



**HAL**  
open science

# Devenir d'une population bactérienne inoculée dans la rhizosphère du blé et ses effets sur la plante: Cas de *Bacillus Polymyxa*

Laurent Gouzou

► **To cite this version:**

Laurent Gouzou. Devenir d'une population bactérienne inoculée dans la rhizosphère du blé et ses effets sur la plante: Cas de *Bacillus Polymyxa*. Agronomie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1992. Français. NNT: 1992NAN10197. tel-01747586

**HAL Id: tel-01747586**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747586v1>**

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>

THESE  
présentée à  
l'UNIVERSITE DE NANCY I  
pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



par

Laurent GOUZOU

Devenir d'une population bactérienne inoculée dans  
la rhizosphère du blé et ses effets sur la plante :  
Cas de *Bacillus polymyxa*.

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

M.	A. HERBILLON, Professeur à l'Université de Nancy I	Président
Melle	L. JOCTEUR-MONROZIER, Chargé de Recherche au C.N.R.S., Lyon	Rapporteur
M.	J.C. GERMON, Directeur de Recherche, I.N.R.A., Dijon	Rapporteur
MM.	M. DIZENGREMEL, Professeur à l'Université de Nancy I	
	A. GUCKERT, Professeur à l' E.N.S.A.I.A., Nancy	
	J.C. CLEYET MAREL, Directeur de Recherche, I.N.R.A., Montpellier	
	T. HEULIN, Chargé de Recherche, C.N.R.S., Nancy	

*Ce travail a été en partie subventionné par la Coopérative Agricole Lorraine; il a été réalisé au Centre de Pédologie Biologique de Vandoeuvre-les-Nancy.*

*Je remercie vivement toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

***INTRODUCTION GENERALE.***

## INTRODUCTION GENERALE.

Les connaissances sur la biologie de la rhizosphère ont progressées depuis 1904 (HILTNER), à tel point que l'utilisation des micro-organismes rhizosphériques est envisagée pour favoriser la croissance des plantes. En effet, la capacité des micro-organismes du sol à libérer des métabolites (phytohormones, antibiotiques, vitamines, ac. aminés, enzymes, polysaccharides) intervenant sur les propriétés du sol, ainsi que sur la croissance et l'état sanitaire des plantes peut être considérée comme l'une des composantes essentielles de la fertilité d'un sol (KLOEPPER et al., 1989; LYNCH, 1990).

L'intérêt actuel de manipuler l'association plante/micro-organismes n'est pas seulement motivé par le désir d'augmenter la productivité agricole mais aussi par la prise de conscience générale sur l'urgence de la protection de notre environnement. Un des moyens de parvenir à la réduction des entrées de composés xénobiotiques dans les agrosystèmes est de reconnaître l'association plante/sol/micro-organismes comme une entité biologique capable d'optimiser les effets de ces produits, voire de les remplacer.

S'il est un rêve que caressent les agronomes, les agriculteurs ou les écologistes, c'est bien de voir un jour toutes les plantes fixer l'azote de l'air. Qu'elles réussissent à capter cet élément nécessaire à leur croissance, dans cette réserve gratuite et inépuisable qu'est l'air, et cela signifierait la fin des engrais azotés coûteux et à la longue, polluants. La nature elle-même a montré la voie puisque les légumineuses, par l'intermédiaire de leur symbiose avec *Rhizobium*, parviennent à fixer directement cet azote.

La fixation d'azote non symbiotique a été mise en évidence à plusieurs reprises dans la rhizosphère des céréales (BODDEY et DOBEREINER, 1988). Parmi les espèces végétales hébergeant une telle activité se trouvent le blé (*Triticum aestivum*), le riz (*Oryza sativa*), le maïs (*Zea mays*), la canne à sucre (*Saccharum officinarum*) et plusieurs espèces prairiales (NEYRA et DOBEREINER, 1977). Des bactéries fixatrices d'azote ont été isolées à partir des racines ou des rhizosphères de ces plantes. La plupart de ces isolats appartiennent aux genres *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella* et *Bacillus* (RENNIE, 1980).

Malgré les nombreux travaux de ces quinze dernières années, l'importance de la fixation d'azote non symbiotique comme source d'azote en agriculture reste controversée (MICHIELS et al., 1989), en

raison de l'absence de technique fiable pour estimer cette fixation. Il est généralement admis que la technique de dilution isotopique de N<sup>15</sup> donne la meilleure estimation de la contribution de la fixation biologique de l'azote dans la nutrition azotée des plantes (BODDEY et al., 1983).

Deux approches différentes ont été adoptées dans l'étude de cette association non symbiotique (CHALK, 1991). La première consiste à évaluer l'activité fixatrice dans la rhizosphère d'un sol non stérile et non inoculé. Il a été ainsi montré que les céréales comme le riz, la canne à sucre et le blé pouvaient bénéficier de la fixation d'azote qui leur était associée. Mais dans ces expériences, les micro-organismes responsables de cette activité ne sont pas identifiés. La seconde approche consiste à inoculer, dans un sol stérilisé ou non, des souches d'espèces bactériennes fixatrices d'azote en culture pure ou en mélange. Les résultats obtenus dans ce type d'études sont complexes, car les réponses à l'inoculation de la plante peuvent être dues non seulement à la fixation d'azote mais aussi à d'autres activités de la bactérie. Les plus fréquemment rapportées sont la production de phytohormones, la suppression d'agents pathogènes dans l'environnement rhizosphérique et la solubilisation des phosphates (KLOEPPER et al., 1989).

L'inoculation du blé avec des bactéries fixatrices telles que, *Azotobacter* spp. (MISHUSTIN, 1970; KUNDU et GAUR, 1980), *Azospirillum brasilense* (KAPULNIK et al., 1981) ou *Bacillus polymyxa* (RENNIE et LARSON, 1979) a été décrite comme stimulant significativement la production de matière sèche, le prélèvement d'azote par la plante ou le rendement en grain. Cependant ces résultats ne peuvent s'expliquer uniquement par une fixation d'azote dans la rhizosphère. En effet, l'inoculation d'un mutant d'*A. brasilense* ne fixant pas l'azote atmosphérique, produit les mêmes résultats (O'HARA et al., 1981).

Même si la connaissance sur les mécanismes de l'association entre la plante et les bactéries fixatrices sont réduites, il semble que la fixation non symbiotique joue un rôle mineur dans le cycle de l'azote sous cultures, en climat tempéré (BARBER et LYNCH, 1977; LETHBRIDGE et al., 1982).

Les stratégies utilisées pour isoler ces bactéries d'intérêt agronomique sont très diverses. Les souches, isolées d'échantillons de sols ou de racines, sont testées pour leurs effets sur différentes espèces ou variétés végétales afin d'obtenir la combinaison donnant la meilleure réponse (HOLL et al., 1988). De telles méthodes peuvent être longues, laborieuses et hasardeuses quant aux résultats obtenus. L'efficacité d'un inoculum bactérien n'est pas universelle et des interactions spécifiques entre espèces végétales ou génotypes et souches bactériennes ont été observées à plusieurs reprises (HOLL, 1983; RENNIE et LARSON, 1979; BALDANI et DOBEREINER, 1980). S'il existe des caractères d'adaptation des bactéries rhizosphériques à leur plante hôte, alors la probabilité d'augmenter les performances de la plante après inoculation d'une souche bactérienne coexistante sera meilleure que si la plante est inoculée

par une souche avec laquelle elle n'a jamais été en contact au préalable (CHANWAY et al., 1988 a). De même, les chances de trouver une bactérie potentiellement bénéfique dans un sol seront augmentées en sélectionnant des isolats à partir de rhizosphères de plantes ayant été cultivées dans ce sol durant une assez longue période.

En considérant ces hypothèses, des bactéries potentiellement promotrices de croissance des plantes ont été recherchées par l'Equipe d'Ecologie Microbienne du C.P.B.-Nancy, dans des sols où le blé est cultivé de façon intensive (HEULIN et al., 1991). Les isolats ont été obtenus à partir de rhizosphères (racines + sol adhérent) de plantules de blé de printemps en prenant en compte deux critères : leur activité fixatrice d'azote et leur abondance dans la rhizosphère. Ces deux caractères, l'un qualitatif et l'autre quantitatif, peuvent être considérés comme des critères d'adaptation à la rhizosphère de la plante étudiée. Le modèle spermosphère décrit par THOMAS-BAUZON et al. (1982), à l'occasion d'une étude des bactéries fixatrices d'azote associées aux racines de riz, a été utilisé pour ces isolements.

*Bacillus polymyxa* est apparu comme la population fixatrice d'azote dominant dans 3 des 4 sols français étudiés (HEULIN, 1991). La population fixatrice du quatrième sol était constituée de *Rahnella aquatilis*. La taille de ces populations variait de 1 à  $5.10^5$  bactéries.g<sup>-1</sup> de poids sec de sol rhizosphérique, soit 0,1% de la microflore rhizosphérique totale. L'activité réductrice d'acétylène des souches de *B. polymyxa*, mesurée en modèle spermosphère, était nettement supérieure en moyenne à celle des souches de *R. aquatilis*. Parmi les isolats de *B. polymyxa* testés, la souche CF43 s'est avérée la plus efficiente pour la fixation d'azote dans la rhizosphère du blé.

*Bacillus polymyxa* est une bactérie Gram positif, formant des endospores. L'activité fixatrice d'azote de cette espèce a été mise en évidence pour la première fois par BREDEMANN en 1908, mais n'a vraiment été admise qu'après les travaux de HINO et WILSON en 1958. Parmi les souches testées en système gnotobiotique, LINDBERG et al. (1985) montrent que *B. polymyxa* possède la plus forte activité nitrogénasique dans la rhizosphère du blé. Cependant d'autres activités, dont la plante hôte pourrait bénéficier, ont été décrites chez cette espèce. La bactérie peut produire des composés solubilisant les phosphates (TIWARI et al., 1989), des antibiotiques contre des agents pathogènes (BACKHOUSE and STEWART, 1989) ou des substances de croissance (SATTAR et GAUR, 1987).

Tandis que cette espèce paraît largement distribuée dans les sols (BREDEMANN, 1908; JENSEN, 1963; SELDIN et al., 1983; CHANWAY et al., 1988 b) les connaissances sur l'écologie de cette bactérie sont encore réduites.

DORNER (1924) rapporte que, sous prairie, la population de *B. polymyxa* est de l'ordre de  $10^3$  à  $10^5$  bactéries.g<sup>-1</sup> de sol. Des densités équivalentes ont été observées par SELDIN et al. (1983) dans des sols brésiliens. Les relations entre les souches de *Bacillus* fixateurs d'azote et les racines de blé ont été étudiées par LARSON et NEAL (1978) et LINDBERG et al. (1985). Ils ont mis en évidence l'existence d'une étroite relation entre la plante et la bactérie. Des cellules bactériennes sont observées dans la couche de mucilage en surface des racines et dans l'espace intercellulaire du cortex. Il semble qu'il y ait une relation entre la production d'un matériel muqueux à la surface des racines et la présence de *Bacillus* fixateurs d'azote (RAJU et al., 1972; NEAL et LARSON, 1976).

L'adaptation à la rhizosphère, l'activité fixatrice d'azote et la production de substances de croissance par *B. polymyxa* sont prometteuses pour l'étude du couple *B. polymyxa*/blé.

L'étude de cette association a montré que l'inoculation du blé avec des isolats de *B. polymyxa* influençait la croissance de la plante, sa productivité ainsi que son prélèvement d'azote (NEAL et al., 1973; RENNIE et LARSON, 1979; KUNDU et GAUR, 1980). La souche *B. polymyxa* CF43, isolée au laboratoire, a été inoculée au champ à deux reprises. Les expériences conduites par BERGE (1984) et BOURGAUD (1987) ont montré que l'inoculation des semences d'un blé de printemps avec cette souche permettait d'augmenter significativement les rendements en grain, même lorsque le blé était correctement fertilisé : + 16% avec 120 kg N/ha (1984) et + 8% avec 60 kg N/ha (1987). Un effet positif a été également observé sur la hauteur de la plante (1984) et sur le tallage épis (1987).

La souche CF43 apparaît comme un bon modèle dans l'étude de l'association entre le blé et *B. polymyxa*. L'objectif du travail présenté dans ce mémoire est d'évaluer l'effet direct ou indirect de *B. polymyxa* CF43 sur la croissance du blé après inoculation, en s'attachant particulièrement au devenir, dans la rhizosphère, de la bactérie introduite.

L'étude de la dynamique de populations de bactéries rhizosphériques est à la base de l'étude de leurs effets sur la plante après inoculation. Le suivi de la colonisation de la rhizosphère du blé par *B. polymyxa* a donc été l'un des objectifs principaux de ce travail. Le chapitre 1 concerne la mise au point de méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) compatibles avec une estimation de la taille de la population de *B. polymyxa* dans la rhizosphère et sur les racines de blé, cultivé en conditions de plein champ.

Ces méthodes nous ont permis de suivre l'évolution de la population de *Bacillus polymyxa* dans la rhizosphère en relation avec des paramètres édaphiques tels que la fertilisation azotée ou la texture du sol (chapitre 2). Dans cette étude de l'interaction entre une population bactérienne et les constituants

minéraux du sol, nous avons envisagé le rôle des micro-organismes dans la structuration du sol rhizosphérique.

Le chapitre 3 est consacré à l'étude en taille réelle, de l'intérêt agronomique de l'inoculation du blé avec la souche *B. polymyxa* CF43. A trois reprises nous avons suivi l'effet de l'inoculation en facteur croisé avec la fertilisation azotée, sur l'élaboration du rendement d'un blé de printemps.

Les résultats sont discutés pour chacun de ces chapitres et les perspectives qu'ils suggèrent sont développées dans la conclusion générale.

## CHAPITRE 1

### Quantification de la population de *Bacillus polymyxa* à l'aide de méthodes immuno-enzymatiques.

- **Partie 1** : Adaptation de méthodes immuno-enzymatiques à la quantification de *Bacillus polymyxa* CF43, en culture pure.
- **Partie 2** : Dispersion et floculation des sols pour la détection de *Bacillus polymyxa* par ACP ELISA.

# 1. Adaptation de méthodes immuno-enzymatiques à la quantification de *Bacillus polymyxa* CF43, en culture pure.

## 1.1. INTRODUCTION.

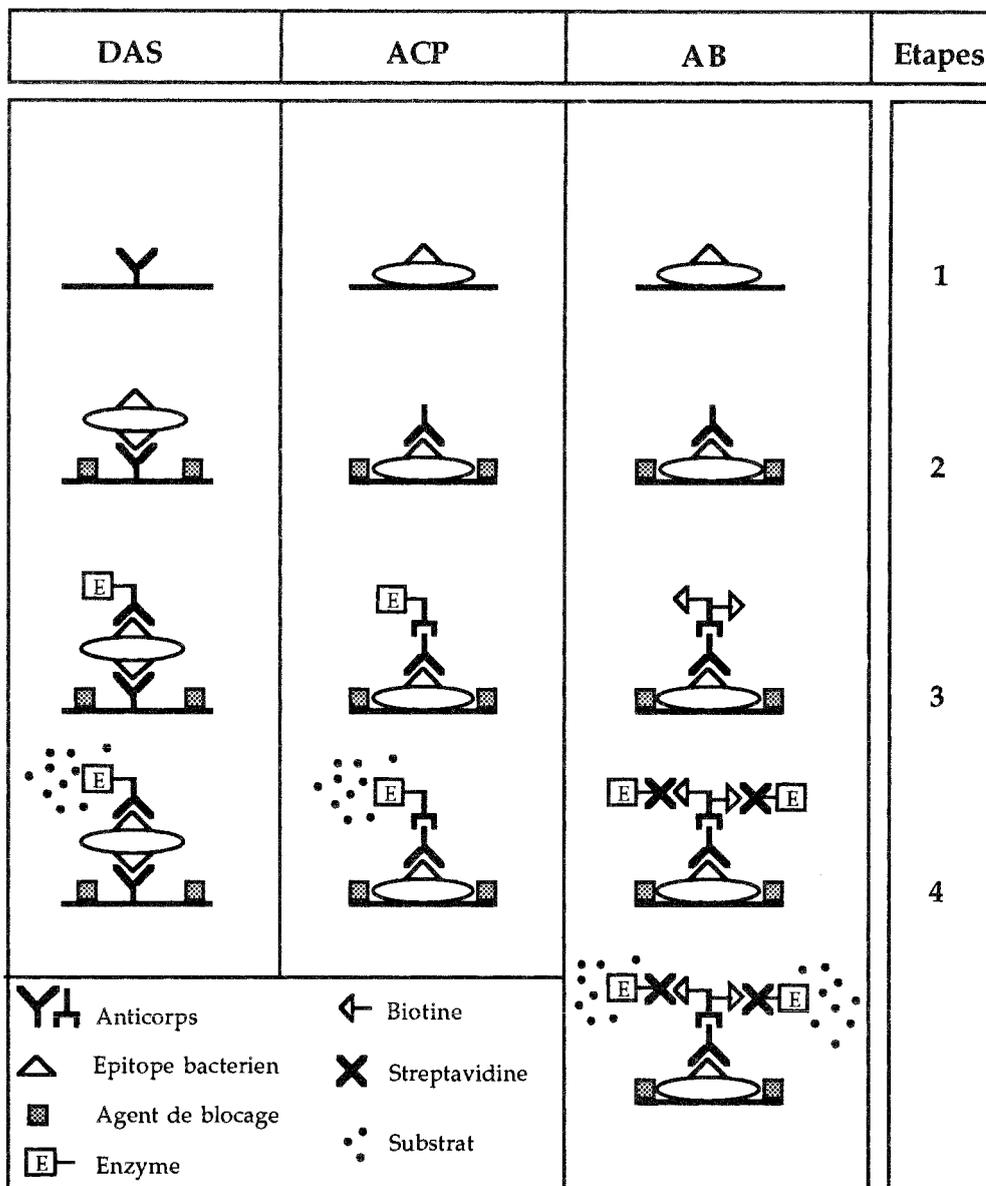
Le choix et la mise au point de la méthode de détection sont imposés par la nature de l'échantillon dans lequel la bactérie étudiée se trouve. En effet, il faut être capable de détecter et de dénombrer dans un milieu complexe et hétérogène comme le sol, une population microbienne estimée à  $10^5$  bactéries.g<sup>-1</sup> sec de sol, soit environ 0,1% de la microflore totale. La méthode devra donc être spécifique, sensible, fiable, mais aussi rapide et facile à mettre en oeuvre afin d'être applicable à un grand nombre d'échantillons.

Le sol et la rhizosphère hébergent une microflore abondante et diversifiée et la détection d'une population particulière par emploi de milieux sélectifs est souvent impossible (GRAY T. R. G. 1969). Dans le cas où elle est envisageable, cette méthode reste fastidieuse.

L'intérêt croissant porté à l'étude des bactéries génétiquement manipulées et des transferts de gènes dans l'environnement a nécessité la mise en place de nouvelles méthodologies. Les techniques utilisées en biologie moléculaire permettent de détecter spécifiquement certains gènes et par conséquent l'organisme porteur de ces gènes (HOLBEN et al., 1988). De plus, on peut facilement extraire de l'ADN du sol, sans se soucier de préserver l'unité de l'organisme (TORSVIK and GOKSOYR, 1978). Ces techniques permettent de s'affranchir des nécessités de culture du micro-organisme et de le détecter spécifiquement dans des milieux complexes comme le sol ou les tissus végétaux. Dans les années 70, la méthodologie de détection des acides nucléiques reposait principalement sur l'hybridation moléculaire.

La mise au point par SAIKI et al. (1988) de la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction), que l'on peut définir comme l'amplification sélective d'une courte région d'acide nucléique à l'aide d'amorces nucléotidiques et d'une polymérase thermorésistante, a permis d'améliorer très nettement les performances obtenues en hybridation moléculaire. La succession des cycles d'amplification permet d'obtenir des millions de copies à partir d'une seule séquence initiale, et donc, théoriquement de détecter une seule copie du génome du micro-organisme. Cette technique a été mise au point pour la détection des

Figure 1 : Représentation schématique des différentes variantes d'ELISA.



- 1 - Fixation des anticorps ou des antigènes.
- 2 - Dépot des antigènes ou des anticorps.
- 3 - Révélation par l'anticorps marqué. L'utilisation d'un système d'amplification suppose une étape supplémentaire (ex : AB ELISA).
- 4 - Introduction du substrat.

virus et des viroïdes, et s'étend actuellement aux bactéries et champignons. En pratique, la PCR peut détecter 1 picogramme d'ADN de la bactérie *Erwinia chrysanthemi*, soit 100 bactéries (DARASSE, 1989), voire même 1 cellule d'*Agrobacterium* dans un échantillon contenant une quantité d'ADN non cible équivalent à  $10^8$  bactéries (PICARD et al., 1991). Ces techniques permettant d'accéder à l'étude directe des génotypes vont sûrement révolutionner l'approche de l'écologie microbienne. Mais cette extrême sensibilité constitue actuellement une des limites de la méthode. En effet, une très faible contamination d'un échantillon peut engendrer de graves erreurs, nécessitant l'introduction de contrôles positifs et négatifs dans l'analyse. D'autre part, le domaine d'application de la PCR reste essentiellement qualitatif et on dispose de peu d'exemples d'application pour la quantification des micro-organismes du sol.

Ces techniques d'amplification ont été développées pour répondre à la nécessité d'aller, dans certains cas, au-delà des seuils de sensibilité obtenus avec les méthodes immuno-enzymatiques (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay ou ELISA). Depuis les travaux de ENGVALL et PERLMAN (1972) et ceux de CLARK et ADAMS (1977), les anticorps marqués avec une enzyme sont couramment employés pour l'identification spécifique de micro-organismes. Ces méthodes sont fondées sur l'utilisation d'un marqueur enzymatique fixé à un anticorps, un antigène ou un haptène, dont la présence permet la détection de la réaction antigène-anticorps, invisible par ailleurs. Le dosage proprement dit revient à la mesure de l'activité de l'enzyme fixée (phosphatase alcaline, peroxydase).

Le test ELISA "sandwich" ou DAS-ELISA (Fig.1) reste le protocole le plus couramment employé. Mais d'autres variantes ont été adoptées dans le but d'en améliorer la spécificité et la sensibilité, et d'en simplifier l'exécution.

Afin d'améliorer la sensibilité on a recours à des méthodes dites indirectes ou ACP ELISA (Antigen Coating Plate ELISA; Fig.1). Dans ce protocole, l'adsorption directe de l'antigène sur le support, évite l'étape de sensibilisation de la plaque du DAS ELISA, particulièrement gourmande en anticorps spécifiques. De plus elle permet d'utiliser des systèmes indirects de révélation, avec seulement un seul type d'anticorps spécifique de la bactérie, employé très dilué. De plus, plusieurs Ig G couplées à l'enzyme peuvent s'associer sur chaque Ig G fixée sur la bactérie, donnant ainsi un premier degré d'amplification. Pour amplifier encore plus la réaction on peut faire intervenir des couples de molécules présentant entre elles une très forte affinité, tel que le complexe streptavidine-biotine, Fig.1 (YOLKEN et al., 1983). La streptavidine, glycoprotéine isolée à partir de *Streptomyces avidinii*, présente une affinité exceptionnelle pour la biotine, vitamine de faible poids moléculaire (constante d'affinité  $10^{15}$  M). On peut coupler la biotine aux anticorps et la streptavidine à une enzyme. Comme il est possible de fixer plusieurs molécules de biotine sur un anticorps, un anticorps biotinylé peut donc réagir avec

plusieurs conjugués streptavidine-enzyme. L'amplification du signal qui en découle permet d'obtenir une meilleure sensibilité, pour peu que l'on sache limiter les réactions non spécifiques. Pour pallier à cet inconvénient, on peut utiliser des protéines (albumine, caséine, gélatine) pour bloquer les sites libres ou avoir recours aux anticorps monoclonaux.

Le principe de l'ACP ELISA a trouvé un essor particulier dans la technique utilisant des membranes de nitrocellulose ou de nylon en remplacement du polystyrène des plaques de microtitration. Cette technique ( Dot Immuno Blot-ELISA) n'est pas encore adaptée à l'automatisation mais elle offre les avantages d'être simple et rapide. Le fait que l'on puisse travailler avec de plus faibles volumes d'échantillon, conserver les membranes, sont des atouts supplémentaires. Récemment, est apparue la technique ELIFA ou Enzyme-Linked Immuno-Filtration Assay. La révélation de la réaction antigène-anticorps se fait selon le principe des méthodes ELISA. L'avantage de cette technique vient du fait que l'ensemble des réactions se fait par filtration à travers une membrane de nitrocellulose. La concentration des éléments sur la membrane lors de la filtration assure l'adsorption d'une plus grande quantité d'antigènes et favorise le contact de ceux-ci avec les anticorps. Plus sensible, la technique ELIFA est aussi plus rapide que les méthodes ELISA (JSSELMUIDEN et al., 1989).

La sensibilité acquise rapproche de plus en plus le seuil limite de détection de ces techniques immuno-enzymatiques de celui atteint par les méthodes utilisant les sondes nucléiques. Il n'en reste pas moins que, quelque soit le protocole employé, la qualité des réactifs, en relation avec celle des préparations ayant servi aux immunisations, conditionnera la spécificité et la sensibilité du test.

Le but du travail présenté dans cette partie, est de développer une méthode immuno-enzymatique, adaptée à l'identification et au dénombrement de *Bacillus polymyxa* en culture pure. Nous nous sommes particulièrement attachés à des critères de sensibilité et de spécificité, mais aussi à la rapidité et à la facilité de mise en oeuvre de la méthode. Nous avons testé des protocoles de type ACP ELISA, AB ELISA et Dot ELISA (système ELIFA).

## 12. MATERIEL ET METHODES.

- *La souche Bacillus polymyxa CF43 .*

Elle a été isolée de la rhizosphère de blé d'un sol limono-sableux ( HEULIN et al.,1991). Son abondance dans la rhizosphère du blé était de l'ordre de  $10^5$  bactéries par gramme de sol. Outre sa forte activité antagoniste contre *Gaeumannomyces graminis* var. tritici (agent du piétin échaudage chez le blé), c'était l'une des souches de *B. polymyxa* les plus efficaces pour la fixation de l'azote atmosphérique. Elle a été identifiée à l'aide de galeries API 20B et 50CH. *In vitro*, sa forme végétative apparaît comme un bâtonnet de  $1\mu\text{m}$  de diamètre et de 2 à  $5\mu\text{m}$  de longueur, très mobile. Elle forme des endospores subapicales déformantes.

- *Autres souches utilisées .*

Les noms des souches utilisées pour cette étude ainsi que leur provenance, figurent dans le tableau 1. La spécificité des méthodes a été testée vis à vis de la souche type de *Bacillus polymyxa* (ATCC 842), de souches de *B. polymyxa* isolées de la rhizosphère du blé, de la souche type de *Bacillus circulans* (NCIB 9374) et de souches de *B. circulans* isolées de la rhizosphère du maïs. L'ensemble des souches rhizosphériques ont été isolées au Centre de Pédologie Biologique de Nancy ( HEULIN et al., 1991; BERGE et al., 1991). De plus, le laboratoire dispose d'une collection originale de *B. polymyxa* isolés d'un sol limono-sableux par immunopiegeage (MAVINGUI et al., 1990). Les souches que nous avons utilisées provenaient de 3 compartiments différents : sol non rhizosphérique, sol rhizosphérique et rhizoplan de blé. La souche de *Pseudomonas fluorescens* PH12b, également isolée de la rhizosphère du blé de ce même sol limono-sableux, m'a été fournie par P. HEBBAR. Lors de son isolement, elle représentait à elle seule, 10% de la microflore rhizosphérique totale exprimée en CFU.

- *Milieux de culture.*

Les souches de *B. polymyxa* ont été cultivées sur un milieu liquide Luria Bertani modifié (LB). Leur sporulation est obtenue dans un milieu à base d'amidon. La souche *P. fluorescens* PH12b a été produite en bouillon nutritif (NB). La composition de ces milieux est présentée en annexe 1.

- *Récupération des bactéries.*

Les échantillons bactériens ont été préparés selon différents procédés.

Tableau 1 : Présentation des souches bactériennes utilisées en ELISA.

Nom de la souche	Plante hôte	Localisation	Station	Provenance
------------------	-------------	--------------	---------	------------

*Bacillus polymyxa* :

842	-	-	-	ATCC (1)
CF36, CF38, CF43	blé	Rhizosphère (2)	Nemours	CPB-Nancy
CH5, CH29	blé	Rhizosphère	Châlons	CPB-Nancy
BG7	blé	Rhizosphère	Boigneville	CPB-Nancy
PMD 66, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 84, 85	blé	Sol nu	Dieulouard	CPB-Nancy
PMD 103, 105, 106, 108 et de 111 à 118	blé	Rhizosphère	Dieulouard	CPB-Nancy
PMD 200 à 203, 220 à 223, 240 à 243	blé	Racines	Dieulouard	CPB-Nancy

*Bacillus circulans* :

9374	-	-	-	NCIB (3)
TRO4	Maïs	Rhizosphère	Trogny	CPB-Nancy
RS7, RS19, RS20	Maïs	Rhizosphère	Ramonville	CPB-Nancy

*Pseudomonas fluorescens* :

PH 12b	blé	Rhizosphère	Dieulouard	CPB-Nancy
--------	-----	-------------	------------	-----------

(1) ATCC : American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA).

(2) Rhizosphère : comprenant les racines et leur sol adhérent.

(3) NCIB : National Collection of Industrial Bacteria (Aberdeen, Scotland).

- Les suspensions de cellules végétatives ont été obtenues après incubation des milieux ensemencés, à 32°C pendant 16 heures sous agitation. A ce stade, les cultures étaient en fin de phase exponentielle. Elles ont alors été centrifugées à 10 000 g pendant 20 mn. Les culots obtenus ont été lavés dans un tampon phosphate (PBS) dont la composition figure en annexe 2.

- Pour la mise en évidence d'antigènes solubles, les surnageants de centrifugation ont été filtrés sur membrane Minisart 0,2 µm (SM 165 34).

- Dans un milieu à base d'amidon, la souche *B. polymyxa* CF43 commence à sporuler dès le 2<sup>ème</sup> jour. Mais plus d'une semaine après (10 j), il persiste encore des formes végétatives (environ 25%). Dans le but de récupérer exclusivement les spores, la culture a été centrifugée à 10000 g pendant 20 mn. Le culot, repris dans l'eau distillée stérile, a été pasteurisé 10 mn à 80°C. La suspension a été à nouveau centrifugée afin de séparer les spores des cellules végétatives lysées.

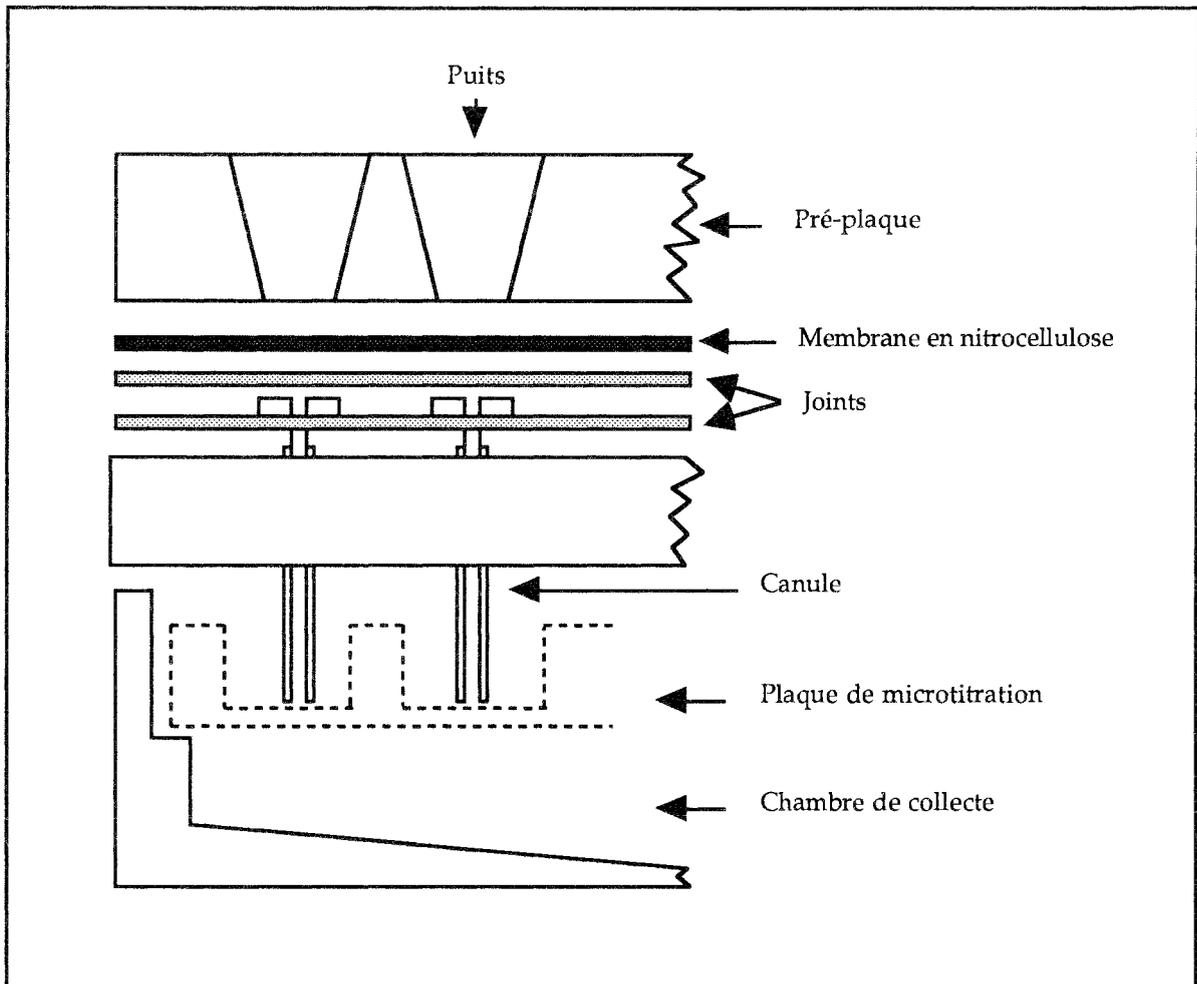
Une fois prêtes, les suspensions de bactéries ont pu être utilisées immédiatement en ELISA ou bien congelées à - 80°C, sans qu'elles aient perdu leurs propriétés antigéniques.

- *Numération des bactéries.*

Le comptage des bactéries a été effectué par numération directe sur lame de Thoma. A l'aide d'un microscope Leitz (Dialux 20, objectif 40/0,65), nous avons compté le nombre de cellules dans 16 carrés de 0,0025 mm<sup>2</sup>. La moyenne obtenue, multipliée par 4x10<sup>6</sup>, donne le nombre total de cellules par ml de suspension. On a considéré comme cellule, une bactérie de la taille moyenne de *B. polymyxa* CF43 en milieu LB (soit 3 à 5 µm de longueur) afin de réduire le risque d'erreur dû au polymorphisme entre souches (tel que la taille importante des souches BG7 et TRO4, les amas cellulaires des souches RS7 et RS20). Comparativement à une numération indirecte (Most Probable Number, Colony Forming Unit) cette méthode de comptage directe donne une meilleure estimation de la surface bactérienne sur laquelle le sérum est susceptible de venir se fixer.

- *Production de l'antisérum.*

Des cellules végétatives entières de *B. polymyxa* CF43 ont été utilisées pour induire la production d'anticorps. Les bactéries ont été produites sur milieu LB après une incubation de 16 h à 32 °C. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 10 000 g durant 20 mn et lavées à 3 reprises dans du PBS stérile, pH 7,2. Le culot a été repris dans un volume minimum de PBS afin d'obtenir une suspension à 10<sup>9</sup> cellules/ml. La préparation de l'antisérum a été réalisée par A. DORIER (I.U.T. Biologie Appliquée,



**Figure 2 : Coupe schématique du système ELIFA.** Le système comprend 3 pièces en plexiglass. La pré-plaque repose sur une membrane en nitrocellulose à travers laquelle s'effectue la filtration. Des joints assurent l'étanchéité, une fois le système fermé. Les canules permettent de transférer les filtrats de chaque puits dans la chambre de collecte ou dans une plaque de microtitration lorsqu'il s'agit du substrat.

Lyon). Le sérum a été produit par des lapins issus du croisement entre races néo-zélandaise et californienne. Des séries d'injections ont été effectuées jusqu'à obtention d'un titre supérieur à 1:1000. Le sérum a été récupéré après prélèvement du sang par ponction cardiaque. Il a été réparti en fraction de 200 µl et congelé à -20°C. Son titre initial, mesuré par test d'agglutination, était de 1:2560. Par la suite, une purification partielle des IgG du sérum a été effectuée selon la technique du relargage des protéines par les sels. Les Ig G ont été précipités par une solution de sulfate d'ammonium à 3,9 M. Le précipité ainsi obtenu a été dialysé contre du PBS, afin d'éliminer le sulfate d'ammonium. Au terme de la purification, nous avons obtenu une solution contenant 12,7 mg d' Ig G/ml.

• *Matériel et produits utilisés en ELISA.*

(i) **ACP ELISA.** Plaques de microtitration Nunc Maxisorp F96 (réf. 439453); PBS, pH 7,2; Tampon tris, pH 7,6 (TBS, composition en annexe 2); Tween 20 (Prolabo, 28 829.296); albumine de sérum bovin (Sigma, A-7030); Conjugué constitué d'Ig G de chèvre anti-Ig G (H+L) de lapin, couplées à la phosphatase alcaline (Biosys-BI 2507); p-nitrophényl phosphate (Boehringer Mannheim, 107 905); diéthanolamine (Prolabo, 23 374.291). L'agitation des plaques est effectuée avec des agitateurs de microplaques (Bioblock, 86247), les lavages avec un laveur automatique 96 canaux (Dynatech AM 56) et les lectures d'absorbance avec un lecteur de microplaque (Dynatech MR5000) équipé de filtres interférentiel de 405 nm et 630 nm.

(ii) **AB ELISA.** Même matériel, tampons et solution saturante qu'en ACP ELISA; anticorps biotinylés d'âne anti-Ig G de lapin (Amersham, RPN 1004); streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (Amersham, RPN 1234).

(iii) **ELIFA.** Ce protocole a nécessité l'utilisation du système Easy-Titer ELIFA de Pierce couplé à une pompe péristaltique (Fig. 2); membrane en nitrocellulose de 0,45 µm (Pierce, No. 77011). Les réactifs sont identiques à ceux employés en ACP ELISA.

• *Conduite des réactions immuno-enzymatiques.*

(i) **ACP ELISA.** Ce protocole s'inspire de ceux proposés par F. BOURGAUD (1987) et ARSAC et CLEYET-MAREL (1986). L'adsorption des antigènes à la surface des puits (coating) a été faite de la façon suivante. Les bactéries ont été mises en suspension et éventuellement diluées dans du PBS à pH 7,2. Un volume de 100 µl de ces suspensions a été déposé dans chaque puits. Après assèchement durant 1 nuit à 40 °C, les puits ont été lavés automatiquement à 3 reprises avec 200 µl d'un tampon de lavage constitué de TBS contenant 0,05 % de Tween 20. La saturation des sites a été ensuite effectuée par le tampon de lavage

additionné de BSA à 1 % (p/v). Après une incubation d'une heure à 37 °C les plaques ont été lavées comme décrit précédemment. Ensuite, les puits ayant reçu 100 µl d'une solution d'antisérum dilué au 1:10000 dans le tampon de lavage ont été incubés 3 heures à 37 °C. Après que les anticorps non fixés aient été éliminés par 3 lavages, 100 µl d'une solution d'anticorps de chèvre couplés à la phosphatase alcaline ont été ajoutés dans chaque puits. Le conjugué a été au préalable dilué au 1:1000 dans la solution saturante. Les plaques ont été mises à incuber une nuit à 30 °C. Après 2 lavages au TBS + Tween et 1 lavage au TBS seul, les puits ont reçu une solution fraîchement préparée de para-nitrophényl phosphate dissout à raison de 1 mg/ml dans un tampon diéthanolamine 1M (ajusté à pH 9,8). Les plaques ont été incubées à température ambiante, à l'obscurité et sous agitation douce. L'absorbance du produit de la réaction enzymatique a été mesurée à 405 nm. A cette absorbance, l'appareil a systématiquement retranché celle obtenue à 630 nm. Pour ce programme double longueur d'onde l'appareil effectue la lecture sur les 96 puits d'une plaque en moins de 2,5 secondes. Ce temps de lecture remarquable nous évite d'interrompre la réaction enzymatique, nous laissant ainsi le choix du temps de lecture le plus adapté aux échantillons. Des résultats précédents ont montré que l'on conservait une activité maximale de l'enzyme après 3 heures d'incubation, dans les limites de validité de la loi de Beer-Lambert (annexe 3).

(ii) **AB ELISA.** Ce protocole a été adapté d'après LEVANONY H. et BASHAN Y. (1990). Les étapes précédant le dépôt des anticorps anti-Ig G de lapin ont été effectuées comme décrit pour l'ACP ELISA. A ce stade du protocole, nous avons ajouté dans chaque puits 100 µl d'une solution d'anticorps biotinylés dirigés contre les Ig G de lapin fixées, diluée au 1:1000 dans la solution saturante (TBS tween + BSA). Les plaques ont été mises à incuber une nuit à 30 °C. Après 3 lavages au tampon TBS + tween, nous avons fait agir 100 µl d'une solution de streptavidine couplée à la phosphatase alcaline, diluée au 1:1000 dans la solution de lavage. La durée de l'incubation a été fixée à 3 heures à 37 °C. A nouveau, la révélation de l'activité enzymatique était identique à celle du protocole ACP ELISA.

(iii) **ELIFA.** Cette méthode se fait par filtration sur une membrane de nitrocellulose. Dans un premier temps celle-ci a été humidifiée dans un bain d'eau distillée durant 5 mn. Après l'installation du système ELIFA, les 96 puits de la préplaque ont reçu 100 µl d'eau distillée chacun. Sous l'action de la pompe péristaltique, l'eau s'est écoulé vers la chambre de collecte. Cette opération permettait d'amorcer les canules. Un volume de 100 µl de suspensions bactériennes préparées dans le PBS pH 7,2, a été déposé dans les puits. Les bactéries sont retenues sur la membrane par filtration. Après avoir arrêté la pompe, nous avons ajouté 100 µl d'une solution saturante de BSA à 0,5 % dans le tampon tris + 0,05 % de tween. Après filtration de cette solution, alors que la pompe est toujours en action, 2 lavages de 200 µl de TBS + tween ont été effectués. Après ces lavages, 100 µl d'antisérum de lapin, dilué au 1:10000 dans la solution de lavage, ont été déposés dans les puits. On a laissé agir le sérum 2 heures à température ambiante avant de filtrer. Pour maintenir les 100 µl dans les puits durant les incubations une légère sur-

pression a été appliquée dans la chambre de collecte, par inversion du flux de la pompe. Après 2 filtrations de la solution de lavage, nous avons fait agir 100 µl d'anticorps de chèvre couplés à la phosphatase alcaline, dilués au 1:1000 dans la solution de saturation. L'incubation a duré 2 heures dans les mêmes conditions que le sérum de lapin. L'excès d'anticorps a été éliminé par deux lavages au TBS + tween, suivis de 1 lavage au tampon diéthanolamine 1M, pH 9,8. Une fois les filtrations terminées, la chambre de collecte est ouverte. L'excès de liquide contenu dans les canules est éliminé à l'aide d'un papier absorbant. Une plaque de microtitration est placée dans la chambre de collecte. Après avoir remis en place le système ELIFA, 100 µl de p-nitrophényl phosphate à 1 mg/ml dans le tampon diéthanolamine, ont été déposés dans chaque puits. Le substrat a été mis à incuber en présence de l'enzyme pendant 15 mn, puis filtré encore pendant 15 mn. Le produit de la réaction qui s'écoulait à travers la membrane était directement collecté dans la microplaque. Il suffisait ensuite de récupérer la plaque et de mesurer l'absorbance dans chacun de ses puits à l'aide du lecteur. Pour cette méthode, comme toutes les étapes se faisaient par filtration, il fallait faire en sorte que tous les puits soient remplis et que leur écoulement soit homogène.

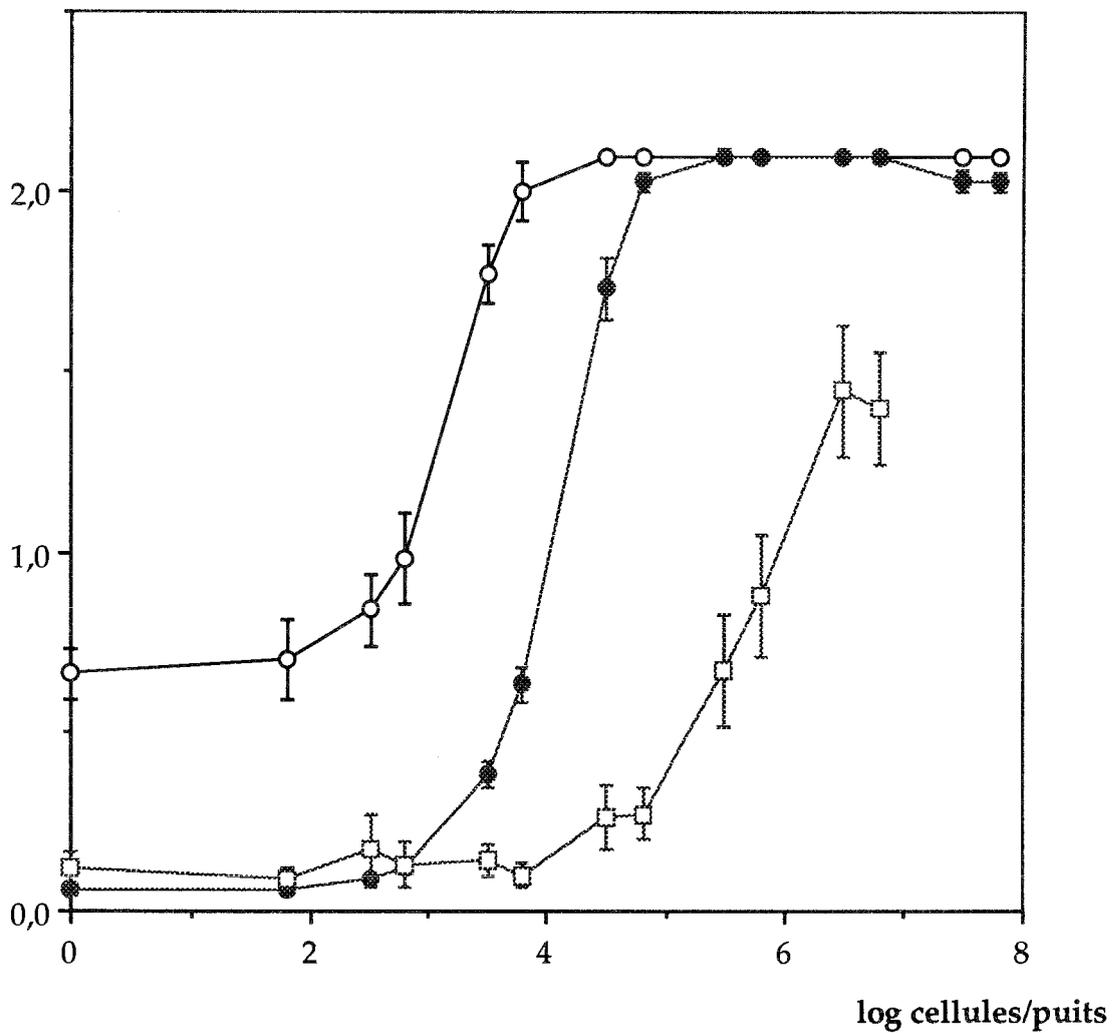
- *Composition des puits témoins.*

Les méthodes décrites précédemment, se résument à un dosage direct d'une activité enzymatique et à un dosage indirect de la quantité d'anticorps de lapin fixés. Il nous a semblé que le meilleur témoin de réaction équivalait à un "puits échantillon" n'ayant pas reçu le sérum de lapin. On tenait compte ainsi de l'occupation du support par l'échantillon et de ses réactions croisées avec le conjugué, voire vis à vis du substrat. On omettait en revanche l'adsorption non spécifique des anticorps de lapin sur le support. Mais des essais préliminaires nous avaient montré que ce phénomène restait négligeable, au moins pour le protocole ACP ELISA. L'absorbance corrigée d'une réaction représentait la valeur de son absorbance diminuée de l'absorbance du témoin de réaction.

- *Plan d'occupation des plaques.*

Une plaque comporte 96 puits repérés selon la matrice (A,..., H x 1,..., 12). Bien que les plaques employées aient été parmi les meilleures disponibles sur le marché, il est apparu une hétérogénéité, vis à vis de la réaction immuno-enzymatique, entre les puits périphériques et les 60 puits centraux. Ce paramètre a été pris en compte dans la disposition des échantillons sur la plaque. Les colonnes douteuses 1 et 12 restaient inutilisées et seulement remplies de tampons. Les échantillons étaient répartis en colonne (3 à 6 puits par échantillons) avec le témoin correspondant en tête de colonne (ligne A et H). On pouvait ainsi traiter 10 à 20 échantillons par plaque. Pour le système ELIFA il était possible d'utiliser

$A_{405 \text{ nm}}$  lue après 30mn



**Figure 3** : Evolution de l'absorbance obtenue par ACP ELISA (●), AB-ELISA (○) et ELIFA (□) pour différentes concentrations en *Bacillus polymyxa* CF43. L'absorbance est lue à 405nm après une incubation de 30 mn du substrat.

l'ensemble de la préplaque (donc les 96 puits), bien qu'il existe un gradient dans la vitesse d'écoulement des puits.

