49														
ONPG	50	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+
CIT.	51														
H2S	52														
URE	53														
IND.	54														
V.P.	55	(+)	+		+			+	+	+	+	+	+	+	+
GEL.	56														
NIT.	57	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAZ	58	+	+					+	+	+	+	+	+	+	+
GRAM	59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALASE	60	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDASE	61			+	+	+	+								
SPORE	62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	63	+	+	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	64	+	+	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectinase	65	+	+	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitinase	66	2+	2+	nd	nd	nd	nd		3+	+	3+	+	3+	3+	
Inhib. G.g.t sur PDA	67	2	0	nd	nd	nd	nd	0	3	0	2	0	0	2	0
Inhib. G.g.t sur King B	67	3	0	nd	nd	nd	nd	0	3	0	1	0	0	3	0

NOMS DES SOUCHES		PMD 65	PMD 66	PMD 67	PMD 68	PMD 69	PMD 70	PMD 71	PMD 72	PMD 73	PMD 74	PMD 75	PMD 76	PMD 77	PMD 78
TESTS	N°														
GLYCEROL	1	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ERYTHROL	2														
D-ARABINOSE	3				+			+							
L-ARABINOSE	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIBOSE	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-XYLOSE	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-XYLOSE	7														
ADONITOL	8														
β ME-XYLOSIDE	9	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	(+)	
GALACTOSE	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-GLUCOSE	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-FRUCTOSE	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-MANNOSE	13	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
L-SORBOSE	14														
RHAMNOSE	15	+	+	+	+			+				+	+		
DULCITOL	16														
INOSITOL	17							+							
MANNITOL	18	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+
SORBITOL	19				+										
α ME-D-MANNOSIDE	20	+	+	+				+				+		+	+
α ME-D-GLUCOSIDE	21	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
N AC GLUCOSAMINE	22				+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
AMYGDALINE	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARBUTINE	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESCULINE	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SALICINE	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CELLOBIOSE	27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MALTOSE	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSE	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELIBIOSE	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACCHAROSE	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOSE	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INULINE	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELEZITOSE	34				+					+	+	+			
D-RAFFINOSE	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMIDON	36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYCOGENE	37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XYLITOL	38														
GENTIBIOSE	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-TURANOSE	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-LYXOSE	41														
D-TAGATOSE	42														
D-FUCOSE	43														
L-FUCOSE	44							+	+						
D-ARABITOL	45														
L-ARABITOL	46														
GLUCONATE	47		(+)								+		(+)		
2 CETO-GLUCONATE	48														
5 CETO-GLUCONATE	49														
ONPG	50	+	+	+	+	+	+	nd	+	*	+	+	+	+	+
CIT.	51							nd							
H2S	52							nd							
URE	53							nd							
IND.	54							nd							
V.P.	55	+	+	(+)	+	+	(+)	nd			+	(+)	+	+	+
GEL.	56							nd							
NIT.	57	+	+	+		+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+
GAZ	58	+	+	+		+	+			+		+	+	+	+
GRAM	59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALASE	60	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	+
OXYDASE	61				+			+	+	+	+	+	+	+	+
SPORE	62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	63	+	+	+	nd	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	64	+	+	+	nd	+	+	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+
Pectinase	65	+	+	+	nd	+	+	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+
Chitinase	66	3+	2+	+	nd	2+	+	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+
Inhib. G.g.t sur PDA	67	0	2	1	nd	1	1	nd	nd	nd	nd	2	2	1	2
Inhib. G. g. t sur King B	67	0	2	1	nd	2	1	nd	nd	nd	nd	3	3	0	3

Souches du sol non-rhizosphérique (suite)

NOMS DES SOUCHES		PMD 79	PMD 80	PMD 81	PMD 82	PMD 83	PMD 84	PMD 85	PMD 86	PMD 87	PMD 88	PMD 89	PMD 90	PMD 91	PMD 92	PMD 93
TESTS	N°															
GLYCEROL	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+
ERYTHROL	2															
D-ARABINOSE	3												+			
L-ARABINOSE	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIBOSE	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-XYLOSE	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-XYLOSE	7															
ADONITOL	8															
β ME-XYLOSIDE	9	+			(+)			+	(+)	+	+	+	(+)	+		
GALACTOSE	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-GLUCOSE	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-FRUCTOSE	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-MANNOSE	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-SORBOSE	14															
RHAMNOSE	15						+			+		+		+		
DULCITOL	16															
INOSITOL	17											+				
MANNITOL	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+
SORBITOL	19															
α ME-D-MANNOSIDE	20							+	+		+	+	+	+		
α ME-D-GLUCOSIDE	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N AC GLUCOSAMINE	22											+	+			
AMYGDALINE	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARBUTINE	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESCULINE	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SALICINE	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CELLOBIOSE	27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MALTOSE	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSE	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELIBIOSE	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACCHAROSE	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOSE	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INULINE	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELEZITOSE	34															
D-RAFFINOSE	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMIDON	36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYCOGENE	37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XYLITOL	38															
β-GENTIBIOSE	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-TURANOSE	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-LYXOSE	41															
D-TAGATOSE	42															
D-FUCOSE	43															
L-FUCOSE	44										+	+	+			
D-ARABITOL	45															
L-ARABITOL	46															
GLUCONATE	47			+	+				+	+				+		(+)
2 CETO-GLUCONATE	48					+										
5 CETO-GLUCONATE	49					+										
ONPG	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT.	51															
H2S	52															
URE	53															
IND.	54															
V.P.	55	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL.	56		+													+
NIT.	57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAZ	58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GRAM	59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALASE	60	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDASE	61										+	+	+			
SPORE	62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	+	+	+	+
Cellulase	64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	+	+	+	+
Pectinase	65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	+	+	+	+
Chitinase	66	+		+	2+	2+			2+		nd	nd	+	2+	+	+
Inhib. G.g.t sur PDA	67	2	2	2	1	0	2	2	2	2	nd	nd	2	2	2	2
Inhib. G.g.t sur King B	67	2	3	2	2	0	3	3	3	3	nd	nd	3	3	3	3

Souches du sol non-rhizosphérique (fin)

