



HAL
open science

Caractérisation de la distribution et du comportement métabolique de la microflore indigène dans un profil de sol

Marie Christine Dictor

► To cite this version:

Marie Christine Dictor. Caractérisation de la distribution et du comportement métabolique de la microflore indigène dans un profil de sol. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1994. Français. NNT : 1994INPL041N . tel-01751278

HAL Id: tel-01751278

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751278v1>

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

96 INPL 0414

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ENSAIA

THESE

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

présentée pour l'obtention du DIPLOME DE DOCTORAT
en Sciences Agronomiques

**CARACTERISATION DE LA DISTRIBUTION ET DU
COMPORTEMENT METABOLIQUE DE LA MICROFLORE
INDIGENE DANS UN PROFIL DE SOL**

par

Marie-Christine DICTOR

Soutenance le 17 mars 1994

devant le jury composé de

- | | | |
|-------------------|--|------------|
| - J.P.E. ANDERSON | Directeur de recherche | Examineur |
| - F. ANDREUX | Professeur à l'Université de Bourgogne | Rapporteur |
| - M. BABUT | Division Qualité Ressources Agence de l'Eau Rhin-Meuse | Examineur |
| - P. FUSI | Professeur à l'Université de Florence | Rapporteur |
| - I. SCHEU | | Examineur |
| - M. SCHI | ENSAIA | Président |
| - G. SOUL | Directeur de recherche INRA | Examineur |



MINISTERE DE L'AGRICULTURE

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ENSAIA

THESE

Version corrigée

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

présentée pour l'obtention du DIPLOME DE DOCTORAT

en Sciences Agronomiques

[M]1994 DICTOR, M.C.

**CARACTERISATION DE LA DISTRIBUTION ET DU
COMPORTEMENT METABOLIQUE DE LA MICROFLORE
INDIGENE DANS UN PROFIL DE SOL**

par

Marie-Christine DICTOR

Soutenance le 17 mars 1994

devant le jury composé de

- J.P.E. ANDERSON	Directeur de recherche	Examineur
- F. ANDREUX	Professeur à l'Université de Bourgogne	Rapporteur
- M. BABUT	Division Qualité Ressources Agence de l'Eau Rhin-Meuse	Examineur
- P. FUSI	Professeur à l'Université de Florence	Rapporteur
- I. SCHEUNERT	Directeur de recherche	Examineur
- M. SCHIAVON	Professeur à l'INPL-ENSAIA	Président
- G. SOULAS	Directeur de recherche INRA	Examineur

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'INRA de Dijon dirigé par J.C. Germon. Il a été financé par la CEE sur le contrat STEP CT90-0027.

Je lui adresse mes remerciements ainsi qu'à P. Fusi et F. Andreux d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je tiens à remercier également J. Scheunert, M. Babut et J.P.E. Anderson d'avoir bien voulu participer à mon jury de thèse et M. Schiavon en tant que directeur de thèse.

Je remercie G. Soulas, en sa qualité de maître de stage, pour sa disponibilité et son aide précieuse lors de ces 3 années de thèse ainsi pour sa délicieuse pâte de coings et ses petits chocolats de fin d'année.

Je remercie Nadine ainsi que M'sieur Lagache pour leur aide et leur bonne humeur lors de ces 4 années passées ensemble.

Je dédie cette thèse à mes parents, à ma soeur Laurence ainsi qu'à mes amis qui m'ont permis par leur soutien moral, d'arriver au terme de ce travail.

SOMMAIRE

PRÉAMBULE	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
- DISTRIBUTION DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL.....	3
1- Principaux types de microorganismes présents dans le sous-sol et importance pondérale.....	3
1-1 MICROORGANISMES EUCARYOTES	3
1-1-1 Protozoaires.....	4.
1-1-2 Champignons.....	5.
1-1-3 Levures	6.
1-1-4 Algues	6.
1-2 MICROORGANISMES PROCARYOTES.....	6
1-2-1 Bactéries	6.
1-2-2 Actinomycètes.....	7.
2- Etat nutritionnel des microorganismes du sous-sol	8
2-1 DÉFINITION DE L'OLIGOTROPHIE	8.
2-2 ADAPTATIONS PHYSIOLOGIQUES DES MICROORGANISMES OLIGOTROPHES	8
3- Origine de la colonisation microbienne du sous-sol.....	11
4- Diversité physiologique des microorganismes du sous-sol.....	12
- ACTIVITÉS MICROBIENNES DANS LE SOUS-SOL.....	15
1- Dégradation de composés organiques naturels.....	15
2- Dégradation des pesticides dans le sous-sol.....	17

2-1 MISE EN ÉVIDENCE DE LA PERSISTENCE DES PESTICIDES	17
2-2 ADAPTATION DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL À LA DÉGRADATION DES COMPOSÉS XÉNOBIOTIQUES.....	19
- INFLUENCE DES CARACTÉRISTIQUES DU MILIEU ENVIRONNANT SUR LA DISTRIBUTION ET L'ACTIVITÉ DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL.....	20
1- Description de l'environnement souterrain.....	20
2- Principaux facteurs de l'environnement.....	21
2-1 INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE	22
2-2 INFLUENCE DE LA PRESSION HYDROSTATIQUE.....	23
2-3 INFLUENCE DE LA TEXTURE DU SOUS-SOL.....	23
2-4 INFLUENCE DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION	24
2-5 INFLUENCE DU PH	26
2-6 INFLUENCE DU CARBONE ORGANIQUE.....	27
2-7 INFLUENCE DES NUTRIMENTS MINÉRAUX	29

PARTIE EXPERIMENTALE

PRESENTATION DU SITE DE CÎTEAUX

- MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	30
1- Installation de la station expérimentale.....	30
2- Collecte et traitement des échantillons de sol.....	31
3- Description pédologique du profil de sol.....	31
4- Analyses physiques.....	31

2-1 MESURE DES FLUCTUATIONS DE LA HAUTEUR DE LA NAPPE PHRÉATIQUE.....	31
2-2 MESURES DE LA TEMPÉRATURE DE L'AIR ET DU SOL	31
2-3 MESURE DE L'OXYGÈNE DU SOL.....	32
2-2-1 Oxygène présent dans l'atmosphère du sol.....	32
2-2-2 Oxygène dissous dans l'eau souterraine.....	34
- RESULTATS	35
1- Caractéristiques physico-chimiques des sols récupérés.....	35
2- Fluctuations de la nappe phréatique.	35
3- Mesures de la température du sol.....	35
4- Mesures de l'oxygène et du gaz carbonique du sol.....	36
- DISCUSSION	37
1- Mesures de températures	37
2- Mesures d'oxygène et de gaz carbonique.....	37

LES SOLS, LES PRODUITS

1- Les sols	40
1-1 PRÉLÈVEMENT DES SOLS ET ANALYSES BIOLOGIQUES.	40
1-2 CONDITIONNEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SOL.....	40
1-3 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DE SOL.	41
2- Les produits utilisés.....	41
2-1 PRODUITS MARQUÉS ET FROIDS.....	41
2-2 PRÉPARATION DES SOLUTIONS DE TRAITEMENT.	42

PREMIERE PARTIE EXPERIMENTALE : METHODES D'ESTIMATION DE LA TAILLE DE LA MICROFLORE

- INTRODUCTION	43
1- Les techniques de dénombrement.....	43
1-1 LE DÉNOMBREMENT PAR EXAMEN MICROSCOPIQUE DIRECT.....	43
1-2 LES DÉNOMBREMENTS SUR MILIEU DE CULTURE.....	44
1-2-1 La technique du Nombre le Plus Probable (NPP).....	44
1-2-2 Le comptage sur boites.	45
2- Les méthodes indirectes.....	46
2-1 LES MÉTHODES BIOCIDALES.....	46
2-1-1 La méthode de Fumigation-Incubation (FI).....	46
2-1-2 La méthode de Fumigation-Extraction (FE).....	48
3- Estimation de la biomasse microbienne par la méthode de Respiration Induite par le Substrat (RIS).....	50
4- Les methodes biochimiques.....	52
- MATERIEL ET MÉTHODES.....	55
1- Dénombrements microbiens sur milieux liquides et gélosés.....	55
2- Estimation de la biomasse microbienne par les méthodes biocidales.....	57
2-1 FUMIGATION-EXTRACTION (FE).....	57
2-2 MARQUAGE "IN SITU" DE LA BIOMASSE DANS LE SOL.....	57
2-3 FUMIGATION-INCUBATION (FI).....	59
3- Estimation de la biomasse microbienne par la méthode de Respiration Induite par le Substrat.....	59

- RESULTATS-DISCUSSION.....	60
1- Dénombrement microbiens sur milieux liquide et gélosés.....	60
1-1 OBSERVATIONS QUALITATIVES PRÉLIMINAIRES.....	60
1-2 DÉNOMBREMENT DE LA MICROFLORE TOTALE.....	61
1-2-1 Comparaison des techniques NPP et étalement sur boîtes.....	61
1-2-2 Comparaison des dénombrement de la microflore totale sur différents milieux.....	61
1-3 DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES AÉROBIES, ANAÉROBIES ET DES CHAMPIGNONS.....	62
2- Mesures de biomasse par les méthodes biocidales et physiologique.....	65
2-1 DÉTERMINATION PAR FUMIGATION-EXTRACTION (FE).....	65
2-2 DÉTERMINATION DU COEFFICIENT KEC.....	65
2-2-1 étude de la répartition de la radioactivité après apport d'un substrat carboné marqué.....	65
2-2-1-1 Influence de la concentration en glucose (1ère expérience).....	65
2-2-1-2 Influence du temps d'incubation (2ème expérience).....	66
2-2-1-3 Influence de la nature du substrat de marquage (3ème expérience). ...	67
2-2-2 Incorporation biologique de la radioactivité. Valeurs du Kec.....	67
2-3 DÉTERMINATION DE LA BIOMASSE PAR FUMIGATION-INCUBATION (FI).....	72
2-4 DÉTERMINATION PAR LA MÉTHODE DE RESPIRATION INDUITE PAR LE SUBSTRAT (SIR).....	74
CONCLUSION.....	76

DEUXIEME PARTIE EXPÉRIMENTALE : METHODES D'ESTIMATION DE LA TAILLE DE LA MICROFLORE

1- Méthode d'estimation du potentiel hétérotrophe du sol.....	77
1-1 DÉVELOPPEMENTS THÉORIQUES ET APPLICATION AUX MILIEUX NATURELS.....	77
1-1-1 Application aux milieux aquatiques - Bases théoriques.....	77
1-1-2 Application au milieu "sol".....	78

1-1-3 Quelques exemples d'application.....	79
1-1-4 Interêts et limites de la notion d'activité hétérotrophe.....	80
1-2 EXPÉRIENCES RÉALISÉES DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL.....	82
2- Etudes des cinétiques de transformation de différents substrats carbonés biogéniques et xénobiotiques.....	84
2-1- CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION DE TROIS SUBSTRATS CARBONÉS NATURELS : GLUCOSE, ACÉTATE DE SODIUM ET ACIDE BENZOÏQUE.....	84
2-1-1 Première expérience	84
2-1-2 Deuxième expérience.....	85
2-2 CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION DE COMPOSÉS XÉNOBIOTIQUES. CAS DU 2,4-D ET DE L'ATRAZINE.....	86
2-3- CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION ET D'INCORPORATION BIOLOGIQUE DU CARBONE. CAS DU 2,4-D.....	87
2-3-1 Rappels bibliographiques sur la méthode utilisée.....	87
2-3-2 Expérimentation réalisée.....	88
- RESULTATS-DISCUSSION.....	89
1- Mesure de l'activité hétérotrophe de différents horizons de sol provenant de la zone non saturée.....	89
1-1 MINÉRALISATION DE L'ACÉTATE.....	89
1-2 MINÉRALISATION DU GLUCOSE.....	93
2- Cinétiques de minéralisation de substrats carbonés.....	95
2-1 SUBSTRATS NATURELS.....	95
2-1-1 Cinétiques de minéralisation de longue durée.....	95
2-1-1-1 Influence de la structure chimique du substrat.....	95
2-1-1-2 Influence de la concentration.....	97
2-1-1-3 Influence de la profondeur.....	97
2-1-2 Cinétiques de minéralisation en temps court.....	97
3- Substrats xénobiotiques. Cas du 2,4-D et de l'atrazine.....	100
3-1 CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION DU 2,4-D ET DE L'ATRAZINE.....	100
3-2 CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION ET DE L'INCORPORATION BIOLOGIQUE DU CARBONE DU 2,4-D.....	104

3-2-1 Minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle	104
3-2-2 Cinétiques d'incorporation du carbone aromatique du 2,4-D.....	105
CONCLUSION.....	106

DISCUSSION GENERALE.....	107
---------------------------------	------------

ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PREAMBULE

Au sein de l'environnement naturel, l'utilisation agricole intensive d'engrais azotés et de composés xénobiotiques tels que les pesticides entraîne un double phénomène de pollution du sol et des nappes phréatiques. Effectivement, en Europe, des études récentes montrent la présence de pesticides dans les eaux superficielles et souterraines. Dans 6 pays européens, le recensement des composés xénobiotiques dans les eaux, révèle la présence de résidus d'atrazine, de carbofuran, de bentazone, de dichlorprop, de 2,4-D, de MCPA, de mecoprop et de simazine pour ne citer que les principaux.

La présence de polluants dans l'eau souterraine stimule l'intérêt porté à l'écologie microbienne des milieux souterrains. Dans un but de bioremédiation des sites contaminés, ce constat justifie la finalité des recherches concernant la compréhension des facteurs qui limitent l'activité métabolique de la microflore du sous-sol.

Ceci est d'importance, car une des voies d'entrée des polluants dans la nappe phréatique est constituée par la zone non saturée du sol au travers de laquelle le transport d'une substance organique se fait soit à l'état dissous, soit à l'état adsorbé.

Dans le sol de surface, des processus abiotiques et biologiques sont responsables de la dégradation des pesticides. Ces composés sont photodégradés ou hydrolysés. Mais, le processus de dégradation microbienne est souvent majoritaire dans la détoxification de nombreux composés organiques. Qu'en est-il sous la zone cultivée du sol? Jusqu'à ce jour, peu d'études ont été réalisées et ne permettent pas de répondre à cette question. Devant l'augmentation du nombre de polluants détectés dans les eaux et le sous-sol, il a paru nécessaire de mieux connaître les mécanismes de biodégradation des composés xénobiotiques qui s'y trouvent ainsi que le rôle des facteurs environnementaux qui affectent la disponibilité biologique des polluants.

L'objectif à long terme de cette recherche concerne la maîtrise de la persistance des produits dans l'environnement terrestre. Dans cette optique, plusieurs thèmes doivent être développés. Ils concernent :

- une connaissance approfondie de la microflore du sous-sol,
- une évaluation réaliste des vitesses de dégradation des composés organiques dans le sous-sol,

- l'établissement d'une base de données qui servira à modifier et à valider les modèles mathématiques prédictifs de la persistance des composés xénobiotiques dans la zone non saturée du sol.

- l'isolement de communautés ou de souches microbiennes issues de la zone non saturée du sol dont nous pourrions envisager l'utilisation ultérieure dans le cadre de biotechnologies appliquées à la restauration des environnements pédologiques et aquatiques contaminés.

C'est dans le cadre d'un programme de recherche européen (STEP CT90-0027), mis en place en 1990, et en collaboration avec les laboratoires de BAYER AG (Allemagne) et Zeneca Agrochemicals (Angleterre) qu'une réflexion a été engagée au Laboratoire de Microbiologie des sols de l'INRA de Dijon sur les différents thèmes cités.

Le travail d'expérimentation mis en place comporte trois objectifs principaux :

- Le premier est de préciser les conditions environnementales du milieu souterrain. Il s'agissait de mettre en place un dispositif de terrain permettant le suivi des facteurs physiques comme la température ou la teneur en oxygène mesurées à différentes profondeurs dans le sol.

- Le second conduit à estimer l'importance de la microflore du sous-sol. Pour cela, nous avons adapté les techniques classiques de dénombrement aux conditions, notamment nutritives, de l'environnement souterrain ainsi que les techniques de mesure de biomasse.

- Le troisième a pour but de préciser l'activité métabolique de cette microflore en mettant l'accent sur les potentialités dégradantes de la microflore du sous-sol envers de deux herbicides : le 2,4-D et l'atrazine.

**- SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE -**

DISTRIBUTION DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL

1- Principaux types de microorganismes présents dans le sous-sol et importance pondérale.

Dès 1916, Waksman s'intéresse à la distribution des bactéries dans le sous-sol. Par l'utilisation de la technique du dénombrement sur milieu gélosé, il réussit à dénombrer sur un profil de sol d'une hauteur de 76 cm, le nombre de bactéries viables. Plus récemment, Sinclair et Ghiorse, en 1989, ont déterminé la tendance générale d'un profil de densité de population microbienne dans le sous-sol. A une décroissance du nombre de microorganismes en dessous de la zone cultivée, succède une relative stabilisation de ce nombre dans le sol sous-jacent. Le tableau 1 récapitule les dénombrements des populations procaryotique et eucaryotique existantes dans différents profils de sol.

La microflore du sous-sol superficiel, bien que composée en majorité de procaryotes, révèle cependant des organismes eucaryotes tels que algues, champignons et protozoaires. Pour Balkwill et Ghiorse (1985) les formes microscopiques d'un profil de sol de 6,5 mètres de profondeur contiennent 85 à 90% d'espèces procaryotiques.

1-1 MICROORGANISMES EUCARYOTES

Au plan de l'expérimentation, trois méthodes sont employées :

(1) l'observation et le comptage des cellules en Microscopie Electronique à Transmission (MET) (Bone et Balkwill, 1986),

(2) le dénombrement sur milieux gélosés. Les protozoaires sont dénombrés de la façon suivante : des suspensions-dilutions de sol sont étalées sur un milieu gélosé additionné d'une souche bactérienne, *Enterobacter aerogenes*, constituant le substrat nutritif des eucaryotes. Après une incubation de 14 jours, le comptage de protozoaires s'effectue en microscopie à contraste de phase (Sinclair et Ghiorse, 1987). De leur côté, les algues et les champignons sont dénombrés respectivement sur un milieu gélosé minéral en présence de lumière (Alexander, 1982) et sur un milieu gélosé acidifié (pH 4,5) ou additionné d'un agent antibactérien (pénicilline, rose bengal, streptomycine),

(3) l'analyse des différentes classes d'acides gras polyénoïques spécifiques des microorganismes eucaryotes (Federle *et al.*, 1986). Les acides gras sont désignés de la

Nom	Site	Profondeur mètres	Texture	Procaryotes bactéries nb cellules.g ⁻¹	Eucaryotes protozoaires, algues, champignons nb cellules.g ⁻¹	Référence
• New Jersey		0-0,76		10 ⁷ -10 ⁶ viables ^b		Waksman, 1916
Lula		1,2-5	sableux	10 ⁷ -10 ⁶ totales ^a	absence	Wilson <i>et al.</i> , 1983
Oklahoma, USA				10 ⁵ -10 ³ viables ^b		
Fort Polk		1,2-6,7	sédiments	10 ⁶ totales ^a		Ghiorse et Balkwill, 1983
Louisiane, USA			argilo-limoneux	>10 ² viables ^b présence d'actinomycètes		
Lula		0-5,5	sableux	10 ⁶ -10 ⁷ totales ^a		Balkwill et Ghiorse, 1985
Oklahoma, USA				10 ⁶ -10 ² viables ^b		
Whitwell sol		0-2		10 ⁻² -10 ⁻⁵ μmole.g ⁻¹		Federle <i>et al.</i> , 1986
Alabama, USA				phospholipides ^c		
Lula		0-7,57		10 ⁷ -10 ⁵ viables ^b		Bone et Balkwill, 1986
Oklahoma, USA						
Lula		0-7,4			10 ⁶ -10 protozoaires ^b	Sinclair et Ghiorse, 1987
Oklahoma, USA						
Lula		0-9	limono-sableux	10 ⁹ -10 ⁷ totales ^a	10 ⁵ -10 protozoaires ^b	Beloin <i>et al.</i> , 1988
Oklahoma, USA				10 ⁷ -10 ⁵ viables ^b		
Lula		0-8	limono-argileux	10 ⁹ -10 ⁶ totales ^a		Bone et Balkwill, 1988
Oklahoma, USA				10 ⁷ -10 ³ viables ^b présence d'actinomycètes (spores)	filaments fongiques, levures.	
Savannah River Plant		0-265	sédiments	totales ^a		
Caroline du sud, USA			argileux, sableux	10 ⁶ -10 ² viables ^b 1% actinomycètes ^c	1.6% champignons ^c	Balkwill, 1989
Savannah River Plant		0-260		10 ⁶ -10 ⁷ totales ^a	10 ⁵ -50 champignons ^b	Sinclair et Ghiorse, 1989
Caroline du sud, USA				10 ⁷ -10 ³ viables ^b	10 ² -10 ³ algues ^b 10 ⁴ -10 protozoaires ^b	
Savannah River Plant		0-216		10 ⁶ -10 ⁵ viables ^b	10 ⁵ -0 champignons ^b	Fredrickson <i>et al.</i> , 1989
Caroline du sud, USA						
Summit Lake		0-17,7	limono-sableux	10 ⁶ -10 ⁵ totales ^a	6-1% d'A.G. champignons ^c	Federle <i>et al.</i> , 1990
Wisconsin, USA				10 ² -10 pmoles.g ⁻¹	2,7-0,7% d'A.G. protozoaires ^c	

3,5-0% d'A.G. actinomycètes^c

Savannah River Plant Caroline du sud, USA	0-210 m		10^8 - 10^6 totales ^a	10^6 - 10^5 viables ^b	Hazen <i>et al.</i> , 1991	
Hanford Washington, USA	0-64	sédiments paléosol	10^6 - 10^7 totales ^a	10^3 - 10^2 viables ^b		Brockman <i>et al.</i> , 1992
Nord US	0-7 0-4,8 3,7-6,7		10^7 totales ^a	10^6 - 10^2 viables ^b	10^3 -0 champignons ^b	Madsen <i>et al.</i> , 1992
Snake river plain Idaho, USA	0-70	sédiments limono-argileux	10^4 -0 actinomycetes ^b	10^6 - 10^5 totales ^a		Colwell, 1989
				10^5 -0 viables ^b		
				pas d'actinomycètes		

NB : A.G. : Acides Gras.

^a : nombre de bactéries déterminé par la technique AODC (Acridine Orange Direct Count).

^b : nombre de microorganismes déterminé par la technique des comptages sur boîtes.

^c : quantité de matériel bactérien estimée par la quantité d'acides gras spécifiques de la population microbienne.

Tableau 1 : Distribution de la microflore du sous-sol dans différents profils de sol.

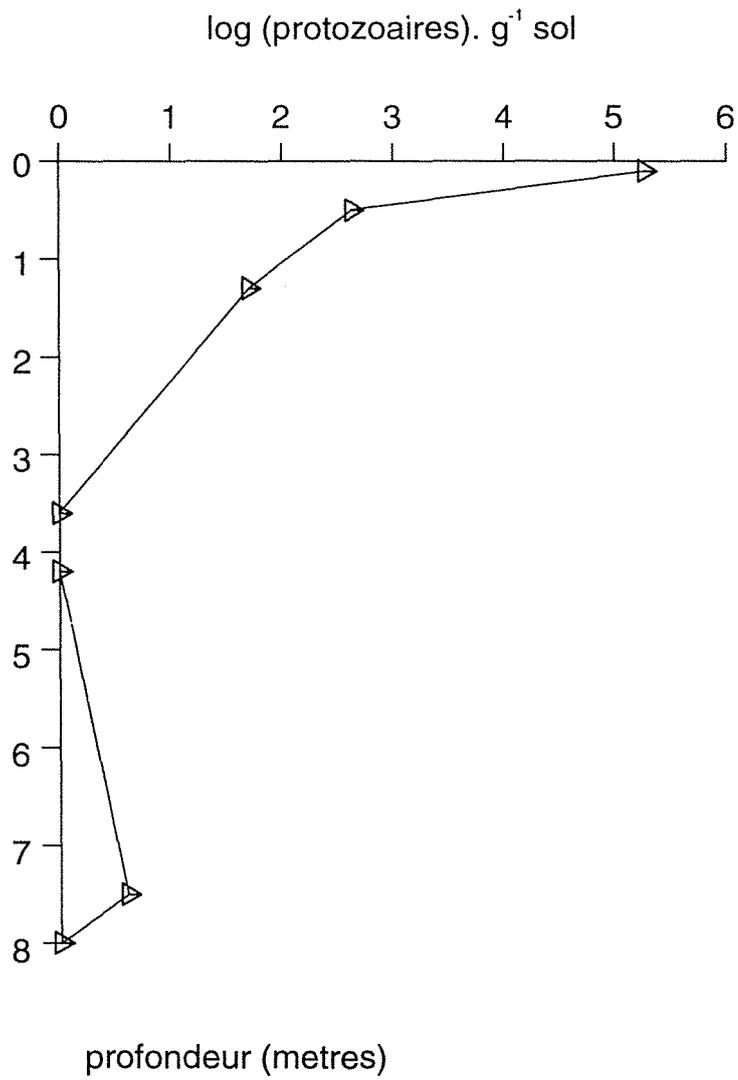


Figure 1 : Distribution du nombre de protozoaires dans un profil de sol situé à Lula, Oklahoma (D'après Sinclair et Ghiorse, 1987).

façon suivante $C_x:y\omega z$ où x , y , z représentent respectivement le nombre d'atomes de carbone, le nombre de doubles liaisons et la position de la double liaison à proximité de la chaîne aliphatique terminale de la molécule (Federle *et al.*, 1990).

La diminution avec la profondeur des formes eucaryotiques observée en MET par Bone et Balkwill (1986) corrobore les résultats de Federle *et al.* (1986). Ces auteurs dénombrent 17% d'acide gras polyénoïques en surface et 0,6% à 2 mètres de profondeur.

1-1-1 Protozoaires

Ce sont des organismes unicellulaires dont la taille varie de quelques micromètres à quelques millimètres. En fonction de leur moyen de locomotion, leur classification s'organise en trois groupes : (1) les flagellés, d'une taille maximale de 20 micromètres de longueur, possèdent 1 à 4 flagelles, (2) les ciliés, d'une longueur comprise entre 10 et 80 micromètres, ont des cils implantés tout autour de la cellule, (3) les amibiens qui se déplacent par l'intermédiaire de pseudopodes (Alexander, 1982).

Par la technique du dénombrement en milieu liquide, Sinclair et Ghiorse (1987) déterminent de $1,9 \cdot 10^5$ à $6,4 \cdot 10^6$ protozoaires g^{-1} sol dans l'horizon de surface d'un sol limono-sableux. En revanche leur nombre décroît jusqu'à 28 à 40 protozoaires g^{-1} sol dans la zone non saturée à texture limono-argileuse. Aucun protozoaire n'est détecté dans la zone saturée sous-jacente (figure 1). De même, dans un autre profil, la quantité d'acides gras spécifiques des protozoaires (20:3 ω 6 et 20:4 ω 6) décroît de 2,7% en surface à 0,7% au delà de 3 mètres de profondeur (Federle *et al.*, 1990). Contrairement à Sinclair et Ghiorse (1987), les auteurs précédents décèlent un pourcentage de protozoaires de 0,23 à 1,26% dans la zone saturée.

La diminution du nombre de protozoaires dans un profil admet plusieurs hypothèses. Elle peut être liée à :

(i) une décroissance de la population bactérienne. Les protozoaires, prédateurs des bactéries, sont présents dans les zones de forte densité bactérienne. Cette observation est confirmée par Sinclair et Ghiorse (1989). Dans un horizon sableux à 58 mètres de profondeur, ces auteurs détectent une densité élevée de protozoaires (10^3 protozoaires g^{-1} sol) et de bactéries (10^7 bactéries g^{-1} sol). Dans la zone intermédiaire entre les zones non saturée et saturée du même profil de sol, Beloin *et al.* (1988) constatent une liaison directe entre la diminution du nombre de protozoaires et celle des bactéries.

(ii) la texture du sol. Ces organismes nécessitent une taille minimale de pores pour vivre. Des pores dont le diamètre est inférieur à 4 micromètres ne sont pas colonisés par les protozoaires (Darbyshire, 1974 *in* Alexander, 1977). Les sols avec une texture sableuse ou limono-sableuse contiennent un nombre plus important de pores dont le diamètre est supérieur à 4 micromètres que les sols à texture fine (argileuse ou limoneuse). D'après

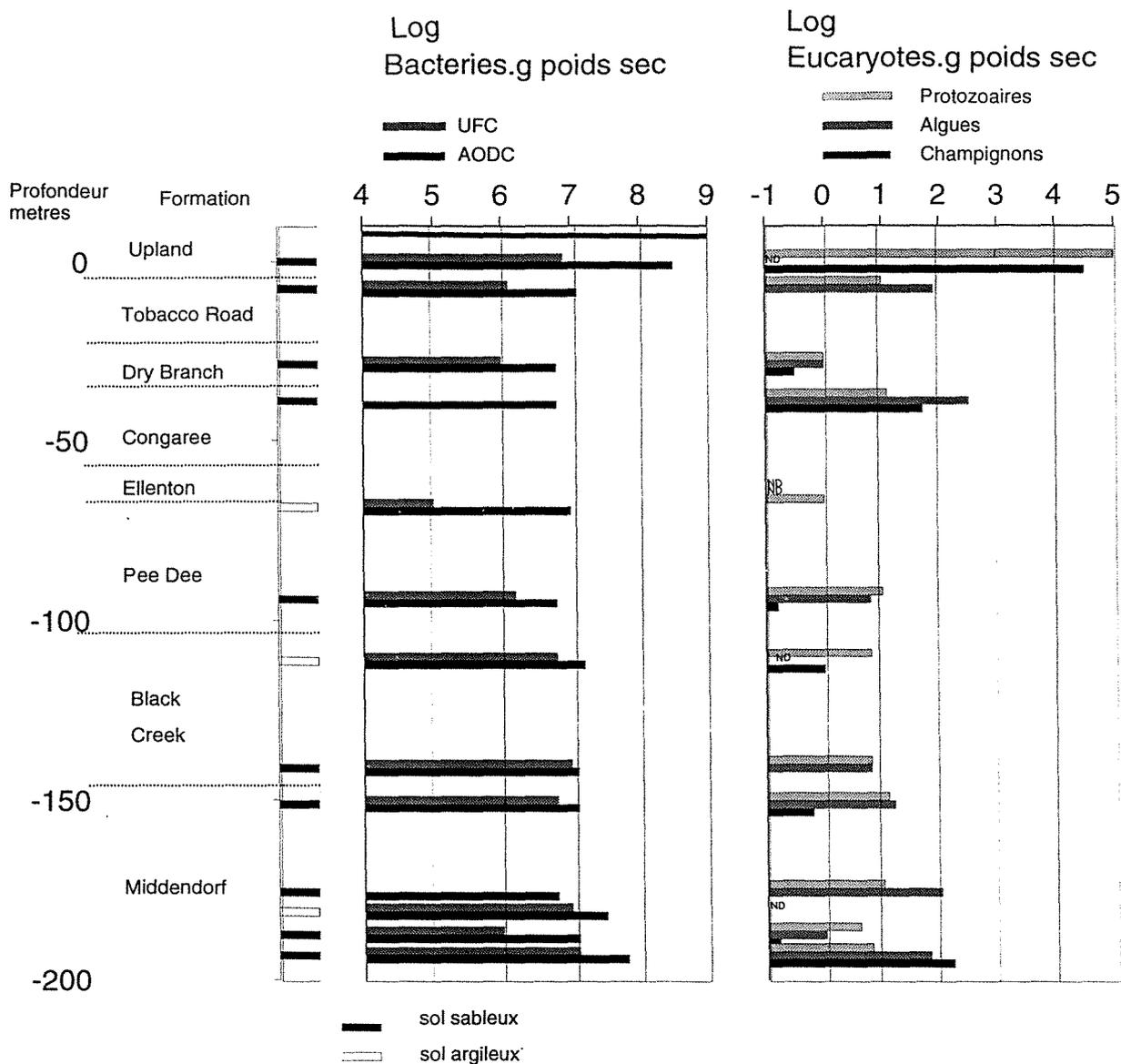


Figure 2 : Distribution du nombre de bactéries, de protozoaires, d'algues et de champignons dans des horizons sableux et argileux issus d'un profil de sol de 260 mètres de profondeur sur le site Savannah River Plant en Caroline du Sud. Les lignes pointillées entre le diagramme texture et celui des comptages microbiens indiquent la localisation des échantillons de sol dans la formation géologique du profil (D'après Sinclair et Ghiorse, 1989).

l'auteur précédent, ces pores sont susceptibles d'être colonisés par les protozoaires. Ainsi, leur disparition dans un environnement souterrain résulterait à la fois d'une diminution de la taille des pores dans des horizons à teneur élevée en argile où, en outre, la teneur en oxygène serait limitée. Cette conclusion est confortée par l'observation suivante : de 2 à 20 protozoaires $\cdot g^{-1}$ de sol sont dénombrés dans l'horizon sableux prélevé sur le site de Savannah River Plant et aucun dans l'horizon suivant à teneur élevée en argile (Sinclair et Ghiorse, 1989).

(iii) la teneur en eau. La présence d'une quantité suffisante d'eau facilite le mouvement vertical et latéral de ces microorganismes (Alexander, 1977). Contrairement au genre cilié, les protozoaires flagellés tolèrent des environnements avec une faible humidité (Alexander, 1977). Dans la zone non saturée limono-sableuse, Sinclair et Ghiorse (1987) constatent une augmentation avec la profondeur des protozoaires du genre flagellé (63% du nombre total de protozoaires se situent en surface contre 90% à 1,3 mètre de profondeur), tandis que les protozoaires amibiens décroissent de 37% du nombre total de protozoaires en surface à 10% à 1,3 mètres de profondeur. Par contre, les ciliés qui représentent 2% de la population des protozoaires en surface disparaissent en dessous de 0,5 mètre de profondeur. La présence de protozoaires communs aux genres flagellé et amibien dans le sous-sol, indique qu'ils sont plus aptes à coloniser le sol que les ciliés en raison de leur petite taille et de leur tolérance à de faibles teneurs en eau (Alexander, 1977).

1-1-2 Champignons

D'après l'analyse des différentes classes d'acides gras du profil de sol de texture sableuse, situé à Summit Lake, les marqueurs spécifiques des champignons (18:2 ω 6 et 18:3 ω 6) de l'ordre de 7% de la quantité totale des acides gras en surface, décroissent à 1% à 18,6 mètres de profondeur (Federle *et al.*, 1990).

Par la technique du dénombrement sur milieu gélosé, Madsen *et al.* (1992) comptent 3,2 10^3 champignons g^{-1} sol dans la zone non saturée, et moins de 10 dans la zone saturée d'un profil de sol prélevé sur un site forestier. Sinclair et Ghiorse (1989) dénombrent, par la même technique, 6,6 10^4 champignons g^{-1} sol dans un horizon de surface sableux. Ce nombre qui décroît avec la profondeur, est compris entre 0 et 35 champignons g^{-1} sol entre 14 et 216 mètres de profondeur (figure 2).

D'après Alexander (1977), le nombre de champignons filamenteux dans le sol varie avec la disponibilité des substrats carbonés oxydables. La diminution du nombre de champignons avec la profondeur est la résultante d'une baisse du taux de matière organique et de la teneur en oxygène de l'atmosphère du sol. Les champignons filamenteux sont aussi très sensibles à la teneur en eau du sol. Leur nombre est positivement corrélé avec l'humidité. Mais, dans le cas d'une humidité très élevée, comme dans la zone saturée d'un sous-sol, la

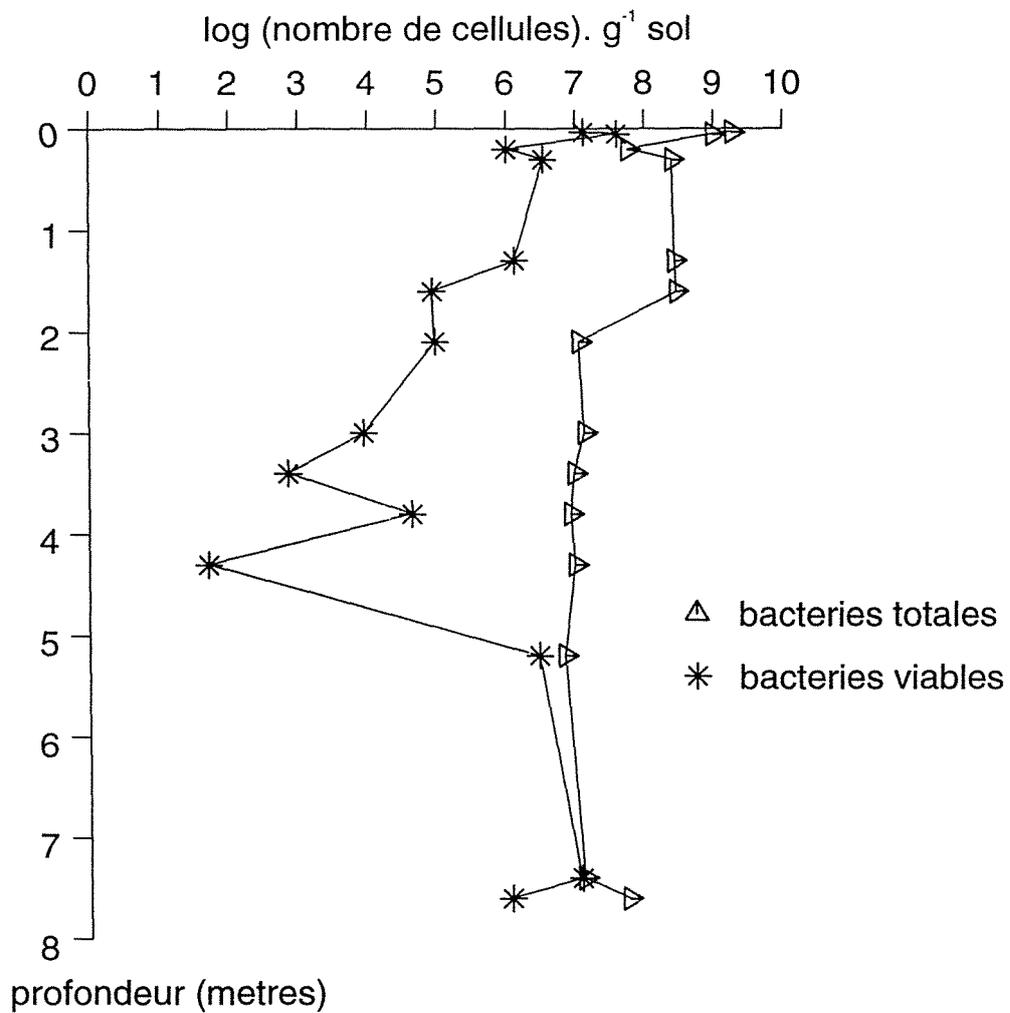


Figure 3 : Distribution du nombre de bactéries totales (dénombrées par la technique AODC) et viables (dénombrées par la technique d'étalement sur boîtes) dans un profil de sol situé à Lula, Oklahoma (D'après Beloin *et al.*, 1988).

diffusion de l'oxygène nécessaire au métabolisme aérobie est insuffisante pour satisfaire la croissance des champignons (Alexander, 1977).

1-1-3 Levures

Peu d'études concernent les levures. D'après Alexander (1977), en sol de surface, des comptages de levures de l'ordre de $2 \cdot 10^2$ à 10^5 cellules g^{-1} sol ne sont pas inhabituels. En MET, Bone et Balkwill (1988) détectent des cellules eucaryotiques apparentées aux levures dans le sol de surface ainsi que dans la zone non saturée du sous-sol.

1-1-4 Algues

Ce sont des organismes unicellulaires ou filamenteux qui nécessitent de la lumière comme source d'énergie. Différentes catégories de phototrophes sont visualisés en MET par Sinclair et Ghiorse (1989). Il s'agit d'organismes eucaryotes tels que des algues vertes filamenteuses et unicellulaires, des diatomées ou de procaryotes tels que les cyanobactéries filamenteuses. Leur nombre décroît de 10^4 - 10^5 cellules g^{-1} sol en surface à 10^2 cellules g^{-1} sol au delà de 14 mètres de profondeur sur le profil de Savannah River Plant (Sinclair et Ghiorse, 1989) (figure 2). Puisque les algues nécessitent de la lumière pour leur croissance, leur présence en profondeur pourrait s'expliquer par le flux latéral de l'eau d'une rivière proche du site de prélèvement qui aurait véhiculé ces microorganismes (Sinclair et Ghiorse, 1989).

Certaines espèces de diatomées et de cyanobactéries sont hétérotrophes. Cette caractéristique justifie leur présence dans des horizons éloignés de la zone de pénétration de la lumière. Mais, à cause de leur faible compétitivité face aux bactéries hétérotrophes, la grande majorité de ces cellules existerait à l'état de dormance dans un sous-sol limité en carbone (Alexander, 1977).

1-2 MICROORGANISMES PROCARYOTES

1-2-1 Bactéries

Le nombre total de cellules bactériennes, estimé par la technique AODC (comptage direct des cellules après coloration à l'acridine orange et examen en microscopie électronique à fluorescence), varie entre 10^9 et 10^7 cellules g^{-1} sol en surface. Il décroît d'un facteur de 10 à 100 avec la profondeur (Tableau 1). Les comptages de bactéries viables sont inférieurs d'un facteur de 10 à 100 par rapport aux comptages totaux (figure 3) (Beloin *et al.*, 1988). Ainsi seulement 1 à 10% des cellules bactériennes seraient non viables ou à l'état de dormance. De même, Webster *et al.* (1985) estiment un nombre de cellules bactériennes métaboliquement actives (déterminé par leur capacité à réduire le chlorure de 2-(iodophényl)-3-(p-nitrophényl)-5-phényltétrazolium (INT) de l'ordre de 10^4 à 10^5 bactéries.g⁻¹

¹sol dans un profil de sol limono-argileux contenant 10^6 bactéries.g⁻¹sol dénombrées par la technique AODC.

En microscopie électronique, le sol de surface, en général, contient une grande variété de types microbiens dont la plupart sont des bacilles Gram⁻ d'un diamètre de 0,3 à 1,2 µm. Dans le sous-sol, les deux types bactériens Gram⁺ et Gram⁻ coexistent avec une prédominance de bactéries Gram⁺ (Wilson *et al.*, 1983). Cette observation corrobore les études de Balkwill et Ghiorse (1985) et de Sinclair et Ghiorse (1989). La microflore des horizons de sol compris entre 1,2 et 9,5 mètres de profondeur est composée de 85% de bactéries de forme coccoïde ou de petits bâtonnets Gram⁺ d'une taille de 0,6 µm de diamètre (Balkwill et Ghiorse, 1985). De même, une teneur importante en acide teichoïque (composant spécifique de la paroi des bactéries Gram⁺) dans les sédiments et les sols profonds par comparaison au sol superficiel témoigne de la représentation majoritaire des bactéries Gram⁺ (Gehron *et al.*, 1984). De plus, les bactéries Gram⁺ sont fréquemment isolées d'horizon à texture argileuse. Les auteurs suggèrent que la paroi cellulaire rigide et anionique des bactéries Gram⁺ serait un avantage dans un horizon argileux où règnent des conditions extrêmes telles que pression osmotique élevée, faibles pH, concentrations élevées en composés toxiques. Au contraire, les bactéries Gram⁻ sont en nombre supérieur dans les horizons sableux (Sinclair et Ghiorse, 1989). Ce résultat confirme l'étude de Smith *et al.* (1986) qui détectent une proportion plus importante d'acide teichoïque dans l'horizon profond sablo-argileux situé à 10 mètres de profondeur qu'en surface du profil de sol de Lula (Oklahoma).