### 1.3. RESULTATS.

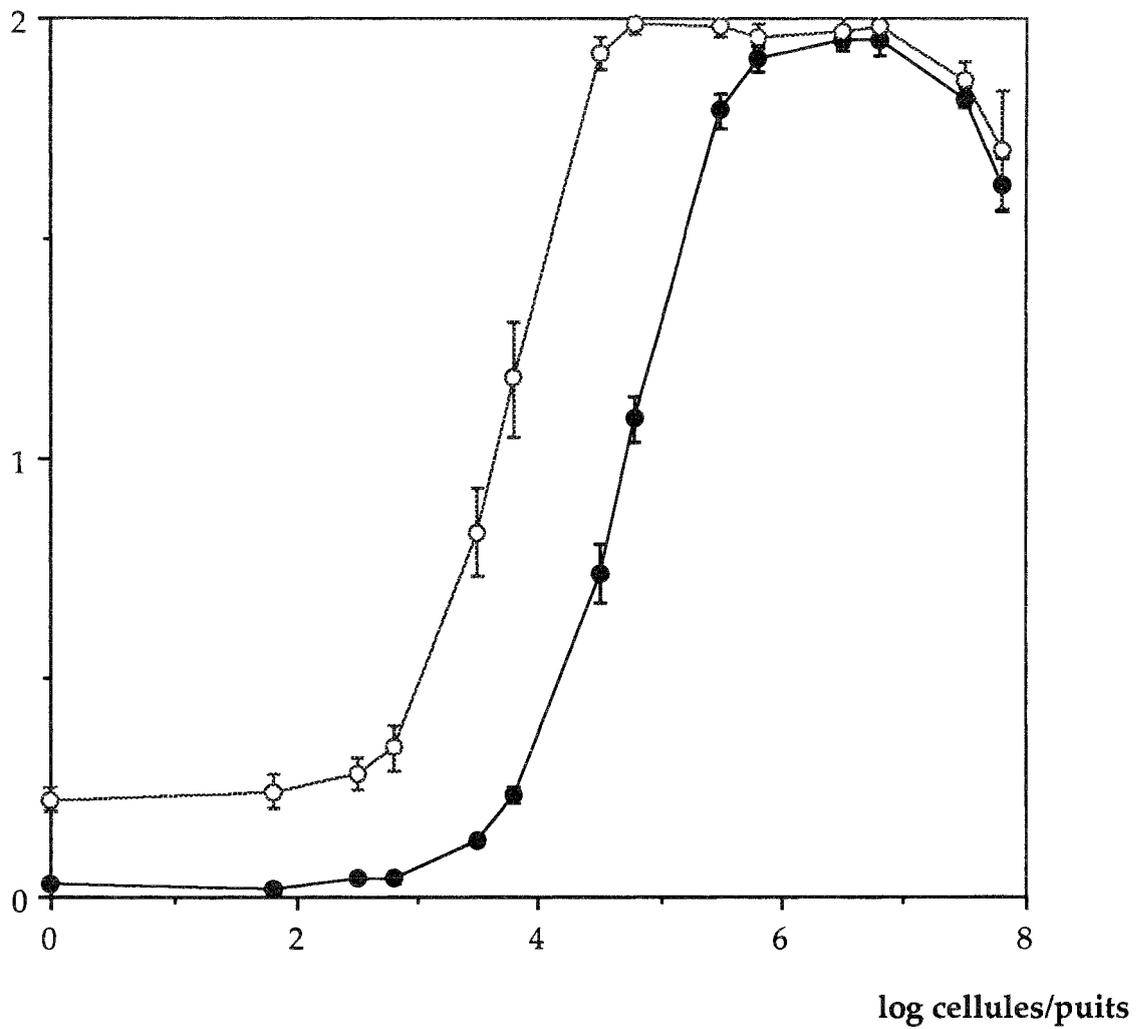
- *Sensibilité des tests immuno-enzymatiques pour la détection de la suspension bactérienne .*

Pour tester la sensibilité de chacune des méthodes, nous avons fait varier la quantité de cellules de *B. polymyxa* CF43 par puits de 0 à  $6 \times 10^7$ . Pour chaque protocole l'expérience a été renouvelée 5 fois, avec à chaque fois des réactifs nouvellement préparés. Seules les mêmes suspensions d'antigènes, congelées à  $-20^\circ\text{C}$ , ont été réutilisées à chaque fois.

Les moyennes des absorbances lues permettent de différencier nettement les 3 méthodes (Fig. 3). Au delà de leurs différences, les courbes présentent globalement la même allure en sigmoïde, à laquelle succède une absence de corrélation dans les domaines de fortes concentrations en bactéries. Le principal point de distinction est donné par le seuil de détection des 3 méthodes, déterminant la position de leur courbe respective sur l'axe des concentrations bactériennes. En ELIFA, on obtient une absorbance significativement différente du niveau de base pour  $3 \times 10^4$  cellules/puits, alors qu'à cette même concentration les deux autres méthodes donnent des valeurs supérieures à 2 unités. D'autre part, ce type de protocole ne permet pas d'apporter plus de  $5 \times 10^6$  cellules de la taille de *B. polymyxa* CF43 par puits au risque de colmater la membrane. Après 30 mn d'incubation du substrat, les méthodes ACP et AB ELISA permettent de détecter respectivement, **1000 et 300 bactéries/puits**. La valeur du seuil de détection étant une fonction linéaire du temps, tant que l'activité de la phosphatase alcaline reste maximale, une incubation de 60 mn abaisse le seuil de détection de la méthode ACP ELISA à **600 bactéries/puits**. Mais, un temps d'incubation plus long favorise également le développement du bruit de fond. C'est essentiellement pour cette raison que des temps supérieurs à 30 mn ne permettent pas d'améliorer la sensibilité du test AB ELISA.

Les lectures des absorbances après seulement 10 mn d'incubation rendent plus aisée la comparaison entre ACP ELISA et AB ELISA (Fig. 4). On obtient toujours un parallélisme presque parfait entre les phases exponentielles des deux courbes, avec un décalage des valeurs obtenues en AB ELISA vers des niveaux de concentrations bactériennes plus faibles. L'utilisation du système streptavidine - biotine permet de détecter  $6 \times 10^2$  cellules de *B. polymyxa* CF43/puits pour une absorbance de 0,35 unité. Ce

A<sub>405 nm</sub> lue après 10 mn



**Figure 4 :** Détection et numération de *Bacillus polymyxa* CF 43 en culture pure par les tests ACP-(●) et AB-ELISA (○). L'absorbance est lue à 405 nm après 10 mn d'incubation du substrat.

résultat ne doit pas faire oublier la bonne sensibilité du test ACP ELISA, dont le seuil de détection se situe à  $3 \times 10^3$  cellules/puits, pour une absorbance cependant assez faible de 0,15 unité.

Les seuils de détection sont suivis d'une portion linéaire qu'il nous a paru intéressant de tester en régression simple. Les modèles suivant ont été obtenus,

▲ entre 3,5 et 5,5 log cellules/puits, les absorbances lues en ACP ELISA suivent une loi d'équation linéaire  $Y = 0,84 X - 2,92$  ( $R^2 = 0,96$ ).

▲ entre 2,8 et 4,5 log cellules/puits, les absorbances lues en AB ELISA suivent une loi d'équation linéaire  $Y = 0,94 X - 2,36$  ( $R^2 = 0,92$ ).

Bien que faible, la différence entre les deux pentes est significative ( $p < 0,001$ ), la méthode AB ELISA offrant une meilleure résolution que l'ACP ELISA. Nous avons déterminé la différence minimale entre concentrations bactériennes qu'il est possible de mettre en évidence dans cette portion de courbe.

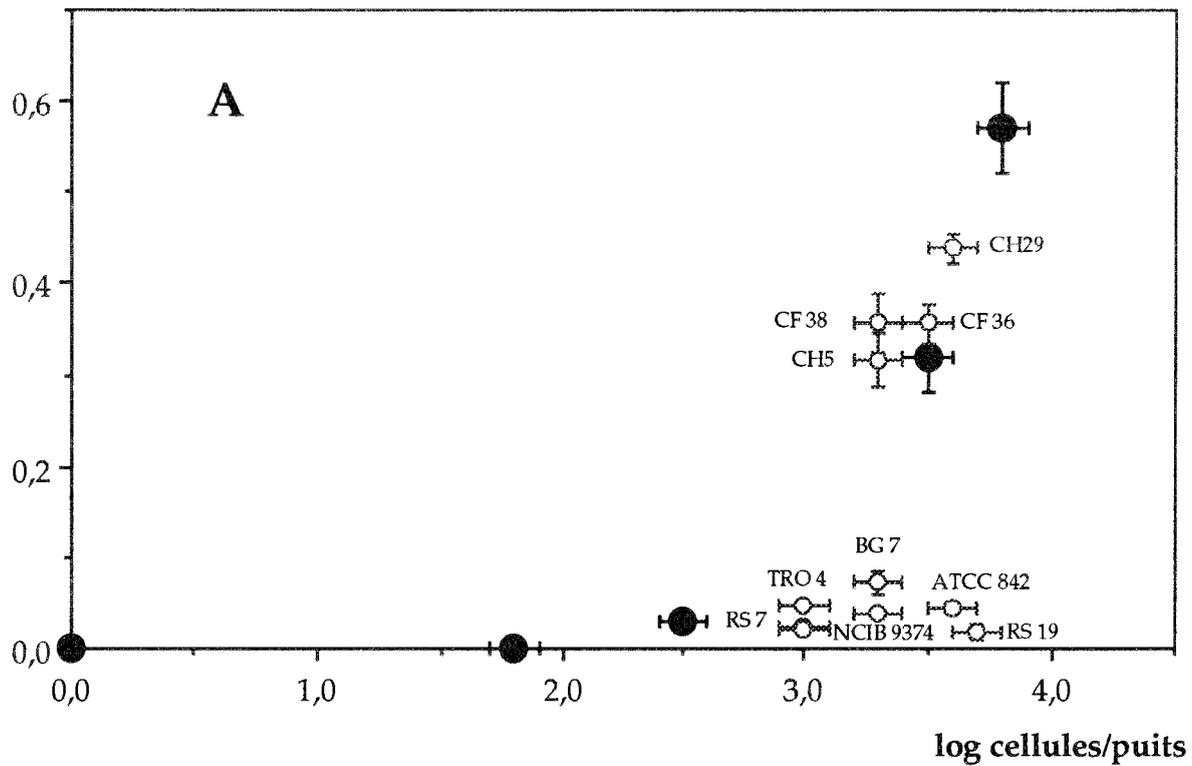
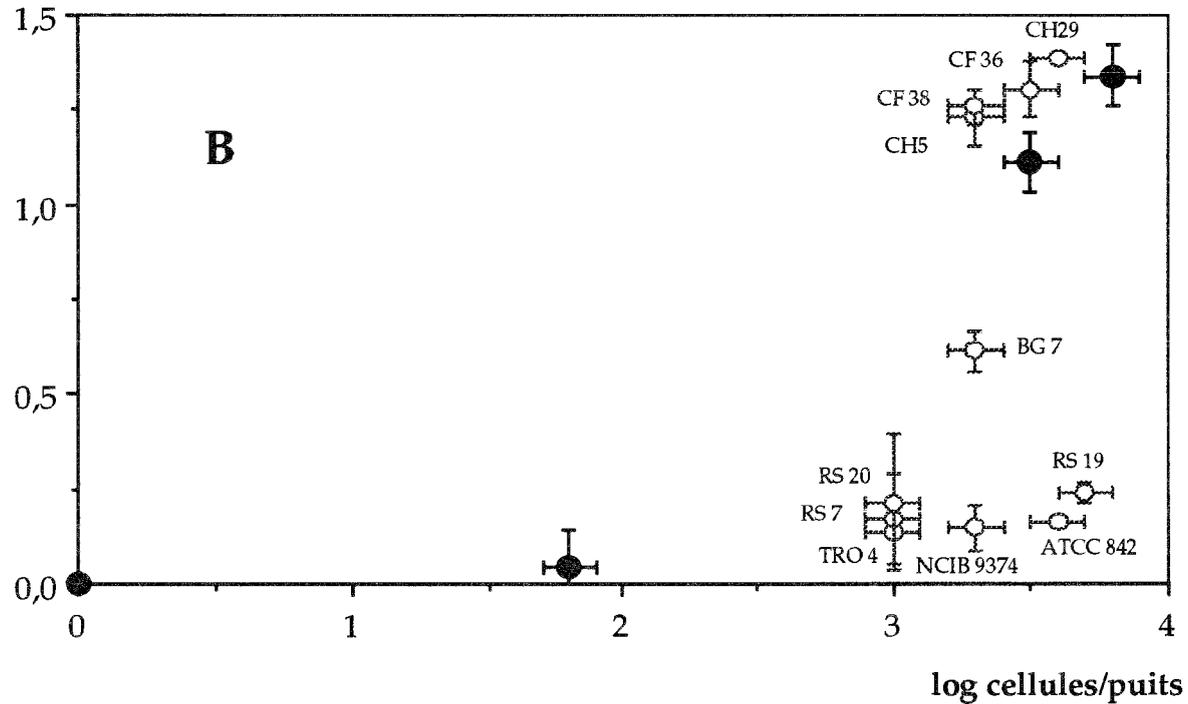
Comme les écart-types donnés par les 5 répétitions sont rarement supérieurs à 0,1 unité d'absorbance, on peut espérer mettre en évidence des différences de l'ordre de 0,25 unité (pour un risque de 1<sup>ère</sup> espèce de 5%). Cela représente une variation de  $\pm 0,2$  log du nombre de cellules/puits, en ACP comme en AB ELISA. Par le protocole AB ELISA, on aboutit à la même sensibilité que par ACP ELISA, mais pour un seuil de détection plus bas.

*Cela signifie théoriquement, que dans 1 ml de suspension bactérienne pure, il est possible de détecter une variation de  $3 \cdot 10^4$  à  $5 \cdot 10^4$  cellules par ACP ELISA, ou de  $6 \cdot 10^3$  à  $1 \cdot 10^4$  cellules par AB ELISA.*

L'utilisation du système d'amplification engendre une augmentation du bruit de fond dans les cupules ayant reçu le sérum mais pas les antigènes. Le phénomène est d'autant plus marqué que le temps d'incubation est long (Fig. 3). On met ainsi en évidence la fixation non spécifique du sérum de lapin sur la plaque, qui n'avait pas été détectée par ACP ELISA. Malgré la bonne sensibilité des deux méthodes, ce dernier résultat pose le problème de leur spécificité.

- *Spécificité du sérum employé.*

Dans un premier temps, les réactions croisées de 12 souches d'origines diverses - souches de collection, rhizosphère du blé, rhizosphère du maïs - ont été mesurées par ACP ELISA (Fig. 5-A) et AB ELISA (Fig. 5-B). Les absorbances obtenues permettent de séparer les souches hétérologues en deux

A  $A_{405 \text{ nm}}$  lue après 30 mnB  $A_{405 \text{ nm}}$  lue après 30 mn

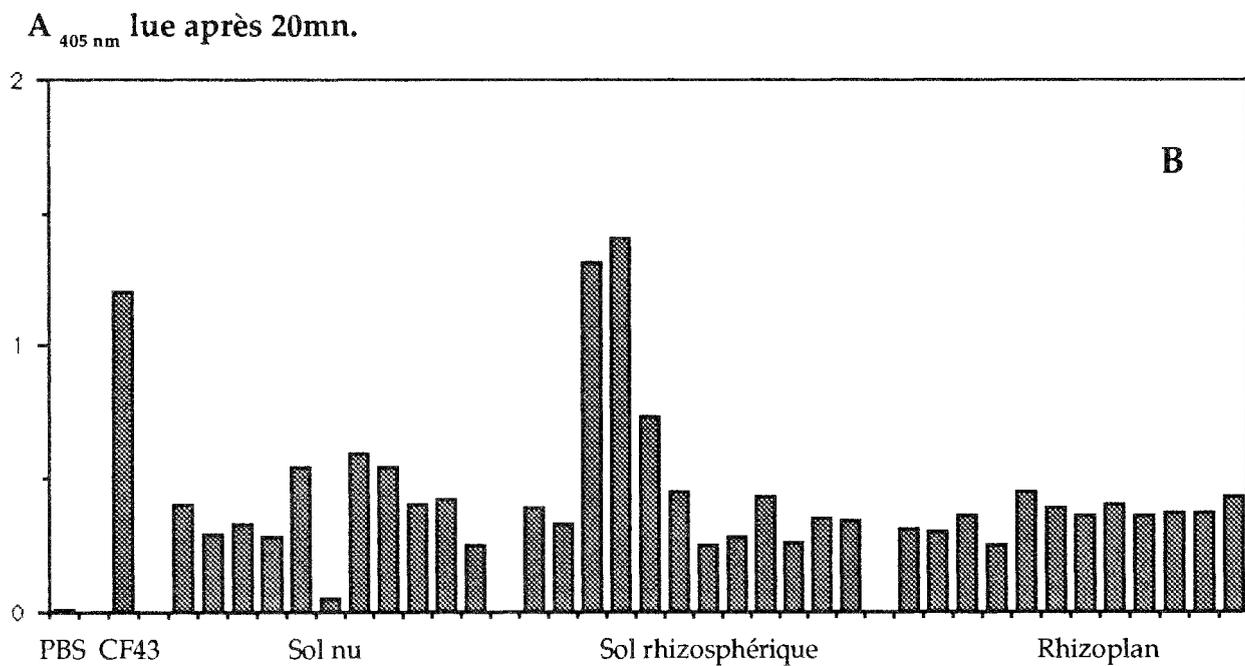
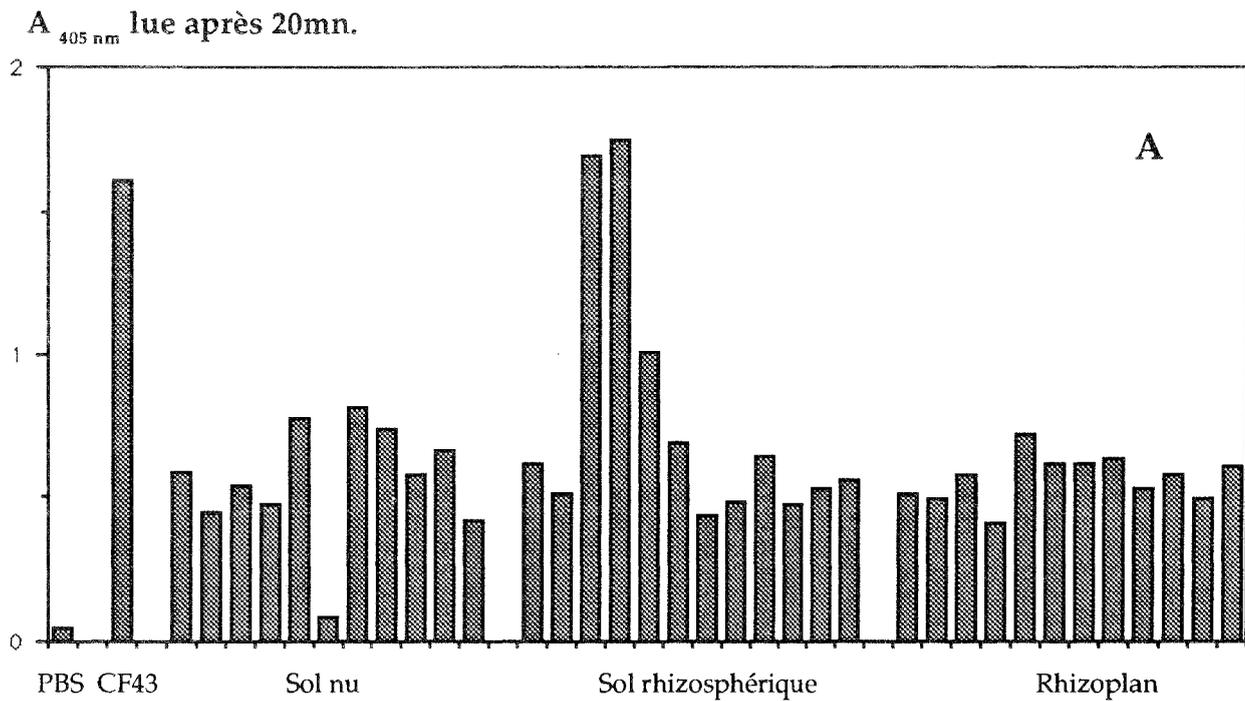
**Figure 5** : Spécificité de la technique ACP-ELISA (A) et AB-ELISA (B), utilisant un sérum dirigé contre la souche *Bacillus polymyxa* CF 43, vis à vis de *B. polymyxa* de référence (ATCC 842) ou isolés de la rhizosphère du blé (CF36, CF38, CH5, CH29, BG7), et de *B. circulans* de référence (NCIB 9374) ou isolés de la rhizosphère du maïs (TRO4, RS7, RS19, RS20). Les absorbances obtenues avec des suspensions pures de *B. polymyxa* CF43 (●), servent de référence.

groupes selon leur affinité pour l'antisérum. Ces résultats sont reproductibles d'un protocole à l'autre. Il apparaît clairement une **spécificité d'espèce** du sérum employé, car aucune des souches de *Bacillus circulans* ne présente de réaction croisée. D'un autre côté, on n'obtient pas une spécificité stricte pour la souche homologue, l'ensemble des *B. polymyxa* isolés de la rhizosphère du blé présentant une forte affinité pour le sérum anti-CF43. La souche BG7 fait exception en n'ayant qu'une affinité moyenne, et la souche type *B. polymyxa* ATCC 842 se classait dans le groupe de souches n'ayant pas d'affinité pour le sérum. Ces résultats confirment ceux de O. BERGE obtenus par ACP ELISA sur un plus grand nombre de souches (annexe 4). Elle a montré que au-delà de la spécificité de genre et d'espèce, le sérum anti-CF 43 permet de différencier les *B. polymyxa* isolés de la rhizosphère du blé des souches de référence de l'espèce.

Dans notre cas, l'emploi du système streptavidine - biotine n'a pas modifier la spécificité du test. Il n'a fait qu'amplifier les différences.

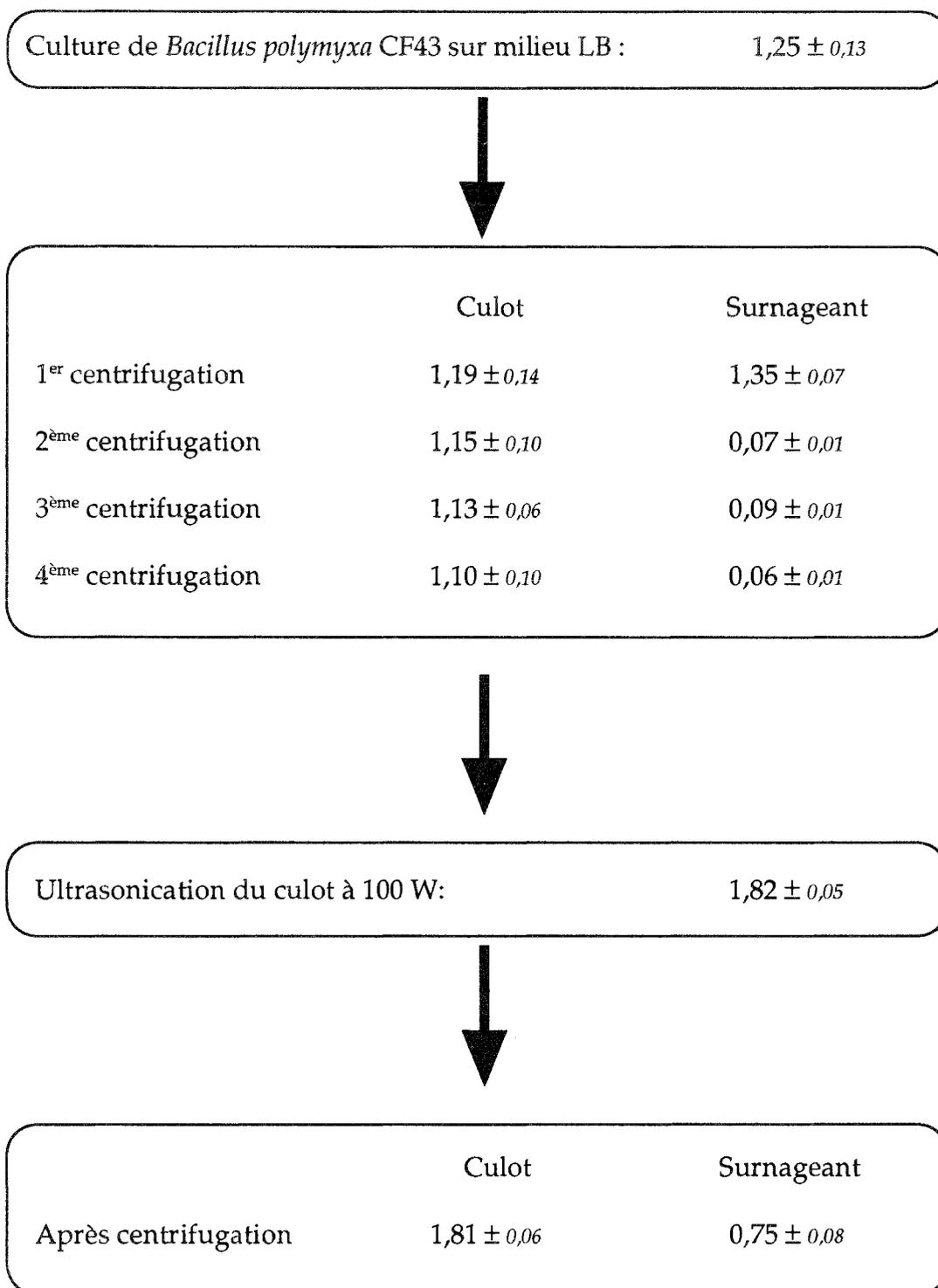
Au cours d'une seconde expérience, nous avons tenté de préciser cette spécificité au sein de la population tellurique ou non de *B. polymyxa*. Nous avons testé les réactions croisées de l'antisérum vis à vis d'une partie des souches isolées par P. MAVINGUI (1990), se distinguant par leur localisation dans l'environnement des racines de blé (sol non rhizosphérique, sol rhizosphérique et rhizoplan). Les suspensions testées ont été ramenées à la concentration optimale de  $10^6$  cellules/ml. Les réactions croisées mesurées en ACP ELISA après 20 mn d'incubation du substrat, ont été comparées à la réaction homologue (Fig. 6-A). L'ensemble des souches testées donne des réactions nettes. Cependant, la majorité de celles-ci n'excèdent pas en intensité, 50% de l'absorbance mesurée pour la réaction homologue. Dans ce domaine de concentration bactérienne, un tel écart reporté sur la courbe étalon obtenue en ACP ELISA, correspond à une variation d'un facteur 10 de la quantité de *B. polymyxa* CF43 déposée par puits. D'autre part, les absorbances obtenues avec les souches du rhizoplan semblent beaucoup plus homogènes que celles des deux autres groupes. La plus forte variabilité est observée pour les souches isolées du sol rhizosphérique, dont certaines présentent une aussi forte affinité pour le sérum que la souche homologue. Ces résultats confirmaient ceux de P. MAVINGUI (1991), obtenus en ACP ELISA sur un nombre plus important de souches. Il a pu ainsi montrer une plus forte homologie sérologique des souches du rhizoplan par rapport au souches du sol rhizosphérique et non rhizosphérique.

Dans notre cas la purification partielle du sérum n'a apporté aucun gain de spécificité. On obtient le même type de réactions hétérologues, pour une moins bonne sensibilité (Fig. 6-B).



**Figure 6 :** Spécificité en ACP ELISA de l'immunsérum anti - CF43 brut (A) ou partiellement purifié (B) à l'intérieur de l'espèce *B. polymyxa*. Nous avons comparé la réaction homologe avec celles obtenues sur des souches isolées du sol nu (dans l'ordre PMD 66, 75, 76, 77, 78, 80, 81, 82, 83, 84, 85), du sol rhizosphérique de blé (PMD 103, 105, 106, 108, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118) et du rhizoplan (PMD 200, 201, 202, 203, 220, 221, 222, 223, 240, 241, 242, 243).

**Tableau 2** : Absorbances mesurées en ACP-ELISA sur des culots et des filtrats bactériens. Les absorbances sont lues après 10 mn d'incubation du substrat. Moyennes et écartypes sont calculés à partir de 4 répétitions.



- *Etude des culots et des filtrats bactériens.*

Cette expérience devait permettre la mise en évidence d'antigènes solubles responsables de réactions croisées en ELISA. Culots et surnageants ont été obtenus à partir de suspensions bactériennes à  $10^8$  cellules/ml. Les culots ont été remis en suspension dans le PBS et ajustés à  $10^6$  cellules/ml environ avant d'être testés en ELISA. Le même facteur de dilution (1:100) était appliqué au surnageant correspondant, filtré à 0,2  $\mu\text{m}$ . Il apparaît que la fraction soluble, obtenue par centrifugation d'une culture de *B. polymyxa* CF 43 de 24 h. en LB, contient des antigènes capables de réagir aussi fortement avec le sérum que les antigènes de surface des bactéries, contenus dans le culot (Tab. 2). Un seul lavage au PBS suffit pour faire disparaître cette réaction croisée du surnageant. Cependant, le traitement aux ultrasons (puissance de 100 w) de la suspension lavée à 3 reprises, provoque une libération spontanée d'antigènes solubles. Cette réaction demeure plus faible que celle du culot, elle aussi augmentée par le traitement aux ultrasons.

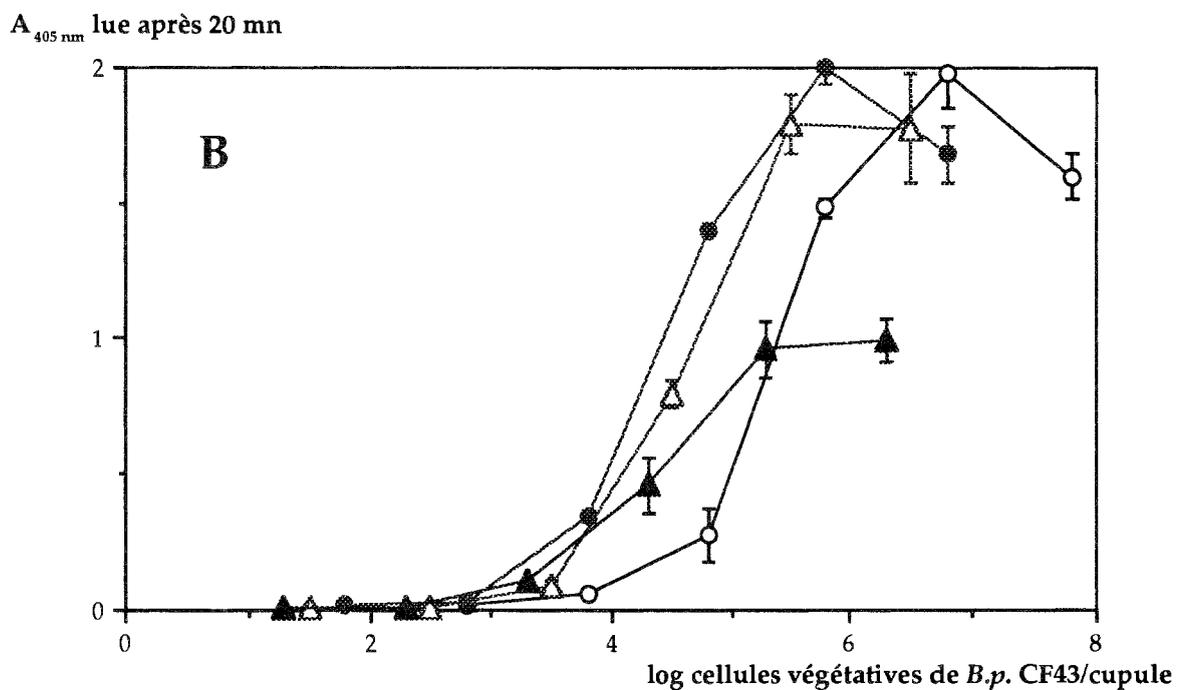
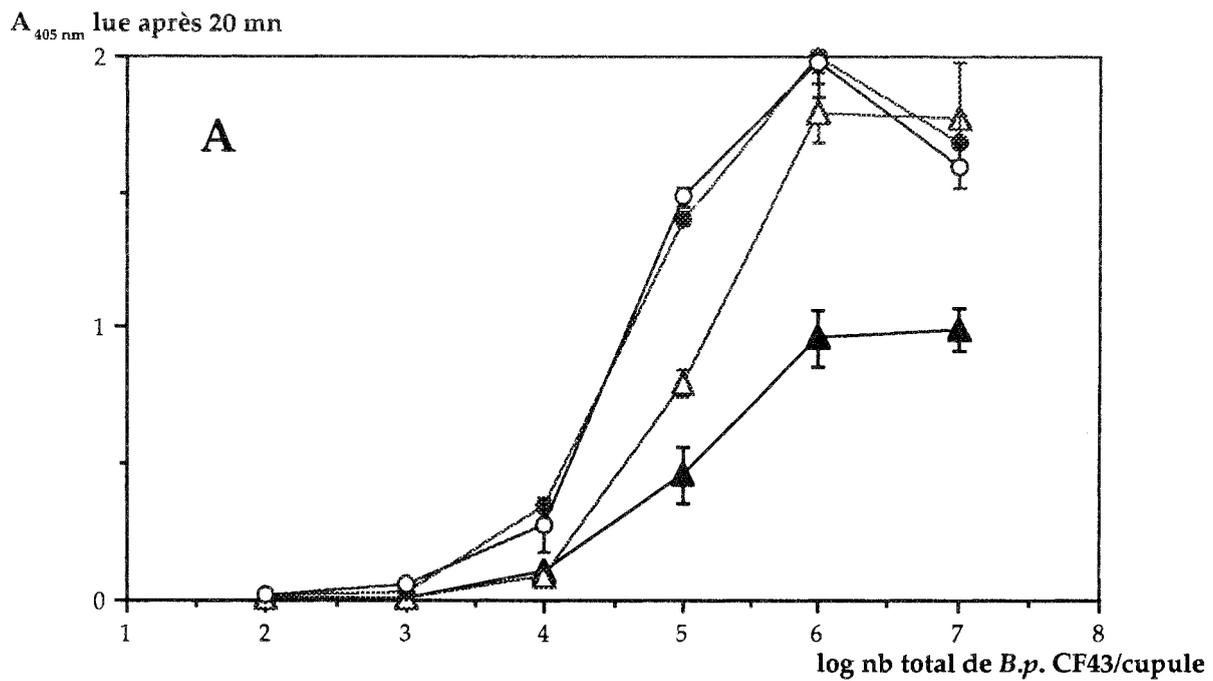
- *Détection des formes végétatives et sporulées.*

Le principe des méthodes ELISA repose sur l'intensité d'une réaction immunologique qui dépend de la quantité et de la nature des épitopes à la surface de la bactérie. L'état physiologique de celle-ci va donc jouer un rôle important. Pour l'illustrer, nous avons choisi d'étudier la réactivité en ACP ELISA de deux formes de *B. polymyxa*, coexistantes dans le sol : la cellule végétative et la spore.

Nous avons testé plusieurs suspensions enrichies en spores (Fig. 7A). L'augmentation du taux de spores dans le mélange provoque une baisse de l'absorbance mesurée. Mais l'absorbance résiduelle ne peut être attribuée à la seule présence des formes végétatives. En effet l'expression des absorbances en fonction du nombre de cellules végétatives/puits, ne permet pas de superposer les courbes des différents traitements (Fig. 7B). La présence des spores est responsable de ces écarts. On peut donc en conclure que les formes sporulées donnent une réaction croisée avec l'antisérum de lapin, cependant beaucoup plus faible que les cellules végétatives. Cette baisse de réactivité ne peut s'expliquer par la diminution de la taille des cellules, donc des surfaces de contact, car on arrive malgré tout à saturation des plaques. La sporulation se traduirait donc par une modification des propriétés antigéniques de la bactérie, entraînant une diminution du nombre d'épitopes en commun avec la forme végétative.

- *Détection de *B. polymyxa* CF43 en mélange.*

Quelque soit la méthode d'extraction des bactéries appliquée aux échantillons rhizosphériques, la détection de *B. polymyxa* doit se faire dans un mélange complexe de micro-organismes telluriques. Des



**Figure 7 :** Relation entre l'absorbance lue en ACP ELISA et le taux de spores de la suspension bactérienne. Les valeurs des absorbances sont exprimées en fonction du nombre total de bactéries (A) et en fonction du nombre de cellules végétatives déposées par puits (B). Les spores représentaient successivement 0 (○), 49 (●), 72 (△) et 80 % (▲) du nombre total de bactéries dans la suspension.

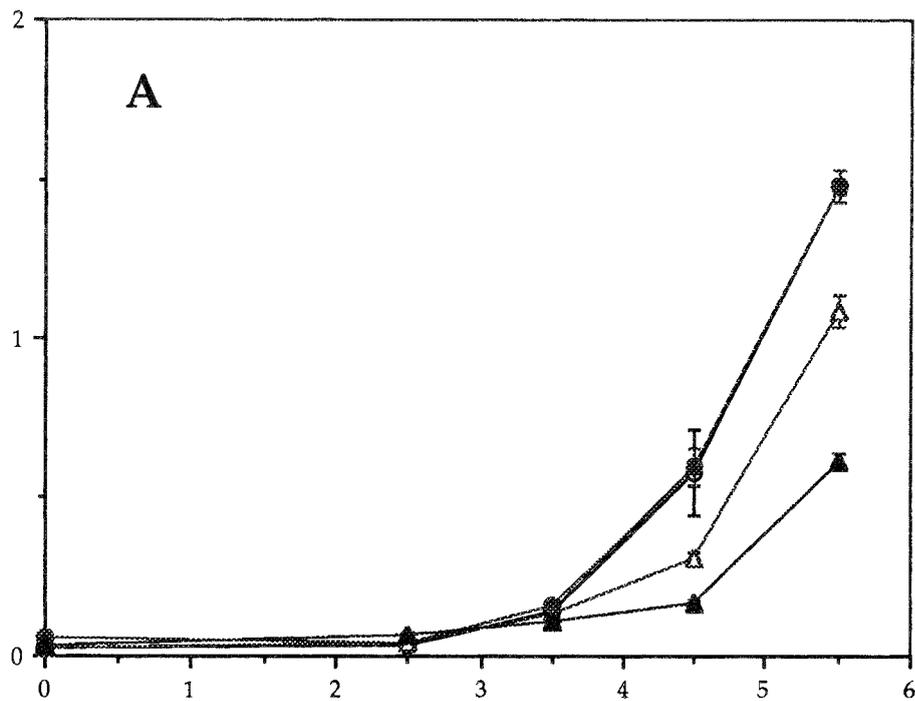
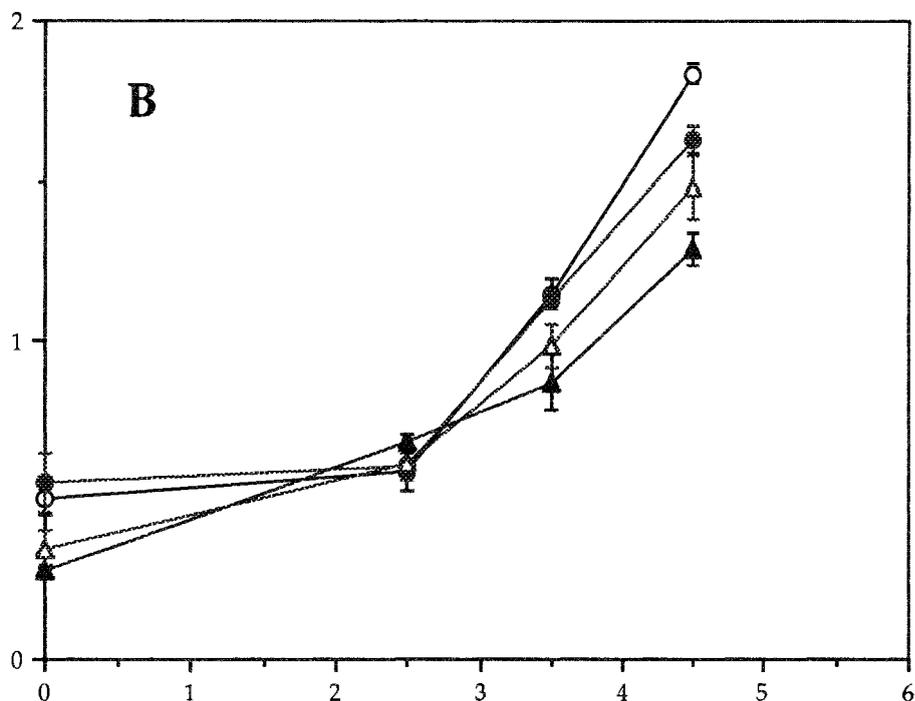
résultats obtenus au laboratoire estiment à 0,1% l'abondance naturelle de cette microflore extractible en *B. polymyxa*. Nous avons cherché à savoir si les sensibilités données par ACP ELISA et AB ELISA sur culture pure, étaient conservées lorsque *B. polymyxa* CF43 était en mélange avec d'autres bactéries. Pour ce faire nous avons ajouté à la suspension pure de *B. polymyxa*, une suspension de la souche *P. fluorescens* PH12b, figurant la microflore totale. Plusieurs points ont justifié le choix de cette souche. Tout d'abord, elle a été isolée par P. HEBBAR de la rhizosphère du blé d'un sol limono-sableux que nous avons utilisé à plusieurs reprises. Cette souche représentait à elle seule, lors de son isolement, 10% de la microflore rhizosphérique. Enfin, elle était parfaitement identifiée à l'espèce *P. fluorescens*.

Pour effectuer le mélange, nous avons fixé la quantité de *B. polymyxa* CF43 de départ à 5,5 log cellules/100 µl. Les cellules de la souche PH12b ont été rajoutées en quantité suffisante pour finalement aboutir à des suspensions bactériennes contenant 100% - 10% - 1% et 0,1% de *B. polymyxa* CF43. Une fois ces suspensions prêtes, il suffisait de les diluer dans le PBS pour faire varier la quantité de *B. polymyxa* CF43 déposée par puits. Les puits sans bactérie (traitement 0) ont reçu la même quantité de PH12b que les puits avec 5,5 log *B. p.* CF43/100µl.

Les résultats montrent que la présence d'autres bactéries affecte la détection et le dénombrement de *B. polymyxa* CF43 en ACP ELISA comme en AB ELISA (Fig. 8A et 8B). La sensibilité des deux méthodes chute avec la diminution du taux de *B. polymyxa* dans la suspension déposée. Cette relation n'étant pas progressive, on pense alors à l'existence d'un pourcentage critique de part et d'autre duquel la sensibilité est ou non atténuée. En ACP ELISA ce pourcentage serait situé entre 1 et 10%, sachant qu'il n'y a pas de différence entre 10 et 100%.

Mais deux autres résultats orientent différemment notre analyse. Le premier est que la quantité minimale de *B. polymyxa* détectable est la même (3,5 log cellules de *B.p.* CF43/puits), quelque soit le mélange testé. Le second est obtenu en AB ELISA, où l'effet du traitement 10% n'apparaît qu'au delà d'une concentration en *B. polymyxa* CF43 10 fois supérieure au seuil de détection. Plutôt qu'un pourcentage critique nous avons testé l'hypothèse de l'existence d'une quantité critique de bactéries à déposer dans les cupules.

Nous avons commencé l'analyse sur les données d' ACP ELISA (Fig. 8A). Au seuil de détection, nous avons apporté par puits entre  $3 \times 10^3$  (niveau 100% de *B. polymyxa*) et  $3 \times 10^5$  bactéries totales (niveau 1% de *B. polymyxa*), sans qu'il y ait de différence entre les absorbances lues. On note seulement une diminution non significative de l'absorbance pour le niveau 0,1% correspondant au total, à un dépôt de  $3 \times 10^6$  bactéries. Pour une concentration en *B. p.* CF43 de 4,5 log de cellules/puits, on note une baisse de l'absorbance pour le niveau 1% correspondant de nouveau à un dépôt de  $3 \times 10^6$  bactéries totales. Les écarts

A<sub>405 nm</sub> lue après 10 mnlog cellules *B. p.CF43*/puitsA<sub>405 nm</sub> lue après 10 mnlog cellules *B. p.CF43*/puits

**Figure 8** : Détection par ACP ELISA (A) et AB ELISA (B) de *Bacillus polymyxa* CF43 en mélange avec la souche *Pseudomonas fluorescens* PH12b. Les taux de *B. polymyxa* exprimés en % du nombre total de bactéries sont successivement de 100 (○), 10 (●), 1 (△) et 0,1 (▲).

des traitements 1% et 0,1% par rapport au niveau 100% s'accroissent au fur et mesure que l'on augmente la concentration en *B.p.* CF43. Ces résultats indiquent l'existence d'une limite dans la capacité des cupules à adsorber les cellules bactériennes. Au delà de cette limite, la compétition entre bactéries se fait aux dépens de la souche homologue. Pour l'ACP ELISA, on pouvait estimer globalement cette limite entre  $10^6$  et  $5 \times 10^6$  bactéries totales/puits.

Si on se reporte à la courbe étalon obtenue en culture pure (Fig. 4), on remarque que c'est dans ce même domaine de concentration bactérienne qu'est obtenu le signal maximum précédant une baisse de l'absorbance.

Nous avons confronté cette analyse aux résultats obtenus en AB ELISA (Fig. 8B). La limite de saturation des cupules apparaît bien sur la courbe du traitement 10%. Dans ce cas, on a une parfaite similarité avec la courbe témoin jusqu'à une concentration en bactéries totales estimée à  $3 \times 10^5$  cellules. Au delà de cette limite l'absorbance mesurée sur le mélange à 10% s'écarte de celle du témoin. L'ordre de grandeur de cette limite est confirmé par les résultats obtenus sur les mélanges 1 et 0,1%. On peut également noter que la présence de bactéries sur le fond de la cupule limite l'adsorption non spécifique des anticorps de lapin. Ce phénomène s'observe sur les puits n'ayant pas reçu de *B. polymyxa*. Le fait d'apporter au moins  $10^7$  bactéries non homologues par puits, diminue significativement le bruit de fond.

#### 1.4. DISCUSSION.

Depuis sa mise au point en 1972 par ENGVALL et PERLMANN, la technique ELISA a connu un développement important. Sa bonne sensibilité et son caractère quantitatif ont permis de diversifier les approches expérimentales dans l'étude de l'écologie des micro-organismes rhizosphériques (ARSAC et CLEYET-MAREL, 1986; BASHAN et al., 1987). Dans un premier temps, notre objectif était d'adapter cette technique à la détection de la souche *B. polymyxa* CF43. Nous avons établi plusieurs protocoles afin de répondre aux impératifs de nos conditions expérimentales. La méthode devait être sensible et spécifique tout en restant facile à mettre en oeuvre.

- *Effet de la concentration en antigènes.*

Nos résultats obtenus en ACP ELISA dans la détection de *Bacillus polymyxa* CF 43 en culture pure, confirment les travaux déjà présentés sur l'utilisation des techniques ELISA. Les sensibilités de ces méthodes appliquées à la détection de bactéries apparaissent souvent exprimées en concentration de

cellules détectées. Différentes valeurs sont proposées en fonction du germe étudié. Concernant la phyto bactérie *Corynebacterium michiganense*, STEVENS et TSIANTOS (1979) détectent jusqu'à  $10^3$  bactéries/ml. Dans un autre domaine, LEVANONY et al. (1987) détectent environ  $10^5$  CFU d' *Azospirillum brasilense* Cd/ml en ACP ELISA. Avec des cultures pures de *Rhizobium*, les méthodes ACP ELISA (KISHINEVSKI et BAR-JOSEPH, 1978), et DAS ELISA (NAMBIAR et ANJIAH, 1985) rendent possible la détection de  $5 \times 10^3$  à  $10^4$  bactéries/ml. Dans ces cas, la technique ELISA s'avère légèrement plus sensible que l'immunofluorescence avec laquelle CLEYET-MAREL et CROZAT (1982) détectent jusqu' à  $10^4$  *Rhizobium* /ml sur membrane de filtration.

Ce seuil autorisé par les techniques ELISA traditionnelles est suffisant pour la détection de *Rhizobium* dans les nodules, dont le broyage permet de récupérer entre  $10^7$  et  $10^8$  bactéries/ml. En revanche on ne peut espérer récupérer plus de  $10^4$  *B. polymyxa*/ml dans une suspension de sol. L'inconvénient majeur de la technique ACP ELISA réside donc dans le fait que pour des concentrations voisines du seuil de détection, l'absorbance mesurée est à peine supérieure au bruit de fond. Dans ces conditions, les applications quantitatives de la méthode sont discutables.