NOMS DES SOUCHES		PMD 100	PMD 101	PMD 102	PMD 103	PMD 104	PMD 105	PMD 106	PMD 107	PMD 108	PMD 109	PMD 110	PMD 111	PMD 112
TESTS	N°													
GLYCEROL	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ERYTHROL	2													
D-ARABINOSE	3													
L-ARABINOSE	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIBOSE	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-XYLOSE	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-XYLOSE	7													
ADONITOL	8													
β ME-XYLOSIDE	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GALACTOSE	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-GLUCOSE	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-FRUCTOSE	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-MANNOSE	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-SORBOSE	14													
RHAMNOSE	15	+				+								
DULCITOL	16													
INOSITOL	17													
MANNITOL	18	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
SORBITOL	19													
α ME-D-MANNOSIDE	20				+	+	+							
α ME-D-GLUCOSIDE	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
N AC GLUCOSAMINE	22													
AMYGDALINE	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARBUTINE	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESCULINE	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SALICINE	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CELLOBIOSE	27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MALTOSE	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSE	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELIBIOSE	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACCHAROSE	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOSE	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INULINE	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELEZITOSE	34					+								
D-RAFFINOSE	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMIDON	36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYCOGENE	37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XYLITOL	38													
β-GENTIBIOSE	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-TURANOSE	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-LYXOSE	41													
D-TAGATOSE	42													
D-FUCOSE	43													
L-FUCOSE	44													
D-ARABITOL	45													
L-ARABITOL	46													
GLUCONATE	47													(+)
2 CETO-GLUCONATE	48													
5 CETO-GLUCONATE	49													
ONPG	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT.	51													
H2S	52													
URE	53													
IND.	54													
V.P.	55	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL.	56		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
NIT.	57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAZ	58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GRAM	59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALASE	60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDASE	61													
SPORE	62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectinase	65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitinase	66			+	+	+	3+		3+			2+	2+	2+
Inhib. G.g.t sur PDA	67	0	2	2	0	2	1	2	0	2	1	2	2	2
Inhib. G.g.t sur King B	68	0	1	1	0	2	1	1	0	1	1	1	1	3

Souches du sol rhizosphérique

NOMS DES SOUCHES		PMD 113	PMD 114	PMD 115	PMD 116	PMD 117	PMD 118	PMD 119	PMD 120	PMD 121	PMD 122	PMD 123	PMD 124	PMD 125
TESTS	N°													
GLYCEROL	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ERYTHROL	2													
D-ARABINOSE	3													
L-ARABINOSE	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIBOSE	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-XYLOSE	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-XYLOSE	7													
ADONITOL	8													
β ME-D-XYLOSIDE	9	+	+			+	+					+	+	
GALACTOSE	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-GLUCOSE	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-FRUCTOSE	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-MANNOSE	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-SORBOSE	14													
RHAMNOSE	15								+					
DULCITOL	16													
INOSITOL	17													
MANNITOL	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SORBITOL	19													
α ME-D-MANNOSIDE	20	+							+		+	+	+	
α ME-D-GLUCOSIDE	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N AC GLUCOSAMINE	22													
AMYGDALINE	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARBUTINE	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESCULINE	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SALICINE	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CELLOBIOSE	27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MALTOSE	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSE	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELIBIOSE	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACCHAROSE	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOSE	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INULINE	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELEZITOSE	34													
D-RAFFINOSE	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMIDON	36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYCOGENE	37	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
XYLITOL	38							+						
GENTIBIOSE	39	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
D-TURANOSE	40	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
D-LYXOSE	41													
D-TAGATOSE	42													
D-FUCOSE	43													
L-FUCOSE	44													
D-ARABITOL	45													
L-ARABITOL	46													
GLUCONATE	47								(+)					+
2 CETO-GLUCONATE	48													
5 CETO-GLUCONATE	49													
ONPG	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT.	51													
H2S	52													
URE	53													
IND.	54													
V.P.	55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL.	56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NIT.	57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAZ	58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GRAM	59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALASE	60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDASE	61													
SPORE	62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectinase	65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitinase	66	+	3+	3+	2+	3+	2+	3+	+		3+	3+	2+	3+
Inhib. G.g.t sur PDA	67	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	3
Inhib. G.g.t sur King B	68	2	2	2	2	1	1	2	2	0	1	3	2	3

NOMS DES SOUCHES		PMD 126	PMD 127	PMD 128	PMD 129	PMD 130	PMD 131	PMD 132	PMD 133	PMD 134	PMD 135	PMD 136	PMD 137
TESTS	N°												
GLYCEROL	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ERYTHROL	2												
D-ARABINOSE	3												
L-ARABINOSE	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIBOSE	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-XYLOSE	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-XYLOSE	7												
ADONITOL	8												
β ME-XYLOSIDE	9	+		+				+	+	+	+		
GALACTOSE	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-GLUCOSE	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-FRUCTOSE	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-MANNOSE	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-SORBOSE	14												
RHAMNOSE	15	+						+					
DULCITOL	16												
INOSITOL	17												
MANNITOL	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SORBITOL	19												
α ME-D-MANNOSIDE	20	+		+		+		+					+
α ME-D-GLUCOSIDE	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N AC GLUCOSAMINE	22												
AMYGDALINE	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARBUTINE	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESCULINE	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SALICINE	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CELLOBIOSE	27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MALTOSE	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSE	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELIBIOSE	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACCHAROSE	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOSE	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INULINE	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELEZITOSE	34									+			
D-RAFFINOSE	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMIDON	36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYCOGENE	37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XYLITOL	38												
GENTIBIOSE	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-TURANOSE	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-LYXOSE	41												
D-TAGATOSE	42												
D-FUCOSE	43												
L-FUCOSE	44												
D-ARABITOL	45												
L-ARABITOL	46												
GLUCONATE	47	+	+					+					
2 CETO-GLUCONATE	48												
5 CETO-GLUCONATE	49												
ONPG	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT.	51												
H2S	52												
URE	53												
IND.	54												
V.P.	55		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL.	56			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NIT.	57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAZ	58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GRAM	59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALASE	60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDASE	61												
SPORE	62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectinase	65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitinase	66		3+	+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	3+	+
Inhib. G.g.t sur PDA	67	0	2	2	2	2	3	1	2	3	3	2	2
Inhib. G.g.t sur King B	68	0	2	3	1	2	2	0	0	3	3	1	2

Souches du sol rhizosphérique (fin)

NOMS DES SOUCHES		PMD 200	PMD 201	PMD 202	PMD 203	PMD 204	PMD 205	PMD 206	PMD 207	PMD 208	PMD 209	PMD 210	PMD 211	PMD 212	PMD 213
TESTS	N°														
GLYCEROL	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ERYTHROL	2														
D-ARABINOSE	3														
L-ARABINOSE	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIBOSE	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-XYLOSE	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-XYLOSE	7														
ADONITOL	8														
β ME-XYLOSIDE	9			+					+						
GALACTOSE	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-GLUCOSE	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-FRUCTOSE	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-MANNOSE	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-SORBOSE	14														
RHAMNOSE	15														
DULCITOL	16														
INOSITOL	17														
MANNITOL	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SORBITOL	19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α ME-D-MANNOSIDE	20														
α ME-D-GLUCOSIDE	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N AC GLUCOSAMINE	22														
AMYGDALINE	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARBUTINE	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESCULINE	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SALICINE	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CELLOBIOSE	27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MALTOSE	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSE	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELIBIOSE	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACCHAROSE	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOSE	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INULINE	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELEZITOSE	34									+					
D-RAFFINOSE	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMIDON	36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYCOGENE	37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XYLITOL	38														
GENTIBIOSE	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-TURANOSE	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-LYXOSE	41														
D-TAGATOSE	42														
D-FUCOSE	43														
L-FUCOSE	44														
D-ARABITOL	45														
L-ARABITOL	46														
GLUCONATE	47														
2 CETO-GLUCONATE	48														
5 CETO-GLUCONATE	49														
ONPG	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT.	51														
H2S	52														
URE	53														
IND.	54														
V.P.	55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL.	56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NIT.	57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAZ	58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GRAM	59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALASE	60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDASE	61														
SPORE	62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectinase	65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitinase	66	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Inhib. G.g.t sur PDA	67	1	1	1	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2
Inhib. G.g.t sur King B	67	2	2	2	2	1	3	3	3	3	2	2	2	2	2