Une étude comparative menée par Kolbel-Boelke *et al.* (1988) sur les communautés microbiennes présentes dans les particules de sol et l'eau souterraine, met en évidence une proportion de bactéries Gram⁺ de 3 à 7 fois supérieure dans les horizons du sous-sol que dans l'eau souterraine. Concernant l'appartenance à une famille bactérienne, ces auteurs ont mis en évidence une majorité d'*Arthrobacter*, de *Pseudomonas* corroborant les observations en MET de Balkwill et Ghiorse (1985).

1-2-2 Actinomycètes

Ce sont des microorganismes qui produisent des filaments fins et ramifiés dont le diamètre est équivalent à celui des bactéries (compris entre 0,5 et 1 micromètre) (Alexander, 1977). Ces microorganismes filamenteux sont observés en MET dans un profil de sol limono-sableux à 8 mètres de profondeur (Balkwill et Ghiorse, 1985; Bone et Balkwill, 1988) ainsi que dans un aquifère à 10 mètres de profondeur (Hirsch et Rades-Rohkohl, 1983). Balkwill (1989) détecte des actinomycètes jusqu'à une profondeur de 265 mètres.

Federle *et al.* (1990) étudient leur répartition dans un profil de sol, en dosant la quantité de l'acide tuberculostéarique (TBS), spécifique des actinomycètes. Elle représente 3,5% de la quantité totale de phospholipides en surface, puis décroît avec la profondeur et s'annule

dans la zone saturée (à 20 mètres de profondeur). Ces microorganismes sont rares voire absents lorsque la teneur en eau est supérieure à 85% de l'humidité à saturation (Alexander, 1977; Federle *et al.*, 1990). Outre le facteur humidité, la présence de carbone disponible en faible quantité freine leur multiplication car leur compétitivité est moindre que celle des bactéries (Alexander, 1977). Federle *et al.* (1986) comparent la répartition des différents marqueurs biochimiques, dont l'acide tuberculostéarique, dans 4 profils de sol de texture différentes. Ces auteurs établissent une corrélation positive entre la présence préférentielle d'acide TBS et la teneur en argile.

2- Etat nutritionnel des microorganismes du sous-sol

L'environnement souterrain se caractérise essentiellement par une diminution de la teneur en nutriments carbonés avec la profondeur. Nous pouvons donc supposer que les microorganismes vivant dans le sous-sol ont développé des mécanismes physiologiques d'adaptation aux conditions de stress nutritionnel. Les microorganismes capables de vivre dans de telles conditions de pénurie carbonée sont dits oligotrophes.

2-1 DEFINITION DE L'OLIGOTROPHIE

De nombreuses bactéries isolées du sous-sol, se développent mieux sur milieu dilué à base d'extrait de sol que sur des milieux standard à teneur en nutriments élevée (Balkwill et Ghiorse, 1985). Certaines d'entre elles sont cependant capables de croître également sur milieux qualifiés de "riches" (Balkwill et Ghiorse, 1985; Balkwill, 1989; Bone et Balkwill, 1988). Ainsi, ces bactéries possèderaient une certaine flexibilité métabolique. Ceci nous amène à définir le concept d'oligotrophie. Selon Kuznetsov *et al.* (1979), une bactérie est définie comme oligotrophe si elle répond positivement à deux conditions (1) croissance sur un milieu avec une teneur en matière organique de l'ordre de 1 à 15 mg C l⁻¹, (2) puis croissance sur un milieu enrichi en carbone.

2-2 ADAPTATIONS PHYSIOLOGIQUES DES MICROORGANISMES OLIGOTROPHES

L'adaptation spécifique des microorganismes aux environnements avec des ressources nutritives limitées est basée sur l'une des stratégies suivantes (Tempest et Neijssel, 1978; Poindexter, 1981; Semenov, 1991) :

(i) *induction ou dérégulation de la synthèse de systèmes enzymatiques à affinités élevées pour les substrats présents en faible quantité.* Semenov (1991) distingue 3 groupes de microorganismes hétérotrophes dans les communautés microbiennes en fonction de la concentration en carbone (figure 4). Deux groupes situés aux deux extrémités de l'échelle de concentration, correspondent l'un aux oligotrophes stricts (avec des systèmes de transport à haute affinité) et l'autre aux copiotrophes stricts incapables de se développer

dans des environnements carencés en nutriments. Le troisième groupe, intermédiaire, comprend la majorité des microorganismes. Ils possèdent une faculté d'adaptation élevée à l'égard des conditions de concentration en carbone qui serait le résultat d'une possession de systèmes isoenzymatiques distincts. Ceux-ci se distinguent soit par leur affinité envers un même substrat soit par leur mode de régulation.

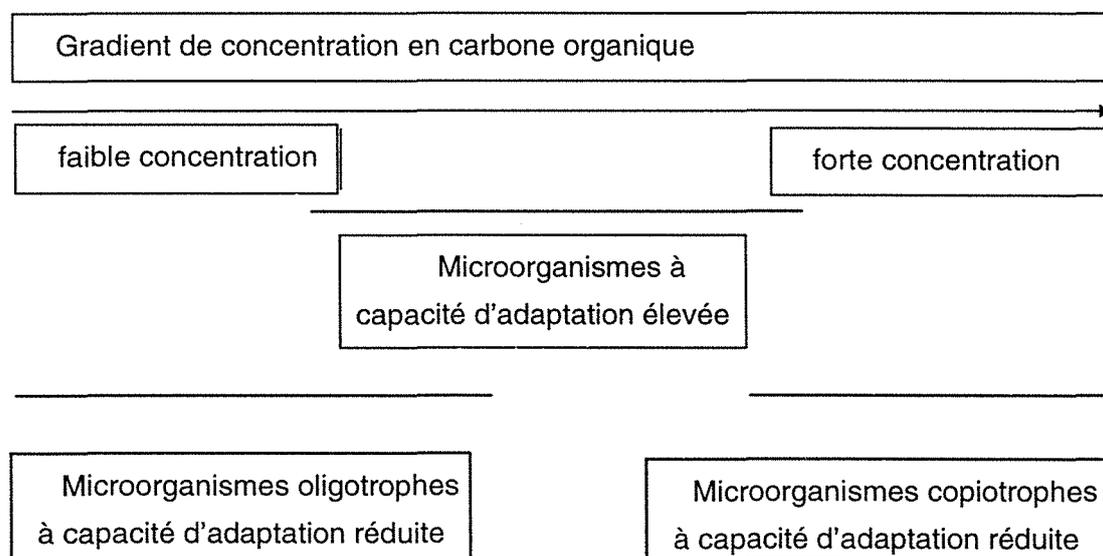


Figure 4 : Fonctionnement de la communauté microbienne d'un milieu en réponse à un gradient de concentration en carbone (D'après Semenov, 1991).

Un même microorganisme peut également posséder plusieurs systèmes enzymatiques ayant des affinités différentes pour le même substrat (Semenov, 1991). Par exemple, une bactérie marine isolée par Marden *et al.* (1987) possède 2 systèmes d'incorporation de la leucine, l'un à faible affinité ($K_m = 20 \mu\text{M}$), l'autre à forte affinité ($K_m = 0,76 \mu\text{M}$).

Les caractéristiques d'adaptation sont mises en évidence par Chesbro *et al.* (1990). Ces auteurs ont étudié le comportement d' *E.coli*, en conditions de stress nutritionnel en chémostat. En présence de faibles quantités de glucose, le système de répression catabolique est réduit en favorisant l'induction d'autres systèmes enzymatiques (tryptophane, β galactosides).

(ii) *modulation de la synthèse des composés moléculaires*. Par exemple, Tempest et Neijssel (1978) montrent qu'une bactérie Gram⁺, *Bacillus subtilis*, dans un milieu sans phosphore, synthétisait un polymère anionique non phosphoré, l'acide teichuronique. Ce composé remplace l'acide teichoïque dans la paroi bactérienne.

(iii) *changement de morphologie*. Des études en chemostat révèlent que les microorganismes possédant un rapport surface sur volume élevé ainsi qu'une forte densité de sites de transport, sont bien adaptés à la survie dans des conditions d'apports nutritifs limités (Poindexter, 1981). Lors de l'étude du comportement d'*E. coli* en chemostat, Chesbro *et al.* (1990) observent un changement de la morphologie cellulaire de cette bactérie. Lorsque la concentration en glucose décroît, elle adopte une forme coccoïde. Le phénomène inverse se produit aussi. Lors d'un apport de nutriments, une bactérie aquatique coccoïde non identifiée adopte une forme de petit bâtonnet (Wright, 1978).

(iv) *adaptation du support de l'information génétique*. Par exemple, Frederickson *et al.*, (1988) ont montré que la fréquence des plasmides, déterminée par le rapport entre le nombre d'isolats contenant des plasmides sur le nombre total d'isolats examinés, est de 14% dans le sol de surface, alors qu'au delà de 29 mètres de profondeur, leur proportion avoisine 35%. Par ailleurs, il semblerait que la taille des plasmides présents dans les bactéries augmente avec la profondeur. Ainsi, 53% des plasmides issus de bactéries isolées d'horizons de sol à plus de 30 mètres de profondeur, ont une taille supérieure à 150 kb (Fredrickson *et al.*, 1988). Ces plasmides seraient impliqués dans la dégradation des composés organiques plus résistants à l'attaque microbienne dans le sous-sol que dans le sol de surface. Ainsi l'existence d'homologies entre l'ADN de certains de ces plasmides et l'ADN du plasmide TOL contenant des gènes codant pour les enzymes de la dégradation de composés aromatiques montre leur implication possible dans la dégradation des composés aromatiques qui constituent probablement une part importante du carbone des horizons du sous-sol. La présence de gènes de dégradation de composés aromatiques sur des éléments extrachromosomiques dans les bactéries des environnements souterrains, serait liée à une utilisation occasionnelle de ces composés par les microorganismes. Cette contribution à la production énergétique de la cellule l'emporte sur leur coût de maintenance (Campbell, 1981).

D'après Reaney *et al.* (1983), dans des conditions limitantes en nutriments, la présence de plasmides dans les bactéries constitue une charge. La pression de sélection devrait favoriser l'élimination de ces éléments extrachromosomiques pour diminuer les dépenses énergétiques dues à la maintenance des plasmides. Cette dernière explication contredit l'observation précédente. Leur survivance serait lié au maintien d'une large diversité métabolique, la multiplicité des substrats dégradés compensant leur présence en faible concentration.

(v) *accumulation de polymères de stockage*. Lorsque la disponibilité d'un nutriment essentiel limite leur croissance, de nombreux microorganismes accumulent des polymères de stockage (Tempest et Neijssel, 1978). Nous pouvons distinguer 3 classes de composés : des hydrates de carbones (glycogène et polyglucanes), des lipides (poly β hydroxybutyrate

ou PHB) et des polyphosphates (Dawes, 1989). Par exemple, les bactéries observées en Microscopie Electronique à Transmission (MET) contiennent des inclusions intracytoplasmiques composées de granules de PHB ou de polyphosphate (Bone et Balkwill, 1988; Wilson *et al.*, 1983). Balkwill *et al.* (1988) déterminent un rapport entre la quantité de PHB et celle des phospholipides de 9,09 dans un horizon du sous-sol et de 0,61 dans l'horizon de surface. Ce résultat implique que les microorganismes du sous-sol contiennent une quantité élevée de PHB. Le dosage de la quantité des polysaccharides exocellulaires ou de glycocalyx est aussi un bon indicateur des conditions de stress nutritionnel (Smith *et al.*, 1986).

L'accumulation de carbone dans des produits de stockage et la synthèse d'exopolysaccharides par les bactéries se produisent au détriment de la croissance. Ces 2 mécanismes sont paradoxaux. Une explication a été avancée par Ghiorse et Wilson (1988). Ils supposent que, dans un environnement terrestre carencé en carbone et colonisé par des microorganismes, ceux-ci se développent jusqu'à l'épuisement des composés métabolisables. Ensuite, les cellules se lysent ou tombent à l'état de dormance. Ce comportement permettrait l'accumulation d'une quantité suffisante de composés organiques à nouveau disponible pour les microorganismes restés vivants. Cette succession d'évènements : la colonisation, l'exploitation, l'abandon de la zone de croissance et la régénération des sources de carbone sont observés dans d'autres écosystèmes. Des observations en MET démontrent que les bactéries adhèrent aux surfaces organiques et minérales du sol par l'intermédiaire de fibrilles implantées dans la paroi cellulaire ou de polysaccharides extracellulaires (Ghiorse et Balkwill, 1983; Hirsch et Rades-Rohkohl, 1983; Paul et Clark, 1989a). Supposons que l'exopolysaccharide permette une meilleure adhérence des bactéries aux particules de sol, la capture des composés organiques présents dans l'eau interstitielle sera facilitée. D'après Ghiorse et Wilson (1988), cette supposition justifie la synthèse de PHB et de polysaccharides par les bactéries. Cette hypothèse est confirmée par les études de Ventullo *et al.* (1983) in Ghiorse et Wilson (1988). Les bactéries associées aux surfaces solides utilisent le glucose, le glutamate et l'arginine plus rapidement que les bactéries libres dans l'eau souterraine.

D'après les observations en MET, les horizons du sous-sol contiendraient une majorité de cellules microbiennes isolées et de microcolonies (association de moins de 10 colonies) tandis que les associations microbiennes seraient plus représentatives d'un sol de surface (Balkwill et Ghiorse, 1985; Bone et Balkwill, 1986).

3- Origine de la colonisation microbienne du sous-sol.

A propos de l'origine de la colonisation microbienne du sous-sol, Sargent et Fliermans (1989) avancent 2 hypothèses : le transport des microorganismes du sol de surface par

percolation et la colonisation du sous-sol par les microorganismes au cours des dépôts sédimentaires.

La première hypothèse semblerait la plus plausible dans le cas d'une colonisation de la zone non saturée du sous-sol superficiel. Grâce aux travaux sur la porosité des sols rapportés par McNabb et Dunlap (1975), l'espace interstitiel total dans le sous-sol, serait suffisant pour la croissance des microorganismes et leur transport à travers le sol.

L'origine des bactéries présentes dans le sous-sol profond, au-delà de 10 mètres de profondeur, diffère de la précédente. D'après des études comparatives de profils biochimiques menées par Balkwill *et al.* (1989), les sédiments profonds et le sol de surface sont peuplés par des souches bactériennes distinctes. Seulement 3% des isolats du sol de surface présentent les mêmes caractéristiques physiologiques que les isolats bactériens des horizons de sol à 260 mètres de profondeur. De même, Hazen *et al.* (1991) ont montré l'absence d'homologies entre l'ADN issu d'isolats bactériens du sous-sol (Jimenez, 1990) et celui issu de 23 bactéries isolées de l'eau souterraine. Ces observations démontrent une colonisation du sous-sol profond au cours des dépôts successifs de sédiments (Bone et Balkwill, 1988; Balkwill *et al.*, 1989) et un transport des microorganismes par l'eau d'alimentation des aquifères (Hazen et Jimenez, 1988).

4- Diversité physiologique des microorganismes du sous-sol.

Les études relatives à la diversité microbienne du sous-sol montrent que la diversité phénotypique et génotypique diminue avec la profondeur.

Trois méthodes principales sont utilisées pour ces études. Il s'agit (1) des tests biochimiques, (2) des tests génotypiques basés sur l'étude des homologies de fragments d'ADN (3) des tests basés sur l'analyse des classes d'acides gras de la communauté microbienne du sol.

La première méthode établit un "profil métabolique" des souches bactériennes en vérifiant leur capacité à effectuer un ensemble de transformations biochimiques sous atmosphère aérobie ou anaérobie. Actuellement, deux séries de tests biochimiques sont utilisées : (i) le système BIOLOG basé sur l'utilisation de 95 substrats carbonés, (ii) le système API (variante Rapid NFT) permettant de tester 21 caractéristiques physiologiques. Ces "profils métaboliques" permettent de déterminer des relations de proximité entre différentes souches en calculant des coefficients de similarité (SSM) d'après le rapport entre les nombres de tests positifs de 2 isolats différents (Sokal et Michener, 1985 *in* Kolbel-Boelke *et al.*, 1988). Les bactéries du sous-sol profond (365 à 467 mètres) ont des profils métaboliques très divers. Une analyse discriminante sur 21 tests physiologiques à 75% de similarité distingue 10 biotypes différents : un biotype regroupe 57 isolats, 5 biotypes contiennent plus de 5

isolats et les 4 derniers biotypes en comprennent moins de 4 (Fredrickson *et al.*, 1991). De plus ces études révèlent que 85% et 60% des bactéries étaient capables de métaboliser respectivement le Tween 40 et l'acide PHB.

La deuxième méthode est basée sur des tests génotypiques. Nous avons recours à deux techniques différentes. L'une consiste à mettre en évidence par hybridation, des homologies entre des fragments d'ADN issus de 2 sources microbiennes différentes. L'ADN total extrait directement du sol ou de microorganismes isolés du sol, est fragmenté par sonication puis dénaturé à haute température. Les fragments d'ADN simple brin obtenus sont immobilisés sur filtre de nitrocellulose. Parallèlement, l'ADN d'une autre source bactérienne est marqué radioactivement avec de la thymidine tritiée, fragmenté puis dénaturé comme précédemment. Cette solution d'ADN est déposée sur le filtre de nitrocellulose précédent. Seuls les fragments d'ADN contenant des zones homologues avec l'ADN immobilisé s'apparient et restent fixés sur le filtre. La radioactivité présente sur le filtre est ensuite comptée (Jiménez, 1990).

L'autre technique est basée sur la détermination du pourcentage de bases guanine et cytosine de l'ADN microbien (G+C%). Les liaisons entre les bases G-C étant plus stables que celles entre les bases A-T, la dénaturation thermique de l'ADN est obtenue à une température d'autant plus élevée que celui-ci est riche en bases G-C. La courbe sigmoïde qui traduit cette dénaturation nous permet de déterminer le point de demi-dénaturation T_m . Cette température T_m est proportionnelle à la quantité de bases G-C présentes. Nous avons une relation linéaire entre la T_m et la teneur en G+C : elle s'élève de 0,4°C pour une augmentation de 1% de la teneur en bases G-C. Chaque espèce bactérienne possède son propre G+C%.

Jiménez (1990) étudie la composition de la communauté microbienne présente dans le sous-sol en comparant les 3 méthodes suivantes : les tests biochimiques, le G+C% et l'homologie ADN/ADN. Il conclue que les tests biochimiques sous-estiment la diversité bactérienne car des bactéries de même phénotype possèdent un G+C% différent. Par exemple, le pourcentage G+C% d'isolats identifiés par les test API *Pseudomonas aeruginosa*, est compris entre 46,8 et 64,7%. D'après l'analyse des profils d'hybridation de l'ADN total, les auteurs isolent une majorité de bactéries des genres *Pseudomonas* (40% des isolats) et *Acinetobacter* (25%) dans le sous-sol.

La troisième méthode de caractérisation de la diversité microbienne est basée sur le dosage quantitatif et qualitatif des acides gras dont la structure chimique (nombre d'atomes de carbone et de doubles liaisons) varie d'une communauté à l'autre. Ces acides sont extraits du sol par un mélange chloroforme-méthanol puis fractionnés en 3 groupes : les acides gras neutres (triglycérides), les glycolipides (acide PHB) et les lipides polaires. L'étude de la diversité microbienne est effectuée à partir de la caractérisation de ce dernier

groupe (White, 1983). Par exemple, dans un profil de sol sablo-argileux, une plus grande diversité est détectée dans l'horizon de surface que dans l'horizon situé à 4 mètres de profondeur (Smith *et al.*, 1986). Cette observation corrobore celle de Federle *et al.* (1990) après analyse des différentes classes d'acides gras sur un profil de sol de 20 mètres de profondeur. La plus grande diversité d'acides gras est trouvée dans la zone comprise entre la surface et 2 mètres de profondeur. Les classes d'acides gras les plus représentées sont 16:1 ω 7, 16:0, 18:1 ω 9, 18:1 ω 7 et cyc19:0. Dans cette même zone, en dessous de cette profondeur, Federle *et al.* (1990) trouvent une dominance d'acides gras 16:1 ω 7, 16:0, cyc17:0, 17:1 ω 6 et 18:1 ω 7. Par contre, dans la zone saturée, les classes d'acides gras 16:0, 18:1 ω 9, 18:1 ω 7 et 18:0 sont les plus abondantes.

ACTIVITES MICROBIENNES DANS LE SOUS-SOL

Après l'étude de la caractérisation de la microflore du sous-sol, nous allons étudier sa capacité à dégrader les composés organiques naturels et xénobiotiques. Nous allons aussi détailler les effets de l'environnement sur la biodégradation de ces composés dans le sous-sol.

1- Dégradation de composés organiques naturels.

Dans la plupart des études réalisées, les sols sont amendés avec différentes concentrations de molécules marquées au carbone 14. Le suivi de la minéralisation du substrat se réalise par le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ produit.

Nous avons récapitulé, dans le tableau 2, les études de biodégradation de composés organiques naturels dans le sol de surface et dans l'horizon de sous-sol correspondant. Il apparaît que le temps de demi-vie des composés organiques augmente dans le sous-sol.

Composé	Concentration ng g ⁻¹ sol	Temps de demi-vie (jours)		Référence
		surface	sous-sol	
Acétate	25	0,06	0,50	van Beelen <i>et al.</i> , 1991
Glucose	1000	0,19	1,06	Ward, 1985
Glucose	0,25	-	2,80	van Beelen <i>et al.</i> , 1991
Glucose	25	-	3,0	van Beelen <i>et al.</i> , 1991
Glucose	0,55	0,75	0,37-27,8	Konopka et Turco, 1991
Acide glutamique	1000	0,10	0,75	Ward, 1985
Phénol	5 à 10000	-	0,3-10,3	Dobbins <i>et al.</i> , 1987
Phénol	50	0,89	0,71-2,43	Federle, 1988
Phénol	0,01	4,0	1,38-166,7	Konopka et Turco, 1991
Acide benzoïque	50	0,91	0,81-0,74	Federle, 1988
Benzylamine	50	1,67	1,03-10,0	Federle, 1988
Acide stéarique	1000	4,92	13,0	Ward, 1985

Tableau 2 : Comparaison des temps de demi-vie (en jours) des composés organiques à différentes concentrations, dans le sol de surface et le sous-sol superficiel.

Nous notons que la vitesse de dégradation du glucose et de l'acide glutamique est respectivement 6 et 2,5 fois plus lente dans le sous-sol que dans le sol de surface (Ward, 1985).

Les études de biodégradation du glucose et de l'acétate en anaérobiose et à 10°C menées par van Beelen *et al.* (1991) dans des horizons sableux situés entre 1,5 et 2,5 mètres de profondeur montrent que dans le cas du glucose, ces conditions entraînaient l'existence d'une phase de latence de 0,8 jours puis une augmentation d'un facteur de 2 du temps de demi-vie. Konopka et Turco (1991) étudient la minéralisation du glucose à différentes profondeurs (0 à 26 mètres). Les temps de demi-vie constatés sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus dans les autres expériences (tableau 2). Dans certains horizons de la zone non saturée, avec une teneur en argile supérieure à 20%, les auteurs précédents observent une phase de latence de 2 jours ainsi que des valeurs de demi-vie élevées (27,8 jours) ce qu'ils expliquent par une limitation en nutriments minéraux ou une faible disponibilité de l'eau.

Les composés aromatiques de type acide benzoïque, phénol, benzylamine et les composés lipidiques tel que l'acide stéarique sont dégradés sans phase de latence dans le sous-sol. Leur temps de demi-vie ne dépasse pas 5 jours, à l'exception du phénol et de l'acide stéarique (Dobbins *et al.*, 1987; Ward, 1985). Dans le cas du dernier composé, le temps de demi-vie est supérieur à 10 jours. D'après Federle (1988), il n'est pas surprenant que les microorganismes du sous-sol superficiel soient aptes à minéraliser rapidement ce type de composés, car la matière organique du sous-sol est composée en grande partie de substances humiques et phénoliques en provenance du sol de surface (Thurman, 1984; Ghiorse et Wilson, 1988).

Les vitesses de minéralisation de l'acide benzoïque, du phénol et de la benzylamine dans un profil de sol à texture limoneuse entre 0 et 2 mètres de profondeur et sableuse au-delà de 2 mètres, fluctuent avec la profondeur (Federle, 1988). Celles-ci ne sont pas corrélées aux caractéristiques physico-chimiques du sol ou à une diminution de la biomasse totale estimée par la technique AODC. D'après les auteurs, ces résultats suggèrent une spécialisation des communautés microbiennes du sous-sol à dégrader ces composés associée à un développement de systèmes enzymatiques à affinité élevée par les microorganismes du sous-sol. Cette dernière hypothèse n'est pas confirmée par Dobbins *et al.* (1987). Ces auteurs ont estimé l'activité hétérotrophe de la microflore de différents horizons d'un profil de sol de 2 mètres de profondeur en mesurant la minéralisation du phénol en CO₂. Ils observent (i) une diminution de la vitesse maximale de minéralisation V_m d'un facteur de 2 avec la profondeur, (ii) une relation entre V_m et le type de sol. Par exemple, dans un sol peu perméable un V_m élevé correspondrait à une adaptation des microorganismes à la dégradation du phénol due à une augmentation du temps de

résidence de ce composé, (iii) par contre, aucune diminution de l'affinité pour le substrat, estimée au travers de la constante de Michaelis K_m , n'est observée avec la profondeur comme nous aurions pu le supposer dans un environnement oligotrophe.

La structure de la molécule influe sur la biodégradation des substrats carbonés. Les vitesses de minéralisation de l'acétate, du phénol et de l'acide 4-méthoxybenzoïque (4-MB), à une concentration de $10 \text{ mg.g}^{-1}\text{sol}$, dans différents horizons du site Savannah River Plant (SRP), s'ordonnent de la façon suivante : acétate > phénol > 4-MB (Hicks et Fredrickson, 1989).

La microflore des sous-sols profonds est stimulée par l'addition de concentrations croissantes en substrats. Ainsi Madsen et Bollag (1989) testent l'influence de la concentration en glucose sur l'activité minéralisatrice de sols prélevés entre 0,06 et 262 mètres de profondeur sur le site SRP. Dans tous les horizons, l'apport d'une solution à une concentration de $2640 \mu\text{g.l}^{-1}$ entraîne une augmentation de la vitesse de minéralisation à l'exception des horizons à 44 et 63 mètres par rapport aux échantillons traités avec une solution à $26,4 \mu\text{g.l}^{-1}$.

2- Dégradation des pesticides dans le sous-sol.

2-1 MISE EN EVIDENCE DE LA PERSISTENCE DES PESTICIDES

Nous avons mis à jour le tableau récapitulatif des différentes études de dégradation de pesticides dans le sous-sol établi par Helweg (1992) (tableau 3).

Pesticide	Temps de 1/2 vie (jours)	Référence
<i>Alachlor</i>	73 < $T_{1/2}$ < 285 zone non saturée 320 < $T_{1/2}$ < 553 zone saturée 0,5% minéralisé après 30 jours dans la zone saturée sableuse	Pothuluri <i>et al.</i> , 1990 Novick <i>et al.</i> , 1986
<i>Aldicarbe</i>	qqes jours < $T_{1/2}$ < qqes années 0,2-2,1 mois zone non saturée 63 eau souterraine (150 m) 52 à 178	Harkin <i>et al.</i> , 1986 Jones <i>et al.</i> , 1986 Miles et Delfino, 1985 Ou <i>et al.</i> , 1985
<i>Sulfone d'aldicarbe</i>	46 (70-90 cm limoneux) pas de dégradation à 90-110 cm 5,7 eau souterraine (150 m)	Smelt <i>et al.</i> , 1978a Miles et Delfino, 1985
<i>Sulfoxide d'aldicarbe</i>	53 < $T_{1/2}$ > 300 zone non saturée 2 < $T_{1/2}$ < 27 zone saturée 84-194 zone non saturée aérobie 2,3-27 zone saturée anaérobie 53 70-90 cm limoneux 11,3 eau souterraine (150 m)	Ou <i>et al.</i> , 1985 Smelt <i>et al.</i> , 1983 Smelt <i>et al.</i> , 1978b Miles et Delfino, 1985

<i>RCT</i> (résidus carbamates totaux)	79-105	Ou <i>et al.</i> , 1988
<i>Aldoxycarbe</i>	82-1100 zone non saturée aérobie 6,7-131 zone saturée anaérobie 0,3-1,2 mois zone non saturée	Smelt <i>et al.</i> , 1983 Jones <i>et al.</i> , 1986
<i>Atrazine</i>	17 à >41 mois (15 à 90 cm) 69 à 740 mois (aquifère 5,5-18,3 mètres) 105 à 200	Lavy <i>et al.</i> , 1973 McMahon <i>et al.</i> , 1992 Helweg, 1989 ^a , 1990 ^a
<i>2,4-D</i>	dégradation rapide à 15, 40 et 90 cm <3% de minéralisation	Lavy <i>et al.</i> , 1973 Ward, 1985
<i>Dicamba</i>	40% minéralisé après 5 mois sous-sol avec 0,2% d'humus	Chegrinets <i>et al.</i> , 1981 ^a
<i>1,3-dichloropropène</i>	1,4 à 23,5 limono-sableux	Vink et Groen, 1992
<i>Lindane</i>	39 à 84	Pestemer <i>et al.</i> , 1989 ^a
<i>MCPA</i>	Vitesse de dégradation dans le sous-sol=10% de celle du sol de surface	Bek Zeuthen <i>et al.</i> , 1988 ^a Helweg, 1987 ^a
<i>Mecoprop</i>	30 à 120 (horizon 60-100cm)	Helweg, 1991 ^a
<i>Methomyl</i>	0,5 à 1,6 mois <0,2 zone saturée anaérobie	Jones <i>et al.</i> , 1989 Smelt <i>et al.</i> , 1983
<i>Metribuzine</i>	5% minéralisé après 91 jours	Moorman et Harper, 1989
<i>Methyl parathion</i>	<7% de minéralisation	Ward, 1985
<i>Oxamyl</i>	21 à 415 zone non saturée aérobie <0,2 zone saturée anaérobie	Smelt <i>et al.</i> , 1983
<i>Parathion</i>	200 à 400 zone non saturée	Helweg, 1987 ^a
<i>Propachlor</i>	0,8% minéralisé après 30 jours dans la zone sableuse saturée du sol	Novick <i>et al.</i> , 1986
<i>Simazine</i>	80 à 110 zone saturée	Pestemer <i>et al.</i> , 1989 ^a
<i>2, 4, 5 T</i>	10% de disparition après 68 jours	Schmidt <i>et al.</i> , 1983 ^a
<i>TCA</i>	60 à >800	Helweg, 1987 ^a Torstensson et Hammerström, 1979 ^a

^a : *in* Helweg, 1992.

Tableau 3 : Dégradation des pesticides dans la zone non saturée et saturée du sous-sol. T_{1/2} est le temps de demi-vie du produit (en jours). (D'après Helweg, 1992).

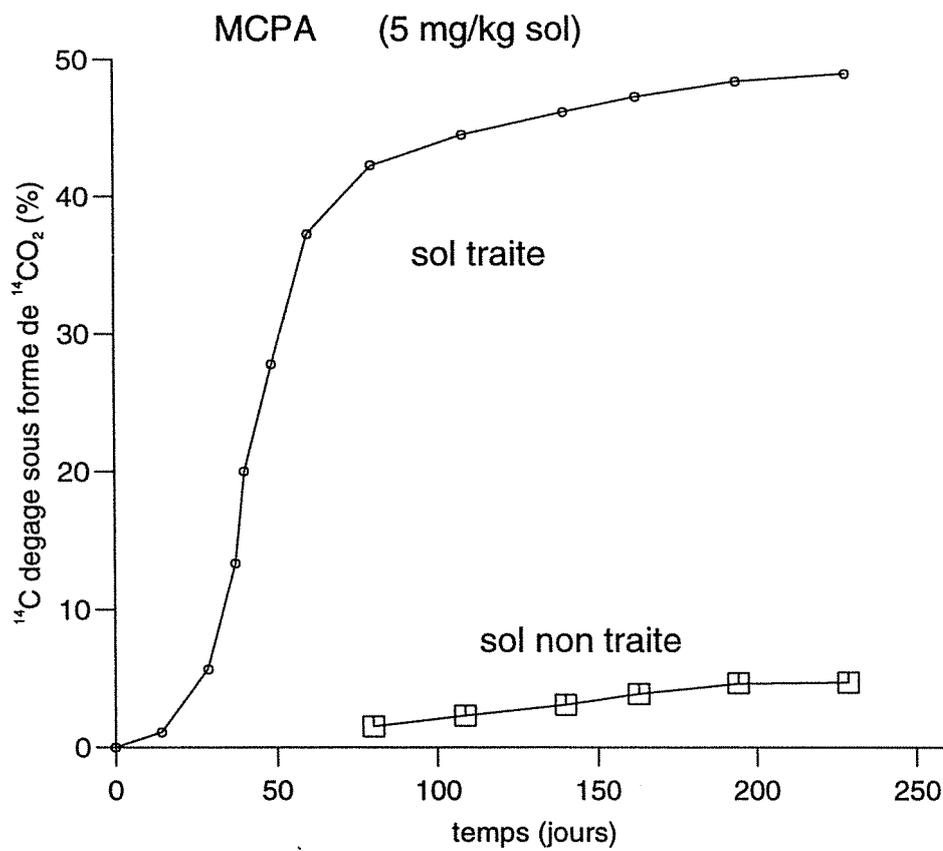


Figure 5 : Cinétiques de minéralisation du ^{14}C -MCPA ($5 \text{ mg.kg}^{-1}\text{sol}$) dans un horizon de sol prélevé à 1 mètre de profondeur. Les échantillons ont été prélevés dans un champs traité avec l'herbicide phénoxyacétique (cropped soil) ou non traité (uncropped soil). (D'après Helweg, 1992).

L'examen du tableau 3 montre que de nombreuses molécules xénobiotiques de structure chimique différente sont susceptibles d'être dégradées par les microorganismes du sous-sol. Mais ces molécules sont dégradées plus lentement dans le sous-sol que dans le sol de surface (Helweg, 1992).

Dans le sol, la biodégradation des pesticides dépend : (i) de la quantité, de l'activité et des capacités métaboliques des microorganismes, (ii) des facteurs de l'environnement qui affectent leur biodisponibilité (Freshe et Anderson, 1983 in Torstensson, 1987; Harper *et al.*, 1990).

La disponibilité d'un pesticide pour les microorganismes est déterminée par les caractéristiques d'adsorption-désorption du composé, les caractéristiques physico-chimiques du sol ainsi que par la présence du pesticide et des microorganismes dans le même site (Torstensson, 1987). Les teneurs en matière organique et en argile du sol influent sur le degré d'adsorption du composé organique. En revanche, la probabilité de rencontre entre les molécules de polluants et les cellules microbiennes diminue avec le faible nombre de microorganismes présents dans le sous-sol.

2-2 ADAPTATION DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL A LA DEGRADATION DES COMPOSES XENOBIOTIQUES.

L'adaptation est définie par une augmentation de la vitesse de dégradation d'un composé. A l'origine de l'apparition de ce phénomène, plusieurs hypothèses sont avancées: (i) transfert de gènes ou mutation dans un gène, (ii) induction enzymatique, (iii) augmentation de la population dégradante à un niveau suffisant pour la détection de la minéralisation du composé (Spain *et al.*, 1980). Ce phénomène qui est largement étudié pour le sol de surface se manifeste aussi en profondeur. Il est notamment confirmé dans le cas du p-nitrophénol (PNP) par la communauté microbienne présente dans la zone aquifère (4,5 à 5,6 mètres de profondeur) du profil de sol de Lula (Aelion *et al.*, 1987). De même, dans des horizons prélevés entre 60 et 200 cm de profondeur, la dégradation d'un composé xénobiotique comme l'N-(4-nitrophényl)propanamide est précédée par une phase de latence de 3 à 6 jours puis montre une adaptation de la microflore de ces horizons au composé xénobiotique (Campbell *et al.*, 1991). Dans une étude consacrée à la dégradation du 2,4-D dans un profil de sol de 4 mètres de profondeur situé à Sainghin, Fournier (1989) constate une adaptation métabolique de la microflore dans les horizons profonds survenant après une phase de latence dont la longueur varie avec la profondeur. De plus, Helweg (1992) met en évidence une dégradation accélérée du MCPA dans un horizon de sol prélevé à 80-100 cm de profondeur sous un sol cultivé ayant déjà reçu cet herbicide (figure 5).

INFLUENCE DES CARACTÉRISTIQUES DU MILIEU ENVIRONNANT SUR LA DISTRIBUTION ET L'ACTIVITÉ DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL.

1- Description de l'environnement souterrain.

D'une manière générale, cet environnement est défini comme la zone de sol située en dessous de la partie cultivée. Elle se divise en 2 parties distinctes : la *zone non saturée*, portion de sol entre la surface et la nappe phréatique, et la *zone saturée* (ou *zone aquifère*) pour la partie de sol en dessous de la nappe (Smith, 1990 ; Bouwer, 1984 ; Mc Nabb et Mallard, 1984). Entre ces deux zones, une *frange capillaire* est caractérisée par le mouvement ascendant de l'eau (figure 6). L'épaisseur de cette zone fluctue selon la hauteur de la nappe. La zone non saturée contient des zones saturées ou proches de la saturation. Nous distinguons 2 types de zones aquifères : un aquifère non confiné compris entre la nappe phréatique et une couche non perméable (argileuse ou roche-mère) et un aquifère confiné délimité par 2 couches non perméables (Bouwer, 1984).

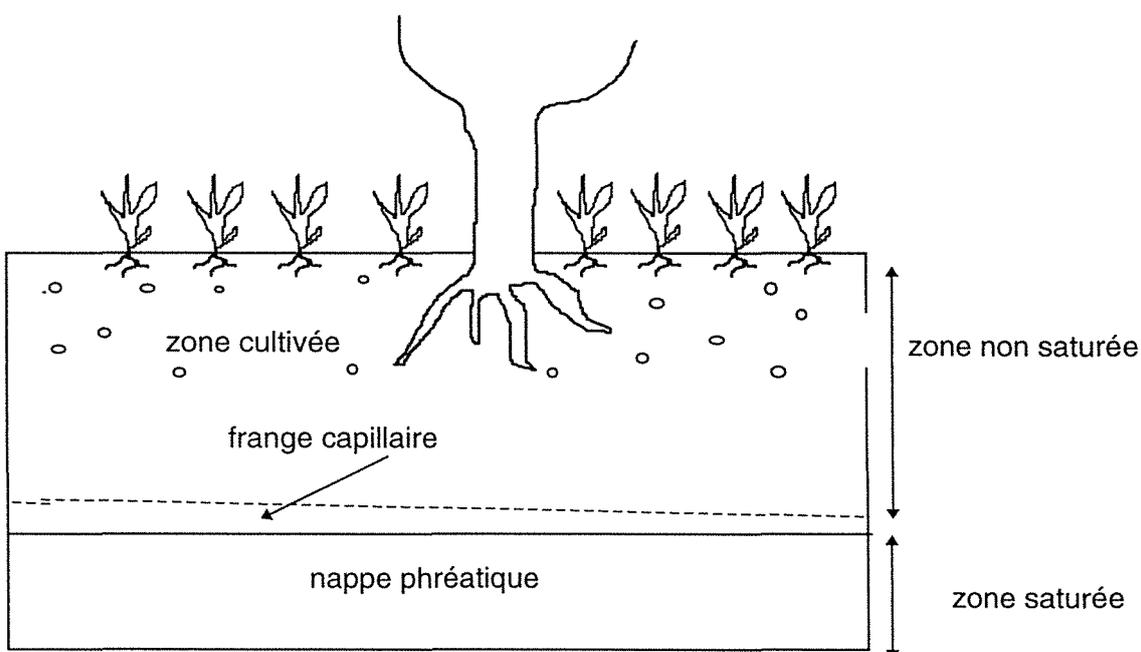


Figure 6 : Coupe verticale d'un environnement souterrain localisant les zones non saturée et saturée (D'après Smith, 1990).

D'une grande importance écologique, la zone non saturée représente le lien entre la surface du sol et l'eau souterraine. C'est d'elle que dépend la percolation des polluants appliqués en surface jusqu'à la nappe. En effet, les caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de l'environnement souterrain agissent directement sur le transport et la transformation des substances xénobiotiques. Cela contribue de façon significative à leur détoxification (Colwell, 1989).

2- Principaux facteurs de l'environnement.

Nous avons résumé les exigences nutritionnelles et les facteurs environnementaux qui contrôlent l'activité microbienne dans le sous-sol. Nous allons détailler l'influence de ces différents facteurs sur l'activité microbienne dans l'environnement souterrain à l'aide d'exemples.

Paramètre	Commentaire
<i>Facteurs environnementaux</i>	
Température	augmente avec la profondeur (3°C/100 m)
Pression osmotique	Effet dans les aquifères salins
Pression hydrostatique	augmente de 0,1 atm par 1 mètre
Potentiel Redox	Certains microorganismes seront exclus dans des sols très réducteurs
pH	réduction de l'activité microbienne aux valeurs extrêmes
<i>Besoins énergétiques</i>	
Carbone	minéral (carbonates et bicarbonates) organique (substances humiques récalcitrantes)
Composés organiques	présents à faibles concentrations
Autres éléments	N, P, S, Na, Ca, Mg...présents en quantité suffisante
Accepteurs d'électrons	O ₂ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻

Tableau 4 : Besoins énergétiques dans l'environnement souterrain (D'après Bitton et Gerba, 1984).

2-1 INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

La température influe sur l'activité métabolique des microorganismes dans l'environnement. Nous classons les microorganismes en 3 catégories : les *mésophiles* regroupant la plupart des microorganismes qui tolèrent des températures comprises entre 20 et 40°C, les *psychrophiles* qui sont capables de se développer à des températures comprises entre 0 et 5°C et les *thermophiles* dont l'optimum de température se situe entre 55 et 60°C.

Les variations de température dans le sous-sol sont corrélées avec celles du sol de surface. Les oscillations saisonnières des températures des horizons profonds sont décalées et amorties : plus froids en été et plus chauds en hiver. Cette observation est montrée par le suivi de la température à différentes profondeurs réalisé par Takagi *et al.* (1992) sur un profil de sol (figure 7). A 3 et à 5 mètres de profondeur, les variations de température sont de faible amplitude et suivent les températures de surface avec un décalage de 2 mois.