Nous nous sommes orientés vers des méthodes de type Dot-ELISA qui semblent avoir la sensibilité recherchée. Essentiellement utilisées par les phytopathologistes, ces techniques offrent en général des seuils de détection plus bas que l'ACP ou le DAS ELISA (HIBI et SAITO, 1985; ZAGULA et al., 1990). Ce sont surtout des tests rapides. De plus, la mise en vente sur le marché du système ELIFA, rendait envisageable l'utilisation quantitative de ces tests. La méthode s'est avéré très rapide. En effet, il est possible de détecter  $10^6$  *B. polymyxa* CF43/puits en moins de 30 mn avec une absorbance de 1 unité (résultats non communiqués). Le protocole dont nous avons présenté les résultats est quant à lui réalisable en 5 heures. Appliquée à la caractérisation sérologique de souches, cette méthode est compétitive avec les méthodes ELISA. Mais contrairement à ce qu'on attendait, la technique ELIFA ne permet pas de détection en dessous de  $10^5$  cellules/ml. On obtient donc une moins bonne sensibilité, à laquelle s'ajoute une plus forte variabilité sur la mesure. L'important bruit de fond, dû à l'adsorption non spécifique des anticorps sur la membrane, est le principal facteur limitant. Le problème n'a pu être résolu malgré des essais effectués sur des membranes de porosités différentes (0.45  $\mu\text{m}$ ; 3  $\mu\text{m}$ ; 8  $\mu\text{m}$ ) et de natures différentes (nitrocellulose, acétate de cellulose, nylon). De plus, la filtration impose l'utilisation de suspensions limpides, ce qui n'est pas le cas lorsqu'on travaille avec des broyats racinaires.

Finalement, l'incorporation du système streptavidine-biotine dans le protocole ACP ELISA permet de détecter 3000 cellules de *Bacillus polymyxa* CF43/ml. Ce système d'amplification donne des résultats équivalents avec d'autres souches d'origine rhizosphérique. Ainsi la valeur de  $10^4$  CFU/ml

obtenue pour *Azospirillum brasilense* Cd est nettement plus intéressante que celle obtenue avec les méthodes ELISA classiques (LEVANONY et BASHAN, 1990).

• *Les techniques ELISA sont-elles parfaitement adaptées à la numération de la bactérie en culture pure?*

Les résultats obtenus avec les 2 méthodes ELISA montrent que au-delà du seuil de détection on obtient une parfaite corrélation linéaire entre l'absorbance mesurée et la quantité de bactéries déposées par puits (exprimée en log). Les coefficients de corrélation en ACP et AB ELISA sont estimés respectivement à 0,84 et 0,94. Mais d'autres résultats montrent qu'il est incorrect d'exprimer la sensibilité de ces deux méthodes en termes de corps bactériens par puits. Les réactions positives enregistrées avec le filtrat d'une culture de *B. polymyxa* CF43 confirment que les anticorps homologues se fixent également sur les métabolites bactériens. Ce rôle prépondérant des antigènes solubles en ELISA a déjà été mentionné pour *Rhizobium phaseoli* (CLEYET-MAREL, 1987) et pour *Pseudomonas phaseolica* (BARZIC and TRIGALET, 1982). Ces métabolites sont excrétés dans le milieu en transitant plus ou moins longtemps à travers la paroi bactérienne. Dans notre cas, la durée de contact entre le culot bactérien et la solution de lavage (tampon PBS) est insuffisante pour obtenir un enrichissement de cette dernière en antigènes solubles. Cependant, compte tenu des conditions drastiques appliquées aux échantillons tout au long du coating, on peut penser qu'il y a progressivement un relargage de ces composés dans les puits. L'effet du traitement aux ultrasons nous rappelle que ce type de réaction croisée existe potentiellement dans un culot bactérien lavé. Ces métabolites, soit à l'état libre soit à l'état de transit dans la paroi bactérienne, sont à l'origine d'une partie de la réaction mesurée en ELISA. Il est probable que le reste de la réaction soit dû à des molécules antigéniques constitutives de la paroi et non excrétés. Il ne nous est pas possible de connaître la part attribuable à chacun de ces antigènes dans la réaction homologue obtenue en ELISA. Ces considérations montrent qu'il serait plus correct d'exprimer les sensibilités de ces tests ELISA en terme d'épitopes décelables, solubles ou non. Il ne sera possible de quantifier une population bactérienne que s'il existe une corrélation étroite entre la quantité de métabolites produits et la concentration de bactéries. Il semble que ce soit le cas pour *B. polymyxa* en culture pure, dans les conditions expérimentales que nous avons définies, car nous obtenons une bonne corrélation entre le nombre de cellules déposées et l'absorbance.

• *Une sensibilité fortement dépendante des paramètres expérimentaux.*

Les utilisateurs des méthodes ELISA s'accordent à dire que derrière la simplicité de leurs principes se cache un mode d'utilisation complexe. Le matériel et les réactifs employés doivent être choisis avec soins. Le protocole final est le résultat de l'optimisation d'un grand nombre de paramètres.

Certains, comme le type de plaque, les temps d'incubations ou les dilutions des réactifs, sont particulièrement critiques (FUHRMANN and WOLLUM II, 1985; LEVANONY et al., 1987). La reproductibilité du test dépend du suivi scrupuleux du protocole. Dans ces conditions, l'échantillon reste la source majeure de variabilité.

Nos résultats montrent qu'il peut y avoir compétition entre bactéries pour l'occupation du support. La détection de *B. polymyxa* CF 43 est affectée par la présence d'autres bactéries non homologues. Chaque cupule est limitée dans sa capacité à adsorber des bactéries. Cette limite est atteinte pour  $5 \times 10^6$  bactéries en ACP ELISA et pour seulement  $3 \times 10^5$  bactéries en AB ELISA. Dans ce dernier cas, le système d'amplification, intéressant pour détecter de faibles concentrations bactériennes, augmente l'encombrement des puits pour de plus fortes concentrations. L'adsorption non spécifique sur le support ne favorise aucun des deux types de bactéries. La probabilité de fixer une cellule de *B. polymyxa* CF43 sera donc d'autant plus faible que celle-ci est présente en faible quantité dans le mélange. Si les seuils de détection suffisamment bas ne sont pas affectés, la sensibilité des tests est sérieusement diminuée avec des mélanges similaires à ceux existant dans le sol. Par ailleurs cette expérience confirme la bonne adéquation entre l'absorbance mesurée et le nombre de cellules bactériennes déposées par puits.

Une autre source importante de variabilité est attribuée aux propriétés antigéniques de la bactérie au moment où elle est testée. Comme nous l'avons évoqué plus haut, les tests ELISA prennent en compte aussi bien les antigènes solubles que les antigènes somatiques et flagellaires, sans distinction possible. Or ce cortège d'épitopes varie qualitativement et quantitativement selon l'état physiologique de la bactérie. Les résultats obtenus par LADHA et al. (1982) avec *Azospirillum* montrent que les réactions en immunofluorescence sont beaucoup plus intenses avec une culture de 7 jours qu'avec une culture de 24 h. Chez *Bacillus* la sporulation se traduit par un profond bouleversement de l'état physiologique de la bactérie. Nos résultats avec *B. polymyxa* CF43, confirment que le passage du stade de cellule végétative au stade de spore s'accompagne d'une perte de l'affinité vis à vis du sérum. La spore présenterait peu d'épitopes communs avec la forme végétative contre laquelle le sérum a été produit.

- ***Une bonne spécificité du sérum polyclonal.***

Pour préparer le sérum nous avons utilisé une suspension de cellules entières de *B. polymyxa* CF43. Les constituants ayant déclenchés la réaction immunitaire du lapin sont les plus immunogènes mais aussi les plus externes. Parmi les anticorps contenus dans le sérum recueilli, certains reconnaîtront spécifiquement les antigènes portés par la bactérie. Parce qu'il contient une grande variété d'anticorps ce sérum est appelé antisérum polyclonal. Rien ne permettait de prévoir la spécificité d'un tel type de

sérum. Celle-ci a donc été testée vis à vis d'une large gamme de micro-organismes pour en fixer ses limites.

Nos résultats mettent en évidence au moins une spécificité d'espèce, à défaut de la spécificité de souche attendue. En effet des espèces taxonomiquement proches de *Bacillus polymyxa*, comme *B. circulans* ou *B. macerans*, ne réagissent pas avec l'antisérum (BERGE, 1988). De POLLI et al. (1980) ont obtenus des résultats équivalents, en immunofluorescence, sur *Azospirillum lipoferum* avec un sérum polyclonal anti-sp59b. Comme pour *A. lipoferum*, nos résultats semblent indiquer une homogénéité sérologique de l'espèce *B. polymyxa*. Pourtant cette espèce est souvent décrite comme possédant une structure antigénique complexe (DAVIES, 1951). Les différents antigènes (flagellaire, somatiques, spores) opèrent à des niveaux de spécificité différents. Ainsi, la reconnaissance d'antigènes flagellaires en immunoagglutination assurerait l'identification de souches particulières. Les antigènes somatiques permettraient de former des sous-groupes sérologiques au sein d'une espèce bactérienne, alors que les antigènes de spores donneraient une bonne spécificité d'espèce (WOLF and BARKER, 1968).

L'étude d'un grand nombre de souches de *Bacillus polymyxa*, isolées de la rhizosphère du blé, permet de nuancer la spécificité obtenue avec ce sérum polyclonal. La sensibilité de la technique ELISA met en évidence une homogénéité sérologique entre souches isolées du rhizoplan, qui n'existe pas pour les souches du sol rhizosphérique (MAVINGUI et al., 1991). L'intensité des réactions hétérologues mesurées sur le groupe de souches du rhizoplan n'excède pas 50% de la réaction homologue. En revanche, c'est parmi les isolats du sol rhizosphérique que l'on rencontre la plus grande diversité de réaction. Certaines souches présentent une affinité pour l'antisérum aussi forte que la souche homologue, elle-même isolée d'un sol rhizosphérique. Ces résultats semblent indiquer une relation entre les caractéristiques sérologiques d'une souche et sa localisation par rapport aux racines de sa plante hôte. Une étude réalisée par DE-POLLI et al. (1980), avec des isolats rhizosphériques d' *A. brasilense*, donne un classement sérologique au sein des souches nir- (déficientes pour la nitrite réductase). Un groupe est constitué de souches isolées de l'endorhizosphère de plantes en C3 et un autre de souches isolées de sol rhizosphérique ou de racines non stérilisées (de plantes en C3 ou en C4). Ce résultats refléteraient une sélection des souches de l'endorhizosphère par les plantes en C3. Cependant, la mise en évidence par des critères sérologiques de cette sélection préférentielle n'a pas toujours été vérifiée (LADHA et al., 1982; GAMARD, 1991). Même s'ils doivent être confirmés, les résultats obtenus avec *B. polymyxa* ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'utilisation des techniques ELISA dans l'étude écologique de ces populations rhizosphériques.

• *Les perspectives offertes par les techniques ELISA.*

Les techniques ELISA ne permettront jamais d'atteindre les niveaux de spécificité et de sensibilité offerts actuellement par la PCR. Cependant elles présentent les avantages d'être d'une mise en oeuvre facile et rapide, ainsi que d'un coût modéré. Face aux techniques de pointe, l'ELISA demeure un complément performant. Leur réussite dépend en grande partie de la qualité de l'antisérum employé. Le moyen par lequel nous avons obtenu le sérum polyclonal ne nous permettait pas de présupposer de son degré de spécificité. Celui-ci n'a pu qu'être testé *a posteriori*. Notre objectif était d'atteindre une spécificité de souche afin de rendre possible le suivi de la souche *Bacillus polymyxa* CF43 dans la rhizosphère du blé après inoculation. Un tel degré de spécificité avait déjà été obtenu en ELISA avec des sérum polyclonaux dirigés contre des souches d'*Azospirillum brasilense* (LEVANONY et al., 1987), de *Pseudomonas* (BARRAQUIO et al., 1986). L'antisérum utilisé dans ce travail n'offre qu'une spécificité au niveau de l'espèce *Bacillus polymyxa*. L'amélioration de ces techniques repose donc sur un gain de spécificité du sérum employé. Ceci dépend avant tout de la qualité du sérum plutôt que de son degré de purification. La démarche proposée consiste à rechercher et isoler une fraction antigénique plus spécifique. Le choix de la source antigénique pourra se faire parmi des extraits somatiques, des extraits polysidiques (EPS et LPS) ou des antigènes solubles. Cette démarche est motivée par le fait qu'il semble exister une diversité sérologique, phénotypique et génotypique entre souches de *Bacillus polymyxa* isolées de la rhizosphère du blé (MAVINGUI et al., 1991). Dans cette approche, l'étude des profils protéiques de ces souches semble particulièrement intéressante. Dans ses travaux sur *Rhizobium*, CLEYET-MAREL (1987) a montré l'utilité de coupler aux méthodes immunologiques d'autres méthodes biochimiques permettant de caractériser les structures antigéniques de la bactérie.

La spécificité reste un problème majeur dans l'application des méthodes immuno-enzymatiques à des études écologiques. Ceci suppose un choix judicieux de la source antigénique. Il serait d'un grand intérêt d'établir une relation entre les propriétés antigéniques de la bactérie cultivée *in vitro* et celles correspondant aux conditions naturelles de son environnement.

## 2. Dispersion et floculation des sols pour la détection de *Bacillus polymyxa* par ACP ELISA.

### 2.1. INTRODUCTION.

Les phytopathologistes restent les principaux utilisateurs de l'outil immuno-enzymatique pour la détection d'agents pathogènes ou d'antigènes liés à leur pathogénicité. Bien que plus limités, les méthodes ELISA trouvent des domaines d'application en microbiologie du sol. Les premiers travaux ont porté sur l'identification sérologique de *Rhizobium* (BERGER et al. 1979; MORLEY and JONES. 1980; FUHRMANN and WOLLUM II. 1985), de *Pseudomonas* spp (BARRAQUIO et al. 1986), d'*Azospirillum brasilense* (LEVANONY et al. 1987). Cependant, les applications des méthodes immunologiques en écologie microbienne se limitaient jusqu'ici à un aspect qualitatif. En absence de piégeage par la plante (nodules de légumineuses, rhizoplan), l'étude quantitative d'une population microbienne dans le sol est limitée par la nature même de cet environnement. Ces bactéries sont présentes dans toutes les fractions du sol, et pour la plupart étroitement associées aux particules organo-minérales. Dans un premier temps, il faut procéder à la séparation des bactéries et des particules auxquelles elles sont associées, sous l'effet de traitements dispersants. Puis la difficulté consiste à éliminer les colloïdes de la suspension, en conservant le maximum de bactéries dans le surnageant sous l'action de sels floculants. Selon ce procédé, la technique de dénombrement en immunofluorescence décrite par SCHMIDT (1974) permet de quantifier spécifiquement des populations bactériennes dans le sol et la rhizosphère (CLEYET-MAREL et CROZAT, 1982).

Nous avons abordé dans cette partie le problème de la détection et de la quantification de populations bactériennes dans leur environnement tellurique, ce qui nous a amené à comparer différentes procédures d'extraction et de récupération des bactéries.

## 2.2. MATERIEL ET METHODE.

- *Les type de sols.*

Deux sols de textures opposées ont été utilisés pour cette étude. Le premier provenait de l'horizon arable d'un sol brun lessivé, prélevé sur le site d'expérimentation de la Coopérative Agricole Lorraine, à Dieulouard (Meurthe-et-Moselle). Le second avait pour origine l'horizon C d'un pélosol vertique, localisé sous forêt à Padoux (Vosges). Après avoir été prélevés, les sols ont été tamisés à 2 mm et séchés à l'air. Leurs propriétés respectives sont récapitulées dans le tableau 3. Les sols ont été choisis pour la teneur et la nature de leurs argiles qui nous plaçaient dans des conditions très différentes pour tester la récupération des bactéries.

Tableau 3 : Principales caractéristiques physico-chimiques des sols de Dieulouard et Padoux.

Site	Hor.	Granulométrie					pH KCl	C (g.Kg <sup>-1</sup> )	N (g.Kg <sup>-1</sup> )	C.E.C. (mEq/100 g)
		SG	SF	LG	LF	A				
Dieulouard	Ah	15,3	21,5	25,8	22,3	11,6	5,3	10,2	0,7	7,45
Padoux	C	3,5	3,8	8,1	23,5	61,1	7,2	4,5	0,5	36,02

- *Dispersion des sols.*

3 modes de dispersion ont été utilisés dans ce travail. Ils ont été choisis car ils n'employaient aucun dispersant chimique pouvant altérer le compartiment biologique du sol.

(i). Le protocole le plus sommaire consistait en une **agitation manuelle** de l'échantillon dans le tampon phosphate (PBS, pH 7,2). Dix grammes de sol sec ont été mis dans un flacon sérum de 125 ml. L'échantillon a été au préalable réhumidifié par 4 ml d'eau distillée avant de recevoir les 90 ml de

tampon phosphate donnant une suspension à 10% de sol. Puis le flacon a été agité manuellement et énergiquement pendant 30 secondes. Ce protocole était utilisé pour le traitement d'échantillons de sol rhizosphérique prélevés dans la plupart des essais au champ.

(ii). Nous avons adopté la méthode **des résines échangeuses d'ions** utilisée pour la dispersion des sols dans l'analyse granulométrique (ROUILLER et al., 1972; BARTOLI et al., 1991). Un échantillon de 2,5 g a été ajouté à 200 ml d'eau distillée et 100 ml de résine-Na Amberlite IRN 77. L'ensemble, après avoir été agité pendant 16 heures à 40 rpm, a été tamisé à 200  $\mu\text{m}$  puis 50  $\mu\text{m}$ . La suspension ainsi obtenue a été transférée dans une fiole et son volume ramené à 1 litre avec de l'eau distillée. On conservait l'ensemble des particules les plus réactives du sol, susceptibles d'intervenir sur la détection des bactéries en ELISA (argiles, limons, matières organiques). Les teneurs en particules obtenues pour les sols de Dieulouard et de Padoux étaient respectivement de 1,31 g/l et 2,06 g/l.

(iii). Nous avons également testé l'efficacité **des ultrasons** afin d'optimiser les conditions de désagrégation et de dispersion des sols, compatibles avec nos objectifs de recherche. Un échantillon de 4 g a été mélangé à 50 ml de PBS dans un récipient à fond hémisphérique. La sonde ( $\varnothing = 10$  mm) a été immergée de façon à ce que la distance entre son extrémité et le fond du récipient soit de 2 cm. L'appareil (150 TU Ultrasons Annemasse) a été réglé sur une intensité indexée à 170 V. Dans ces conditions, pour des durées de fonctionnement de 16.5, 82, 165 et 330 secondes, on obtient des puissances en sortie de sonde respectivement de 10, 50, 100 et 200 W. Le temps de sonication était divisé en deux périodes de même durée, séparées par une période de repos de 30 s. Le choix de l'énergie et de son mode d'application ont été déterminés d'après les conditions opératoires définies par BURTIN G. (1989). Les ultrasons n'ont été testés que sur le sol de Dieulouard. Les échantillons provenaient d'un sol non rhizosphérique, provenant d'un profil sans colonisation racinaire, et d'un sol adhérent aux racines de blé, défini comme la fraction de sol rhizosphérique restant fermement accrochée aux racines après agitation de celles-ci à la main.

• *Comparaison des différents modes de floculation des sols.*

Deux flocculants chimiques ont été testés : le chlorure d'aluminium et le chlorure de strontium. Les deux solutions utilisées contenaient 236 mg d'ion Sr/ml et 78 mg d'ion Al/ml. Plusieurs quantités de sels ont été testées pour leur efficacité à flocculer les suspensions de sol préalablement dispersées. Le temps de floculation a été fixé à 15 mn afin de limiter la sédimentation des bactéries libres dans le surnageant. La limpidité des suspensions testées en ELISA, avant et après floculation, a été estimée par absorbance à 630 nm. La mesure a été faite directement sur les microplaques avant que celles-ci soient mises à sécher (étape du coating).

- *Détection de Bacillus polymyxa dans les suspensions.*

La détection a été faite selon le protocole ACP ELISA précédemment décrit. Les échantillons ont été déposés en colonne sur la plaque, à raison de 3 puits par échantillons. Les puits témoins disposés en tête de colonne sur la plaque, ont reçu l'échantillon mais pas l'antisérum.

- *Récupération de bactéries récemment inoculées.*

Cette expérience devait nous permettre de préciser les conditions opératoires assurant la meilleure récupération d'une population de *B. polymyxa* CF43 inoculée aux deux sols. Ces derniers ont été utilisés avec ou sans dissociation préalable.

(i) *Sur sols non dissociés.* Les bactéries ont été cultivées sur le milieu liquide Luria Bertani modifié (LB). Après une incubation d'une nuit à 32°C, les bactéries en fin de phase exponentielle ont été récupérées par centrifugation (10 mn à 10000 g) et lavées. Le culot a été repris dans un volume d'eau distillée stérile de façon à obtenir environ  $2 \times 10^8$  cellules/ml (comptage sur lame de Thoma). Une suspension de 2 ml a été inoculée à 10 g sec de sol auxquels on a encore ajouté 2 ml d'eau distillée pour achever de réhumecter le sol. Le tout a été mis à incuber 20 h à 4°C, le temps qu'un équilibre soit établi entre les bactéries inoculées et le sol. L'échantillon a été ensuite repris dans 90 ml de PBS, pH 7,2 et agité à la main pendant 30 s. Immédiatement, des prélèvements ont été effectués afin de mesurer la limpidité de la suspension et le niveau de *Bacillus polymyxa* détectable en ACP ELISA. Chaque prélèvement correspondait aux  $4 \times 100 \mu\text{l}$  nécessaires au remplissage des puits. Après 15 mn de sédimentation, on a effectué un nouveau prélèvement dans le surnageant. La suspension a été re-homogénéisée avant de recevoir le chlorure de strontium ou le chlorure d'aluminium. On a laissé agir le flocculant pendant 15 mn avant de prélever le surnageant. Les concentrations en ion flocculant testée étaient, après ajout dans la suspension, de 60, 120, 240 et 480 ppm pour le strontium et de 20, 40, 80 et 160 ppm pour l'aluminium. Ces quantités correspondaient respectivement à des apports de 25, 50, 100 et 200  $\mu\text{l}$  de chacune des solutions flocculantes, aux 100 ml de suspension de sol. Une suspension de bactéries sans sol constituait le traitement témoin. Deux répétitions par traitement ont été effectuées.

(ii) *Sur sols dispersés par les résines.* Les suspensions de sols ont été obtenues selon le procédé de dispersion précédemment décrit. Pour chacun des sols étudiés, 100 ml de suspension dispersée ont été inoculés avec  $10^8$  cellules de *B. polymyxa* CF43. Après 20 heures à 4°C, on a procédé à la floculation des mélanges avec  $\text{AlCl}_3$  ou  $\text{SrCl}_2$ .

### 2.3. RESULTATS.

- *Effet des particules de sol sur les résultats obtenus par ACP ELISA.*

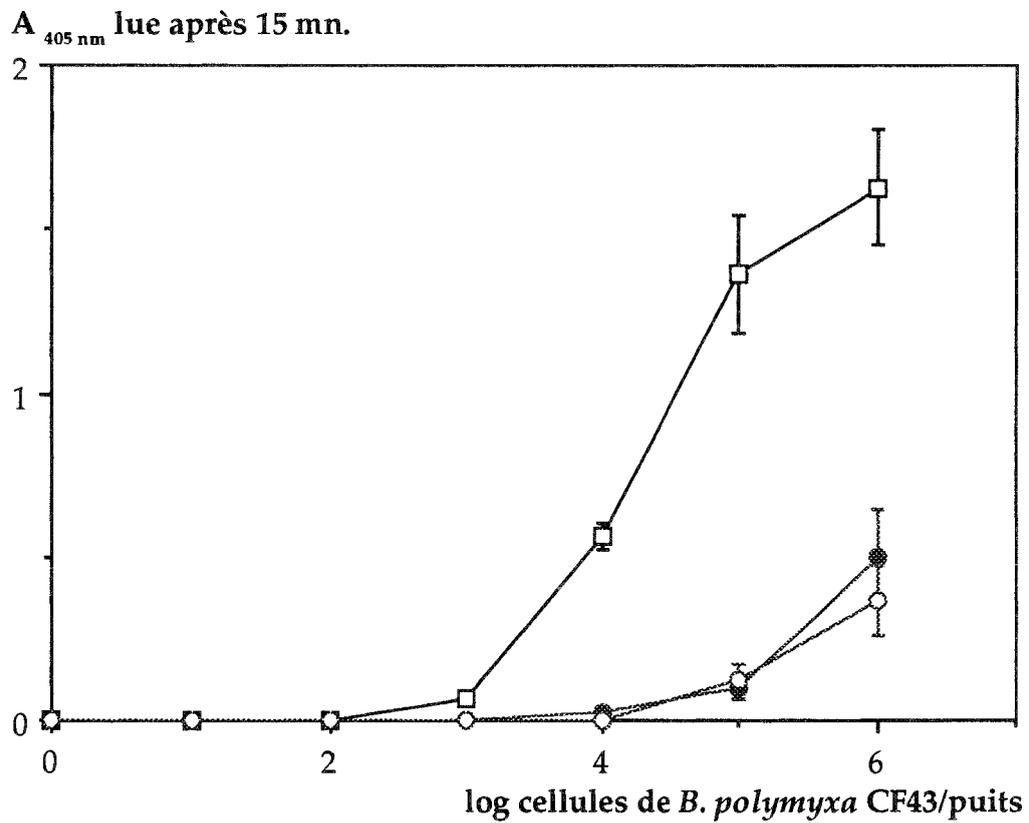
Des suspensions de sols à 10% dans le PBS (w/v), ont été inoculées avec différentes quantités de *Bacillus polymyxa* CF43. On a procédé à une agitation manuelle des flacons, sans période d'incubation et sans traitement dispersant particulier. Les absorbances mesurées, par ACP ELISA, sur ces suspensions sont comparées à celles obtenues avec les suspensions bactériennes sans sol (Fig. 9). Le seuil de détection, situé vers  $5 \times 10^3$  cellules/puits en culture pure, est déplacé vers des concentrations bactériennes 100 fois supérieures, lorsque le coating des bactéries est effectué en présence de particules de sol. Compte tenu du mélange bactéries-sol, il nous est impossible de détecter moins de  $10^7$  *B. polymyxa*/g sec de sol. Cette mauvaise sensibilité justifie que l'on ait pas détecté les populations de *B. polymyxa*, naturellement présentes dans les sols de Padoux et de Dieulouard aux alentours de  $5 \times 10^5$  bactéries/g sec. Les mesures d'absorbances faites à 630 nm sur les suspensions déposées dans les cupules sont respectivement de  $1,56 \pm 0,046$  et  $1,80 \pm 0,022$  pour les sols de Padoux et de Dieulouard. Elles mettent en évidence une meilleure dispersion, par simple agitation, du sol de Dieulouard par rapport au sol plus argileux de Padoux. Mais en absence d'autre traitement, l'enrichissement de la suspension en particules de sol atténue encore un peu plus la sensibilité de la méthode.

Cette expérience montre l'existence d'une interaction entre les particules du sol et les bactéries pour l'adsorption sur le support. De part leur densité, ces particules se sont plus rapidement décantées dans les cupules, formant ainsi un écran qui limite d'autant plus l'adsorption des bactéries sur le support que celles-ci sont peu concentrées. L'application des méthodes immuno-enzymatiques à la détection de *Bacillus polymyxa* dans le sol passe donc par la mise au point de pré-traitements permettant la séparation des bactéries des autres colloïdes.

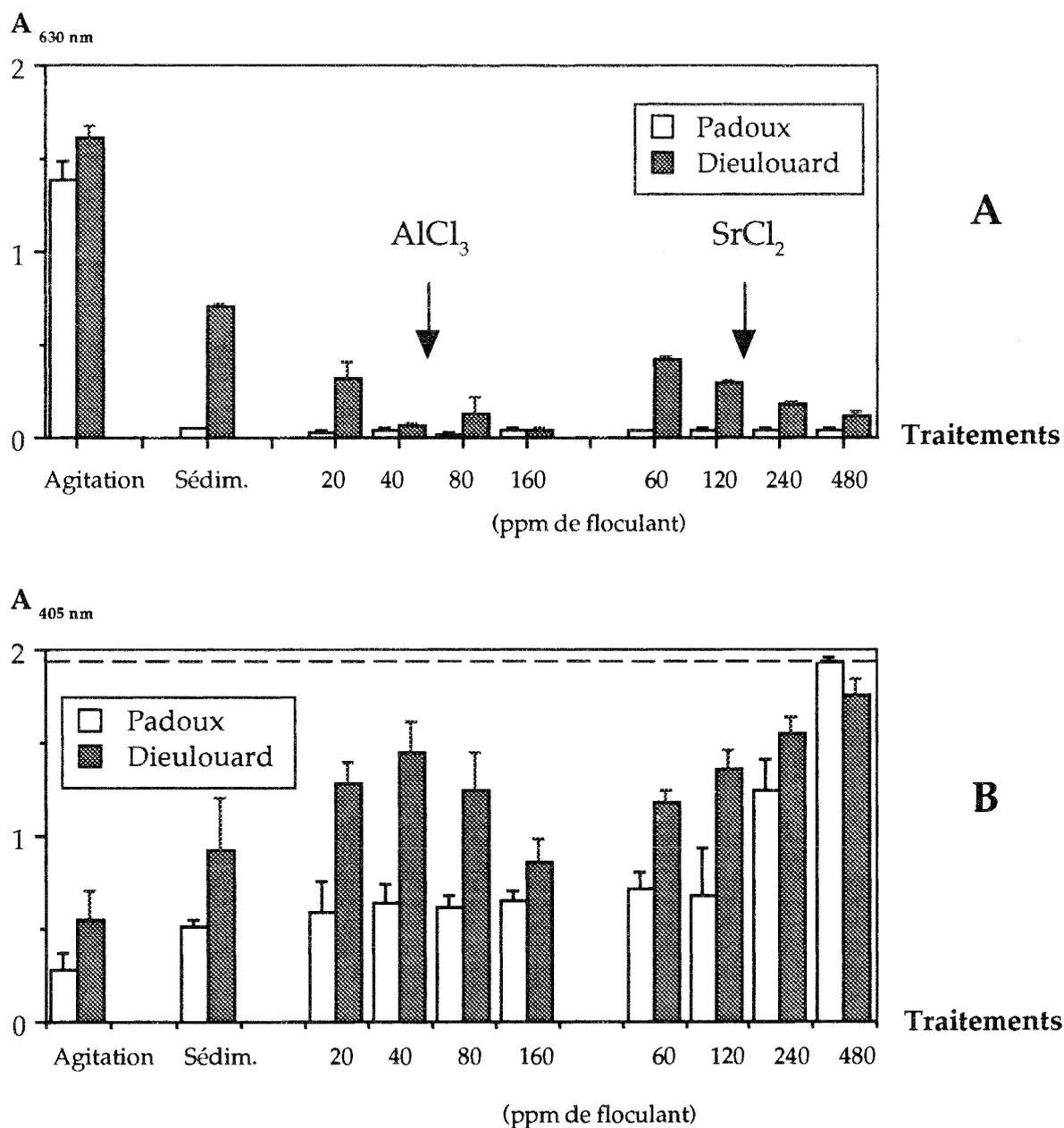
- *Récupération de bactéries ajoutées aux sols: effets de traitements dispersants et floculants.*

Nous avons étudié le taux de récupération, pour différents modes de floculation, de bactéries introduites dans les sols par inoculation. La limpidité du surnageant a été estimée par l'absorbance à 630 nm de la suspension déposée dans les cupules (Fig. 10A).

Après simple sédimentation, on note déjà une différence entre les deux sols. Du fait de sa moindre stabilité, le sol de Dieulouard a été beaucoup plus dispersé par l'agitation dans le PBS qui précédait la sédimentation. En revanche, comme pour les autres tests, le surnageant du sol de Padoux, peu dispersé par



**Figure 9** : Détection de *Bacillus polymyxa* CF 43 par ACP ELISA, en culture pure ( $\square$ ), dans une suspension à 10% (W/V) d'un sol sablo-limoneux ( $\circ$ , Dieulouard) et d'un sol très argileux ( $\bullet$ , Padoux).



**Figure 10** : Effets de différents traitements floculants sur la turbidité des suspensions déposées dans les puits (A) et sur la détection de *Bacillus polymyxa* CF43 en ACP ELISA (B). L'absorbance obtenue à 405 nm, avec la suspension bactérienne sans particule de sol, sert de référence (---).

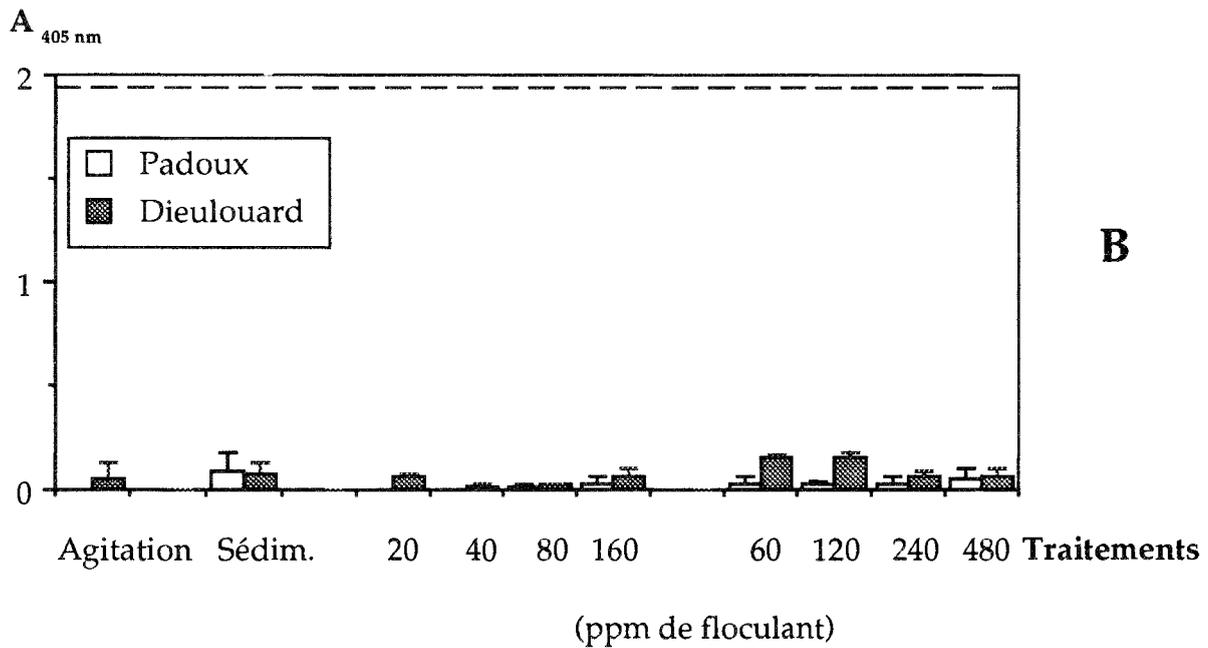
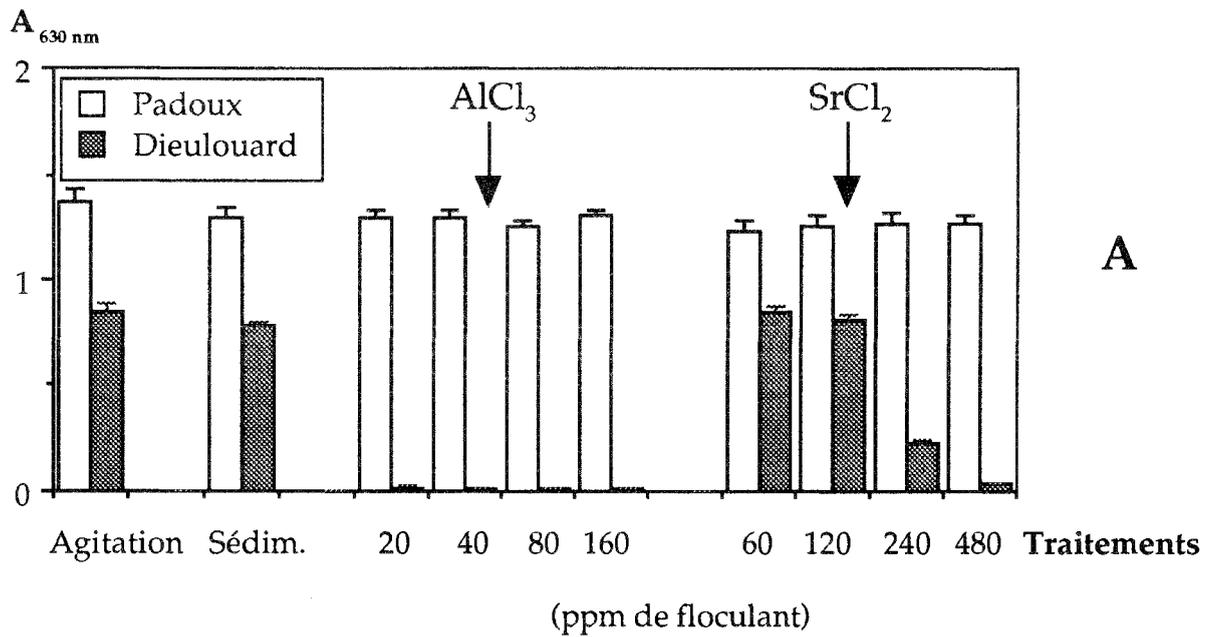
l'agitation, apparaît suffisamment limpide ( $A_{630\text{ nm}} < 0,1$  unité). Des deux flocculants testés, le chlorure d'aluminium s'avère le plus efficace. Ce résultat était attendu du fait de la valence supérieure de l'aluminium.

Le taux de récupération des bactéries inoculées a été estimé par ACP ELISA (Fig. 10B). Les moins bonnes récupérations sont obtenues pour les protocoles se limitant à une agitation et à une sédimentation de 15 mn. Pour les quantités testées, le chlorure de strontium donne de meilleurs résultats que le chlorure d'aluminium. Il permet de récupérer plus de 90% de l'absorbance à 405 nm obtenue sur les suspensions bactériennes pures, quelque soit le type de sol. Mis à part cet optimum, la récupération des bactéries dépend du sol et du flocculant. Il existe une forte interaction entre ces deux paramètres. La détection est d'autant plus faible que la quantité de colloïdes dans la suspension est importante et que le flocculant employé est puissant. Dans le cas de  $\text{AlCl}_3$  il y aurait eu sédimentation d'une partie des bactéries en même temps que la floculation du sol. Dans le cas du sol de Dieulouard, mis en présence de  $\text{SrCl}_2$ , il faut remarquer la bonne corrélation négative entre la limpidité du surnageant et l'absorbance mesurée à 405 nm.

Au vu de ces résultats, l'utilisation du chlorure de strontium permettrait de rétablir la sensibilité de la méthode ACP ELISA lorsqu'on travaille avec des suspensions de sol. Toutefois, ce mode de récupération n'est satisfaisant que si on se limite à la détection de bactéries libres dans la solution. En effet, il s'agissait dans ce protocole de détecter les  $10^7$  cellules de *B. polymyxa* CF43 ajoutées aux  $10^5$  *B. polymyxa* naturellement présents dans un gramme de sol sec. Dans le cas des populations naturelles de *Bacillus polymyxa* dans la rhizosphère du blé, il convient avant tout de procéder à leur extraction à partir du sol. Il est donc nécessaire de passer par une étape de dispersion du sol avant de procéder à la sédimentation par floculation.

L'emploi des résines échangeuses d'ions permet de se placer dans des conditions optimales de dispersion. Avant de tester la dispersion sur des populations de *B. polymyxa* en équilibre, nous avons de nouveau utilisé un protocole d'inoculation.

La forte CEC des argiles présentes dans le sol de Padoux rend leur floculation impossible dans les conditions opératoires utilisées (Fig. 11A). En revanche ce n'est pas le cas du sol de Dieulouard. Comme attendu la non floculation du sol de Padoux s'est traduit par une non détection des bactéries inoculées en ELISA (Fig. 11B). Mais la récupération n'est pas meilleure avec le sol de Dieulouard qui pourtant a floculé. Les bactéries auraient été entraînées dans la floculation avec les autres colloïdes.



**Figure 11** : Traitements floculants sur des suspensions de sol préalablement dispersées avec des résines sodiques. Effets sur la turbidité des suspensions déposées dans les puits (**A**) et sur la détection de *Bacillus polymyxa* CF43 en ACP ELISA (**B**). L'absorbance obtenue à 405 nm, avec la suspension bactérienne sans sol, sert de référence (---).

• *Optimisation des conditions d'extraction des bactéries du sol.*

Notre objectif était toujours d'atteindre les bactéries en équilibre dans le sol, donc peu accessibles par une simple agitation. Les résultats précédents ont montré que le facteur limitant la détection des bactéries était l'adaptation de la méthode de dispersion à nos conditions de récupération. Nous avons testé l'utilisation conjointe des ultrasons (50 w) et du  $\text{SrCl}_2$  pour la détection de population de *B. polymyxa* en équilibre, dans un sol non rhizosphérique et dans un sol adhérent aux racines de blé. Les échantillons provenaient de la station de Dieulouard.

Les données reportées dans le tableau 4 montrent que l'ultrasonication appliquée au sol est un bon moyen de dispersion, ce qui rend d'autant plus indispensable la floculation. Quelque soit le traitement dispersant appliqué, il n'y a pas de différence significative entre les absorbances mesurées en ELISA sur les fractions sol nu et sol adhérent (Fig. 12). Le fait que pour un traitement donné, on détecte la même quantité de *B. polymyxa* corrobore d'autres résultats obtenus au laboratoire. En effet, il semble que l'effet rhizosphérique sur la population de *B. polymyxa* soit plus d'ordre qualitatif que quantitatif. La récupération des bactéries dépend également de leur degré d'association avec les autres colloïdes du sol. Avec ce sol sablo-limoneux, l'accessibilité aux bactéries étudiées semble identique, que l'on se place dans un sol nu ou dans la rhizosphère.

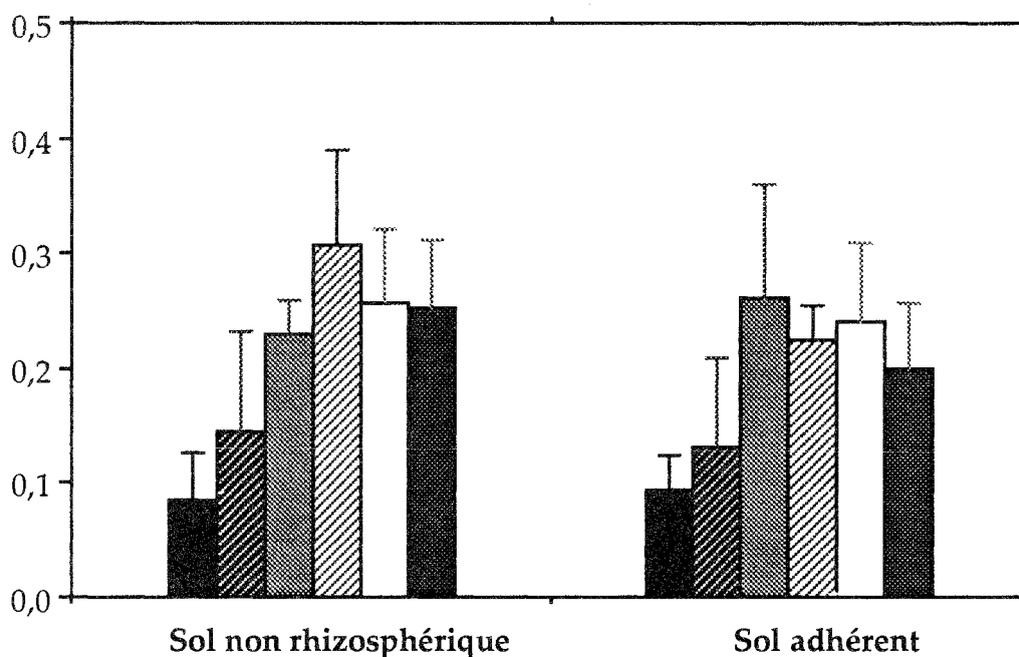
La valeur de 0,1 unité est traditionnellement obtenue en ACP ELISA lorsqu'on procède à une simple agitation manuelle des suspensions. Le traitement aux ultrasons suivi d'une floculation par le  $\text{SrCl}_2$  donne de meilleurs résultats. Cependant, il n'y a pas de différence significative dans la quantité d'antigènes détectables après les différents traitements aux ultrasons. Des puissances de 10 ou 50 watts suffisent pour obtenir le maximum de récupération. L'absorbance lue à 405 nm est de l'ordre de 0,25 unité. Reportée sur une courbe d'étalonnage obtenue avec des suspensions bactériennes pures, cette absorbance équivaut à la détection d'environ  $2 \times 10^3$  cellules de *B. polymyxa* CF43. Ramené à l'unité de poids sec de sol déposé par puits, on peut évaluer à  $2,5 \times 10^5$  bactéries/g, le niveau de *B. polymyxa* ainsi détecté. Ce résultat est tout à fait cohérent avec le chiffre de  $5 \times 10^5$  bactéries/g obtenu avec ce sol, par la méthode de comptage du MPN (Most Probable Number).

*Grâce à l'utilisation conjointe des ultrasons et du chlorure de strontium, sur des échantillons de sol, nous avons une estimation de la taille de la population de B. polymyxa par ELISA approchant celle obtenue par le comptage classique du Nombre le Plus Probable.*

**Tableau 4** : Turbidité des surnageants déposés dans les puits après traitement des suspensions de sol.

	Agitation + sédimentation	Ultrasons	Ultrasons + SrCl <sub>2</sub>
A <sub>630 nm</sub>	0,16 (± 0,02)	1,98 (± 0,11)	0,01 (± 0,02)

A<sub>405 nm</sub> lue après 30 mn.



**Figure 12** : Absorbance mesurée en ACP ELISA, pour différents protocoles d'extraction des bactéries d'un sol non rhizosphérique et d'un sol adhérent. Les traitements consistent à disperser la suspension de sol par une agitation manuelle suivie d'une sédimentation de 15 mn (■) ou d'une flocculation au SrCl<sub>2</sub> (▣), par le traitement conjoint des ultrasons à 10w (▨), 50 w (▧), 100w (□), 200w (⊞) et du SrCl<sub>2</sub>.

## 2.4. DISCUSSION.

L'étude de la dynamique des populations bactériennes telluriques passe par leur extraction du sol. Plusieurs travaux font état de la nécessité d'un protocole de séparation de bactéries du sol pour leur quantification en immunofluorescence (SCHMIDT, 1974) ou par comptage direct (BAKKEN, 1985; HOPKINS et al., 1991). La récupération de *B. polymyxa* à partir d'échantillons de sol est une des principales difficultés rencontrées dans l'étude autécologique de la bactérie. Nous avons été amenés à tester plusieurs procédures d'extraction permettant d'obtenir une fraction bactérienne, représentative du niveau de *B. polymyxa* dans le sol.

- *Dispersion du sol*.

La localisation des micro-organismes à l'intérieur même des agrégats est un des phénomènes qui limite le plus l'extraction des bactéries du sol (KILBERTUS, 1980; HATTORI, 1988). L'individualisation des bactéries des autres particules du sol nécessite des traitements préalables de destruction de la structure en agrégats. La problématique est la même que dans l'analyse granulométrique d'un sol où la méthodologie doit permettre l'individualisation des particules élémentaires. Il n'est donc pas étonnant de trouver des traitements utilisés dans l'extraction des micro-organismes du sol qui soient similaires à ceux destinés à la dispersion des argiles.

Ainsi, nous avons montré que, l'utilisation des ultrasons pour la désagrégation et la dispersion d'un sol sablo-limoneux semble compatible avec la récupération de *Bacillus polymyxa* et sa détection par ACP ELISA. Cette méthode est souvent choisie pour obtenir une récupération optimale des bactéries du sol (STEVENSON, 1958; RAMSAY, 1984; HOPKINS et al., 1991). Cependant la comparaison des résultats mentionnés dans la littérature est difficile car les conditions d'utilisation des ultrasons sont rarement standardisées. De plus, les taux de récupération des bactéries sont estimés par des méthodes aussi diverses que le comptage sur boîte de Pétri (STEVENSON, 1958) ou le comptage directe des cellules au microscope (HOPKINS et al., 1991). Alors que des bactéries fermement attachées aux particules de sol sont extraites grâce aux ultrasons, des puissances trop fortes peuvent endommager les cellules (RAMSAY, 1984), voire les épitopes (BOQUIEN et al., 1991). Nos résultats montrent que l'ultrasonication permet une meilleure détection de *B. polymyxa* par comparaison à une simple agitation de la suspension de sol. Mais, la puissance en sortie de sonde doit être ajustée afin d'obtenir le signal maximum en ELISA. Dans le cas d'un sol sablo-limoneux une puissance de 50 watts suffit pour obtenir une dispersion maximale et par conséquent une récupération optimale des bactéries en ELISA.