## Souches du rhizoplan

NOMS DES SOUCHES		PMD 214	PMD 215	PMD 216	PMD 217	PMD 218	PMD 219	PMD 220	PMD 221	PMD 222	PMD 223	PMD 224	PMD 225	PMD 226	PMD 227
TESTS	N°														
GLYCEROL	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ERYTHROL	2														
D-ARABINOSE	3														
L-ARABINOSE	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIBOSE	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-XYLOSE	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-XYLOSE	7														
ADONITOL	8														
β ME-XYLOSIDE	9	+				+	+				+				
GALACTOSE	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-GLUCOSE	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-FRUCTOSE	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-MANNOSE	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-SORBOSE	14														
RHAMNOSE	15														
DULCITOL	16														
INOSITOL	17														
MANNITOL	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SORBITOL	19	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+
α ME-D-MANNOSIDE	20														
α ME-D-GLUCOSIDE	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N AC GLUCOSAMINE	22														
AMYGDALINE	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARBUTINE	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESCULINE	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SALICINE	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CELLOBIOSE	27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MALTOSE	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSE	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELIBIOSE	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACCHAROSE	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOSE	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INULINE	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELEZITOSE	34		+	+					+		+				+
D-RAFFINOSE	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMIDON	36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYCOGENE	37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XYLITOL	38	+													+
GENTIBIOSE	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-TURANOSE	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-LYXOSE	41														
D-TAGATOSE	42														
D-FUCOSE	43														
L-FUCOSE	44														
D-ARABITOL	45														
L-ARABITOL	46														
GLUCONATE	47														
2 CETO-GLUCONATE	48														
5 CETO-GLUCONATE	49														
ONPG	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT.	51														
H2S	52														
URE	53														
IND.	54														
V.P.	55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL.	56			+	+		+	+			+				
NIT.	57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAZ	58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GRAM	59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALASE	60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDASE	61														
SPORE	62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectinase	65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitinase	66	3+	3+	2+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	2+	3+	2+	2+	2+
Inhib. G.g.t sur PDA	67	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
Inhib. G.g.t sur King B	67	2	1	2	3	3	2	3	1	1	2	1	3	2	2

Souches du rhizoplan (suite)

NOMS DES SOUCHES		PMD 228	PMD 229	PMD 230	PMD 231	PMD 232	PMD 233	PMD 234	PMD 235	PMD 236	PMD 237	PMD 238	PMD 239	PMD 240	PMD 241
TESTS	N°														
GLYCEROL	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ERYTHROL	2														
D-ARABINOSE	3														
L-ARABINOSE	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIBOSE	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-XYLOSE	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-XYLOSE	7														
ADONITOL	8														
β ME-XYLOSIDE	9	+	+											+	+
GALACTOSE	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-GLUCOSE	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-FRUCTOSE	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-MANNOSE	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-SORBOSE	14														
RHAMNOSE	15														
DULCITOL	16														
INOSITOL	17														
MANNITOL	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SORBITOL	19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α ME-D-MANNOSIDE	20														
α ME-D-GLUCOSIDE	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N AC GLUCOSAMINE	22														
AMYGDALINE	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARBUTINE	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESCULINE	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SALICINE	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CELLOBIOSE	27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MALTOSE	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSE	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELIBIOSE	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACCHAROSE	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOSE	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INULINE	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELEZITOSE	34					+	+	+	+				+	+	
D-RAFFINOSE	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMIDON	36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYCOGENE	37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XYLITOL	38			+											
GENTIBIOSE	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-TURANOSE	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-LYXOSE	41														
D-TAGATOSE	42														
D-FUCOSE	43														
L-FUCOSE	44														
D-ARABITOL	45														
L-ARABITOL	46														
GLUCONATE	47										+				
2 CETO-GLUCONATE	48														
5 CETO-GLUCONATE	49														
ONPG	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT.	51														
H2S	52														
URE	53														
IND.	54														
V.P.	55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL.	56	+	+	+	+		+					+	+	+	+
NIT.	57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAZ	58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GRAM	59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALASE	60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDASE	61														
SPORE	62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectinase	65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitinase	66	2+	+	2+	+	2+	2+	3+	2+	3+	2+	2+	3+	3+	3+
Inhib. G.g.t sur PDA	67	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2
Inhib. G.g.t sur King B	67	3	1	2	2	2	2	2	1	2	3	1	3	2	0

Souches du rhizoplan (suite)

NOMS DES SOUCHES		PMD 242	PMD 243	PMD 244	PMD 245	PMD 246	PMD 247	PMD 248	PMD 249	PMD 250	PMD 251	PMD 252	PMD 253	PMD 254	PMD 255
TESTS	N°														
GLYCEROL	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ERYTHROL	2														
D-ARABINOSE	3														
L-ARABINOSE	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIBOSE	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-XYLOSE	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-XYLOSE	7														
ADONITOL	8														
β ME-XYLOSIDE	9	+		+			+			+	+			+	
GALACTOSE	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-GLUCOSE	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-FRUCTOSE	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-MANNOSE	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-SORBOSE	14														
RHAMNOSE	15														
DULCITOL	16														
INOSITOL	17														
MANNITOL	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SORBITOL	19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α ME-D-MANNOSIDE	20														
α ME-D-GLUCOSIDE	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N AC GLUCOSAMINE	22														
AMYGDALINE	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARBUTINE	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESCULINE	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SALICINE	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CELLOBIOSE	27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MALTOSE	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSE	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELIBIOSE	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACCHAROSE	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOSE	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INULINE	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MELEZITOSE	34				+		+			+		+		+	
D-RAFFINOSE	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMIDON	36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYCOGENE	37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XYLITOL	38									+	+			+	
GENTIBIOSE	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-TURANOSE	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-LYXOSE	41														
D-TAGATOSE	42														
D-FUCOSE	43														
L-FUCOSE	44														
D-ARABITOL	45														
L-ARABITOL	46														
GLUCONATE	47										+		+	+	
2 CETO-GLUCONATE	48														
5 CETO-GLUCONATE	49														
ONPG	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT.	51														
H2S	52														
URE	53														
IND.	54														
V.P.	55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL.	56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NIT.	57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAZ	58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GRAM	59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALASE	60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDASE	61														
SPORE	62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectinase	65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitinase	66	2+	3+	2+	2+	2+	3+	2+	2+	3+	2+	2+	2+	2+	2+
Inhib. G.g.t sur PDA	67	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	1
Inhib. G.g.t sur King B	67	1	2	3	3	2	1	2	3	1	2	1	2	2	2