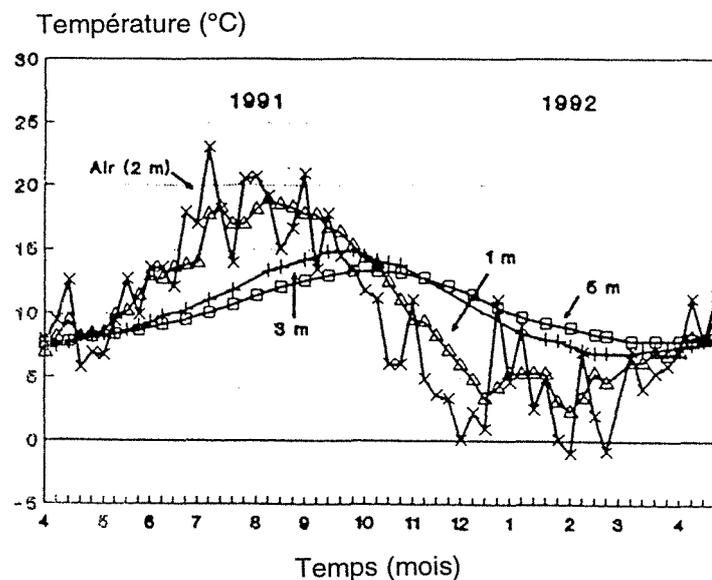


Figure 7 : Variations saisonnières de la température à différentes profondeurs dans le sol de Laacherhof en Allemagne (D'après Takagi *et al.*, 1992).

Vink et Groen (1992) étudient l'influence de la température sur la dégradation du 1,3 dichloropropène appliqué à des concentrations de 5 à 15 mg.g⁻¹sol dans l'horizon de surface sablo-limoneux et à 30 à 300 ng.g⁻¹sol dans l'horizon prélevé entre 35 et 75 cm de profondeur. Les temps de demi-vie décroissent rapidement avec l'augmentation de la température : (i) dans l'horizon de surface, les temps de demi-vie sont de 8,4 , 3,4 et 1,4 jours respectivement à 5°C, 10°C et 20°C, (ii) dans l'horizon de profondeur, les temps de demi-vie sont respectivement de 21, 5,5 ,et 1,4 jours à des températures identiques.

2-2 INFLUENCE DE LA PRESSION HYDROSTATIQUE.

La pression hydrostatique augmente avec la profondeur du sol. Les microorganismes de surface tolèrent des pressions d'une centaine d'atmosphères. Ce facteur n'aurait pas d'influence sur l'activité microbienne des sous-sols superficiels (Ghiorse et Wilson, 1988).

2-3 INFLUENCE DE LA TEXTURE DU SOUS-SOL.

2-3-1 Texture du sol et distribution de la microflore du sous-sol.

La texture des sédiments, exprimée par le rapport sable sur argile, est corrélée avec les mesures de densité de population microbienne, comme le montrent les études conduites par Beloin *et al.* (1988) sur un profil de sol à 8 mètres de profondeur situé à Lula. Dans la zone saturée (3 à 8 mètres de profondeur), nous observons une relation directe entre la proportion de sable et l'activité microbienne (estimée par le pourcentage de bactéries métaboliquement actives, capables de réduire le formazan).

Ces observations sont confirmées par celles de Sinclair et Ghiorse (1989) sur un profil de sol de 216 mètres de profondeur situé sur le site Savannah River Plant (SRP). Ces auteurs dénombrent 10^7 à 10^9 bactéries totales.g⁻¹sol dans des horizons ayant de 14 à 2% d'argile et 10^6 à 10^7 bactéries totales.g⁻¹sol dans des horizons ayant de 20 à 63% d'argile. De plus, le rapport bactéries viables/bactéries totales serait plus élevé dans les horizons sableux que dans les horizons argileux. Ce résultat s'expliquerait par une diminution du transport des nutriments à travers les couches de sol où l'espace poral est restreint. Cette diminution favorise les conditions anaérobies dans la zone argileuse et provoque une diminution du nombre des microorganismes aérobies (Fredrickson *et al.*, 1989).

2-3-2 Texture du sol et activité des microorganismes du sous-sol.

La mesure du taux de croissance des bactéries du sous-sol est estimée par la vitesse d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN bactérien. Le pourcentage de radioactivité incorporée est respectivement de 65% et 98% dans des sédiments limono-argileux et sableux. Ce pourcentage plus élevé de radioactivité incorporée dans les microorganismes présents dans les sédiments sableux serait le reflet d'une meilleure accessibilité des nutriments aux microorganismes indigènes due à une bonne perméabilité des sédiments sableux (Thorn et Ventullo, 1988). Au contraire, dans les sédiments limono-argileux, les processus d'adsorption et la faible perméabilité réduisent la disponibilité en nutriments.

Dans les sous-sols profonds (20 à 260 mètres de profondeur), Hicks et Fredrickson (1989) observent que le pourcentage de minéralisation de l'acétate est compris entre 32 et 65% dans tous les horizons du profil de sol de Savannah River Plant compris entre 31 et 215 mètres de profondeur excepté dans les horizons situés à 72 et 204 mètres de profondeur où le pourcentage n'excède pas 1,5%. Les auteurs expliquent ce faible pourcentage de minéralisation par une teneur en argile élevée dans ces horizons (26 à 47%). Les

expériences de minéralisation de l'acétate et du glucose dans des horizons prélevés entre 34 et 264 mètres de profondeur sur le même site corroborent les résultats précédents (Phelps *et al.*, 1989). Dans les horizons contenant plus de 20% d'argile, ces auteurs ont estimé des activités minéralisatrices 10 fois plus faibles que dans les sédiments sableux.

Ces observations sont confirmées par l'étude de Shanker *et al.* (1991) dont les résultats sont les suivants : (i) le glucose est minéralisé dans tous les horizons de sol compris entre 21 et 526 mètres de profondeur, (ii) indépendamment de la profondeur, il existe une corrélation entre la vitesse de minéralisation et la texture du sol. Par exemple, la vitesse de minéralisation du glucose est de l'ordre de 80 nmol glucose. g⁻¹sol j⁻¹ en surface et dans les horizons sableux (212, 463 et 536 mètres de profondeur) et seulement de 0,6 à 4,6 nmol glucose. g⁻¹sol j⁻¹ dans des horizons contenant plus de 40% d'argile (56 et 71 mètres de profondeur), (iii) la minéralisation du glucose dans les différents horizons s'accorde avec la distribution de la biomasse totale viable estimée par la technique de dénombrement sur boîte.

Dans un profil de 31 mètres de profondeur (Vejen, Danemark), Albrechtsen et Winding (1992) observent, dans des horizons à teneur élevée en argile, des conditions d'anaérobiose qui se traduisent par une absence de minéralisation du phénol après une période d'incubation de 60 jours et une faible minéralisation de l'acétate. Plusieurs explications sont avancées par les auteurs (i) une adsorption du phénol sur les surfaces solides entraînant une inaccessibilité biologique, (ii) une faible perméabilité de ces sédiments entraînant une diminution du flux des nutriments, dont l'oxygène, à travers cette zone.

Smelt *et al.* (1983) montrent que la dégradation des herbicides suivants : sulfoxyde d'aldicarbe, oxamyl, méthomyl et aldoxycarbe, est plus rapide dans un horizon sableux prélevé à 1,5 mètres que dans un horizon limoneux prélevé à 0,7 mètres de profondeur. Par contre, Jones *et al.* (1989) trouvent que la demi-vie du méthomyl est de 2 jours dans des sols de surface limono-argileux ou sablo-argileux et comprise entre 0,5 et 1,6 mois dans les horizons du sous-sol (30 à 300 cm de profondeur) de texture argileuse ou sableuse : ces résultats ne permettent pas de conclure à un effet de la texture du sol.

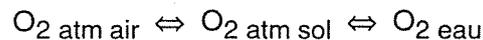
2-4 INFLUENCE DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION

2-4-1 L'atmosphère du sol.

Dans le sol de surface, la phase solide occupe environ la moitié du volume total, l'autre comprend les phases liquide et gazeuse. Les proportions respectives de ces deux phases conditionnent l'état d'aération du sol (Alexander, 1977). L'atmosphère du sol se compose essentiellement d'azote, de dioxyde de carbone, d'oxygène et de vapeur d'eau.

En général, l'atmosphère d'un sol bien aéré (horizon de surface) contient moins d'oxygène, de 18 à 20%, que l'atmosphère de l'air mais plus de CO₂, de 1 à 3%. Toutefois,

une teneur élevée en argile et en eau couplée avec une activité microbienne importante conduisent à une augmentation de la concentration en CO₂ qui peut atteindre 10% (Paul et Clark, 1989b). La teneur en oxygène conditionne l'activité des microorganismes présents dans cet environnement. Des échanges gazeux entre l'atmosphère terrestre, l'atmosphère du sol et la solution du sol ont lieu dans l'horizon de surface :



Lorsque le sol est bien structuré avec une forte porosité, ces échanges fonctionnent normalement. Dans la zone non saturée du sous-sol, les conditions aérobies sont généralement prédominantes au moins tant que les échanges gazeux avec l'atmosphère sont facilités. De plus, le passage du métabolisme aérobie au métabolisme anaérobie se produit à une concentration en oxygène inférieure à 1% (Paul et Clark, 1989b). Lorsqu'on se rapproche de la nappe phréatique, les pores se saturent en eau et l'oxygène gazeux devient limitant en raison d'une recharge en oxygène dissous limitée par une mauvaise accessibilité de l'espace poral à la circulation de l'air. La consommation en oxygène des microorganismes peut très rapidement aboutir à des conditions réductrices (McNabb et Dunlap, 1975). Patrick et Mahapatra (1968) ont classé les sols en fonction du potentiel rédox (Eh) à pH 7 :

	Type de sol	Eh (mV)
oxydé		> 400
modérément réduit		100 à 400
réduit		-100 à 100
fortement réduit		-300 à -100

2-4-2 Potentiel d'oxydo-réduction et activité microbienne

D'après McNabb et Dunlap (1975), l'oxygène, accepteur d'électron habituel des bactéries aérobies strictes et facultatives, existe en quantité limitée dans le sous-sol superficiel et peut manquer dans les horizons profonds et saturés. Toutefois, d'autres composés tels que NO₃⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻, qui peuvent servir d'accepteurs d'électrons de substitution pour les microorganismes en conditions anaérobies, sont présents dans le sous-sol en quantité suffisante (Ghiorse et Wilson, 1988).

Il est possible d'isoler des microorganismes anaérobies dans un sous-sol aérobie. Ceci indique la présence de microhabitats permettant la survie de ces populations microbiennes. Jones *et al.* (1989) ainsi que Fredrickson *et al.*, (1989) ont dénombré de 0 à 10⁵ bactéries sulfato-réductrices dans un profil de sol de 260 mètres de profondeur malgré des conditions essentiellement aérobies. Jones *et al.* (1989) ont étudié les potentialités de métabolisme anaérobie du benzoate et du phénol dans un profil de sol profond (0-300 mètres de

profondeur). Les auteurs ont montré qu'une dégradation anaérobie du benzoate pouvait avoir lieu dans les horizons saturés.

Pothuluri *et al.* (1990) étudient la dégradation de l'alachlor à une concentration de 1,56 mg.g⁻¹sol dans un profil de sol de 15,2 mètres de profondeur. En anaérobiose (incubation sous atmosphère d'azote), la demi-vie de l'alachlor dans le sol de surface est 5 fois plus élevée qu'en aérobiose. Cette mesure est de 337 et 563 jours dans la zone saturée dans les mêmes conditions d'incubation. De la même manière, Helweg (1992) compare les vitesses de minéralisation du MCPA dans un sol de surface et dans 2 horizons profonds prélevés à 1 mètre de profondeur. En étudiant la dégradation du composé dans des colonnes de sol non perturbé en conditions aérobies pour le sol de surface et anaérobies pour les sols de profondeur, il observe une minéralisation de l'herbicide plus rapide en aérobiose qu'en anaérobiose.

Par contre, Smelt *et al.* (1983) montrent que la dégradation anaérobie de composés tels que le sulfoxyde d'aldicarbe, l'aldoxycarbe, l'oxamyl pouvait être plus importante que la dégradation aérobie. Les temps de demi-vie de ces composés en anaérobiose, dans des sols provenant de la zone saturée, sont respectivement de 2,3 jours, 6,7 jours et moins de 0,2 jour alors qu'en aérobiose, dans des sols prélevés dans la zone non saturée, ils sont respectivement de 84, 82 et 26 jours.

2-5 INFLUENCE DU PH

D'une façon générale, la plupart des bactéries hétérotrophes et des champignons sont actifs à un pH voisin de la neutralité. Les champignons sont plus tolérants aux pH acides. Par contre, des pH extrêmes ont une influence négative sur l'activité microbienne.

Cette influence du pH sur l'activité microbienne est illustrée par le travail de Smelt *et al.* (1978) sur la dégradation de la sulfone dérivée de l'aldicarbe qui n'est pas dégradée après 294 jours d'incubation dans un sol sableux acide (pH=5) prélevé à 90-110 cm de profondeur alors que, dans un deuxième sol de profondeur (pH=7,8) le temps de demi-vie est de 46 jours. De même, Campbell *et al.* (1991) étudient la dégradation de l'N-(4-nitrophenyl)propanamide dans des échantillons de sous-sol provenant de 3 sols avec des pH différents. En surface, le temps de demi-vie du produit est 3 fois plus élevé dans un sol basique que dans un sol neutre ou acide. Par contre, dans les horizons de sol prélevés à 2 mètres de profondeur, les auteurs n'observent pas d'influence du pH sur la dégradation du produit. Un autre composé, le carbofuran, est sensible aux variations de pH. Le carbofuran est hydrolysé en méthylamine et en CO₂ dans des conditions alcalines. Comme le montre les études menées par Anderson (1993) sur la minéralisation du carbofuran marqué sur le groupement carbonyle dans un profil de sol de 8 mètres de profondeur situé à Monchengladbach. Par exemple, dans des échantillons de sol stérilisés dont le pH est

compris entre 6,5 et 7,2, 80% de l'insecticide est libéré sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ après 12 semaines d'incubation alors que dans des horizons dont le pH est inférieur à 6,5 seulement 8% du produit sont hydrolysés après 12 semaines.

2-6 INFLUENCE DU CARBONE ORGANIQUE.

2-6-1 Quantité et nature du carbone organique dans un profil de sol.

Au dessous de la zone cultivée, la teneur en Carbone Organique Dissout (COD) de l'eau interstitielle diminue avec la profondeur. Konopka et Turco (1991) ont montré que le COD décroît de 1,72% dans le sol de surface jusqu'à 0,37% à 1,5 mètre de profondeur tandis que la quantité de Carbone Organique Total (COT) reste constante. Elle est comprise entre 2,09 et 3,42% sur l'ensemble du profil. La figure 8 extraite d'une étude de Thurman (1984) indique la tendance générale de l'évolution du carbone organique dissout en profondeur. L'auteur signale quelques mécanismes qui sont supposés influencer sur cette évolution : formation de complexes avec le fer et l'aluminium, adsorption sur les argiles, dégradation microbienne.

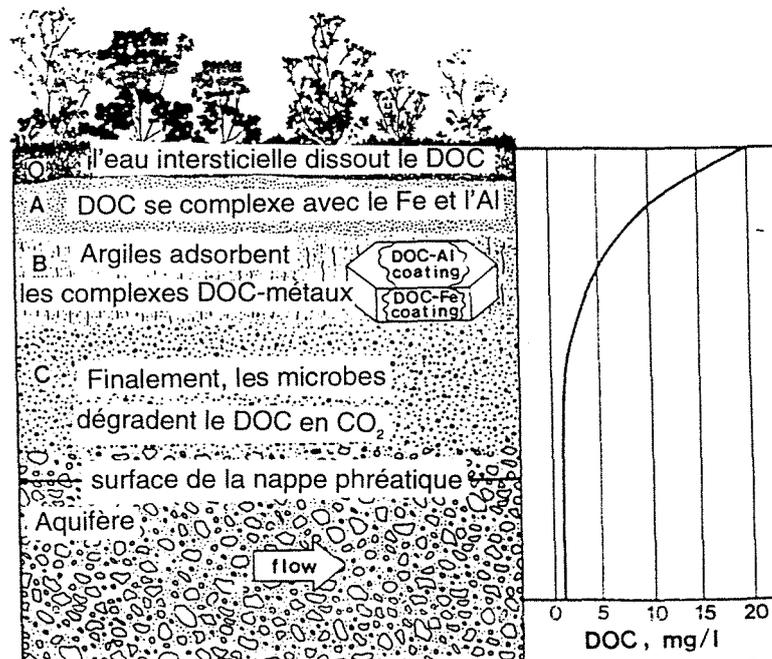


Figure 8 : Diminution de la teneur en carbone organique dissout (DOC) dans un profil de sol (Thurman, 1984).

La majeure partie des composés organiques facilement métabolisables disparaît dans le sol de surface avant qu'ils atteignent les horizons sous-jacents. Les composés organiques solubles présents dans l'eau souterraine sont généralement des substances humiques, des acides naphthéniques et des composés phénoliques (Ghiorse et Wilson, 1988).

2-6-2 Carbone organique et distribution des microorganismes.

La teneur en carbone organique soluble est un faible indicateur de la taille des populations microbiennes et de leurs activités car elle n'est pas représentative de la

disponibilité des nutriments. Cette observation est démontrée par Fredrickson *et al.* (1989). La taille des populations bactériennes n'est pas corrélée avec la concentration en carbone organique soluble de la solution du sous-sol. De même, Wallis et Ladd (1983) observent de mauvaises corrélations entre les teneurs en matière organique dissoute et la taille des populations bactériennes des aquifères. Ceci pourrait s'expliquer par la mauvaise caractérisation de la nature de ce carbone organique dont certains composés tels que les substances humiques seraient récalcitrants c'est à dire plus difficilement dégradés par la microflore.

2-6-3 Carbone organique et activité de la microflore

La disponibilité en composés carbonés dissous est un facteur important dans la dégradation de molécules xénobiotiques récalcitrantes dont certaines ne peuvent être dégradées que par des processus co-métaboliques.

Moreale et van Bladel (1980) testent l'influence de la teneur en carbone organique sur la minéralisation de la molécule de 2,4-D suivie par le dégagement du $^{14}\text{CO}_2$ produit à partir du ^{14}C -2,4-D appliqué à un profil de sol (30 cm de profondeur) à une concentration de 10 mg.kg⁻¹. Par opposition au sol contenant 0,12% de matière organique (MO), la mobilité de l'herbicide est ralentie dans le sol avec une teneur en MO élevée (1,85%). Une deuxième expérience réalisée dans une colonne de 100 cm de hauteur contenant du sol non perturbé amendé avec une concentration de 4,4 kg.ha⁻¹ de 2,4-D met en évidence une localisation préférentielle de l'herbicide dans les horizons riches en matière organique (compris entre 0 et 30 cm).

Ou *et al.* (1988) étudient la dégradation de l'aldicarbe dans un profil de sol jusqu'à 300 cm de profondeur en conditions aérobies. La demi-vie moyenne du composé est de 63 jours dans l'horizon 0-30 cm. Elle augmente avec la profondeur (jusqu'à 300 cm) de 52 à 178 jours. Dans les horizons compris entre 150 et 300 cm, l'hydrolyse chimique est la voie principale de dégradation de l'aldicarbe contrairement à ce que nous observons aux horizons supérieurs où l'aldicarbe sulfoxyde est détecté. La présence de ce métabolite est le signe d'une oxydation microbienne de la molécule. L'augmentation de la voie hydrolytique dans la dégradation de l'aldicarbe dans le sous-sol serait corrélée avec une diminution de la teneur en carbone organique. Celle-ci décroît de 0,4% en surface jusqu'à 0,03% en profondeur provoquant une diminution de l'activité microbienne.

De même, la diminution de la vitesse de dégradation de l'herbicide métribuzine en profondeur serait corrélée avec une diminution du nombre de microorganismes, elle-même liée à une diminution de la teneur en nutriments (Moorman et Harper, 1989). L'étude conduite par Pothuluri *et al.* (1990) montre une dégradation de l'herbicide alachlor plus

rapide dans le sol de surface ($T_{1/2}$ = 23 jours) que dans les horizons plus profonds. La demi-vie dans le sous-sol augmente avec la profondeur et passe de 73 jours entre 0,6 et 2,4 mètres à 324 jours à 15,2 mètres. Cette réduction de la vitesse de dégradation serait liée à un manque de carbone facilement minéralisable comme en témoigne le résultat de l'addition d'une solution de glucose ou d'hydrolysate de caséine après 126 jours d'incubation : le taux de dégradation de l'herbicide augmente dans les horizons du sous-sol compris entre 0,6 et 12,2 mètres de profondeur. Ces résultats laissent penser que la dégradation de polluants dans le sous-sol serait un processus co-métabolique. Ces conclusions sont aussi celles de McMahon *et al.* (1992) au sujet de la dégradation de l'atrazine dans la zone aquifère comprise entre 5,2 et 18,1 mètres de profondeur. La minéralisation de l'atrazine, mesurée par dégagement du $^{14}\text{CO}_2$ à partir d'atrazine marquée radioactivement sur la chaîne éthyl augmente en présence de glucose. Les auteurs n'ont cependant pas observé d'incorporation de radioactivité dans la biomasse.

L'étude de Bolton *et al.* (1993) contenant la biodégradation de chélatants synthétiques marqué au carbone 14 (EDTA, DTPA, NTA) dans des sédiments profonds (36-376 mètres) contredit les conclusions précédentes. L'évolution du $^{14}\text{CO}_2$, suivie pendant 16 semaines à une température de 22°C, montre que l'addition d'une source de carbone soluble (acétate, succinate, citrate et glutamate) à une concentration de 10 mgC par litre réduit la vitesse de dégradation de ces 3 chélatants dans des sédiments prélevés à 36 et 212 mètres de profondeur.

2-7 INFLUENCE DES NUTRIMENTS MINÉRAUX

D'après McNabb et Dunlap (1975), les nutriments minéraux, tels que l'azote, le phosphore et le soufre seraient présents en quantité suffisante dans le sous-sol.

Cependant, Swindoll *et al.* (1988) montrent qu'une addition d'azote sous forme de nitrate d'ammonium et/ou de phosphore sous forme de phosphate de potassium à un échantillon de sous-sol prélevé dans la zone aquifère du site de Lula entraînait une augmentation significative de la vitesse de dégradation du bromure d'éthylène.

En guise de conclusion aux deux paragraphes précédents, nous pouvons nous appuyer sur les propos de Swindoll *et al.* (1988) pour affirmer que la dégradation de nombreux polluants dans le sous-sol dépend davantage de la faible disponibilité en nutriments organiques et/ou minéraux que de l'absence de microorganismes dégradants.

- PARTIE EXPERIMENTALE -

- PARTIE EXPERIMENTALE COMMUNE -
présentation du site de Cîteaux

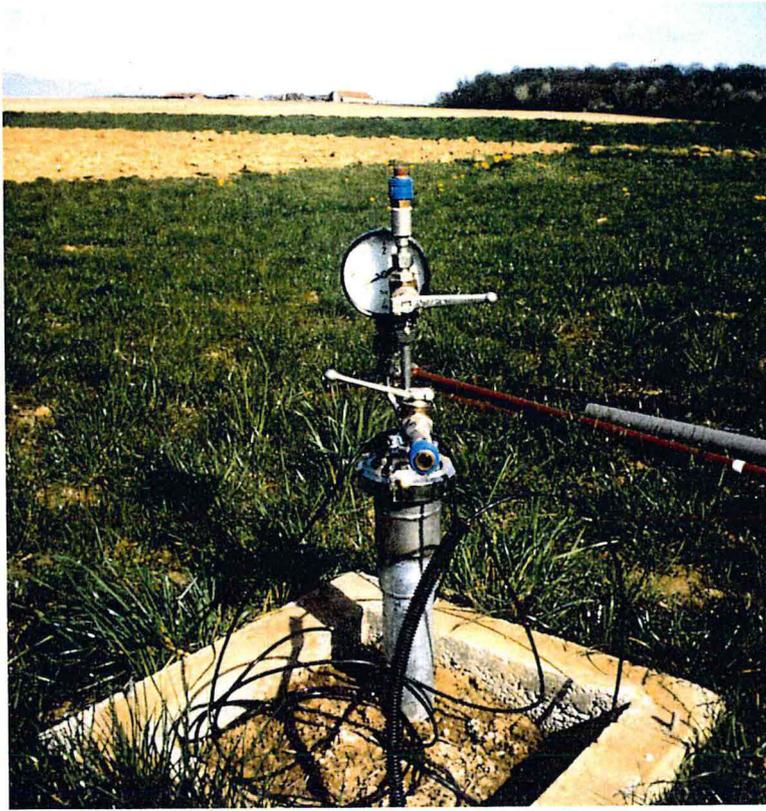


Figure 9 : Dispositif expérimental installé en permanence dans le sol et utilisé pour le suivi des variations de température et d'oxygène dans le sol à différentes profondeurs.



Figure 10 : Prélèvement des échantillons de sol dans des cylindres en plastique de façon à éviter la contamination biologique des différents horizons.

PRESENTATION DU SITE DE CITEAUX

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1- Installation de la station expérimentale.

La station expérimentale est en place sur une parcelle appartenant à l'Abbaye de Citeaux (Cote d'Or). La parcelle se situe dans la région naturelle dite "plaine de la Saône" à une latitude de 47°08'N, une longitude de 5°04'E et à 202 mètres au dessus du niveau de la mer.

Quatre tubes en acier inoxydable de 5 cm de diamètre constitués par les sondes d'un appareil de prélèvement de sol de type "HUMAX" sont implantés à demeure dans le sol à des profondeurs de 1, 2, 3 et 5 mètres (figure 9). Les rallonges successives sont soudées au fur et à mesure de leur enfoncement dans le sol. Parallèlement, les échantillons de sol sont prélevés sans contamination dans des cylindres en plastique (25 cm x 5cm) pour les analyses physiques, chimiques et biologiques (nous ne prélevons que 20 cm de sol dans ces cylindres) (figure 10). L'extrémité supérieure de chaque tube est bouchée par un couvercle hermétique soudé sur place. Sur ce couvercle sont insérés un manomètre et 3 sorties de type Swagelok dont l'une permet le passage d'une sonde à température et les 2 autres des tuyaux en acier inoxydable de 10 mm de diamètre dont un atteint la base du tube correspondant. Extérieurement, ces 2 tuyaux sont connectés à 2 raccords rapides sur lesquels nous pouvons connecter le système de mesure de l'atmosphère du sol et de prélèvement d'échantillons d'air ou d'eau des puits.

Ultérieurement, nous avons allongé le tube de 1 mètre de profondeur de 0,5 mètre car l'extrémité de ce puits se trouvait dans une zone à forte teneur en argile qui bouchait hermétiquement sa base inférieure rendant impossible la mesure de l'atmosphère gazeuse à cette profondeur. Ainsi, nous avons pu suivre les variations de la teneur en oxygène à 1,5 mètres de profondeur.

Ce dispositif est complété par une station météorologique de type CIMEL avec acquisition automatique des données suivantes : température de l'air à 2 mètres, températures du sol à 5, 10, 20 et 50 cm, pluviomètre, ensoleillement.

Enfin, récemment, un puits sec de 3 mètres de profondeur est installé à partir duquel un certain nombre de caractéristiques complémentaires du sol peuvent être mesurées. Il s'agit de sondes capacitatives pour la mesure de la teneur en eau, de sondes de températures et

de bougies poreuses en acier inoxydable pour le prélèvement d'échantillons d'eau. Ces divers capteurs sont placés à différentes profondeurs dans le puits de 3 mètres.

2- Collecte et traitement des échantillons de sol.

Au cours de leur prélèvement, les échantillons de sol sont collectés dans des cylindres en plastique (5 x 25 cm) ce qui permet de limiter les contaminations biologiques entre les différents horizons. Avant utilisation, les 2 premiers centimètres de chaque extrémité du cylindre de sol sont éliminés ainsi que le premier centimètre extérieur du cylindre. Une partie du sol restant, considéré comme non contaminé, est prélevée, séchée à l'air libre puis tamisée à 200 μm . Les analyses physico-chimiques de ces différents échantillons de sol sont réalisées par le laboratoire d'analyses de sols de l'INRA d'Arras. Elles figurent en Annexe 1.

L'autre partie de l'échantillon de sol est grossièrement émiettée à la main, placée dans un sac en plastique fermé hermétiquement et stockée dans une chambre climatisée à 4°C en attente des analyses microbiologiques.

3- Description pédologique du profil de sol.

Elle a été effectuée par la station de Science du sol (INRA, Avignon). Elle est résumée en Annexe 2. Le sol est classé comme un "luvisol rédoxique resaturé par la mise en culture" (Classification R.P.F 1992). Une couche d'accumulation argileuse entraîne, après des épisodes pluvieux, la formation d'une nappe perchée à une hauteur variant entre 1,5 et 2,5 mètres de profondeur.

4- Analyses physiques.

2-1 MESURE DES FLUCTUATIONS DE LA HAUTEUR DE LA NAPPE PHRÉATIQUE.

Sur le site expérimental, 4 piézomètres ont été implantés à des profondeurs respectives de 1,1, 2,1, 3,15 et 4,1 mètres par la station de science du sol (INRA Avignon). La hauteur est crépinée sur 1 mètre. Ils sont disposés en ligne et espacés de 2 mètres.

2-2 MESURES DE LA TEMPÉRATURE DE L'AIR ET DU SOL.

La station météorologique installée sur le site permet de suivre les températures à 2 mètres au dessus de la surface du sol ainsi qu'à 2, 10, 20, 50 cm de profondeur. Les températures à 1, 2, 3 et 5 mètres de profondeur sont mesurées à l'aide de sondes de température PT 100 placées dans les puits et reliées à un enregistreur de données (NCIA). Les températures sont automatiquement enregistrées toutes les 4 heures.

2-2 MESURE DE L'OXYGÈNE DU SOL.

Nous avons effectué des mesures d'oxygène dans les 4 puits 3 à 4 fois par mois au cours de la période allant de mai 1992 à septembre 1993.

2-2-1 Oxygène présent dans l'atmosphère du sol.

Nous avons représenté sur la figure 11 le dispositif de mesure de la teneur en oxygène dans le sol à différentes profondeurs. Le système de mesure est le suivant : une électrode à oxygène (Trioxmatic 600-DU, WTW) connectée à un oxymètre (OXI 160, WTW) est placée dans une jaquette en verre hermétique dont l'entrée est reliée à la sortie d'une pompe à vide et la sortie reliée à une ampoule en verre de 500 ml servant à prélever un échantillon de l'atmosphère du puits. Cette ampoule est munie d'un septum. L'ampoule est, par ailleurs, reliée à la vanne d'entrée du "long" tube présent à l'intérieur du puits. La vanne du tube "court" est reliée à l'entrée de la pompe à vide.

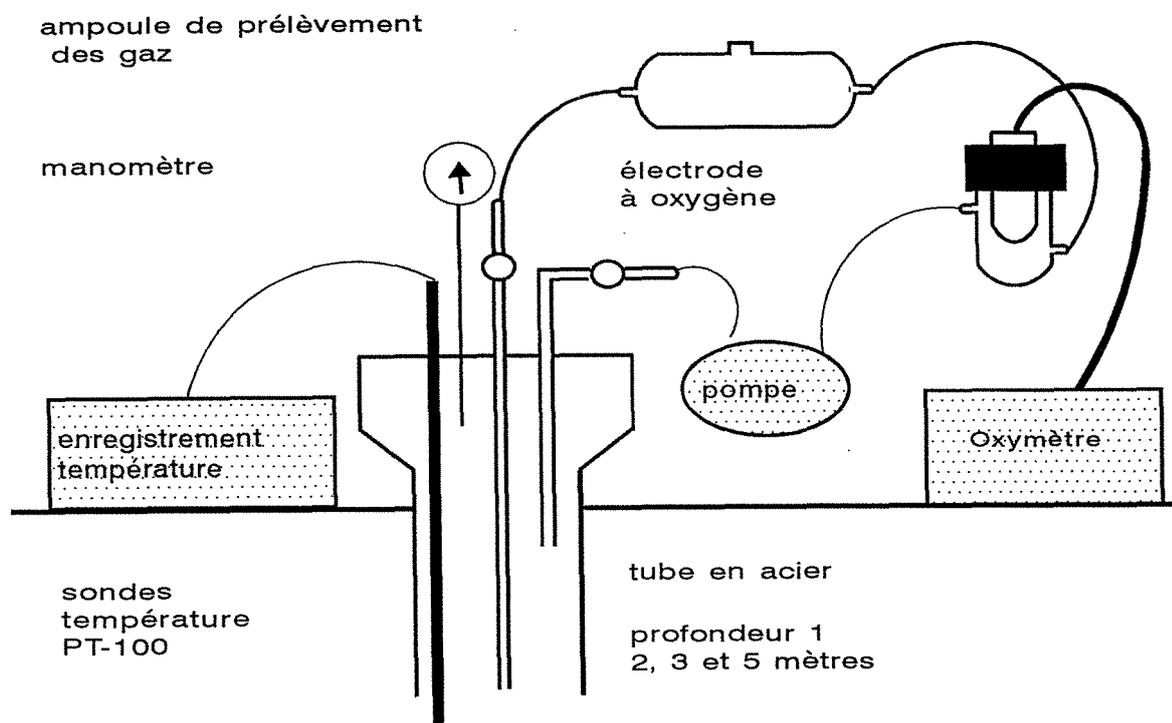


Figure 11 : Dispositif de mesure de l'oxygène dans le sol à différentes profondeurs.

La première étape consiste à faire le vide dans le puits à l'aide de la pompe à vide déconnectée de l'électrode à oxygène. Nous attendons ensuite que la pression indiquée par le manomètre du puits soit revenue à la pression atmosphérique pour effectuer la mesure. Pendant ce temps, l'électrode à oxygène est calibrée dans l'air atmosphérique en ajustant à

100%, après correction de la pression atmosphérique à l'aide du baromètre (WTW). Le circuit de pompage est alors fermé puis la pompe est mise en route pour homogénéiser l'air contenu dans le puits. Durant la circulation des gaz de l'atmosphère du sol, nous injectons 5 ml de krypton à travers le septum de l'ampoule de prélèvement. Lorsque le pourcentage d'oxygène indiqué sur l'oxymètre est constant, la pompe est arrêtée. Nous déterminons ainsi le pourcentage de saturation en oxygène de l'air du sol exprimé par rapport à la teneur en oxygène de l'air atmosphérique. Après fermeture des robinets de l'ampoule de prélèvement, nous prélevons l'équivalent de 2 tubes Vacutainer (Terumo Venous Blood Collection System, Venoject), d'une contenance approximative de 5 ml et sous vide partiel, de gaz pour les analyses de CO₂ effectuées au laboratoire, en chromatographie en phase gazeuse (CPG) Girdel 30 équipé d'un détecteur en catharométrie (Annexe 3).

Au laboratoire, nous avons calculé la contamination par l'oxygène atmosphérique contenu dans le système de mesure constitué de la pompe, des tuyaux, de la sonde à oxygène et de l'ampoule de prélèvement. Nous avons donc déterminé le volume gazeux du dispositif. Pour cela, nous avons injecté 5 ml de krypton dans le système isolé, en circuit fermé, puis nous avons homogénéisé l'atmosphère par une recirculation des gaz de 10 minutes. Nous avons alors prélevé de l'air du système dans 2 tubes Venoject et nous avons dosé le krypton en chromatographie en phase gazeuse. Nous avons utilisé le krypton car c'est un gaz inerte et présent à l'état de traces dans l'atmosphère (0,0001%).

Le volume d'air contenu dans le système (V_m) est de $1610,7 \pm 100,1$ ml. A partir de la formule du volume d'un cylindre ($\pi \cdot r^2 \cdot h$), nous avons calculé le volume intérieur des 4 puits (V_p) : 1,5 mètres ($V_p=2945,2$ ml), 2 mètres ($V_p=3926,9$ ml), 3 mètres ($V_p=5890,5$ ml) et 5 mètres ($V_p=9817,5$ ml).

Le pourcentage de gaz O₂ ou CO₂ dans l'atmosphère des puits est calculé en utilisant la formule suivante :

$$X = \frac{(Y \times V_t) - (Z \times V_m)}{V_p} \quad (1)$$

X : valeur corrigée de la teneur en gaz (en %)

Y : valeur mesurée de la teneur en gaz (en %)

Z : valeur de la teneur en oxygène (21%) ou en gaz carbonique (0,03%) dans l'atmosphère de l'air.

V_t : volume total ($V_p + V_m$).

Après 0,5 , 1, 2 et 3 heures, nous avons aussi contrôlé l'étanchéité du système de mesure de l'oxygène en prélevant 0,5 ml d'air dans lequel nous avons dosé le krypton en CPG.

2-2-2 Oxygène dissout dans l'eau souterraine.

Sur la figure 12 est schématisé le système utilisé pour la mesure de l'oxygène dissout et le prélèvement d'échantillons d'eau. L'air contenu dans la partie supérieure du puits est comprimée par l'intermédiaire d'une pompe branchée sur la vanne du tube "court" tandis que la vanne du tube "long" est reliée à l'électrode à oxygène contenue dans sa jaquette hermétique. Sous la pression, l'eau contenue dans le puits remonte dans le tube "long" et passe sur l'électrode à oxygène préalablement calibrée à l'air. Nous attendons que la jaquette soit pleine puis nous récupérons l'équivalent d'un flacon à plasma en verre (V=250 ml) d'eau dont nous mesurons la température. Nous notons la valeur du pourcentage de saturation de l'oxygène après la stabilisation de celle-ci. Nous vidons ensuite le puits puis nous attendons le retour à la pression atmosphérique. Nous effectuons une deuxième mesure de l'oxygène dans les puits qui est considérée comme la mesure de la teneur en oxygène réellement présente au moment du prélèvement. A l'aide d'abaques, nous déterminons ensuite la teneur maximale en oxygène dissout dans de l'eau saturée en air à une température donnée. En multipliant cette valeur par le pourcentage de saturation en oxygène mesuré au champ (deuxième mesure), nous obtenons la teneur en oxygène dissout dans l'eau prélevée dans chacun des puits.

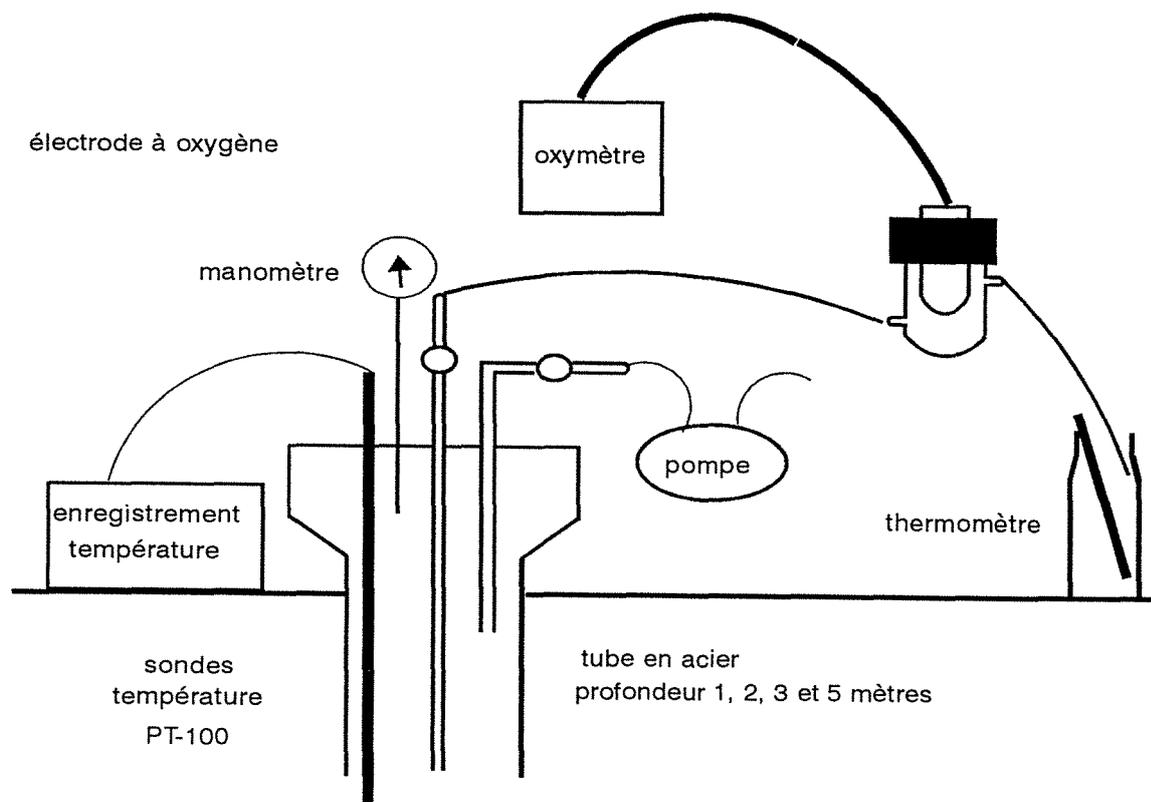


Figure 12 : Dispositif de mesure de la teneur en oxygène dissout de l'eau souterraine.

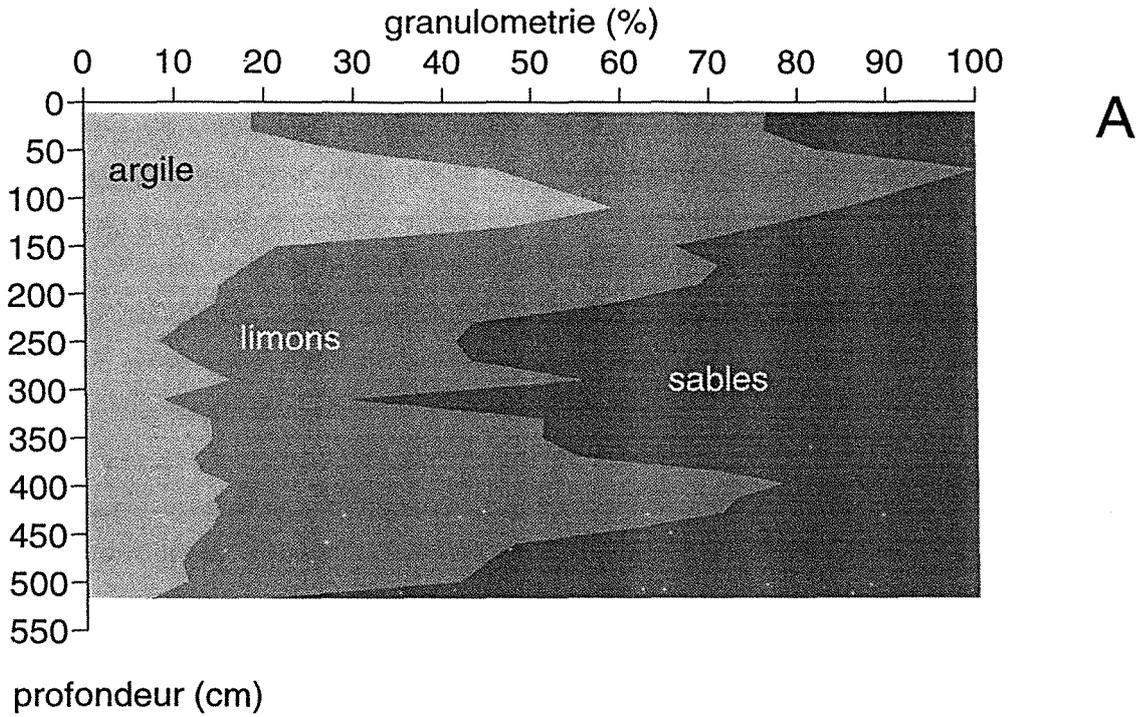


Figure 13 : Teneurs en argile, en limons et en sables du profil du sol de Cîteaux (5 mètres de profondeur).