Déjà utilisées dans la caractérisation texturale et minéralogique des sols (ROUILLER et al., 1972; BARTOLI et al., 1991) ou le fractionnement physique de la matière organique (FELLER et al., 1991), l'utilisation des résines sodiques a trouvé récemment un nouveau domaine d'application dans l'extraction des bactéries du sol (HOPKINS et al., 1991). Le rôle des résines consiste à décationiser les colloïdes et à remplacer les cations saturants à effet floculant par l'ion  $\text{Na}^+$ . On obtient ainsi une suspension dispersée, parfaitement stable, sans addition d'agent dispersant chimique. Cependant, ce traitement est beaucoup plus long que l'ultrasonication et alourdit la méthodologie, la rendant peu compatible avec le traitement d'un grand nombre d'échantillons. De plus le degré de dispersion élevé complique la séparation des bactéries des autres particules du sol. Le faible taux de récupération obtenu en ACP ELISA rend bien compte de cette limite. L'intégration du système streptavidine - biotine dans le protocole ACP ELISA donne au test une meilleure sensibilité. La possibilité de travailler avec des suspensions de sol moins concentrées donc plus facilement floculables, devrait assurer une meilleure récupération des bactéries après un traitement aux résines.

Les premiers essais visant à coupler l'efficacité des résines cationiques à la sensibilité de la méthode AB ELISA sont encourageants (résultats non communiqués).

- *Séparation des bactéries et des particules de sol.*

Une fois le sol dispersé, la difficulté consiste à éliminer les colloïdes de la suspension tout en conservant le maximum de bactéries, ou d'épitopes bactériens, dans le surnageant. Cette étape de purification du compartiment microbien est indispensable à la détection et à la quantification des *Bacillus polymyxa* du sol par ELISA. En effet, nos résultats montrent que le seuil de détection de la méthode est considérablement augmenté par la présence de particules de sol dans les puits, lors du dépôt.

Les utilisateurs des techniques de marquage par immunofluorescence (IF) ont été également confrontés à ce problème. En effet, la méthode de dénombrement sur membrane de filtration nécessite de travailler avec des suspensions parfaitement limpides (SCHMIDT, 1974). Une des originalités de cette technique consiste à séparer les particules minérales et organiques des bactéries par floculation des colloïdes à l'aide d'un mélange de  $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{MgCO}_3$  (2/5). Cependant certains auteurs (BEZDICEK and DONALDSON, 1980) montrent que ce mélange est le floculant qui engendre le plus de pertes de bactéries.  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{AlCl}_3$  donnent de meilleurs taux de récupération, mais avec des surnageants moins limpides (CROZAT and CLEYET-MAREL, 1984). Dans les conditions opératoires que nous avons employées,  $\text{AlCl}_3$  s'est avéré être un agent floculant plus efficace que  $\text{SrCl}_2$ . Mais ce dernier donne les meilleurs taux de récupération.

La floculation des colloïdes du sol, nécessaire à l'obtention d'un surnageant limpide, doit provoquer inévitablement la cofloculation des cellules bactériennes. Afin d'améliorer ces taux de récupération, d'autres techniques se basent sur la différence de densité qui existe entre les bactéries et les particules de sol. La séparation peut se faire par simple centrifugation à 500 g pendant 2mn (HOPKINS et al., 1991) ou par centrifugation en gradient de densité (WOLLUM II and MILLER, 1980). Ces méthodes permettent de récupérer des suspensions bactériennes très pures. Ainsi, BAKKEN (1985) exprime le degré de purification du surnageant en dosant l'azote d'origine bactérienne. Alors que dans le sol cet azote représente environ 1% de l'azote total, il augmente jusqu'à 10% après centrifugation. Ce résultat est confirmé par le comptage des cellules viables sur milieu nutritif.

Si ce type de méthode est intéressant pour l'isolement de populations bactériennes, des études en microscopie ou l'extraction d'ADN, il n'est pas compatible avec le traitement d'un grand nombre d'échantillons.

- *Le taux de récupération est une caractéristique du sol et de l'espèce bactérienne considérée.*

Effectivement, les taux de récupération diffèrent selon les types de sols, en rapport avec leur sensibilité aux traitements dispersants et floculants employés. REYES et SCHMIDT (1979) obtiennent dans un sol de Waukegan aux Etats-Unis, un taux de récupération de 35% avec la souche 123 de *R. japonicum*, alors que KINGSLEY et BOHLOOL (1981) rapportent des taux inférieurs à 1% dans des sols tropicaux avec la même souche. Dans le cas de fortes populations bactériennes (environ  $10^8$  rhizobia/g de sol), WOLLUM II et MILLER (1980) ont des rendements proches de 100% grâce à une centrifugation des suspensions dans un gradient de saccharose. Ces mêmes auteurs mentionnent que ce taux de récupération est obtenu indépendamment des propriétés physico-chimiques des sols testés (ultisol, alfisol, mollisol, oxisol). En revanche, la récupération pourrait être affectée par l'humidité du sol au moment de l'inoculation des bactéries. L'humidité pourrait intervenir sur la viabilité des bactéries inoculées ou bien, sur l'adsorption des cellules sur les colloïdes du sol. Cependant, on peut penser que ce protocole d'inoculation n'est pas la méthode la plus appropriée pour estimer le taux de récupération des populations microbiennes indigènes d'un sol.

D'autres travaux ont porté sur la récupération de cette microflore autochtone. Dans le cas d'un sol sableux, il n'y a pas de différence entre le nombre de bactéries totales extraites par des traitements aussi différents qu'une agitation mécanique ou des ultrasons, alors que ces derniers permettent de récupérer plus de bactéries dans un sol limoneux (RAMSAY, 1984). La teneur en argile, en favorisant l'attachement entre cellules et particules du sol, est un facteur déterminant dans l'extraction de bactéries. Le taux de récupération de bactéries par agitation puis centrifugation d'une suspension, est

plus faible avec un sol argilo-limoneux qu'avec un sol sablo-limoneux (BAKKEN, 1985). Alors que le taux de récupération est négativement corrélé avec le taux d'argiles, la pureté de la fraction bactérienne est quant à elle positivement corrélée. La centrifugation permettrait de séparer les bactéries parfaitement dissociées des autres cellules, plus denses car encore associées à des particules de sol. Des observations similaires ont été faites par MARTIN et McDONALD (1981). HOPKINS et al. (1991) en concluent que, les difficultés à séparer les bactéries des petites particules minérales ou organiques expliquent les faibles taux de récupération obtenus avec des sols argileux ou très organiques. On peut rajouter, en ce qui concerne les méthodes ELISA, que l'association bactérie-particule du sol risque d'interférer sur la détection des épitopes bactériens par l'antisérum.

Dans le cadre d'études des populations telluriques de *Bacillus polymyxa* par ELISA, il conviendra de définir les limites d'utilisation des méthodes d'extraction pour chaque type de sol. Plus le taux de récupération sera élevé, plus le niveau de détection en ELISA sera important et donc, meilleure sera la résolution.

### 3. Conclusion.

Les résultats présentés dans ce chapitre, montrent que les techniques immuno-enzymatiques sont adaptées à la détection et à la quantification de *Bacillus polymyxa* CF43 en culture pure. Elles sont à la fois sensibles, reproductibles, rapides et faciles à mettre en oeuvre.

Le protocole ACP ELISA proposé permet de détecter entre  $6 \times 10^3$  et  $10^4$  *B. polymyxa* CF43/ml. Ce seuil de détection peut être abaissé à  $3 \times 10^3$  bactéries/ml, en utilisant comme système d'amplification le couple streptavidine-biotine (AB ELISA). Ce dernier protocole offre une meilleure résolution que celle obtenue en ACP ELISA, dans des domaines de faibles concentrations bactériennes.

La spécificité du sérum polyclonal employé se situe au niveau de l'espèce *Bacillus polymyxa* et non pas au niveau de la souche *B. polymyxa* CF43, contre laquelle l'antisérum a été produit.

L'adaptation de ces méthodes à la détection d'une population de *Bacillus polymyxa* tellurique, a nécessité le développement de méthodes d'extraction des bactéries du sol. Grâce à l'utilisation conjointe des ultrasons et du chlorure de strontium, nous avons une estimation de la taille de la population de *Bacillus polymyxa* par ELISA proche de celle obtenue par le comptage classique des MPN.

Cependant, la sensibilité des méthodes testées est sous le contrôle de nombreux paramètres tels que la physiologie de la bactérie, sa présence en mélange avec d'autres bactéries et le taux de récupération des bactéries du sol. Ces variables s'ajoutent à la variable étudiée, qui est le nombre d'épitopes bactériens déposés par puits. Dans ces conditions, il paraît abusif de convertir une absorbance lue par ELISA en un nombre de cellules déposées par puits. L'outil immuno-enzymatique sera donc utilisé pour comparer entre différents traitements, les niveaux de population de *Bacillus polymyxa*, exprimés en unités d'absorbance à 405 nm.

## CHAPITRE 2

**Suivi de la population de *Bacillus polymyxa* dans la rhizosphère du blé après inoculation : étude de l'interaction avec le sol.**

- **Partie 1** : Devenir de *Bacillus polymyxa* dans la rhizosphère du blé après inoculation.
- **Partie 2** : Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere : preliminary examination (Article).

## 1. Devenir de *Bacillus polymyxa* dans la rhizosphère du blé après inoculation.

### 1. 1. INTRODUCTION.

Pour les raisons évoquées dans l'introduction générale, les micro-organismes du sol peuvent avoir une action bénéfique sur la croissance des plantes. Plusieurs tentatives ont été effectuées afin de contrôler certaines de ces activités. Une des approches possibles consiste à inoculer la plante avec l'espèce bactérienne potentiellement intéressante. La bactérie peut être apportée par inoculation du sol, par bactérisation des semences ou des racines ( BROWN, 1974). Il s'est avéré que l'extrême variabilité des résultats rapportés constituait un des obstacles majeurs au développement de ces techniques. Les raisons évoquées prennent en compte la mauvaise survie de l'inoculum sur la semence avant semis ainsi que les difficultés pour la souche inoculée à s'installer durablement dans le sol ou sur les racines. La maîtrise de l'inoculation passe donc par l'identification puis le contrôle des facteurs régissant la colonisation rhizosphérique par une population bactérienne.

De nombreuses informations sont disponibles sur la survie de bactéries après introduction dans un sol, *in vitro* au laboratoire ou *in situ* dans les conditions du champ. Dans la plupart des cas, une chute du nombre de bactéries introduites est rapportée (ALBRECHT et al., 1983; VAN ELSAS et al., 1989; HEYNEN et al., 1988), rappelant le rôle des facteurs biotiques et abiotiques du sol sur la dynamique des populations bactériennes. Plusieurs travaux montrent en effet, que les dynamiques de population ainsi que l'activité des micro-organismes dans un sol sont influencés par de nombreux facteurs comme l'humidité (HOWIE et al., 1987), la température (SEONG et al., 1991), le pH (RICHARDSON et al., 1988) ou encore le niveau de substrat disponible. Des composantes physiques comme la texture (HEYNEN et al., 1988) et la structure du sol (POSTMA and VAN VEEN, 1990) sont aussi importantes. La diminution du nombre de bactéries introduites est également attribuée à l'action de prédation par des protozoaires (STEINBERG et al., 1987) ou à l'antagonisme exercé par d'autres populations du sol (MAZZOLA and COOK, 1991).

La survie des bactéries inoculées est généralement améliorée par la présence de racines en croissance dans le milieu (ALBRECHT et al., 1983). D'un autre coté, la présence d'une plante peut amplifier les phénomènes de régulation déjà existants dans le sol ou en induire de nouveaux. En 1973,

BOWEN et ROVIRA mettent l'accent sur la complexité du phénomène en posant la question suivante : " Are modelling approaches useful in rhizosphere biology ?". Ils concluent en écrivant qu'une telle approche dans l'étude de la rhizosphère pourrait être utile, mais que certains paramètres tels que, la distribution des micro-organismes dans le sol, les temps de génération des bactéries, les taux de croissance des champignons, la croissance des racines, la nature et la quantité des exsudats ainsi que les conditions dans le sol nécessitent des études supplémentaires avant qu'il soit possible de quantifier la colonisation et la croissance des micro-organismes dans la rhizosphère. Aujourd'hui encore, chacun des paramètres abordés par BOWEN et ROVIRA font l'objet de nombreuses études. Malgré la complexité du sujet, SCHER et al. (1984) rappellent que l'étude écologique de la rhizosphère ne peut se faire dans son ensemble qu'en utilisant des sols bruts. Il en est de même pour l'étude du devenir d'une population bactérienne introduite dans cette rhizosphère. Une espèce bactérienne introduite dans un sol stérile se développe rapidement pouvant atteindre des densités élevées, alors que l'inoculation de la même espèce dans un sol non stérile est généralement suivie par une chute de la population introduite pouvant aller jusqu'à la disparition de celle-ci (DANSO et al., 1975; ACEA et al., 1988).

A notre tour, nous nous sommes posé la question du devenir de la souche CF43 dans la rhizosphère du blé, après inoculation. Les méthodes ELISA que nous avons développées donnent une estimation du niveau de colonisation du sol rhizosphérique et des racines par l'espèce *Bacillus polymyxa* et pas seulement par la souche CF43. Les suivis ont été effectués *in vitro* dans des dispositifs de laboratoire et *in situ*, dans les conditions du champ. Les conséquences de l'inoculation sur la croissance des racines ainsi que sur leur environnement physique ont également été mesurées.

## 1. 2. MATERIEL ET METHODES.

- *Les types de sols.*

Trois sols ont été utilisés pour cette étude. L'un provient du département de la Côte-d'Or (Auxonne) et les deux autres de Meurthe-et-Moselle (Dieulouard et Sexey-les-Bois). Ils ont été choisis pour leurs textures contrastées. Leurs caractéristiques sont données en annexe 5. La vermiculite a également été utilisée pour des expériences *in vitro*.

- *Variété de blé.*

La variété retenue est *Fidel*. Inscrit au catalogue français en 1979, *Fidel* est une variété de blé de type alternatif. Les semences que nous avons utilisées provenaient d'un lot de semences certifiées et traitées (anthraquinone et bétaxane).

- *Préparation de l'inoculum.*

Nous avons adopté la stratégie d'inoculer des spores de *Bacillus polymyxa* CF43 plutôt que des formes végétatives. Ce conditionnement permet de réduire la mortalité des cellules lors de la conservation de l'inoculum. Deux protocoles ont été utilisés pour la production de spores.

(i). *En milieu liquide.* Le milieu à base d'amidon utilisé a été décrit par KATZNELSON et LOCHHEAD (1944). Sa composition figure en annexe . Le milieu a été autoclavé pendant 30 mn à 110°C. Il a été inoculé à la dose de 1% (v/v) avec une préculture de *Bacillus polymyxa* CF43 produite sur ce même milieu. L'incubation à 28°C a duré 3 jours. Une forte aération du milieu a été assurée pendant les 8 premières heures de culture. Après 24 heures, on obtenait environ  $10^8$  bactéries/ml, très mobiles. Après 48 heures de culture, on estimait à  $5 \times 10^7$  le nombre de spores, par ml de milieu. Au 3<sup>ème</sup> jour de culture, les spores étaient totalement formées, pour la plupart libérées de leur fantôme. A ce stade le milieu a été centrifugé à 3600 g pendant 30 mn (centrifugeuse Beckman J2-21). Le culot ainsi récupéré constituait l'inoculum, et se composait du mélange des bactéries et de leurs polysaccharides. Ce protocole présente l'avantage d'être facile à mettre en oeuvre, mais les conditions opératoires, établies de façon empirique, ne garantissent pas systématiquement la sporulation.

(ii). *Sur milieu solide.* Les conditions aérobies qui règnent sur milieu solide en boîte de Pétri, sont favorables à la sporulation de *Bacillus polymyxa*. Nous avons utilisé le protocole suivant : une

préculture, âgée de 24 heures, a été obtenue sur milieu LB. Une série de dilutions a été effectuée dans une solution de KCl (0,1M) stérile, pour aboutir à une suspension contenant environ  $5 \times 10^3$  bactéries/ml. On a étalé 50 µl de cette suspension dans chacune des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (marque Biokar). Après 24 heures d'incubation à 30°C, 200 à 300 colonies isolées sont apparues dans chaque boîte. L'individualisation des colonies apparaissait comme une condition nécessaire à la sporulation. Le niveau de sporulation était maximal à partir du 5<sup>ème</sup> jour d'incubation. A ce stade, les colonies ont été récoltées à la spatule et remises en suspension dans le KCl (0,1M) stérile. Dans ces conditions, on récupérait environ  $10^9$  spores par boîtes. Contrairement au protocole précédent, cette méthode garantissait la production de spores. De plus, elle permet un contrôle direct de la pureté des colonies récoltées. Mais le protocole est alourdi par le mode d'ensemencement des boîtes.

• *Inoculation des plantes.*

(i). *Par enrobage des semences.* Pour assurer un bon pelliculage des bactéries autour de la graine nous les avons mélangées au préalable à de la gomme arabique. Une masse donnée de gomme arabique (Merck, Art. 4282) a été solubilisée dans de l'eau distillée à 60°C. Après refroidissement, la solution a été mélangée à la suspension bactérienne. La quantité de gomme utilisée a été calculée de façon à obtenir dans le mélange final, 15% (w/v) de gomme arabique. De même la concentration bactérienne du mélange a été ajustée en fonction du niveau d'inoculation recherché. Les semences ont été déposées dans un flacon sérum. Elles ont reçu le mélange bactéries-gomme arabique, à raison de 3 ml pour 500 semences. Le flacon a été mis à agiter pendant 45 mn sur un agitateur rotatif. Les semences ainsi enrobées ont été étalées et mises à sécher à l'air pendant 2 jours.

Le traitement témoin consistait à enrober les graines uniquement avec la gomme arabique.

Des échantillons de 10 graines inoculés ou non (témoins), ont été prélevés afin d'estimer le nombre de spores fixées sur chacune d'elles. Chaque graine a été déposée dans un microtube contenant 1 ml de KCl stérile. Après agitation au vortex, la quantité de spores dans la suspension a été estimée par comptage des CFU sur gélose nutritive.

(ii). *Par aspersion.* Ce type d'inoculation a été effectué conjointement à l'enrobage, lors de l'expérimentation sous serre. L'apport a été réalisé au moment du semis. Environ  $5 \times 10^{10}$  spores de *Bacillus polymyxa* CF43, produites sur gélose nutritive, ont été mises en suspension dans 1600 ml d'eau distillée. Chaque pot inoculé a reçu 50 ml de cette suspension, soit au total  $1,5 \times 10^9$  bactéries. Dans un premier temps, on assurait ainsi un enrichissement superficiel du sol en *Bacillus polymyxa* CF43. Cet inoculum venait s'ajouter aux  $2,5 \times 10^7$  spores fixées sur chaque semence.

Le traitement témoin consistait à apporter 50 ml d'une suspension contenant  $1,5 \times 10^9$  spores de *Bacillus polymyxa* CF43 tuées par deux autoclavages à 120°C.

• *Conditions de croissance des plantes.*

(i). *En incubateur réfrigéré et illuminé.* Une première expérience consistait à faire germer les semences pendant 7 jours dans des bacs en plastique (19 x 13 x 9 cm). Ceux-ci ont été remplis avec la vermiculite ou avec le sol brun, sablo-limoneux. Chacun a reçu 100 semences témoins ou 100 semences inoculées avec  $10^7$  spores de *B. polymyxa* CF43.

Une deuxième expérience utilisait des tubes de culture *in vitro* (15 cm de hauteur et 2,1 cm de diamètre), remplis sur toute leur hauteur avec chacun des trois sols étudiés. Deux semences ont été déposées dans chaque tube. On disposait de 4 lots de graines enrobées avec 0,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^6$  et  $10^8$  spores de *Bacillus polymyxa* CF43. Les tubes ont été pesés régulièrement afin de réajuster l'humidité des sols au cours de l'expérience (12% pour les sols sableux et sablo-limoneux, 28% pour le sol argileux). La disposition des tubes, dans l'incubateur, a été totalement randomisée. Chaque traitement est étudié avec 6 répétitions. Les plantes ont été récoltées 7 jours après le semis (stade 2 feuilles).

Pour ces deux expériences, l'incubateur (Forma Scientific) a été réglé pour une période d'éclairage de 14 heures et une température, diurne comme nocturne, de 16°C.

(ii). *Sous serre.* Un abrit-serre avait été mis à notre disposition dans le cadre d'une collaboration avec l'Equipe de Microbiologie des Sols de l'INRA de DIJON. Les cultures ont été effectuées dans des pots en PVC de 30 cm de haut et 6,7 cm de diamètre (soit une surface de 142 cm<sup>2</sup>). Le sol sableux, provenant d'Auxonne, a été utilisé pour cette expérience. L'équivalent de 3,3 kg de sol sec a été placé dans chaque pot, au fond duquel avait été mis au préalable une couche drainante (1 à 2 cm de billes d'argile cuite POPCLAY). Tous les pots ont reçu en solution, 272 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> complété avec 89 mg de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, soit l'équivalent de 100 kg/ha de K<sub>2</sub>O et P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. De plus la moitié des pots a reçu 142 mg d'azote sous forme d'une solution d'ammonitrates, soit l'équivalent de 100 Kg N/ha. L'autre moitié n'a reçu que l'équivalent du volume en eau distillée. On a déposé 8 semences par pot, pour n'en conserver que 5 après germination. L'apport des solutions amenait le sol à 100% de sa capacité en eau. L'ajout de 50 ml d'inoculum bactérien, viable ou tué, a engendré un excès d'humidité. Par la suite, celle-ci a été maintenue quotidiennement à la capacité de rétention, soit 10,2 %. L'arrangement des pots a été fait selon un dispositif en randomisation totale. L'expérience a été conduite pendant 41 jours, du 6 juin au 17 juillet 1991.

(iii). *En conditions de plein champ.* Les graines ont été semées le 22 mars 1989 sur une parcelle argileuse située à Sexey-les-Bois. L'essai consistait à étudier l'effet croisé de l'inoculation avec la fertilisation azotée sur la croissance de la plante. Le facteur inoculation était étudié aux niveaux 0 et  $10^6$  bactéries/semence, et le facteur azote aux niveaux 0, 80 et 160 Kg N/ ha. Les détails de la disposition des parcelles en split-plot sont donnés dans la 3<sup>ème</sup> partie.

• *Echantillonnage des rhizosphères.*

(i) *Prélèvements des systèmes racinaires.* Dans le cas de culture en pot, il est relativement facile de récupérer la totalité du système racinaire. Une fois le contenu du pot sorti, on a séparé délicatement les systèmes racinaires. Ceux-ci ont été agités manuellement, afin d'éliminer le sol non adhérent aux racines. On récupérait donc un échantillon constitué d'un système racinaire entier et du sol qui y adhérait. Evidemment, la nature des rhizosphères récoltées variait selon le stade de développement de la plante.

Dans le cas des essais en incubateur, l'échantillon était exclusivement constitué de racines séminales qui ont été analysées dans leur totalité. Dans l'expérience en bac, les plantules ont été récoltées après 7 jours de germination. On a formé 3 lots de 25 plantules ayant correctement germé, à partir des 100 graines semées. Pour la suite des traitements, chaque lot était considéré comme 1 répétition. A chaque essai, un seul bac était mis en place par traitement. Dans la deuxième expérience, les graines ont été mises à germer durant 7 jours, dans des tubes de cultures *in vitro*. Pour chaque modalité, 6 tubes ayant reçu chacun 2 graines, ont été récoltés. La totalité des racines récoltées par tube est considéré comme un seul échantillon.

Lors de l'essai en serre, nous avons effectué 4 prélèvements espacés chacun de 1 semaine. A chaque prélèvement, 4 pots contenant 5 plantes chacun, ont été sacrifiés par modalité. Le premier prélèvement précédait le tallage des plantes (stade 4-5 feuilles). Dans chaque pot, nous avons prélevé une racine séminale entière pour chacune des 5 plantes. Lors des deux prélèvements suivants, les plantes étaient en plein tallage et en début de montaison lors du dernier prélèvement. Dans ces trois cas, le chevelu racinaire était trop important pour individualiser les systèmes racinaires des 5 plantes. Des tronçons de racines, avec leur sol adhérent, ont été prélevées aléatoirement sur l'ensemble des systèmes racinaires. A chaque prélèvement nous avons échantillonné du sol non rhizosphérique, défini comme le sol restant après extraction et agitation des systèmes racinaires. Il constituait la référence dans la mise en évidence d'un "effet rhizosphère" sur la dynamique de la population de *Bacillus polymyxa*.

La difficulté de l'essai au champ consistait à prélever un échantillon rhizosphérique représentatif. Pour des raisons matérielles, les prélèvements ont été effectués à l'intérieur de 4 blocs, sur les parcelles ayant reçues une fertilisation azotée. Des échantillons ont été prélevés en 3 points différents de la parcelle sur les lignes de semis centrales. Pour les 3 premiers prélèvements un échantillon se composait de 3 plantules voisines. Pour le 4<sup>ème</sup> prélèvement, il s'agit d'un seul plateau de tallage. Les parties racinaires ont été prélevées à l'aide d'une pelle et les racines débarrassées du sol non adhérent par agitation. Par cette technique de prélèvement on n'a recueilli qu'une partie du système racinaire, constituée des racines les plus robustes se trouvant dans les 15 premiers centimètres du sol.

Une fois prélevée, la plante était sectionnée au niveau du collet. Dans le cas de jeunes plantules, les racines séminales étaient coupées 1 cm en dessous de la graine.

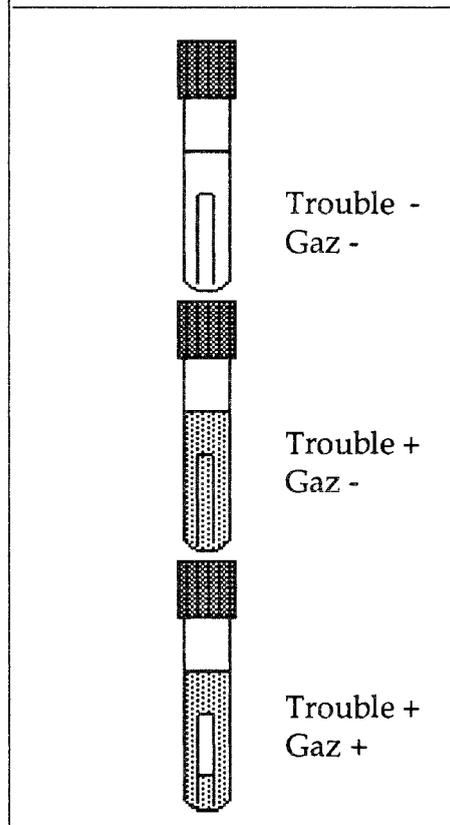
(ii) *traitement des échantillons.* Dans un premier temps, le poids humide des échantillons a été mesuré. Ce résultat permettait de déterminer le volume de tampon phosphate (PBS, pH 7,2) à rajouter pour obtenir des suspensions équivalentes du point de vue de leur concentration en sol. Ces concentrations étaient variables d'une expérience à l'autre, mais parfaitement fixées pour une expérience donnée. Elles étaient de 50 ou 100 g/l pour le sol argileux, de 100 g/l pour le sol sablo-limoneux et de 100 ou 200 g/l pour le sol sableux. La mesure du poids sec de sol permettait de connaître a posteriori la concentration avec précision.

Une fois le PBS ajouté, la suspension était agitée énergiquement de façon à séparer parfaitement les racines du sol adhérent. Les racines ainsi lavées ont été broyées dans 5 ml d'eau distillée (Vibro-broyeur Retsch). Puis les volumes ont été complétés à 20 ou 30 ml selon les quantités broyées. L'eau distillée a été préférée au tampon phosphate car elle évitait toute addition de sels qu'il aurait fallu prendre en compte dans les poids secs, mesurés par la suite. Or dans le cas du PBS, ce poids (10,4 g/l) était généralement supérieur à celui des racines broyées (environ 5g/l).

• *Détermination du niveau de la population de Bacillus polymyxa.*

(i) *Par les méthodes ELISA.* Les broyats racinaires n'ont subi aucun traitement avant d'être déposés dans les plaques de microtitration, ce qui n'a pas été le cas des suspensions de sol adhérent. Dans un premier temps, le protocole ACP ELISA a été utilisé. Dans ce cas, la suspension de sol ne subissait aucun traitement dispersant autre qu'une simple agitation. Ce protocole n'a été utilisé que pour l'expérience au champ.

**Figure 13** : Schéma de lecture des résultats par la méthode de comptage des MPN.



Pour les autres expériences, les traitements dispersants et floculants ont été employés en association avec la technique AB ELISA. Le matériel utilisé était identique à celui décrit dans la première partie. Les ultrasons ont été appliqués avec une puissance de 10 watts en sortie de sonde. La floculation a été obtenue en ajoutant 100 µl d'une solution de chlorure de strontium (à 236 g Sr/l), à l'exception du sol argileux qui n'a floculé qu'en présence de 100 µl d'une solution de chlorure d'aluminium (78 g Al/l). Après avoir laissé sédimenter les floccs pendant 15 mn, le surnageant a été échantillonné dans le but de tester sa réactivité vis à vis de l'immunsérum anti-*Bacillus polymyxa* CF43.

(ii) *Par la méthode des MPN.* Les méthodes ELISA nous informaient sur un niveau de population de *Bacillus polymyxa* (exprimé en unité d'absorbance à 405 nm) et non pas sur le nombre d'individus. Nous avons tenté d'associer la spécificité des méthodes ELISA au calcul du nombre le plus probable de bactéries par la méthode de Mc Crady.

Cette technique comportant l'ensemencement d'un milieu liquide, avec un volume connu de broyat racinaire ou de suspension de sol, se propose d'estimer, en le rapportant à l'unité de poids, le nombre le plus probable de germes viables et capables de proliférer dans ce milieu. Ce nombre nous est donné par les tables de Mc Crady. La lecture des résultats consiste à compter pour chaque dilution le nombre de tubes positifs impliquant une culture. On doit admettre que la présence d'un germe viable dans l'inoculum est nécessaire et suffisante pour qu'il y ait une croissance bactérienne dans le tube. L'estimation est sûrement faite par défaut. La détermination du nombre le plus probable de germes est alors déduite du nombre de tubes positifs trouvés pour des dilutions consécutives.

Nous ne nous sommes pas limités à mesurer un trouble dans le tube. Nous avons également suivi la production de gaz et la réactivité du mélange bactérien en ACP ELISA, après 5 jours de culture. Dans le cas où ces deux derniers caractères étaient positifs, on pouvait penser qu'il y avait au moins une cellule viable de *Bacillus polymyxa* dans l'inoculum. Le test ELISA n'a été effectué que sur les cultures présentant une production significative de gaz. Des résultats préliminaires ont montré une bonne adéquation entre ces deux caractères.

Le milieu de croissance utilisé avait la composition suivante : 5 g de glucose; 5 g d'amidon; 10 g de peptone; 1 litre de solution RCV (composition en annexe 1). Il a été autoclavé à 110°C. La cloche de Durhan renversée, permettait de mettre en évidence la production de gaz (Fig. 13). Chaque tube a reçu 9,8 ml de milieu. Il a été inoculé avec 0,2 ml de broyat racinaire ou de suspension de sol. La lecture des résultats a été effectuée après 5 jours d'incubation à 30°C. Pour chaque dilution, on a ensemencé 3 tubes. On disposait de 3 répétitions par traitement de semences. Chaque répétition était constituée de 25

plantules obtenues par germination des 100 semences. La lourdeur de ce protocole ne nous permettait pas de tester plus de répétitions.

- *Numération de la microflore totale.*

Cette microflore a été estimée parallèlement au niveau de population de *Bacillus polymyxa*, dans l'expérience en serre. Un volume de 100 µl a été prélevé dans le broyat racinaire et dans la suspension de sol avant que celle-ci ne soit dispersée par les ultrasons, afin de conserver la viabilité des cellules bactériennes. Les dilutions réalisées à partir de cet échantillon ont été déposées en spot de 10 µl sur milieu gélosé tryptone-soja (composition en annexe 1). On pouvait ainsi placer dans chaque boîte de Pétri 6 spots, correspondant à 3 répétitions de 2 dilutions. Les comptages ont eu lieu après 24 et 48 heures d'incubation à 30°C.

- *Traitements statistiques.*

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel d'analyse statistique STATITCF. Dans le cas des expériences en pot, nous avons étudié des dispositifs en randomisation totale avec répétitions. Un facteur (inoculation) ou deux (azote inoculation; sol-inoculation) ont été pris en compte. Les résultats de l'expérience au champ ont été analysés selon un dispositif en split-plot à deux facteurs étudiés (azote et inoculation), avec le facteur azote en sous-bloc. Les risques de 1<sup>ère</sup> et de 2<sup>ème</sup> espèces ont été fixés respectivement à 5 et 10 %. Les groupes homogènes sont donnés par le test de Newman et Keuls. Les intervalles de confiance calculés à partir des écart-types, sont donnés à 95%.

### 1. 3. RESULTATS.

- *Stabilité de l'inoculum après enrobage.*

Les résultats présentés dans le tableau 5 montrent que par la technique d'enrobage utilisée, il est possible de fixer jusqu'à 10<sup>7</sup> spores/graines. Le pelliculage ne modifie pas la morphologie de la semence et la phase d'humectation lors de l'enrobage est suffisamment courte pour qu'il n'y ait pas de germination.

**Tableau 5** : Résultats des comptages de cellules de *Bacillus polymyxa* CF 43 adsorbées sur les semences. Les moyennes sont calculées à partir de 10 répétitions. Les intervalles de confiance sont donnés à 95 %.

Durée du stockage	CFU <i>B. polymyxa</i> CF43 / semence	
	Témoin	inoculé
0 jour	<10 <sup>2</sup>	8,8 ± 2,5 .10 <sup>6</sup>
1 mois	idem	7,8 ± 4,0 .10 <sup>6</sup>
2 mois	idem	1,8 ± 0,7 .10 <sup>7</sup>
4 mois	idem	3,8 ± 1,5 .10 <sup>6</sup>

**Tableau 6** : Effet de l'inoculation sur les valeurs des absorbances lues en ACP ELISA, après germination des plantules dans la vermiculite. Les groupes homogènes obtenus par le test de Newman et Keuls (seuil de 5%) pour le facteur inoculation, figurent en caractères gras.

	Témoin	Inoculé
A <sub>405 nm</sub> / grain après germination	0,08 ± 0,10 <b>(a)</b>	0,52 ± 0,16 <b>(b)</b>
A <sub>405 nm</sub> / 10 mg sec de racines lavées.	0,24 ± 0,22 <b>(a)</b>	0,91 ± 0,25 <b>(b)</b>

**Tableau 7 :** Résultats des numérations (log bactéries/g de racines), obtenues par la méthode des MPN sur les racines de plantules de blé ayant germé dans la vermiculite.

	témoin	inoculé
<b>Totalité des cellules,</b>		
Donnant un trouble	8,6 ± 0,6	8,8 ± 0,2
Produisant du gaz	4,2 ± 0,3	6,1 ± 0,3
Réagissant avec l'antisérum anti-CF 43 ( $A_{405\text{nm}}$ après 20 mn > 0,2)	3,8 ± 0,2	6,0 ± 0,4

**Tableau 8 :** Résultats des numérations (en log bactéries/g de racine ou de sol), obtenues par la méthode des MPN, sur les racines de plantules de blé ayant germé dans un sol brun sablo-limoneux.

	Racine		Sol adhérent	
	témoin	inoculé	témoin	inoculé
<b>Totalité des cellules,</b>				
Donnant un trouble	7,8 ± 0,7	7,8 ± 0,6	8,2 ± 0,8	8,2 ± 0,6
Produisant du gaz	7,3 ± 0,7	6,6 ± 0,3	8,0 ± 0,6	7,7 ± 0,4
Réagissant avec l'antisérum anti-CF 43 ( $A_{405\text{nm}}$ après 20 mn > 0,2)	2,1 ± 0,1	4,2 ± 0,4	2,0 ± 0,4	5,2 ± 1,1

L'apport des bactéries sous forme de spores, permet une très bonne survie de l'inoculum pendant le stockage des semences à 4°C. Il importait alors de savoir si cette survie était aussi effective dans le sol, afin d'assurer une bonne colonisation des racines séminales au moment de la germination.

- *Approche quantitative de la colonisation.*

(i) *Dans la vermiculite.* Dans un premier temps les tests de colonisation ont été fait sur des jeunes plantules âgées de 7 jours, ayant germées dans la vermiculite. Bien que non stérile, celle-ci hébergeait une microflore beaucoup moins diversifiée que celle d'un sol.

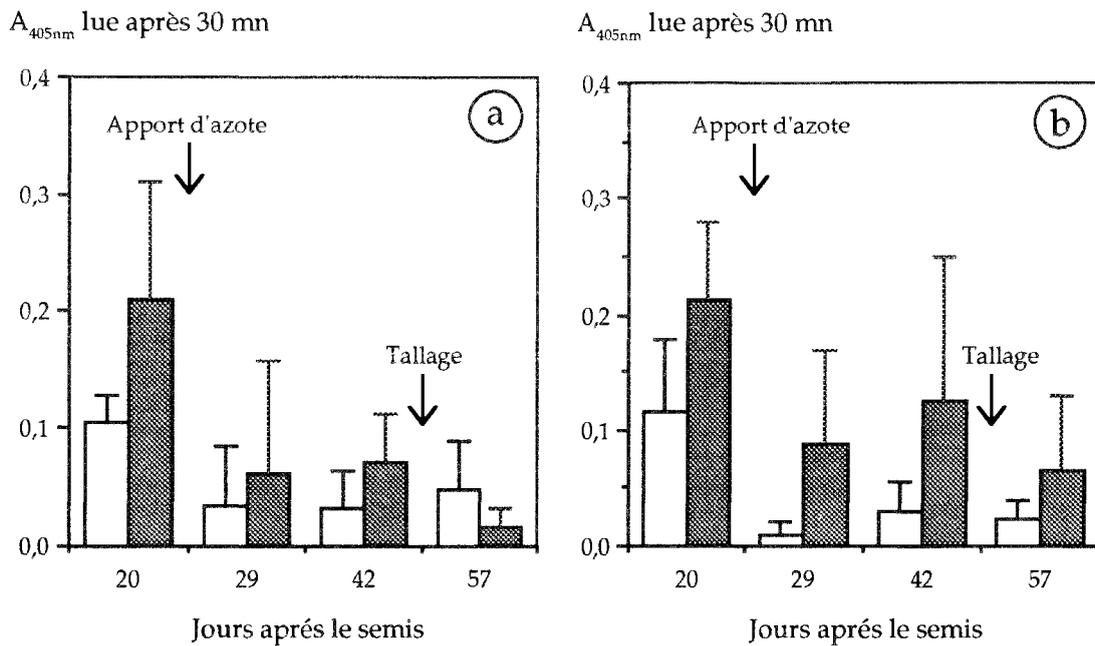
Le reste de la semence a été broyé puis testé en ACP ELISA. Les racines ont été débarrassées de la vermiculite par lavage à l'eau distillée, avant d'être à leur tour broyées.

Après 7 jours de germination, les absorbances mesurées sur les broyats de graines inoculées, montrent qu'il reste une quantité importante de cellules bactériennes adsorbées (Tableau 6). Cependant, il était impossible de connaître l'activité de cette population et son rôle sur la plante en germination. La différence d'absorbance entre traitements témoin et inoculé est encore plus nette au niveau des racines. La souche *Bacillus polymyxa* CF43 est bien présente et elle est capable de coloniser rapidement le système racinaire nouvellement formé. Les résultats obtenus parallèlement par la méthode des MPN permettent de quantifier cette colonisation (Tableau 7). L'inoculation a multiplié par un facteur 100 la population de bactéries proches de *Bacillus polymyxa* CF43, sans pour autant affecter quantitativement la microflore totale.

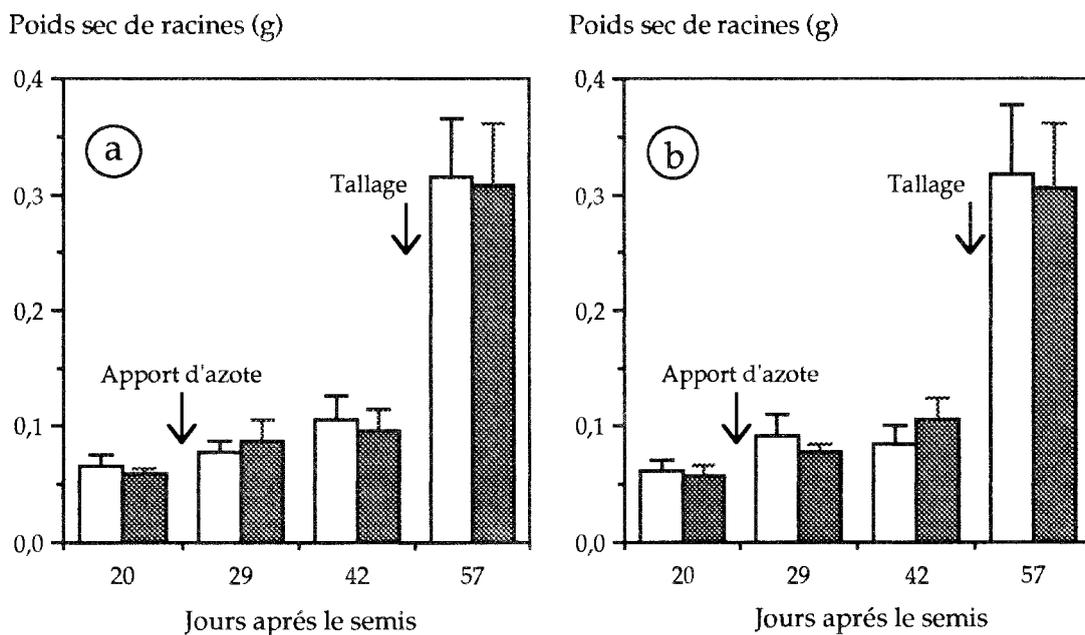
(ii) *Dans le sol brun, sablo-limoneux.* L'expérience a été renouvelée, mais la germination s'est effectuée dans un sol brun, sablo-limoneux (Dieulouard). Nous avons considéré séparément le sol adhérent et les racines lavées. A nouveau, l'inoculation déplace le niveau de population de *Bacillus polymyxa* (Tableau 8). Cet effet est plus marqué dans le sol adhérent que sur les racines. La colonisation racinaire demeure plus faible que lorsque le support est constitué de vermiculite. Ceci se fait au détriment de la population de *Bacillus polymyxa* proche de CF43 qui semble moins compétitive, vis à vis de la microflore tellurique, pour la colonisation du rhizoplan.

- *Etudes de rhizosphères prélevées au champ .*

Les résultats précédents montrent qu'il est possible de déplacer le niveau de population de *Bacillus polymyxa* au contact des racines et dans le sol adhérent, durant les jours qui suivent la germination. Nous avons cherché à évaluer la durée du phénomène.



**Figure 14 :** Evolution du niveau de *Bacillus polymyxa* détectés par ACP ELISA, sur des racines prélevées au champ, dans un sol argileux. Comparaison entre traitements témoin (□) et inoculé avec *B. polymyxa* CF43 (▨) pour des niveaux de fertilisation azotée de 80 (a) et 160 KgN/ha (b). Les moyennes ont été calculées à partir de 12 répétitions. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%.



**Figure 15 :** Evolution du poids de matière sèche de racines prélevées au cours de l'expérience au champ. Comparaison entre traitements témoin (□) et inoculé avec *B. polymyxa* CF43 (▨) pour des niveaux de fertilisation azotée de 80 (a) et 160 KgN/ha (b). Les moyennes ont été calculées à partir de 12 répétitions. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%.

Le suivi a été fait sur des systèmes racinaires prélevés au champ. L'essai était implanté dans un sol argileux. Les semences inoculées avaient reçues chacune  $10^6$  *Bacillus polymyxa* CF43. Nous avons traité séparément les échantillons provenant de parcelles fertilisées avec l'équivalent de 80 et 160 Kg N/ha.

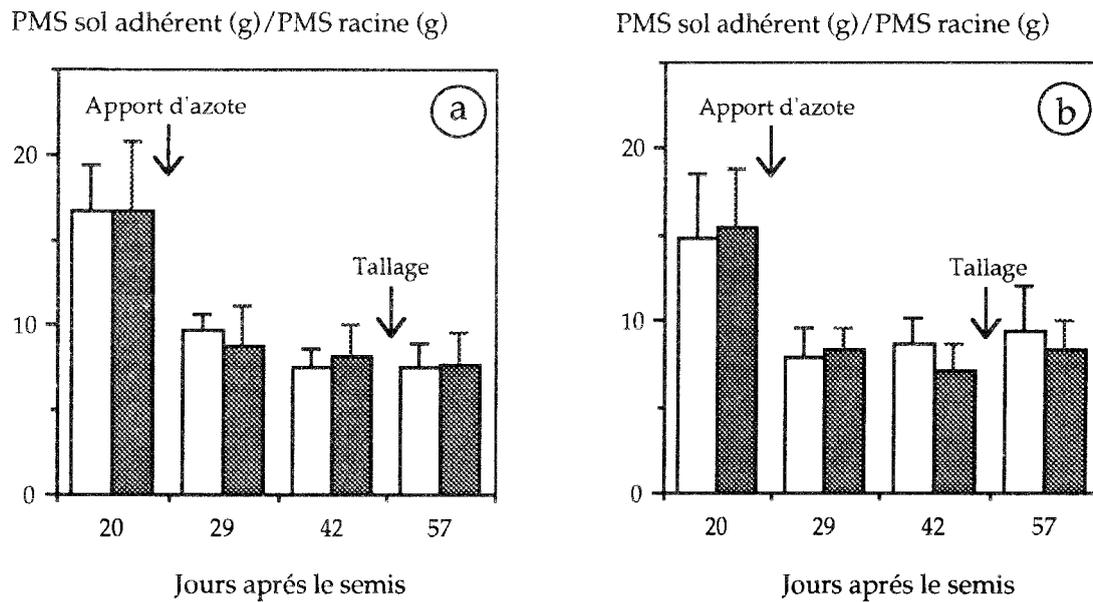
L'analyse, en ACP ELISA, de broyats racinaires (Fig. 14) montre que l'inoculation déplace le niveau de population de *Bacillus polymyxa* durant les deux mois qui suivent le semis ( $p=0,006$ ). L'effet est particulièrement marqué après la levée (20 j) et s'atténue au cours des prélèvements. La différence de fertilisation azotée ne modifie pas le niveau de colonisation des racines par *Bacillus polymyxa*. Tous traitements confondus, l'absorbance mesurée à 405 nm diminue aussi au cours du temps alors que la quantité de racines prélevées augmente (Fig. 15). Cette chute est à mettre en relation avec le changement de systèmes racinaires prélevés, ceux-ci présentant des niveaux de colonisation différents. A ce titre, le rapport Poids Sec de Sol Adhérent/Poids Sec de Racine (SA/R) est un bon indicateur de la nature des racines prélevées (Fig. 16). A 20 j, on prélève la totalité des racines séminales avec des zones pilifères actives et agrégeantes alors que par la suite les échantillons se composent d'éléments plus âgés et apparemment moins actifs. Au tallage, l'apparition d'un système nodal ne modifie ni les résultats en ACP ELISA ni le rapport SA/R.

Quant au sol adhérent, l'absence de prétraitement dispersant et flocculant rend inefficace l'application de l'ACP ELISA à ce compartiment (Fig. 17). Les absorbances, mesurées après 30 mn d'incubation, restent inférieures à 0,1 unité.

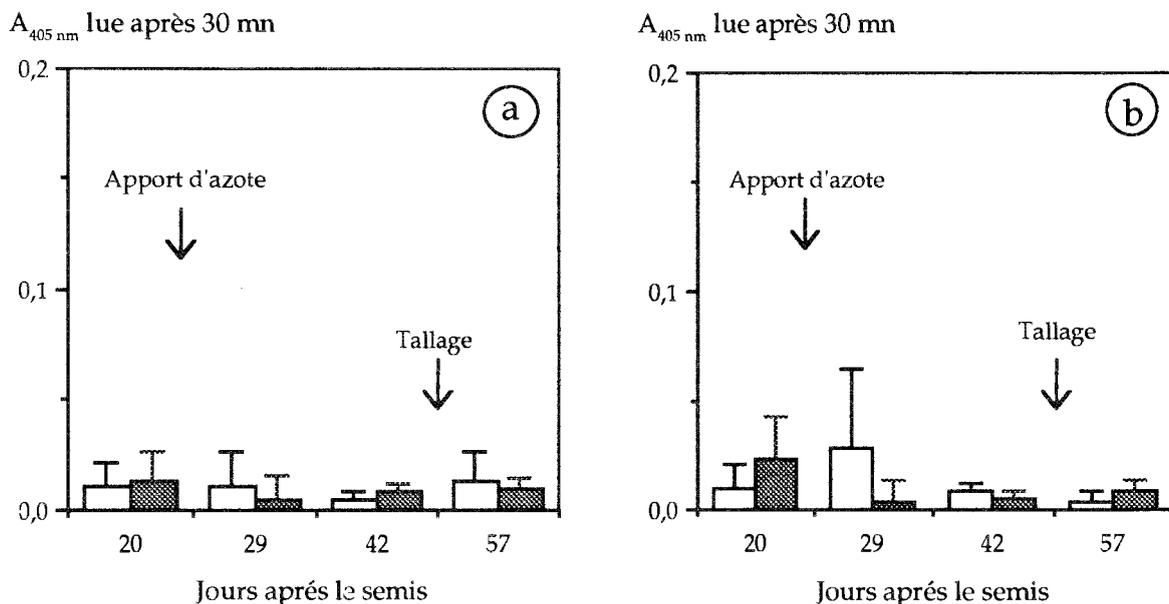
*Cette expérience confirmait l'existence d'un possible déplacement de la population de Bacillus polymyxa dans la rhizosphère du blé après inoculation des semences.* Cependant une meilleure méthode d'échantillonnage des systèmes racinaires était nécessaire afin de mieux appréhender le devenir de cet inoculum durant la croissance de la plante et de préciser sa répartition dans le sol adhérent et le rhizoplan.