Souches du rhizoplan (suite)

NOMS DES SOUCHES		PMD 256	PMD 257	PMD 258	PMD 259
TESTS	N°				
GLYCEROL	1	+	+	+	+
ERYTHROL	2				
D-ARABINOSE	3				
L-ARABINOSE	4	+	+	+	+
RIBOSE	5	+	+	+	+
D-XYLOSE	6	+	+	+	+
L-XYLOSE	7				
ADONITOL	8				
β ME-XYLOSIDE	9	+			+
GALACTOSE	10	+	+	+	+
D-GLUCOSE	11	+	+	+	+
D-FRUCTOSE	12	+	+	+	+
D-MANNOSE	13	+	+	+	+
L-SORBOSE	14				
RHAMNOSE	15				
DULCITOL	16				
INOSITOL	17				
MANNITOL	18	+	+	+	+
SORBITOL	19	+	+	+	
α ME-D-MANNOSIDE	20				
α ME-D-GLUCOSIDE	21	+	+	+	+
N AC GLUCOSAMINE	22				
AMYGDALINE	23	+	+	+	+
ARBUTINE	24	+	+	+	+
ESCULINE	25	+	+	+	+
SALICINE	26	+	+	+	+
CELLOBIOSE	27	+	+	+	+
MALTOSE	28	+	+	+	+
LACTOSE	29	+	+	+	+
MELIBIOSE	30	+	+	+	+
SACCHAROSE	31	+	+	+	+
TREHALOSE	32	+	+	+	+
INULINE	33	+	+	+	+
MELEZITOSE	34	+		+	+
D-RAFFINOSE	35	+	+	+	+
AMIDON	36	+	+	+	+
GLYCOGENE	37	+	+	+	+
XYLITOL	38				
GENTIBIOSE	39	+	+	+	+
D-TURANOSE	40	+	+	+	+
D-LYXOSE	41				
D-TAGATOSE	42				
D-FUCOSE	43				
L-FUCOSE	44				
D-ARABITOL	45				
L-ARABITOL	46				
GLUCONATE	47				+
2 CETO-GLUCONATE	48				
5 CETO-GLUCONATE	49				
ONPG	50	+	+	+	+
CIT.	51				
H <sub>2</sub> S	52				
URE	53				
IND.	54				
V.P.	55	+	+	+	+
GEL.	56	+	+	+	+
NIT.	57	+	+	+	+
GAZ	58	+	+	+	+
GRAM	59	+	+	+	+
CATALASE	60	+	+	+	+
OXYDASE	61				
SPORE	62	+	+	+	+
ARA	63	+	+	+	+
Cellulase	64	+	+	+	+
Pectinase	65	+	+	+	+
Chitinase	66	2+	2+	2+	2+
Inhib. G.g.t sur PDA	67	1	2	1	1
Inhib. G.g.t sur King B	67	0	2	2	3

Souches du rhizoplan (fin)



**ANNEXE 4**

**Détail du dendrogramme de similitude des phénotypes**







**ANNEXE 5**

**Réactions sérologiques des souches en ACP-ELISA**



NOM DES SOUCHES	Log N bactéries par ml	ANTI-CF43 1/10000	ANTI-CF43 1/1000	ANTI-RSA20 1/10000	ANTI-RSA20 1/1000
PMD51	6,4	1,48	2	0,1	0,28
PMD52	6,2	0,32	1,58	0,1	0,64
PMD53	5,9	0,02	0,1	0,18	0,98
PMD54	5,6	0	0,06	0,13	0,09
PMD55	6	0,03	0,06	0	0,25
PMD56	6,4	0,01	0,15	0,09	0,43
PMD57	6,9	0,47	1,6	0,06	0,4
PMD58	6,8	0,57	1,94	0	0,05
PMD59	6,7	0,72	2	0	0,11
PMD60	6,9	1	2	0	0,05
PMD61	7	1,02	2	0,01	0,07
PMD62	6,4	0,12	1,15	0,04	0,17
PMD63	6,4	0,17	1,27	0	0,05
PMD64	6,3	0,15	1,12	0	0,06
PMD65	6,5	0,29	1,42	0	0
PMD66	6,5	0,19	1,2	0	0,06
PMD67	6,1	0,02	0,09	0	0
PMD68	6	0,01	0,1	0	0
PMD69	5,6	0,21	1,06	0,29	0,46
PMD70	6,4	0,26	1,29	0,08	0,22
PMD71	5,5	0,12	0,11	0,08	0,42
PMD72	6	0	0,06	0	0,22
PMD73	6,6	0	0,05	1,77	2
PMD74	5,6	0,1	0,15	0,38	1,67
PMD75	5,2	0,8	1,57	0	0,1
PMD76	5,9	0,29	1,32	0	0,01
PMD77	5,2	0,15	1,34	0	0,02
PMD78	5,4	0,32	1,64	0	0,02
PMD79	6,7	0,74	1,76	0,06	0,31
PMD80	6,7	0,51	1,79	0,05	0,39
PMD81	6,1	1,57	2	0,27	0,61
PMD82	6,6	1,57	2	0,12	0,39
PMD83	6,4	0,83	1,99	0,11	0,66
PMD84	6,3	0,94	2	0,07	0,38
PMD85	6	0,5	1,86	0,06	0,38
PMD86	6,2	0,7	1,97	0,09	0,45
PMD87	6,4	0,66	1,94	0,08	0,15
PMD88	5,5	0	0	0,1	0
PMD89	5,6	0,16	0,16	0,11	0,23
PMD90	6,4	0,81	2	0,13	0,08
PMD91	6,8	0,46	1,59	0,03	0,19
PMD92	6,7	0,32	1,35	0,06	0,2
PMD93	6,7	0,32	1,36	0,05	0,19