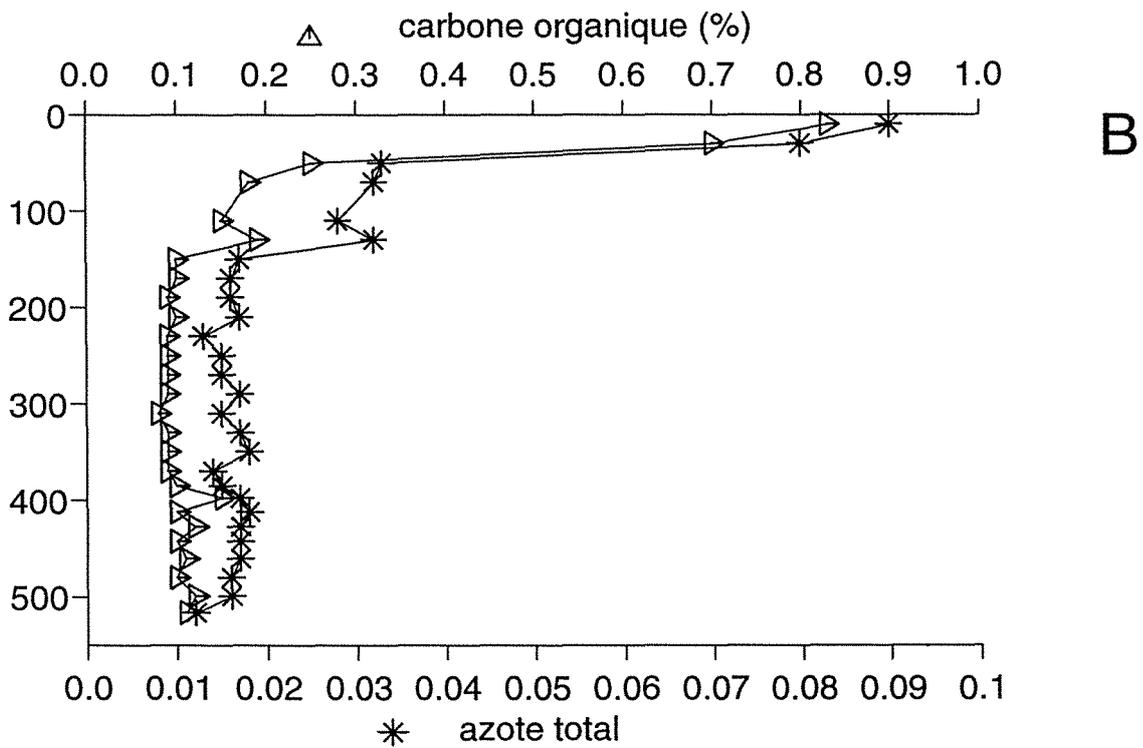


Figure 14 : Teneurs en carbone organique et en azote total dans le profil de sol de Cîteaux (5 mètres de profondeur).

RESULTATS

1- Caractéristiques physico-chimiques des sols récupérés.

Les principaux résultats de ces analyses sont rapportés sur les figures 13 et 14. Les points les plus remarquables concernent d'abord l'augmentation de la teneur en argile que nous observons entre 60 et 140 cm de profondeur et qui représente entre 45,9% et 59% de la granulométrie totale. Par ailleurs, la teneur en sables augmente avec la profondeur, elle atteint 80% à 5 mètres de profondeur. Les teneurs en carbone organique et en azote total sont de 0,83% et de 0,09% respectivement en surface, décroissent jusqu'à 0,18% et 0,032% respectivement au-dessous de 60 cm de profondeur. Le pH du sol ne varie pas significativement avec la profondeur et est compris entre 7 et 7,5. La Capacité d'Echange de Cations (CEC) est de 10 méq.100g⁻¹ sol en surface, comprise entre 21 et 28 méq.100g⁻¹ sol dans la zone argileuse (60-140 cm) et redescend entre 3,9 et 7,6 méq.100g⁻¹ sol au-dessous de 140 cm. Le complexe CEC est saturé en calcium (Annexe 1).

2- Fluctuations de la nappe phréatique.

Sur la figure 15 sont représentées les fluctuations de la nappe pendant la période de juin 1993 à janvier 1994. La hauteur de la nappe fluctue entre 1 mètre et 2,5 mètres de profondeur avec une remontée jusqu'à 0,5 mètre lors de forts épisodes pluvieux.

3- Mesures de la température du sol.

Les fluctuations saisonnières de la température à différentes profondeurs du sol sont représentées sur les figures 16 et 17. D'une manière générale, nous observons que des variations cycliques de températures atténuées en profondeur. Deux exemples de température hivernale et estivale sont données dans les encadrés A et B de la figure 16. En été 1993, le maxima de température à 2 cm de profondeur est comprise entre 23 et 28°C, à -10 cm il fluctue entre 22 et 24°C, il est égal à 21°C à -20 cm et à 20°C à -50 cm. En hiver 1992-1993, les maxima de températures sont respectivement de -1°C, de 1°C, de 3°C et de 5°C pour les profondeurs précédentes.

La figure 17 représente les fluctuations des températures enregistrées dans les puits à 1,5, 2, 3 et 5 mètres de profondeur ainsi que la température de l'air. A cause de problèmes techniques, nous ne disposons pas des relevés automatiques de températures avant juin 1993. Nous observons que la température à 5 mètres reste à peu près constante et est comprise entre 11 et 13°C.

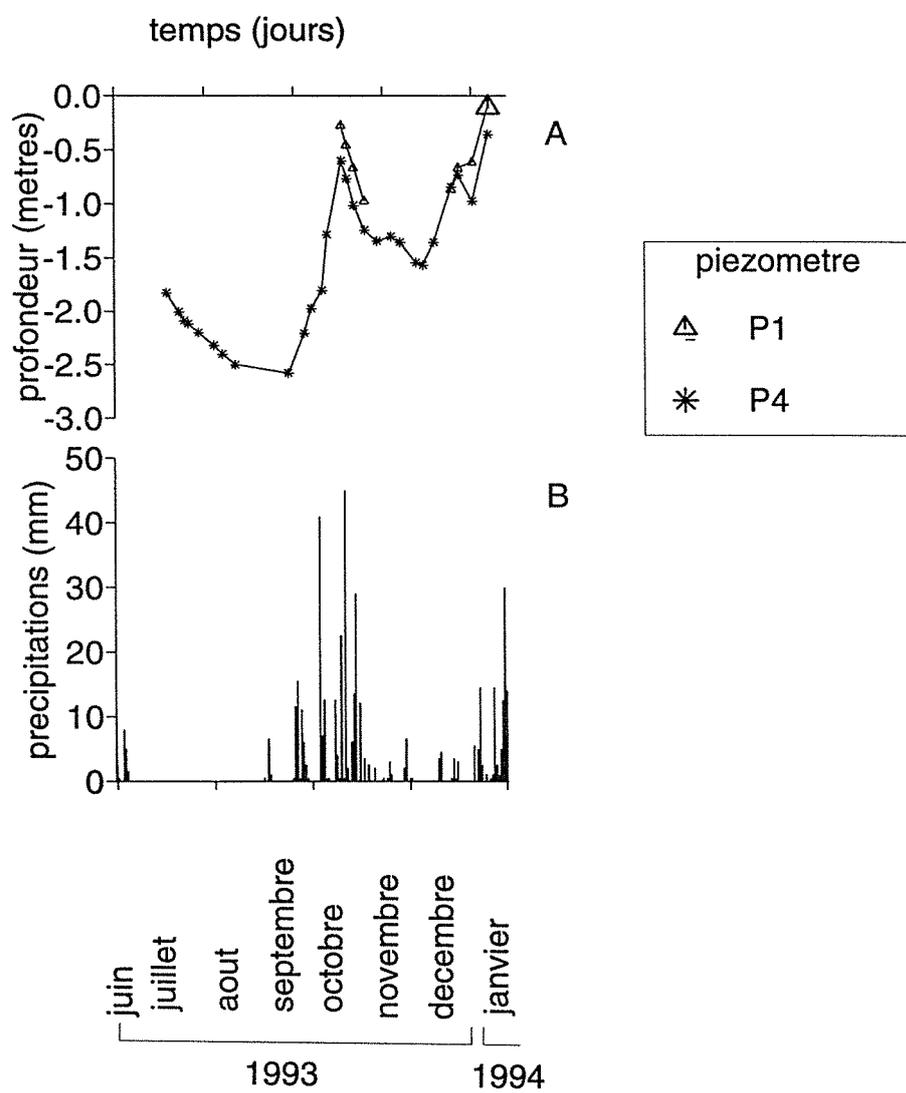


Figure 15 : Fluctuations de la nappe phréatique dans le sol de Cîteaux pendant la période de juin 1993 à janvier 1994.

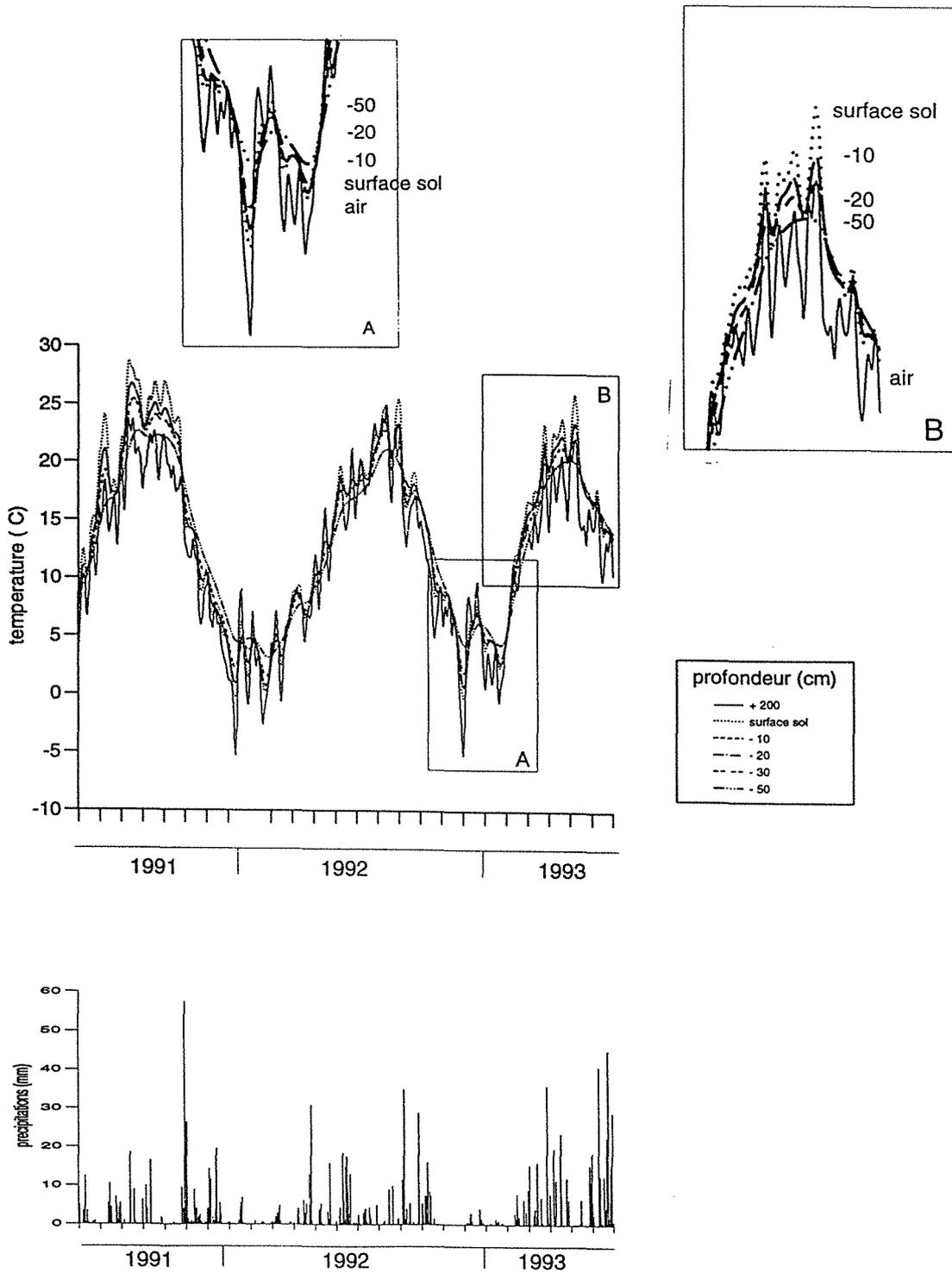


Figure 16 : Variations saisonnières de la température dans l'air atmosphérique (2 mètres), à 2, 10, 20 et 50 cm de profondeur dans le sol de Cîteaux pendant la période 1992 et 1993.

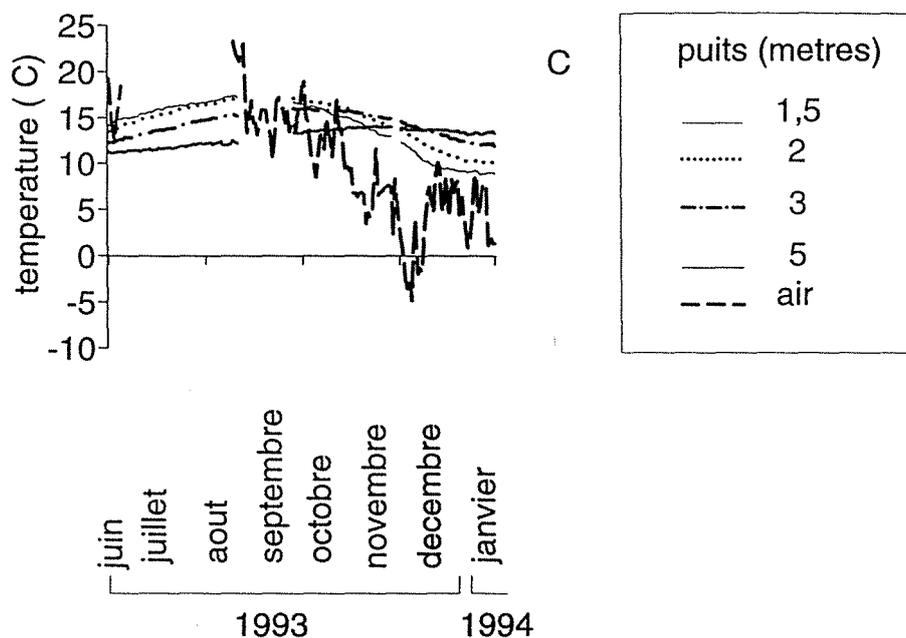


Figure 17 : Variations saisonnières de la température (A) dans l'air atmosphérique, à 1,5, 2, 3 et 5 mètres de profondeur dans le sol de Cîteaux pendant la période 1993 et des précipitations (B).

4- Mesures de l'oxygène et du gaz carbonique du sol.

Les figures 18 et 19 donnent les fluctuations saisonnières des teneurs en l'oxygène et en gaz carbonique dans l'atmosphère ou dans l'eau des différents puits durant la période allant de mai 1992 à septembre 1993.

Durant la période comprise entre novembre 1992 et février 1993, le puits de 1,5 mètre de profondeur contient de l'eau (Figure 18A). Entre mai 1992 et début novembre 1992, la teneur en oxygène est comprise entre 12% et 18,8%. Durant la période hivernale, de mi-novembre 1992 à début février 1993, la base du puits est noyée et la concentration en oxygène dissous est comprise entre 8,2 et 12,3 mg.l⁻¹. Par comparaison avec les valeurs en oxygène dissous dans de l'eau saturée par de l'air, le pourcentage de saturation de l'eau par l'oxygène, à cette profondeur, est compris entre 72 et 97%. A partir de mi-février 1992, le pourcentage d'oxygène dans l'atmosphère du sol prélevée à 1 mètre de profondeur, est compris entre 14,5 et 19,1%. Notons que pendant la période allant de fin juillet 1993 à mi-août 1993, la teneur en oxygène diminue (de 15,5 à 14,5%). D'après nos résultats, le pourcentage de CO₂ est compris entre 0,2 et 5,8%, ce qui représente des valeurs 10 à 100 fois supérieures à celle de l'atmosphère terrestre (figure 18A).

Pendant les périodes d'inondation du puits de 2 mètres de profondeur comprise entre mai 1992 et juillet 1992, puis entre novembre 1992 et mars 1993, enfin entre juillet 1993 et septembre 1993, la teneur en oxygène dissous prélevé à la base du puits est comprise entre

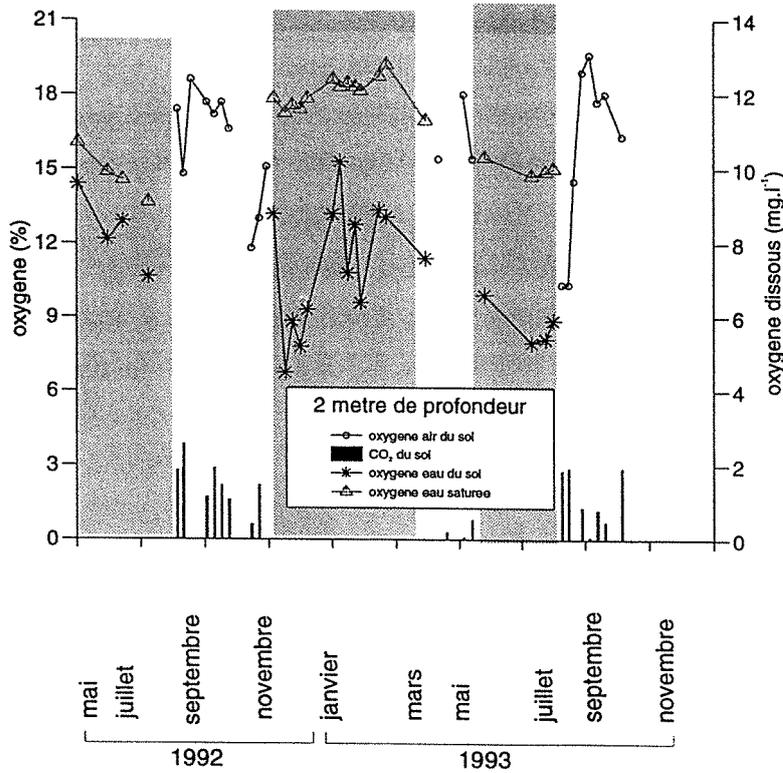
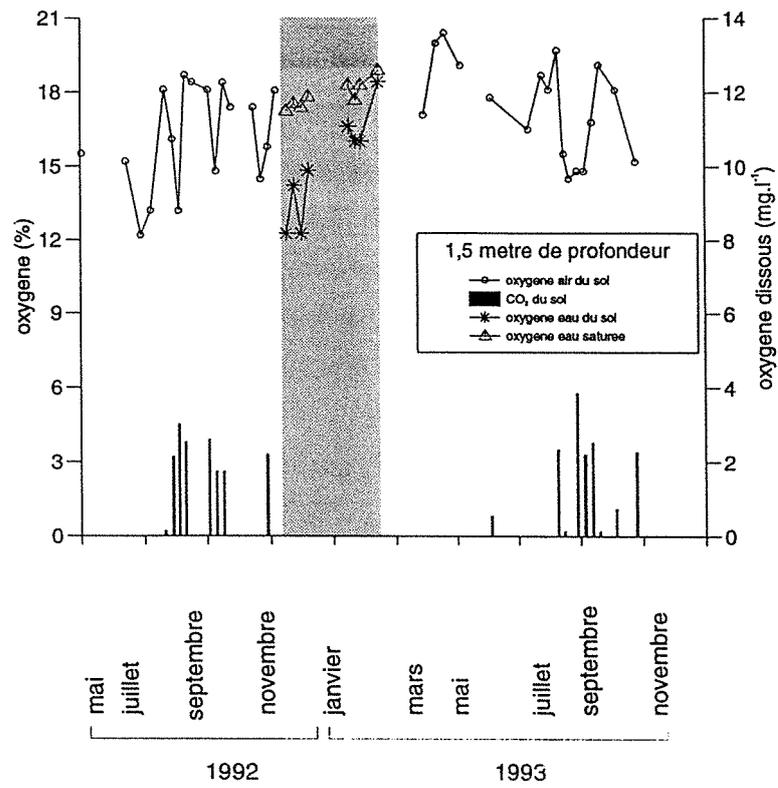


Figure 18 : Fluctuations saisonnières de la teneur en oxygène et en gaz carbonique à 1,5 (A) et 2 (B) mètres de profondeur. Les zones grises correspondent aux mesures d'oxygène dissous dans l'eau présente dans le puits.

7,1 et 9,6 mg.l⁻¹ ce qui correspond à des taux de saturation en oxygène variant de 39 à 73% (figure 18B). Pendant les périodes "sèches", nous avons mesuré les teneurs en oxygène dans l'atmosphère gazeuse variant de 10 à 18,6%.

A 3 et 5 mètres de profondeur, la base des puits se trouve en permanence dans la nappe phréatique. Sur la figure 19 sont représentées les fluctuations de la teneur en oxygène dissous dans les puits de 3 (Figure 19A) et 5 (Figure 19B) mètres. Nous observons de grandes fluctuations dans les mesures qui oscillent entre 1,5 et environ 9 mg.l⁻¹ d'oxygène ce qui correspond à des taux de saturation compris entre 15 et 80%. Paul et Clark (1989b) considèrent que le passage du métabolisme anaérobie au métabolisme aérobie se produit à une concentration en oxygène inférieure à 1%. Ainsi, jusqu'à 5 mètres de profondeur nous retrouvons une concentration en oxygène qui semble compatible avec des conditions aérobies.

DISCUSSION

1- Mesures de températures

Nos résultats sont en accord avec les mesures de température publiées dans la littérature. Les fluctuations de températures décroissent avec l'augmentation de la profondeur. Si nous comparons nos données avec des mesures similaires effectuées par Takagi *et al.* (1992) sur les sites de Laacherhof et de Monchengladbach en Allemagne, nous observons le même type de tendance. Par comparaison avec les températures mesurées sur le site de Monchengladbach où les variations de températures de l'air sont similaires aux nôtres, la température à 1 mètre varie dans le même sens que celle de l'air et la température à 3 et 5 mètres est de 10°C. Mais nous ne disposons pas suffisamment de données pour dessiner une tendance générale des fluctuations de température en fonction de la profondeur. La seule conclusion que nous pouvons tirer de nos résultats est que les températures sont relativement constantes en profondeur et qu'elles permettent une activité microbienne.

2- Mesures d'oxygène et de gaz carbonique.

Nous n'avons pas observé de tendance bien nette dans l'évolution de la teneur en oxygène que les mesures soient effectuées en phase gazeuse ou liquide. Patrick (1977) observe, sous culture de coton, une diminution jusqu'à 120 cm de profondeur de la teneur en oxygène dans l'atmosphère du sol de 21% à 4% à 120 cm de profondeur. Cette diminution est particulièrement marquée au mois de juin et est due à la respiration racinaire

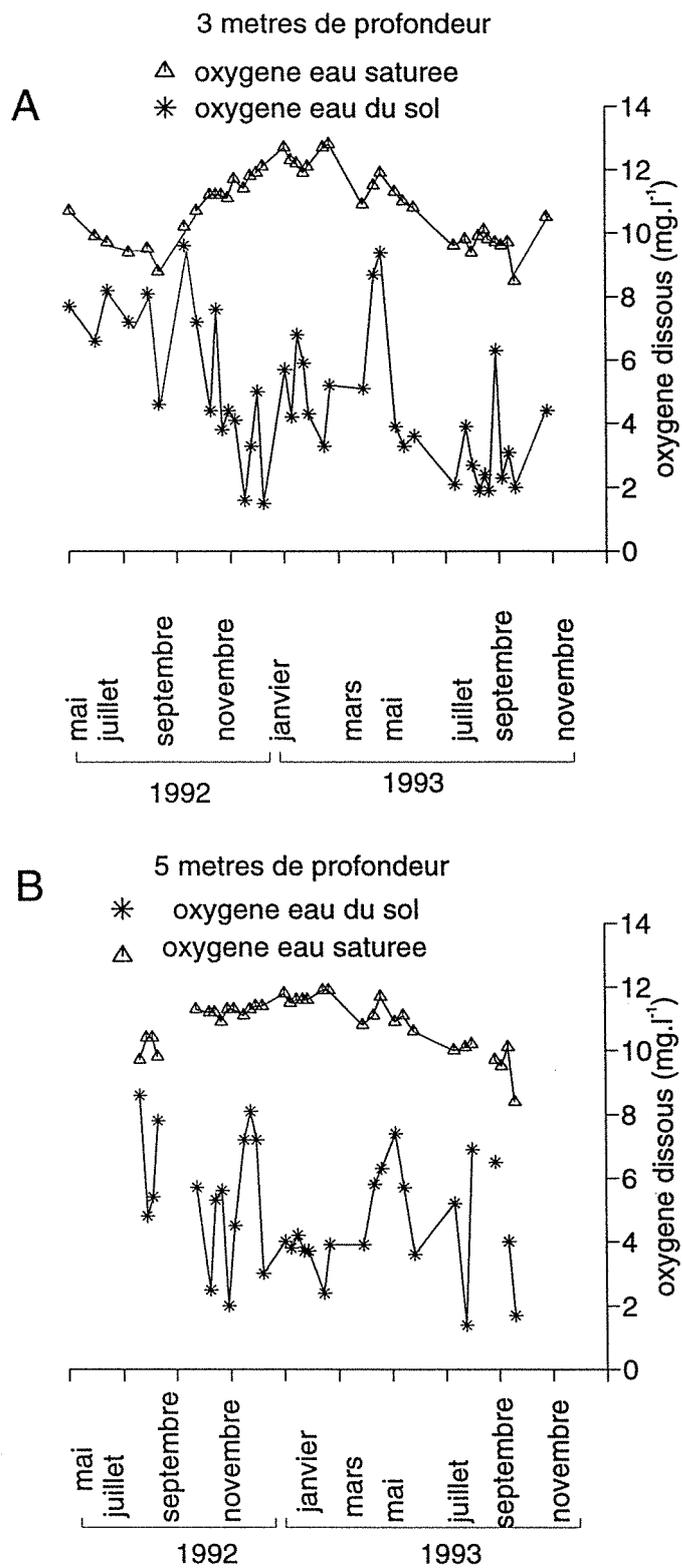


Figure 19 : Fluctuations saisonnières de la teneur en oxygène à 3 (A) et 5 (B) mètres de profondeur.

de la culture et à l'activité microbienne dans le sol. Dans notre cas, la parcelle n'est pas en culture ce qui peut expliquer l'absence de variations de la concentration en oxygène.

En utilisant le même système de mesure sur 2 sites expérimentaux différents qui sont Laacherhof et Monchengladbach en Allemagne, Takagi *et al.* (1992) ont montré que les variations de la concentration en oxygène étaient liées aux variations saisonnières et étaient plus importantes à 1 mètre qu'à 3 et 5 mètres de profondeur. A 1 mètre, durant la période de mai à septembre, le pourcentage d'oxygène est compris entre 16 et 18%, puis cette valeur augmente jusqu'à 19-20% d'octobre à avril dans le sol sableux de Laacherhof. Dans le sol limoneux de Monchengladbach, le pourcentage d'oxygène est plus faible, compris entre 15 et 18%. Les différences de la teneur en oxygène dans ces 2 sols sont probablement dûes aux différences de texture des sols. Dans le sol de Cîteaux, nous pouvons supposer que la couche à teneur élevée en argile présente entre 60 et 140 cm joue probablement un rôle important dans la détermination de la teneur en oxygène notamment en limitant les transferts gazeux de la surface vers la profondeur.

Les valeurs des teneurs en gaz carbonique que nous avons mesurées à 1,5 et à 2 mètres de profondeur sont de 10 à 100 fois plus élevées que celle que l'on trouve dans l'atmosphère du sol de surface. Ces résultats sont comparables à ceux qu'ont obtenus Thorstenson *et al.* (1983) qui ont mesuré les concentrations en CO₂ et en O₂ dans différents profils de sol issus des grandes plaines de l'Ouest américain à différentes périodes de l'année (tableau 5).

Profondeur (mètres)	CO ₂ (%)	O ₂ (%)
surface	0,033	21
3	0,98-2,3	15,2-20,3
5,8	1,23-1,74	17,4-19,7
8,3	0,95-1,21	17,6-19,6

Tableau 5 : Variations annuelles des teneurs en oxygène et en gaz carbonique dans la zone non saturée d'un profil de sol de 10 mètres de profondeur (Thorstenson *et al.*, 1983).

Wood *et al.* (1993) ont observé une diminution de la concentration en oxygène et une augmentation de la concentration en CO₂ avec la profondeur ainsi qu'une similitude entre les profils de CO₂ et de températures qui variaient dans le même sens. Cette évolution opposée aux teneurs en oxygène et en CO₂ avec la profondeur suggère une consommation de l'oxygène par les microorganismes qui, en retour, produisent du CO₂. Cette hypothèse a

été mise en évidence par les auteurs précédents qui ont analysé l'enrichissement isotopique en carbone 13 du gaz carbonique présent à différentes profondeurs de la zone non saturée. Cet enrichissement est compris entre -19,2 et -26,57 pour mille, signe que le CO₂ provient de l'oxydation du carbone organique. Si la respiration racinaire peut influencer ce facteur en surface, ce n'est pas le cas au delà de 0,5 mètre.

Concernant la mesure de la concentration en oxygène dissous, les valeurs que nous avons trouvées sont probablement légèrement surestimées, compte tenu de l'oxygène contenu dans l'air atmosphérique que nous comprimons pour assurer la remontée de l'eau dans le puits et dont une partie se dissout probablement dans l'eau. Faulkner *et al.* (1989) mesurent la teneur en oxygène et le potentiel rédox à 30 cm de profondeur dans des sols saturés et non saturés. Ils mettent en évidence un effet de la saturation en eau du sol sur la concentration en oxygène du sol. A 30 cm, un sol dont la hauteur de la nappe se situe à 1,2 mètre, contient de 18 à 20% d'oxygène. Par contre, dans un sol saturé, cette concentration diminue à 4%.

LES SOLS, LES PRODUITS

1 LES SOLS

1-1 Prélèvement des sols et analyses biologiques.

En septembre 1990 lors de l'installation des différents puits sur le site expérimental, nous avons collectés tous les 20 cm des échantillons provenant de 4 profils de sol atteignant 1, 2, 3 et 5 mètres de profondeur. Nous avons réalisés les dénombrements de la microflore sur boites ainsi que la mesure du carbone microbien. De plus, des études de minéralisation de composés organiques tels que le glucose, l'acétate, l'acide benzoïque, le 2,4-D et l'atrazine ont aussi été accomplies.

En décembre 1991, des prélèvements de sol jusqu'à 1,5 mètres de profondeur ont été effectués. Ils ont servi pour des recherches sur la capacité dégradante de la microflore du sol vis à vis du glucose, de l'acide acétique et de l'acide benzoïque, ainsi que pour des mesures de biomasse microbienne par des techniques biocidales. Nous avons refait les mêmes analyses dans un sol plus humide car lors du prélèvement en septembre 1990, le sol était très sec.

En juillet 1992, nous avons prélevés des échantillons de sol jusqu'à 2,5 mètres de profondeur. Sur ces sols, nous avons pu étudier l'activité hétérotrophe de la microflore et approfondir les comparaisons des méthodes d'estimation du carbone microbien dans le sous-sol.

1-2 Conditionnement des échantillons de sol.

Avant utilisation des échantillons de sol et de sous-sol prélevés avec le système HUMAX et conservés dans des cylindres de plastique, les extrémités des carottes de sol ainsi que la partie extérieure du cylindre, sur une épaisseur de 1 centimètre, sont éliminées. Seule la partie centrale du cylindre est utilisée pour les analyses microbiologiques. Le sol provenant de chaque horizon est désagrégé à la main et placé dans des sacs en plastique fermés hermétiquement. Les sols sont conservés dans une chambre à 4°C dans les conditions d'humidité du sol en place.

1-3 Préparation des échantillons de sol.

Les échantillons de sol dont l'humidité est supérieure à l'humidité équivalente sont séchés de la façon suivante. La quantité de sol, nécessaire à l'expérience, est placée dans une boîte en plastique puis nous déposons un tamis contenant des cristaux de silicagel régénéré à 170°C (couleur bleue) et la boîte est fermée hermétiquement. Nous suivons le déséchage en prélevant 2 à 3 grammes de sol dont nous mesurons la teneur en eau à l'aide d'une balance à humidité.

Toutes les expériences ont été conduites sur des échantillons de sol émiétés manuellement sauf dans certains cas où nous avons tamisés les sols à 2 mm et à humidité équivalente.

2- LES PRODUITS UTILISÉS

2-1 Produits marqués et froids.

Le tableau 6 suivant récapitule les caractéristiques des produits radioactifs utilisés pour toutes les expériences. Les produits ont été fournis par Amersham (2,4-D, acide acétique, atrazine), CEA (glucose) et Sigma (acide benzoïque).

Nom	Formule	Marquage	Activité spécifique	Pureté
commun	moléculaire		de la solution mère	radiochimique
		GBq.mmol ⁻¹	%	
<i>Pesticides</i>				
2,4-D	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	chaîne 2	2,07	99
2,4-D		cycle	1,7	99
atrazine	C ₈ H ₁₄ ClN	éthyl 1	0,925	98
atrazine		cycle	0,198	99
<i>Composés organiques naturels</i>				
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	molécule	10,8	98
Acétate de sodium	NaO ₂ C ₂ H ₃	molécule	1,92	98,9
Acide benzoïque	C ₇ H ₆ O ₂	cycle	0,555	98

Tableau 6 : Principales caractéristiques des produits radioactifs utilisés.

Nous avons utilisé les mêmes produits non marqués sous forme de poudre :

* 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique), PM = 221,04, pureté chimique de 95% (Fluka).

- * atrazine (2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine), PM = 215,7, pureté chimique de 99,65%.
- * D(+) glucose anhydre, PM = 180,16, pureté chimique de 99% (Prolabo).
- * Acétate de sodium, PM = 82.03, pureté chimique de 98% (Prolabo).
- * Acide benzoïque, PM = 122, pureté chimique de 99% (Prolabo).

2-2 Préparation des solutions de traitement.

Les solutions de traitement des produits ont été préparées en mettant à évaporer la quantité adéquate de solution-mère de produit radioactif. Après quoi, nous avons rajouté une quantité de solution de produit froid pour obtenir la concentration et la radioactivité voulues. La solution d'acide benzoïque a été neutralisée (pour faciliter sa dissolution) avec de la soude 0,1 M. Les quantités de produit radioactif et de produit froid seront détaillées lors de la description de chaque expérience.

- PREMIERE PARTIE EXPERIMENTALE -

**méthodes d'estimation de la taille de la
microflore du sous-sol**

- PREMIÈRE PARTIE EXPÉRIMENTALE -
METHODES D'ESTIMATION DE LA TAILLE DE LA
MICROFLORE

INTRODUCTION

Leach (1984) et Balkwill (1989) ont passé en revue les différentes techniques qui ont été appliquées à l'estimation de la taille des populations microbiennes du sous-sol.

1- Les techniques de dénombrement.

1-1 LE DÉNOMBREMENT PAR EXAMEN MICROSCOPIQUE DIRECT.

La technique de comptage AODC (Acridine Orange Direct Count) consiste à colorer les cellules microbiennes avec un fluorochrome, l'acridine orange, qui se lie à la double hélice de la molécule d'ADN en rendant les cellules visibles en microscopie à épifluorescence (Trolldenier, 1973). Les cellules microbiennes fluorescent en vert par opposition avec les particules de sol qui sont colorées en orange. Cette technique permet d'estimer le nombre total de cellules vivantes et mortes dans un environnement donné. Ghiorse et Balkwill, en 1985, ont modifié cette technique, utilisée pour des échantillons d'eaux, pour l'observation des sédiments. Dans la technique modifiée, l'échantillon de sol est dilué puis fixé avec un mélange de glutaraldéhyde et d'agar.

Cette technique couplée avec l'utilisation d'un indicateur rédox tel que le chlorure de 2-(p-iodophényl)-3-(p-nitrophényl)-5-phényltétrazolium (INT) permet la distinction entre les cellules viables et mortes. En effet, le système de transport d'électrons des organismes actifs réduit l'INT en INT-formazan (INTF) rouge foncé qui s'accumule dans la cellule la rendant repérable en microscopie à épifluorescence. Par cette technique AOINT (Acridine Orange INT réduction), les cellules non viables dont le transport des électrons ne fonctionne plus ne peuvent réduire l'INT et peuvent donc être distinguées des précédentes (Webster *et al.*, 1985).

L'utilisation du fluorochrome fluoresceine diacétate (FDA) permet de dénombrer les champignons actifs dans une suspension de sol. Cette technique consiste en l'absorption du fluorochrome FDA par les champignons présents dans une suspension homogène de sol dans du tampon phosphate. Après absorption, le fluorochrome non fluorescent au départ est clivé par une estérase en acétate et en fluoresceine fluorescente. L'observation en microscopie électronique à épifluorescence permet de distinguer les hyphes actives dans la suspension de sol (Paul et Clark, 1989). Mais une partie des hyphes est endommagée lors

de la préparation de la suspension de sol. Ceci entraîne une perte de la fluorescence qui va, par conséquent, sous-estimer la biomasse fongique (Domsch *et al.*, 1979).

Par exemple, le nombre de cellules fluorescentes diminue peu avec la profondeur et il est de l'ordre de 10^9 à 10^7 cellules.g⁻¹ de sol (Wilson *et al.*, 1983). Ce résultat corrobore ceux de Webster *et al.* (1985) qui ont dénombré par la technique AODC de $7 \cdot 10^6$ à $9 \cdot 10^6$ cellules.g⁻¹ sol dans un horizon de 6,3 mètres de profondeur et par la technique AOINT de $0,2 \cdot 10^6$ à moins de $0,14 \cdot 10^6$ cellules.g⁻¹ sol entre 3,1 et 6,3 mètres de profondeur. Ainsi, d'après cet exemple, 10^4 à 10^5 cellules g⁻¹sol seraient métaboliquement actives dans le sous-sol (Webster *et al.*, 1985).

Ces techniques présentent des avantages et des inconvénients :

(i) elles permettent de visualiser la taille et la morphologie des cellules microbiennes présentes. C'est ainsi que Ghiorse et Balkwill (1985) ont mis en évidence que le sous-sol était peuplé d'une majorité de cellules bactériennes dont la taille n'excédait pas 1 micromètre de longueur,

(ii) elles permettent de déterminer le nombre de cellules métaboliquement actives,

(iii). elles sont longues et fastidieuses car de nombreuses étapes sont nécessaires : dilution et fixation de l'échantillon à analyser, préparation et coloration des cellules pour le comptage en microscopie à fluorescence, comptage des cellules fluorescent en vert.

1-2- LES DÉNOMBREMENTS SUR MILIEU DE CULTURE.

1-2-1-1 La technique du Nombre le Plus Probable (NPP).

Elle permet l'estimation de la densité des populations microbiennes. Nous réalisons une série de suspensions-dilutions du sol à analyser dans des tubes contenant un milieu de culture liquide (3 à 5 tubes par dilution). Après incubation, nous effectuons une lecture des tubes qui sont comptés positifs si un trouble apparaît ou si la densité optique mesurée par turbidimétrie augmente de façon significative indiquant une croissance microbienne. Ils sont négatifs dans le cas contraire. Le NPP est déterminé de la façon suivante :

- l'examen des tubes permet d'accéder à un "nombre caractéristique" à trois chiffres dont le premier est le nombre de tubes positifs de la dernière dilution où le maximum de tubes sont positifs, les deux chiffres suivants représentant les nombres de tubes positifs des deux dilutions suivantes,

- à l'aide de tables de Mc Grady, ce nombre de 3 chiffres est converti en nombre le plus probable de micro-organismes, NPP, présent dans la dilution correspondant au second chiffre,

- en multipliant par le facteur de dilution approprié, nous obtenons le nombre de micro-organismes présents dans l'échantillon de sol de départ (Alexander, 1982).

1-2-1-2 Le comptage sur boîtes.

Il permet aussi de dénombrer les micro-organismes viables. Des suspensions-dilutions de sol sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture gélosé. Après incubation des boîtes dont la durée et la température vont dépendre des micro-organismes étudiés, les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies sont comptées (Wollum II, 1982).

Les inconvénients et les avantages sont les suivants :

(i) le manque de précision des dénombrements. Seulement 1 à 10% de la microflore du sol est détectée par les techniques de comptage indirect (Alexander, 1977). De plus, seulement 0,1 à 1% des bactéries observées en microscopie à fluorescence sont capables de former des colonies sur milieu gélosé (Olsen et Bakken, 1987).

(ii) la sélectivité des milieux. Les deux techniques de dénombrement précédentes sont sélectives à cause du milieu et des conditions de culture utilisées car nous ne connaissons pas de milieu suffisamment universel pour permettre la croissance de l'ensemble des micro-organismes présents dans un sol (Wollum II, 1982). Un exemple qui reflète cette observation est l'étude comparative d'Olsen et Bakken (1987) qui ont dénombré des bactéries du sol sur différents milieux de culture gélosés. Les dénombrements bactériens effectués sur milieux YP (milieu à base de peptone et d'extrait de levure), SEG (milieu minéral additionné d'extrait de sol et de glucose) ou celui de Thornton (milieu minéral additionné d'asparagine et de mannitol) sont 3 à 5 fois inférieurs aux dénombrements effectués sur milieux PS (extrait de sol additionné de phosphate de potassium) et CSEA (extrait de sol additionné d'une solution tampon et d'une source de nutriments). La conclusion des auteurs est que la croissance des bactéries serait inhibée par les concentrations trop élevées en composés organiques et minéraux des trois premiers milieux de culture testés par comparaison aux milieux PS et CSEA. De façon similaire, des comptages de bactéries provenant d'échantillons du sous-sol effectués sur des milieux standards dilués tels que PTYG (milieu à base de peptone, de tryptone, d'extrait de levure et de glucose) dilué au 1/20^{ème} ou SSA (extrait de sol gélosé) donnent des résultats 3 à 4 fois supérieurs à ceux effectués sur le milieu non dilué PTYG (Balkwill et Ghiorse, 1985). Une hypothèse avancée par ces auteurs serait que la croissance des micro-organismes oligotrophes du sous-sol adaptés aux conditions de pénurie carbonée du milieu serait inhibée par la teneur élevée en nutriments des milieux de culture usuels même si certains d'entre eux peuvent se développer sur des milieux à "forte" concentration en carbone. Ceci est confirmé par Brockman *et al.* (1992) qui ont mis en évidence que le nombre de cellules métaboliquement actives, obtenu par la technique AOINT, était 2 à 3 fois supérieur à celui obtenu par comptage sur boîtes.