*• Suivi in vitro de la population de Bacillus polymyxa dans le sol et la rhizosphère : effet de la fertilisation azotée.*

Cette expérience a été conduite en pots et sous abri. Le sol sableux utilisé provenait d'Auxonne. Chaque semence a été inoculée par enrobage de  $2,5 \times 10^7$  spores de *Bacillus polymyxa* CF43 puis par aspersion au moment du semis avec  $2 \times 10^8$  spores. Le traitement témoin consistait à enrober les semences



**Figure 16 :** Evolution du poids sec de sol adhérent par gramme sec de racines prélevées au champ. Comparaison entre traitement témoin (□) et inoculé avec *Bacillus polymyxa* CF43 (▨) pour des niveaux de fertilisation azotée de 80 (a) et 160 KgN/ha (b). Les moyennes ont été calculées à partir de 12 répétitions. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%.



**Figure 17 :** Evolution du niveau de *Bacillus polymyxa* détectés par ACP ELISA, dans le sol adhérent aux racines prélevées au champ. Comparaison entre traitement témoin (□) et inoculé avec *Bacillus polymyxa* CF43 (▨) pour des niveaux de fertilisation azotée de 80 (a) et 160 KgN/ha (b). Les moyennes ont été calculées à partir de 12 répétitions. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%.

seulement avec de la gomme arabique et de les réinoculer avec une suspension autoclavée de spores. Un pot sur deux a reçu une fertilisation azotée sous forme d'ammonitrate, équivalente à 100 kg N/ha.

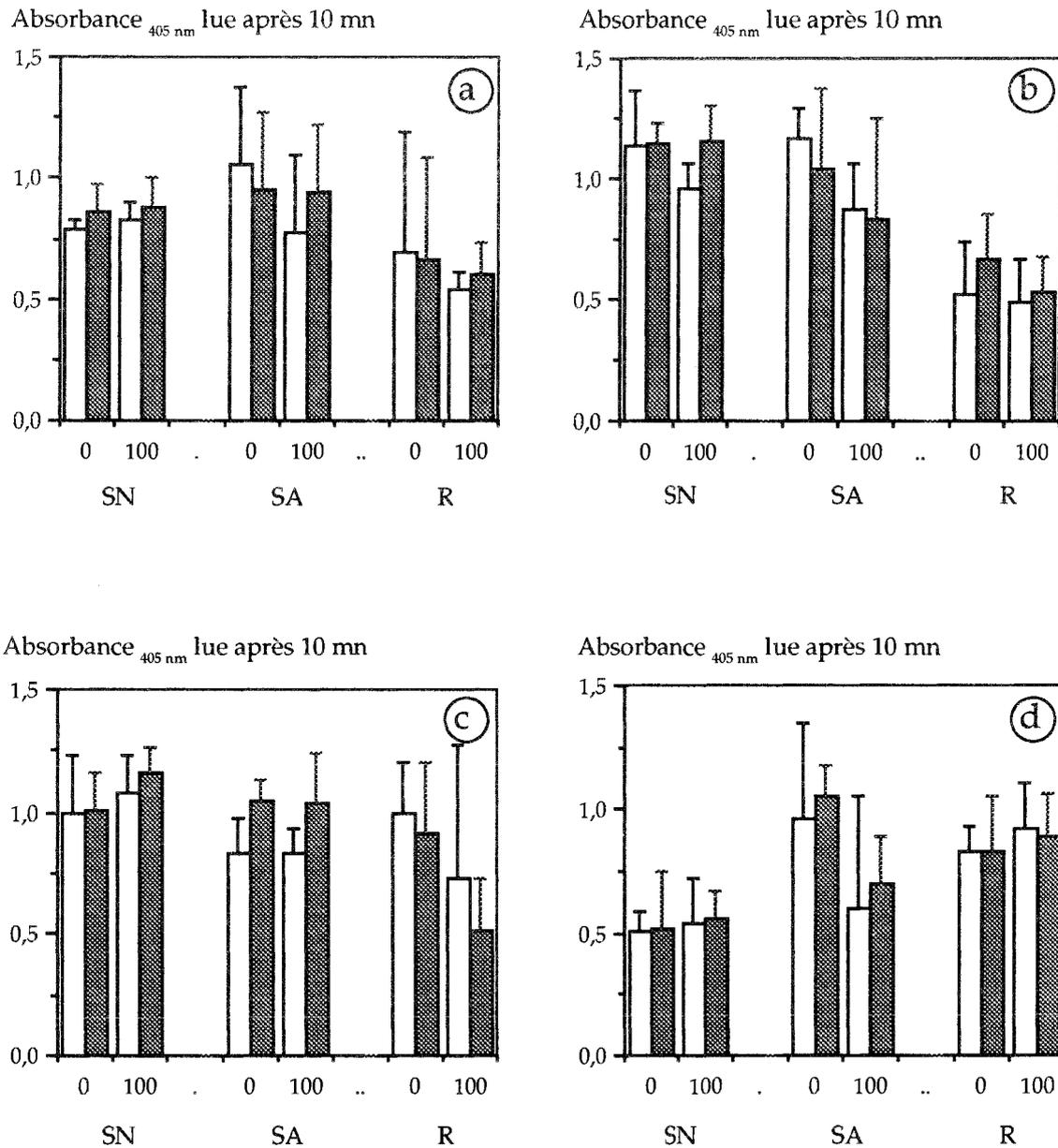
Nous avons étudié les compartiments suivants : le sol non rhizosphérique, le sol adhérent aux racines et le rhizoplan. Dans chacun, le niveau de la population de *Bacillus polymyxa* a été mesurée avec la technique AB ELISA. Parallèlement, une estimation de la microflore totale a été obtenue par comptage de colonies sur milieu TSA.

Le premier prélèvement a eu lieu 18 jours après le semis (Fig. 18a). Compte tenu des conditions de culture les plantes étaient déjà au stade 4-5 feuilles. Les résultats obtenus en AB ELISA montrent que l'inoculation de *Bacillus polymyxa* CF43 a permis de déplacer significativement le niveau de *Bacillus polymyxa* dans le sol non rhizosphérique ( $p = 0,04$ ), indépendamment de la fertilisation azotée. En revanche, l'inoculation n'a aucun effet sur le niveau de *Bacillus polymyxa* détecté après 18 jours dans le sol adhérent ( $p = 0,77$ ) et sur le rhizoplan ( $p = 0,88$ ). Notons que pour ces deux derniers résultats, les puissances de test étaient inférieures à 10%. Le déplacement de population dans le sol non rhizosphérique persiste significativement au moins jusqu'au tallage des plantes (Fig. 18b), puis disparaît à la fin de celui-ci (Fig. 18c). Au dernier prélèvement, on note une chute des absorbances sur l'ensemble des traitements concernant le sol non rhizosphérique (Fig. 18d). Lors du troisième prélèvement, alors que les systèmes racinaires colonisent tout le volume de sol, on met en évidence un transfert de l'effet de l'inoculation, du sol non rhizosphérique vers le sol adhérent (Fig. 18c). On observe encore cette tendance au dernier prélèvement (Fig. 18d).

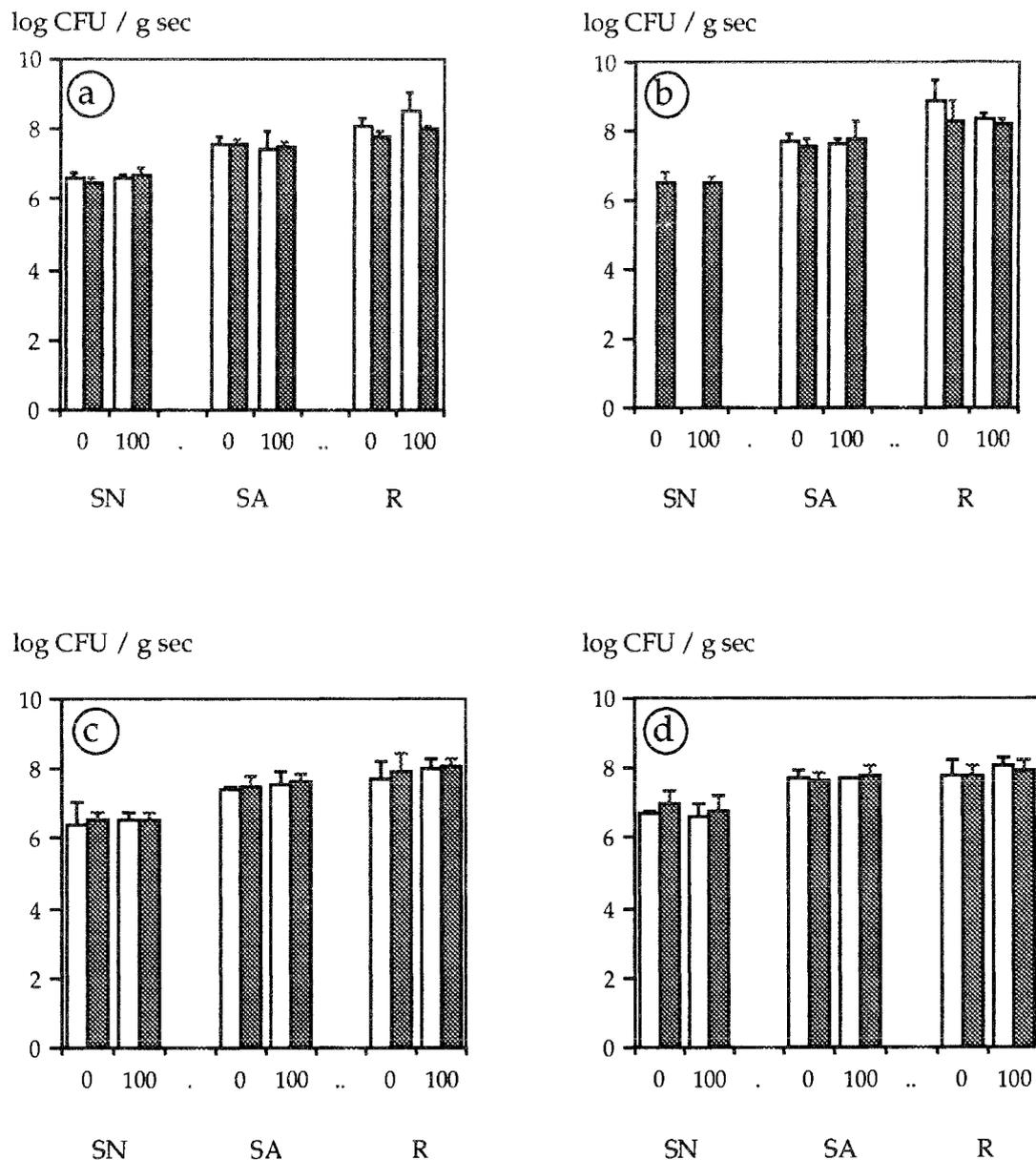
Sur l'ensemble de l'expérience, aucune différence d'absorbance ne sera décelée entre traitement témoin et inoculé, avec la fraction racinaire.

Par contre, la population de *Bacillus polymyxa* localisée dans la rhizosphère est plus sensible, directement ou indirectement, à l'apport d'azote dans le milieu que la population du sol non rhizosphérique. Cela se traduit par une diminution significative de l'absorbance mesurée en AB ELISA, dans le sol adhérent (Fig. 18b-d) et sur les racines (Fig. 18c) provenant des pots fertilisés. Mais il n'apparaît aucune interaction significative entre les facteurs azote et inoculation.

Le dénombrement des bactéries sur milieu complet confirme l'effet de l'activité racinaire sur la microflore du sol dès le premier prélèvement (Fig. 19). Le nombre de colonies, ramené à l'unité de poids sec (g), comptées dans le sol non rhizosphérique est multiplié par 10 dans le sol adhérent et par 30 sur les racines. Les microflores totales ainsi dénombrées restent stables entre traitements et tout au long de



**Figure 18** : Niveaux de *Bacillus polymyxa* détectés par AB ELISA dans le sol non rhizosphérique (SN), le sol adhérent (SA) et sur les racines (R) de plantes fertilisées avec l'équivalent de 0 ou 100 KgN/ha. Comparaison entre traitement témoin (□) et inoculé (▨). Les prélèvements ont été effectués 18 (a), 26 (b), 33 (c) et 41 jours (d) après inoculation. Les moyennes sont calculées à partir de 4 répétitions. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%.



**Figure 19** : Evolution de la microflore dénombrée sur milieu TSA dans le sol non rhizosphérique (SR), le sol adhérent (SA) et sur les racines (R). Comparaison entre traitement témoin (□) et inoculé (▨) à deux niveaux de fertilisation azotée, 0 et 100 Kg N/ha. Les prélèvements ont été effectués 18 (a), 26 (b), 33 (c) et 41 jours (d) après inoculation. Les moyennes sont calculées à partir de 4 répétitions. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%.

l'expérience. On n'observe aucune évolution qui soit corrélable à celles des *Bacillus polymyxa* détectés en AB ELISA.

• *Interaction entre la quantité d'inoculum et le type de sol, sur le niveau de Bacillus polymyxa détecté.*

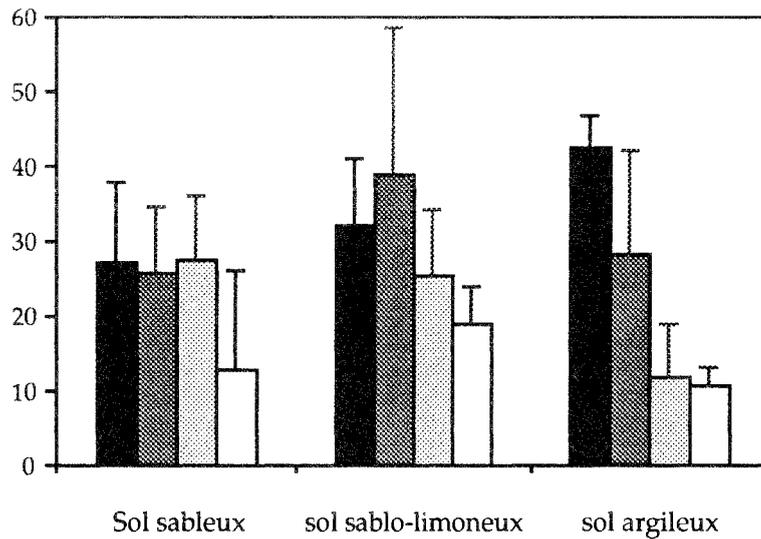
Les résultats présentés précédemment sont difficilement comparables entre eux, car réalisés dans des sols de texture éloignées et des niveaux d'inoculation variés. Le travail qui suit consiste à comparer les abondances de *Bacillus polymyxa* dans des rhizosphères de blé de sols sableux, sablo-limoneux et argileux après enrobage des semences avec *Bacillus polymyxa* CF43. Les différentes quantités d'inoculum apportées par semence sont de  $0, 2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^6$  et  $10^8$  spores. Des tubes remplis de sol ont reçu 2 semences d'un même traitement. Après 7 jours en incubateur illuminé, les plantules sont récoltées. Le sol adhérent et les racines ont été étudiés séparément.

Les mesures des poids de matière sèche de racines récoltées par tube (Fig. 20), montrent un effet délétère de la bactérie après inoculation ( $p=0,01$ ). Cet effet, jamais observé jusqu'ici, est net en présence de  $10^8$  spores/semences pour le sol sableux et le sol sablo-limoneux et de  $2 \cdot 10^6$  spores/semences pour le sol argileux. Par ailleurs, la technique AB ELISA, appliquée aux broyats racinaires, ne fait pas apparaître de différence significative entre les traitements, même si dans le sol sableux, l'inoculation de  $2 \cdot 10^4$  spores/semence semble augmenter la population de *B. polymyxa* à la surface des racines (Fig. 21). L'application de cette méthode au sol adhérent apporte des informations supplémentaires (Fig. 22). Le sol argileux se différencie des deux autres sols par un niveau naturel en *Bacillus polymyxa* plus élevé ( $p<0,001$ ). Il semble impossible de modifier quantitativement cette population par inoculation. Les absorbances mesurées sur les sols sableux et sablo-limoneux suivent une évolution similaires avec une réponse plus marquée à l'inoculation dans le cas du sol sablo-limoneux, concernant le sol adhérent.

Un autre paramètre permet de distinguer significativement ( $p<0,001$ ) ces trois sols (Fig. 23). Le rapport Poids sec de sol adhérent/Poids sec de racine prend les valeurs les plus élevées dans le sol sableux et les plus faibles dans le sol argileux ( $p<0,001$ ). L'analyse de cette variable met en évidence un effet de l'inoculation ( $p<0,05$ ). Indiscernable dans le sol sableux, l'expression de cet effet semble dépendre du niveau d'argiles et de limons dans le sol. Ces résultats, obtenus sur le traitement témoin, montrent que plus il y a d'argiles, plus le poids sec de racines prélevées est élevé et moins il y a de sol adhérent à ces racines. L'inoculation intervient en inversant ces tendances.

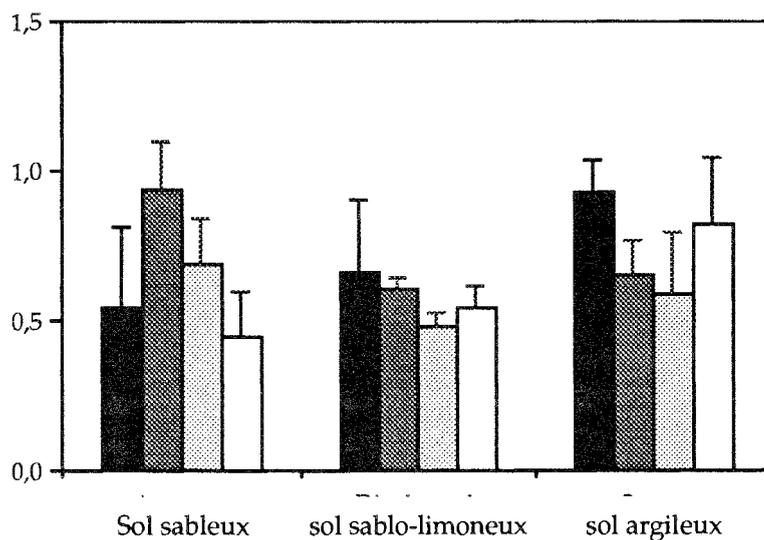
Il semble que les différents effets de l'inoculation ne puissent être expliqués uniquement par un déplacement de la population de *Bacillus polymyxa* vers des niveaux supérieurs. Dans le cas du sol

Poids sec de racines (mg/tube)

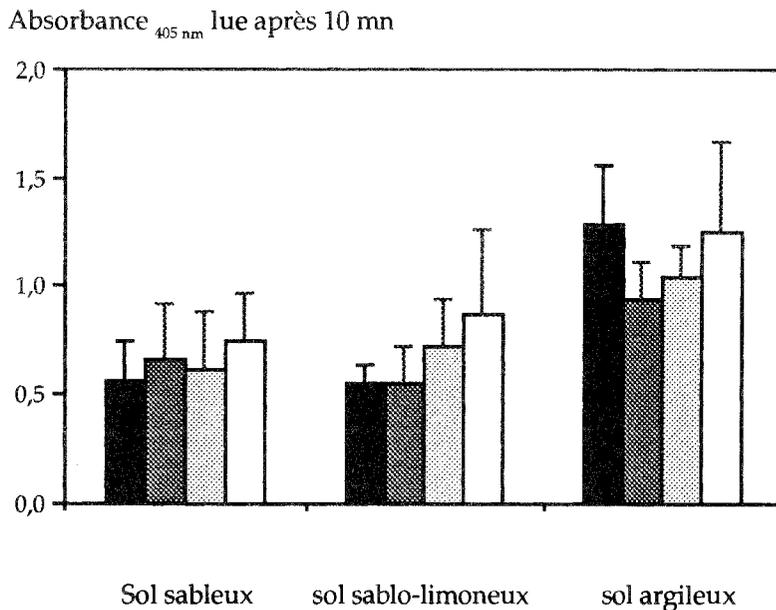


**Figure 20** : Mesure du poids sec de racines de plantules de blé ayant germées en sol sableux, sablo-limoneux et argileux, avec comme niveaux d'inoculation de *Bacillus polymyxa* CF43 : 0 (■), 2x10<sup>4</sup> (▨), 2x10<sup>6</sup> (▩) et 10<sup>8</sup> (□) spores/graines. Le poids de matière sèche de racines est exprimé en g/tube. Chaque tube a reçu deux graines d'un même traitement. Les moyennes de chaque modalité sont calculées à partir de 6 répétitions. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%.

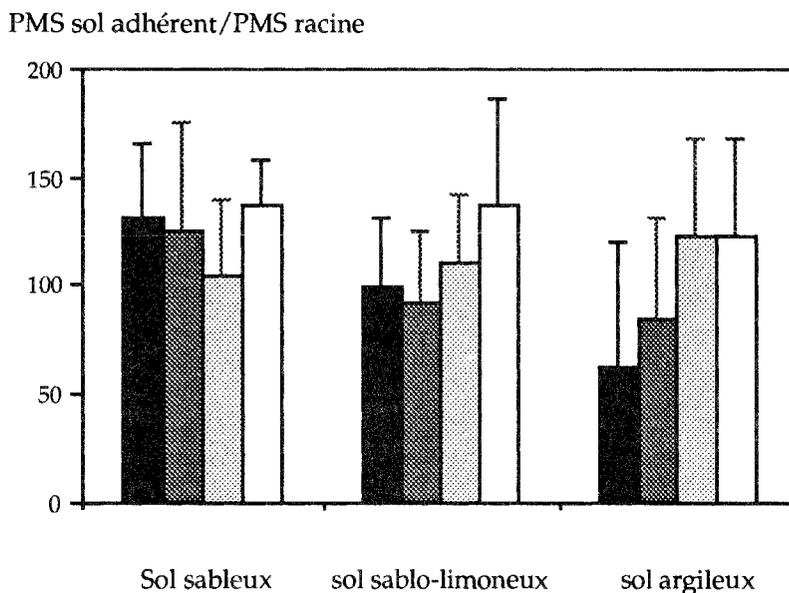
Absorbance<sub>405 nm</sub> lue après 10 mn



**Figure 21** : Absorbances mesurées en AB ELISA sur les broyats racinaires de plantules de blé. Les facteurs étudiés sont identiques à ceux mentionnés dans la légende de la figure 20.



**Figure 22** : Absorbances mesurées en AB ELISA dans le sol adhérent aux racines de plantules de blé (agées de 7 jours) ayant germées en sol sableux, sablo-limoneux et argileux, avec comme niveaux d'inoculation de *Bacillus polymyxa* CF43 : 0 (■),  $2 \times 10^4$  (▨),  $2 \times 10^6$  (▩) et  $10^8$  (□) spores/grains. Les moyennes de chaque modalité sont calculées à partir de 6 répétitions. Les intervalles de confiances sont donnés à 95%.



**Figure 23** : Poids sec de sol adhérent récupéré par gramme de racines de plantules de blé (agées de 7 jours) ayant germées en sol sableux, sablo-limoneux et argileux, avec comme niveaux d'inoculation de *Bacillus polymyxa* CF43 : 0 (■),  $2 \times 10^4$  (▨),  $2 \times 10^6$  (▩) et  $10^8$  (□) spores/grains. Les moyennes de chaque modalité sont calculées à partir de 6 répétitions. Les intervalles de confiances sont donnés à 95%.

argileux, l'effet de l'inoculation sur le poids sec de racines et l'adhésion du sol à ces racines est très net. C'est dans ce même sol que la densité de *Bacillus polymyxa* détectée est naturellement élevée et insensible à l'apport exogène de la souche *B. polymyxa* CF43. Dans ce cas, l'abondance des *Bacillus polymyxa* dans le sol, masque une différence d'activité dans la rhizosphère après inoculation. A l'inverse, dans le sol sableux on observe après inoculation, une augmentation de la quantité de *Bacillus polymyxa* dans le sol adhérent, confirmée par les poids secs de racines, sans influence sur la masse de sol adhérent. Enfin ce n'est que dans le cas du sol sablo-limoneux, qu'il semble y avoir une corrélation entre l'effet de l'inoculation sur la population de *Bacillus polymyxa* dans le sol adhérent, l'adhérence de celui-ci sur les racines et le poids sec de ces racines.

#### 1.4. DISCUSSION.

Peu d'études ont porté sur le devenir de bactéries fixatrices d'azote libres dans la rhizosphère du blé après inoculation (ALBRECHT et al., 1983; BASHAN et al., 1987). Pourtant les travaux effectués sur *Bacillus polymyxa* montrent qu'il s'agit d'une espèce répandue dans les sols, donc capable de survivre et de se développer naturellement dans cet écosystème. A l'image d'*Azospirillum*, *B. polymyxa* est présent en faible nombre et représente moins de 1% de la microflore totale dans la rhizosphère du blé. Cette faible densité naturelle rend plus difficile l'étude de la bactérie, mais motive l'idée de déplacer cette population par inoculation d'une souche de l'espèce.

- *Méthode d'introduction de la bactérie.*

Le choix du mode d'inoculation détermine son efficacité, car l'environnement physico-chimique dans lequel se trouvent les cellules bactériennes, détermine leur devenir et leur survie.

L'inoculum peut être apporté directement dans le sol ou par bactérisation des semences. Dans ce cas, différents supports peuvent être utilisés pour favoriser l'adhérence des bactéries sur la semence et pour protéger l'inoculum de la dessiccation (VAN ELSAS et HEIJNEN, 1990). Des supports aussi divers que la tourbe, le charbon, des composts d'origines végétales, la cellulose, le talc, la vermiculite et les billes d'alginate ont été testés. La gomme arabique telle que nous l'avons utilisée pour enrober les semences, est un excellent adhésif déjà utilisé pour *Rhizobium* (ELEGBA et RENNIE, 1984).

La façon dont les bactéries sont produites est également déterminant pour la survie de l'inoculum pendant le stockage puis lors de son introduction dans le sol. L'obtention de formes de résistance, telles

que les spores pour *Bacillus polymyxa*, assure une bonne conservation tout en maintenant le potentiel de colonisation de l'inoculum lors de la germination des graines.

• *Une colonisation préférentielle du sol adhérent.*

L'efficacité de l'inoculation dépend également de la capacité des bactéries introduites à coloniser l'environnement racinaire à partir des points d'apport que sont le sol ou les semences.

Dans la zone d'influence des racines on distingue le rhizoplan (RP), défini par CLARK (1949) comme l'interface entre la surface racinaire et le sol, et la rhizosphère (RS) qui est la partie de sol au-delà du rhizoplan subissant l'influence des racines. La diversité des facteurs déterminant la densité des populations microbiennes rend difficile l'étude du rôle des racines. Cependant l'effet clé des exsudats racinaires dans la stimulation sélective des micro-organismes du sol a été mis en évidence à plusieurs reprises (ROVIRA, 1965; NEAL et al., 1973). MILLER et al. (1989) ont montré qu'une plante peut assurer à sa rhizosphère l'existence d'une microflore qui lui est "favorable". Les mécanismes sous-jacents à une telle relation ne sont pas encore connus.

Les mesures effectuées en ELISA sur des traitements témoins, montrent que la densité de *B. polymyxa* dans le sol ne semblent pas influencée par la présence de racines de blé (Fig. 18). Des résultats similaires ont été obtenus, indiquant que le genre *Bacillus* n'est pas un puissant colonisateur du sol et de la rhizosphère (LIANG et al., 1982; MILLER et al., 1989). Contrairement à un genre comme *Pseudomonas* plus "typique" d'un effet rhizosphère, le genre *Bacillus* serait uniformément répartie dans le sol plutôt que concentré dans la rhizosphère. Cette profonde différence dans la capacité de colonisation de la rhizosphère entre Gram- et Gram+ pourrait être due au temps de génération généralement plus long pour les Gram+ dans le sol (BOWEN and ROVIRA, 1976). Ces populations du genre *Bacillus* existeraient dans le sol essentiellement sous forme de spores (VAN ELSAS et al., 1989).

Nos résultats montrent qu'il est cependant possible de déplacer le niveau de colonisation de *B. polymyxa* sur de jeunes racines de blé après enrobage des graines avec la souche CF43. Ce résultat a été obtenu à la fois *in vitro* (tab.5) et *in situ* (Fig. 14). Selon HOWIE et al. (1987) la colonisation racinaire par des bactéries introduites sur les semences de blé peut être décomposée en 2 phases :

(i). Un transport passif des bactéries par croissance des racines. Dans le cas où seule cette phase existe, cela se traduit par une diminution de la densité bactérienne sur les racines lorsqu'on s'éloigne de la graine.

(ii) Une phase de survie et de multiplication de l'inoculum pouvant se dérouler pendant et après la première phase.

Cette seconde étape repose sur les compétences de la bactérie à prendre possession des nouveaux sites avant la microflore indigène du sol mais aussi sur sa compétitivité vis à vis de cette microflore. Dans ces conditions, une espèce bactérienne sensible à l'exsudation racinaire et ayant un temps de génération court, devrait s'implanter dans la rhizosphère après inoculation. Il semble que la capacité à migrer le long de la racine soit un caractère distinctif de souches isolées de la rhizosphère avec des souches d'un sol non rhizosphérique (HOZORE et ALEXANDER, 1991).

Les différences de colonisation racinaire par *B. polymyxa* dans la vermiculite (Tab. 7) et dans un sol sablo-limoneux (Tab. 8) montrent la difficulté de l'espèce à s'implanter face à des populations telluriques plus adaptées à la colonisation du rhizoplan. La compétition est interspécifique et intraspécifique (BENNETT et LYNCH, 1981; MAZZOLA et COOK, 1991). Finalement, l'adaptation à la rhizosphère semble être plus un caractère de souche qu'un caractère d'espèce (JHUNKE et al., 1987). L'étude de la diversité des individus composant la population de *B. polymyxa* dans le sol a mis en évidence des différences sérologiques, phénotypiques et génétiques entre isolats provenant d'un sol nu, d'un sol rhizosphérique et du rhizoplan (MAVINGUI et al., 1991). La souche CF43, bien que capable de coloniser à court terme le rhizoplan de plantules de blé, présente plus d'homologie de caractères avec les isolats du sol rhizosphérique qu'avec ceux du rhizoplan. BAATH et al. (1988) rapportent également l'existence de différents degrés de dépendance des bactéries vis à vis des racines pour survivre et se développer. Les micro-organismes rhizosphériques se situaient dans un continuum, dont une extrémité serait constituée d'isolats dont la survie est fortement liée à la présence de racines (faible viabilité dans un sol non rhizosphérique; un rapport des abondances RP/RS élevé). A l'autre extrémité du continuum se trouveraient les bactéries dont la survie dans le sol rhizosphérique est aussi bonne, voire meilleure que sur le rhizoplan. L'appartenance de la souche CF43 à ce dernier groupe semble se confirmer par les mesures de densités dans le sol adhérent. Les résultats obtenus en ELISA et par la méthode des MPN montrent des différences de colonisation du sol adhérent aux racines par *Bacillus polymyxa* après inoculation, alors qu'elles ne sont pas systématiquement détectées sur les racines.

*Il paraît plus facile de déplacer, par inoculation de la souche CF43, le niveau de colonisation de Bacillus polymyxa dans le sol adhérent que sur le rhizoplan.* Par conséquent, le devenir de la population introduite, ainsi que ses effets sur la plante, risquent d'être différents de ceux d'une population bactérienne qui coloniserait le rhizoplan.

• *Interactions entre le sol et la population de Bacillus polymyxa dans la rhizosphère du blé.*

Les propriétés du sol jouent un rôle primordial dans l'association des populations bactériennes avec la plante. Nos résultats montrent que le niveau de *B. polymyxa* détecté en ELISA ainsi que l'impact de l'inoculation sur cette population est étroitement dépendante des teneurs en argiles. L'importance des constituants argileux est reconnue depuis longtemps, en ce qui concerne les effets sur la biomasse microbienne et les interactions entre populations (CAMPBELL et EPHGRAVE, 1983; HEYNEN et al.; 1988). CHAUSSOD et al. (1986) ont montré la cohérence qui existait entre la caractérisation physico-chimique des horizons de culture des sols et leurs propriétés biologiques. Nos résultats indiquent que cet élément devra être pris en compte dans le choix de la quantité d'inoculum à apporter. En effet, il apparaît que la croissance des racines est sensible à de fortes densités de *B. polymyxa* dans la rhizosphère, celles-ci étant plus facilement atteintes dans des sols argileux. Le mécanisme de réponse de la rhizogénèse du blé à de fortes quantités d'inoculum n'a pas encore été étudié.

La concentration en azote minérale du sol peut également modifier directement ou indirectement la microflore rhizosphérique. Nos résultats mettent en évidence une diminution de l'absorbance mesurée en ABELISA dans la rhizosphère de plantes ayant reçues une fertilisation azotée par rapport aux plantes non fertilisées, alors que la microflore totale (exprimée en unité formant une colonie) ne varie pas. D'autres travaux mentionnent l'effet de la fertilisation azotée sur la croissance et l'activité des micro-organismes rhizosphériques. TURNER et al. (1985) ne trouvent pas de différence dans le nombre de bactéries lorsque l'alimentation minérale de la plante est modifiée, mais une augmentation de la biomasse fongique quand l'azote est limitant. KOLB et MARTIN (1988) ont montré que le nombre total de bactéries rhizosphériques augmente lorsque la plante reçoit une forte fertilisation azotée alors que le nombre de fixateurs d'azote libres chute. Ces effets sont interprétés comme une réponse de la microflore au changement qualitatif et quantitatif de l'exsudation racinaire (MERCKX et al., 1987). De plus, LILJEROTH et al. (1990) suggèrent qu'une augmentation du niveau d'azote dans la rhizosphère permet une utilisation plus efficace des rhizodépôts par les micro-organismes. Nos résultats indiquent que ces changements se font au détriment de la population de *Bacillus polymyxa* dans la rhizosphère d'un sol sableux.

A l'inverse, les bactéries rhizosphériques peuvent influencer l'environnement physique de la plante. Les observations faites au microscope électronique à transmission par GREAVES et DARBYSHIRE (1972) et FOSTER (1981) offrent une vision intéressante des interactions qui existent dans la rhizosphère entre les racines, les mucilages d'origines végétales et microbiennes et les particules sableuses, limoneuses et argileuses. Plusieurs études ont montré que des micro-organismes possédaient la capacité d'agréger les particules du sol. Leurs activités dans la rhizosphère se traduit par l'agrégation

des particules du sol entre elles et sur les racines. Les mesures du poids sec de sol adhérent par unité de poids sec de racine que nous avons effectuées, sont fortement dépendantes de la teneur en argile du sol, ainsi que de la quantité de *Bacillus polymyxa* CF43 introduite. L'étude présentée dans le chapitre suivant a pour objectif de préciser cet effet de l'inoculation, dans le cas d'un sol sablo-limoneux.

**2. Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere : preliminary examination.**

L. GOUZOU, G. BURTIN, R. PHILIPPY, F. BARTOLI and T. HEULIN †.

Centre de Pédologie Biologie, UPR 6831 du CNRS associée à l'Université Nancy I, BP 5F - 54501  
Vandoeuvre France.

(A paraître dans *Geoderma*, 60 (1993))

## ABSTRACT

The present paper reports the results of a combined physical and microbial approach to studying the aggregation state of a silt loam soil in the wheat rhizosphere. Non-rhizosphere soil aggregate size distribution was attributed to self-fragmentation of clods. In contrast, aggregate size distribution was uni-modal and centered at 0.2 - 2 mm for soil adhering to wheat roots. On the other hand, inoculation of wheat with a rhizosphere strain of *Bacillus polymyxa* increased the mass of soil adhering to the roots by 57%. Comparison of aggregate size distributions suggested a more porous structure for the inoculated rhizosphere soil than the uninoculated. An avidin-biotin indirect ELISA procedure, which allows the detection of *B. polymyxa* in its natural environment, indicated that the population remained at a constant level whatever the treatment or the size of aggregates. Aggregate stability in water, which was low, showed no statistical difference between treatments or between aggregate size fractions. The water-stable aggregates studied here represent the elementary rhizosphere aggregates characterized by the association of clays, silts, fine sands and *B. polymyxa* cells.

No effect on the population level of *B. polymyxa* or on the stabilization of aggregates was observed after inoculation of soil and seeds. However, a more porous structure developed within the rhizosphere soil. We are continuing to investigate this aspect of the soil structure process which could be related to a spatial extension of the rhizosphere soil. Inoculation by *Bacillus polymyxa* could play an important role in water retention and nutrient transfer in the rhizosphere through increasing porosity.

## 2. Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere : preliminary examination.

### 2.1. INTRODUCTION

Soil structure is important in fertility and plant growth, and may be affected by physical and biological factors. It is well known that organic residues applied to soils improve their structures (ALLISON, 1973). In cropping, the rhizosphere constitutes one of the principal sources of organic material in soils. It contributes to soil organic matter directly through the root material itself and its decomposition, and indirect through stimulation of microbial activity in the rhizosphere.

GUCKERT et al. (1975) suggested that plant products such as mucigel could adsorb clay particles and thus may be a mechanism leading to the formation of aggregates. TISDALL and OADES (1979), attributed the efficiency of rye-grass in aggregate stabilization to the fungal hyphae population it supported. REID and GOSS (1981) found that increased aggregate stability of soils associated with root growth of rye-grass and alfalfa was due to polysaccharides produced in the rhizosphere. So far, no attempt has been made to distinguish the effects of the roots from the one due to the associated microbial biomass.

Interest in the use of polysaccharide-producing organisms to improve structure in agricultural soils has increased. Several authors have studied the addition of polysaccharides (CHENU et al., 1987) or exopolysaccharides (EPS)-producing organisms (LYNCH, 1981; METTING, 1986; MOLOPE et al., 1987) to the bulk soil. But in terms of exploiting the native microorganisms in soil or rhizosphere, few

attempts have been made to improve EPS production and aggregate stability (CHAPMAN and LYNCH, 1985; THOMAS et al., 1986; ROBERSON et al., 1991).

However, soil microbiologists have described bacterial populations which could play a major role in rhizosphere soil aggregation. Using transmission electron microscopy (TEM), FAULL and CAMPBELL (1979) have provided excellent pictorial evidence that a rhizosphere colonist of wheat, *Bacillus cereus* var. *mycoides*, is surrounded by an electron-transparent region, presumably polysaccharide, to which clay particles adhered. Among *Bacillus* species isolated from the rhizosphere of *Graminae*, the presence of the nitrogen-fixing bacteria *Bacillus polymyxa* has been also reported (NEAL and LARSON, 1976; LINDBERG and GRANHALL, 1984; MAVINGUI et al., 1990). This species has been tested for its growth-promoting effects on *Graminae* (HOLL et al., 1988) but no author has reported an effect on soil aggregation in the rhizosphere.

The present paper reports the results of a combined physical and microbial approach to studying the aggregation state of a silt loam soil in the wheat rhizosphere. The aim of the study was to investigate the short-term effect of inoculation with the rhizobacteria *B. polymyxa*, on rhizosphere soil structure.

## 2.2. MATERIALS AND METHODS

### • Soil

A silt loam soil (Eutric Cambisol, 36.8 % sand, 48.1% silt, 11.6% clay), pH 5.6, from eastern France (near Nancy) was used in this study. The soil sample was collected in November 1989 from the homogeneous Ap horizon (0-30 cm) which was previously under a rape crop. Clay minerals were illite, vermiculite, kaolinite and goethite. Cation exchange capacity by 0.5 M ammonium chloride was 7.4 mEq per 100 g. Air-dried soil contained 0.7 g. kg<sup>-1</sup> N and 10.2 g. kg<sup>-1</sup> organic C. The soil sample (moisture 15% w/w) was stored up to 3 months in plastic containers at room temperature.

### • Bacteria and bacterial inoculum

*Bacillus polymyxa* strain CF43 was isolated from rhizosphere soil samples containing roots of spring wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.), cv. Castan. Plantlets were grown in a silt loam soil (Eutric cambisol) from a cultivated area near Nemours, France. The size of the *B. polymyxa* population ranged from 1 to 5 x 10<sup>5</sup> bacteria g<sup>-1</sup> dry weight of rhizosphere soil. *B. polymyxa* strains were identified by morphological and biochemical tests. In the presence of sucrose, strain CF43, which was the most efficient N<sub>2</sub>-fixing *B. polymyxa* isolated, produced two types of exocellular polysaccharides, heteroglycan acid (polymer of glucose-galactose-fructose and uronic acid) and levane, a neutral fructose polymer of low molecular weight (10<sup>4</sup> to 10<sup>5</sup> monomeric units). Stock cultures of *B. polymyxa* CF43 were stored in their polysaccharides at - 80°C. A pure culture of *B. polymyxa* strain CF43 was grown in a modified Luria Bertani broth at 30 ± 2°C for 16 to 18 h i.e. until the end of the exponential growth phase. The number of bacteria was adjusted to 10<sup>4</sup> CFU.ml<sup>-1</sup> in 0.1 M sterile KCl solution. A 50 µl-volume of suspension was plated onto nutrient agar (Biokar) and grown for five days at 30 ± 2°C. Sporulating bacterial colonies were scraped from the agar plates and then washed twice in 0.1 M KCl

solution. Bacteria were harvested by centrifugation ( $3600 \times g$  for 30 mn) and the final concentration of the inoculum adjusted to  $10^8$  bacteria.ml<sup>-1</sup> in distilled water.

- **Inoculation and obtention of rhizosphere soil**

Soil and wheat seeds were inoculated by a spore suspension of *B. polymyxa* CF43. Polypropylene pots (8 cm diam. and 40 cm length) were filled with 1.7 dm<sup>3</sup> of unsieved moist soil equivalent to 2.6 kg dry weight of soil. The top (5 cm) layer of the soil was inoculated with the bacterial spores. The spore suspension was sprayed at the rate of 45 ml per kg of soil. It was calculated that each gram of dry soil received  $5 \times 10^6$  CF43 spores. Control soil was treated similarly with distilled water. Wheat seeds were inoculated by mixing them with the bacterial suspension. Gum arabic (15%) was used to improve seed bacterization. Control seeds were treated with gum arabic and distilled water only. Bacterized and control seeds were then air-dried for 48 h at room temperature. The seed population of strain CF43 was estimated by serial dilution plating before sowing. About  $5 \times 10^6$  CFU of strain CF43 per seed were detected in inoculated samples and none in uninoculated seeds. Three seeds of wheat, *Triticum aestivum* cv. Fidel were sown in each pot. There were three plots with nine replicate pots for each treatment. The pots were transferred to a glasshouse and were watered per ascensum with distilled water. The plants were harvested after 3 weeks. The intact root-soil mass was removed from the pot and handled gently while carefully untangling the roots. The soil adhering strongly to the roots was referred to as rhizosphere soil. The rhizosphere soil was carefully separated from the roots using a fine silk bristle brush and tweezers. To obtain sufficient soil for analyses it was necessary to bulk the rhizosphere soil samples from the nine pots of each plot. Soil samples were air-dried and then stored at 4°C. The plant material was separated into roots and shoots and the seed was excised. Roots were washed briefly in water before storage at -20°C and shoots were dried at 60°C.

- **Aggregate size distribution and water-stability**

The rhizosphere soil was dry-sieved into seven aggregate-size fractions, < 0.1 mm, 0.1 to 0.2 mm, 0.2 to 0.5 mm, 0.5 to 1 mm, 1 to 2 mm, 2 to 4 mm and > 4 mm. The dry weight of the soil was estimated for each fraction. Total C and N contents of the soil were determined on triplicate samples of each fraction using a CHN 1106 Carlo Erba Analyser.

Water-stability of the aggregates was studied on 2 g of each of the > 0.2 mm air-dried fractions added to 200 ml distilled water in a wet sieving machine designed in our laboratory (BARTOLI et al., 1991). Nine sieves (height 70 mm, diameter 60 mm, mesh size 200  $\mu\text{m}$ ) were supported by a 600 mm diameter holder which was vibrated at a steady rate by a motor. Each sieve was immersed in distilled water up to 2 cm and oscillated. The horizontal oscillations, applied for 1 h, were sinusoidal with an amplitude of 2 cm at 100 rpm and a frequency of 1.6 H. Each sample was treated in triplicate. Each fraction < 0.2 mm was eliminated and there was no cross contamination of samples. Water-stable aggregates > 200  $\mu\text{m}$  were calculated by subtracting the > 200  $\mu\text{m}$  fractions (coarse sand) obtained after a total disaggregation with Na resin (Rouiller et al., 1972) from the fraction remaining on the sieve.

- **Extraction of *Bacillus polymyxa* from aggregates and wheat roots.**

Washed roots from inoculated and control plants were cut into pieces, and samples (0.1 g) were homogenized by a crusher (MM2 - Retsch) in 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS) : NaCl, 7.2 g.l<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 g.l<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.8 g.l<sup>-1</sup> (final pH 7.2). The slurry obtained was used for coating wells in microtiter plates.

Rhizosphere soil samples (1 g dry weight) were suspended in 50 ml of PBS, pH 7.2. The suspension was dispersed by ultrasonic probe with an outside energy of 50 W as determined by the procedure described by NORTH (1976). Dispersed soil suspensions received 200  $\mu\text{l}$  flocculant solution (720 mg SrCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O l<sup>-1</sup>, resulting concentration : 0.01 mM SrCl<sub>2</sub>), shaken vigorously by hand for 2 min and

allowed to settle for 15 min. The supernatant was used for coating wells in microtiter plates (100 µl per well). Three replicates of each sample and a control without antiserum were used.

• **Detection of *Bacillus polymyxa* : the ELISA procedure.**

(i) **Immunoassay reagents and equipment.** Phosphate-buffered saline (PBS) : NaCl, 7.2 g.l<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 g.l<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.8 g.l<sup>-1</sup> (final pH 7.2). Tris-buffered saline (TBS) : NaCl, 8 g.l<sup>-1</sup>; Tris base, 0.604 g.l<sup>-1</sup>; HCl (1M), 3.8 ml.l<sup>-1</sup> (final pH 7.6). Washing buffer : TBS plus 0.05 % Tween 20 (v/v). Blocking solution : washing buffer supplemented by 1 % (w/v) bovin serum albumin (Sigma). Substrate buffer composition per liter was as follows : diethanolamine (Prolabo), 97 ml; pH was adjusted by HCl 12 N (final pH 9.8). Biotinylated donkey-antirabbit antibodies (RPN 1004) and streptavidin conjugated with alkaline phosphatase (RPN 1234) were purchased from Amersham. Absorbance at 405 nm of hydrolysed substrate (4-nitrophenylphosphate ref. 107905, Boehringer Mannheim) was measured with an automatic microplate reader MR 5000 (Dynatech laboratories). Polystyrene microplates Nunc Maxisorp F96 (ref. 4-39453) were used.

(ii) **Antiserum production.** Bacteria were grown in a modified Luria Bertani broth (tryptone 10 g.l<sup>-1</sup>, yeast extract 5 g.l<sup>-1</sup>, NaCl 5 g.l<sup>-1</sup>) for 24 h at 30 ± 2°C in a rotary shaker (200 rpm). Cells were harvested by centrifugation at 10,000 × g for 20 min at 4°C and washed three times in sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and their number was adjusted to 10<sup>9</sup> cells.ml<sup>-1</sup>. Whole cells of *B. polymyxa* CF43 were used to elicit antibodies in (New Zealand × Californian) rabbits by immunization with multiple intradermal injections. Antisera were collected by bleeding via cardiac puncture and stored at - 20°C. Before using, the antiserum was tested for its ability to induce agglutination of strain CF43, as described by CARPENTIER (1965). The antiserum used in this study had an initial titer of 1 : 2560. All the strains isolated from wheat rhizosphere and belonging to *B. polymyxa* species cross-react with this antiserum. The absorbances obtained with the closest species, *Bacillus macerans*, *Bacillus circulans* and *Bacillus subtilis* were ten-fold weaker than that generated by *B. polymyxa* CF43 and

there was no cross-reaction with the Gram-negative species usually isolated from the soil and the wheat rhizosphere.

(iii) **Avidin-biotin complex incorporation into ELISA (AB-ELISA).** Each well of a microtiter plate was coated with 100  $\mu$ l soil bacteria suspension in PBS pH 7.2 and allowed to dry at 40°C. The plate was then washed three times with TBS-Tween. The washing buffer was supplemented with 1% bovine serum albumin and added to the wells to block unreacted sites. After 1 h at 37°C, the wells were washed as described above. Wells were then filled with 100  $\mu$ l rabbit anti-CF43 serum diluted to 1 : 10,000 in TBS-Tween and incubated for 3 h at 37°C. After all unbound antibodies were washed off, 100  $\mu$ l biotinylated donkey-antirabbit IgG was applied to each well. The biotinylated IgG was previously diluted to 1 : 1000 in the blocking solution. Plates were incubated at 30°C overnight. After three washings, each well received 100  $\mu$ l streptavidin alkaline phosphatase conjugate diluted to 1 : 1000 in TBS-Tween. The plate was incubated at 37°C for 3 h and washed again twice with TBS-Tween and once with TBS pH 7.6. Then 100  $\mu$ l of a freshly prepared substrate solution, 1 mg *p*-nitrophenyl phosphate  $\text{ml}^{-1}$  in diethanolamine buffer, was added, incubated at room temperature for 30 min and the subsequent development of a yellow color indicated a positive reaction. The enzymatic reaction was recorded as the absorbance at 405 nm, measured with a microplate reader MR 5000 (Dynatech Laboratories). In each set of AB-ELISA tests, wells lacking antigens were included as blanks. There was a significant linear correlation between the absorbance values and the number of *B. polymyxa* cells coated in the wells in the range of 3.8 and 5.5 log bacteria.  $\text{ml}^{-1}$ .