Souches du sol non-rhizosphérique

NOM DES SOUCHES	Log N bactéries par ml	ANTI-CF43 1/10000	ANTI-CF43 1/1000	ANTI-RSA20 1/10000	ANTI-RSA20 1/1000
PMD100	6,4	0,73	2	0,02	0,19
PMD101	6,8	0,56	2	0,02	0,32
PMD102	6,7	0,4	1,93	0	0,07
PMD103	6,5	0,37	1,49	0,08	0,28
PMD104	5,5	0,24	0,9	0	0,25
PMD105	6,6	0,69	2	0	0,12
PMD106	6,8	2	2	0	0,08
PMD107	6,4	0,33	2	0	0,08
PMD108	6,4	2	2	0	0,11
PMD109	5,6	0,78	2	0	0,12
PMD110	6,4	0,8	1,27	0	0,1
PMD111	6,3	0,25	1,43	0	0
PMD112	5,6	0,21	1,36	0	0,05
PMD113	6,4	0,13	1,05	0,03	0,17
PMD114	6	0,15	1,2	0,02	0,05
PMD115	6,1	0,26	1,58	0,05	0,31
PMD116	5,7	0,07	0,82	0,02	0,07
PMD117	6	0,18	1,51	0,02	0,04
PMD118	5,6	0,15	1,07	0	0,03
PMD119	6,4	0,2	1,5	0	0,03
PMD120	6,5	0,38	1,64	0	0,03
PMD121	6,3	1,23	2	0,15	0,65
PMD122	5,8	0,47	1,79	0	0,04
PMD123	6,8	0,41	1,73	0	0,04
PMD124	5,5	0,34	1,49	0,06	0,24
PMD125	6,1	0,23	1,5	0	0,05
PMD126	6,4	0,64	1,89	0	0,07
PMD127	6,3	1,93	2	0,07	0,7
PMD128	6,3	0,66	1,95	0,03	0,2
PMD129	6,4	1,02	2	0,02	0,3
PMD130	6,4	0,78	2	0,06	0,18
PMD131	6,3	2	2	0,12	0,66
PMD132	6,5	0,35	1,74	0,03	0,09
PMD133	6,4	0,63	2	0,05	0,34
PMD134	6,5	0,65	2	0,05	0,31
PMD135	6,4	0,21	1,26	0,11	0,47
PMD136	6,3	0,16	1,17	0,08	0,31
PMD137	5,5	0,42	1,56	0,09	0,31

Souches du sol rhizosphérique

NOM DES SOUCHES	Log N bactéries par ml	ANTI-CF43 1/1000	ANTI-CF43 1/10000	ANTI-RSA20 1/10000	ANTI-RSA20 1/1000
PMD200	6,5	1,98	0,4	0	0,14
PMD201	6,7	2	0,38	0	0,15
PMD202	6,4	1,96	0,39	0	0,17
PMD203	6,6	1,99	0,38	0	0,19
PMD204	6,6	1,97	0,41	0	0,12
PMD205	6,5	1,92	0,36	0	0,13
PMD206	6,4	1,93	0,38	0	0,13
PMD207	6,5	1,93	0,38	0	0,14
PMD208	6,6	1,85	0,36	0	0,15
PMD209	6,6	1,95	0,4	0	0,16
PMD210	6,6	2	0,39	0	0,18
PMD211	6,5	2	0,36	0	0,14
PMD212	6,5	1,98	0,4	0	0,15
PMD213	6,6	2	0,39	0	0,17
PMD214	6,4	1,99	0,36	0	0,09
PMD215	6,5	2	0,42	0	0,07
PMD216	6,6	2	0,42	0	0,08
PMD217	6,6	2	0,34	0	0,15
PMD218	6,7	1,57	0,22	0	0,14
PMD219	6,4	1,83	0,67	0	0,15
PMD220	6,7	1,91	0,29	0	0,13
PMD221	6,9	1,45	0,22	0	0,15
PMD222	6,8	1,55	0,2	0	0,11
PMD223	6,7	1,53	0,2	0	0,17
PMD224	6,7	1,56	0,21	nd	0,16
PMD225	7	1,77	0,21	nd	0,17
PMD226	7	1,58	0,25	nd	0,16
PMD227	6,6	1,7	0,21	nd	0,18
PMD228	6,8	1,54	0,25	nd	0,16
PMD229	6,7	1,59	0,2	nd	0,18
PMD230	6,9	1,61	0,19	nd	0,15
PMD231	7	1,52	0,22	nd	0,15
PMD232	6,6	1,56	0,22	0	0,15
PMD233	7,7	1,85	0,56	0	0,07
PMD234	7,4	1,96	0,55	0	0,07
PMD235	7,7	1,87	0,65	0	0,12
PMD236	7,4	1,85	0,66	0	0,09
PMD237	7,7	1,89	0,63	0	0,13

Souches du rhizoplan

PMD238	7,7	1,86	0,79	0	0,16
PMD239	7,7	1,9	0,69	0	0,15
PMD240	6,9	1,79	0,28	0	0,15
PMD241	6,7	1,78	0,24	0	0,17
PMD242	6,8	1,79	0,26	0	0,16
PMD243	6,7	1,8	0,23	0	0,11
PMD244	6,8	1,86	0,24	0	0,12
PMD245	6,5	1,93	0,29	0	0,13
PMD246	6,6	1,78	0,22	0	0,17
PMD247	6,6	1,84	0,26	0	0,12
PMD248	6,7	1,88	0,26	0	0,18
PMD249	6,8	1,85	0,27	0	0,15
PMD250	6,5	1,75	0,24	0	0,15
PMD251	6,4	1,85	0,26	0	0,16
PMD252	6,5	1,76	0,23	0	0,2
PMD253	6,8	1,82	0,22	0	0,17
PMD254	6,6	1,85	0,24	0	0,18
PMD255	6,6	1,77	0,22	0	0,08
PMD256	6,7	1,7	0,22	0	0,12
PMD257	6,7	1,59	0,29	0	0,17
PMD258	7	1,64	0,21	0	0,14
PMD259	6,6	1,77	0,22	0	0,17
<b>Références</b>					
CF43	6,2	2	2	0,01	0,11
RSA20	6,5	0,01	0,02	2	2
842	6,9	0,71	1,22	2	0,13
10401	6,1	1	1,79	0,2	0,47
8244	6,6	0	0,17	0,15	0,5
9374	6,5	0,08	0,15	0,14	0,62

**Souches du rhizoplan + références**

<b>ANNEXE 6</b>
-----------------

## Milieux utilisés lors de l'étude des activité enzymatiques (Chapitre 3)

### Milieu à la cellulose (g/l)

CMC ou MN300	5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,04
NaCl	0,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3
Extrait de levure (Difco)	0,1
Gélose (bioMérieux)	15

- CMC : Carboxyméthylcellulose (Sigma) ; Cellulose MN300 (MACHEREL-NAGEL)
- pH ajusté à 7,0 avec de la soude normale
- Stérilisation par autoclavage (20 min à 120 °C)

### Milieu à la pectine (g/l)

Pectine «ruban rouge» (n° 4890 DESCHARMES)	5
bio-Polytone (Difco)	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5
Gélose	15

- Dissoudre la pectine avec quelques gouttes d'éthanol à 95%
- Mettre 1000 ml d'eau distillée et le phosphate bipotassique
- Agiter et ajuster le pH à 7,2 avec de la soude normale
- Ajouter les autres composés et chauffer légèrement avant de répartir dans des flacons de 200 ml
- Autoclaver 20 min à 120 °C.