De nombreux milieux pour dénombrement de la microflore totale sont disponibles, mais le milieu à base d'extrait de sol est souvent utilisé, car il est sensé refléter la composition de la solution du sol (source de nutriments pour les micro-organismes indigènes). Un inconvénient de ce milieu est l'incapacité à standardiser sa composition. Angle *et al.* (1991) ont élaboré un milieu de culture dont la composition en nutriments est proche de celle de la solution du sol étudié. Ce milieu contient les éléments minéraux en quantité similaire à celle de la solution du sol.

(iii) un des avantages majeurs de la technique de dénombrement sur boîte est la possibilité d'isoler les colonies en vue d'une identification par des systèmes API ou BIOLOG et même d'envisager une caractérisation génotypique des souches.

2- Les méthodes indirectes

2-1 LES MÉTHODES BIOCIDALES.

2-1-1 La méthode de Fumigation-Incubation (FI).

Elle a été mise au point par Jenkinson et Powlson (1976). Elle est basée sur le traitement d'un échantillon de sol avec des vapeurs de chloroforme dans le but de tuer la majorité des micro-organismes. Le sol fumigé est ensuite incubé durant 10 jours à 25°C. Le carbone provenant de la microflore tuée est utilisé par la biomasse microbienne survivante comme substrat facilement assimilable. La minéralisation de l'échantillon de sol fumigé est comparée à celle d'un échantillon de sol non fumigé pris comme témoin dont la définition varie selon les auteurs et le traitement de l'échantillon de sol.

Le carbone qui était présent dans la biomasse microbienne avant fumigation est estimé par la différence entre la quantité de C-CO₂ libérée par l'échantillon fumigé et celle libérée par l'échantillon non fumigé divisée par un coefficient K_c qui tient compte du fait que le carbone minéralisé ne représente qu'une partie du carbone réellement utilisé par la microflore qui se redéveloppe après fumigation. L'expression de la biomasse s'écrit donc selon la formule suivante :

$$B = \frac{F - C}{K_c} \quad (2)$$

Dans l'équation (2), F et C (exprimés en mg C unité⁻¹ poids de sol) représentent les quantités de C-CO₂ libérées respectivement par les échantillons fumigé et non-fumigé pendant un temps d'incubation qui varie selon le traitement subi par le sol avant la mesure.

Dans le cas où une période d'équilibrage a précédé la fumigation, la période d'incubation des sols fumigés ou non est de 10 jours. Dans le cas contraire, les auteurs ont proposé de prendre pour valeur de F la quantité de C-CO₂ dégagée pendant les 10 premiers jours d'incubation qui suivent la fumigation et comme valeur de C, la quantité de C-CO₂ dégagée

pendant les 10 jours suivants. Ceci pour ne pas prendre en compte un effet perturbateur dû aux traitements appliqués au sol lors de sa préparation (séchage, tamisage, ...) qui s'accompagnent généralement d'une légère recrudescence de l'activité minéralisatrice de la microflore.

Dans cette méthode, les deux termes de la différence (F-C) ne sont pas en toute rigueur parfaitement comparables puisque le premier (F) se rapporte à l'activité de la biomasse, probablement réduite, qui se développe après fumigation alors que le second (C) reflète l'activité de la biomasse que l'on cherche à mesurer. C'est la raison pour laquelle une modification de cette méthode a été développée par Chaussod et Nicolardot (1982) qui ont proposé de supprimer le sol non fumigé. Ces auteurs utilisent comme terme correctif la respiration mesurée pendant une période de référence (de 7 jours lorsqu'on travaille à 28°C) débutant après une période d'incubation (également de 7 jours pour une incubation à 28°C) au terme de laquelle nous pouvons considérer que tout le carbone de la biomasse tuée a été minéralisé. Ainsi le carbone microbien est calculé de la façon suivante :

$$B(\text{mgC}) = \frac{\text{mgC} - \text{CO}_2(0 - 7 \text{ jours}) - \text{mgC} - \text{CO}_2(7 - 14 \text{ jours})}{K_c} \quad (3)$$

Dans les relations (2) et (3), apparaît un coefficient de proportionnalité, K_c , qui correspond à la fraction du carbone microbien minéralisé durant l'incubation. Ce facteur a d'abord été estimé par détermination du taux de minéralisation de quantités de carbone microbien connues dans un sol fumigé (Jenkinson, 1966). Cet auteur estime ce coefficient à 0,5. Par la suite, pour tenir compte de la grande variabilité des organismes microbiens dont dépend la valeur du K_c , Anderson et Domsch (1978) ont marqué au ^{14}C différents micro-organismes communs (bactéries et champignons) et les ont réintroduits dans le sol dans un rapport masse de bactéries / masse de champignons de 1/3 qui est celui qui correspond aux populations microbiennes naturelles des sols. Ainsi la valeur moyenne de 0,41 a été déterminée.

L'utilisation d'un même facteur K_c pour tous les types de sol conduit à estimer le compartiment microbien avec une erreur allant de 10 à 20 % comme l'ont montré les résultats obtenus par Nicolardot *et al.* (1984). Ces auteurs ont suggéré de déterminer la valeur du K_c pour différentes classes de sols. En particulier, dans les sols acides (pH inférieur à 4,5), Vance *et al.* (1987) ont déterminé une valeur de K_c égale à 0,33. La diminution de la valeur du coefficient K_c serait due :

(i) à une plus faible activité de la microflore recolonisant le sol acide fumigé par comparaison à celle recolonisant un sol dont le pH est supérieur à 5 (Vance *et al.*, 1987),

(ii) à une incapacité de la population recolonisante à décomposer la matière organique non vivante de sorte que le C-CO₂ dégagé pendant la période de référence qui suit la fumigation viendrait exclusivement de la minéralisation des corps microbiens tués (Soulas, 1990).

De plus, la présence, dans le sol, de substrats carbonés facilement minéralisables au moment de la fumigation entraîne une sous-estimation de la mesure de biomasse (Jenkinson et Powlson, 1976).

2-1-2 La méthode de Fumigation-Extraction (FE).

Pour apporter une solution aux inconvénients précédents, une autre méthode biocidale est proposée par Vance *et al.* (1987). C'est la méthode de Fumigation-Extraction (FE). Elle diffère de la méthode FI en ce sens, qu'après la fumigation, le carbone organique du sol, qui comprend le carbone microbien tué par fumigation, est extrait par une solution diluée de K₂SO₄ qui a pour particularité de n'extraire qu'une faible partie des composés humiques. La différence entre les quantités de carbone organique extraites d'un échantillon de sol fumigé et d'un échantillon témoin non fumigé (également appelé "flush" par référence à la méthode FI), est proportionnelle à la biomasse du sol (Vance *et al.*, 1987).

Pour convertir la quantité de carbone organique correspondant en carbone biomasse, il convient d'utiliser un facteur correctif K_{ec} qui traduit l'extractibilité incomplète du carbone microbien. La quantité de carbone microbien (en mg C. kg⁻¹sol) est calculée de la façon suivante :

$$\text{Carbone microbien} = \frac{\text{carbone extrait après fumigation} - \text{carbone extrait avant fumigation}}{K_{ec}} \quad (4)$$

Comme le coefficient K_{ec} varie d'un sol à l'autre, l'utilisation d'une même valeur égale à 0,37 pour tous les sols entraîne une approximation de plus de 20% de la quantité de biomasse (Ross, 1990). Ce facteur est habituellement déterminé par calibration avec les méthodes FI (Vance *et al.*, 1987; Sparling et West, 1988; Tate *et al.*, 1988), SIR (Sparling et West, 1988), teneur en ATP (Joergensen *et al.*, 1989) ou par marquage *in situ* de la biomasse avec du ¹⁴C-glucose (Voroney et Paul, 1984; Sparling et West, 1988). Concernant cette dernière méthode de marquage *in situ* de la biomasse microbienne, Voroney et Paul (1984) ainsi que Sparling et West (1988) ont respectivement utilisé des concentrations en ¹⁴C-glucose de 1582 et 10000 mg C.kg⁻¹sol pour marquer la biomasse. Ces fortes concentrations en glucose vont favoriser plus spécifiquement les micro-organismes capables d'une croissance rapide qui ne sont pas forcément représentatifs de la population microbienne totale du sol. Bremer et van Kessel (1990) ont proposé d'ajouter une concentration en carbone égale à la quantité de carbone microbien présent dans le sol.

Un autre facteur critique de la méthode de marquage *in situ* est le choix d'une période d'incubation qui permet de marquer uniformément la biomasse du sol. van Veen *et al.* (1985) ont observé que le taux d'incorporation de radioactivité dans les micro-organismes du sol était supérieur à 70% dès 6 heures après addition du substrat et en ont déduit que ce pourcentage élevé pourrait traduire une incorporation sans utilisation. Au contraire, une augmentation de la période d'incubation pour favoriser une utilisation complète du substrat peut aussi entraîner une stabilisation du substrat dans la matière organique non microbienne du sol. C'est ainsi que Bremer et van Kessel (1990) ont proposé un schéma de dégradation du ^{14}C -glucose dans le sol (figure 20). Le glucose serait dans un premier temps stocké et incorporé dans des constituants cytoplasmiques dont la bonne extractibilité correspondrait à un K_{ec} élevé. La redistribution ultérieure de la radioactivité et son incorporation progressive dans les composants structuraux de la cellule microbienne entraînerait une diminution progressive de la valeur du K_{ec} .

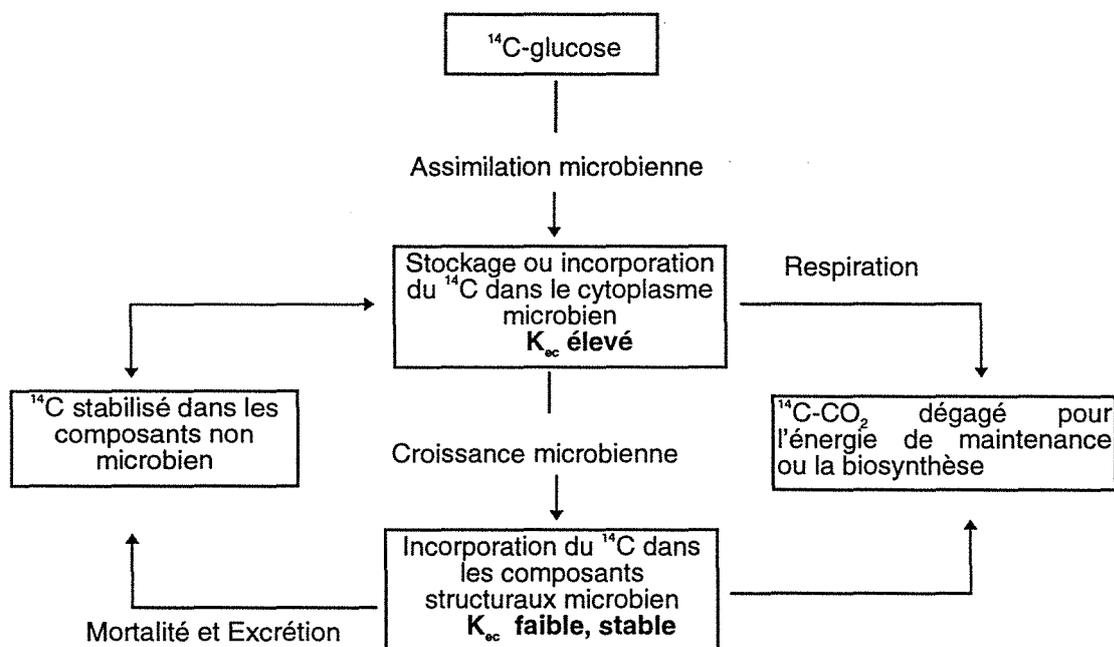


Figure 20 : Voies présumées de dégradation du ^{14}C -glucose dans le sol (D'après , et van Kessel, 1990).

Sparling *et al.* (1990) montrent que la détermination du K_{ec} est fortement influencée par la teneur en eau du sol (figure 21). Ces auteurs recommandent, lorsque cela est nécessaire, de réhumidifier le sol jusqu'à 100% de l'humidité équivalente pour assurer une efficacité maximale de la fumigation.

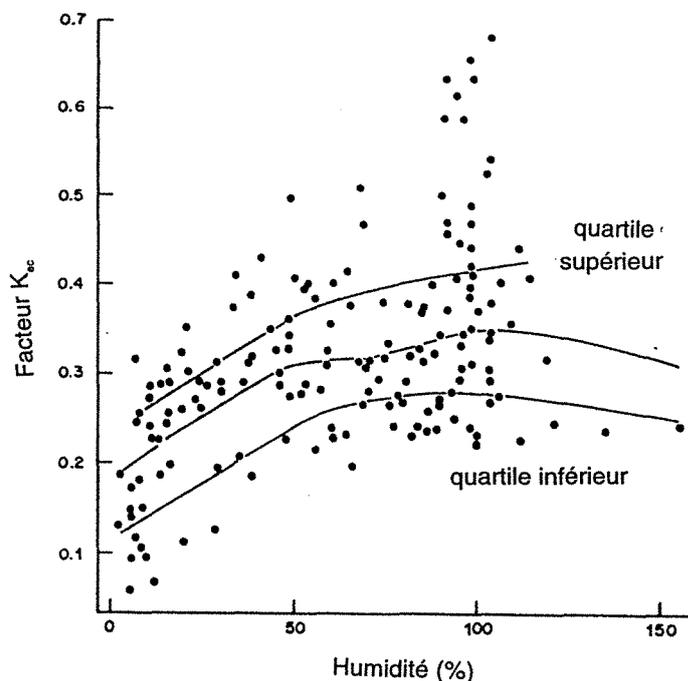


Figure 21 : Nuage de points mettant en évidence la variation du facteur K_{ec} dans différents sols en fonction de l'humidité (100% représente $-5kPa$) (d'après Sparling et al., 1990).

La méthode de Fumigation-Extraction a plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes car elle est rapide, applicable à tous type de sols (faible pH, sols saturés en eau ou bien desséchés) (Sparling, 1981; Vance *et al.*, 1987). Par ailleurs, l'estimation de la biomasse par cette méthode est faiblement influencée par le teneur en matière organique soluble.

3 Estimation de la biomasse microbienne par la méthode de Respiration Induite par le Substrat (RIS).

Cette méthode élaborée par Anderson et Domsch (1978) de mesure de la Respiration Induite par le Substrat (RIS), consiste à mesurer pendant un temps réduit la réponse respiratoire de la biomasse du sol immédiatement après un apport de glucose. Pratiquement, sa mise en oeuvre se fait en deux étapes successives : (1) la première consiste à déterminer la concentration en glucose qui donne une réponse respiratoire initiale maximale correspondant à la saturation des systèmes enzymatiques, (2) la seconde consiste, après amendement du sol avec cette concentration en glucose, à suivre l'évolution du CO_2 durant quelques heures seulement afin de réaliser la mesure pendant une période où la croissance microbienne peut être considérée comme négligeable. Suivant les sols, nous distinguons 3 types de courbes de réponses dont Anderson et Domsch (1978) ont donné une représentation (figure 22) :

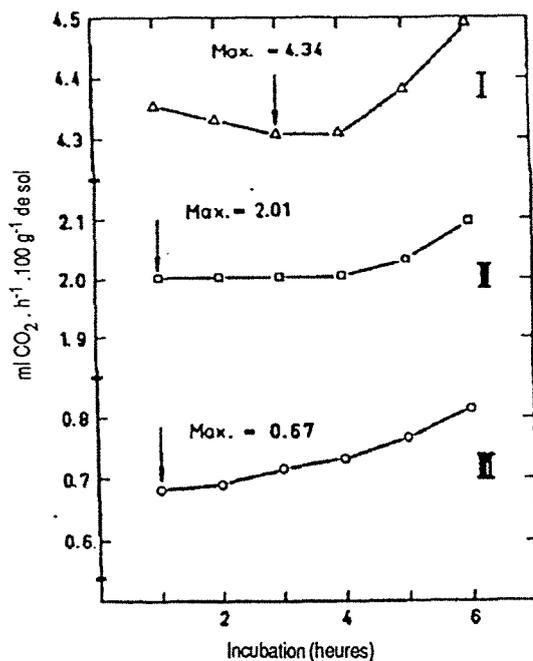


Figure 22 : Principaux types de courbes de minéralisation initiale après amendement des sols avec du glucose. Les flèches indiquent le taux initial maximal respiratoire de la biomasse (D'après Anderson et Domsch, 1978).

Par exemple, les sols de type I sont généralement des sols à teneurs en matière organique, en biomasse et en eau élevées.

Il est nécessaire de disposer d'une méthode de référence pour calibrer la méthode SIR. Anderson et Domsch (1978) ont choisi comme méthode de référence la méthode FI de Jenkinson et ont montré que le carbone de la biomasse (X) exprimé en mg C. 100g⁻¹sol pouvait s'exprimer en fonction du taux maximal respiratoire (Y) exprimé en ml CO₂.100g⁻¹sol h⁻¹ (figure 23) par l'équation suivante, établie à partir d'un ensemble de 12 sols :

$$X = 40,04.Y + 0,37 \quad (5)$$

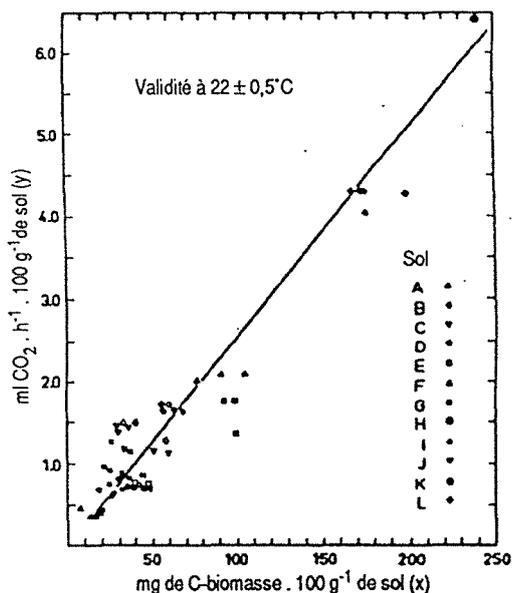


Figure 23 : Relation entre la vitesse maximum initiale de respiration induite par un apport de glucose et la taille de la biomasse (D'après Anderson et Domsch, 1978).

Un inconvénient de cette technique réside dans le choix d'un substrat carboné qui doit être immédiatement minéralisé par la population microbienne. Le glucose semble satisfaire cette condition. Par ailleurs le résultat obtenu dépend de l'état d'activité" de la microflore du sol, la fraction dormante de la population microbienne n'étant pas détectée. Enfin, il est nécessaire de calibrer la méthode par rapport à une autre.

4- LES METHODES BIOCHIMIQUES.

Dans leur principe général, ces méthodes consistent à choisir un marqueur biochimique dont la quantité traduit aussi directement que possible l'importance de la microflore. Ces marqueurs doivent répondre à certaines caractéristiques de spécificité, d'extractibilité, de dosage et de stabilité dans la concentration intracellulaire.

Différents marqueurs (ATP, phospholipides, acide muramique...) peuvent servir d'indicateurs biochimiques. Toutefois, aucun d'entre eux ne satisfait l'ensemble des conditions énoncées. Certains de ces marqueurs sont spécifiques d'un type de micro-organismes. Pour d'autres, comme l'ATP, la concentration intracellulaire peut dépendre de l'état physiologique des micro-organismes et sa mesure peut ne pas être directement liée aux variations de la taille de la communauté microbienne du sol (Kaiser et Bollag, 1990).

Certains de ces marqueurs ont pour avantage de donner des renseignements sur la composition et la diversité de la communauté vivante du sol. C'est le cas des phospholipides qui sont des lipides majeurs de la membrane bactérienne et, à ce titre, utilisés pour mesurer la biomasse bactérienne. Ils sont extraits par un mélange chloroforme:méthanol puis l'extrait obtenu est fractionné en lipides neutres, glycolipides et lipides polaires. C'est ce dernier groupe qui est analysé dans les études de diversité des populations bactériennes. Après extraction, le résidu peut être utilisé pour le dosage de l'acide muramique et de la glucosamine qui sont des composants présents en proportion égale dans la paroi cellulaire bactérienne. Par ailleurs, de nombreux eucaryotes contenant également de la glucosamine, le rapport glucosamine sur acide muramique peut nous renseigner sur la proportion de procaryotes par rapport aux eucaryotes (Balkwill *et al.*, 1988).

De même, l'analyse des différents types d'acides gras peut permettre d'identifier certains composants de la communauté microbienne. Par exemple, les acides gras hydroxylés libérés à partir du lipide A des lipopolysaccharides sont spécifiques des bactéries Gram⁻. De plus, les types respiratoires (aérobie, anaérobie) présents dans le sol peuvent être détectés par l'analyse des acides gras (A.G.). Ainsi, les bactéries aérobies contiennent une proportion importante d' A.G. cyclopropylé, les bactéries aérobies facultatives possèdent des A.G. C₁₈:1 ω 7 et les bactéries anaérobies facultatives ont un pourcentage d'A.G. C₁₂:0 et C₁₆:0 plus élevé.

La teneur en β -polyhydroxybutyrate qui est un polymère endogène de réserve présent dans de nombreuses bactéries renseigne sur l'état métabolique de cette communauté (Leach, 1984).

L'activité phosphatasique alcaline a été suggérée comme un indice de l'activité microbienne des sédiments. Un traitement aux ultrasons des sédiments permet la libération de la phosphatase. En présence d'un substrat tel que le p-nitrophényl phosphate (PNP), une coloration jaune, dosée en spectrophotométrie à 418 nm, se développe liée à la quantité de nitrophénol produite elle-même proportionnelle à la quantité d'enzyme extraite.

L'ATP est dosé de la façon suivante : l'enzyme luciférase, en présence du substrat aromatique luciférine, d'oxygène, d'ions Mg²⁺ et d'ATP va former un complexe luciféryladénylate qui, oxydé, produit du CO₂ et de la lumière qui est dosée en photométrie. La quantité d'ATP dans les bactéries demeure constant lorsque celles-ci sont en phase exponentielle de croissance. En revanche, lorsque les cellules sont soumises à des conditions environnementales extrêmes, on peut s'attendre à de plus grandes variations de la teneur en ATP par rapport à celle présente dans les cellules en conditions optimales de croissance. Comme la quantité d'ATP varie en fonction des organismes et de leur état physiologique, cette technique doit être couplée à d'autres méthodes telles que AO-INT, comptage sur boîtes...(Webster *et al.*, 1985).

Chaque méthode a ses limites. Il est nécessaire d'en utiliser plusieurs de façon à approcher au mieux la biomasse présente dans le sous-sol. C'est la raison pour laquelle, dans notre étude, nous avons tenté d'estimer de différentes manières la taille de la biomasse microbienne présente à différents niveaux d'un profil de sol de Cîteaux :

(1) Nous avons dénombré les différentes populations bactériennes (aérobies et anaérobies) et fongiques composant la microflore du sous-sol sur différents milieux de culture gélosés et liquides.

(2) Nous avons également cherché à déterminer la taille de la biomasse par les techniques biocidales comme FI et FE. Ceci nous a conduit à vérifier, par une méthode de marquage "in situ" de la microflore du sol, la constance de la valeur du coefficient K_{EC} avec la profondeur.

(3) Enfin, nous avons également utilisé la méthode d'Anderson et Domsch pour déterminer la taille de la biomasse.

MATERIEL ET METHODES

1- Dénombrements microbiens sur milieux liquides et gélosés.

Préparation des suspensions-dilutions : Nous avons préparé une suspension constituée de 10 grammes de sol dans un flacon en verre de 250 ml contenant 90 ml d'une solution de pyrophosphate de sodium 0,1% stérile. Après 10 minutes d'agitation sur une table animée d'un mouvement circulaire sur un plan horizontal (320 rpm), dans une chambre climatisée à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 10 ml de la suspension sont transférés dans un flacon en verre de 250 ml contenant 90 ml d'eau déminéralisée stérile (dilution 10^{-2}). Après homogénéisation au vortex, des dilutions en série au 1/10e, jusqu'à la dilution 10^{-6} , ont été préparées par introduction de 1 ml de la dilution 10^{-n} dans des fioles en verre de 20 ml contenant 9 ml d'eau déminéralisée stérile (dilution $10^{-(n+1)}$).

Dénombrement en milieu liquide : 5 fois 1 ml des dilutions 10^{-3} à 10^{-7} sont transférés dans 5 tubes en verre de 20 ml contenant 9 ml de milieu Extrait de sol (ES) stérile. Les tubes sont agités pendant quelques secondes au Vortex et incubés dans une chambre climatisée à 28°C pendant 21 jours (Alexander, 1982). 5 tubes témoin contenant le milieu de culture non inoculé sont incubés en même temps que les autres pour contrôler l'absence de contamination durant l'incubation. Le nombre de micro-organismes est déterminé à l'aide des tables de Mac Crady.

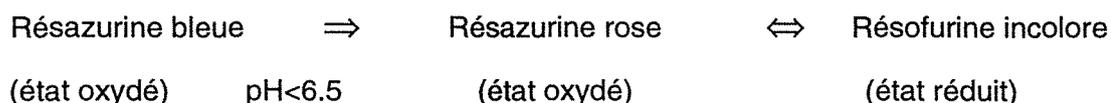
Dénombrement en milieu solide : 100 μl de chaque dilution (10^{-1} à 10^{-6}) sont déposés sur différents milieux gélosés à teneurs en carbone organique différentes. Les milieux nommés Levure Peptone Glucose Agar (LPGA), Tryptic Soy Agar (TSA), Nutrient Agar (NA) sont des milieux standards dits milieux "riches". Les milieux tels que Extrait de Sol Agar (ESA) et Nutrient Agar dilué (NA 1/40) sont dits milieux "pauvres". Nous avons préparé 3 boîtes par dilution. La répartition de la suspension-dilution sur le milieu solide est réalisée de la façon suivante : 7 à 8 billes en verre (diamètre de 4 mm), stérilisées pendant 40 minutes à 180°C dans une étuve, sont ajoutées dans chaque boîte. Les boîtes sont secouées manuellement jusqu'à absorption des 100 μl de suspension. Les billes sont enlevées des boîtes qui sont incubées dans une chambre climatisée à 28°C pendant 3 jours pour les milieux dits "riches" et 7 jours pour les milieux dits "pauvres". La taille de la microflore totale a été estimée d'une part par la méthode du point d'extinction ou méthode du Nombre le Plus Probable (NPP) (Alexander, 1982) en utilisant le milieu ES dont la préparation est donnée ci-dessous, d'autre part par comptage sur boîtes (Wollum II, 1982) en testant 4 milieux de culture (NA, TSA, ESA et NA1/40). Les compositions des milieux de culture NA, TSA et NA1/40 sont détaillées en Annexe 4.

Pour la préparation du milieu à l'extrait de sol, nous avons opéré de la façon suivante : cinq kg de sol sec de Citeaux, prélevé dans l'horizon de surface et tamisé à 4-5 mm, sont autoclavés avec 7 litres d'eau déminéralisée à 120°C pendant 2 heures. Après décantation à température ambiante, la phase aqueuse est centrifugée 10 minutes à 7000 rpm. Le surnageant obtenu est filtré sur filtre Millipore 1,2 µm. Le pH final du milieu est de 7,4-7,5. La teneur en C organique soluble du milieu, déterminée à l'aide d'un analyseur Dorhmann DC 80, est de 103 mg C l⁻¹. Le milieu ESA (Extrait de Sol Agar) est composé d'un litre de milieu ES additionné de 15 g.l⁻¹ d'agar.

Les bactéries aérobies sont dénombrées par étalement sur deux milieux gélosés qui sont LPGA et NA 1/40 de teneurs en carbone organique différentes auxquels a été ajouté un agent antifongique, l'actidione (Annexe 4).

Les champignons sont dénombrés sur le milieu gélosé Malt Agar acidifié par de l'acide citrique dont la composition est donnée en Annexe 4.

Les bactéries anaérobies sont dénombrées par la technique de Hungate (Latham et Wolin, 1978; Hungate, 1969; Miller et Wolin, 1974; Molongoski et Klug, 1976; Kaspar et Tiedje, 1982). Un ballon à fond rond de 1 litre est utilisé pour faire chauffer 500 ml de milieu YPG ou de milieu de dilution dont la composition est donnée en Annexe 4. Le chauffage du milieu est réalisé sous un flux continu d' N_2 et l'ébullition est maintenue durant 5 minutes. Le milieu est ensuite refroidi dans de la glace en faisant buller l'azote dans le milieu. Après refroidissement, nous ajoutons, à l'aide d'une seringue, 12,5 ml de solution stock de cystéine-HCl 1% (agent réducteur) pour obtenir une concentration finale de 0,025% et 0,5 ml de solution stock de résazurine 0,1% (indicateur rédox). Pour la réduction du milieu de dilution, nous ajoutons 0,05% de solution stock de cystéine-HCl et 0,2% de solution de résazurine. Le milieu vire au rose. Il est ensuite distribué dans des fioles à pénicilline ($v = 36$ ml). Pour cela, 10 ml de milieu YPG (ou 9 ml de milieu de dilution) sont distribués, avec la pipette rincée avec de l' N_2 , dans les fioles à pénicilline dans lesquelles circule un flux d' N_2 en continu. Les fioles sont bouchées avec des bouchons en caoutchouc puis scellées avec des capsules en aluminium. Le milieu retrouve sa couleur initiale indiquant sa réduction.



Les fioles à pénicilline sont stérilisées par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Celles dont le milieu est redevenu rose après autoclavage sont éliminées.

Pour l'inoculation, on utilise des seringues de 1 ml (Terumo) et des aiguilles hypodermiques stériles, à usage unique (Terumo, Luer 25Gx1", 0,5x25). Les seringues sont préalablement rincées 3 fois avec de l' N_2 . Les bactéries anaérobies sont

dénombrées par la technique NPP. Des séries de dilution jusqu'à 10^{-6} sont réalisées dans les fioles contenant 9 ml de milieu de dilution. Les fioles contenant le milieu YPG sont inoculées avec 1 ml de dilution (3 fioles par dilution) et incubées pendant 3 jours à 28°C.

2- Estimation de la biomasse microbienne par les méthodes biocidales.

2-1 FUMIGATION-EXTRACTION (FE).

Huit échantillons de sol issus de chaque profondeur du profil étudié, chacun de 20 grammes (équivalent sol sec) sont nécessaires. Quatre d'entre eux sont conservés tandis que les quatre autres sont fumigés, à température ambiante, durant 16 heures dans une étuve (ou un dessiccateur) dont l'atmosphère est saturée par les vapeurs de chloroforme selon le protocole décrit par Chaussod et Nicolardot (1982). Au préalable, nous avons rincé, par 3 fois, le chloroforme avec de l'eau volume à volume dans une ampoule à décanter de manière à éliminer les traces d'éthanol pouvant servir de substrat carboné aux micro-organismes du sol durant la fumigation. Les huit échantillons de sol, fumigés ou non, sont extraits chacun avec 100 ml de solution de K_2SO_4 250 mM par agitation sur table dans une chambre climatisée à 20°C pendant 1 heure et centrifugés durant 10 minutes à 6000 rem à 4°C. Le carbone organique extractible par le K_2SO_4 est mesuré à l'aide d'un analyseur de carbone organique en solution aqueuse par détection en I.R. après oxydation au persulfate et rayonnement U.V. (Dormant DC 80) (Wu *et al.*, 1990). La quantité de carbone microbien est calculée d'après l'équation (4).

2-2 MARQUAGE "IN SITU" DE LA BIOMASSE DANS LE SOL.

Le coefficient K_{ec} a été estimé par marquage *in situ* de la biomasse microbienne soit avec du ^{14}C -Glucose (activité spécifique = 400,4 kBq kg^{-1} sol) soit avec du ^{14}C -Acétate (activité spécifique = 328,1 kBq kg^{-1} sol) (Voroney et Paul, 1984; Sparling et West, 1988). Pour chaque profondeur étudiée, 6 échantillons de 10 grammes (équivalent sol sec), tamisés à 2 mm, sont amendés avec l'un des 2 substrats carbonés à des doses correspondant à 1, 10 et 100 mg C kg^{-1} sol. Le substrat est ajouté en solution aqueuse à raison de 100 μl par échantillon. Lorsque cela s'avérait indispensable, nous avons ajouté la quantité d'eau nécessaire pour obtenir 100% de l'humidité équivalente. Chaque échantillon de sol traité est incubé dans une fiole à plasma en verre, de 250 ml, contenant deux fioles à scintillation de 20 ml, l'une avec 10 ml d'eau déminéralisée, l'autre avec 10 ml de soude 0,2 M. Les fioles à plasma sont fermées hermétiquement avec des bouchons en caoutchouc et incubées dans une chambre climatisée à 20°C pendant 24 ou 48 heures. Chaque lot de 6 échantillons de sol est divisé en deux parties. Trois d'entre-eux sont fumigés et extraits avec 50 ml de solution de K_2SO_4 250 mM

selon le protocole décrit précédemment. Trois autres sont extraits directement sans fumigation préalable dans les mêmes conditions. La radioactivité contenue dans 5 ml du surnageant de chaque extrait ainsi que celle correspondant au $^{14}\text{CO}_2$ piégé dans la soude au cours de l'incubation sont mesurées au compteur à scintillation liquide (Packard Tri-Carb 1900 TR) après addition de 10 ml de liquide scintillant (ACSII Amersham Corporation).

Le ^{14}C microbien a été calculé en considérant que la radioactivité restante dans le sol est intégralement incorporée dans la biomasse (Sparling et West, 1988), soit :

$$^{14}\text{C-microbien} = (^{14}\text{C-substrat ajouté}) - (^{14}\text{C-CO}_2 \text{ dégagé} + ^{14}\text{C-extrait avant fumigation}). \quad (6)$$

En reprenant l'expression (4),

$$^{14}\text{C-microbien} = \frac{^{14}\text{C - extrait après fumigation} - ^{14}\text{C - extrait avant fumigation}}{K_{ec}} \quad (7)$$

Nous pouvons calculer la valeur du coefficient K_{ec} ,

$$K_{ec} = \frac{^{14}\text{C - extrait après fumigation} - ^{14}\text{C - extrait avant fumigation.}}{^{14}\text{C-microbien}} \quad (8)$$

Trois expériences ont été réalisées. La première avait pour but de tester l'influence de la concentration en glucose sur le calcul du K_{ec} . Suivant les recommandations de Bremer et van Kessel (1990), nous avons utilisé, pour le marquage de la biomasse, des concentrations en glucose équivalentes à 1, 10 et 100 mg C.kg⁻¹sol c'est à dire dans un domaine qui recouvre les quantités de carbone libérées après fumigation des échantillons de sol issus de différentes profondeurs. Dans la seconde expérience, nous avons étudié l'influence du temps d'incubation. Nous avons traité deux séries identiques d'échantillons de sol avec du glucose à 2 concentrations différentes (1, 10 mg C.kg⁻¹sol) que nous avons incubés pendant 24 ou 48 heures avant d'analyser la répartition de la radioactivité. Enfin, dans une troisième expérience, nous avons changé de substrat de marquage et utilisé le ^{14}C -acétate dans des conditions expérimentales comparables à celles que nous avons décrites pour le glucose (1, 10, 100 mg C.kg⁻¹sol et 24 heures d'incubation).

2-3 FUMIGATION-INCUBATION (FI).

Pour chaque profondeur étudiée, huit échantillons de sol de 20 grammes (équivalent sol sec) sont nécessaires. Une série de quatre échantillons sont fumigés selon le protocole décrit précédemment tandis que la deuxième série est conservée dans une chambre climatisée à 4°C. Après fumigation, nous avons réajusté l'humidité des échantillons de sol fumigés. Chacun des 8 échantillons a été placé dans un bocal en verre de 500 ml fermé hermétiquement contenant une fiole à scintillation avec 10 ml de NaOH 0.2 M et une deuxième fiole avec 10 ml d'eau déminéralisée. Les bocaux sont ensuite incubés dans une chambre climatisée à 28°C pendant 28 jours. Après 7, 14, 21 et 28 jours, les fioles de soude sont prélevées et remplacées par de nouvelles. Le CO₂ piégé, provenant de la minéralisation de la biomasse microbienne tuée lors de la fumigation, est dosé colorimétriquement à l'aide d'un autoanalyseur à flux continu (Technicon). Le CO₂ total piégé dans la soude puis libéré sous l'action de l'acide sulfurique décolore un milieu carbonaté teinté par la phénolphthaléine. Le protocole est détaillé en Annexe 5. La quantité de carbone microbien est calculée par l'équation (3).

$$B(\text{mg C}) = \frac{\text{mg C} - \text{CO}_2 (0 - 7 \text{ jours}) - \text{mg C} - \text{CO}_2 (7 - 14 \text{ jours})}{K_c} \quad (3)$$

3 ESTIMATION DE LA BIOMASSE MICROBIENNE PAR LA METHODE DE RESPIRATION INDUITE PAR LE SUBSTRAT.

Cette partie de l'expérimentation a été réalisée dans les laboratoires de Zeneca Agrochemicals (Jealott's hill, Angleterre). Les sols ont été séchés de façon à pouvoir être tamisés à 2 mm. 600 grammes de chaque horizon de sol ont été humidifiés à 40% de l'humidité équivalente déterminée par la méthode de Keens et Raczkowski (1929) *in* Lewis *et al.* (1992). et laissés à température ambiante durant 5 jours (phase d'équilibration des sols). Pour chaque profondeur, nous disposons de 6 échantillons de 100 grammes équivalent sol sec. Une série de 3 échantillons de sol sont amendés avec 0,3 g (ou 0,2 g) de glucose en poudre. Nous ajoutons ensuite 0,5 g de sable (tableau 8). La deuxième série d'échantillons ne reçoit que 0,5 g de sable.

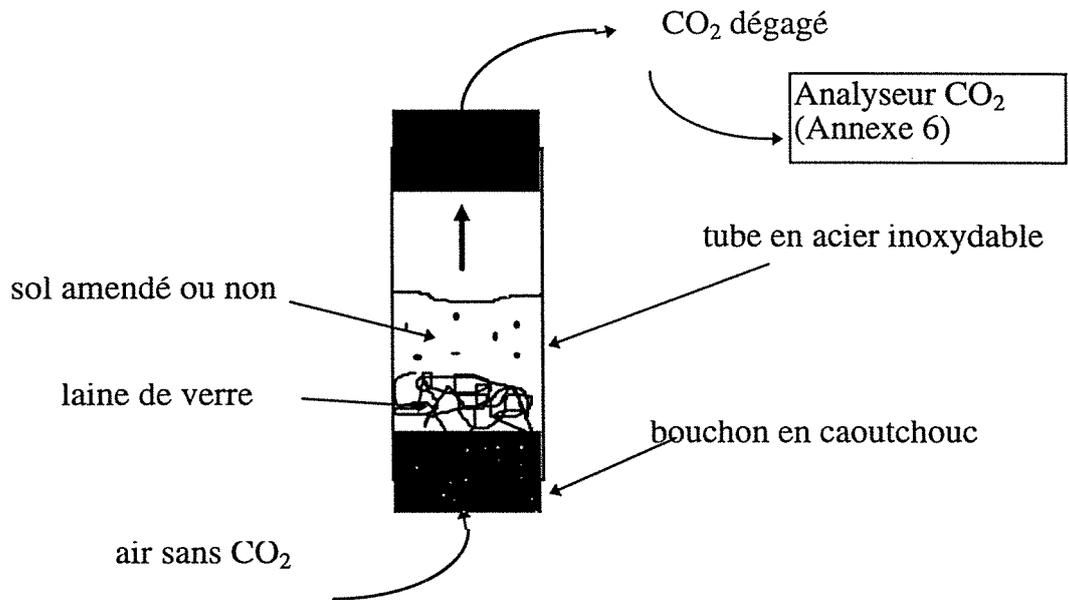


Figure 24 : Dispositif d'incubation des échantillons de sol amendés ou non avec du glucose.

profondeur (cm)	Quantité de Glucose ajoutée (g.100 g ⁻¹ de sol)
0-20	0,3
20-40	0,3
40-60	0,3
60-80	0,3
80-100	0,3
100-140	0,2
140-180	0,2
180-220	0,2
220-250	0,2

Tableau 8 : Quantités de glucose (mg. 100g⁻¹ équivalent sol sec) ajoutées aux échantillons de sol pris à différentes profondeurs de sol.

Après mélange vigoureux dans un sac en plastique, le sol est placé dans un tube en inox de 25 x 4 cm dont les deux extrémités sont fermées par des bouchons en caoutchouc connecté à un analyseur de CO₂ (figure 24) et incubé à 22°C. Toutes les 96 minutes, de l'air sans CO₂ circule à travers le sol à un débit de 2 l.h⁻¹ et le dégagement de CO₂ est mesuré pendant 4 minutes à l'aide de l'analyseur de gaz infrarouge (voir le schéma détaillé de la mesure en annexe 6). Chaque échantillon incube pendant une durée totale de 16 heures. La quantité de carbone microbien est déterminée à partir de l'équation (5).

RESULTATS-DISCUSSION

1- Dénombrement microbiens sur milieux liquide et gélosés.

1-1 OBSERVATIONS QUALITATIVES PRÉLIMINAIRES.

L'observation du nombre de colonies sur milieu gélosé riche (NA et TSA) montre une microflore du sol de surface très diverse. Cette diversité décroît avec la profondeur : nous observons la disparition des formes filamenteuses et une dominance de petites colonies. Sur milieu dilué (ES et NA 1/40), nous observons la disparition des formes filamenteuses et la présence de petites colonies blanches, non muqueuses quelle que soit la profondeur (figure 25).

profondeur (cm)	log(NPP) g ⁻¹ sol Puits n°			
	1	2	3	4
0-20	5,59	5,94	5,60	7,17
20-40	5,70	6,16	5,40	5,72
40-60	5,25	5,52	4,71	5,56
60-80	4,73	5,18	4,95	4,96
80-100	4,74	5,13	4,92	4,58
100-140		5,14	3,96	4,59
140-180		4,30	4,14	3,90
180-220		4,42	4,30	4,01
220-260			4,40	3,11
260-300			2,93	3,18
300-340				3,37
340-380				2,38
380-420				2,89
420-470				2,73
470-508				3,96

Tableau 9 : Dénombrements de la microflore totale en milieu liquide (Extrait de Sol) par la technique NPP dans les échantillons de sol prélevés lors du forage des 4 puits. Les résultats sont exprimés en log(NPP).g⁻¹sol.



Figure 25 : Dénombrements de la microflore totale sur 4 milieux gélosés. Aspect des colonies sur milieux dits "riches" (milieux NA et TSA) et sur milieux dits "pauvres" (milieux NA 1/40 et ES).

1-2 DÉNOMBREMENT DE LA MICROFLORE TOTALE.

Le tableau 9 rassemble les valeurs des dénombrements microbiens exprimés en log (nombre le plus probable), provenant des échantillons de sol prélevés lors de l'installation, en septembre 1990, des tubes en acier à quatre profondeurs différentes. En surface, le nombre de micro-organismes varie de $3,3 \cdot 10^5$ (puits 1 et 3) à $1,3 \cdot 10^7$ cellules.g⁻¹sol (puits 4) avec une différence d'un facteur de 10^2 entre le nombre de cellules microbiennes dénombrées dans le sol de surface du puits de 5 mètres par rapport à ceux établis pour les puits de 1, 2 et 3 mètres. D'une manière générale, nous notons une diminution du nombre de micro-organismes avec l'augmentation de la profondeur et une homogénéité des profils de densité microbiennes des 4 puits à l'exception du sol de surface.