- **Statistical analysis**

The data were analysed using a completely randomized design containing two factors (aggregate-size fractions, and inoculation) and three replicates per treatment. Analysis of variance was performed on untransformed data with the exception of particle-size distribution in water-stable aggregates, which was arc-sine transformed. All statistical analysis were performed using STATITCF a software program by the Institut Technique des Céréales et des Fourrages (ITCF, Paris, France).

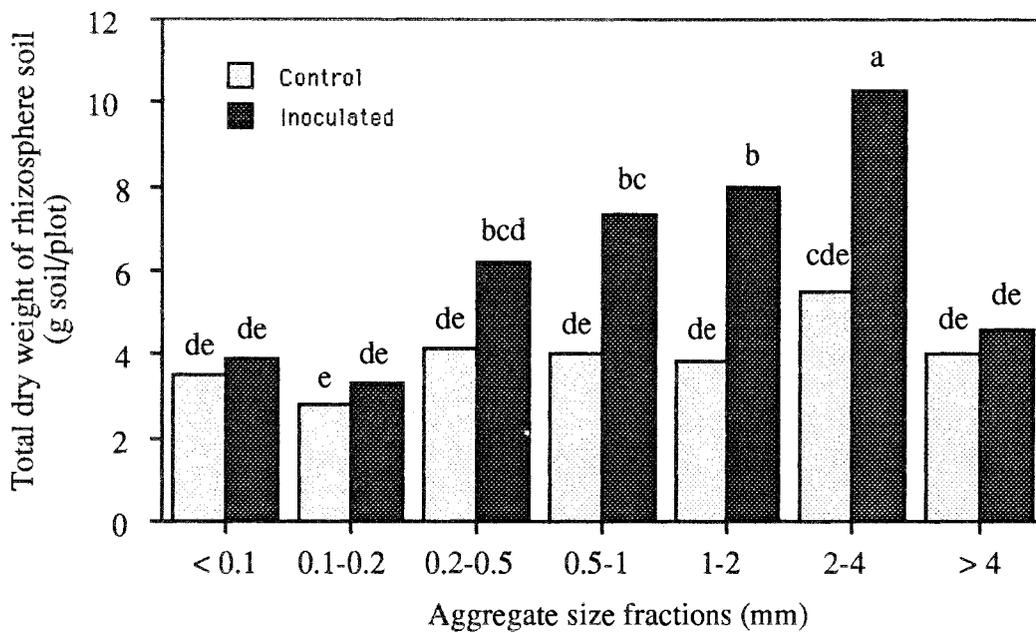
### 2.3. RESULTS

- Effects of wheat roots on soil structure.

The distribution of size fractions obtained by dry sieving was different for root-free and rhizosphere soils (Table 9). There were more macroaggregates in root-free soil as compared to rhizosphere soil. Non-rhizosphere soil aggregate size distribution agreed well with a power-law function. It was attributed to a self-similar fragmentation of clods. In contrast, aggregate size distribution was quite uni-modal and centered at 0.2 mm to 2 mm for soil adhering to wheat roots.

**Table 9 : Aggregate size distribution for the root-free and rhizosphere soils studied.**

Aggregate size fractions (mm)	Root-free soil (%)	Rhizosphere soil (%)
< 0.2	1.0	16.8
0.2 - 2	10.2	40.0
2 - 4	13.3	19.2
4 - 10	25.5	24.0
> 10	50.0	0



**Figure 24** . Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* CF43 on total dry weight of rhizosphere soil occurring in seven aggregate size fractions. The significant differences observed between treatments are noted by the letters a, b, c, d and e, as identified by Newman-Keuls test. Mean values with common letters are not significantly different at the 5% level.

• Effect of *Bacillus polymyxa* inoculation on plant growth and rhizosphere soil structure.

Inoculation of soil and wheat seeds with the rhizobacterial strain CF43 significantly increased the mass of soil adhering to the roots by 57% (Table 10). However, there was no significant effect of inoculation on shoot and root dry weight after 21 days of growth.

The effect of inoculation on amounts of macroaggregates was very clear (Figure 24). There was much more soil in the 0.2 mm to 4 mm aggregate-size fractions for inoculated soil. This distribution approached a power-law function. The Geometric Mean Diameter (GMD) as defined by MAZURAK (1950), was not significantly larger ( $p = 0.15$ ) for the inoculated rhizosphere soil than the control ( $0.955 \pm 0.051$  mm and  $0.892 \pm 0.065$  mm, respectively). Comparison of aggregate-size distributions suggested a more porous structure for the inoculated rhizosphere soil than for the non-inoculated one.

**Table 10 : Effect of *Bacillus polymyxa* CF43 inoculation on plant root and shoot dry weight, and weight of rhizosphere soil.**

Treatment	Shoot dry weight * (g / plant)	Root dry weight (g / plant)	Rhizosphere soil dry weight (g / g root)
Control	0.157 a <sup>†</sup>	0.146 a	7.5 a
Inoculated	0.156 a	0.147 a	11.8 b

\* Plant harvested at the beginning of tillering.

<sup>†</sup> average of three replicates. In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level.

- **Extraction of *Bacillus polymyxa* from aggregates and wheat roots.**

Absorbance at 405 nm obtained with the avidin-biotin ELISA procedure from aggregates and wheat roots largely exceeded the 0.1 absorbance commonly observed as the background level (Table 11). Results confirmed that the native population of *B. polymyxa* was able to colonize rhizosphere soil and wheat roots. The level of *B. polymyxa* population per gram dry weight of soil was similar regardless of inoculation treatment. The *B. polymyxa* population estimated by ELISA procedure was the same in the different aggregate size fractions whatever the treatment, whether inoculated or not (Table 11). Comparison of absorbances obtained from the 2% (w/v) rhizosphere soil and 1% (w/v) roots suspensions suggested no substantial difference between *B. polymyxa* colonization levels of rhizoplane or soil adhering to the root.

- **Chemical characteristics of aggregates.**

The distribution of total organic C concentrations measured in the various aggregate-size fractions were in good agreement with a normal-law function with a maximum for the 0.5 to 1 mm macroaggregate-size fraction (Table 12). Amount of total C decreased significantly ( $p = 0.001$ ) after inoculation regardless of aggregate size. Similar differences between aggregate-size fractions were also observed for N concentrations with the exception of greater amounts of N in the finest aggregate-size fraction than in the coarser one. In contrast, inoculation had no effect on the amount of total N in the rhizosphere soil. The C/N ratio was therefore larger in macroaggregates than in microaggregates and was smaller in inoculated rhizosphere soil than in non-inoculated. There was relatively more C lost by inoculation than N. The improved structuring, which could be related to a spatial extension of the rhizosphere soil, reduced C concentration in aggregates by dilution of root exudates. The flow of nitrogen from the soil to the rhizosphere, did not seem to have change after inoculation.

Table 11 : Evaluation of the effect of *Bacillus polymyxa* CF43 inoculation on root and rhizosphere soil density of *Bacillus polymyxa*, measured by the ELISA method (absorbance at 405 nm per gram).

Treatment	Root	Aggregate-size fractions (mm)						
		< .1	.1-.2	.2-.5	.5-1	1-2	2-4	>4
Control	1.24a <sup>†</sup>	1.20a	1.20a	1.28a	0.88a	1.12a	1.25a	1.29a
Inoculated	1.25a	1.12a	1.19a	1.18a	1.17a	1.27a	1.29a	1.26a

<sup>†</sup> average of three replications. In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level.

Table 12 : Nutrient concentrations and C/N ratio in seven aggregate size fractions of rhizosphere soils .

Aggregate size fraction (mm)	Treatment	Total organic C (g.kg <sup>-1</sup> )	Total N (g.kg <sup>-1</sup> )	C/N
< 0.1	Control	1.04 <i>c</i> †	0.11 <i>bc</i>	9.42 <i>d</i>
	Inoculated	0.94 <i>c</i>	0.10 <i>bc</i>	9.15 <i>d</i>
0.1 - 0.2	Control	1.12 <i>bc</i>	0.11 <i>b</i>	10.18 <i>cd</i>
	Inoculated	1.00 <i>bc</i>	0.11 <i>b</i>	9.41 <i>cd</i>
0.2 - 0.5	Control	1.12 <i>bc</i>	0.10 <i>bc</i>	10.80 <i>bc</i>
	Inoculated	1.04 <i>bc</i>	0.11 <i>bc</i>	9.77 <i>bc</i>
0.5 - 1	Control	1.33 <i>a</i>	0.12 <i>a</i>	11.07 <i>b</i>
	Inoculated	1.24 <i>a</i>	0.12 <i>a</i>	10.09 <i>b</i>
1 - 2	Control	1.18 <i>b</i>	0.10 <i>bc</i>	12.18 <i>a</i>
	Inoculated	1.10 <i>b</i>	0.10 <i>bc</i>	10.61 <i>a</i>
2 - 4	Control	1.12 <i>bc</i>	0.09 <i>c</i>	12.07 <i>a</i>
	Inoculated	1.04 <i>bc</i>	0.09 <i>c</i>	11.20 <i>a</i>
> 4	Control	1.01 <i>c</i>	0.08 <i>d</i>	11.93 <i>a</i>
	Inoculated	0.90 <i>c</i>	0.08 <i>d</i>	11.31 <i>a</i>

† Average of three replications. In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level.

Table 13 : Characteristics of water-stable aggregates from rhizosphere soil of control and inoculated plants.

Treatment	Aggregates		Particle-size distribution		
	Fractions (mm)	Water-stable (% aggregate fraction)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)
Control	0.2 - 0.5	12.0 <i>a</i> <sup>†</sup>	34.7 <i>a</i>	49.3 <i>a</i>	16.0 <i>a</i>
	0.5 - 1	7.8 <i>a</i>	29.2 <i>a</i>	46.1 <i>a</i>	24.7 <i>a</i>
	1 - 2	8.5 <i>a</i>	26.2 <i>a</i>	53.8 <i>a</i>	20.0 <i>a</i>
	2 - 4	7.7 <i>a</i>	31.4 <i>a</i>	47.7 <i>a</i>	20.9 <i>a</i>
	> 4	8.8 <i>a</i>	28.7 <i>a</i>	51.0 <i>a</i>	20.2 <i>a</i>
Inoculated	0.2 - 0.5	17.1 <i>a</i>	35.1 <i>a</i>	47.6 <i>a</i>	17.3 <i>a</i>
	0.5 - 1	12.7 <i>a</i>	24.9 <i>a</i>	56.0 <i>a</i>	19.2 <i>a</i>
	1 - 2	10.0 <i>a</i>	26.0 <i>a</i>	50.5 <i>a</i>	23.6 <i>a</i>
	2 - 4	7.9 <i>a</i>	27.6 <i>a</i>	49.0 <i>a</i>	23.4 <i>a</i>
	> 4	9.3 <i>a</i>	34.4 <i>a</i>	43.3 <i>a</i>	22.3 <i>a</i>

<sup>†</sup> Average of three replications. In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level.

- **Aggregate water-stability and particle-size distribution.**

Water stability of dry sieved aggregates was small (Table 13) and showed no statistical difference between inoculation treatments ( $p = 0.15$ ) and between aggregate-size fractions ( $p = 0.18$ ). The largest value was measured in the smallest aggregate size fraction (0.2 - 0.5 mm) but was not significantly larger than the other water-stability fraction. Particle-size distribution was obtained after a total disaggregation with Na resin from the water-stable aggregates. Results indicated that the proportion of particles contained in each size fraction did not change (Table 13). The proportion of clay particles was higher than in bulk soil, silt fraction was quite similar and sand particles in lower proportion than in bulk soil. The 0.2 - 0.5 mm-fraction showed the lowest amount of clay.

#### **2.4. DISCUSSION AND CONCLUSION**

In the rhizosphere, optimal conditions for aggregate formation and aggregate stabilization are combined, since root growth in soil is well known for promoting aggregate stabilization (Allison, 1968; Reid and Goss, 1981).

With regards to soil structure formation, two distinct aggregate size distributions were observed in rhizosphere and non-rhizosphere soils. Our results suggested that the action of the rhizosphere was through fragmentation of the soil mass into smaller units (Table 9). This observed effect of the rhizosphere was similar to those reported by Tri (1968). Two distinct mechanisms of soil structure formation were observed by Tri (1968) in the rhizosphere of forage grasses, depending on the initial physical condition of the soils: (i) granulation occurring either through fragmentation of the soil mass into smaller units, or (ii) through aggregation of smaller units into larger elements. Soil structuration also depends in addition on soil texture, soil moisture content, root age and the plant species involved

(Gilmour et al., 1948; Martin, 1971; Reid and Goss, 1981; Sparling and Cheshire, 1985). The energy with which root samples are shaken to dislodge loosely adhering soil should also be taken into consideration.

The observed effects of different plant species indicated differences in the activities of roots and associated microorganisms. Mycorrhizal infection may play an important role in the formation of soil structure and aggregate stability (Tisdall and Oades, 1979; Miller and Jastrow, 1990). Mycorrhizal infection was not measured in our experiment, but it is unlikely to have been of significance because infection normally takes several weeks to develop (Sanders et al., 1977).

The results of our experiment showed that it was possible to increase the mass of soil adhering to the roots after inoculation with the *B. polymyxa* strain CF43. The change in aggregate abundance was not correlated with either root mass or soil population density of *B. polymyxa* as detected by the ELISA procedure. The change in rhizosphere soil structure suggested that microbial activity (strain CF43 vs. endogenous *B. polymyxa*), and not the total *B. polymyxa* population size, would contribute to aggregate formation (Harris et al., 1964). The relationship between biomass and the stabilizing effect on soil structuration depends on the microbial species (Lynch, 1984).

The effect of inoculation on soil mass distribution among the aggregate-size fractions was mostly restricted to macroaggregates rather than microaggregates and suggested a more porous structure for the inoculated rhizosphere soil than for the non-inoculated one. Wu et al. (1990) reported that measurements of water retention and pore size distribution for a soil are affected by changes in aggregate-size distribution. Inoculation induced neither increase in population density of *Bacillus polymyxa* nor stabilization of aggregates, but a more porous structure within the rhizosphere soil. The relationship between laboratory examinations and soil structuration in the field is uncertain. However, the inoculation, especially under field conditions, could play a significant role in water retention and nutrient transfer in the rhizosphere.

The absence of a significant effect of inoculation on water-aggregate stability in this short-term study suggested that the binding energy was weak or that the effect was transient, as described by Tisdall and Oades (1982). The role of polysaccharides in the rhizosphere is complex, and Sparling and Cheshire (1985) have reported that the contribution of the recently-synthesized carbohydrate in the

rhizosphere to the water stability of aggregates was less than that from the older, possibly transformed, carbohydrate in the bulk soil. Particle size-distribution suggested that the water-stable aggregates studied here represent the basic rhizosphere aggregates whose structural sub-units could be characterized by association of the clays, silts, fine sands and bacteria (*B. polymyxa*).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Mrs B. Gerard for the CHN analysis; A. Heyraud from the C.E.R.M.A.V., Grenoble, France, who carried out the polysaccharides analysis; and A. Dorier from the I.U.T. de Biologie Appliquée, Université de Lyon I, Lyon, France, who prepared the antiserum against the strain CF43.

### 3. Conclusion.

Des techniques immuno-enzymatiques ont été développées afin de suivre l'évolution de la taille de la population de *B. polymyxa* dans la rhizosphère et sur les racines de blé cultivé en conditions de plein champ. Dans ces conditions, il a été montré que l'enrobage des semences de blé avec la souche CF43 provoquait une augmentation significative de la taille de cette population sur le système racinaire séminal. Cet effet de l'inoculation est très net à la levée et se prolonge jusqu'au début du tallage.

L'étude de la colonisation, en microcosme au laboratoire, a permis de mettre en évidence après inoculation, un déplacement préférentiel du niveau de colonisation de *B. polymyxa* dans le sol adhérent par rapport au rhizoplan.

L'interaction entre le type de sol et l'inoculation est un des résultats les plus marquants de ce second chapitre. Il apparaît que le niveau de *B. polymyxa* détecté en ELISA, ainsi que l'impact de l'inoculation sur cette population sont étroitement dépendants des teneurs en argiles des sols utilisés.

Dans un sol sableux, l'inoculation semble augmenter la densité de *B. polymyxa* sur les racines, alors que dans un sol argileux les conséquences de l'inoculation sont observées sur le sol adhérent aux racines, avec une augmentation de cette quantité de sol adhérent.

Dans le cas d'un sol sablo-limoneux il semble y avoir une bonne corrélation entre l'effet de l'inoculation sur la densité de *B. polymyxa* dans le sol adhérent et la quantité de sol adhérent aux racines. Dans ce sol, l'effet de l'inoculation est particulièrement marqué sur certaines classes granulométriques (entre 0,2 et 2 mm). Ce résultat suggère l'existence d'une structure plus poreuse du sol rhizosphérique d'un blé inoculé par rapport à celui d'un blé non inoculé. La conséquence d'un tel effet sur la structuration du sol rhizosphérique peut jouer un rôle important dans la rétention d'eau et le transfert d'éléments nutritifs dans la rhizosphère.

Même si l'adaptation de résultats obtenus au laboratoire aux conditions du champ est délicate, les activités observées avec la souche CF43 (fixation d'azote, activité chitinasique, production de polysaccharides) en font un candidat intéressant pour l'inoculation du blé.

### **CHAPITRE 3**

**Conséquences de l'inoculation de *Bacillus polymyxa*  
CF43 sur la croissance et l'élaboration du rendement  
d'un blé de printemps.**

## 1. INTRODUCTION.

Dès lors que des bactéries fixatrices d'azote libres ont été isolées dans le sol, le désir de stimuler leur activité dans la rhizosphère par inoculation est apparu. Des bactéries du genre *Azotobacter*, *Azospirillum* et *Bacillus* sont devenues des micro-organismes de choix pour l'inoculation des céréales (DART, 1986). Les résultats obtenus sont très variables et comme les expériences montrant des effets négatifs de l'inoculation sont rarement publiées, il est difficile d'avoir une réelle estimation des potentialités offertes par l'utilisation de bactéries rhizosphériques.

Les réponses observées sur des céréales se sont traduites par des augmentations de l'activité nitrogénasique, du nombre de talles herbacées et fertiles, du prélèvement d'éléments minéraux dans le sol, du poids sec des parties aériennes, de la teneur en N des feuilles, du rendement en grains et du poids moyen d'un grain. Plusieurs articles de synthèse sont consacrés à ce sujet (DART, 1986; JAGNOW, 1987; BODDEY et DOBEREINER, 1988; CHALK, 1991). L'augmentation de la production de biomasse est l'observation la plus fréquemment rapportée.

La promotion de croissance peut s'établir par l'intermédiaire de mécanismes directs ou indirects (DAVIDSON, 1988). Les effets directs s'observent dans le cas où les métabolites produits par la bactérie inoculée stimulent la croissance de la plante indépendamment de la microflore rhizosphérique native. Au contraire un effet indirect s'exerce par un comportement compétitif voire antagoniste de la population introduite, vis à vis de populations délétères ou pathogènes.

L'importance de la fertilisation azotée sur la réponse à l'inoculation a été montré à plusieurs reprises. Des effets de l'inoculation avec *Azospirillum* sp. ont été obtenus pour des niveaux de fertilisation azotée moyens (30 à 80 kg N/ha) sur des cultures de sorgho (SMITH et al., 1982), de maïs (KAPULNIK et al., 1982) et de blé (RAI et GAUR, 1982; KAPULNIK et al., 1983). Ces effets disparaissaient pour de fortes doses d'azote. D'autres résultats montrent que l'inoculation reste compatible avec des systèmes de production intensifs. Des augmentations de rendement après inoculation d'un blé avec *Azospirillum* ont été obtenus pour des niveaux de fertilisation azotée supérieurs à 160 kg N/ha (REYNDERS et VLASSAK, 1982; ZAMBRE et al., 1984).

JAGNOW (1987) propose une synthèse de plusieurs expériences d'inoculation au champ avec des souches bactériennes appartenant aux genres *Azotobacter* et *Azospirillum*. Sur 15 expériences au champ, chacune avec différentes doses d'azote, 8 montrent une augmentation et 7 une diminution du rendement en grains après inoculation, lorsque la fertilisation azotée augmente. En outre, l'interaction entre

l'inoculation et l'azote n'est pas toujours la même pour la production de grain et pour la production de pailles. RAI et GAUR (1982) ont mis en évidence une plus forte augmentation du rendement en pailles, mais un plus faible effet sur le rendement en grains, dans les parcelles fertilisées. ZAMBRE et al. (1984) ont montré les évolutions inverses. L'analyse faite par JAGNOW (1987) met également en évidence l'extrême variabilité des résultats obtenus dans des expérimentations au champ.

Peu de données sont disponibles concernant l'effet de l'inoculation avec *B. polymyxa* en interaction avec la fertilisation minérale appliquée. L'essentiel des études porte sur l'effet de la solubilisation des phosphates par cette espèce, sur la croissance des plantes inoculées (HOLL et al., 1988; TIWARI et al., 1989).

**Tableau 14 : Evolution du rendement en grain (en qx/ha) d'un blé de printemps après inoculation avec la souche *B. polymyxa* CF 43. Comparaison entre traitement témoin (NI) et inoculé (I). Les rendements à 15% d'humidité, ont été mesurés par BERGE (1984) et BOURGAUD (1987) dans des parcelles ayant reçu trois niveaux de fertilisation azotée : 0, 60 et 120 kg N/ha.**

	Azote (kg N/ha)					
	0		60		120	
	NI	I	NI	I	NI	I
1984	43,6	42,4 (ns) <sup>†</sup>	51,4	53,7 (ns)	58,3	69,1 (*)
1987	25,4	23,6 (ns)	30,4	32,9 (*)	30,2	28,2 (ns)

<sup>†</sup> Entre parenthèses figure le résultat de la comparaison des moyennes pour les traitements témoin et inoculé; ns = "différence non significative", \* = différence significative pour  $\alpha = 0,05$ .

Le tableau 14 présente les résultats obtenus sur le rendement en grains lors de deux expériences d'inoculation de blé de printemps avec *B. polymyxa* CF43 (BERGE, 1984; BOURGAUD, 1987). En 1984, l'inoculation a eu un effet sur le rendement de plus en plus marqué avec la dose d'azote, celui-ci étant significatif pour les parcelles fertilisées avec 120 kg N/ha. En 1987, l'augmentation de rendement est observé uniquement pour un niveau de fertilisation intermédiaire de 60 kg N/ha.

L'objectif du travail présenté dans cette partie, est d'étudier à nouveau l'interaction d'un blé de printemps avec la souche CF43 et la fertilisation azotée appliquée. Le rendement en grain étant un critère trop global pour évaluer l'ensemble des phénomènes qui se sont déroulés pendant le cycle de la culture, nous avons suivi chronologiquement son élaboration à travers ses composantes. Les résultats présentés ont été obtenus à partir de trois expériences au champ.

## 2. MATERIEL ET METHODES.

Trois expériences au champ ont été réalisées entre 1989 et 1991. Le tableau 15 récapitule les principales conditions expérimentales de chaque essai.

- *Sites expérimentaux.*

En 1989, les parcelles de l'essai se situaient sur la propriété de M. PARISSE, commune de Sexey-les-Bois (Meurthe-et-Moselle). Le blé a été semé le 22 mars en seconde paille, dans un sol argileux (Annexe 5).

Un second essai a été implanté le 12 mars 1990 sur le site expérimental de la Coopérative Agricole Lorraine (C.A.L.), à Dieulouard (Meurthe-et-Moselle). A cet endroit, le sol est de texture sablo-limoneuse (Annexe 5). La mise en place et le suivi des deux essais de 1989 et 1990 ont été assurés par le service technique de la C.A.L.

En 1991, la prise en charge de l'essai a été assurée par LORCA (Lorraine Céréales Approvisionnement). L'essai a été semé le 29 mars sur la plate-forme expérimentale de Ogy (Moselle). Le sol, de texture limono-argileuse, était cultivé l'année précédente en orge de printemps.

- *Matériel végétal et inoculation des semences.*

Pour tous ces essais sur blé de printemps, notre choix s'est porté sur la variété Fidel. Cette variété de type alternatif doit être semée dans notre région au plus tard au début du mois de mars. En raison des conditions climatiques, les semis ont été effectués, lors de ces trois essais, avec pratiquement deux à trois semaines de retard. Malgré un bon tallage épis et une précocité épiaison, le potentiel de rendement de la variété est diminué.

Des graines que nous avons utilisées provenaient d'un lot de semences certifiées et traitées (anthraquinone et bétaxane). Une semaine avant le semis, les semences ont été inoculées avec la souche CF43 selon le procédé de pelliculage décrit dans le second chapitre. Cela paraissait être le seul procédé d'inoculation compatible avec une technique de semis au champ. Ainsi, il a été possible d'apporter en 1989, 1990 et 1991 respectivement  $10^6$ ,  $10^7$  et  $5 \times 10^5$  spores de *B. polymyxa* CF43 par graine inoculée. Ces concentrations de bactéries correspondaient plus à une limite de la capacité du laboratoire à produire

Tableau 15 : Récapitulatif des principales caractéristiques des essais de 1989, 1990 et 1991.

	1989	1990	1991
Site	Sexey-les-Bois (54)	Dieulouard (54)	Ogy (57)
Texture du sol	argileux	sablo-limoneux	limono-argileux
Dispositif expérimental	split-plot	split-plot	split-plot
Nb de blocs	6	5	6
Date de semis	22 mars	12 mars	29 mars
Densité de semis (semences/m <sup>2</sup> )	400	400	500
Niveau d'inoculation (spores de <i>B.p.</i> CF43/semence)	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	5.10 <sup>5</sup>
Fertilisations azotées (kgN/ha)	0 - 80 - 160	0 - 80 - 120	0 - 70 - 110
Nb d'apports azotés et le stade d'application	1 au semis	2 1 <sup>er</sup> avant le tallage 2 <sup>nd</sup> début montaison	1 au semis
Mesures à la levée	-	Nb de plante/m	Nb de plante/m
Mesures au tallage	Nb de talles/plante	Nb de talles/m <sup>2</sup> PMS feuilles/m <sup>2</sup> % N parties aériennes	Nb de talles/m <sup>2</sup> PMS feuilles/m <sup>2</sup>
Mesures à la floraison	Nb d'épis/m <sup>2</sup>	Nb d'épis/m <sup>2</sup> %N parties aériennes	Nb d'épis/m <sup>2</sup>
Mesures à la récolte	Rendement PMG Nb d'épillets/épi Nb grains/épi %N grain	Rendement PMG %N paille %N grain	Rendement PMG

l'inoculum pour des essais de cette importance, plutôt qu'à un choix d'expérimentation. Le traitement témoin consistait à ne pas apporter d'inoculum.

Les parcelles sont semées avec une densité de 400 à 500 graines/m<sup>2</sup>.

• *Protocoles expérimentaux au champ.*

Ces protocoles devaient permettre d'atteindre les objectifs que nous nous étions fixé :

- Mettre en évidence un effet de l'inoculation sur la plante (croissance et production)
- Observer d'éventuelles interactions entre l'inoculation et la fertilisation azotée.

(i) *Facteurs étudiés.*

- Le facteur "azote" est étudié à 3 niveaux: le niveau 0 unité, constitué de parcelles témoins n'ayant reçu aucune fertilisation azotée; une fertilisation maximale (ou optimale) et une fertilisation intermédiaire constituaient les deux autres niveaux. Nous verrons par la suite comment ces doses d'engrais azoté ont été déterminées.

- Le facteur "inoculation" comprenait deux niveaux : le traitement témoin (parcelles non inoculées) et le traitement inoculé.

Pour chaque essai, la combinaison des niveaux des deux facteurs représentait donc 6 traitements au total.

(ii) *Détermination de la dose d'azote optimale à apporter.* En 1989, la dose maximale a été fixée à 160 kgN/ha, en se basant sur les niveaux de fertilisation appliqués par les agriculteurs. La dose intermédiaire était alors fixée à 80 Kg N/ha.

Pour les deux essais suivants, nous avons appliqué la méthode du bilan prévisionnel pour déterminer la dose d'azote maximale à apporter. Cette méthode permet de prévoir la fumure azotée des céréales à partir d'un certain nombre de paramètres du milieu. On utilise un modèle additif décomposant la fourniture du sol en 5 postes :

$$\text{PREC} + \text{RSH} + \text{MIN} + \text{AEFORG} + \text{AEFPRAI} = \text{FS}$$

où **PREC** = Effet du précédent; **RSH** = reliquat azoté sortie hiver; **MIN** = minéralisation humus; **AEFORG** = arrières effets des apports organiques réguliers; **AEFPRAI** = arrières effets des prairies retournées; **FS** = fournitures du sol.

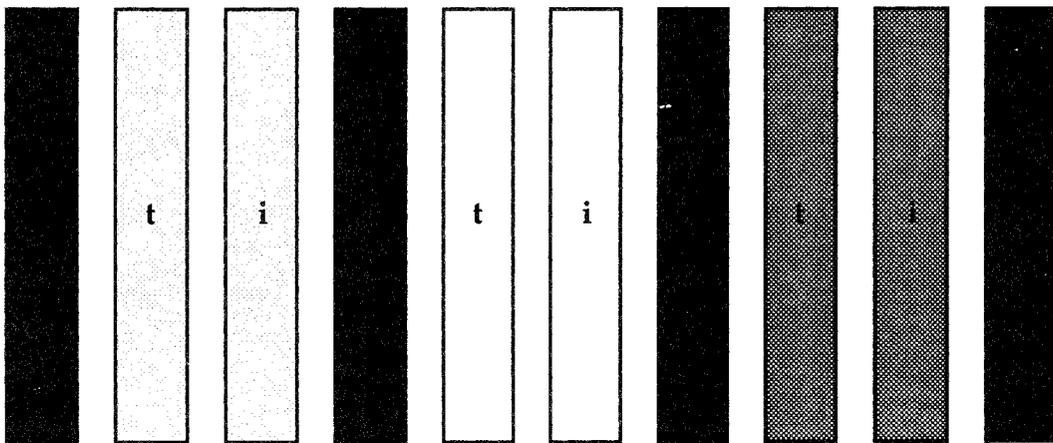
Dans notre cas, les variables **AEFORG** et **AEFPRAI** étaient nulles. Le bilan entre la consommation d'azote pour la décomposition des résidus du précédent (**PREC**) et la minéralisation de l'humus étaient équivalentes. Nous nous sommes donc intéressé à la variable **RSH**.

L'estimation du **RSH** consistait à prendre en compte une quantité d'azote minérale, disponible, résultant du bilan azoté de l'année précédente sur la parcelle. Ce reliquat a été estimé sur une profondeur présumée d'extension maximale du système racinaire du blé. C'est généralement 90 cm dans des sols profonds tels que ceux de Dieulouard ou Ogy.

Pratiquement, nous avons échantillonné sur l'ensemble de l'essai, à raison de 10 répétitions par horizon. Les profondeurs prélevées à la tarière sont : 0-30 cm, 30-60 cm, 60-90 cm. Les fractions, conservées à 4°C, sont traitées dans les 48 heures qui suivent le prélèvement, afin de doser les nitrates extractibles. Nous avons effectué cette extraction en rajoutant 300 ml d'eau distillée à 100 g de sol de chaque horizon. L'ensemble, placé dans un flacon sérum de 500 ml est agité pendant 30 mn puis centrifugé pour ne conserver que la solution du sol. Le surnageant est dosé en chromatographie ionique (Dionex).

La fourniture du sol en N-NO<sub>3</sub> s'est avérée importante en 1990 comme en 1991 (respectivement de 60 et 70 Kg N-NO<sub>3</sub>/ha). Ces résultats rappelaient la nécessité de mettre en place des parcelles sans fertilisation azotée afin de confirmer le niveau des fournitures du sol utilisables par la plante au cours de la culture. La dose optimale d'azote à apporter a été calculée pour un objectif de rendement de 60 qx/ha. Cela portait en théorie les besoins de la culture à 180 kgN/ha. Compte tenu de la fourniture du sol, la dose optimale à apporter était de 120 unités en 1990 et de 110 unités en 1991. Les niveaux de fertilisation intermédiaire ont été calculés en retranchant 40 unités aux doses optimales, soit 80 unités en 1990 et 70 unités en 1991.

*(iii) Le dispositif expérimental.* Les deux facteurs étudiés sont croisés en 6 traitements différents, chacun apparaissant à l'intérieur de blocs. Dans chaque bloc, les parcelles sont disposées en split-plot après randomisation du facteur azote en sous-bloc (Fig. 25). Le nombre de blocs était de 5 en 1990 et de 6 en 1989 et 1991. Les parcelles unitaires faisaient 12 m<sup>2</sup> de superficie (12 m x 1 m, soit 7 lignes de semis) en 1989 et 1990, et 18 m<sup>2</sup> (15 m x 1,2 m, soit 8 lignes de semis) en 1991. Les parcelles sont séparées entre elles par un allée de 50 cm de large. Pour limiter les effets de bord, des parcelles supplémentaires ont été



**Figure 25 :** Disposition des parcelles en split-plot à l'intérieur d'un bloc. Il y a autant de sous-blocs par bloc qu'il y a de niveaux du facteur "azote" et il y a autant de parcelles élémentaires par sous-bloc que le facteur "inoculation" a de niveaux. Le facteur "azote" est étudié à trois niveaux : aucune fertilisation ( □ ), une dose moyenne ( ◻ ) et une dose maximale ( ■ ); Le facteur "inoculation" est étudié à deux niveaux : non inoculé (t) et inoculé (i). Les sous-blocs sont séparés par une parcelle supplémentaire ( ■ ).

disposées en bordure de chaque bloc et entre deux sous-blocs ayant reçu des fertilisations azotées différentes.

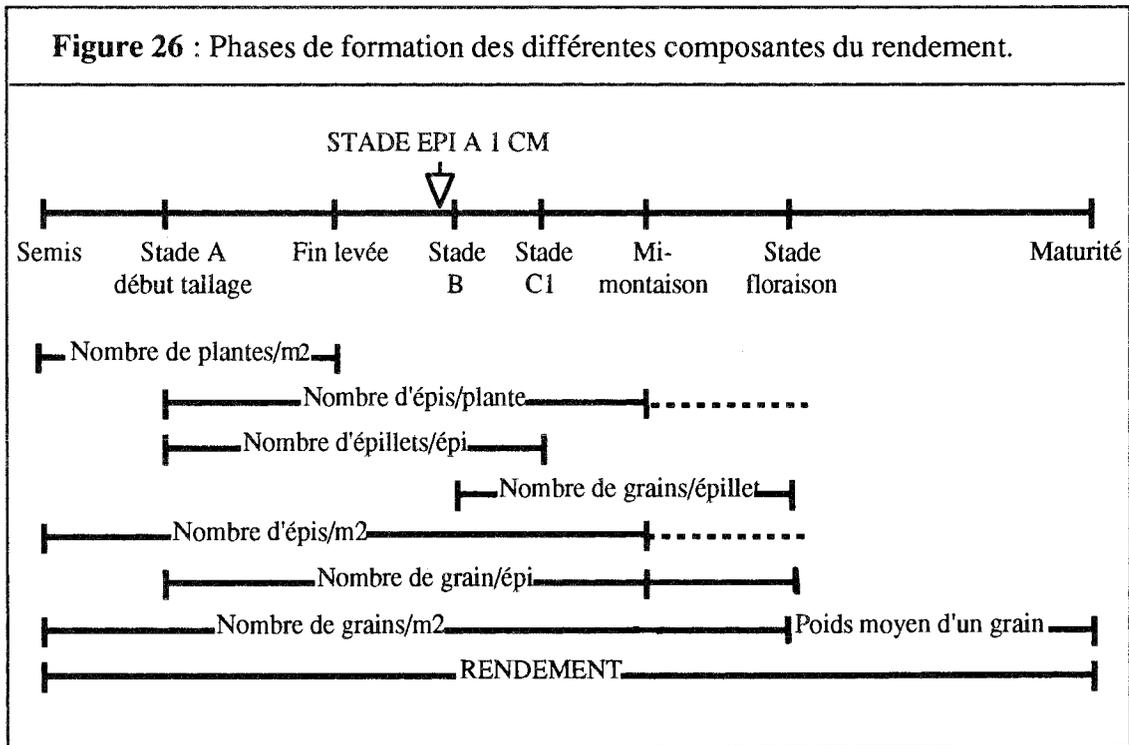
(iv) *Conduite de l'essai.* Au préalable une fumure de fond a été effectuée, équivalente à 100 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et K<sub>2</sub>O. Les semis ont été réalisés à l'aide d'un semoir de précision, indispensables pour ce type de dispositif. De même la récolte nécessitait l'utilisation d'une moissonneuse d'expérimentation dont la barre de coupe était adaptée à la largeur des parcelles de l'essai. L'engrais azoté a été apporté sous forme d'ammonitrate par épandage à la main. En 1989 et 1991, l'apport a été effectué en une seule fois au moment du semis. En 1990, nous avons testé l'effet de la fertilisation azotée en apport fractionné. Du fait de la forte minéralisation hivernale et du coefficient d'utilisation généralement plus faible du premier apport, celui-ci a été minimisé par rapport au second. Ainsi, 40% de la dose d'engrais azoté a été apporté au stade 3-4 feuilles, le reste étant apporté au début de la montaison, toujours sous forme d'ammonitrates solides.

• *Variables mesurées au champ.*

**Le rendement** est un critère trop global pour permettre de mettre en évidence l'ensemble des phénomènes qui se sont déroulés pendant le cycle de la culture (fig. 26). Les composantes du rendement permettent cette analyse chronologique. La valeur d'une de ces composantes peut servir d'indicateur du fonctionnement du peuplement végétal face aux paramètres du milieu, comme l'azote.

Ainsi, en général, sur un essai de fertilisation azotée, la réponse du nombre de grains/m<sup>2</sup> exprime les effets directs de l'engrais, alors que **le poids moyen d'un grain** réagit surtout à des effets indirects de l'azote. Pour mieux comprendre les variations du nombre de grains/m<sup>2</sup> il est intéressant d'examiner ses sous composantes : **nombre d'épis/m<sup>2</sup>** et **nombre de grains/épi**. Mais il est assez délicat d'utiliser cette dernière composante dans l'analyse, car on connaît assez mal ses conditions d'élaboration. En revanche, les variations du nombre d'épis/m<sup>2</sup> peuvent être plus facilement étudiées car les connaissances sur l'élaboration de cette composante sont nombreuses. On sait en particulier que le nombre d'épis potentiel que peut exprimer un peuplement en l'absence de carence nutritionnelle ou de parasitisme est directement lié à la **biomasse aérienne au début de la montaison**. Cette relation n'est pas la même pour toutes les variétés et diffère sensiblement selon le lieu géographique. Elle est par contre très stable entre années. L'utilisation de la biomasse aérienne comme élément explicatif du nombre d'épis, plutôt que **le nombre de talles**, revient en fait à considérer que le poids de chaque talle est un bon indicateur de sa probabilité à monter. On peut déjà parler de potentiel de rendement au début de la montaison.

**Figure 26** : Phases de formation des différentes composantes du rendement.



(D'après MEYNARD, J.M., *Perspectives Agricoles*, 115, 1987)

Nous avons donc étudié l'action croisée de l'apport d'engrais azoté et de l'inoculation, sur l'expression de ces variables.

(i) *Peuplement herbacé à la levée.* Cette mesure non destructive a été effectuée au moment où les plantules avaient atteint le stade 3 feuilles. Elle consistait à compter le nombre de plantules sur 1 mètre linéaire à raison de trois répétitions par parcelle et cela sur l'ensemble de l'essai.

(ii) *Biomasse aérienne produite au tallage.* Lorsque le blé a eu atteint le stade "épi à 1 cm", les plantes ont été coupées sur 1 m<sup>2</sup>, à l'intérieur de chaque parcelle. Ce prélèvement permettait de déterminer par unité de surface, le poids sec des parties aériennes et le nombre de talles herbacées. Ce protocole a été appliqué en 1990 et 1991. Lors du premier essai en 1989, seul le nombre de talles herbacées par plante a été mesuré. Six plateaux de tallage ont été prélevés sur toutes les parcelles afin de compter le nombre total de brins par plateaux. Contrairement aux prélèvements des années suivantes, celui-ci présentait l'inconvénient de ne pas prendre en compte la densité du peuplement herbacé.

Le comptage du nombre de talles prenait toujours en compte le maître-brin.

(iii) *Le peuplement épis à la floraison.* Le peuplement épis a été mesuré sur l'ensemble des parcelles en comptant les épis sur 1 mètre linéaire à raison de 3 répétitions par parcelle. Dans ce cas le peuplement épis est exprimé par unité de surface (m<sup>2</sup>) en multipliant le comptage fait sur un mètre linéaire par 7 (nb de lignes de semis sur 1 mètre de largeur). En 1990, un prélèvement des plantes sur 1 m<sup>2</sup> a de nouveau été effectué, afin de mesurer le poids sec des parties aériennes à la floraison (feuilles, tiges et épis confondus).

(iv) *Le rendement à la récolte et ses composantes.* Chaque parcelle a été moissonnée séparément. Les rendements obtenus sont exprimés en quintaux/ha pour une humidité relative des grains de 15%. Pour tous les essais, on a également mesuré le poids moyen d'un grain.

Pour l'essai de 1989, le nombre total d'épillets par épi ainsi que le nombre de grains par épi ont été mesurés. Le nombre total d'épillets par épi a été obtenu en comptant les épillets de 10 épis, prélevés aléatoirement sur chacune des parcelles. Ces épis ont servi également au comptage du nombre de grains par épi.

(v) *Teneur en azote de la plante en croissance et des grains après récolte.* En 1990, les parties aériennes prélevées sur 1 m<sup>2</sup> de chaque parcelle ont été analysées sur leur teneur en azote au moment du

tallage (feuilles et tiges) et de la floraison (feuilles, tiges et épis confondus). La richesse des pailles en azote a également été déterminée au moment de la récolte.

La totalité des plantes prélevées dans chaque parcelle est grossièrement coupée à l'aide de ciseaux, après séchage à 60°C. Après homogénéisation des brins, un échantillon a été prélevé afin d'être finement broyé à l'aide d'un vibro-broyeur (MM2 - Retsch). La teneur en azote de la poudre obtenue a été mesurée par un analyseur CHN 1106 Carlo Erba.

De la même façon, la teneur en azote des grains après récolte a été déterminée en 1989 et 1990.

• *Etude de la germination et de la croissance de jeunes plantules in vitro.*

En 1990, un lot de semences inoculées avec  $10^7$  spores de *Bacillus polymyxa* CF43 a été conservé pour effectuer des tests de germination *in vitro*. L'expérience consistait à faire germer les semences en étuve éclairée (photopériode de 12 heures), pendant 7 jours à 20°C dans des bacs en plastique (19 x 13 x 9 cm). Ces bacs ont été remplis avec la vermiculite ou avec le sol sablo-limoneux de Dieulouard sur une couche de 3-4 cm. Chacun a reçu 100 graines témoins ou 100 graines inoculées avec la souche CF43. Pour chaque traitement, les tests ont porté au total sur 400 graines dans la vermiculite et sur 100 graines dans le cas du sol de Dieulouard. Après 7 jours d'incubation, les nombres de plantules normales, anormales et le nombre de grains morts ont été comptés. Les plantules ont été considérées comme anormales lorsqu'elles présentaient un coléoptile déjeté, bouclé ou vide ou une absence de racine séminale.

L'expérience mise en place pour suivre la colonisation rhizosphérique de *Bacillus polymyxa* après inoculation, dans les sol sableux (Auxonne), sablo-limoneux (Dieulouard) et argileux (Sexey-les-bois), a également permis d'observer les effets de l'inoculation sur la croissance des parties aériennes du blé. Les plantules avaient été inoculées par enrobage des graines avec 0,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^6$  et  $10^8$  spores de la souche CF43. Elles ont été récoltées 7 jours après le semis (stade 2 feuilles). Les détails du protocole ont été présentés dans la 1<sup>ère</sup> partie du chapitre 2.

• *Analyse des résultats.*

Une analyse de variance à 2 facteurs, pour un dispositif en split-plot, a été faite pour chaque variable étudiée lors des expériences au champ. Les deux facteurs pris en compte sont l'azote en sous-bloc et l'inoculation. Le facteur bloc est un facteur contrôlé. La comparaison des niveaux des facteurs est faite au risque de première espèce de 5%. Le logiciel utilisé est STATITCF.

Les résultats des taux de germination ont été analysés à l'aide d'un test non paramétrique des permutations (logiciel STATXACT).

### 3. RESULTATS.

Nous avons étudié l'action croisée de la fertilisation azotée et de l'inoculation sur l'expression des composantes du rendement ainsi que les conséquences sur la teneur en azote de la plante.

- *Inoculation et élaboration du rendement.*

(i) *Effet in vitro de l'inoculation sur la graine en germination.* Les résultats obtenus avec les taux de germination dans la vermiculite et dans le sol de Dieulouard apparaissent dans le tableau 16. La comparaison des pourcentages montre une diminution du taux de germination, entre 2 et 3%, suite à l'inoculation par enrobage. Cet effet est significatif dans le cas où le support utilisé pour faire germer les graines est la vermiculite ( $p = 0,028$ ). L'absence d'effet significatif dans le sol de Dieulouard est peut être à mettre sur le compte d'un nombre insuffisant de graines testées. En utilisant comme témoin des graines n'ayant reçu aucun traitement, cette expérience ne permettait pas de distinguer l'effet de l'inoculum sur la germination de celui de la technique d'enrobage.

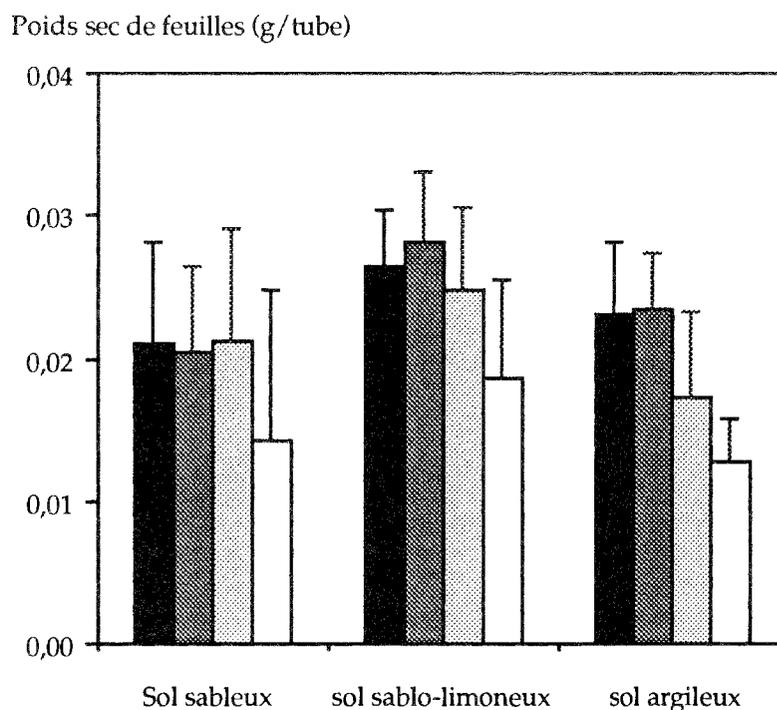
**Tableau 16 : Effet de l'inoculation avec *Bacillus polymyxa* CF43 sur le taux de germination de graines de blé, dans la vermiculite et dans un sol brun sablo-limoneux (sol de Dieulouard). Les graines inoculées ont été enrobées avec  $10^7$  spores de la souche CF43. Les témoins n'ont reçu aucun traitement.**

	Témoin	Inoculé	Proba. critique (1)
vermiculite (2)	95,5 %	92,2 %	0,028
sol sablo-limoneux (3)	92,0 %	90,0 %	0,403

(1) Probabilité critique donnée par le test non paramétrique des permutations.

(2) Les pourcentages sont déterminés sur 400 graines de chaque traitement.

(3) Les pourcentages sont déterminés sur 100 graines de chaque traitement.



**Figure 27:** Mesure du poids sec de feuilles de plantules de blé ayant germé en sol sableux, sablo-limoneux et argileux, avec comme niveaux d'inoculation de *Bacillus polymyxa* CF43 : 0 (■),  $2 \times 10^4$  (▣),  $2 \times 10^6$  (□) et  $10^8$  (□) spores/graines. Le poids de matière sèche de feuilles est exprimé en g/tube. Chaque tube a reçu deux graines d'un même traitement. Les moyennes de chaque modalité sont calculées à partir de 6 répétitions. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%.

Une des études présentées dans le chapitre 2 consistait à comparer les abondances de *Bacillus polymyxa* dans les rhizosphère de blé de sols sableux, sablo-limoneux et argileux après enrobage des semences avec la souche CF43. Les différentes quantités d'inoculum apportées par semence étaient de 0,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^6$  et  $10^8$  spores. Lors de cette expérience, le poids de matière sèche des parties aériennes obtenues pour chaque traitement a été mesuré sur des plantules ayant atteint le stade 2 feuilles.