**Mesure de l'activité pectate lyase (PL)****Milieu (g/l)**

Pectine «ruban rouge»	30
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,05
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,04
Extrait de levure	0,01
Tampon phosphate	15 ml
(Chapitre 1)	

Ce milieu est utilisé pour la production de l'inoculum bactérien et de l'extrait enzymatique. Le pH est ajusté à 6,8 avec de la soude normale. Stérilisation par autoclavage (20 min à 120 °C)

**Mesure de la PL**

Acide polygalacturonique (0,5 %) (Sigma)	0,3 ml
Extrait enzymatique	0,1 ml
Tris-HCl (pH 8,5)	1,5 ml
CaCl <sub>2</sub>	0,001 M
H <sub>2</sub> O bidistillée	1,1 ml

Le volume total est de 3 ml dans une cuve de 5 ml de contenance et 1 cm de chemin optique. Une activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme produisant une micromole de produit par minute. Le calcul de l'activité spécifique (unité enzymatique/mg de protéine) est effectué par la formule suivante

$$\text{Activité spécifique} = (\Delta A \times VR \times 10^6) / (\Delta t \times \epsilon \times d \times VE \times X) \mu\text{mol de résidus polygalacturoniques insaturés produits/min/mg protéines.}$$

$\Delta A$  : Absorbance

VR : volume réactionnel

$\Delta t$  : temps d'incubation ( en min)

$\epsilon_{235}$  : 4600 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Spectrometry nomenclature, 1965)

d : chemin optique de la cuve

VE : Volume de l'extrait enzymatique

X : mg protéines/l

Ce qui conduit après simplification : Activité spécifique =  $\Delta A \times 6521,74 / \Delta t \times X$   $\mu\text{mol de produit /min/mg protéines.}$

**Activité chitobiasique**

La solution stock de 4-méthylumbelliferyl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide (Sigma) est préparée en dissolvant 50  $\mu\text{mol}$  de ce produit dans 2 ml de diméthylformamide (Sigma). La solution pour le test est obtenue en diluant 0,6 ml de la solution stock dans 9,4 ml de tampon phosphate 0,1 M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,8 g.  $\text{l}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4 g  $\text{l}^{-1}$ ; pH 7,4). Ces deux solutions sont utilisées immédiatement, sans autoclavage, ou conservées à  $-20^\circ\text{C}$ .

ANNEXE 7
----------

## Production des exsudats du blé

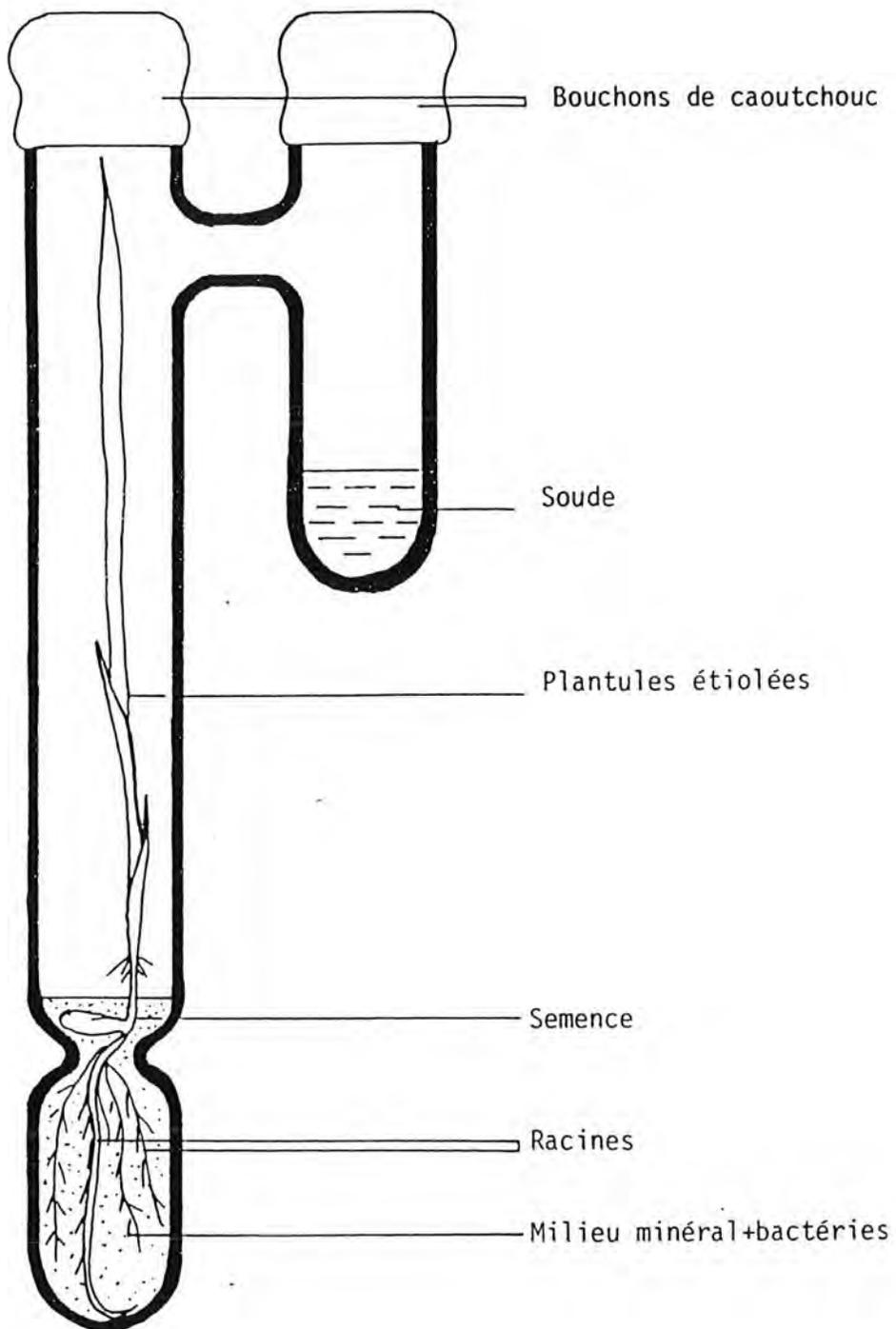
Les semences de blé sont stérilisées par deux traitements :

- trempage dans de l'hypochlorite de calcium ( 1 % dans de l'eau distillée stérile et décanté) avec quelques gouttes d'éthanol à 95 %. Après un traitement sous vide pendant 2 heures, les semences sont rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile.