Le nombre de micro-organismes estimé est relativement important en profondeur. Il est compris entre $7,8 \cdot 10^2$ et $7,9 \cdot 10^3$ cellules.g⁻¹sol entre 3 et 5 mètres de profondeur.

1-2-1 Comparaison des techniques NPP et étalement sur boîtes.

Nous avons dénombré la microflore totale en utilisant ces 2 techniques différentes sur le même milieu de culture à base d'extrait de sol ES et ESA. Avec la technique NPP, nous avons observé que le nombre de micro-organismes décroissait rapidement avec la profondeur ($1,5 \cdot 10^7$ cellules.g⁻¹sol dans l'horizon 0-20 cm et $9,1 \cdot 10^3$ cellules.g⁻¹sol dans l'horizon 470-508 cm). Par contre, par la technique d'étalement sur boîtes, sur milieu ESA, nous avons dénombré $2,6 \cdot 10^6$ cellules.g⁻¹sol et $4,5 \cdot 10^5$ cellules.g⁻¹sol pour les mêmes horizons (tableau 10).

1-2-2- Comparaison des dénombrement de la microflore totale sur différents milieux

La microflore totale a été dénombrée sur quatre milieux différents, deux milieux à haute teneur en carbone organique soluble (4 g C.l⁻¹) qui sont NA et TSA et deux milieux à faible teneur en carbone organique soluble (0,1 g C.l⁻¹) qui sont ESA et NA 1/40.

Dans l'horizon 0-20 cm, nous avons dénombré $2,2 \cdot 10^6$ cellules.g⁻¹sol sur milieu NA et $3,4 \cdot 10^6$ cellules.g⁻¹sol sur milieu TSA. Sur milieu dilué, le nombre de micro-organismes est de $2,6 \cdot 10^6$ cellules.g⁻¹sol sur ESA et sur NA1/40 (tableau 10). En profondeur, où la teneur en carbone est plus faible qu'en surface, par exemple dans l'horizon 300-340 cm, le nombre de colonies par gramme de sol, sur les milieux NA, TSA, ESA et NA1/40, s'élève respectivement à $8,9 \cdot 10^4$, $1,4 \cdot 10^5$, $1,1 \cdot 10^5$ et $8,9 \cdot 10^4$. Ainsi, pour chaque profondeur, nous dénombrons la même quantité de micro-organismes quel que soit le milieu de culture utilisé.

Profondeur (cm)	Microflore totale					Bactéries aérobies		Bactéries anaérobies	Champignons
	NA	TSA	NA 1/40	ESA	ES	LPGA	NA 1/40	PTYG	Malt acide
0-20	6,41	6,53	6,35	6,42	7,17	6,50	6,64	5,46	3,92
20-40	5,86	5,93	5,86	6,15	5,72	6,09	6,45	4,69	3,55
40-60	6,13	6,36	6,03	6,00	5,56	6,00	6,22	3,69	2,40
60-80	5,60	5,37	5,34	5,54	4,96	5,46	5,44	4,32	2,46
80-100	5,12	5,11	5,02	5,14	4,58	5,12	5,30	3,49	2,17
100-140	5,61	5,33	5,31	5,59	4,59	5,49	5,82	2,36	1,97
140-180	5,49	5,48	5,41	5,37	3,90	5,66	5,82	2,98	0
180-220	5,50	5,51	5,29	5,37	4,01	5,28	5,57	2,57	0
220-260	4,20	4,51	4,20	4,09	3,11	5,23	5,28	1,17	0
260-300	5,64	5,22	5,26	5,24	3,18	4,99	5,17	1,72	0
300-340	4,95	5,14	4,96	5,04	3,37	4,93	5,15	1,70	0
340-380	5,48	5,43	5,46	5,34	2,38	5,32	5,69	1,40	0
380-420	5,75	5,72	5,39	5,73	2,89	4,93	5,56	1,62	0
420-470	5,70	5,76	5,29	5,71	2,73	5,49	5,77	1,38	0
470-508	5,72	5,66	5,57	5,69	3,96	5,07	5,14	1,31	0

Milieux gélosés : ESA (Extrait de Sol Agar); TSA (Tryptic Soy Agar); NA (Nutrient Agar); NA 1/40 (NA dilué au 1/40^e); LPGA (Levure Peptone Glucose Agar); Malt acide.

Milieux liquides : ES (Extrait de Sol); PTYG (Peptone Tryptone Yeast Glucose).

Tableau 10 : Dénombrements de la microflore totale, des bactéries (aérobies et anaérobies) et des champignons sur différents milieux dans le profil de sol issu du forage du puits de 5 mètres. Les résultats sont exprimés en log UFC g⁻¹ sol (milieux gélosés) et en log NPPg⁻¹ sol (milieux liquides).

D'après plusieurs auteurs, les comptages de cellules viables dans le sous-sol, sur milieu dilué sont plus élevés que sur des milieux standards plus concentrés en nutriments. Par exemple, Bone et Balkwill (1988) ont montré que, dans la zone non saturée de leur profil de sol, les comptages microbiens réalisés sur milieu à base d'extrait de sol étaient supérieurs d'une puissance de 10 à ceux effectués sur milieu non dilué PTYG. De la même façon, Balkwill et Ghiorse (1985) ont dénombré $3,4 \cdot 10^4$ colonies.g⁻¹sol sur milieu PTYG standard et $1,9 \cdot 10^5$ colonies.g⁻¹sol sur le même milieu dilué au 1/20^e. Nos résultats ne font pas apparaître de différences significatives lorsqu'on compare les valeurs des dénombrements réalisés sur milieux dilués ou non. Il est possible que la teneur en carbone organique des milieux dilués que nous avons utilisés était trop élevée pour favoriser la croissance des micro-organismes oligotrophes présent dans le sous-sol. En effet, la concentration de nos milieux à base d'extrait de sol et NA dilué, de l'ordre de 100 mg C.kg⁻¹sol, excède largement la valeur de 15 mg l⁻¹ proposée par Poindexter (1981) comme limite supérieure de la teneur en carbone des milieux propices au développement des organismes oligotrophes. La teneur en carbone de notre milieu a été obtenue en traitant le sol de surface pour obtenir une teneur en carbone compatible avec une croissance microbienne devant conduire à la formation de colonies décelables. Il est probable que l'utilisation d'un milieu ES préparé à partir d'un sol de profondeur à faible teneur en carbone organique aurait probablement été plus adaptée au dénombrement des micro-organismes vivant dans les horizons correspondants. Cependant, nous nous serions heurté à une limite technique liée à l'impossibilité d'observation de colonies décelables sur des milieux dont la teneur en carbone avoisine 15 mg C.l⁻¹.

1-2- DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES AÉROBIES, ANAÉROBIES ET DES CHAMPIGNONS.

Nous avons dénombré les bactéries aérobies sur les milieux NA 1/40 et LPGA. Sur le milieu LPGA, le nombre de bactéries aérobies décroît de $3,2 \cdot 10^6$ bactéries.g⁻¹sol en surface jusqu'à $2,9 \cdot 10^5$ bactéries.g⁻¹sol à 60 cm puis reste constant jusqu'à 5 mètres de profondeur (tableau 10). Si nous comparons les comptages réalisés sur le milieu dilué NA 1/40, les valeurs sont du même ordre de grandeur ($4,4 \cdot 10^6$ bactéries.g⁻¹sol entre 0 et 20 cm et $2,8 \cdot 10^5$ bactéries.g⁻¹sol à partir de 60 cm de profondeur). La différence existant entre les protocoles destinés à dénombrer les bactéries ou la microflore totale consiste, dans le premier cas à ajouter au milieu de culture un inhibiteur de la microflore fongique. Or, nous avons observé des comptages similaires sur milieu NA1/40 avec ou sans agent antifongique ($1,8 \cdot 10^5$ cellules g⁻¹sol et $1,5 \cdot 10^5$ bactéries.g⁻¹sol dans l'horizon 260-300 cm). En conclusion, la microflore fongique ne contribue que faiblement au dénombrement de la microflore totale et la microflore bactérienne aérobie est largement majoritaire.

En profondeur, les comptages microbiens en milieu liquide conduisent à des valeurs plus faibles que celles obtenues par comptages sur boîtes alors que c'est l'inverse pour l'horizon de surface. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Olsen et Bakken (1987). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, dans le sous-sol, les micro-organismes sont attachés à des particules minérales ou organiques et seraient plus aptes à se développer sur milieu solide. Dans notre cas, s'ajoute la difficulté de lire des tubes après 21 jours d'incubation en raison d'une faible croissance bactérienne difficile à détecter. Nous avons tenté d'affiner la lecture en dosant la biomasse en spectrophotométrie visible, mais cette approche instrumentale n'a pas amélioré les observations visuelles.

Le nombre de bactéries anaérobies strictes et facultatives dénombrées sur le milieu LPGA diminue de $2,9 \cdot 10^5$ bactéries g^{-1} sol en surface jusqu'à 368 bactéries g^{-1} sol à 220 cm. Entre 220 et 508 cm, nous avons dénombré entre 15 et 53 bactéries g^{-1} sol. Si on compare la distribution de la microflore totale avec celle des bactéries anaérobies sur milieu liquide, la proportion de ces dernières semble diminuer en sol profond (0,22% en surface contre 0,03% à 5 mètres de profondeur). Par cette technique, il n'est pas possible de différencier les bactéries anaérobies strictes et facultatives.

Nous observons une diminution rapide du nombre de champignons avec l'augmentation de la profondeur. Nous dénombrons $8,3 \cdot 10^3$ colonies g^{-1} sol en surface et seulement 94 colonies g^{-1} sol entre 100 et 140 cm de profondeur. Au dessous de 1,5 mètres, les horizons sont exempts de champignons.

Ce résultat n'exclut pas la présence, au-delà de cette profondeur, de spores dont la mise en évidence peut se faire en utilisant une technique mise au point par Gams et Domsch (1967). Par cette procédure, Lewis *et al.* (1992) ont détecté l'existence de champignons métaboliquement actifs jusqu'à une profondeur de 455 cm.

Nous avons résumé l'ensemble des résultats précédents sur la figure 26. Les valeurs obtenues, de l'ordre de 10^7 micro-organismes g^{-1} sol dans le sol de surface, sont faibles et tiennent probablement compte du fait que les échantillons de sol ont été prélevés après une période de sécheresse de plusieurs mois.

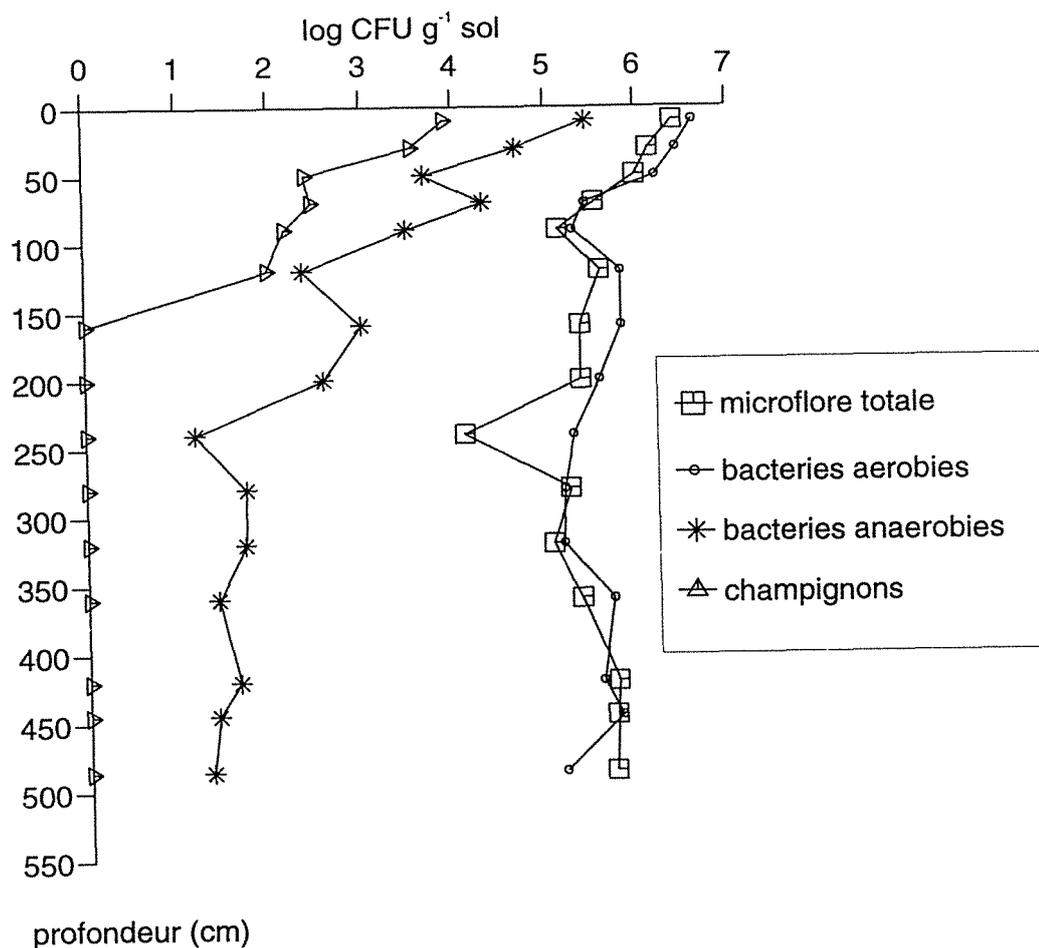


Figure 26 : Répartition des populations microbiennes dans le profil de sol de 5 mètres de profondeur.

Une critique à formuler à l'égard des techniques de dénombrement et de la comparaison que nous pouvons faire des résultats obtenus après culture sur différents milieux concerne la différence de morphologie qu'une même souche peut adopter en fonction de la nature qualitative et quantitative du milieu de culture. Il est donc difficile de conclure quant au choix du milieu le plus approprié autrement que sur un critère quantitatif. Ainsi, la caractérisation de la diversité phénotypique des souches isolées pourrait permettre une distinction des différentes populations microbiennes présentes sur les milieux de culture. Ainsi, Balkwill *et al.* (1989) ont mis en évidence que seulement 11% des isolats sur milieu PTYG avaient le même profil de réponse vis à vis des test API que les isolats sur milieu PTYG dilué au 1/100^e. Ce travail permet donc de

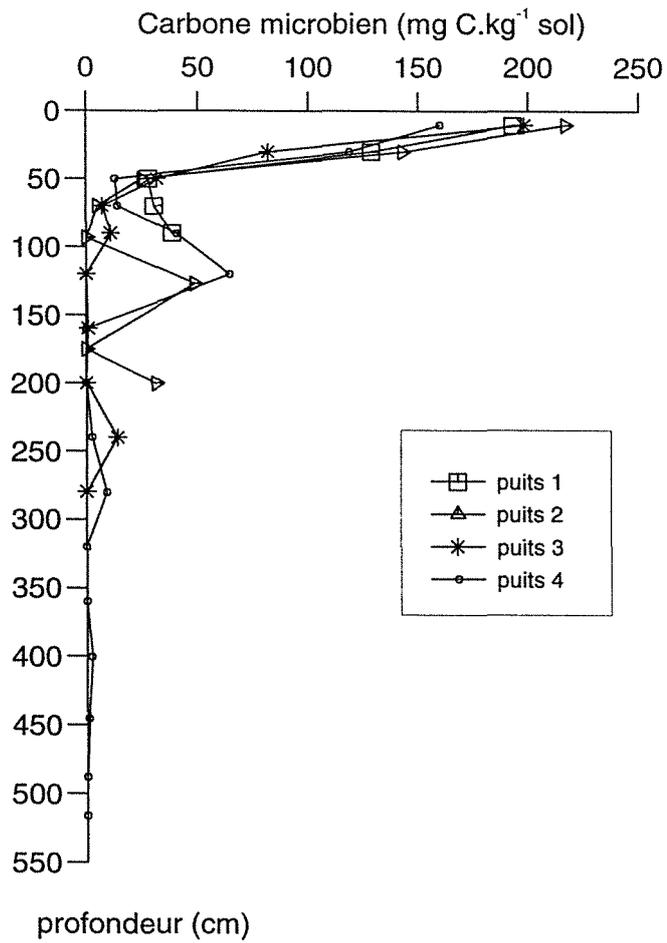


Figure 27 : Estimation du carbone microbien par la méthode de Fumigation-Extraction dans les échantillons de sol provenant des quatre puits. Les résultats sont exprimés en mg C.kg⁻¹sol.

supposer que la concentration en substrat des milieux de culture est un facteur de sélection d'isolats appartenant à des types physiologiques différents.

En conclusion, les techniques de dénombrement donnent une idée de l'importance quantitative des populations bactériennes et fongiques composant la microflore totale du sol. Ces résultats restent cependant largement assujettis à la composition des milieux de culture. Cet aspect est d'autant plus important pour les populations microbiennes vivant en profondeur dans le sol que leur caractérisation dépend de la teneur en carbone du milieu de culture. C'est la raison pour laquelle nous avons essayé d'appliquer d'autres méthodes d'estimation de la taille des populations microbiennes.

2- Mesures de biomasse par les méthodes biocidales et physiologique.

2-1 DÉTERMINATION PAR FUMIGATION-EXTRACTION (FE).

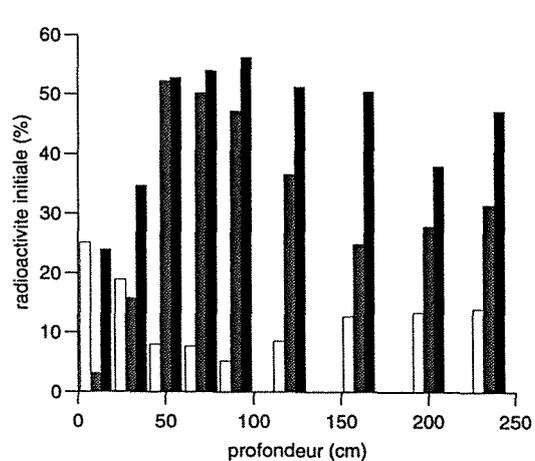
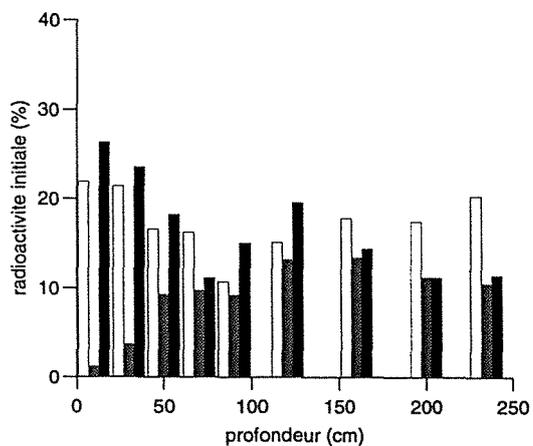
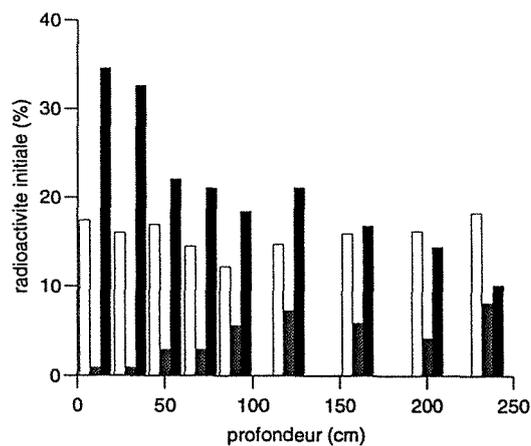
Sur le profil de sol de Cîteaux (0-500 cm), nous avons déterminé le carbone microbien par FE (figure 27). Nous avons mis en évidence une diminution de la quantité de carbone microbien avec la profondeur. La quantité de biomasse déterminée dans le sol de surface pour chacun des quatre puits est comprise entre 160 et 216,9 mg C.kg⁻¹ sol. Après une diminution rapide et importante du carbone microbien, celui-ci connaît une nouvelle augmentation entre 80 et 140 cm, où, dans le puits de 5 mètres, il atteint une valeur moyenne de 52,3 mg C.kg⁻¹ sol. Nous pouvons noter qu'à cette teneur élevée en carbone microbien correspond une couche de sol à teneur élevée en argile (59%).

2-2- DÉTERMINATION DU COEFFICIENT K_{ec}

2-2-1 étude de la répartition de la radioactivité après apport d'un substrat carboné marqué.

2-2-1-1 Influence de la concentration en glucose (1^{ère} expérience).

Sur la figure 28 est représentée la répartition de la radioactivité apportée sous la forme de ¹⁴C-glucose à 3 concentrations différentes dans des échantillons de sol prélevés à différentes profondeurs après une incubation de 24 heures. Pour la dose de 1 mg C-glucose kg⁻¹ sol (Figure 28A), nous observons que (i) 12 à 17% de la radioactivité est minéralisée, (ii) le pourcentage de radioactivité extraite avant fumigation représente essentiellement du carbone non biologique (¹⁴C-glucose résiduel ou ¹⁴C-métabolites). Il oscille entre 0,95% en surface et 7% à 2,5 mètres. De plus, nous notons une certaine tendance à l'augmentation du carbone extractible en profondeur traduisant une moindre activité microbienne liée à une plus faible biomasse microbienne, (iii) la radioactivité liée au carbone microbien extractible (différence entre les quantités de



radioactivite initiale (%)

- C-CO2
- ▨ C-extrait avant fumigation
- C-extrait apres fumigation

Figure 28 : Répartition du ^{14}C -glucose, apporté à trois concentrations (1, 10 et 100 mgC.kg⁻¹ sol) après 24 heures d'incubation, dans des échantillons prélevés à différentes profondeurs du profil de sol de Cîteaux

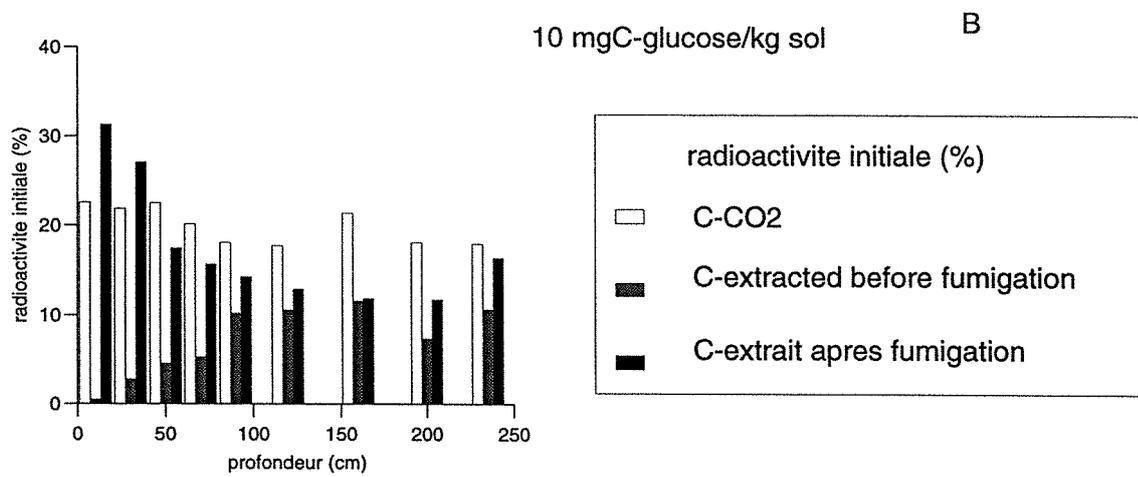
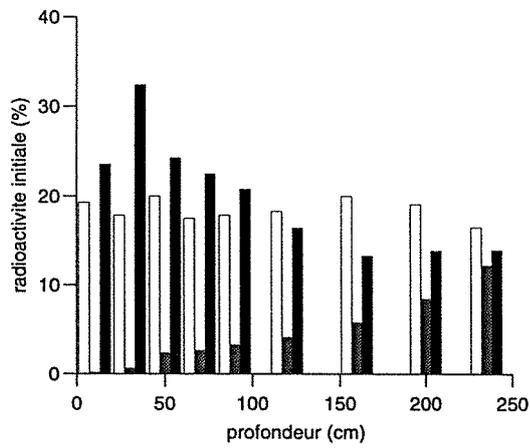


Figure 29 : Répartition du ^{14}C -glucose, apporté à deux concentrations (1 et 10 mgC.kg⁻¹sol) après 48 heures d'incubation, dans des échantillons prélevés à différentes profondeurs du profil de sol de Cîteaux

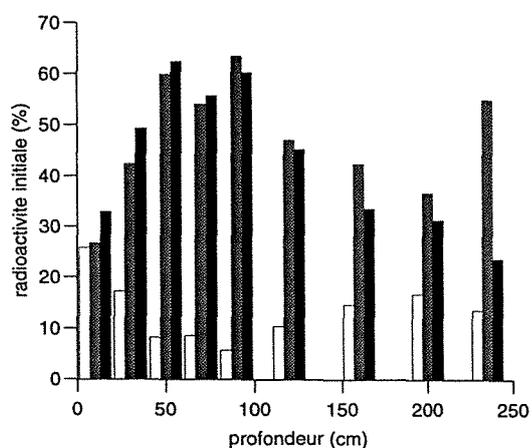
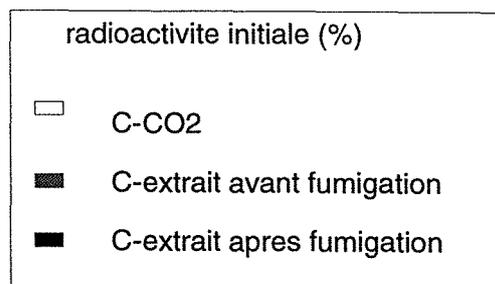
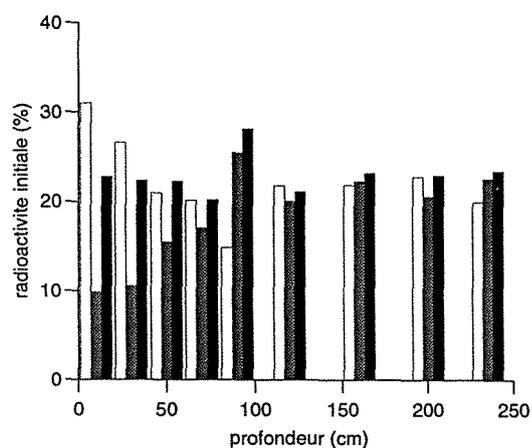
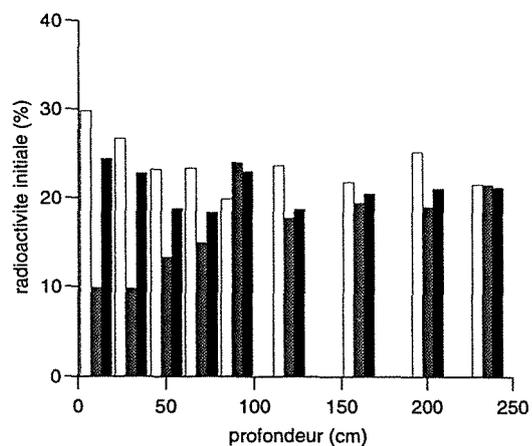


Figure 30 : Répartition du ^{14}C -acétate, apporté à trois concentrations (1, 10 et 100 mgC.kg⁻¹sol) après 24 heures d'incubation, dans des échantillons prélevés à différentes profondeurs du profil de sol de Cîteaux

carbone organique soluble extractible après et avant fumigation) décroît de 36% en surface à 2% à 220-250 cm de profondeur.

Avec une concentration en glucose dix fois plus élevée (Figure 28B), nous notons que 10 à 22% de la radioactivité initiale ajoutée est minéralisée. En revanche, la radioactivité extraite avant fumigation augmente par rapport à ce que nous avons observé après traitement avec la dose la plus faible. Cette augmentation correspondrait à un moindre pourcentage d'utilisation du substrat marqué, surtout dans les horizons profonds, en raison d'une biomasse limitée. Enfin, l'incorporation biologique de carbone 14 devient très limitée sinon nulle en profondeur.

Après addition d'une concentration en glucose cent fois supérieure (Figure 28C), nous observons que le pourcentage de radioactivité libérée sous forme de CO_2 dégagé varie de 25% en surface à des valeurs allant de 5% à 14% en dessous de 40 cm. De plus, la quantité de radioactivité extraite avant fumigation est toujours très importante et est comprise entre 24% et 52%, le maximum correspondant au minimum observé pour la minéralisation. Ce pourcentage très élevé de radioactivité non incorporée dans la biomasse serait due aux capacités dégradantes limitées de la microflore. Nous retrouvons une quantité de radioactivité extraite après fumigation très importante en profondeur avec, cependant, une tendance à une augmentation de l'incorporation biologique de radioactivité en dessous de 50 cm qui peut atteindre le niveau observé dans le sol de surface. Elle oscille entre 38% et 57% de la radioactivité initiale.

2-2-1-2 Influence du temps d'incubation (2^{ème} expérience).

Sur la figure 29, nous avons représenté la répartition de la radioactivité après traitement avec du ^{14}C -glucose à deux concentrations (1 et 10 mg $\text{C.kg}^{-1}\text{sol}$) après 48 heures d'incubation. Lorsque la période d'incubation est de 48 heures, nous observons une augmentation de 1,8 à 5,6% de la quantité de CO_2 dégagé selon la profondeur, lorsque les échantillons de sol sont amendés avec 1 mg $\text{C.kg}^{-1}\text{sol}$ et de 0,5 à 7,4% après un traitement à 10 mg $\text{C.kg}^{-1}\text{sol}$.

La quantité de ^{14}C extraite avant fumigation diminue avec la durée d'incubation surtout dans les horizons supérieurs et à la dose de 10 mg $\text{C.kg}^{-1}\text{sol}$. En profondeur, l'augmentation de la durée d'incubation ne modifie pratiquement pas les résultats ce qui pourrait signifier que la microflore réduite des horizons inférieurs utiliserait le substrat carboné avec une production accrue de métabolites par rapport à la microflore des horizons superficiels. Quoiqu'il en soit, l'incorporation biologique du carbone reste pratiquement inchangée quelle que soit la durée d'incubation.

2-2-1-3 Influence de la nature du substrat de marquage (3^{ème} expérience).

Les résultats de cette expérience sont illustrés sur la figure 30, qui représente la répartition de la radioactivité après apport de ^{14}C -acétate à trois concentrations et après 24 heures d'incubation.

Aux faibles doses, par comparaison à ce que nous avons observé avec le glucose, les différences essentielles résident dans des pourcentages accrus de radioactivité minéralisée ou extraite avant fumigation (figures 30A et 30B). L'incorporation biologique apparaît toujours très réduite, de l'ordre de 15% dans le sol de surface. A la concentration la plus élevée, nous retrouvons une évolution comparable à celle observée en présence de glucose, avec cependant une extractibilité du carbone avant fumigation (figure 30C).

2-2-2 INCORPORATION BIOLOGIQUE DE LA RADIOACTIVITÉ. VALEURS DU K_{EC} .

Le tableau 11 donne les pourcentages d'incorporation biologique de la radioactivité, calculée avec la formule (6), après apport de glucose à différentes concentrations et différents temps d'incubation. Le pourcentage de radioactivité incorporée diminue avec l'augmentation de la concentration en glucose. En surface, il est de 81,3%, 77,4% et 71,7% pour des concentrations respectives de 1, 10 et 100 mg C.kg⁻¹sol. Ces différences sont accentuées avec l'augmentation de la profondeur. Par exemple, à 250 cm de profondeur, les mêmes pourcentages sont respectivement de 73,6%, 69,6% et 53,9%.

Profondeur (cm)	Radioactivité incorporée (%)				
	Glucose (mg C.kg ⁻¹ sol)				
	1	10	100	1	10
	(Incubation 24 heures)			(Incubation 48 heures)	
0-20	81,3±0,2	77,4±0,9	71,7±0,3	80,8±1,2	76,8±0,6
20-40	84,0±0,8	75,3±1,1	64,5±4,2	81,5±1,9	75,1±1,1
40-60	79,3±0,8	73,7±1,8	39,6±1,1	77,8±1,1	73,1±0,9
60-80	81,1±0,7	75,4±1,0	41,9±2,2	80,1±0,6	74,4±1,2
80-100	82,2±0,2	80,5±0,7	47,3±7,5	78,9±0,9	71,6±2,0
100-140	78,9±0,3	71,7±2,1	54,9±5,7	77,4±0,8	72,4±2,0
140-180	78,7±2,4	68,6±1,9	61,1±0,5	74,9±1,5	66,9±1,4
180-220	79,7±0,9	71,3±0,7	58,9±1,3	72,2±0,2	74,3±2,1
220-250	73,6±0,4	69,6±0,5	53,9±3,9	72,4±1,2	72,2±3,9

Tableau 11 : Pourcentages de la radioactivité initialement ajoutée sous forme de ¹⁴C-glucose et retrouvée dans les corps microbiens après traitements à différentes concentrations et différents temps d'incubation.

En tenant compte de l'erreur expérimentale, nous n'observons pas de différence entre les pourcentages d'incorporation biologique après 24 et 48 heures d'incubation.

Le tableau 12 récapitule les valeurs des pourcentages de la radioactivité initiale retrouvée sous forme de ¹⁴C microbien extractible déterminées à l'aide du numérateur de la formule (7) pour les trois concentrations en glucose et les deux temps d'incubation étudiés. Ces pourcentages diminuent pour des concentrations croissantes en glucose. Ils sont par contre peu modifiés lorsque la durée de l'incubation qui suit l'apport du substrat marqué augmente.

Profondeur (cm)	¹⁴ C microbien extractible (%)				
	Glucose (mg C.kg ⁻¹ sol)				
	1	10	100	1	10
	(Incubation 24 heures)			(Incubation 48 heures)	
0-20	33,6±2,2	25,2±0,8	23,3±3,2	34,7±9,3	30,7±0,6
20-40	31,7±1,1	19,9±1,0	22,6±3,7	31,8±1,9	24,7±0,7
40-60	19,1±0,5	9,1±1,3	0,2±3,7	22,6±0,6	12,9±0,3
60-80	18,1±0,3	1,5±1,1	3,8±0,9	19,9±0,5	10,4±0,8
80-100	12,8±1,2	5,8±0,8	8,7±3,9	17,1±0,4	4,0±0,4
100-140	13,8±0,9	6,5±2,2	14,7±3,3	12,3±1,6	2,3±0,5
140-180	10,8±0,9	1,2±1,2	26,3±2,6	6,6±1,0	1,0±0,8
180-220	10,3±0,3	0,1±0,3	10,1±1,3	5,4±1,2	4,4±1,2
220-250	2,0±0,2	0,9±0,7	15,8±3,3	1,7±2,3	5,7±2,1

Tableau 12 : Pourcentages de la radioactivité initialement ajoutée sous forme de ¹⁴C-glucose retrouvés dans le carbone microbien extractible après traitements à différentes concentrations et différents temps d'incubation.

Nous observons que les pourcentages de la radioactivité extractible contenue dans les corps microbiens décroît avec l'augmentation de la profondeur, de 33,6% en surface contre 2% à 250 cm pour les échantillons traités à la concentration de 1 mg C.kg⁻¹sol de glucose.

Le tableau 13 met en évidence une variation, avec la profondeur de la valeur du coefficient K_{ec} calculé suivant la formule (8). Ce coefficient décroît très nettement avec la profondeur, excepté après un traitement avec la dose de 100 mgC-glucose.kg⁻¹sol. Cette valeur s'écarte sensiblement de la valeur considérée comme constante et égale à 0,45 proposée par Wu *et al.* (1990). Trois tendances se dégagent de ce tableau :

- avec le glucose, nous avons une bonne concordance entre les valeurs de K_{ec} quelle que soit la durée d'incubation
- nous obtenons une diminution du K_{ec} avec la profondeur excepté pour le traitement avec la dose de glucose la plus élevée pour laquelle les valeurs sont plus erratiques
- nous obtenons des valeurs de K_{ec} 2 fois plus faibles lorsque la microflore de surface est marquée avec de l'acétate.

Profondeur cm	Glucose (mgC kg sol ⁻¹)					Acétate		
	1	10	100	1	10	1	10	100
	(Incubation 24 h)			(Incubation 48h)		(Incubation 24 h)		
0-20	0,44	0,34	0,32	0,43	0,40	0,25	0,22	0,11
20-40	0,37	0,27	0,35	0,39	0,33	0,21	0,19	0,15
40-60	0,24	0,12	0,01	0,29	0,18	0,09	0,13	0,08
60-80	0,22	0,02	0,09	0,25	0,14	0,06	0,05	0,04
80-100	0,17	0,07	0,19	0,22	0,06	0,00	0,08	0,00
100-140	0,18	0,09	0,27	0,16	0,03	0,07	0,02	0,00
140-180	0,14	0,02	0,43	0,09	0,01	0,02	0,01	0,00
180-220	0,13	0,00	0,17	0,08	0,06	0,04	0,04	0,00
220-250	0,03	0,01	0,29	0,02	0,08	0,00	0,01	0,00

Tableau 13 : Influence de la concentration en ¹⁴C-glucose, en ¹⁴C-acétate et du temps d'incubation sur la détermination du coefficient d'extractibilité du carbone microbien K_{ec} .

Le problème méthodologique essentiel lié à l'utilisation de la méthode FE réside dans la détermination du coefficient d'extractibilité du carbone microbien, K_{ec} . Nous avons essayé de le déterminer à l'aide d'une méthode de marquage *in situ* de la microflore du sol. Les conditions de ce marquage sont importantes puisque nous avons pu établir que la valeur du coefficient K_{ec} variait avec le traitement utilisé pour marquer radioactivement la biomasse du sol.

Concernant le choix du substrat de marquage, le glucose semble être plus adapté que l'acétate en raison des faibles pourcentages d'incorporation du carbone de ce dernier substrat après 24 heures d'incubation. Le pourcentage d'incorporation de la radioactivité, donc du carbone du ¹⁴C-glucose dans le compartiment microbien, après application à des concentrations de 1 et 10 mgC.kg⁻¹sol est élevé : il varie de 66 à 83%. Ces résultats sont concordants avec ceux de Bremer et van Kessel (1990) qui ont trouvé que le pourcentage de conversion en composants microbiens du glucose marqué appliqué à une concentration de 30 ou 300 mgC.kg⁻¹sol était supérieur au pourcentage habituel d'assimilation des sucres simples par la biomasse qui est de l'ordre de 60%. L'hypothèse formulée par ces auteurs ainsi que par van Veen *et al.* (1985) est que cette forte incorporation biologique serait le résultat d'une accumulation intracellulaire de glucose sans qu'il soit utilisé pour la biosynthèse au cours de la durée du test. Une incubation prolongée destinée à favoriser l'utilisation métabolique du glucose peut avoir pour effet une stabilisation du glucose marqué dans le compartiment non microbien du

sol et ainsi entraîner une erreur dans la détermination du coefficient K_{ec} . Dans notre cas, nous avons constaté qu'une période d'incubation de 24 heures semblait suffisante pour marquer la biomasse à des concentrations de 1 ou même 10 mgC.kg⁻¹sol. Une incubation de 48 heures ne semble pas améliorer sensiblement le coefficient d'utilisation du glucose excepté peut-être à la dose la plus élevée dans les horizons superficiels. Par contre, pour une concentration en glucose de 100 mgC.kg⁻¹sol une durée d'incubation de 48 heures serait nécessaire surtout dans les horizons inférieurs du sous-sol. Ce marquage à forte concentration a cependant d'autres inconvénients sur lesquels nous reviendrons et qui justifie son abandon.

La valeur du coefficient K_{ec} , telle que nous l'avons calculée dans différentes conditions de marquage, est comprise entre 0,33 et 0,44 dans le sol de surface. Ces valeurs sont en accord avec celles qui sont habituellement proposées dans la littérature (tableau 14). Entre 20-40 cm, les valeurs estimées (0,33 et 0,39) sont plus faibles que celles obtenues à la même profondeur par Sparling *et al.* (1990) en utilisant la même méthode. Une des raisons pourrait être le faible pH (4-5) de leur sol. Sparling et West (1988) ont proposé une valeur de K_{ec} de 0,33 pour la conversion du carbone microbien extractible en carbone biomasse.

Référence	valeur de K_{ec}	
	horizon 0-20 cm	horizon 20-40 cm
Sparling et West (1988)	0,33	
Sparling <i>et al.</i> , (1990)	0,34	0,43-0,60
Bremer et van Kessel (1990)	0,41	
notre valeur	0,32-0,43	0,33-0,39

Tableau 14 : Comparaison des valeurs du coefficient K_{ec} en sol de surface et en profondeur déterminés par la méthode de marquage *in situ* de la biomasse au ¹⁴C-glucose.

La principale conclusion de ce travail reste la variation importante de la valeur du coefficient K_{ec} que nous avons observée le long de notre profil de sol. L'utilisation d'une valeur constante de ce coefficient conduit à une sous-estimation de la biomasse qui, dans le plus mauvais des cas, peut atteindre 90%. Il reste à vérifier que cette situation est la règle et ne traduit pas une situation particulière au cas étudié.

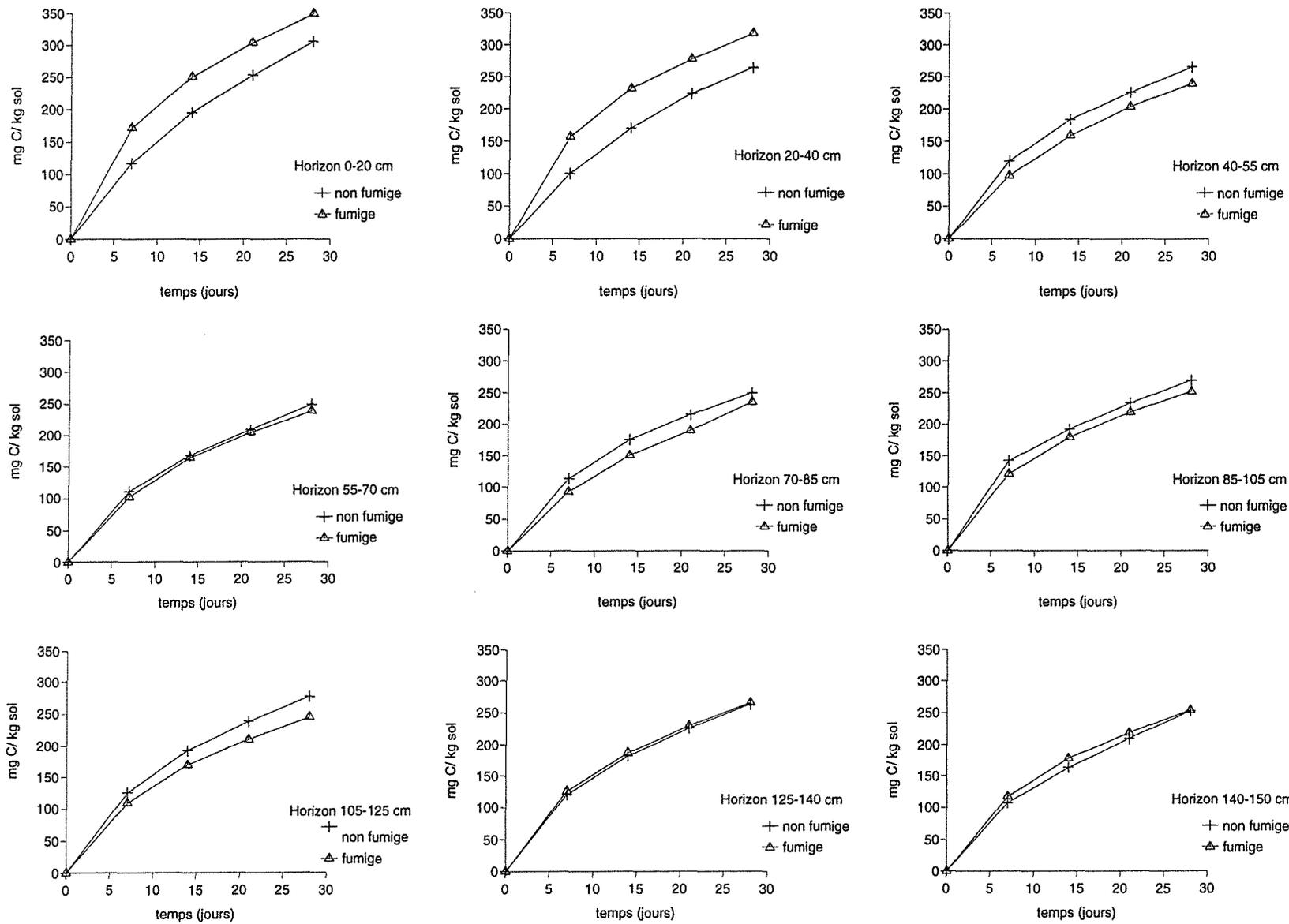


Figure 31 : Cinétiques de dégagement de CO₂ dans des échantillons de sol fumigés et non fumigés, prélevés à différentes profondeurs du profil de sol de Cîteaux.