En présence de  $10^8$  spores/semence, les mesures du poids de matière sèche de feuilles récoltées par tube (Fig. 27), montrent un effet significativement négatif de la bactérie après inoculation ( $p < 0,001$ ). Le mauvais taux de germination, du à de fortes quantités d'inoculum autour des semences, n'explique pas à lui seul cette diminution du poids sec de feuilles par tube. Il y a également pour ce traitement une mauvaise croissance des plantules, d'autant plus marquée que le sol est argileux. Le même effet a été observé sur le poids sec de racines (Fig. 20). Pour des niveaux d'inoculation pratiqués au champ (environ  $10^6$  spores de CF43/semences), le poids de matière sèche de feuilles n'est pas significativement modifié. Par ailleurs, la croissance des jeunes plantules est globalement meilleure dans le sol sablo-limoneux de Dieulouard ( $p = 0,001$ ).

(ii) *Le peuplement herbacé.* Les différences de peuplement observées entre 1990 et 1991 sont consécutives à des densités de semis différentes (Tab. 17). En 1991, la quantité de graines semées par parcelle a été calculée pour obtenir une densité de 500 graines/m<sup>2</sup>, alors qu'elle avait été fixée à 400 graines/m<sup>2</sup> en 1990. Pour ces deux essais, le nombre de plantules effectivement présentes avant le tallage correspond à 80% du nombre de semences théoriquement apportées sur la même surface.

Tableau 17 : Peuplement herbacé à la levée (nb de plantes/m linéaire) pour chaque niveau de fertilisation azotée, dans les essais d'inoculation au champ de 1990 et 1991.

Traitement azoté	1990		1991	
	Témoin	Inoculé	Témoin	Inoculé
Sans fertilisation	45 ± 7 a †	52 ± 10 a	56 ± 9 a	55 ± 5 a
Dose intermédiaire	44 ± 4 a	45 ± 6 a	56 ± 10 a	63 ± 11 a
Dose maximale	48 ± 7 a	43 ± 8 a	61 ± 9 a	60 ± 8 a

† Les valeurs correspondent à la moyenne de 15 répétitions en 1990 et 18 répétitions en 1991. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%. Pour une année, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % (test de Newman-Keuls).

La fertilisation azotée n'a aucun effet sur cette composante. De même, l'effet de l'inoculation sur le taux de germination, observé *in vitro*, n'apparaît pas *in situ*. La variabilité des mesures entre parcelles d'un même traitement (15%) rendait improbable la mise en évidence d'une différence de 2 à 3 % observée entre traitements témoin et inoculé lors du test de germination (moins de 5 chances sur 100 de mettre en évidence le phénomène).

Les comptages effectués en 1991 font apparaître une interaction significative entre les facteurs azote et inoculation. L'inoculation aurait favorisé l'émergence des plantules uniquement dans les parcelles ayant reçu une fertilisation moyenne de 70 kg N/ha. Ce résultat n'est pas corrélable avec un effet de l'azote car ce facteur n'intervient pas sur la plante à ce stade de la culture.

(iii) *La biomasse aérienne produite au début de la montaison.* La biomasse aérienne produite à ce stade détermine le nombre d'épis potentiel. En revanche, le nombre de talles/m<sup>2</sup> donne une moins bonne estimation de ce potentiel, toutes les talles n'ayant pas les mêmes chances de monter. Nous avons mesuré le comportement de ces deux variables face aux traitements azote et inoculation.

**Tableau 18 : Poids de matière sèche des parties aériennes au stade "épi à 1 cm" (g/m<sup>2</sup>) pour chaque niveau de fertilisation azotée dans les essais d'inoculation au champ de 1990 et 1991.**

Traitement azoté	1990		1991	
	Témoin	Inoculé	Témoin	Inoculé
Sans fertilisation	101,9 ± 15,3 ab †	110,5 ± 31 a	181,3 ± 47 a	189,7 ± 54,4 a
Dose intermédiaire	76,6 ± 10,2 bc	89,3 ± 18 abc	198,1 ± 74,5 a	197,7 ± 41 a
Dose maximale	91,6 ± 17,5 abc	70,7 ± 20,4 c	191,6 ± 40,4 a	204 ± 37,6 a

† Les valeurs correspondent à la moyenne de 5 répétitions en 1990 et 6 répétitions en 1991. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%. Pour une année donnée, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % ( test de Newman-Keuls).

Les résultats obtenus sur la biomasse produite en 1990 et 1991, montrent qu'il n'y a pas de gain de potentiel avec l'accroissement des doses d'azote (Tab. 18). Bien au contraire il semble qu'en 1990, la

fertilisation ait eu un effet négatif. L'apport d'azote aurait déplacé l'équilibre établi entre le sol et la plante, aux dépens de cette dernière. Ceci se traduit par une accentuation des tendances que l'on observait déjà sur le peuplement levée pour cet essai. En 1991, il n'y a aucune corrélation entre la production de biomasse au début de la montaison et le niveau de fertilisation azotée.

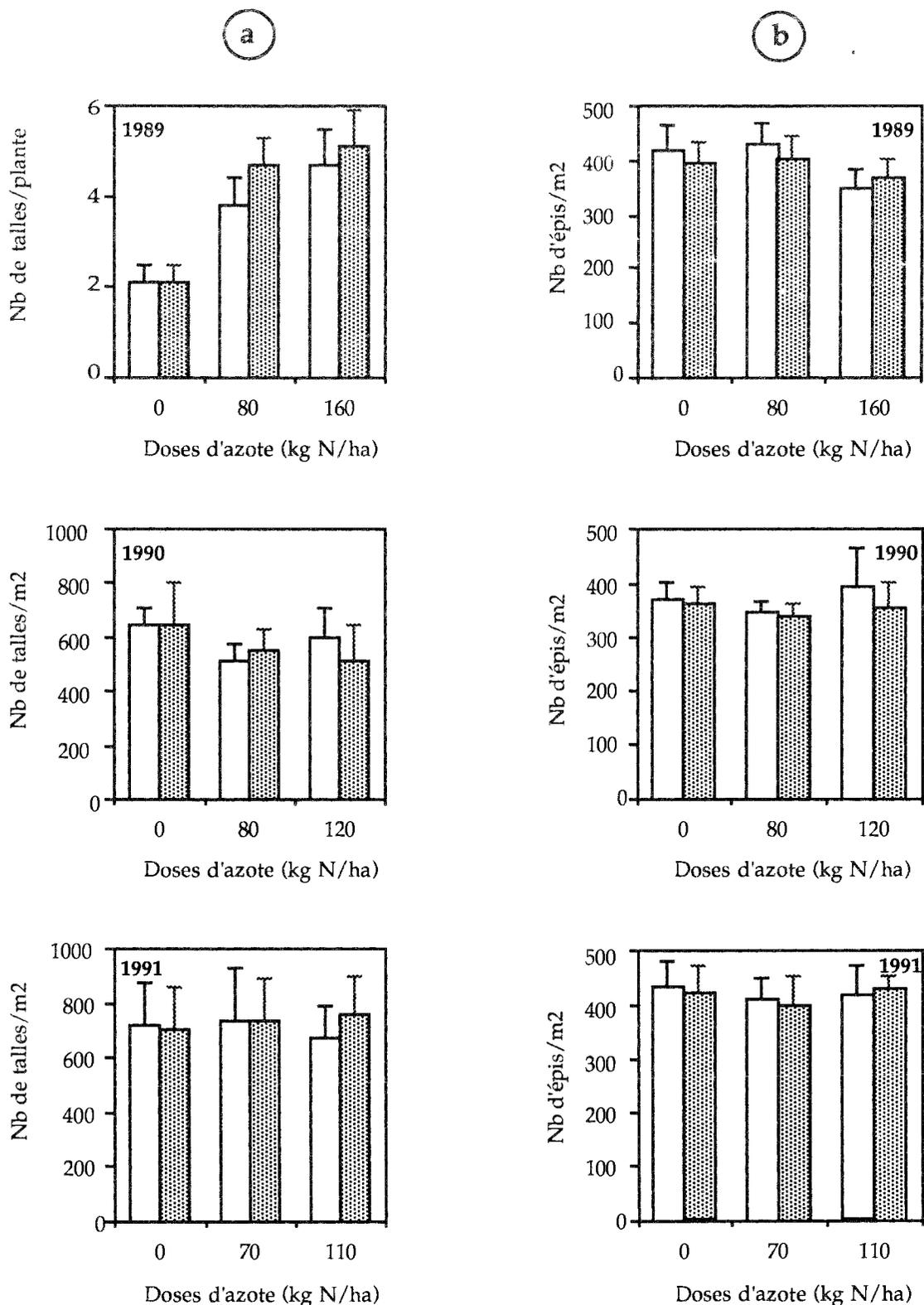
L'analyse de cette variable ne met en évidence ni un effet globale de l'inoculation (pour des puissances de test inférieures à 10%), ni une interaction entre l'azote et l'inoculation.

L'analyse des résultats obtenus en 1990 et 1991 sur la biomasse est la même à propos du comptage du nombre de talles/m<sup>2</sup> effectué pour ces deux années (Fig. 28 a). En 1989, cette composante avait été exprimée en nombre de talles par plante prélevée. Elle montre une forte sensibilité vis à vis de l'azote ( $p < 0,001$ ). Le nombre de talles par plante est en moyenne de 2,1, 4,2 et 4,9 respectivement pour les niveaux 0, 80 et 160 kg N/ha. La faible puissance du test statistique sur le facteur inoculation (25%) ne permet pas de conclure sur un effet global de l'inoculation sur cette variable. Pourtant, l'inoculation semble avoir pour conséquence, une augmentation du tallage des plantes fertilisées avec 80 kg N/ha. L'analyse effectuée uniquement sur ce niveau du facteur azote différencie significativement le traitement inoculé du traitement témoin ( $p = 0,04$ ). Les plantes inoculées et fertilisées avec 80 kg N/ha produisent autant de talles que les plantes témoins fertilisées avec 160 kg N/ha.

Toutes ces talles n'ont pas la même capacité à donner un épis. Ce sont les conditions d'alimentation minérale pendant le tallage et la montaison qui déterminent en grande partie le devenir de ces talles et par conséquent le peuplement épis.

*(iv) Le nombre d'épis à la floraison.* Les comptages de 1990 et 1991 confirment l'absence de réponse à la fertilisation azotée observée au moment du tallage (Fig. 28 b). La comparaison de ces comptages de peuplement épis avec ceux des peuplements herbacés effectués avant le tallage, suggère que la majorité des plantes ne produit qu'un seul épis. Celui-ci étant porté par le maître brin, il apparaît que la quasi totalité des talles est restée non productive. Le potentiel de rendement de la variété Fidel, basée sur un assez fort tallage, ne s'exprime donc pas.

Une part de l'explication de ce phénomène peut être trouvée dans une quantité trop faible d'éléments disponibles au moment de la montaison et dans un fonctionnement racinaire déficient. Cela pose le problème des cultures de blé de printemps pour ces trois années, où la demande maximale de la plante en éléments minéraux comme l'azote correspondait à un régime hydrique déficient. Ainsi pour l'essai de 1989, la réponse à la fertilisation azotée, observée au moment du tallage, n'apparaît pas dans le peuplement épi (Fig. 28 b).

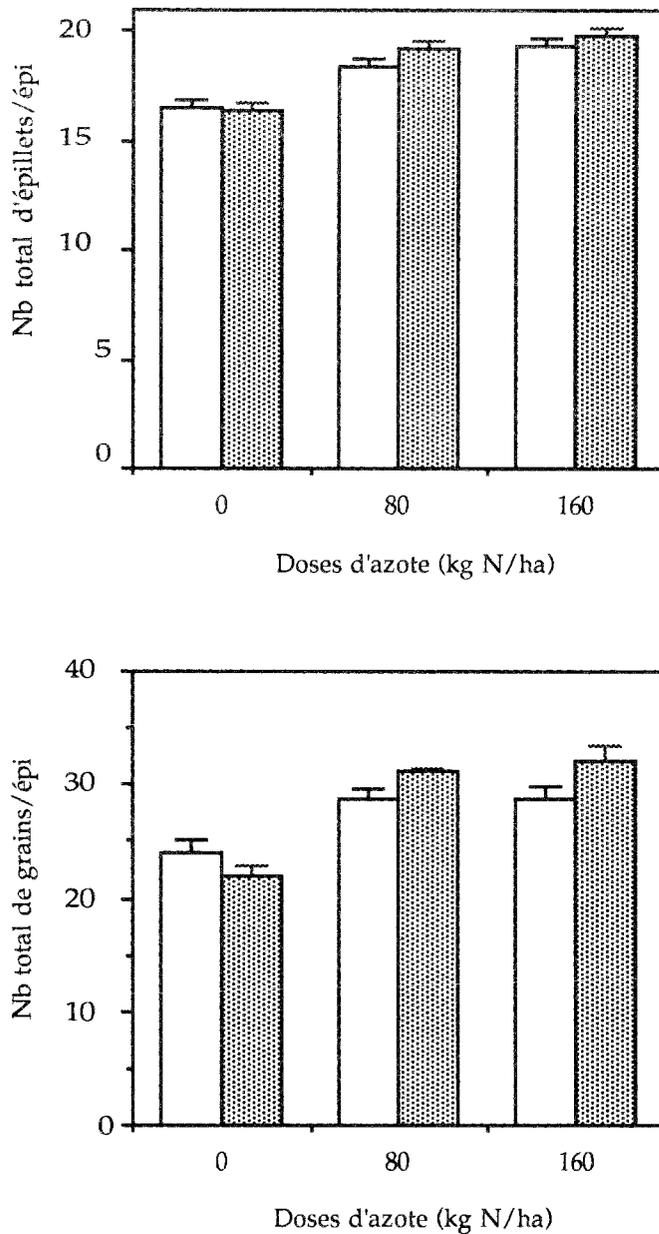


**Figure 28 :** Tallage herbacé au stade "épi à 1 cm" (a) et peuplement épis à la floraison (b) dans les trois essais d'inoculation au champ. Comparaison entre traitement témoin (□) et inoculé avec *B. polymyxa* CF43 (▨) pour l'ensemble des niveaux de fertilisation azotée. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%.

**Tableau 19** : Effets de la fertilisation azotée et de l'inoculation par *Bacillus polymyxa* CF43, sur le rendement à la récolte et le poids moyen d'un grain.

Traitement azoté	1989		1990		1991	
	Témoin	Inoculé	Témoin	Inoculé	Témoin	Inoculé
Rendement à 15% d'humidité des grains (Qx/ha).						
Sans fertilisation	26,7 ± 4,7 a †	27,2 ± 4,0 a	32,1 ± 6,1 a	28,6 ± 6,1 a	42,3 ± 4,4 a	41,6 ± 4,4 a
Dose intermédiaire	37,2 ± 7,5 b	38,2 ± 4,6 b	31,6 ± 4,6 a	31,9 ± 4,2 a	48,3 ± 2,4 b	47 ± 4,6 b
Dose maximale	33,5 ± 5,2 b	36,4 ± 5,0 b	30,5 ± 5 a	30,6 ± 5,6 a	47,5 ± 3 b	47,5 ± 3,4 b
Poids moyen d'un grain (mg).						
Sans fertilisation	44,1 ± 1,2 a	43,8 ± 1,0 a	46 ± 4,0 a	43 ± 4,0 a	41,5 ± 0,7 a	41,5 ± 0,7 a
Dose intermédiaire	42,7 ± 1,0 b	42,4 ± 0,8 b	44 ± 3,0 a	42 ± 5,0 a	41 ± 1,5 a	42 ± 1,5 a
Dose maximale	42,3 ± 1,5 b	42,5 ± 1,1 b	42 ± 3,0 a	41 ± 2,0 a	42 ± 1,0 a	42,5 ± 0,7 a

† La valeur donnée pour chaque traitement correspond à la moyenne de 5 répétitions en 1990 et 6 répétitions en 1989 et 1991. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%. Pour une année, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % ( test de Newman-Keuls).



**Figure 29** : Résultat des comptages du nombre total d'épillets par épis et du nombre total de grains par épi, effectués lors de l'essai de 1989. Comparaison entre traitements témoin ( □ ) et inoculé ( ▨ ) pour les 3 niveaux de fertilisation étudiés (0, 80 et 160 kg N/ha). Pour chaque traitement, les comptages ont été effectués sur 60 épis prélevés aléatoirement dans les parcelles. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%.

(vi) *Le rendement à la récolte.* L'épi récolté peut fournir de nouvelles indications sur le fonctionnement du peuplement végétal face à l'azote et à l'inoculation. Le nombre d'épillets totaux constitue l'une de ces indications. La formation des épillets débute au début du tallage (stade double ride) et s'achève au début de la montaison (stade épillet terminal). Leur nombre dépendrait essentiellement de la température, de la photopériode et de la variété.

Les comptages effectués sur des épis prélevés en 1989, montrent que cette variable peut être également influencée par la fertilisation azotée (Fig. 29). Dans cet essai de 1989, l'épi à maturité porte l'empreinte de l'effet de l'azote qui avait été observé sur la plante au moment du tallage. L'analyse de ces résultats met en évidence un effet significatif de l'inoculation qui est particulièrement net pour la dose moyenne de 80 kg N/ha. Cette augmentation représentant moins de 1 épillet par épi, nous avons cherché à savoir si l'inoculation avait également un effet sur le nombre de grains par épi.

Le nombre final de grains sur un épi reste surtout sous la dépendance du nombre de fleurs capables de former un grain. Or le nombre de fleurs fertiles est sous le contrôle d'hormones et de la quantité en hydrates de carbone et en molécules azotées accédant à l'épi. Lors de l'essai de 1989, seule l'absence ou la présence d'une fertilisation azotée a un effet significatif sur le nombre de grains par épi (Fig. 29). Au moment de la formation des grains, l'azote n'était plus le principal facteur limitant et d'autres paramètres, comme l'alimentation hydrique, ont pu jouer un rôle. L'inoculation semble augmenter le nombre de grains par épi dans les parcelles fertilisées, mais pas de façon significative (puissance de test < 15%).

Entre le nombre d'épis/m<sup>2</sup> et le nombre de grains/épi, seule la sensibilité de la seconde composante à la fertilisation azotée permet d'expliquer l'effet de l'azote sur les rendements obtenus en 1989 et 1991 (Tab. 19). Pour ces deux essais, on observe une réponse à la fertilisation azotée, indépendamment des doses apportées. En 1990, la fertilisation azotée s'est avérée inefficace. Sur l'ensemble des trois essais, le rendement en grain n'est pas modifié par l'inoculation avec *Bacillus polymyxa* CF43.

Les faibles valeurs des rendements s'expliquent par la faiblesse des peuplements épis et des poids moyens des grains (Tab. 19). Le PMG permet d'apprécier le remplissage du grain. Il n'est sensible à aucun des traitements appliqués. Ce paramètre est surtout influencé par les perturbations du fonctionnement photosynthétique et de l'alimentation hydriques.

Tableau 20 : Effet de l'inoculation par *Bacillus polymyxa* CF 43 sur la teneur en azote des grains à la récolte (en % du poids sec), pour les trois niveaux de fertilisation azotée étudiés. Ces mesures ont été effectuées en 1989 et 1990.

Traitement azoté	1989		1990	
	Témoin	Inoculé	Témoin	Inoculé
Sans fertilisation	1,81 ± 0,08 a †	1,83 ± 0,08 a	2,15 ± 0,1 a	2,22 ± 0,16 a
Dose intermédiaire	2,15 ± 0,12 b	2,21 ± 0,09 b	2,33 ± 0,06 b	2,41 ± 0,07 b
Dose maximale	2,49 ± 0,07 c	2,43 ± 0,1 c	2,42 ± 0,23 b	2,48 ± 0,15 b

† Les valeurs obtenues pour chaque traitement correspondent à la moyenne de 6 répétitions en 1989 et de 5 répétitions en 1990. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%. Pour une année, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % ( test de Newman-Keuls).

• *Inoculation et prélèvement d'azote par la plante.*

L'étude du prélèvement d'azote par la plante a été effectuée au cours de l'essai de 1990. Cette année là, l'analyse des composantes du rendement a montré qu'il n'y avait pas de gain de rendement suite à la fertilisation azotée. Dans ces conditions, l'inoculation n'avait eu aucun effet, même précoce, sur la croissance du blé.

(i) *Mesures au stade "épi à 1 cm"*. Ces mesures ont été faites trois semaines après le premier apport d'ammonitrates. L'inoculation et la fertilisation n'ont eu aucun effet sur la teneur en azote des parties aériennes (Fig. 30). Comme la production de biomasse dans les parcelles sans fertilisation azotée paraissait plus importante (Tab. 18), ceci se traduit par une exportation d'azote sensiblement plus importante dans ces parcelles ( $p = 0,04$ ). Les fournitures du sol pendant cette phase de croissance suffisaient aux besoins de la culture.

(ii) *Mesures à la floraison*. Le prélèvement d'azote par la plante n'est toujours pas influencé par la fertilisation des parcelles (Fig. 30). En revanche, l'inoculation diminue la teneur en azote des parties aériennes ( $p < 0,05$ ), quelque soit le niveau de fertilisation azotée. Comme l'analyse a été effectuée sur la plante entière (feuilles, tiges et épis confondus), on ne peut pas savoir si cet effet est généralisé à la plante ou si il y a des parties spécifiquement affectées.

(iii) *Mesures à la récolte*. Un effet de la fertilisation sur la teneur en azote des pailles est enfin détecté à la récolte (Fig. 30). La différence est nette entre les parcelles fertilisées, mais elle est moins évidente entre les deux niveaux de fertilisation.

Un résultat identique est obtenu avec l'analyse de l'azote dans les grains (Tab. 20). Cette mesure avait également été faite sur les lots de grains récoltés en 1989. Dans ce cas il apparaît une meilleure corrélation entre la teneur en azote des grains et le niveau de fertilisation azotée (Tab. 20). La comparaison des résultats obtenus en 1989 et 1990 montrent que les fournitures en azote du sol sous les parcelles témoins étaient plus importantes, ou mieux utilisées en 1990.

#### 4. DISCUSSION.

- *Effet de la fertilisation azotée sur l'élaboration du rendement.*

L'objectif de ce travail était d'étudier l'efficacité de l'inoculation d'un blé de printemps avec la souche CF43, en interaction avec la fertilisation azotée. Nous nous proposons de tester l'hypothèse selon laquelle l'inoculation favoriserait l'alimentation azotée de la plante au cours de son développement. Or le manque de sensibilité à la fertilisation constitue le résultat le plus marquant de ces essais au champ, limitant ainsi la mise en évidence de l'effet de l'inoculation recherché.

Sous le contrôle de facteurs climatiques ( température, photopériode), la succession des stades de développement du blé est accélérée en culture de printemps. Par conséquent, la production de biomasse lors de la phase végétative est réduite. De plus, le prélèvement d'éléments minéraux par la plante est limité par le régime hydrique existant. Des semis effectués tardivement, ont sûrement accentué le phénomène. Dans ces conditions les besoins de la plante en azote ont été en grande partie satisfaits par les fournitures du sol. D'une manière générale, les apports azotés ont été mal valorisés lors de ces trois essais.

- *Effet de l'inoculation sur la jeune plantule.*

L'enrobage des semences avec de fortes concentrations d'inoculum ( $10^8$  spores/semences) se traduit par une diminution du poids sec de feuilles, 7 jours après le semis. A l'image des racines, le développement des parties aériennes est d'autant plus sensible à l'inoculation que le sol est argileux.

Il semble qu'un excès de cellules bactériennes sur la semence se traduise par la production de substances en quantité suffisante pour inhiber le développement de la plantule en germination. Cependant, cet effet existe pour des niveaux d'inoculation très élevés qui ne sont pas utilisés en expérimentation au champ. De plus, en attendant d'identifier les substances impliquées dans ce mécanisme, il reste à démontrer que l'activité de l'inoculum observée *in vitro* existe dans la rhizosphère de plantules au champ. Les mesures de biomasse effectuées plus tardivement au moment du tallage suggèrent que cet effet, s'il existe, n'a pas de conséquence sur la croissance ultérieure de la plante.

Il semble qu'une diminution de la croissance soit fréquemment obtenue pour des concentrations d'inoculum excessives (FALLIK et al., 1988; ARSAC et al., 1990). La production de substances, capables de modifier la croissance des plantes, par des bactéries fixatrices d'azote a été suggéré par plusieurs

auteurs pour expliquer les promotions de croissance après inoculation, en absence de fixation d'azote notable (MILLET et FELDMAN, 1984; SMITH et al., 1984; LINDBERG et al., 1985; KUCEY, 1988). La production de telles substances a été mise en évidence pour des bactéries appartenant aux genres *Azospirillum* (JAIN et PATRIQUIN, 1985) et *Bacillus* (ROVIRA, 1963; HOLL et al., 1988; CHANWAY et NELSON, 1990). Ces substances comprenant des molécules comme les auxines, gibbérélines et cytokinines (TIEN et al., 1979) peuvent modifier la croissance et la morphologie du système racinaire (BROWN, 1974; JAIN et PATRIQUIN, 1985; KUCEY, 1988) ainsi que l'émergence des plantules (HOLL et al., 1988; CHANWAY et NELSON, 1990). D'autres molécules, comme les nitrites, peuvent avoir des effets similaires à ceux des phytohormones (ZIMMER et al., 1988). La formation de nitrites par respiration des nitrates existe chez des populations rhizosphériques comme *Azospirillum brasilense* ou *Bacillus polymyxa*. La production de nitrites par la bactérie peut être trop importante et inhiber la croissance de la plante (ZIMMER et al., 1988).

Les courbes de réponses du poids sec de racines et de feuilles à l'inoculation de la souche CF43, n'ont pas l'allure en "cloche" typique d'une réponse à des substances promotrices de croissance. On observe seulement une réponse négative de la croissance végétale à de fortes concentrations d'inoculum, les doses intermédiaires n'ayant aucun effet significatif.

• *Les effets de l'inoculation sur l'élaboration du rendement.*

HOLL et al. (1988) montrent que la stimulation de la croissance du chiendent (*Agropyron cristatum* L.) après inoculation d'une souche de *B. polymyxa* est essentiellement marquée sur le poids sec de racines alors que la réponse des parties aériennes reste marginale. KUCEY (1988) a étudié la modification du système racinaire d'un blé de printemps *in situ*, après inoculation d'une souche de *Bacillus*. Les relevés qu'il a effectués à l'aide d'une technique au P<sup>32</sup> montrent que les systèmes racinaires des plantes inoculées représentent 82% de la dimension des systèmes racinaires des plantes non inoculées. Cependant il n'y a pas eu de différence dans la production de matière sèche ou dans la teneur en azote totale des plantes.

Compte tenu de l'impossibilité de prélever un système racinaire intact au champ, nous sommes limités à suivre l'effet de l'inoculation sur la croissance des parties aériennes et l'élaboration du rendement.

En 1989, des systèmes racinaires ont tout de même été prélevés afin de suivre par ELISA, la colonisation rhizosphérique de l'inoculum. Les résultats présentés dans le chapitre 2 (Fig. 14) montrent que l'inoculation de la souche CF43 augmente la densité de *B. polymyxa* associés aux racines séminales

du blé. L'effet, particulièrement net à la levée, se prolonge jusqu'au tallage. Ce stade de développement se caractérise par la mise en place du système racinaire définitif de la plante. Il est peu probable que ce système nodal, qui apparaît environ 6 semaines après le semis, soit influencé dans son fonctionnement par l'inoculum apporté initialement sur la semence. Par conséquent, il y a peu de chance d'observer un effet direct de l'inoculation sur les composantes du rendement qui s'élaborent après le tallage. Il est donc important d'examiner les effets de l'inoculation à ce stade du développement de la plante.

Au cours de l'essai de 1989, alors que l'inoculum avait colonisé effectivement le système racinaire séminal, un effet significatif de l'inoculation sur la tallage herbacé a été mis en évidence dans les parcelles fertilisées avec une dose moyenne d'azote (80 kg N/ha). Cet essai est le seul parmi les trois où ce phénomène a pu être observé. C'est également la seule année où une réponse nette à l'azote a été obtenue sur les paramètres mesurés au tallage. Dans ce cas, la réponse à l'inoculation est similaire à celle d'une augmentation de la fertilisation azotée.

Les effets de l'azote et de l'inoculation sont retrouvés plus tard à la récolte, sur le nombre d'épillets par épi. La formation de ces épillets qui a lieu pendant le tallage est sous la dépendance des fournitures en azote par le sol (NERSON et al., 1990). L'inoculation aurait un effet similaire à celui de la fertilisation azotée.

L'interaction entre la fertilisation azotée et l'inoculation apparaît clairement. L'effet de l'inoculation est plus marqué dans les parcelles fertilisées avec une dose moyenne d'engrais azotés. Il est inexistant dans les parcelles non fertilisées. La diversité des réponses à l'inoculation en fonction de la quantité d'azote apportée a déjà été abordée dans l'introduction. Dans le cas de l'inoculation avec la souche CF43, il semble que la sensibilité de la culture à la fertilisation azotée soit une condition *sine qua non* pour la mise en évidence d'un effet de l'inoculation, quelle que soit la composante étudiée.

L'augmentation du nombre de talles après inoculation d'une souche de *Bacillus* est également rapportée par CHANWAY et NELSON (1990). Selon eux, les effets de l'inoculation se manifesteraient plus tard lors des expériences au champ par rapport à des études menées *in vitro*. Ainsi, ils ont observé une augmentation du poids sec des parties aériennes des plantes inoculées, 70 jours après le semis, alors que ce poids était inférieur à celui des plantes non inoculées 19 jours seulement après le semis.

L'accumulation de biomasse au moment du tallage va favoriser la montée de ces talles. Les augmentations de rendement obtenues après inoculation de bactéries fixatrices d'azote sont essentiellement dues à une augmentation du nombre de talles fertiles par unité de surface (KAPULNIK et al., 1983; MILLET et al., 1984; WAREMBOURG et al., 1987). Contrairement aux observations de

BOURGAUD (1987), l'inoculation d'un blé de printemps avec la souche CF43 n'a jamais influencé le peuplement épis lors de nos essais. Par conséquent, aucune modification significative du rendement après inoculation n'a été mise en évidence.

- *Prélèvements d'azote par la plante.*

Un meilleur prélèvement d'éléments minéraux (N, P et K) est souvent avancé comme explication à l'augmentation de biomasse après inoculation (LIN et al., 1983; SARIG et al., 1984; YAHALOM et al., 1984; KAPULNIK et al., 1985). Les accroissements significatifs de l'exportation d'azote par la plante peuvent être dus à la fois à une meilleure production de biomasse et à une teneur supérieure en azote des plantes inoculées (KAPULNIK et al., 1983). L'augmentation de la teneur en azote, observée dans les feuilles, est en général moins importante au niveau des grains (KAPULNIK et al., 1985).

Les mesures de l'azote total dans les grains à la récolte ne montrent aucun effet de l'inoculation avec la souche CF43. Des résultats similaires ont été obtenus par BERGE (1984) avec la même souche. En 1990, la teneur en azote des parties aériennes à la floraison est sensiblement diminuée par l'inoculation. Les études de RENNIE et THOMAS (1987), effectuées avec une souche de *Bacillus*, ont montré que si l'inoculation pouvait stimuler la croissance racinaire du blé, elle n'augmentait pas le prélèvement d'azote minéral par la plante. La plante semble équilibrer ces prélèvements en puisant dans l'une des trois sources que sont l'azote provenant de la réduction d'azote par la microflore rhizosphérique et l'azote apporté par fertilisation ou fourni par le sol.

- *Une association spécifique entre la souche testée et la variété de blé utilisée.*

La diversité des résultats que l'on rencontre provient d'une connaissance encore incomplète des paramètres régissant l'interaction plante/micro-organismes. Des différences dans la composition et la quantité de la microflore rhizosphérique ont été mis en évidence entre variétés d'une même espèce végétale (ELKAN, 1962; HORNBY and ULLSTRUP, 1967; AZAD et al., 1985). NEAL et al. (1973) montrent que la substitution d'une simple paire de chromosomes chez le blé affecte quantitativement et qualitativement la microflore rhizosphérique. La capacité d'une variété de blé à héberger une activité fixatrice d'azote dans la rhizosphère dépend de son génotype (RENNIE et AL., 1983; RENNIE et THOMAS, 1987).

Le support de cette spécificité génotypique doit se trouver au niveau de l'exsudation racinaire, les micro-organismes rhizosphériques étant largement dépendant de cette source de carbone. Des changements, même mineurs, dans la plante hôte provoquent des modifications qualitatives et

quantitatives de l'exsudation racinaire (BALDANI et DOBEREINER, 1980; CURL et TRUELOVE, 1986) et par conséquent peuvent influencer la taille de la microflore rhizosphérique, sa diversité d'espèces ou la nature des produits du métabolisme de ces bactéries. S'il est prématuré de parler de relation gène à gène pour l'association entre plante et bactéries promotrices de croissance, il semble qu'une réponse positive à l'inoculation dépende de différences génétiques mineures entre les plantes hôtes (CHANWAY et al., 1988; ARSTROM et GERHARDSON, 1988; ARSAC et al., 1990).

A l'origine, la souche CF43 a été isolée de la rhizosphère de jeunes plantules de blé, variété Castan. L'inoculation de cette variété avec la souche CF43 avait abouti à une augmentation significative du rendement (BERGE, 1984).

Le choix de la variété de blé Fidel pour nos essais au champ est fondé sur une bonne activité fixatrice d'azote, *in vitro*, de la souche CF43 dans sa rhizosphère. De plus, Fidel a une aussi bonne productivité que les autres variétés de blé de printemps. L'effet de l'inoculation avec *B. polymyxa* CF43 n'a pas été testé sur d'autres variétés. Les mesures obtenues par ELISA montrent que l'inoculum est capable de coloniser la rhizosphère des plantules de la variété Fidel. Cependant des différences significatives entre variétés sur les niveaux de colonisation rhizosphérique, ainsi que sur les réponses de la plante à l'inoculation, ne peuvent être exclues.

## 5. CONCLUSION.

Les résultats de l'inoculation d'un blé de printemps avec la souche CF43 ont été analysés dans ce troisième chapitre. Le traitement "inoculation" a été croisé avec le facteur "fertilisation azotée".

Globalement, peu de réponses à la fertilisation azotée ont été mesurées lors de ces trois expériences au champ. Cette absence d'effet de l'azote peut expliquer l'absence d'effet de l'inoculation. Malgré l'importance des dispositifs mis en place, les puissances des tests statistiques pour l'analyse du facteur "inoculation" sont souvent très faibles.

Les résultats les plus significatifs ont été obtenus en 1989. Le nombre de talles herbacées et le nombre total d'épillets par épis ont été significativement influencés par la fertilisation azotée. Un effet de l'inoculation sur ces deux paramètres a été clairement mis en évidence pour les plantes ayant reçu une fertilisation azotée moyenne de 80 kg N/ha. Ces deux composantes du rendement final ont comme point commun le fait qu'elles s'élaborent durant le même stade de développement de la plante : **le tallage**. Or, lors de ce même essai, une augmentation de la population de *B. polymyxa* sur le système racinaire séminal avait été mise en évidence après enrobage de la semence de blé avec la souche CF43.

Il semble donc qu'un effet de l'inoculation, en condition de plein champ, soit corrélée à une meilleure colonisation racinaire par la population de *B. polymyxa*.

*CONCLUSION GENERALE.*

## CONCLUSION GENERALE.

L'engouement des années 80 autour de l'utilisation de bactéries du sol en agriculture, a été quelque peu atténué par le manque de reproductibilité de certains résultats au champ. Il est apparu que ces bactéries potentiellement bénéfiques pour la plante n'étaient pas présentes ou actives dans toutes les conditions et qu'il existait une relation étroite entre la plante-hôte et la bactérie. La difficulté pour la souche bactérienne introduite de s'installer durablement dans la rhizosphère de la plante inoculée est une des principales explications de la variabilité des résultats obtenus.

La mesure de la dynamique de populations de bactéries rhizosphériques est donc à la base de l'étude de leurs effets sur la plante après inoculation. Pourtant, on dispose de peu de données sur les capacités d'une bactérie à coloniser la rhizosphère, par manque de méthodes pour suivre spécifiquement une souche bactérienne dans le sol.

Le travail présenté dans ce mémoire s'inscrit dans cette double approche de l'étude d'une association plante-micro-organisme : localiser et évaluer l'activité d'une espèce bactérienne dans la rhizosphère d'une plante cultivée. Au cours de nos recherches nous avons privilégié le couple blé - *Bacillus polymyxa*. Les raisons qui ont motivé ce choix sont les suivantes :

- Cette espèce paraît largement distribuée dans les sols, mais les connaissances sur l'écologie de cette bactérie sont encore réduites.
- *B. polymyxa* paraît être le fixateur d'azote le plus abondant dans la rhizosphère du blé sous climat tempéré.
- D'autres activités telles que la production d'antibiotiques, de phytohormones ou la solubilisation des phosphates ont également été décrites pour cette espèce.
- Outre son intérêt économique, le blé (*Triticum aestivum*) est une graminée étudiée pour la compréhension des mécanismes régissant l'association plante - micro-organismes.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet direct ou indirect d'une bactérie fixatrice d'azote, *B. polymyxa* CF43, sur la croissance du blé après inoculation, en s'attachant particulièrement au devenir dans la rhizosphère de la bactérie introduite.

- *Approche méthodologique.*

De nombreux outils méthodologiques actuellement disponibles ( mutations génétiques, méthodes immuno-enzymatiques, emploi de sondes nucléiques en RFLP et en PCR) offrent de nombreuses possibilités d'investigation dans l'étude autécologique des micro-organismes rhizosphériques. Ils rendent possible l'application à l'étude des populations rhizosphériques, de concepts d'écologie tels que la diversité et la stabilité ou la notion de niche écologique.

Par leur sensibilité, leur fiabilité et leur souplesse d'utilisation, les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) se sont révélées être des méthodes compatibles avec le suivi de l'évolution de la taille de la population de *B. polymyxa* dans la rhizosphère de blé cultivé au champ.

Deux protocoles ELISA "indirecte" ont été utilisés dans ce travail. En culture bactérienne pure, le protocole ACP ELISA proposé permet de détecter entre  $6.10^3$  et  $10^4$  cellules de *B. polymyxa* CF43/ml. Ce seuil de détection a été abaissé à  $3.10^3$  cellules/ml, en utilisant le couple streptavidine-biotine comme système d'amplification (AB ELISA). Ce dernier protocole donne une meilleure résolution que celle obtenue en ACP ELISA dans des domaines de faibles concentrations bactériennes.

La particularité des méthodologies développées dans ce travail tient à la nature du milieu dans lequel la bactérie est étudiée : le sol. L'extraction des bactéries est obtenue grâce à l'utilisation conjointe de traitements dispersants (ultrasons) et flocculants (Chlorure de Strontium). Cette séparation des bactéries des autres particules du sol est une étape indispensable pour l'utilisation de méthodes ELISA dans la détection de populations bactériennes telluriques.

Ainsi, il est possible d'avoir une estimation de la taille de la population de *Bacillus polymyxa* par ELISA proche de celle obtenue, plus laborieusement, par le comptage classique du Nombre le Plus Probable (environ  $5.10^5$  *B. polymyxa.g*<sup>-1</sup> de sol sec). Cependant, la spécificité du sérum polyclonal employé ne nous donne accès qu'au nombre d'individus appartenant à l'espèce *B. polymyxa* et non pas au nombre d'individus provenant de la souche CF 43.

Dans le cadre d'études des populations telluriques de *B. polymyxa* par ELISA, il conviendra de définir les limites d'utilisation des méthodes d'extraction pour chaque type de sol. Plus le taux de récupération sera élevé, plus le niveau de détection en ELISA sera important, et donc meilleure sera la résolution.

- **La colonisation du système racinaire du blé par *Bacillus polymyxa* et ses conséquences sur la plante.**

En dépit d'observations selon lesquelles *B. polymyxa* est présent sur le rhizoplan, cette espèce est considérée comme une faible colonisatrice rhizosphérique.

Dans notre cas, l'utilisation de l'outil immuno-enzymatique a permis de mettre en évidence que l'inoculation du blé par enrobage des semences avec la souche CF43 conduisait à une augmentation significative de la taille de cette population sur le système racinaire séminal, jusqu'au tallage du blé. Cet effet de l'inoculation ne s'observe plus sur le système racinaire nodal qui se met alors en place.

Ce résultat illustre la difficulté d'adapter une technique d'inoculation efficace, au développement de la plante. Ceci est particulièrement vérifié avec le blé, pour lequel le système racinaire définitif se met en place plus de 6 semaines après le semis. La technique d'enrobage des semences, compatible avec une pratique culturale, ne peut assurer qu'une colonisation du système racinaire séminal par l'inoculum. Par conséquent, la probabilité d'observer un effet de l'inoculation sur la croissance de la plante sera plus importante sur de jeunes plantules ou sur des composantes du rendement s'élaborant précocement. La réponse à l'inoculation du tallage herbacé et du nombre total d'épillets/épi obtenue au champ en 1989, en sont les illustrations.

- **Une colonisation préférentielle du sol adhérent aux racines.**

L'étude de la colonisation rhizosphérique, en microcosme au laboratoire, montre que la taille de la population de *B. polymyxa* est plus facilement déplacée par inoculation dans le sol adhérent que sur la surface racinaire. La survie de la bactérie introduite serait aussi bonne, voire meilleure dans le sol rhizosphérique que sur le rhizoplan. Cette colonisation préférentielle du sol rhizosphérique a eu des conséquences sur les résultats obtenus après inoculation de la souche CF43. L'un des plus marquants est l'interaction entre le type de sol et l'inoculation.

Le niveau de *B. polymyxa* détecté en ELISA, ainsi que l'impact de l'inoculation sur cette population sont étroitement dépendants des teneurs en argiles des sols utilisés. Dans un sol sableux, l'inoculation semble augmenter la densité de *B. polymyxa* sur les racines, alors que dans un sol argileux les conséquences de l'inoculation sont observées sur le sol adhérent aux racines, avec une augmentation de cette quantité de sol.

L'effet de l'inoculation avec la souche CF43, sur l'environnement physique de la plante a été étudié dans un sol sablo-limoneux. Cet effet s'est traduit par une meilleure structuration du sol rhizosphérique pouvant avoir des conséquences sur la rétention d'eau et le transfert d'éléments nutritifs dans la rhizosphère. De nombreuses recherches sont encore nécessaires pour comprendre les mécanismes déterminant la formation du sol rhizosphérique et les conséquences sur le fonctionnement de l'association plante/sol/micro-organismes.

#### • Epilogue.

Lors de cette étude sur l'inoculation du blé avec une souche fixatrice d'azote, la capacité de la bactérie à coloniser le système racinaire a été pris en compte. Cependant, il est difficile d'évaluer le rôle de la colonisation tant que les processus déterminant la prolifération bactérienne dans la rhizosphère ne sont pas identifiés. Une meilleure connaissance de l'écologie de l'espèce bactérienne étudiée est nécessaire afin de mieux cerner la spécificité des réponses à l'inoculation selon la souche utilisée, la quantité de bactéries apportée et le type de sol dans lequel la plante est inoculée.

Plusieurs travaux rapportent l'existence de différents degrés d'adaptation d'espèces bactériennes vis à vis des racines pour survivre et se développer. Mais l'adaptation à la rhizosphère semble être plus un caractère de souche qu'un caractère d'espèce. A l'intérieur de la population de *B. polymyxa*, décrite comme étant uniformément répartie dans le sol plutôt que concentrée dans la rhizosphère, des différences sérologiques, phénotypiques et génotypiques ont été mises en évidence entre isolats provenant d'un sol nu, d'un sol rhizosphérique et du rhizoplan (MAVINGUI et al., 1991).

L'homologie des caractères de la souche CF43, avec ceux des isolats du sol rhizosphérique confirme les résultats des mesures obtenues en ELISA sur la colonisation du sol adhérent après inoculation de cette souche.

L'existence de ces différents degrés d'adaptation à la plante-hôte permet d'affiner les critères de sélection de souches de *B. polymyxa* en vue de leur inoculation. Les résultats que nous avons obtenus

avec CF43 suggèrent que la réponse à l'inoculation d'une souche de *B. polymyxa* isolée du sol rhizosphérique ne sera pas la même que la réponse à l'inoculation avec une souche du rhizoplan, du sol nu ou d'une combinaison de ces différents isolats. Cela rejoint l'idée avancée par plusieurs auteurs selon laquelle les inoculums devraient être composés d'un mélange de souches assurant une complémentarité d'activité dans différents types de sols et à différents stades de croissance de la plante.

Ce travail et bien d'autres rappelle que le désir d'inoculer un micro-organisme particulier est toujours aussi présent dans nos esprits. Cependant, il est au moins aussi important au travers des connaissances en écologie microbienne d'adapter les systèmes culturaux afin de favoriser une activité biologique existant potentiellement dans les sols.

Actuellement, les programmes de sélection variétale de Graminées ne considèrent que l'activité phytopathologique de certaines populations telluriques. Aucun ne prend en compte la capacité d'une plante à héberger une activité fixatrice d'azote dans sa rhizosphère, ou encore sa sensibilité à l'inoculation par des micro-organismes promoteurs de croissance ou antagonistes d'agents pathogènes.

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.*

## Références bibliographiques.

- ACEA, M.J., MOORE, C.R., and ALEXANDER, M., 1988. Survival and growth of bacteria introduced into soil. *Soil Biol. Biochem.*, **20**, 509-515.
- ALBRECHT, S.L., GASKINS, M.H., MILAN, J.R., SCHANKS, S.C., and SMITH, R.L., 1983. Ecological factors affecting survival and activity of *Azospirillum* in the rhizosphere. In *Azospirillum* II. *Exper. Supple. (Basel)*, **48**, 138-148.
- ALLISON, F.E., 1968. Soil aggregation - Some facts and fallacies as seen by a microbiologist. *Soil Science.*, **106**: 136-143.
- ALLISON, F.E., 1973. *Developments in Soil Science: Soil Organic Matter and its Role in Crop Production*, Vol. 3. Elsevier, Amsterdam, 637 pp.
- ARSAC J.F. and CLEYET-MAREL J.C. 1986. Serological and ecological studies of *Rhizobium* spp (*Cicer arietinum* L.) by immunofluorescence and ELISA technique : competitive ability for nodule formation between *Rhizobium* strains. *Plant Soil.* **94**, 411-423.
- ARSAC, J.F., LAMOTHE, C., MULARD, D., and FAGES, J., 1990. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum lipoferum* inoculation : effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie* **10**, 640-654.
- ASTROM, B., and GERHARDSON, B., 1988. Differential reactions of wheat and pea genotypes to root inoculation with growth-affecting rhizosphere bacteria. *Plant and Soil* **109**, 263-269.
- AZAD, H.R., DAVIS, J.R., SCHNATHORST, W.C., and KADO, C.I., 1985. Relationships between rhizoplane and rhizosphere bacteria and Verticillium wilt resistance in potato. *Arch. Microbiol.* **140**, 347-351.
- BAATH, E., OLSSON, S., and TUNLID, A., 1988. Growth of bacteria in the rhizoplane and in the rhizosphere of rape seedlings. *FEMS Microbiol. Ecology*, **53**, 355-360.

- BACKHOUSE, D., and STEWART, A., 1989. Interactions between *Bacillus* species and sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Soil Biol. Biochem.* **21**, 173-176.
- BAKKEN L.R. 1985. Separation et purification of bacteria from soil. *Appl. Env. Microbiol.* **49**, 1482-1487.
- BALDANI, V.L.D., and DOBEREINER, J., 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.* **12**, 433-439.
- BARBER, D.A., and LYNCH, J.M., 1977. Microbial growth in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **9**, 305-308.
- BARRAQUIO W. L., J. K. LADHA, H. Q. YAO and I. WATANABE. 1986. Antigenic relationship of N<sub>2</sub>-fixing *Pseudomonas* strain H8 to various known cultures and rice rhizosphere isolates studied by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Can. J. Microbiol.* **32**, 402-408.
- BARTOLI F., BURTIN G. and HERBILLON A.J. 1991. Disaggregation and clay dispersion of Oxisols: Na resin, a recommended methodology. *Geoderma* **49**, 301-317.
- BARTOLI, F., PHILLIPY, R., DOIRISSE, M., NIQUET, S., and DUBUIT, M., 1991. Structure and self-similarity in silty and sandy soils: the fractal approach. *J. Soil Sci.*, **42**: 167-185.
- BARZIC M.R. and TRIGALET A. 1982. Détection de *Pseudomonas phaseolica* (Burkh.) Dowson par la technique ELISA. *Agronomie.* **2**, 389-398.
- BASHAN Y., LEVANONY H., and ZIV-VECHT O. 1987. The fate of field-inoculated *Azospirillum brasilense* Cd in wheat rhizosphere during the growing season. *Can. J. Microbiol.* **33**, 1074-1079.
- BENNETT, R.A., and LYNCH, J.M., 1981. Bacterial growth and development in the rhizosphere of gnotobiotic cereal plants. *J. Gen. Microbiol.*, **125**, 95-102.
- BERGE O. 1988. Etude et inoculation des *Bacillus* fixateurs d'azote de la rhizosphère du maïs. 236 pp. Thèse INPL - ENSAIA, Nancy.