- trempage dans de l'eau oxygénée 110 volumes diluée au 1/10 dans de l'eau distillée stérile. On réalise de nouveau un traitement sous vide pendant 20 minutes puis trois rinçages à l'eau distillée stérile.

Ces semences sont mises à germer à l'obscurité et à 30 °C dans des tubes de Pankhurst, légèrement modifié par des invaginations effectuées dans le tube principal. Un tube latérale contenant 2 ml de soude normale permet de piéger le CO<sub>2</sub> des respirations (plantes + bactéries). Le milieu minéral RCV (6 ml /tube) (Chapitre I) est utilisée pour la croissance des plantules à l'obscurité et convient également à celle des bactéries. Deux traitements été appliqués : plantule stérile et inoculée. L'inoculation des plantules a lieu 3 jours après la germination, lorsque les coléoptiles mesurent environ 5 cm. Les bactéries ont été cultivées 24 h en milieu LB, centrifugées (10 min à 10000 g) puis lavées dans du KCl. La concentration bactérienne finale est de 10<sup>5</sup> cellules/ml. Dix répétitions par traitements ont été réalisés.

Après une période d'incubation de 7 jours, le contenu des différents tubes sont récoltés, filtrés (Nalgène, 0,45 µm) puis conservés à -75 °C jusqu'au dosage des composés.



Tube de Pankhurst modifié : Une semence stérile ou inoculée par la bactérie germe en milieu minérale à l'obscurité. Le tube latérale contenant de la soude permet de piéger le  $\text{CO}_2$ . Les exsudats sont récoltés après 7 jours d'incubation à 30 °C.

ANNEXE 8
----------

### Liste des abréviations utilisées

AcPcx	: Anticorps polyclonaux
ACP-ELISA	: Antigens coated plate Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ATCC	: American Type Culture Collection (U.S.A)
BS	: Tampon borate de sodium
CB	: Tampon carbonate-bicarbonate de sodium
DSM	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Germany)
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GAR-PA	: Conjugué de lapin couplé à la phosphatase alcaline
HW	: Milieu de HINO-WILSON
IgG	: Immunoglobulines
LB	: Milieu liquide "complet" de LURIA-BERTANI
LG	: Milieu de LEDINGHAM
MBS	: Milieu à base de saccharose
NCIB	: National Collection of Industrial Bacteria (Scotland)
PBS	: Tampon phosphate
PBS-T	: Tampon phosphate + Tween
PBS-TC	: Tampon phosphate + Tween + caséine
4SC	: Milieu à quatre sources de carbone

## *TABLE DES MATIÈRES*



<b>TABLE DES MATIÈRES</b>
---------------------------

INTRODUCTION GENERALE	7
CHAPITRE I : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES DE <i>BACILLUS POLYMYXA</i> DU SOL ET DE LA RHIZOSPHERE DU BLÉ	13
I.- INTRODUCTION	15
II.- MATÉRIEL ET MÉTHODES	18
A.- MATERIEL	18
1.- Le sol	18
2.- Le blé	19
3.- Les milieux de culture	19
4.- Les souches bactériennes	21
5.- Le matériel et les produits pour l'immunopiégeage et l'ELISA	21
B.- METHODES	22
1.- Culture des plantes en phytotron	22
2.- Echantillonnage	23
3.- Préparation des échantillons pour l'immunopiégeage	23
4.- Préparation des sérums anti-CF43 et anti-RSA20	24
5.- Protocole de l'immunopiégeage	24
6.- Numération des <i>Bacillus polymyxa</i> immunopiégeés	27
7.- Identification des souches	27
8.- Caractérisation sérologique des souches en ACP-ELISA	29
9.- Conservation des souches	29
10.- Quantification de la microflore cultivable	31
11.- Quantification de la microflore fixatrice d'azote	32
12.- Quantification des spores de <i>Bacillus</i> producteurs de gaz	32
13.- Traitements statistiques	32

III.- RESULTATS	32
A.- DETERMINATION DES PARAMETRES CRITIQUES POUR L'IMMUNOPIEGEAGE	32
1.- Adsorption d'anticorps polyclonaux (AcPcx) sur les plaques	32
2.- Désorption des bactéries fixées aux anticorps	34
3.- Effet du nombre de lavages sur le taux de désorption	36
4.- Interaction AcPcx adsorbés-taux de désorption	37
5.- Spécificité du sérum polyclonal anti-CF43 en immunopiégeage	38
6.- Effet de la température d'incubation des échantillons de sol sur l'efficacité de l'immunopiégeage de <i>Bacillus polymyxa</i>	38
7.- Effet d'une bactérie hétérologue sur l'immunopiégeage de <i>Bacillus polymyxa</i> CF43	41
B.- IMMUNOPIEGEAGE DES SOUCHES DE <i>BACILLUS POLYMYXA</i> DU SOL NON-RHIZOSPHERIQUE, DU SOL RHIZOSPHERIQUE ET DU RHIZOPLAN	44
C.- IDENTIFICATION DES SOUCHES	46
1.- Taxonomie numérique	46
a.- Souches de références	48
b.- Souches immunopiégeées du sol non-rhizosphérique	48
c.- Souches immunopiégeées du sol rhizosphérique	48
d.- Souches immunopiégeées du rhizoplan	51
e.- Autres souches	51
f.- Tests complémentaires	56
g.- Le problème de la variabilité des tests	56
2.- Caractérisation sérologique	57
D.- ABONDANCE RELATIVE DE LA POPULATION DE <i>BACILLUS POLYMYXA</i> PARMIS LES PEUPELEMENTS DE BACTERIES DU SOL ET DE LA RHIZOSPHERE	60
IV.- DISCUSSION	62
A.- ADAPTATION DE L'IMMUNOPIEGEAGE A L'ISOLEMENT DE LA SOUCHE <i>BACILLUS POLYMYXA</i> CF43	62
B.- L'EFFICIENCE DE L'IMMUNOPIEGEAGE REPOSE SUR LA SPECIFICITE ET LA QUALITE DU SERUM	63
C.- IMMUNOPIEGEAGE DES SOUCHES DE <i>Bacillus polymyxa</i> DANS LE SOL NON-RHIZOSPHERIQUE ET RHIZOSPHERIQUE ET LE RHIZOPLAN DU BLE	64