2-3 DÉTERMINATION DE LA BIOMASSE PAR FUMIGATION-INCUBATION (FI).

Sur la figure 31 sont représentées les cinétiques de dégagement de CO₂ dans les sols fumigés ou non. Dans pratiquement tous les niveaux, excepté dans les deux horizons de surface et l'horizon le plus profond, le dégagement de CO₂ dans les sols fumigés est plus faible que celui dans les sols non fumigés. Il ne nous a donc pas été possible d'utiliser la formule (1) pour calculer la biomasse. Par contre, la méthode de calcul de Chaussod et Nicolardot (1982) (formule (2)) peut être appliquée. Les résultats de ces calculs sont présentés dans le tableau 15. A titre de comparaison, nous avons également reporté les valeurs de biomasse déterminées par la méthode FE en prenant une valeur de K_{ec} constante pour tous les horizons et égale à 0,37 (Vance *et al.*, 1987). Ces résultats amènent deux remarques :

- d'abord, nous observons une décroissance de la biomasse déterminée par FI qui passe de 223,8 mg C kg⁻¹ sol en surface à 85,3 mg C kg⁻¹ sol entre 70 et 85 cm. Entre 85 et 150 cm, la quantité de carbone microbien augmente à nouveau pour prendre une valeur comprise entre 117,3 et 158,1 mg C kg⁻¹ sol.

- ensuite, la comparaison des quantités de carbone microbien estimées par les deux méthodes FE et FI met en évidence un désaccord important qui se traduit par une forte sous-estimation du carbone microbien estimé par la méthode FE en profondeur. Ainsi, le rapport carbone microbien (FE) sur carbone microbien (FI) passe de 1,06 dans l'horizon de surface à 0,16 à 150 cm de profondeur. L'une des deux (ou les deux) méthodes ne donnent pas des résultats satisfaisants. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'étudier la variation de la valeur du coefficient K_{ec} en fonction de la profondeur sur le site de Cîteaux.

Profondeur (cm)	carbone microbien (FE) (mgC kg ⁻¹ sol)	carbone microbien (FI) (mgC kg ⁻¹ sol)
0-20	238,7	223,8
20-40	189,5	199,9
40-55	39,7	89,0
55-70	30,7	97,2
70-85	21,0	85,3
85-105	19,8	150,4
105-125	42,2	117,3
125-140	23,1	158,1
140-150	21,2	134,8

Tableau 15 : Valeurs de carbone microbien (en mgC.kg⁻¹sol) déterminées par deux méthodes biocidales (FE et FI). Les quantités de carbone microbien estimées par la méthode de F.E. ont été calculées en utilisant un coefficient K_{ec} constant.

Nous avons observé que le dégagement de CO₂ est plus faible dans un sol profond fumigé que dans le même sol non fumigé. L'hypothèse avancée pour expliquer ce résultat apparemment aberrant est que, compte tenu de la faible taille de la population microbienne, la fumigation réduit cette population à un niveau tel que son démarrage ultérieur est difficile. Peut-être, dans ce cas aurait-il été nécessaire de réinoculer les échantillons de sol fumigé avec le même sol frais ainsi que le propose Jenkinson (1976). Ces résultats mettent en évidence l'utilité de la technique de Chaussod et Nicolardot (1982) par rapport à la méthode classique de fumigation-incubation avec témoin non fumigé.

Le tableau 15 compare les valeurs de carbone microbien déterminé à différents horizons de sol, par les méthodes FE et FI. Les valeurs de carbone biomasse par Fumigation-Extraction ont été calculées en tenant compte de la variation du K_{ec} telle que nous l'avons déterminée tandis que pour les valeurs de biomasse microbienne estimées par Fumigation-Incubation, nous avons utilisé un K_c constant de 0,41.

Compte tenu de nos résultats concernant la détermination du coefficient K_{ec} , il est possible que cette valeur K_c varie également avec la profondeur. Nous avons donc recalculé ce coefficient K_c en faisant le rapport entre la quantité de carbone-CO₂ libérée après fumigation et incubation et le carbone de la biomasse tel qu'il a été déterminé aux différentes profondeurs par la méthode FE en tenant compte de la variation du coefficient K_{ec} .

$$K_c = \text{flush C-CO}_2/\text{biomasse (FE)}$$

Les résultats de cette comparaison sont donnés dans le tableau 16. Dans le sol de surface, jusqu'à 40 cm de profondeur, les valeurs trouvées du coefficient K_c de 0,46 et 0,43 sont en accord avec la valeur de 0,41 proposée par Anderson et Domsch (1978) et Voroney et Paul (1984). Par contre, nous observons que la valeur du K_c augmente avec la profondeur pour dépasser la valeur maximale théorique de 1. Ceci tient probablement aux deux raisons suivantes :

- la première est biologique et peut correspondre au fait que, dans le sous-sol, l'utilisation de carbone pourrait se faire en privilégiant la minéralisation au détriment de l'assimilation.

- il se pourrait aussi que la méthode de marquage *in situ*, que nous avons utilisée, conduise à une sous-estimation de la valeur du coefficient K_{ec} pour une raison qu'il nous reste à trouver.

Profondeur (cm)	biomasse (FE) (mgC kg ⁻¹ sol)	flush (FI)	biomasse (FI) (mgC-CO ₂ kg ⁻¹ sol)	K_c
0-20	200,73	223,83	91,77	0,46
20-40	189,51	199,98	81,99	0,43
40-55	61,17	89,02	36,50	0,60
55-70	51,55	97,17	39,84	0,77
70-85	35,27	85,32	34,98	0,99
85-105	43,06	150,41	61,67	1,43
105-125	86,67	117,27	48,08	0,55
125-140	47,56	158,07	64,81	1,36
140-150	56,07	134,76	55,25	0,99

Tableau 16 : Détermination du coefficient K_c à différentes profondeurs par calibration avec la méthode de FE.

2-4 DÉTERMINATION PAR LA MÉTHODE DE RESPIRATION INDUITE PAR LE SUBSTRAT (SIR).

Pour stimuler l'activité respiratoire de la microflore des différents échantillons de sol, nous avons choisi deux concentrations différentes: 0,3 g glucose.100 g⁻¹sol jusqu'à un mètre de profondeur et 0,2 g glucose.100 g⁻¹sol au dessous de cette profondeur. Nous avons utilisé des concentrations de glucose identiques à celles déterminées pour les

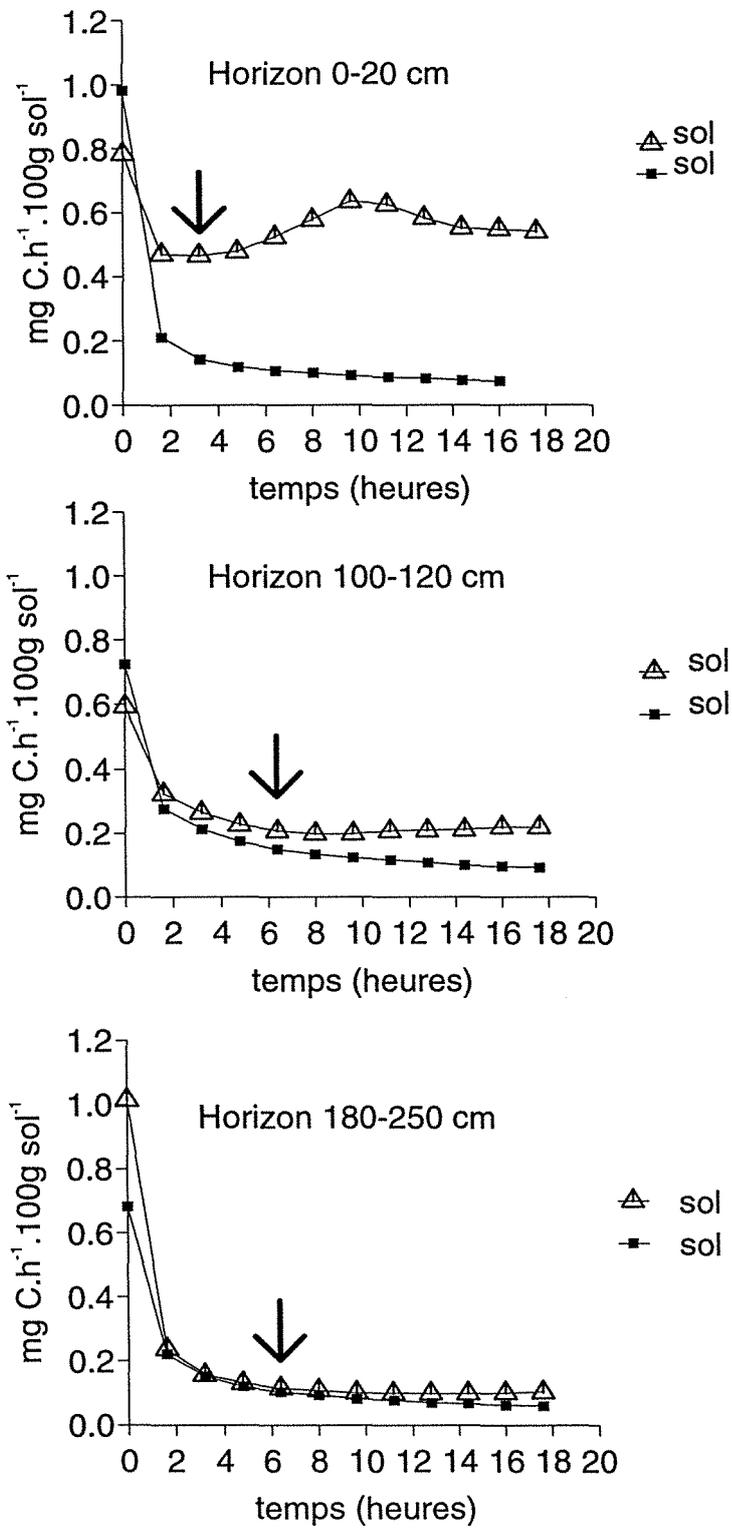


Figure 32 : Types de courbes de minéralisation initiale de 3 horizons de sol consécutif à un amendement de glucose dans les sols. La flèche indique le taux initial maximal respiratoire de la biomasse.

horizons prélevés dans un profil de sol anglais situé à Frensham. La figure 32 présente le comportement cinétique de trois horizons de sol consécutif à un amendement avec du glucose. Pour certains horizons 0-20 cm, 20-40 cm, 100-140cm et 140-220 cm, nous observons d'abord une diminution de la vitesse de dégagement du CO₂ suivie d'une stabilisation. Après 4 heures d'incubation, nous observons une reprise passagère de la minéralisation. Pour les autres horizons du sous-sol compris entre 40-100 cm et 220-250 cm, nous n'observons pas cette seconde phase d'augmentation de la vitesse de dégagement du CO₂. Sur le tableau 17, nous avons comparé les valeurs de biomasse estimées par les deux méthodes FE et SIR jusqu'à une profondeur de 250 cm. Deux différences apparaissent. La première concerne les valeurs de la biomasse qui sont toujours plus élevées lorsqu'elles sont estimées avec la méthode SIR. Par ailleurs, par cette même méthode, nous mettons en évidence l'existence d'un pic de biomasse centré sur la profondeur -140 cm, qui n'apparaît pas après utilisation de la méthode FE. De plus, nous obtenons des valeurs de biomasse estimées par la technique FE comparables à celles que nous avons obtenues dans l'expérience comparant les méthodes FE et FI (tableau 17).

Profondeur (cm)	biomasse (FE) (mgC kg ⁻¹ sol)	biomasse (SIR) (mgC kg ⁻¹ sol)
0-20	287,8	348,2
20-40	139,9	168,7
40-60	32,9	123,1
60-80	22,2	131,7
80-100	16,0	151,5
100-140	15,1	221,7
140-180	4,7	189,4
180-220	6,0	125,4
220-250	2,1	76,9

Tableau 17 : Valeurs des quantités de carbone microbien (en mgC.kg⁻¹sol) déterminées par les méthodes FE et SIR.

Nous avons recalculé la quantité de carbone microbien estimée par la méthode de FE en tenant compte de la variation du coefficient K_{ec} avec la profondeur.

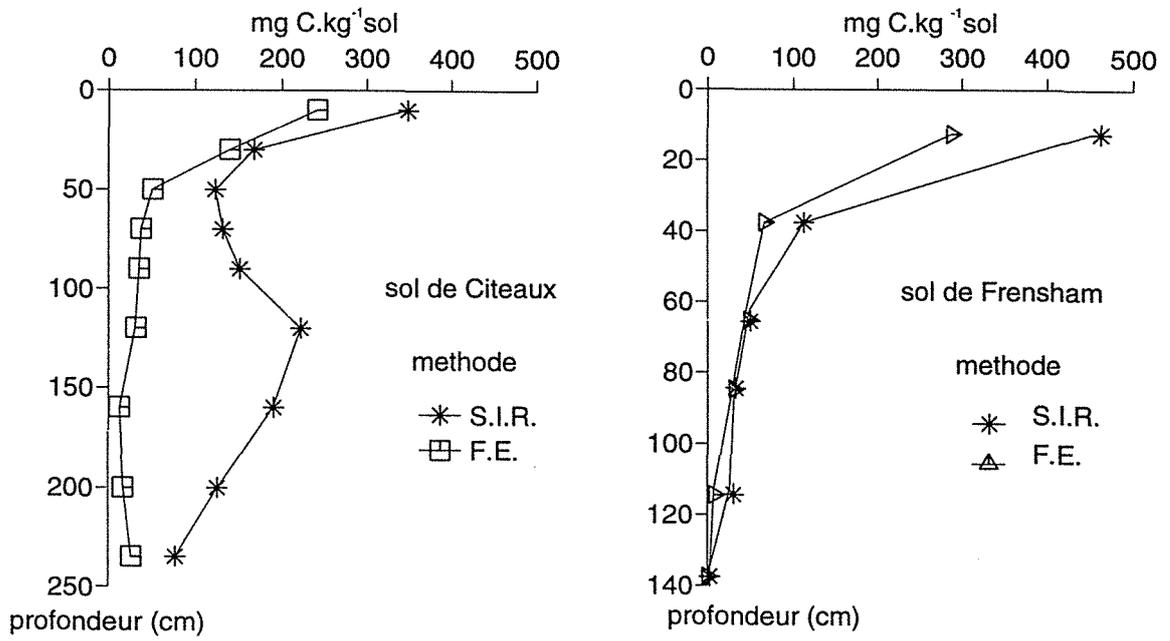


Figure 33 : Comparaison des méthodes S.I.R et F.E. d'estimation de la teneur de carbone microbien dans 2 profils de sol situés à Citeaux (A) et à Frensham (B).

Dans le cas du sol de Cîteaux (Figure 33A), nous avons obtenu des valeurs de biomasse microbienne plus faibles par la méthode FE qui sont de l'ordre de 242,05 mgC kg sol⁻¹ en surface et 26 mgC kg sol⁻¹ à 250 cm de profondeur. Cependant, nous observons que les valeurs de carbone microbien estimés par les 2 méthodes diminuent jusqu'à 50 cm de profondeur. Au delà de cette profondeur, nous n'observons plus de correspondance entre les estimations de carbone microbien par les 2 méthodes.

Nous avons réalisé la même comparaison sur un profil de sol différent, de texture limono-sableuse situé à Frensham en Angleterre (Figure 33B). Contrairement au profil de sol précédent, nous observons que la courbe représentant la biomasse déterminée par FE est proche de celle estimée par la SIR. Toutefois, dans le sol de surface, nous observons une sous-estimation d'un facteur de 1,5 du carbone microbien estimé par la technique FE par rapport à celui estimé par la méthode SIR.

CONCLUSION

Au terme de ce chapitre, le point fort de notre étude concerne la variation du coefficient d'extractibilité du carbone microbien, K_{ec} , dans un profil de sol. Ce résultat nous conduit à mettre en cause la validité des méthodes biocidales d'estimation de la taille de la biomasse dans le sous-sol. D'un point de vue méthodologique, nous devons souligner l'importance d'une recalibration des méthodes d'estimation de la taille de la biomasse dans un profil de sol. L'activité métabolique de cette microflore présente dans des horizons issus du profil de sol de Cîteaux sera étudiée dans le chapitre suivant.

- DEUXIEME PARTIE EXPERIMENTALE -

**étude de quelques activités microbiennes
dans le sous-sol**

- DEUXIÈME PARTIE EXPÉRIMENTALE -

ÉTUDES DE QUELQUES ACTIVITÉS MICROBIENNES DANS LE SOUS-SOL

INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons quantifié la biomasse microbienne du sous-sol à l'aide de différentes méthodes. Nous avons montré une diminution du carbone microbien avec la profondeur. Mais qu'en est-il de son fonctionnement et de son activité dans le sous-sol? Dans cette seconde partie expérimentale, nous avons étudié quelques activités microbiennes dans les différents horizons du profil de sol de Cîteaux. Nous avons cherché à analyser le fonctionnement métabolique de la microflore du sous-sol au travers de l'étude de la minéralisation de différents composés organiques naturels (glucose, acétate, acide benzoïque) et xénobiotiques (2,4-D, atrazine) en conditions de laboratoire c'est à dire optimales par rapport à celles qui prévalent dans le milieu naturel. Le choix de 3 composés organiques, tels que le glucose, l'acétate et l'acide benzoïque est justifié de la façon suivante : le glucose en raison de son utilisation par la majorité des micro-organismes du sol, l'acétate à cause de sa simplicité structurale et l'acide benzoïque comme représentant de la famille des composés aromatiques.

1- Méthode d'estimation du potentiel hétérotrophe du sol.

1-1 DÉVELOPPEMENTS THÉORIQUES ET APPLICATION AUX MILIEUX NATURELS.

1-1-1 Application aux milieux aquatiques - Bases théoriques.

Les premiers travaux relatifs à l'étude de l'activité hétérotrophe furent réalisés dans des milieux aquatiques essentiellement à cause de la méthodologie utilisée. Elle consiste à ajouter une solution de produit marqué dans le milieu naturel puis à mesurer la minéralisation en temps court ce qui suppose un mélange immédiat qui n'est aisément réalisable qu'en milieu liquide. Les applications ultérieures au milieu "sol" seront décrites par la suite.

Le détail de la technique destinée à suivre l'assimilation et la minéralisation de substrats carbonés marqués au ^{14}C apportés à différentes concentrations dans le milieu naturel fut initialement élaboré par Parsons et Strickland (1962). Il s'agit d'incuber, pendant 2 heures, des échantillons d'eau de mer amendés avec des solutions à différentes concentrations de glucose ou d'acétate marqués au carbone 14. Cette première étude a permis de montrer

que l'incorporation du carbone suivait une cinétique de type Michaelis-Menten. La technique est reprise ultérieurement par Wright et Hobbie (1965, 1966) qui en ont développé les bases théoriques. Ainsi, la vitesse de minéralisation (ou d'assimilation) du substrat marqué (v) s'exprime sous la relation :

$$v = \frac{V_m \cdot (S + A)}{K_m + (S + A)} \quad (9)$$

où A = part de la concentration du substrat provenant de l'apport,
 S = concentration naturelle inconnue du substrat,
 V_m = vitesse maximale d'incorporation du substrat,
 K_m = constante d'affinité pour le substrat.

Sous la forme linéaire de Lineweaver et Burk, cette relation s'écrit :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m \cdot (S + A)} + \frac{1}{V_m} \quad (10)$$

Nous pouvons déterminer la vitesse de minéralisation (ou d'incorporation dans la biomasse) du substrat par la formule suivante :

$$\frac{t}{f} = \frac{1}{V_m} A + \frac{K_m + S}{V_m} \quad (11)$$

où f = fraction de radioactivité minéralisée (ou incorporée),
 t = temps d'incubation.

A partir de la représentation graphique de t/f en fonction de A , nous pouvons estimer les paramètres T_n , V_m et K_m . Pour A égal 0, l'ordonnée à l'origine T_n (t/f), ou temps de turnover, représente le temps nécessaire à une dégradation complète du substrat à sa concentration naturelle S . Lorsque la concentration A est très supérieure à S , S devient alors négligeable et nous pouvons estimer les paramètres V_m et K_m .

1-1-2 application au milieu "sol".

Dobbins *et al.* (1987, 1988) développent une nouvelle méthode de mesure de l'activité hétérotrophe basée sur la mesure de la respiration et de l'incorporation cellulaire de composés radioactifs pour l'appliquer à l'étude des communautés microbiennes du sol. Ces auteurs traitent un mélange volume à volume de sol et d'eau avec des solutions de phénol

(1987) ou d'acides aminés ou de m-crésol (1988) marqués radioactivement au carbone 14. Dans cette dernière étude, après acidification du milieu, le CO₂ issu de la minéralisation du substrat est piégé dans de l'hydroxyde de potassium. Pour récupérer les cellules marquées radioactivement lors de l'incubation, la suspension de sol est mélangée avec une solution de pyrophosphate de sodium et de polyvinylpyrrolidone puis agitée. Après centrifugation, le surnageant est prélevé puis filtré. Le filtre est rincé avec de l'eau ou de l'éthanol pour la récupération du matériel biologique ayant incorporé respectivement des acides aminés ou du m-crésol. La radioactivité présente sur le filtre est comptée en scintillation liquide. D'après ces auteurs, 15 à 25% du substrat métabolisé est adsorbé sur les particules de sol. De plus, la seule mesure de la radioactivité dégagée sous forme de CO₂ sous-estime le taux de dégradation car le processus d'incorporation biologique du substrat contribue à fixer une proportion significative du carbone radioactif libéré par métabolisme du substrat organique ajouté. Dans certains cas, l'incorporation biologique peut devenir le processus métabolique majoritaire. Par exemple, dans la zone saturée du sol, les vitesses respectives de la respiration et de l'incorporation des acides aminés sont de 67,3 et 114 ng.h⁻¹kg⁻¹sol.

D'un point de vue théorique, Panikov *et al.* (1992) élaborent un modèle basé sur le formalisme de Michaelis-Menten et tenant compte de l'hétérogénéité du milieu "sol". Ils distinguent une première population oligotrophe caractérisée par de faibles valeurs de V_m et de K_m et une deuxième population copiotrophe avec des paramètres V_m' et K_m' élevés. Le modèle s'écrit de la façon suivante :

$$v = V_m \cdot \frac{S}{K_m + S_n + S} + V_m' \cdot \frac{S}{K_m' + S_n' + S} \quad (12)$$

où v = la vitesse de minéralisation
 S = la concentration en substrat
 S_n = la concentration naturelle en substrat dans le sol.

1-1-3 Quelques exemples d'application

Appliquée à la détermination du potentiel hétérotrophe d'eaux naturelles (Lake Erken, Suède), cette technique a permis à Wright et Hobbie (1966) de distinguer 2 systèmes de transport du substrat dans la communauté microbienne. Ainsi, à faibles concentrations comprises entre 1 et 100 µg.l⁻¹, l'assimilation du substrat serait sous le contrôle d'un système de transport actif de la population bactérienne. Au contraire, à fortes concentrations comprises entre 0,5 et 5 mg.l⁻¹ un second système de transport passif du produit lié à la population des algues prend le relais. De même, Azam et Hodson (1981) montrent que le temps de "turnover" (T_n) du glucose dans de l'eau de mer prélevée à 0,5 mètre de profondeur n'est pas une fonction linéaire de la concentration. La non-linéarité démontre

l'existence de groupes bactériens possédant des systèmes enzymatiques d'affinités différentes pour le glucose. Ces résultats conduisent Lewis *et al.* (1988) à souligner que les paramètres cinétiques de systèmes microbiens hétérogènes doivent être estimés pour différentes zones de concentrations.

Wright (1978) a introduit la notion d'activité spécifique en normalisant la mesure de l'activité hétérotrophe, représentée par V_m , par le nombre total des bactéries estimé par la technique AODC dans les eaux naturelles. L'Index d'Activité Spécifique (IAS) ainsi obtenu représente la quantité de substrat disponible absorbé par la cellule par unité de temps. Selon Wright (1978), cet index IAS reflète l'état physiologique des communautés bactériennes présentes dans l'environnement aquatique. Par exemple, cet auteur étudie le comportement métabolique des bactéries issues d'un profil vertical prélevé dans le Golfe du Maine. Tandis que le nombre total de bactéries reste constant, l'index IAS diminue avec la profondeur. De même, d'après Gottshal (1985), l'activité spécifique est le meilleur indicateur de la capacité des micro-organismes à prélever un substrat en solution diluée.

1-1-4 Intérêts et limites de la notion d'activité hétérotrophe.

Appliquée à des environnements aquatiques, la mesure de l'activité hétérotrophe permet une analyse du comportement de la microflore indigène. Cette méthode est suffisamment sensible pour détecter une modification de son fonctionnement lors d'un stress. C'est le cas après des apports de polluants organiques tels que le chlorobenzène, le m-crésol et l'acide nitriloacétique dans des eaux marines (Wright, 1978; Pfaender et Bartholomew, 1982), le dodecyl nonyléthoxylate dans des eaux de rivières ou souterraines (Larson, 1985) ou après une acidification d'eaux lacustres (Ferroni *et al.*, 1983; Leduc et Ferroni, 1984). De plus cette technique permet d'étudier la diversité métabolique de la microflore présente dans l'environnement naturel. Par exemple, Ventullo et Larson (1985) mesurent l'activité hétérotrophe d'eaux souterraines prélevées à cinq sites différents en Ohio et au Canada en utilisant des composés organiques tels que le glucose, l'arginine, l'acide glutamique, l'acide benzoïque, l'acide nitriloacétique et le 2,4-D. Tous ces composés organiques à l'exception du 2,4-D sont métabolisés par la population microbienne colonisant les nappes phréatiques.

Appliquée au sol, la mesure de l'activité hétérotrophe est un moyen d'évaluer les effets des facteurs de l'environnement. Ainsi, Anderson et Gray (1990) montrent que la valeur de V_m est deux fois plus élevée dans un sol en monoculture que dans un sol en polyculture. De même, les valeurs de K_m diffèrent d'un facteur de 2,5. De plus, la valeur de V_m permet de distinguer l'activité biologique d'un sol ayant un couvert végétal ($V_m = 21 \pm 1,8 \text{ ng.l}^{-1}\text{h}^{-1}$) d'un sol nu ($V_m = 28,8 \pm 1,8 \text{ ng.l}^{-1}\text{h}^{-1}$) (Ferroni *et al.*, 1985). Enfin, Wagner (1975) utilise cette approche méthodologique pour caractériser l'activité de la microflore naturelle présente dans différents horizons d'un profil de sol.

D'autres auteurs appliquent cette technique à l'étude de la dégradation de xénobiotiques. Ainsi, Schmidt et Gier (1990) observent que la minéralisation du 2,4-dinitrophénol (DNP) suit une cinétique multiphasique dans le sol. Après l'isolement de 2 bactéries dégradant le DNP, ces auteurs remarquent que ces deux souches possèdent des caractéristiques physiologiques différentes dues à des affinités différentes pour le DNP.

Cette méthode de mesure de l'activité hétérotrophe a des limites techniques. Nous pouvons d'abord citer celles qui résultent de la procédure opératoire qui consiste à mélanger le sol et l'eau. Une première conséquence est une diminution de la diffusion de l'oxygène. Ainsi, Panikov *et al.* (1992) montrent que le taux de production du $^{14}\text{CO}_2$ d'une boue est de 1,3 fois plus faible que celui du même sol à 60% de l'humidité équivalente. Ces auteurs montrent que la vitesse de dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ est maximale lorsque le sol est à 60-70% de sa capacité de rétention (figure 34). La deuxième conséquence de la mise en suspension du sol est une destruction de sa structure et une perturbation de l'arrangement des diverses niches écologiques qui constituent le cadre de vie naturel de la microflore. En conclusion, la mesure de l'activité hétérotrophe réalisée dans de telles conditions n'a qu'une valeur relative et ne traduit pas directement l'activité réelle de la population microbienne naturelle (Ferroni *et al.*, 1985).

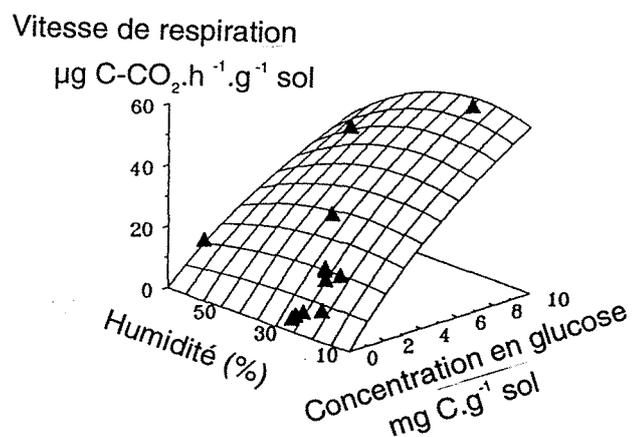


Figure 34 : Effet combiné de la teneur en eau et de la concentration en glucose sur la vitesse de minéralisation du substrat (Panikov *et al.*, 1992).

Une deuxième critique concerne l'utilisation d'un temps d'incubation unique pour les différentes concentrations en substrat. La méthode de Wright et Hobbie repose sur l'utilisation d'un temps d'incubation où la vitesse de minéralisation (ou d'incorporation) est une fonction linéaire du temps quelle que soit la concentration en substrat. Dans la procédure initiale, le temps d'incubation est choisi de façon à satisfaire la condition de linéarité de réponse aux deux concentrations extrêmes, le temps retenu étant supposé s'appliquer aux concentrations intermédiaires. Toutefois, Choquet *et al.* (1987) préfèrent

effectuer des cinétiques de minéralisation pour chaque concentration de substrat de façon à délimiter la période d'incubation durant laquelle la vitesse de minéralisation est une fonction linéaire du temps.

Un autre problème méthodologique concerne les modalités de l'apport de la solution de glucose dans le sol. Anderson et Domsch (1978) montrent que l'on peut réaliser un mélange homogène en apportant le glucose en mélange avec du talc. Cette procédure est surtout valable dans le cas d'échantillons de sol de taille importante. Pour les échantillons de sol de moindre taille (de 10 grammes au maximum), Panikov *et al.* (1992) montrent que l'on peut obtenir une distribution uniforme par addition directe du substrat en solution dans le sol. C'est cette technique d'introduction directe suivie d'une incubation de l'échantillon de sol à une teneur en eau proche de sa capacité de rétention que nous avons utilisée dans nos expérimentations.

Enfin, une autre limite concerne la signification des paramètres et notamment dans le cadre de la prévision de la dégradation des composés xénobiotiques. Larson (1984) souligne que les paramètres V_m et K_m représentent le potentiel de biodégradation des composés xénobiotiques dans l'environnement naturel. Toutefois, Pfaender et Bartholomew (1982) soulignent le fait que le V_m n'est jamais atteint dans les environnements naturels. Ainsi, l'utilisation de ce paramètre pour la prédiction du temps de persistance du polluant dans l'environnement peut conduire à une sous-estimation de celui-ci.

1-2 EXPÉRIENCES RÉALISÉES DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL.

Nous avons étudié l'activité hétérotrophe de 6 horizons de sol sur un profil de 2,5 mètres de profondeur : 0-20; 20-40; 40-80; 80-120; 120-180 et 180-250 cm.

(i) Préparation des échantillons de sol.

Le sol de chaque horizon est réparti à raison de 3 grammes (équivalent de sol sec) dans 30 fioles à pénicilline en verre ($V=10$ ml). Nous avons ajouté la quantité d'eau déminéralisée nécessaire pour amener le sol à 100% de l'humidité équivalente. Nous avons ensuite laissé les échantillons de sol s'équilibrer une nuit à une température de 20°C.

(ii) Traitement des échantillons de sol.

Nous avons traité chaque échantillon de sol avec 100 μ l de solution de substrat carboné marqué telle que, après traitement, les concentrations en substrat soient les suivantes : 2,5 , 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 et 1280 $\text{mgC.kg}^{-1}\text{sol}$ et les radioactivités comprises entre 4 et 7 kBq par échantillon. Les différents traitements sont résumés dans le tableau 18.

horizon (cm)	concentration (mgC.kg ⁻¹ sol)	quantité de radioactivité par échantillon (kBq)	
		Glucose	Acétate
0-20	2,5 à 1280	6,44	5,30
20-40	2,5 à 1280	6,44	5,30
40-80	2,5 à 640	6,18	5,30
80-120	2,5 à 640	6,18	4,89
120-180	2,5 à 320	6,18	4,89
180-250	2,5 à 320	6,18	4,89

Tableau 18 : Concentrations en substrat et quantité de radioactivité présente dans la solution de traitement pour chaque horizon.

Après homogénéisation par retournements successifs des fioles à pénicilline, nous avons introduit un tube Eppendorf de 0,5 ml dépourvu de son capuchon, contenant 0,5 ml de soude 0,2 M. Les fioles à pénicilline sont ensuite fermées hermétiquement par un bouchon en caoutchouc puis serties par une bague en aluminium. Une seringue à usage unique de 1 ml (Terumo) munie d'une aiguille hypodermique de 50 mm de long (Terumo, Luer 19Gx2", 1,1x50 mm) est maintenue à demeure dans le tube Eppendorf au travers du bouchon. Ce dispositif permet le prélèvement de la soude par aspiration puis l'addition du même volume de soude. Cette opération est réalisée toutes les heures sur une période de 10 heures dans une chambre climatisée à 20°C. La radioactivité piégée dans la soude, sous forme de ¹⁴CO₂, est dosée au compteur à scintillation liquide.

(iii) *Calculs.*

Nous avons mesuré la vitesse initiale de minéralisation (V_i) sur la base du pourcentage de radioactivité dégagée au cours des 2 premières heures d'incubation pour chaque concentration en substrat (S). Pour chaque horizon, nous avons représenté $1/V_i$ en fonction de $1/S$. Les paramètres cinétiques V_m et K_m sont calculés à l'aide de la relation de Lineweaver et Burk :

$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_m} + \frac{1}{S} \cdot \frac{K_m}{V_m} \quad (13)$$

Dans une deuxième expérience, nous avons mesuré l'activité hétérotrophe de 3 horizons de sol 0-20 cm, 100-140 cm et 180-250 cm dans une gamme de concentration d'acétate plus faible, comprise entre 0,5 et 80 mgC.kg⁻¹sol.

2- Etudes des cinétiques de transformation de différents substrats carbonés biogéniques et xénobiotiques.

2-1- CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION DE TROIS SUBSTRATS CARBONÉS NATURELS : GLUCOSE, ACÉTATE DE SODIUM ET ACIDE BENZOÏQUE.

2-1-1 Première expérience

(i) Principe

Nous avons étudié la cinétique de minéralisation de 3 composés organiques naturels (glucose, acétate de sodium et acide benzoïque) à 3 concentrations différentes (1000, 100 et 10 mg.kg⁻¹sol sec) et dans 7 horizons de sol prélevés entre 0 et 5 mètres de profondeur. Le tableau 19 résume les différents traitements qui ont été réalisés.

Profondeur	Traitement		
	glucose	acétate de sodium	acide benzoïque
cm			
0-20	+	-	+
20-40	-	+	-
80-100	+	+	+
190-210	+	+	+
240-260	+	+	+
340-360	+	+	+
390-405	+	+	+
450-470	-	+	-
490-508	+	-	+

Tableau 19 : Différents horizons de sol utilisés pour l'étude de la dégradation des composés organiques.

(ii) Traitements des échantillons de sol.

Des échantillons de 10 g (équivalent de sol sec) sont traités chacun avec 100 µl de solution aqueuse contenant 33,3 kBq de produit radioactif pour 100µl, la concentration finale de la solution étant ajustée avec du produit froid. La teneur en eau est ensuite ajustée à 100% de l'humidité équivalente. Les fioles contenant le sol traité sont homogénéisées par retournements successifs. Chaque traitement correspondant à une profondeur et une concentration en substrat est préparé en triple exemplaire.

(iii) Incubation des fioles de sol traité.

Chaque fiole est placée dans un flacon à plasma de 250 ml fermé hermétiquement avec un bouchon en caoutchouc. Dans ce flacon, sont placées 2 fioles à scintillation contenant respectivement 10 ml d'eau déminéralisée destinée à éviter le dessèchement du sol et 10 ml de soude 0,2 M pour piéger le ¹⁴CO₂ dégagé par minéralisation du substrat carboné. Les

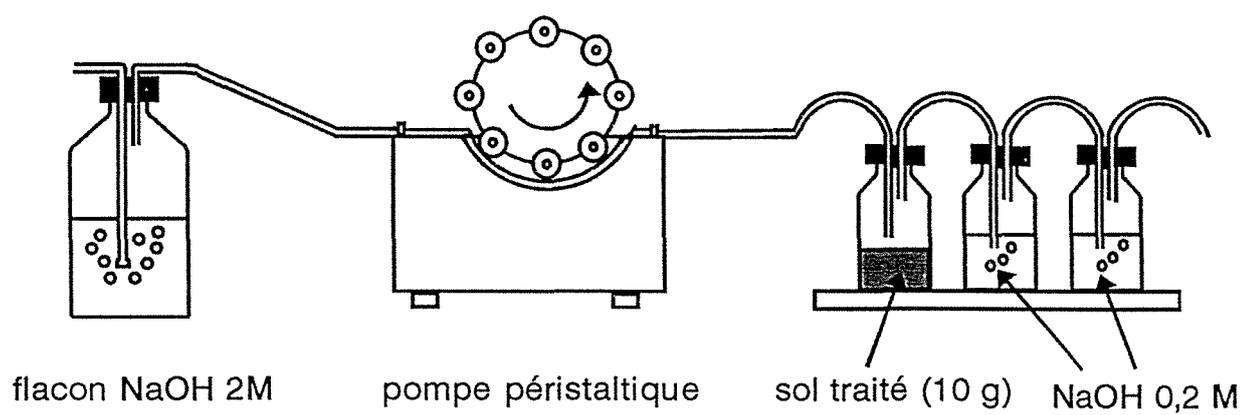


Figure 35 : Dispositif d'incubation à flux continu et de piègeage du CO₂

flacons sont mis en incubation pendant 91 jours dans une chambre climatisée à $20\pm 1^\circ\text{C}$. Les fioles de soude sont périodiquement prélevées, remplacées puis la radioactivité est dosée en scintillation liquide après apport de 10 ml de liquide scintillant (ACS Amersham) aux 10 ml de soude 0,2 M.

2-1-2 Deuxième expérience.

(i) Principe.

Nous avons suivi la minéralisation en temps court de trois composés organiques (glucose, acétate de sodium et acide benzoïque) dans des échantillons de sol prélevés sur 9 horizons de sol issus du profil de 1,5 mètres de profondeur sur le site de Cîteaux.

(ii) Traitements des échantillons de sol.

Chaque échantillon de 10 g (équivalent de sol sec) est traité avec 60 μl de la solution de traitement contenant le substrat carboné marqué et dont le tableau 20 donne les caractéristiques de radioactivité et de concentration. Chaque traitement est réalisé en triple exemplaire.

Produit	Activité spé.	Dose	^{14}C -substrat
	$\text{GBq}\cdot\text{mmole}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\text{KBq}\cdot\text{kg}^{-1}$
Glucose	10,915	5	273,8
		10	292,3
Acétate de Na	3378,1	5	181,3
		10	366,3
Ac. Benzoïque	0,55	5	588,3
		10	403,3

Tableau 20 : Quantités de produit radioactif ajoutées au sol.

(iii) Dispositif expérimental à flux continu.

L'incubation des échantillons de sol est effectuée dans un dispositif à renouvellement d'air placé dans une chambre climatisée à $20\pm 1^\circ\text{C}$ (figure 35). Dans ce système, une pompe péristaltique aspire l'air atmosphérique à travers une fiole contenant de la soude 0,4 M pour éliminer le CO_2 et le fait passer, à un débit de $3,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, à l'intérieur d'une fiole contenant les 10 grammes de sol traité. Puis, le $^{14}\text{CO}_2$ provenant de la minéralisation de la molécule marquée est piégé dans 2 fioles à scintillation contenant chacune 10 ml de soude 0,4 M. Toutes les 2 ou 4 heures pendant 24 heures, la pompe est arrêtée puis les pièges à CO_2 sont remplacés. Le dosage de la radioactivité s'effectue comme indiqué dans l'expérience précédente.

2-2 CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION DE COMPOSÉS XÉNOBIOTIQUES. CAS DU 2,4-D ET DE L'ATRAZINE.

(i) Principe.

Nous avons étudié la minéralisation de 2 herbicides, le 2,4-D et l'atrazine dans 8 (7) horizons de sol d'un profil du site de Cîteaux allant jusqu'à 5,25 mètres de profondeur. Pour chaque profondeur, nous avons comparé les cinétiques de dégradation après traitement à 3 concentrations, 0,033 , 0,33 et 3,3 mg.kg⁻¹sol. Le tableau 21 récapitule les différents traitements étudiés :

Profondeur (cm)	2,4-D	Atrazine
0-20	+	-
20-40	-	+
40-60	+	-
100-120	+	+
140-160	-	+
160-180	+	+
180-200	-	+
200-220	+	-
300-320	+	-
320-340	-	+
405-420	+	-
420-435	-	+
508-525	+	

Tableau 21 : Horizons de sol utilisés (profil de sol de 5 mètres) pour l'étude de la minéralisation du 2,4-D et de l'atrazine.

(ii) Traitement du sol avec le 2,4-D.