- BERGE O., HEULIN T. and 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.
- BERGE, O., 1984. Effet de l'inoculation du blé par une bactérie fixatrice d'azote. D.E.A. I.N.P.L.-Nancy 95 pp.
- BERGER J.A., S.N. MAY, L. R. BERGER and B. B. BOHLOOL. 1979. Colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of strains of *rhizobium* in culture and in the nodules of lentils. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 642-646.
- BEZDICEK D.F. and DONALDSON M.D. 1980. Flocculation of *Rhizobium* from soil colloids for enumeration by immunofluorescence. 297-309. *In* Berkeley R.C.W., Lynch J.M., Melling J.M., Rutter P.R., Vincent B. : "Microbial adhesion to surfaces". Ellis-Horwood ed., Chichester, 343 p.
- BODDEY, R.M., and DOBEREINER, J., 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals : Recent results and perspectives for future research. *Plant and Soil* **108**, 53-65.
- BODDEY, R.M., CHALK, P.M., VICTORIA, R.L., MATSUI, E., and DOBEREINER, J., 1983. The use of the <sup>15</sup>N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. batatais. *Can. J. Microbiol.* **29**, 1036-1045.
- BOQUIEN C.Y., NAKACHE F., and PARAF H. 1991. Ultrasound traitement for harvesting an aminopeptidase from lactic acid bacteria and quantification of the enzyme by enzyme-linked immunosorbent assays. *Appl. Env. Microbiol.* **57**, 2211-2216.
- BOURGAUD F. 1987. Inoculation d'un blé de printemps par *Bacillus polymyxa* : suivi de la souche au champ par une technique immuno-chimique (ELISA). DEA ENSAIA-INPL Nancy.
- BOWEN, G.D., and ROVIRA, A.D., 1973. Are modelling approaches useful in rhizosphere biology ? *Bull. Ecol. Res. Comm. Stockholm*, **17**, 443-450.
- BOWEN, G.D., and ROVIRA, A.D., 1976. Microbial colonization of plant roots. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **14**, 121-144.

- 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.
- BROWN, M.E., 1974. Seed and root bacterization. Annu. Rev. Phytopathol., 12, 181-187.
- BURTIN G. 1989. Méthodologie de régénération des résines et standardisation des ultra-sons pour l'analyse et le fractionnement granulométrique des sols. "Journées Laboratoire" de l' ORSTOM. Montpellier, Sept. 1989.
- CAMPBELL, R., and EPHGRAVE, J.M., 1983. Effect of bentonite clay on the growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and on its interactions with antagonistic bacteria. J. Gen. Microbiol., 129, 771-777.
- CARPENTIER, P.L., 1965. Immunology and serology. 2 nd Edition. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- CHALK, P.M., 1991. The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of non-legumes. Plant and Soil 132, 29-39.
- CHANWAY, C.P., and NELSON, L.M., 1990. Field and laboratory studies of *Triticum aestivum* L. inoculated with co-existent growth-promoting *Bacillus* strains. Soil Biol. Biochem. 22, 789-795.
- CHANWAY, C.P., NELSON, L.M., and HOLL, F.B., 1988a. Cultivar-specific growth promotion of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) by coexistent *Bacillus* species. Can. J. Microbiol. 34, 925-929.
- CHANWAY, C.P., HOLL, F.B., and TURKINGTON, R., 1988b. Genotypic coadaptation in plant growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa*. Plant and Soil 106, 281-284.
- CHAPMAN, S.J., LYNCH, J.M., 1985. Polysaccharide synthesis by capsular microorganisms in coculture with cellulolytic fungi on straw and stabilization of soil aggregates. Biol. Fert. Soils, 1: 161-166.
- CHAUSSOD, R., NICOLARDOT, B., CATROUX, G., et CHRETIEN, J., 1986. Relations entre les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de quelques sols cultivés. Science du Sol, 2, 213-226.

- CHENU, C., PONS, C.H., and ROBERT, M., 1987. Interaction of kaolinite and montmorillonite with neutral polysaccharides. In : L.G. Shultz, H. van Olphen and F.A. Mumpton, (Editors), Proceedings of the International Clay Conference, Denver, 1985. The Clay Minerals Society, Bloomington, pp 375-381.
- CLARK M.F. and A. N. ADAMS. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**, 475-483.
- CLARK, F.F., 1949. Soil microorganisms and plant growth. *Adv. Agron.* **1**, 241-288.
- CLEYET-MAREL J. C. et CROZAT Y. 1982. Etude écologique en immunofluorescence de *Rhizobium japonicum* dans le sol et la rhizosphère. *Agronomie.* **2**, (3), 243-248.
- CLEYET-MAREL. 1987. Dynamique des populations de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* dans le sol et la rhizosphère. Thèse d'état, Lyon. 239 p.
- CROZAT Y. and CLEYET-MAREL J.C. 1984. Problèmes méthodologiques posés par l'extraction et la récupération des bactéries telluriques pour leur quantification par immunofluorescence. *Agronomie*, **4**, (7) 603-610.
- CURL, E.A., and TRUELOVE, B., 1986. The rhizosphere. Springer-Verlag, Berlin.
- DANSO, S.K.A., KEYA, S.O., and ALEXANDER, M., 1975. Protozoa and the decline of *Rhizobium* populations added to soil. *Can. J. Microbiol.* **21**, 884-895.
- DARASSE A. 1989. Application de la méthode d'amplification enzymatique *in vitro* à la détection d'*Erwinia* pectinolytiques. DEA de Phytopathologie, Universités de Paris VI, IX.
- DART, P.J., 1986. Nitrogen fixation associated with non-legumes in agriculture. *Plant and Soil* **90**, 303-334.
- DAVIDSON, J., 1988. Plant beneficial bacteria. *Biotechnology*, **6**, 282-286.
- DAVIES S.N. 1951. The serology of *Bacillus polymyxa*. *J. Gen. Microbiol.* **5**, 807-816.

- DE-POLLI H., BOHLOOL B.B. and DÖBEREINER J. 1980. Serological differentiation of *Azospirillum* species belonging to different host-plant specificity groups. Arch. Microbiol. **126**, 217-222.
- DORNER, W., 1924. Observation on the behaviour of the spores and vegetative forms of *Bacillus amylobacter* AM et Bredemann by detection and pure culture investigations. Land. Jb Schweiz **38**, 175-202.
- ELEGBA, M.S., and RENNIE, R.J., 1984. Effect of different inoculant adhesive agents on rhizobial survival, nodulation, and nitrogenase (acetylene-reducing) activity of soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). Can. J. Soil Sci. **64**, 631-636.
- ELKAN, G.H., 1962. Comparaison of rhizosphere microorganisms of genetically related nodulating and non-nodulating soybean lines. Can. J. Microbiol. **8**, 79-87.
- ENGVALL E. and P. PERLMAN. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled antiimmunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunol. **109**, 129-135.
- FALLIK, E., OKON, Y., and FISCHER, M., 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation : effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing inoculation. Soil Biol. Biochem. **20**, 45-49.
- FAULL, J.L., and CAMPBELL, R., 1979. Ultrastructure of the interaction between the take-all fungus and antagonistic bacteria. Can. J. Bot., **57**: 1800-1808.
- FELLER C., FRANCOIS C., VILLEMIN G., PORTAL J.M., TOUTAIN F., et MOREL J.L. 1991. Nature des matières organiques associées aux fractions argileuses d'un sol ferrallitique. C. R. Acad. Sci. Paris, **t.312, Série II**, 1491-1497.
- FOSTER, R.C., 1981. The ultrastructure and histochemistry of the rhizosphere. New Phytol. **89**, 263-273.
- FUHRMANN J. and A. G. WOLLUM II. 1985. Simplified enzyme-linked immunosorbent assay for routine identification of *Rhizobium japonicum* antigens. Appl. Environ. Microbiol. **49**, 1010-1013.

- GAMARD P. 1991. Etude de populations d'*Azospirillum* dans la rhizosphère. Caractérisation sérologique et activité dénitrifiante. Thèse, Lyon. 173 pp.
- GILMOUR, C.M., ALLEN, O.N., and TRUOG, E., 1948. Soil aggregation as influenced by the growth of mold species, kind of soil, and organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. Proceed.*, **13**: 292-296.
- GOUZOU L. 1988. Inoculation d'un blé d'hiver (cv Arminda) par *Bacillus polymyxa* CF 43 : dynamique de la population de *B. polymyxa* dans la rhizosphère. 37 p. DEA, ENSAIA-INPL Nancy.
- GRAY T. R. G. 1969. The identification of soil bacteria, p. 73-82. In J. G. Sheals (ed.), *The soil ecosystem*. Publication no. 8. The Systematics Assoc., London.
- GREAVES, M.P., and DARBYSHIRE, J.F., 1972. The ultrastructure of the mucilaginous layer on plant roots. *Soil. Biol. Biochem.*, **4**, 443-449.
- GUCKERT, A., BREICH, H., and REISINGER, O., 1975. Interface sol-racine. I: Etude au microscope électronique des relations mucigel-argile-microorganismes. *Soil. Biol. Biochem.*, **7**: 241-250.
- HARRIS, R.F., CHESTERS, G., ALLEN, O.N., and ATTOE, O.J., 1964. Mechanisms involved in soil aggregate stabilization by fungi and bacteria. *Soil Sci. Soc. Am. Proceed.*, **28**: 529-532.
- HATTORI T. 1988. Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. *Rep. Inst. Agr. Res. Tohoku Univ.* **37**, 23-36.
- HEULIN T., BERGE O., HEBBAR P., GOUZOU L. and BALANDREAU J. 1991. *Bacillus polymyxa* and *Rahnella aquatilis*, the dominant N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with wheat roots in french soils. soumis à *Biol. Fertil. Soils*.
- HEYNEN, C.E., VAN ELSAS, J.D., KUIKMAN, P.J., and VAN VEEN, J.A., 1988. Dynamics of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil; the effect of bentonite clay on predation by protozoa. *Soil Biol. Biochem.* **20** (4), 483-488.
- HIBI T. and SAITO Y. 1985. A dot immunobinding assay for the detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. *J. Gen. Virol.* **66**, 1191-1194.

- HILTNER, L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. Arb. Dstch Landwirt. Ges. 98, 59-78.
- HINO, S., and WILSON, P.W., 1958. Nitrogen fixation by a facultative *Bacillus*. J. Bacteriol. 75, 403-408.
- HOLBEN W.E., JANSSON J.K., CHELM B.K. and TIEDJE J.M. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacteria community. Appl. Env. Microbiol. 54, 703-711.
- HOLL, F.B., 1983. Plant genetics : manipulation of the host. Can. J. Microbiol. 29, 945-953.
- HOLL, F.B., CHANWAY, C.P., TURKINGTON, R., and RADLEY, R.A., 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.
- HOPKINS D.W., MACNAUGHTON S.J., and O'DONNELL A.G. 1991. A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil. Soil Biol. Biochem. 23, 217-225.
- HORNBY, D., and ULLSTRUP, A.J., 1967. Fungal populations associated with maize roots. Composition and comparaison of mycofloras from genotypes differing in root rot resistance. Phytopathology 57, 869-875.
- HOWIE, W.J., COOK, R.J., and WELLER, D.M., 1987. Effects of soil matric potential and cell mobility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. Phytopathology, 77, 286-292.
- HOZORE, E., and ALEXANDER, M., 1991. Bacterial characteristics important to rhizosphere competence. Soil Biol. Biochem. 23 (8), 717-723.
- JAGNOW, G., 1987. Inoculation of cereal crops and forage grasses with nitrogen-fixing rhizosphere bacteria : possible causes of success and failure with regard to yield response - a review. Z. Pflanzenernähr. Bodenk., 150, 361-368.

- JAIN, D.K., and PATRIQUIN, D.G., 1985. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.* **31**, 206-210.
- JENSEN, V., 1963. Studies on the microflora of Danish beech forest soils. 3. Properties and composition of the bacterial flora. *Zentbl. Bakt. Abt.* **116**, 593-611.
- JSELMUIDEN O. E., HERBRINK P., MEDDENS M. J. M., TANK B., STOLZ E., VAN EIJK R. V. W. J. 1989. Optimizing the solid-phase immunofiltration assay: A rapid alternative to immunoassays. *Immunol. Methods.* **119**, 35-43.
- JUHNKE, M.E., MATHRE, D.E., and SANDS, D.C., 1987. Identification and characterisation of rhizosphere-competent bacteria of wheat. *Appl. Env. Microbiol.* **53** (12), 2793-2799.
- KAPULNIK, Y., GAFNY, R., and OKON, Y., 1985. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic systems. *Can. J. Bot.* **63**, 627-631.
- KAPULNIK, Y., SARIG, S., NUR, I., and OKON, Y., 1983. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field grown wheat. *Can. J. Microbiol.* **29**, 895-915.
- KAPULNIK, Y., SARIG, S., NUR, I., OKON, Y., and HENIS, Y., 1982. The effect of *Azospirillum* inoculation on growth and yield of corn. *Israel J. Bot.*, **31**, 247-255.
- KAPULNIK, Y., KIGEL, J., OKON, Y., NUR, I., and HENIS, Y., 1981. Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N content of wheat, sorghum and panicum. *Plant and Soil* **61**, 65-70.
- KATZNELSON, H., and LOCHHEAD, A.G., 1944. Studies with *Bacillus polymyxa*. III. Nutritional requirements. *Can. J. Research.* **22** (6), 273-279.
- KILBERTUS G. 1980. Etude des microhabitats contenus dans les agrégats du sol : leur relation avec la biomasse bactérienne et la taille des procaryotes présents. *Rev. Ecol. Biol. Sol* **17**, 543 - 557.
- KINGSLEY M.T. and BOHLOOL B.B. 1981. Release of *Rhizobium* spp. from tropical soils and recovery for immunofluorescence enumeration. *Appl. Env. Microbiol.* **42**, 241-248.

- KISHINEVSKY B. et BAR-JOSEPH M. 1978. *Rhizobium* strain identification in *Arachis hypogae* nodules by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Can. J. Microbiol.* **24**, 1537-1543.
- KLOEPPER, J.W., LIFSHITZ, R., and ZABLOTOWICZ, R.M., 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnol.* **7**, 39-44.
- KOLB, W., and MARTIN, P., 1988. Influence of nitrogen on the number of N<sub>2</sub>-fixing and total bacteria in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, **20**, 221-225.
- KUCEY, R.M., 1988. Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative nitrogen-fixing bacteria measured under field conditions. *Can. J. Microbiol.* **34**, 735-739.
- KUNDU, B.S., and GAUR, A.C., 1980. Establishment of nitrogen-fixing and phosphate solubilizing bacteria in the rhizosphere and their effects on yield and nutrient uptake of a wheat crop. *Plant and Soil* **57**, 223-230.
- LADHA J.K., BARRAQUIO W.L. and WATANABE I. 1982. Immunological techniques to identify *Azospirillum* associated with wetland rice. *Can. J. Microbiol.* **28**, 478-485.
- LARSON, R.I., and NEAL, J.L., 1978. selective colonization of the rhizosphere of wheat by nitrogen-fixing bacteria. In: Granhall U. (ed.) *Environmental role of blue-green algae and asymbiotic bacteria*. *Ecol. Bull. (Stockholm)* **26**, 331-342.
- LETHBRIDGE, G., DAVIDSON, M.S., and 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. and BASHAN Y. 1990. Avidin-biotin complex incorporation into Enzyme-linked immunosorbent assay (ABELISA) for improving the detection of *Azospirillum brasilense* Cd. *Current Microbiology.* **20**, 91-94.
- LEVANONY H., Y. BASHAN and Z. E. KAHANA. 1987. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd. in cereal roots. *Appl. Env. Microbiol.* **53**, 358-364.

- LIANG, L.W., SINCLAIR, J.L., MALLORY, L.M., and ALEXANDER, M., 1982. Fate in model ecosystems of microbial species of potential use in genetic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **44** : 708-714.
- LILJEROTH, E., VAN VEEN, J.A., and MILLER, H.J., 1990. Assimilate translocation to the rhizosphere of two wheat lines and subsequent utilization by rhizosphere microorganisms at two soil nitrogen concentrations. *Soil Biol. Biochem.* **22**, 1015-1021.
- LIN, W., OKON, Y., and HARDY, R.W.F., 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1775-1779.
- 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.
- LINDBERG, T., GRANHALL, U., and TOMENIUS, K., 1985. Infectivity and acetylene reduction of diazotrophic rhizosphere bacteria in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under gnotobiotic conditions. *Biol. Fert. Soils* **1**, 123-129.
- LYNCH, J.M., 1981. Promotion and inhibition of soils aggregate stabilization by microorganisms. *J. Gen. Microbiol.*, **126**: 371-375.
- LYNCH, J.M., 1984. Interactions between biological processes, cultivation and soil structure. *Plant and Soil*, **76**: 307-318.
- LYNCH, J.M., 1990. Beneficial interactions between micro-organisms and roots. *Biotech. Adv.* **8**, 335-346.
- MARTIN, J.P., 1971. Decomposition and binding action of polysaccharides in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **3**: 33-41.
- MAVINGUI P., BERGE O. and HEULIN T. 1990. Immunotrapping of *Bacillus polymyxa* in soil and in the rhizosphere of wheat. *Symbiosis*. **9**, 215-221.
- MAVINGUI, P., LAGUERRE, G., BERGE, O., and HEULIN, T., 1991. Diversity of *Bacillus polymyxa* associated with the wheat rhizosphere: a populational approach. *Soumis à Appl. Env. Microbiol.*

- MAZURAK, A.P., 1950. Effect of gaseous phase on water-stable synthetic aggregates. *Soil Sci.*, **69**: 135-148.
- MAZZOLA, M, and COOK, R.J., 1991. Effects of fungal root pathogens on the population dynamics of biocontrol strains of fluorescent pseudomonads in the wheat rhizosphere. *Appl. Env. Microbiol.* **57** (8), 2171-2178.
- MERCKX, R., DIJKSTRA, A., DEN HARTOG, A., and VAN VEEN, J.A., 1987. Production of root-derived material and associated microbial growth in soil at different nutrient levels. *Biol. Fertil. Soils*, **5**, 126-132.
- METTING, B., 1986. Population dynamics of *Chlamydomonas sajabo* and its influence on soil aggregate stabilization in the field. *Appl. Env. Microbiol.*, **51**: 1161-1164.
- MICHIELS, K., VANDERLEYDEN, J., and VAN GOOL, A., 1989. *Azospirillum*-plant root associations : A review. *Biol. Fertil. Soils* **8**, 356-368.
- MILLER, H.J., HENKEN, G. and VAN VEEN, J.A., 1989. Variation and composition of bacterial populations in the rhizosphere of maize, wheat, and grass cultivars. *Can. J. Microbiol.* **35**, 656-660.
- MILLER, R.M., and JASTROW, J.D., 1990. Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biol. Biochem.*, **22**: 579-584.
- MILLET, E., and FELDMAN, M., 1984. Yield response of a common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilisation. *Plant and Soil* **80**, 255-259.
- MISHUSTIN, E.N., 1970. The importance of non-symbiotic nitrogen-fixing microorganisms in agriculture. *Plant and Soil* **32**, 545-554.
- MOLOPE, M.B., GRIEVE, I.C., and PAGE, E.R. 1987. Contributions by fungi and bacteria to aggregate stability of cultivated soils. *J. Soil Sci.*, **38**: 71-77.

- MORLEY S. J. and D. G. JONES. 1980. A note on a highly sensitive modified ELISA technique for *rhizobium* strain identification. J. Appl. Bacteriol. 49, 103-109.
- NAMBIAR P. T. C. et ANJALIAH V. 1985. Enumeration of *rhizobia* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Appl. Bacteriol. 58, 187-193.
- NEAL, J.L. Jr., LARSON, R.I., and ATKINSON, T.G., 1973. Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. Plant and Soil 39, 209-212.
- NEAL, J.L., and LARSON, R.I., 1976. Acetylene reduction by bacteria isolated from the rhizosphere of wheat. Soil Biol. Biochem. 8, 151-155.
- NERSON, H., EDELSTEIN, M., and PINTHUS, M.J., 1990. Effects of N and P nutrition on spike development in spring wheat. Plant and Soil 124, 33-37.
- NEYRA, C.A., and DOBEREINER, J., 1977. Nitrogen fixation in grasses. Advances in Agronomy 29, 1-38.
- NORTH, P.F., 1976. Towards an absolute measurement of soil structural stability using ultrasound. J. Soil Sci., 27: 451-459.
- O'HARA, G.W., DAVEY, M.R., and LUCAS, J.A., 1981. Effect of inoculation of *Zea mays* with *Azospirillum brasilense* strains under temperate conditions. Can. J. Microbiol. 27, 871-877.
- PICARD C., PONSONNET C., NAZARET S., NORMAND P., SIMONET P. et NESME X. 1991. Application de l'amplification enzymatique de l'ADN à la détection de microorganismes dans le sol. Colloque INRA/ACTA/FNGPC du 6 février 1991.
- POSTMA, J., and VAN VEEN, J.A., 1990. Habitable pore space and survival of *rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil. Microb. Ecol. 19, 149-161.
- RAI, S.N., and CAUR, A.C., 1982. Nitrogen fixation by *Azospirillum* spp and effect of *Azospirillum lipoferum* on the yield and N-uptake of wheat crop. Plant and Soil 69, 233-238.
- RAJU, P.N., EVANS, H.J., and SEIDLER, R.J., 1972. An asymbiotic nitrogen-fixing bacterium from the root environment of corn. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3474-3478.

- RAMSAY A.J. 1984. Extraction of bacteria from soil: efficiency of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography. *Soil Biol. Biochem.* **5**, 475-481.
- REID, J.B., and GOSS, M.J., 1981. Effect of living roots of different plant species on the aggregate stability of two arable soils. *J. Soil. Sci.*, **32**: 521-541.
- RENNIE , R.J., and LARSON, R.I., 1979. Dinitrogen fixation associated with disomic chromosome substitution lines of spring wheat. *Can. J. Bot.* **58**, 21-24.
- RENNIE, R.J., 1980. Dinitrogen-fixing bacteria: computer-assisted identification of soil isolates. *Can. J. Microbiol.* **26**, 1275-1283.
- RENNIE, R.J., and THOMAS, J.B., 1987. <sup>15</sup>N-determined effect of inoculation with N<sub>2</sub> fixing bacteria on nitrogen assimilation in Western Canadian wheats. *Plant and Soil* **100**, 213-223.
- REYES V.G. and SCHMIDT E.L. 1979. Population densities of *Rhizobium japonicum* strain 123 estimated directly in soil and rhizospheres. *Appl. Env. Microbiol.* **37**, 854-858.
- REYNDERS, L., and VLASSAK, K., 1982. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. *Plant and Soil* **66**, 217-223.
- RICHARDSON, A.E., HENDERSON, A.P., JAMES, G.S., and SIMPSON, R.J., 1988. Consequences of soil acidity and the effect of lime on the nodulation of *Trifolium subterraneum* L. growing in an acid soil. *Soil Biol. Biochem.* **20**, 439-445.
- ROBERSON, E.B., SARIG, S., and FIRESTONE, M.K., 1991. Cover crop management of polysaccharide-mediated aggregation in an Orchard soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **55**: 734-739.
- ROUILLER, J., BURTIN, G., and SOUCHIER, B., 1972. La dispersion des sols dans l'analyse granulométrique. Methode utilisant les résines échangeuses d'ions. *Bulletin de l'ENSAIA Nancy*, **14**: 193-205.
- ROVIRA, A.D., 1963. Microbial inoculation of plants. I. Establishment of free-living nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere and their effects on maize, tomato, and wheat. *Plant and Soil*, **19**, 304-314.

- ROVIRA, A.D., 1965. Interactions between plant roots and soil micro-organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **19**, 241-266.
- SAIKI R.K., GELFAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. and EHRLICH H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**, 487-491.
- SANDERS, F.E., TINKER, P.B., BLACK, R.L.B., and PALMERLEY, S.M., 1977. The development of endomycorrhizal root systems. I- Spread of infection and growth promoting effects with four species of vesicular-arbuscular endophyte. *New Phytol.*, **78**: 257-268.
- SARIG, S., KAPULNIK, Y., NUR, I., and OKON, Y., 1984. Response of non-irrigated *Sorghum bicolor* to *Azospirillum* inoculation. *Exp. Agric.* **20**, 59-66.
- SATTAR, M.A., and GAUR, A.C., 1987. Production of auxins and gibberellins by phosphate-dissolving microorganisms. *Zentralbl. Mikrobiol.* **142**, 393-395.
- SCHER, F.M., ZIEGLE, J.S., and KLOEPPER, J.W., 1984. A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria on maize. *Can. J. Microbiol.* **30**, 151-157.
- SCHMIDT E. L. 1974. Quantitative autecological study of microorganisms in soil by immunofluorescence. *Soil Sci.* **118**, 141-149.
- SELDIN, L., VAN ELSAS, J.D., and PENIDO, E.G.C., 1983. *Bacillus* nitrogen fixers from Brazilian soils. *Plant and Soil* **70**, 243-255.
- SEONG, K.Y., HOFTE, M., BOELEN, J., and VERSTRAETE, W., 1991. Growth, survival, and root colonization of plant growth beneficial *Pseudomonas fluorescens* Anp15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 at different temperatures. *Soil. Biol. Biochem.* **23**, 423-428.
- SMITH, R.L., SCHANK, S.C., MILAM, J.R., and BALTENSBERGER, A.A., 1984. Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the N-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1331-1336.

- SMITH, R.L., SCHANK, S.C., MILAM, J.R., and LITTELI, R.C. 1982. Statewide search for highly active associative N<sub>2</sub>-fixation systems. *Soil Crop Sci. Soc. Fla. Proc.* **41**, 122-126.
- SPARLING, G.P., and CHESHIRE, M.V., 1985. Effect of periodate oxidation on the polysaccharide content and microaggregate stability of rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Plant and Soil*, **88**: 113-122.
- STEINBERG, C., FAURIE, G., ZEGERMAN, M., and PAVE, A., 1987. Régulation par les Protozoaires d'une population bactérienne introduite dans le sol. Modélisation mathématique de la relation prédateur-proie. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, **24** (1), 49-62.
- STEVENS W. A., TSIANTOS J. 1979. The use of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Corynebacterium michiganense* in tomatoes. *Microbios lett.* **10**, 29-32.
- STEVENSON I.L. 1958. The effect of sonic vibration on the bacterial plate count of soil. *Plant and Soil*. **10**, 1-8
- THOMAS, R.S., DAKESSIAN, S., AMES, R.N., BROWN, M.S., and BERTHLENFALVAY, G.J., 1986. Aggregation of a silty clay loam soil by mycorrhizal onion roots. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **50**: 1494-1499.
- 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.
- TIEN, T.M., GASKINS, M.H., and HUBBEL, D.H., 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 1016-1024.
- TISDALL, J.M., and OADES, J.M., 1979. Stabilization of soil aggregates by the root systems of rye-grass. *Aust. J. Soil Research.*, **17**: 429-441.
- TISDALL, J.M., and OADES, J.M., 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.*, **33**: 141-163.

- TIWARI, V.N., LEHRI, L.K., and PATHAK, A.N., 1989. Effect of inoculating crops with phospho-microbes. *Expl. Agric.* **25**, 47-50.
- TORSVIK V.L. and GOKSOYR J. 1978. Determination of bacterial DNA in soil. *Soil. Biol. Biochem.* **10**, 7-12.
- TRI, B.H., 1968. Dynamique de la granulation du sol sous prairie. *Ann. Agron.*, **19**: 415-439.
- TURNER, S.M., NEWMAN, E.I., and CAMPBELL, R., 1985. Microbial population of ryegrass root surfaces : Influence of nitrogen and phosphorus supply. *Soil Biol. Biochem.*, **17**, 711-715.
- VAN ELSAS, J.D., and HEIJNEN, C.E., 1990. Methods for the introduction of bacteria into soil : a review. *Biol. Fertil. Soils.* **10**, 127-133.
- VAN ELSAS, J.D., DIJKSTRA, A.F.D., GOVAERT, J.M., and VAN VEEN, J.A., 1989. Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two fields soils of different texture in field microplots. *FEMS Microbiol. Lett.* **38**, 151-160.
- WAREMBOURG, F.R., DREESSEN, R., VLASSAK, K., and LAFONT, F., 1987. Peculiar effect of *Azospirillum* inoculation on growth and nitrogen balance of winter wheat (*Triticum aestivum*). *Biol. Fertil. Soils* **4**, 55-59.
- WOLF J. and BARKER A.N. 1968. The genus *Bacillus* : aids to the identification of its species. *Identification Methods for Microbiologists - part.B.* Ed. Gibbs B.M. et D.A. Shapton. Academic Press. London. pp 93-109.
- WOLLUM II A.G. and MILLER R.H. 1980. Density centrifugation method for recovering *Rhizobium* spp. from soil for fluorescent-antibody studies. *Appl. Env. Microbiol.* **39**, 466-469.
- WU, L., VOMOCIL, J.A., and CHILDS, S.W., 1990. Pore size, particle size, aggregate size, and water retention. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **54**: 952-956.
- YAHALOM, E., KAPULNIK, Y., and OKON, Y., 1984. Response of *Serratia italica* to inoculation with *Azospirillum brasilense* as compared to *Azotobacter chroococcum*. *Plant and Soil* **82**, 77-85.

- YOLKEN R.H., LEISTER F.J., WHITCOMB L.S. and SANTOSHAM M. 1983. Enzyme immunoassays for the detection of bacterial antigens utilizing biotin-labeled antibody and peroxidase biotin-avidin complex. *J. Immun. Methods*. **56**, 319-327.
- ZAGULA K. R., BARBARA D. J., FULBRIGHT D. W. and LISTER R. M. 1990. Evaluation of three ELISA methods as alternatives to ISEM for detection of the wheat spindle streak mosaic strain of wheat yellow mosaic virus. *Plant Dis*. **74**, 974-978.
- ZAMBRE, M.A., KONDE, B.K., and SONAR, K.R., 1984. Effect of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* inoculation under graded levels of nitrogen on growth and yield of wheat. *Plant and Soil* **79**, 61-67.
- ZIMMER, W., ROEBEN, K., and H. BOTHE, 1988. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. *Planta* **176**, 333-342.

# *ANNEXES*

## ANNEXE 1

Composition des milieux utilisés pour cultiver la souche *B. polymyxa* CF43.

• *Composition du milieu liquide Luria Bertani modifié (LB) en g/l :*

Tryptone	10
Extraits de levures	5
NaCl	5

Autoclaver à 120°C pendant 20 mn.

• *Composition du milieu à base d'amidon (g/l):*

Amidon soluble	10
CaCO <sub>3</sub>	5
Extraits de levure	1

Autoclaver à 110°C pendant 30 mn.

• *Composition du bouillon nutritif (NB) en g/l :*

Tryptone	10
Extraits de viande	5
NaCl	5

Autoclaver à 120°C pendant 20 mn.

Milieu prêt à l'emploi (marque Biokar).

• *Composition du milieu solide au Tryptone-Soja (TSA) en g/l :*

Tryptone	17
Soytone	3
Glucose	2,5
NaCl	5
Phosphate dipotassique	2,5

Autoclaver à 120 °C pendant 20 mn.

Milieu prêt à l'emploi (marque Difco).

• *Composition du milieu RCV modifié :*

• La solution "Eléments" en mg/l :

Zn SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	430
Mn SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1300
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	750
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2800
Cu SO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	22,5
Co SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	70
Eau distillée (qsp)	1000 ml

• La solution "Supersalts" pour 1 litre :

EDTA (titriplex II)	400 mg
Mg SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2000 mg
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	2000 mg
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	440 mg
Solution "Eléments"	20 ml
Eau distillée (qsp)	1000 ml

- Tampon phosphate :

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	40 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	60 g
Eau distillée (qsp)	1000 ml

- Composition finale du milieu :

Solution "Supersalts"	50 ml
Solution de tampon phosphate	15 ml
Eau distillée (qsp)	1000 ml

## ANNEXE 2.

## Composition des tampons utilisés en E.L.I.S.A.

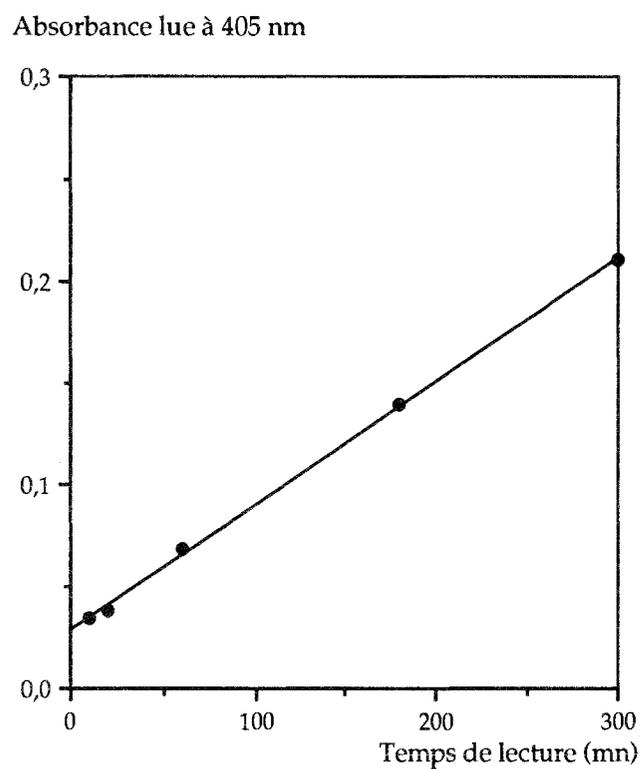
• *Tampon phosphate pH 7,2 (PBS), en g/l:*

NaCl	7,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,8
Eau distillée (qsp)	1000ml

• *Tampon Tris pH 7,6 (TBS) :*

NaCl	8 g
Tris base	0,604 g
HCl (1M)	3,8 ml
Eau distillée (qsp)	1000 ml

## ANNEXE 3.



Evolution de l'absorbance au cours du temps en ACP ELISA. Un test de régression simple a été effectué sur le nuage de points obtenu ( $r^2 = 1.00$ ). Le test ELISA a été effectué à partir d'une culture pure de *B. polymyxa* CF 43 (GOUZOU, 1988).

## ANNEXE 4.

Réactions croisées de l'antisérum anti CF43 avec des souches d'origines diverses, en ACP ELISA (BERGE, 1988).

Dilutions du sérum		Absorbance lue à 405 nm après 20 mn d'incubation.	
		1:1000	1:10000
Nombre de bactéries par ml x 10 <sup>6</sup>			
<i>Souches types de B. polymyxa</i>			
ATCC 10401	2,0	0,27	1,64
ATCC 842	0,4	0,34	1,65
ATCC 21551	0,3	0,29	1,70
<i>Souches de B. circulans isolées de la rhizosphère du maïs.</i>			
RS7	2,5	0,14	0,68
RS10	1,6	0,06	0,31
RS11	2,5	-	-
RS18	0,2	-	0,12
RS19	0,8	-	0,15
RS20	1,6	-	0,02
TRO4	2,5	-	0,085
TRO9	0,4	-	0,07
TRO11	0,4	-	-

Absorbance lue à 405 nm après 20 mn d'incubation.			
Dilutions du sérum		1:1000	1:10000
Nombre de bactéries par ml x 10 <sup>6</sup>			
<i>Souches de B. polymyxa isolées de la rhizosphère du blé.</i>			
CF36	10,0	1,24	1,75
CF38	16,0	1,08	1,78
CF43	13,0	1,88	1,78
CF44	10,0	1,48	1,98
CH5	5,0	1,21	1,72
CH9	7,9	1,45	1,74
CH29	1,6	1,81	1,88
CH41	10	1,41	1,71
BG1	1,6	0,13	-
BG7	1,6	0,35	1,73
BG12	1,0	-	0,12
BG13	0,6	1,55	1,84
<i>B. polymyxa isolés dans la rhizosphère du blé</i>			
<i>d'un sol canadien</i>			
C-11-25	0,1	-	0,1
<i>d'un sol de Suède</i>			
64	1,0	0,29	1,41

La concentration des suspensions bactériennes a été déterminée par comptage sur boîte. Les valeurs nulles d'absorbances sont indiquées par un tiret.

## ANNEXE 5.

## Principales caractéristiques des sols utilisés dans ce travail.

- **AUXONNE (Côte-D'or)** : Sol sableux à hydromorphie de nappe des basses terrasses de la Saône (CHAUSSOD et al., 1986). Selon la classification F.A.O. il s'agit d'un Cambic arenosol.

Granulométrie (%)					CaCO <sub>3</sub> total (%)	pH eau	C.E.C.
SG	SF	LG	LF	A			(mEq/100 g)
61,7	16,9	2,6	8,4	10,4	0	7,6	8,3

- **DIEULOUARD (Meurthe-et-Moselle)** : Sol brun sur terrasses alluviales anciennes (Eutric Cambisol).

Prof.	Hor.	Granulométrie (%)					pH eau	pH KCl	C.E.C.
(cm)		SG	SF	LG	LF	A			(mEq/100g)
0-30	Ah	15,3	21,5	25,8	22,3	11,6	5,6	5,3	7,45
30-70	AB	11,0	16,0	23,8	22,1	23,2	6,9	6,3	11,1
70-120	B-BC	6,0	8,0	22,6	25,7	34,3	7,0	6,2	16,8

La teneur en matière organique de l'horizon supérieur (0-30 cm) est égale à 1,8 %.

- **OGY (Moselle)** : Sol limono-argileux.

Granulométrie					CaCO <sub>3</sub> (%)	pH eau	C.E.C.	M.O.
SG	SF	LG	LF	A			(mEq/100g)	(%)
3,4	2,9	34	37,5	20	0	5,7	11,3	1,9

- **PADOUX (Vosges)** : L'échantillon que nous avons utilisé provenait de l'horizon C (profondeur > 60 cm) de ce Pélosol vertique.

Granulométrie (%)					CaCO <sub>3</sub> (%)	pH eau	C.E.C.
SG	SF	LG	LG	A			(mEq/100g)
3,5	3,8	8,1	23,5	61,1	traces	7,2	36,02

- **SEXÉY-les-BOIS (Meurthe-et-Moselle)** : Sol argileux (Calcaric cambisol).

Granulométrie					CaCO <sub>3</sub> (%)	pH eau	M. O
SG	SF	LG	LF	A			(%)
13,3	4,5	8,9	15,5	53,6	16,1	7,9	3,6

*TABLE DES MATIERES.*

## TABLE DES MATIERES.

INTRODUCTION GENERALE

4

### CHAPITRE 1 : QUANTIFICATION DE LA POPULATION DE *BACILLUS POLYMYXA* A L'AIDE DE METHODES IMMUNOENZYMATIQUES.

1. Adaptation de méthodes immuno-enzymatiques à la quantification de *Bacillus polymyxa* CF43, en culture pure.

1.1. INTRODUCTION	10
1.2. MATERIEL ET METHODES	14
• <i>La souche Bacillus polymyxa</i>	14
• <i>Autres souches utilisées.</i>	14
• <i>Milieux de culture.</i>	14
• <i>Récupération des bactéries.</i>	14
• <i>Numération des bactéries.</i>	16
• <i>Production de l'antisérum.</i>	16
• <i>Matériel et produits utilisés en ELISA.</i>	18
• <i>Conduite des réactions immuno-enzymatiques.</i>	18
• <i>Composition des puits témoins.</i>	20
• <i>Plan d'occupation des plaques.</i>	20
1.3. RESULTATS	22
• <i>Sensibilité des tests immuno-enzymatiques pour la détection de la suspension bactérienne.</i>	22
• <i>Spécificité du sérum employé.</i>	24
• <i>Etude des culots et des filtrats bactériens.</i>	29
• <i>Détection des formes végétatives et sporulées.</i>	29
• <i>Détection de B. polymyxa CF43 en mélange.</i>	29

1.4. DISCUSSION	33
• <i>Effet de la concentration en antigènes.</i>	33
• <i>Les techniques ELISA sont-elles parfaitement adaptées à la numération de la bactérie en culture pure ?</i>	35
• <i>Une sensibilité fortement dépendante des paramètres expérimentaux</i>	35
• <i>Une bonne spécificité du sérum polyclonal.</i>	36
• <i>Les perspectives offertes par les techniques ELISA.</i>	38
2. Dispersion et floculation des sols pour la détection de <i>Bacillus polymyxa</i> par ACP ELISA.	
2.1. INTRODUCTION	39
2.2. MATERIEL ET METHODES	40
• <i>Les types de sols.</i>	40
• <i>Dispersion des sols.</i>	40
• <i>Comparaison des différents modes de floculation des sols.</i>	41
• <i>Détection de Bacillus polymyxa dans les suspensions.</i>	42
• <i>Récupération de bactéries récemment inoculées.</i>	42
2.3. RESULTATS	43
• <i>Effet des particules de sol sur les résultats obtenus par ACP ELISA</i>	43
• <i>Récupération de bactéries ajoutées aux sols : effets de traitements dispersants et floculants.</i>	43
• <i>Optimisation des conditions d'extraction des bactéries du sol.</i>	48
2.4. DISCUSSION	50
• <i>Dispersion du sol.</i>	50
• <i>Séparation des bactéries et des particules de sol.</i>	51
• <i>Le taux de récupération est une caractéristique du sol et de l'espèce bactérienne considérée.</i>	52
3. Conclusion.	54

**CHAPITRE 2 : SUIVI DE LA POPULATION DE BACILLUS POLYMYXA DANS LA RHIZOSPHERE  
DU BLE APRES INOCULATION : ETUDE DE L'INTERACTION AVEC LE SOL.**

1. Devenir de *Bacillus polymyxa* CF 43 dans la rhizosphère  
du blé après inoculation.

1.1 INTRODUCTION	56
1.2.MATERIEL ET METHODES	58
• <i>Les types de sols.</i>	58
• <i>Variété de blé.</i>	58
• <i>Préparation de l'inoculum.</i>	58
• <i>Inoculation des plantes.</i>	59
• <i>Conditions de croissance des plantes.</i>	60
• <i>Echantillonnage des rhizosphères.</i>	61
• <i>Détermination du niveau de la population de Bacillus polymyxa.</i>	62
• <i>Numération de la microflore totale</i>	65
• <i>Traitements statistiques.</i>	65
1.3. RESULTATS	65
• <i>Stabilité de l'inoculum après enrobage.</i>	65
• <i>Approche quantitative de la colonisation.</i>	68
• <i>Etudes de rhizosphères prélevées au champ.</i>	68
• <i>Suivi in vitro de la population de Bacillus polymyxa dans le sol et la rhizosphère : effet de la fertilisation azotée.</i>	70
• <i>Interaction entre la quantité d'inoculum et le type de sol, sur le niveau de Bacillus polymyxa détecté.</i>	75
1.4. DISCUSSION	78
• <i>Méthode d'introduction de la bactérie.</i>	78
• <i>Une colonisation préférentielle du sol adhérent.</i>	79
• <i>Interactions entre le sol et la population de Bacillus polymyxa dans la rhizosphère du blé.</i>	81

2. Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere : preliminary examination. (article).

ABSTRACT	84
2. 1. INTRODUCTION	85
2. 2. MATERIAL AND METHODS	87
• <i>Soil</i>	87
• <i>Bacteria and bacterial inoculum.</i>	87
• <i>Inoculation and obtention of rhizosphere soil.</i>	88
• <i>Aggregate size distribution and water-stability.</i>	89
• <i>Extraction of Bacillus polymyxa from aggregates and wheat roots.</i>	89
• <i>Detection of Bacillus polymyxa : the ELISA procedure.</i>	90
• <i>Statistical analysis.</i>	91
2. 3. RESULTS	92
• <i>Effects of wheat roots on soil structure.</i>	92
• <i>Effect of Bacillus polymyxa inoculation on plant growth and rhizosphere soil structure.</i>	94
• <i>Extraction of Bacillus polymyxa from aggregates and wheat roots.</i>	95
• <i>Chemical characteristics of aggregates.</i>	95
• <i>Aggregate water-stability and particle-size distribution.</i>	99
2. 4. DISCUSSION AND CONCLUSION	99

3. Conclusion 102

**CHAPITRE 3 : CONSEQUENCE DE L'INOCULATION DE BACILLUS POLYMYXA CF 43 SUR LA CROISSANCE DU BLE ET L'ELABORATION DU RENDEMENT.**

1. INTRODUCTION	104
2. MATERIEL ET METHODES.	107
• <i>Sites expérimentaux.</i>	107
• <i>Matériel végétal et inoculation des semences.</i>	107

• <i>Protocoles expérimentaux au champs.</i>	109
• <i>Variables mesurées au champ.</i>	112
• <i>Etude de la germination et de la croissance de jeunes plantules in vitro.</i>	115
• <i>Analyse des résultats.</i>	115
3. RESULTATS	116
• <i>Inoculation et élaboration du rendement.</i>	116
• <i>Inoculation et prélèvement d'azote par la plante.</i>	126
4. DISCUSSION	127
• <i>Effet de la fertilisation azotée sur l'élaboration du rendement.</i>	127
• <i>Effet de l'inoculation sur la jeune plantule.</i>	127
• <i>Les effets de l'inoculation sur l'élaboration du rendement.</i>	128
• <i>Prélèvements d'azote par la plante.</i>	130
• <i>Une association spécifique entre la souche testée et la variété de blé utilisée.</i>	130
5. CONCLUSION	132
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	134
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	140
<b>ANNEXES</b>	
<i>Annexe 1: Composition des milieux utilisés pour cultiver la souche B. polymyxa CF43</i>	159
<i>Annexe 2: Composition des tampons utilisés en ELISA.</i>	162
<i>Annexe 3: Evolution de l'absorbance au cours du temps en ACP ELISA</i>	163
<i>Annexe 4: Réactions croisées de l'antisérum anti CF 43 avec des souches d'origines diverses, en ACP ELISA</i>	164
<i>Annexe 5: Principales caractéristiques des sols utilisés dans ce travail</i>	166

## RESUME

**TITRE :** Devenir d'une population bactérienne inoculée dans la rhizosphère du blé et ses effets sur la plante : cas de *Bacillus polymyxa*.

L'inoculation du blé avec une souche bactérienne fixatrice d'azote (*Bacillus polymyxa* CF43), isolée de sa rhizosphère, a été étudiée. La mise au point de méthodes immuno-enzymatiques (ACP ELISA et AB ELISA) a permis de suivre la colonisation du système racinaire par *Bacillus polymyxa*, en microcosmes au laboratoire et au champ. L'inoculation de la souche CF43 par enrobage des semences de blé conduit à une augmentation significative de la taille de la population de *B. polymyxa* sur le système racinaire séminal de la plante. Pour différents types de sols testés, la survie de la bactérie paraît aussi bonne, voire meilleure, dans le sol adhérent aux racines que sur le rhizoplan.

En pots, l'inoculation a influencé la structuration d'un sol rhizosphérique sablo-limoneux. Au champ, une augmentation du tallage herbacé et du nombre d'épillets par épi ont été observés après inoculation.

**Mots clés :** Agrégation, *Bacillus polymyxa*, blé, colonisation, Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay, inoculation, Rhizosphère.

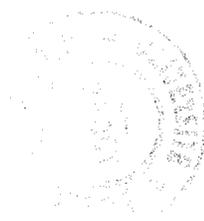
## ABSTRACT

**TITLE :** The dynamic of *Bacillus polymyxa* in the wheat rhizosphere after inoculation and its effects on the plant growth.

Inoculation of wheat with a N<sub>2</sub>-fixing strain (*Bacillus polymyxa* CF 43), isolated from wheat rhizosphere, was studied. Enzyme-linked immunosorbent assays (ACP ELISA and AB ELISA) were developed to measure colonization of the rhizosphere by *Bacillus polymyxa*, in pot experiments and in field conditions. Inoculation of wheat seeds with the strain CF43 induced a significant increase in population density of *Bacillus polymyxa* in the seminal root system. In most of the soils tested, viability of the introduced bacteria was similar, or even higher, in the rhizosphere soil in comparison with the rhizoplane.

In pot experiments, inoculation influenced the structuration of a silt loam rhizosphere soil. In field conditions, increase in the number of tillers and spikelets was observed after inoculation.

**Key words :** *Bacillus polymyxa*, colonization, Enzyme-linked Immuno-Sorbent Assay, rhizosphere, soil aggregation, wheat.



THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Université de Nancy I - UFR-STMP

Année 1992

DISCIPLINE : Microbiologie

Auteur : Laurent GOUZOU

Centre de Pédologie Biologique, C.N.R.S.

B.P. 5, 54501 VANDOEUVRE -LES-NANCY Cedex

FRANCE

## RESUME

**TITRE : Devenir d'une population bactérienne inoculée dans la rhizosphère du blé et ses effets sur la plante : cas de *Bacillus polymyxa*.**

L'inoculation du blé avec une souche bactérienne fixatrice d'azote (*Bacillus polymyxa* CF43), isolée de sa rhizosphère, a été étudiée. La mise au point de méthodes immuno-enzymatiques (ACP ELISA et AB ELISA) a permis de suivre la colonisation du système racinaire par *Bacillus polymyxa*, en microcosmes au laboratoire et au champ. L'inoculation de la souche CF43 par enrobage des semences de blé conduit à une augmentation significative de la taille de la population de *B. polymyxa* sur le système racinaire séminal de la plante. Pour différents types de sols testés, la survie de la bactérie paraît aussi bonne, voire meilleure, dans le sol adhérant aux racines que sur le rhizoplan.

En pots, l'inoculation a influencé la structuration d'un sol rhizosphérique sablo-limoneux. Au champ, une augmentation du tallage herbacé et du nombre d'épillets par épi ont été observés après inoculation.

**Mots clés : Agrégation, *Bacillus polymyxa*, blé, colonisation, Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay, inoculation, Rhizosphère.**