D.- IDENTIFICATION NUMERIQUE DES SOUCHES	68
E.- VALEUR TAXONOMIQUE DE LA CARACTERISATION SEROLOGIQUE DES <i>BACILLUS POLYMYXA</i>	69
V.- CONCLUSION	69
<b>CHAPITRE II : DIVERSITÉ PHÉNOTYPIQUE, SÉROLOGIQUE ET GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE <i>BACILLUS POLYMYXA</i> DU SOL ET DE LA RHIZOSPHERE DU BLÉ</b>	71
PRESENTATION DE LA PUBLICATION	73
INTRODUCTION - RESULTATS - DISCUSSION - CONCLUSION (sous forme de publication en Anglais)	75
<b>CHAPITRE III : RECHERCHE DE CARACTÈRES D'ADAPTATION DES <i>BACILLUS POLYMYXA</i> A L'ENVIRONNEMENT RACINAIRE DU BLÉ</b>	101
I.- INTRODUCTION	102
II.- MATÉRIEL ET MÉTHODES	105
A.- ANALYSE EN COMPOSANTES LOCALES	105
B.- MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	105
1.- Acidité cellulolytique	105
2.- Activité pectinolytique	105
3.- Activité chitinolytique	106
C.- INHIBITION <i>IN VITRO</i> DU CHAMPIGNON <i>GAEUMANNOMYCES GRAMINIS</i> var. <i>TRITICI</i>	107
D.- TRAITEMENTS STATISTIQUES	107

III.- RESULTATS ET DISCUSSION	107
A.- NEURONES DES CARACTERES TROPHIQUES D'ADAPTATION A L'ENVIRONNEMENT RACINAIRE DU BLE	107
B.- CELLULOLYSE	113
C.- PECTINOLYSE	116
D.- CHITINOLYSE	117
E.- EFFET ANTIFONGIQUE	119
IV.- CONCLUSIONS	122
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	129
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129
ANNEXES	
Annexe 1 : Article publié dans la revue "Symbiosis"	151
Annexe 2 : Mesure de l'activité fixatrice d'azote	161
Annexe 3 : Profils biochimiques, activités enzymatiques, inhibition du champignon <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	162
Annexe 4 : Détail du dendrogramme de similitude des phénotypes	177
Annexe 5 : Réactions sérologiques des souches de <i>Bacillus</i> avec les sérums anti- <i>Bacillus polymyxa</i> CF43 et anti- <i>Bacillus circulans</i> RSA20 en ACP-ELISA	181
Annexe 6 : Milieux de culture des souches pour l'étude de leurs activités enzymatiques	187
Annexe 7 : Production des exsudats du blé	190
Annexe 8 : Liste des abréviations utilisées	192
TABLE DES MATIÈRES	193
RÉSUMÉS : Français et Anglais	199

## RÉSUMÉ

Des souches de *Bacillus polymyxa* ont été isolées du sol non-rhizosphérique, du sol rhizosphérique et du rhizoplan de blé à l'aide de "l'immunopîégeage". Cette méthode utilise comme piège des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre une souche de l'espèce *Bacillus polymyxa*. L'identification des souches isolées a été effectuée à l'aide de méthodes classiques basées sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques ainsi que l'utilisation des galeries API, en taxonomie numérique. La population de *Bacillus polymyxa* a été estimée entre 200 et 600 mille bactéries par g de matière sèche.

Une étude de la diversité fondée sur les caractères phénotypiques (galeries API), sérologiques (ELISA) et génotypiques (RFLP) a montré une variabilité plus importante pour la sous-population issue du sol alors que se dégage une relative homogénéité au sein de la sous-population du rhizoplan. Cette baisse de la diversité à la proximité des racines du blé serait un indice d'adaptation des *Bacillus polymyxa* à cette niche écologique. L'utilisation du sorbitol semble être l'un des caractères d'adaptation des *Bacillus polymyxa* à l'environnement racinaire du blé. La plante exerce donc une pression de sélection sur la sous-population de *Bacillus polymyxa* qui lui est associée, en sélectionnant certains caractères trophiques et certaines activités enzymatiques (chitinases, protéases).

**Mots-clés :** Adaptation, *Bacillus polymyxa*, Blé, Diversité, Génotype, Phénotype, Population, Rhizosphère.

## ABSTRACT

Strains of *Bacillus polymyxa* were isolated from non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and the rhizoplane of wheat by using an immunotrapping method. This technique involves using rabbit polyclonal antibodies raised against a strain of *Bacillus polymyxa* as a trap for isolating other strains belonging to the same species. The strains isolated were identified by morphological, physiological and biochemical (API strips) tests. The *Bacillus polymyxa* population size was estimated to be between 200 and 600 thousand bacteria per g dry weight of soil or roots.

The phenotypic, serological and genetic characters revealed a greater variability among the strains isolated from non-rhizosphere soil than those from rhizoplane. The lesser diversity seen within the sorbitol-utilizing *Bacillus polymyxa* subpopulation in the vicinity of the wheat roots (rhizoplane) indicate a process of adaptation. It therefore appears that the wheat roots may select a specific subpopulation from the soil *Bacillus polymyxa* population.

**Keywords:** Adaptation, *Bacillus polymyxa*, Wheat, Diversity, Genotype, Phenotype, Population, Rhizosphere

# UNIVERSITE DE NANCY I

NOM DE L'ETUDIANT : Monsieur MAVINGUI Patrick

NATURE DE LA THESE : DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I  
en MICROBIOLOGIE



VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 17 FEV. 1992 n° 82

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I





THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ  
Université de Nancy I - UFR-STMP  
Année 1992  
DISCIPLINE : Microbiologie  
Auteur : Patrick MAVINGUI  
Centre de Pédologie Biologique, C.N.R.S.  
B.P. 5, 54501 VANDOEUVRE-LES-NANCY Cedex  
FRANCE

## RÉSUMÉ

Des souches de *Bacillus polymyxa* ont été isolées du sol non-rhizosphérique, du sol rhizosphérique et du rhizoplan de blé à l'aide de "l'immunopiégeage". Cette méthode utilise comme piège des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre une souche de l'espèce *Bacillus polymyxa*. L'identification des souches isolées a été effectuée à l'aide de méthodes classiques basées sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques ainsi que l'utilisation des galeries API, en taxonomie numérique. La population de *Bacillus polymyxa* a été estimée entre 200 et 600 mille bactéries par g de matière sèche.

Une étude de la diversité fondée sur les caractères phénotypiques (galeries API), sérologiques (ELISA) et génotypiques (RFLP) a montré une variabilité plus importante pour la sous-population issue du sol alors que se dégage une relative homogénéité au sein de la sous-population du rhizoplan. Cette baisse de la diversité à la proximité des racines du blé serait un indice d'adaptation des *Bacillus polymyxa* à cette niche écologique. L'utilisation du sorbitol semble être l'un des caractères d'adaptation des *Bacillus polymyxa* à l'environnement racinaire du blé. La plante exerce donc une pression de sélection sur la sous-population de *Bacillus polymyxa* qui lui est associée, en sélectionnant certains caractères trophiques et certaines activités enzymatiques (chitinases, protéases).

Mots-clés : Adaptation, *Bacillus polymyxa*, Blé, Diversité, Génotype, Phénotype, Population, Rhizosphère.