Pour chaque horizon, nous préparons 36 échantillons de 10 g (équivalent de sol sec). Nous les traitons avec 60 µl de solution de tampon phosphate (pH=7) contenant le 2,4-D radioactif dont la concentration est ajustée avec du produit froid. Ces solutions apportent à chaque échantillon 3,33 kBq de produit radioactif marqué sur le carbone du groupement -CH₂ ou 2,48 kBq de produit marqué uniformément sur le cycle aromatique.

(iii) Traitement du sol avec l'atrazine.

Nous avons réalisé la même expérience avec l'atrazine dans 7 horizons (tableau 21). L'atrazine étant peu soluble dans l'eau, nous avons traité de la manière suivante : pour chaque horizon de sol, nous avons pesé 36 échantillons de 0,5 grammes de l'horizon de sol correspondant qui ont été broyés puis tamisés à 250 µm. Chacun de ces microéchantillons est placé dans un godet en plastique de 1,5 ml. Dix-huit d'entre eux sont traités avec 44 µl de solution d'atrazine marquée au ¹⁴C sur le groupement éthyle apportant 2,24 kBq par

échantillon. La deuxième série de 18 échantillons est traitée avec 15 µl de solution radioactive marquée sur le cycle apportant 1,81 kBq par échantillon. A ces échantillons de 0,5 g de sol, nous ajoutons 1 ml de solution éthanolique d'atrazine non marquée pour ajuster à la concentration finale voulue. Nous laissons évaporer le solvant une nuit sous courant d'air. Ces 0,5 grammes de poudre de sol traitée sont incorporés dans les échantillons de sol définitifs dont la teneur en eau est ensuite ajustée à 100% de l'humidité équivalente. Nous avons réalisé 3 répétitions pour chaque traitement avec le 2,4-D et l'atrazine.

(iv) Incubation des fioles de sol traité.

Après homogénéisation de la répartition du pesticide dans les échantillons de sol, ceux-ci sont déposés dans un dispositif identique à celui décrit pour l'étude de la minéralisation des substrats naturels. Les cinétiques de minéralisation sont suivies pendant des périodes de 81 jours pour le 2,4-D et 91 jours pour l'atrazine au cours desquelles nous remplaçons les fioles de soude à des intervalles de temps croissants au fur et à mesure que la vitesse de dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ diminue. Après chaque prélèvement, le $^{14}\text{CO}_2$ provenant de la minéralisation de la molécule est dosé au compteur à scintillation liquide.

2-3- CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION ET D'INCORPORATION BIOLOGIQUE DU CARBONE. CAS DU 2,4-D.

2-3-1 Rappels bibliographiques sur la méthode utilisée.

Le principe de la technique de mesure de l'incorporation biologique du carbone d'un substrat organique marqué au ^{14}C est décrit par Soulas (1990). Les développements qui suivent se réfèrent à son travail. La technique repose sur une application de la technique biocidale de fumigation-incubation, utilisée selon le protocole décrit par Chaussod et Nicolardot (1982) sur des échantillons de sol sacrifiés après différentes périodes d'incubation en présence de pesticide marqué au ^{14}C .

Il est nécessaire de distinguer dans le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ la proportion de carbone minéralisé provenant de la biomasse marquée tuée de celle qui correspond à la dégradation du 2,4-D encore présent dans le milieu. Or, seulement 0,3 à 1,7% de 2,4-D marqué sur le cycle est dégradé dans 2 sols fumigés après 28 jours d'incubation (Soulas, 1990). Ce résultat permet de conclure que la microflore dégradant le 2,4-D est pratiquement éliminée par fumigation et que "le flush" de $^{14}\text{CO}_2$ qui se développe après fumigation a pour origine quasi-exclusive la minéralisation des composés cellulaires marqués de la microflore tuée par le traitement biocide. Une autre limite de cette méthode concerne la conséquence de la présence dans le sol de quantités résiduelles de 2,4-D sur l'activité de la microflore qui se réinstalle après fumigation et, en conséquence, sur la cinétique de minéralisation du carbone microbien tué. Or, il a été montré que la cinétique de dégagement du CO_2 total dans un sol fumigé amendé avec 3,2 mg 2,4-D.kg⁻¹sol n'est pas significativement différente de celle d'un

sol fumigé non traité. En conclusion, à des concentrations de quelques mg de produit par kg de sol, nous pouvons conclure que les résidus de 2,4-D ne manifestent pas de toxicité apparente à l'égard de la population microbienne qui se réinstalle dans le sol fumigé. La quantité de radioactivité, c'est à dire de carbone "pesticide" incorporé par la biomasse peut donc être calculée selon une formule extrapolée de la formule (14) :

$$^{14}\text{C} - \text{microbien} = \frac{^{14}\text{CO}_2 (0 - 7\text{jours}) - ^{14}\text{CO}_2 (7 - 14\text{jours})}{K_c} \quad (14)$$

Une limite technique de cette procédure réside dans la détermination du coefficient K_c . Nous pouvons supposer que l'incorporation initiale du carbone de la molécule de 2,4-D correspond à une néo-synthèse de composés cytoplasmiques facilement minéralisables. Cependant, à terme, la radioactivité biologique devrait atteindre des structures plus polymérisées et moins sensibles à l'action enzymatique de la microflore qui recolonise le sol fumigé. Ainsi, le coefficient K_c devrait varier avec le temps. L'utilisation d'un coefficient constant et égal à 0,41 comme dans la technique originale de fumigation-incubation conduit probablement soit à une surestimation de la taille de la biomasse dégradante immédiatement après l'apport de l'herbicide, soit à une sous-estimation en fin d'incubation.

2-3-2 Expérimentation réalisée.

Au cours de cette étude, nous avons suivi la dégradation du 2,4-D marqué au ^{14}C sur le cycle, à 2 concentrations, 0,047 et 3,3 mg.kg⁻¹sol, en mesurant d'une part l'évolution du $^{14}\text{CO}_2$ provenant de la minéralisation de la molécule et d'autre part l'incorporation biologique du carbone de la molécule par la technique de fumigation-incubation décrite précédemment.

(i) Traitement du sol.

Pour chacun des horizons provenant d'un profil de sol de 250 cm de profondeur réalisé sur le site de Cîteaux, nous avons préparé 30 échantillons de 10 g (équivalent de sol sec). Nous avons traité ces échantillons avec 100 µl de solution de 2,4-D apportant par échantillon soit 3,61 kBq de produit radioactif pour le traitement à la dose de 0,033 mg.kg⁻¹sol, soit 3,60 kBq pour le traitement à la dose de 3,3 mg.kg⁻¹sol. La teneur en eau des échantillons de sols est ensuite ajustée à 80% de l'humidité équivalente. Chaque échantillon de sol traité est ensuite placé dans un flacon à plasma en verre de 250 ml fermé hermétiquement conformément au dispositif décrit pour l'étude des cinétiques de minéralisation des divers substrats naturels ou xénobiotiques étudiés auparavant. Nous avons effectué 3 répétitions pour chaque traitement.

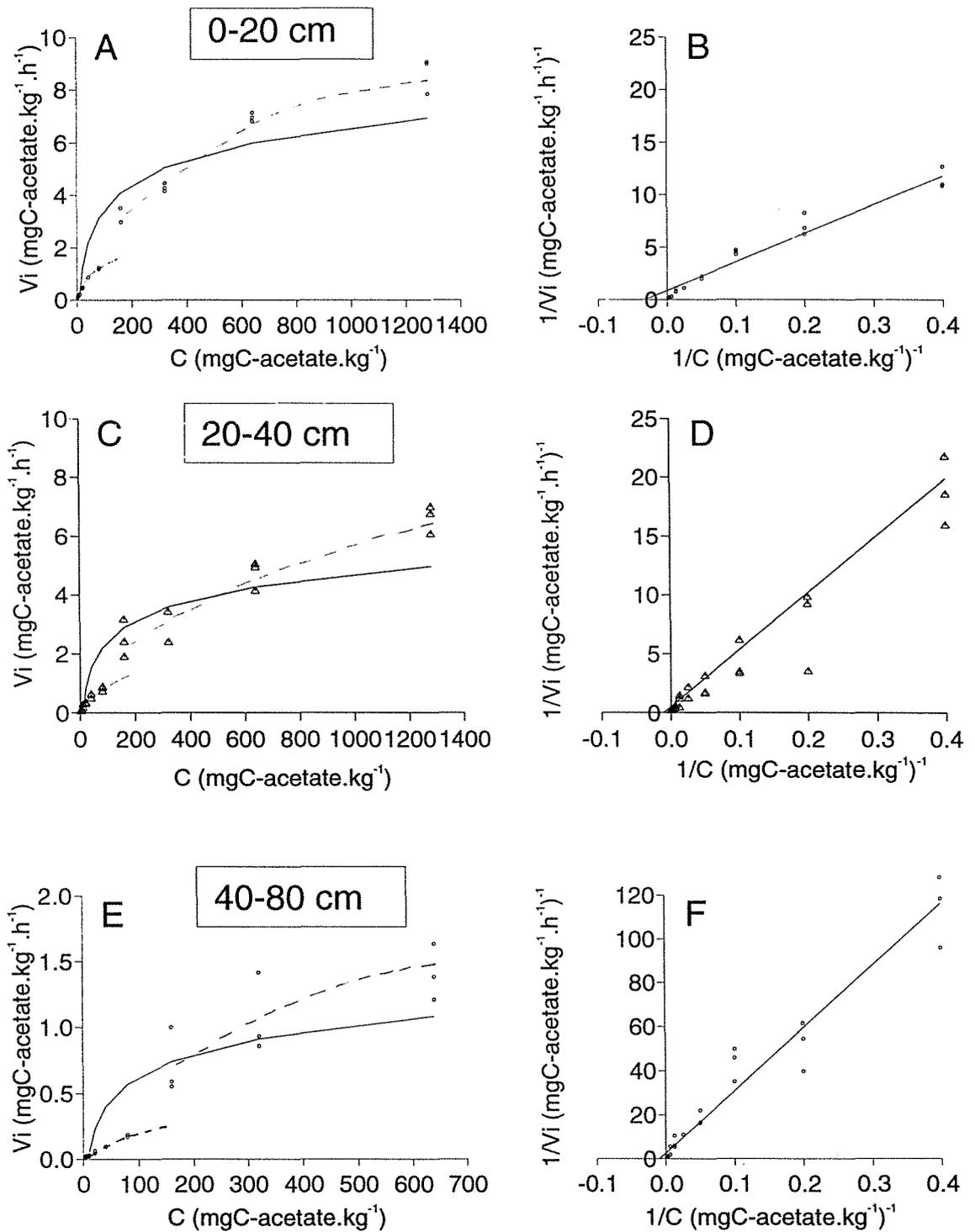


Figure 36 : Variation de la vitesse de minéralisation (V_i) de l'acétate en fonction de la concentration (C) en substrat (2,5-1280 mg.kg⁻¹sol). Représentation en doubles inverses (Lineweaver et Burk) de la vitesse initiale de minéralisation du glucose (V_i) et la concentration initiale (C) dans les horizons 0-20, 20-40 cm et 40-80 cm. La courbe en trait plein représente l'ajustement michaelien à la totalité des points. Les courbes en pointillés représentent l'ajustement après séparation des points expérimentaux en 2 lots.

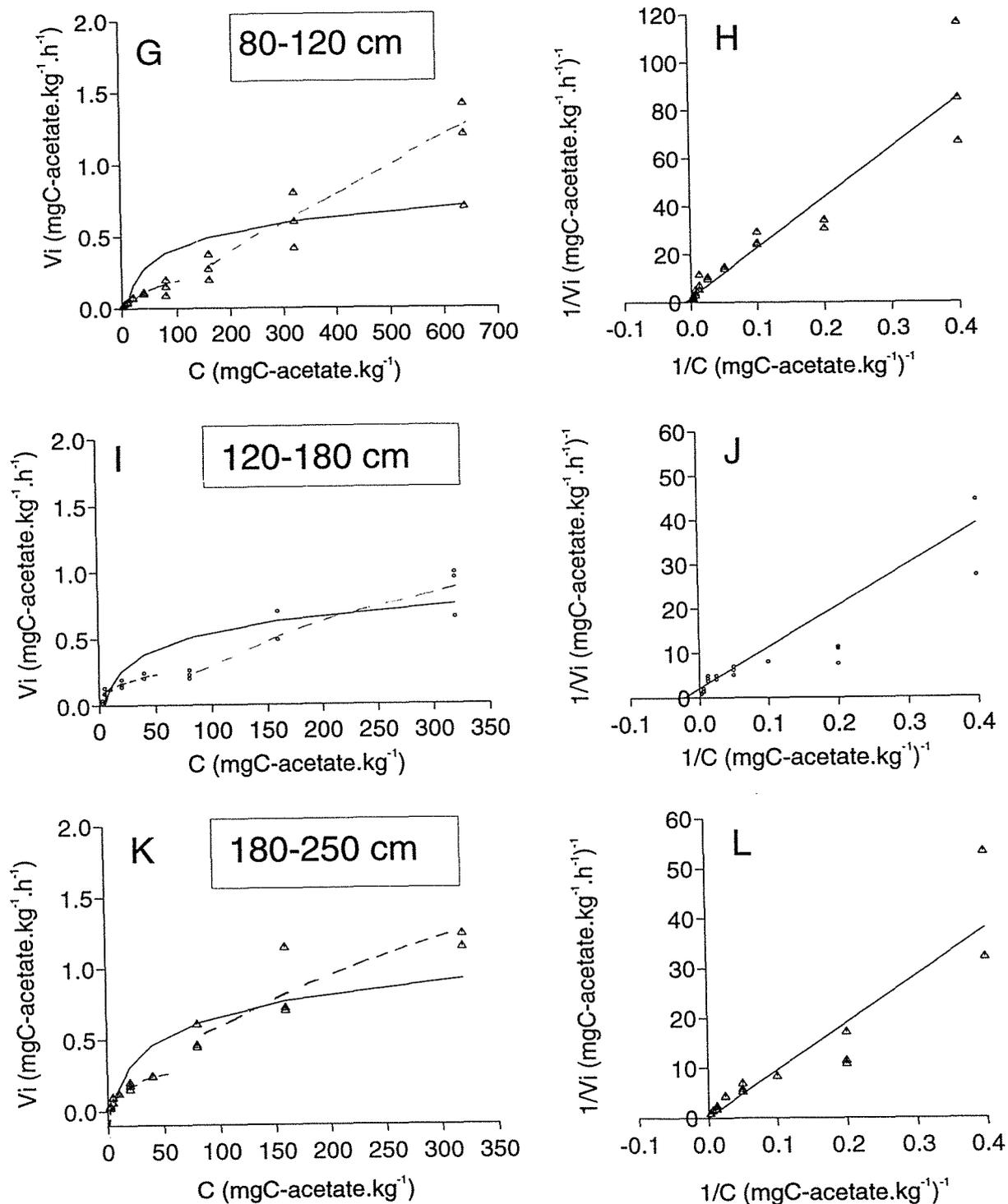


Figure 37 : Variation de la vitesse de minéralisation (V_i) de l'acétate en fonction de la concentration en substrat (C) (2,5-1280 mg.kg⁻¹sol). Représentation en doubles inverses (Lineweaver et Burk) de la vitesse initiale de minéralisation du glucose (V_i) et la concentration initiale (C) dans les horizons 80-120, 120-180 et 180-250 cm. La courbe en trait plein représente l'ajustement michaelien à la totalité des points. Les courbes en pointillés représentent l'ajustement après séparation des points expérimentaux en 2 lots.

(ii) Analyses réalisées.

Périodiquement, nous avons procédé au changement des fioles de soude de façon à analyser la radioactivité issue de la minéralisation de la molécule. Ce dosage est effectué en scintillation liquide. L'activité minéralisatrice est exprimée en cumulant les pourcentages de $^{14}\text{CO}_2$ dégagé.

Par ailleurs, nous avons suivi l'incorporation de radioactivité dans la biomasse. Pour cela, lors de l'analyse de la radioactivité minéralisée, nous avons sacrifié 3 échantillons de sol par profondeur. Ces échantillons sont fumigés pendant 24 heures selon le protocole décrit par Chaussod et Nicolardot (1982). Après élimination des vapeurs de chloroforme puis réajustement de l'humidité, les échantillons sont remis en incubation dans les mêmes dispositifs et placés en chambre climatisée à 28°C. Après 7, 14, 21 et 28 jours d'incubation, nous prélevons les fioles de soude et nous analysons au compteur à scintillation liquide la radioactivité piégée. Le calcul de la radioactivité incorporée dans la biomasse dégradante s'effectue à l'aide de la formule (14).

En parallèle, nous avons préparé 3 échantillons de sol de 10 g (équivalent de sol sec) par profondeur. Ces échantillons sont fumigés aux vapeurs de chloroforme pendant 24 heures. Après rinçage des vapeurs de chloroforme, les échantillons sont incubés dans une chambre climatisée à 28°C pendant 24 heures. Nous avons répété ces deux opérations de fumigation et d'incubation 3 fois de suite. Les processus de traitement et d'analyse des échantillons sont les mêmes que dans le cas précédent.

RESULTATS-DISCUSSION

1- Mesure de l'activité hétérotrophe de différents horizons de sol provenant de la zone non saturée.

1-1 MINÉRALISATION DE L'ACÉTATE.

Sur les figures 36 et 37 (courbes A, C, E, G, I et K) sont représentées les variations de la vitesse de minéralisation (V_i) de l'acétate en fonction de la concentration (C) en substrat. De même, les représentations en doubles inverses de la vitesse de minéralisation et de la concentration en substrat sont aussi reportées sur le même graphe (courbes B, D, F, H, J et L). A partir des droites de régression, nous en déduisons les valeurs des paramètres V_m et K_m qui sont rapportées dans le tableau suivant.

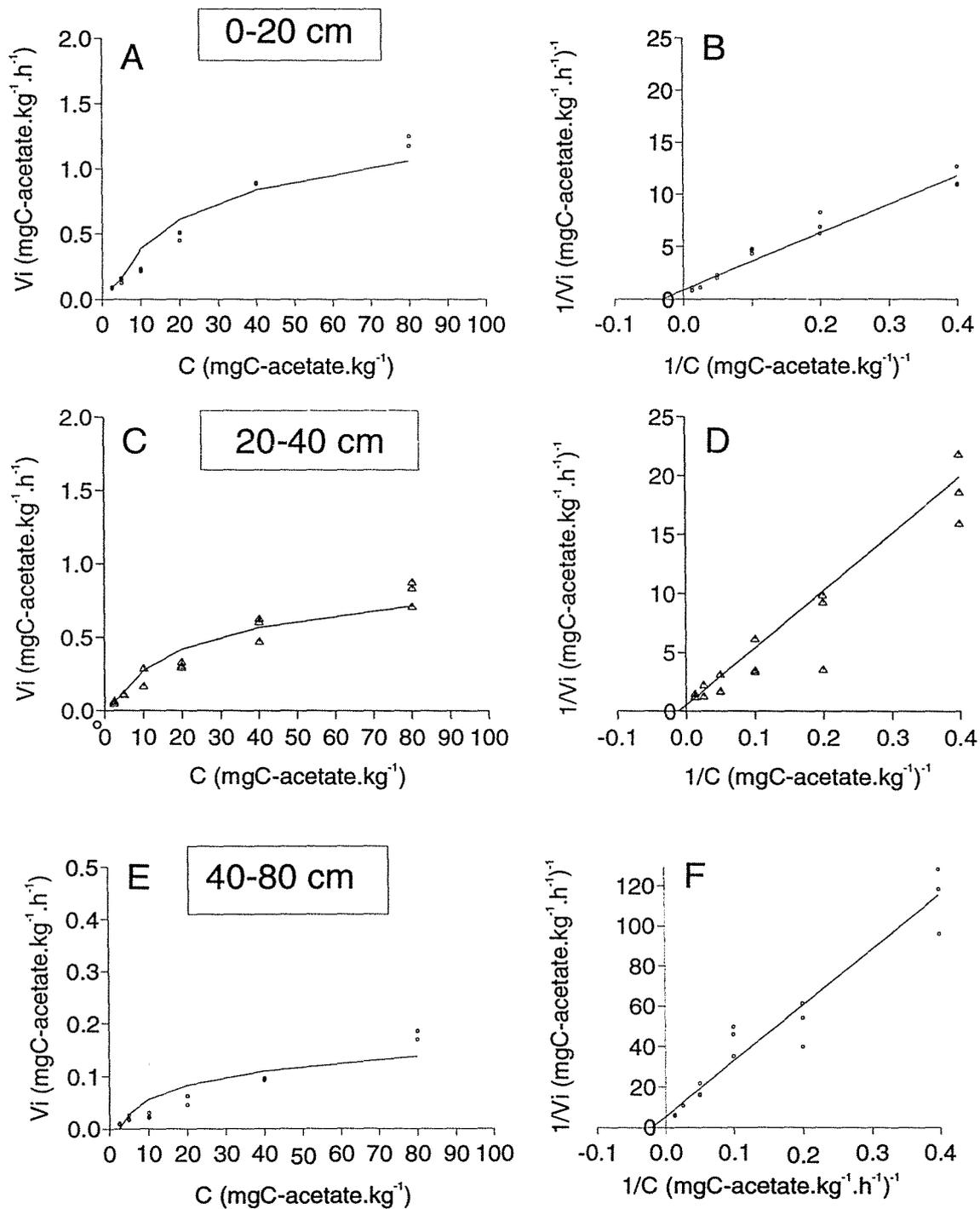


Figure 38 : Variation de la vitesse de minéralisation (V_i) de l'acétate en fonction de la concentration en substrat (C) (2,5-80 $\text{mg.kg}^{-1}\text{sol}$). Représentation en doubles inverses (Lineweaver et Burk) de la vitesse initiale de minéralisation du glucose (V_i) et la concentration initiale (C) dans les horizons 0-20, 20-40 et 40-80 cm.

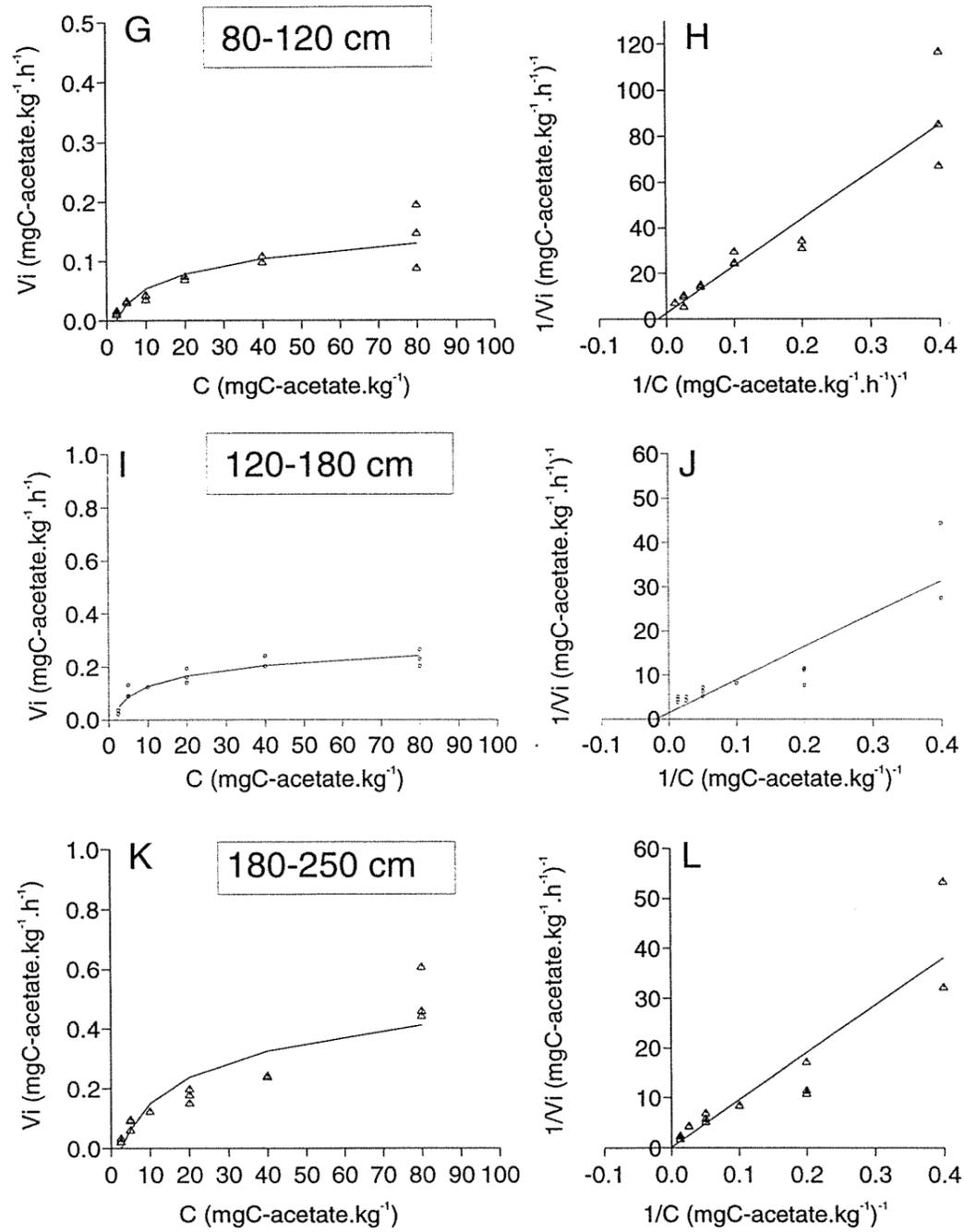


Figure 39 : Variation de la vitesse de minéralisation (V_i) de l'acétate en fonction de la concentration en substrat (C) (2,5-80 mg.kg⁻¹sol). Représentation en doubles inverses (Lineweaver et Burk) de la vitesse initiale de minéralisation d'acétate (V_i) et la concentration initiale (C) dans les horizons 80-120, 120-180 et 180-250 cm.

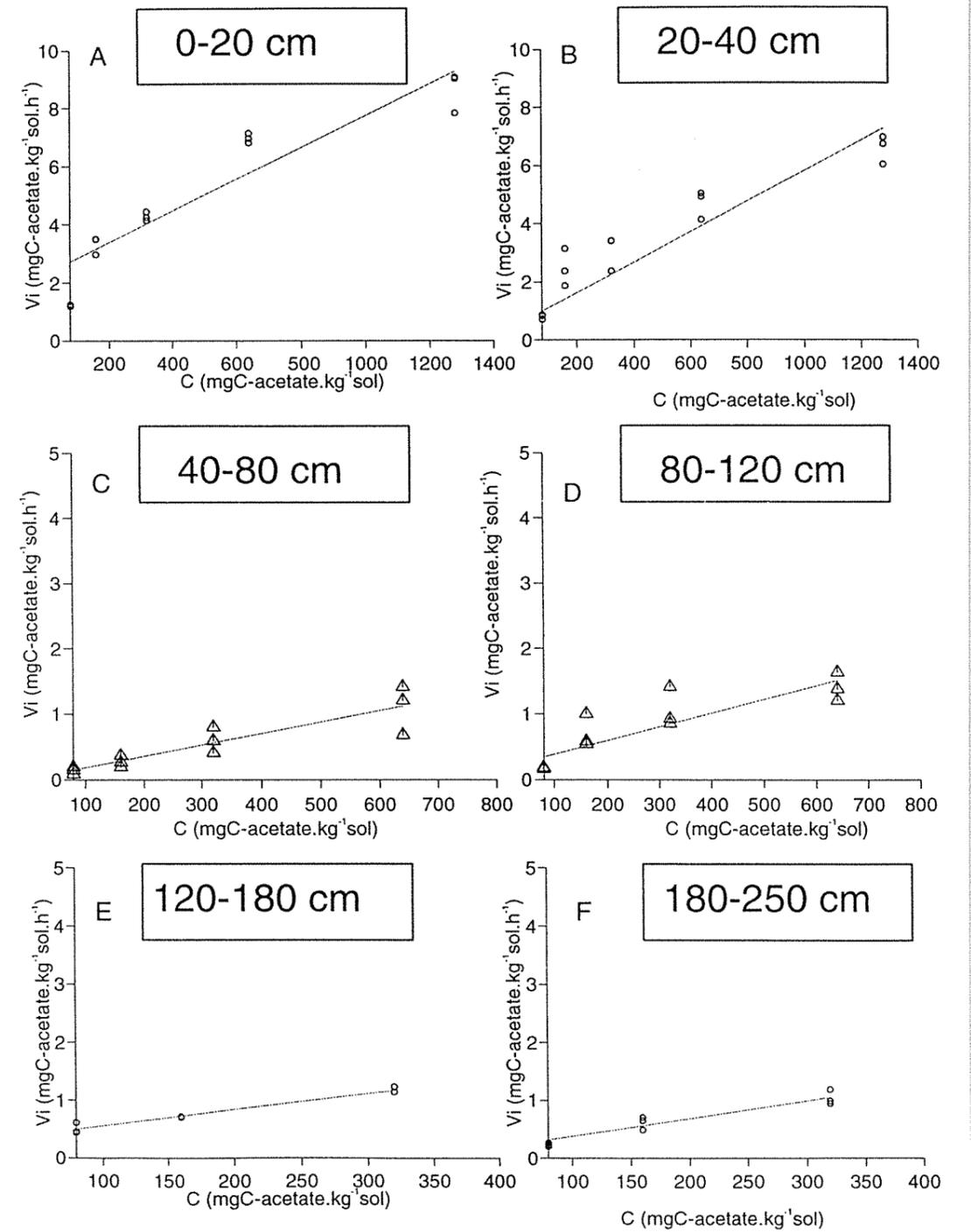


Figure 40 : Variation de la vitesse de minéralisation (V_i) de l'acétate en fonction de la concentration en substrat (80-1280 mg.kg⁻¹sol) dans les horizons 0-20, 20-40, 40-80, 80-120, 120-180 et 180-250 cm.

Profondeur	V_m	K_m
(cm)	mgC.kg ⁻¹ sol.h ⁻¹	mgC.kg ⁻¹ sol
0-20	2,21	64,87
20-40	3,40	167,57
40-80	0,38	107,35
80-120	0,51	106,65
120-180	0,80	60,67
180-250	1,52	144,04

Tableau 22 : Valeurs des paramètres cinétiques V_m et K_m relatifs à la minéralisation de l'acétate de sodium dans un domaine de concentration comprises entre 2,5 et 1280 mg C. kg⁻¹sol. Les valeurs sont déterminées à partir des droites de régression calculées à partir de la représentation graphique de Lineweaver-Burk de la relation entre la vitesse initiale de minéralisation et la concentration en substrat.

Nous observons une tendance générale qui se manifeste par une diminution sensible du paramètre V_m avec la profondeur, à l'exception de l'horizon 20-40 cm, qui traduit une baisse de l'activité de la microflore du sous-sol. Par contre, le sens de variation du paramètre K_m n'apparaît pas de façon évidente.

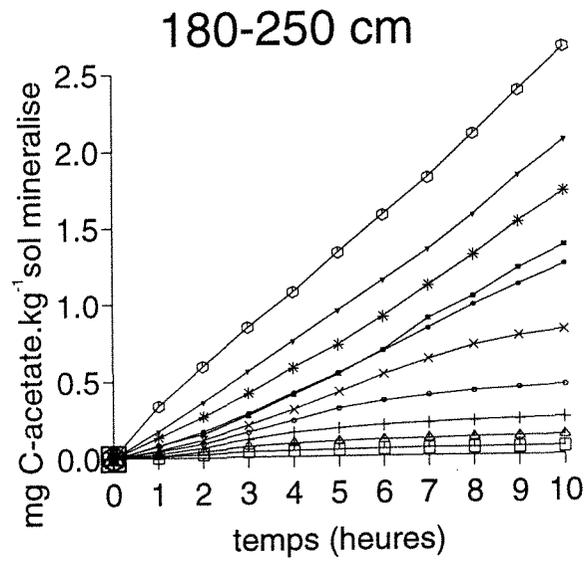
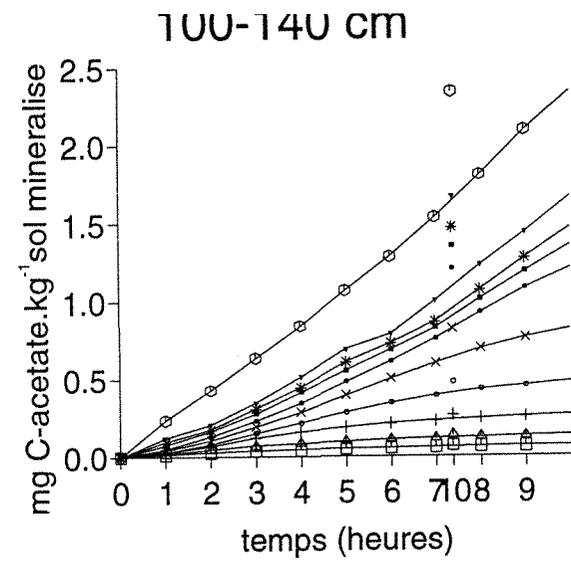
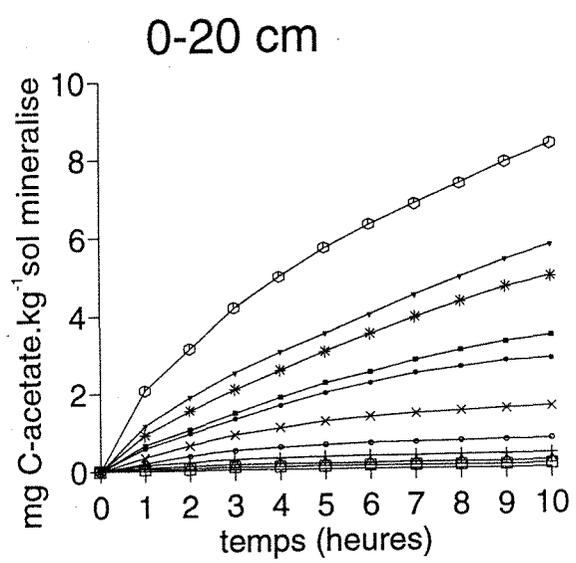
Sur les graphiques de gauche des figures 36 et 37, nous avons également fait figurer la courbe correspondant au modèle Michalien calculé pour les valeurs V_m et K_m du tableau 22. Pour tous les horizons étudiés, il semblerait que les points expérimentaux se distribuent plutôt sur deux courbes selon le domaine de concentrations considéré comme nous l'avons indiqué sur les figures 36 et 37 en traçant les courbes en pointillés. C'est pourquoi, nous avons refait le traitement mathématique en séparant les données précédentes en deux lots, l'un correspondant aux concentrations comprises entre 2,5 et 80 mg C-acétate. kg⁻¹sol et l'autre reprenant les résultats obtenus pour les concentrations les plus élevées. Les calculs relatifs aux faibles concentrations sont résumés sur les figures 38 et 39 et sur le tableau 23. Nous constatons effectivement qu'une réduction de l'intervalle de concentration améliore la qualité de l'ajustement au modèle Michaelien telle que nous pouvons l'apprécier visuellement sur les courbes des figures 38 et 39.

Profondeur	V_m	K_m
(cm)	$\text{mgC.kg}^{-1}\text{sol.h}^{-1}$	$\text{mgC.kg}^{-1}\text{sol}$
0-20	1,14	31,18
20-40	1,95	94,61
40-80	0,18	49,80
80-120	0,39	80,78
120-180	0,69	51,28
180-250	-	-

Tableau 23 : Valeurs des paramètres cinétiques V_m et K_m relatifs à la minéralisation de l'acétate de sodium dans la gamme de concentrations 2,5-80 $\text{mgC-acétate.kg}^{-1}\text{sol}$. Les valeurs sont déterminées à partir des droites de régression calculées à partir de la représentation graphique de Lineweaver-Burk de la relation entre la vitesse initiale de minéralisation et la concentration en substrat.

Il n'a pas été possible d'estimer les valeurs de V_m et de K_m dans l'horizon 180-250 cm, l'ordonnée à l'origine étant négative. Cette nouvelle expérimentation confirme que la vitesse maximale de minéralisation, V_m , diminue avec la profondeur. Elle est 2 à 6 fois plus faible dans les horizons profonds que dans l'horizon de surface. La constante d'affinité K_m est supérieure à celle déterminée dans l'horizon de surface, mais cette différence n'est pas significative. Par contre, par rapport à l'expérience précédente, nous observons une diminution sensible de la constante K_m qui, pour l'ensemble des horizons, semble conforter l'hypothèse de l'existence de groupes microbiens plus adaptés aux faibles concentrations.

En ce qui concerne la gamme de concentrations plus élevée (80 à 1280 $\text{mg C-acétate.kg}^{-1}\text{sol}$), nous observons une relation linéaire entre la vitesse de minéralisation et la concentration en substrat (figure 40). Compte tenu du nombre limité de valeurs expérimentales, nous n'avons pas pu interpréter ces résultats en terme de cinétique Michaelienne. Dans le tableau 24, nous avons regroupé les valeurs des paramètres des droites de régression.



concentration en acetate (mg/kg sol)

- dose 0.5
- △ dose 1
- + dose 2
- dose 4
- × dose 8
- dose 16
- dose 20
- * dose 30
- ▼ dose 40
- ⊕ dose 80

Figure 41 : Cinétiques de minéralisation de l'acétate en fonction du temps à différentes concentrations (0,5-80 mgC.kg⁻¹sol) dans les horizons 0-20, 100-140 et 180-250 cm.

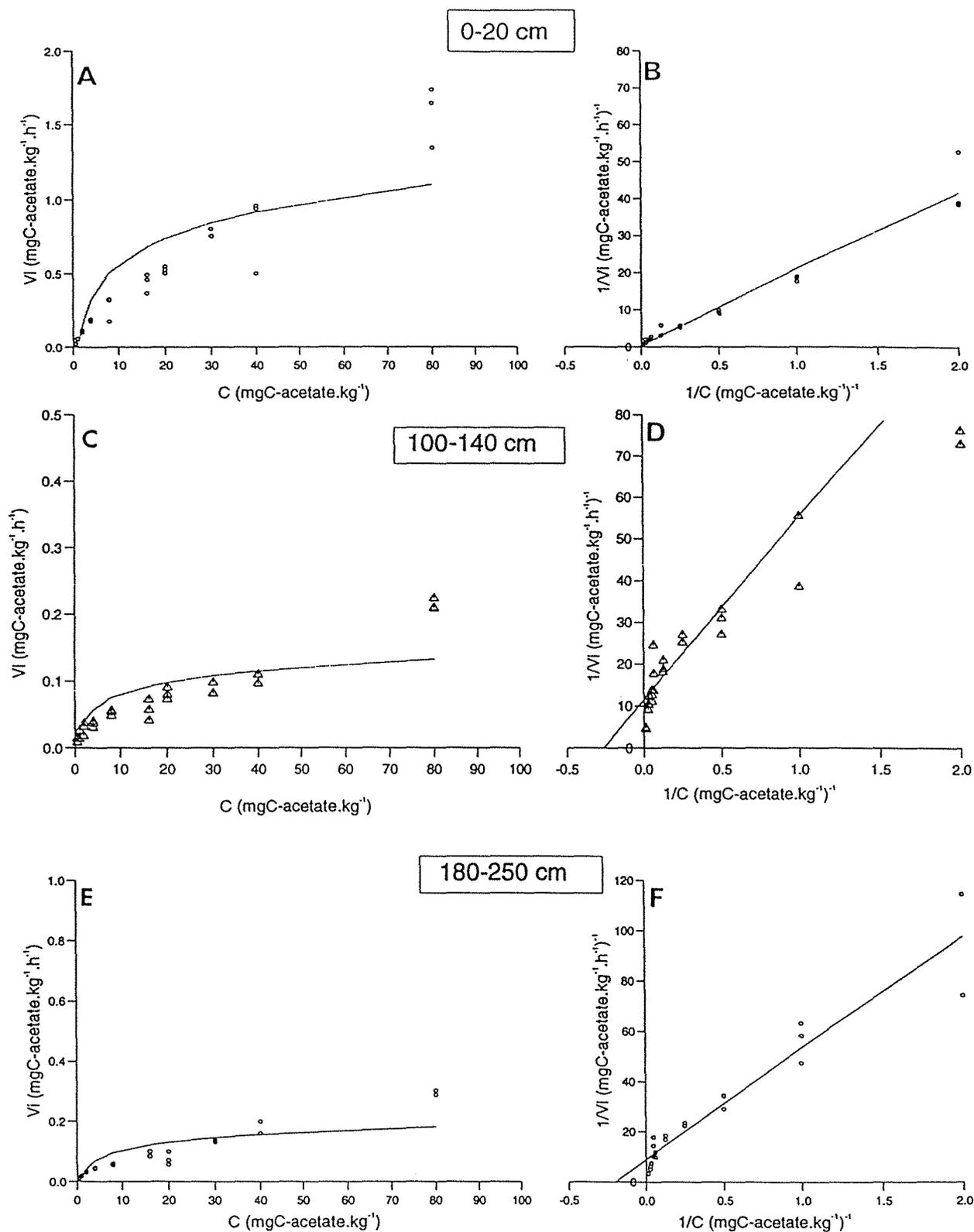


Figure 42 : Variation de la vitesse de minéralisation (V_i) de l'acétate en fonction de la concentration en substrat (C) (0,5-80 mg.kg⁻¹ sol). Représentation en doubles inverses (Lineweaver et Burk) de la vitesse initiale de minéralisation d'acétate (V_i) et la concentration initiale (C) dans les horizons 0-20, 100-140 et 180-250 cm.

Profondeur	ordonnée à l'origine	pente
(cm)	$\times 10^{-2} \text{ mgC.kg}^{-1}$	$\times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$
0-20	227,80±40,87	5,45±0,60
20-40	58,07±16,48	5,23±0,34
40-80	17,59±12,90	2,09±0,34
80-120	1,27±0,74	1,73±0,21
120-180	7,22±2,10	3,06±0,15
180-250	27,06±4,44	2,81±0,20

Tableau 24 : Valeurs des paramètres des droites de régression établies entre la vitesse de minéralisation et la concentration en substrat dans la gamme de concentrations 80-1280 mgC-acétate.kg⁻¹sol.

C'est pour étudier avec plus de précision le phénomène que nous avons déterminé, dans une deuxième expérience, l'activité hétérotrophe de la microflore de 3 horizons de sol 0-20, 100-140 et 180-250 cm, en traitant les sols avec de l'acétate de sodium aux dix concentrations suivantes : 0,5 ,1, 2, 4, 8, 16, 20, 30, 40 et 80 mgC-acétate.kg⁻¹sol.

La figure 41 représente les cinétiques de minéralisation de l'acétate sur un intervalle de temps de 10 heures. La figure 42 et le tableau 25 résument les résultats de cette expérience.

Profondeur	V_m	K_m
(cm)	mgC.kg ⁻¹ sol.h ⁻¹	mgC.kg ⁻¹ sol
0-20	4,63	96,36
100-140	0,09	3,81
180-250	0,11	5,04

Tableau 25 : Valeurs des paramètres cinétiques V_m et K_m relatifs à la minéralisation de l'acétate de sodium dans la gamme de concentrations 0,5-80 mgC-acétate.kg⁻¹sol. Les valeurs sont déterminées à partir des droites de régression calculées à partir de la représentation graphique de Lineweaver-Burk de la relation entre la vitesse initiale de minéralisation et la concentration en substrat.

Cette deuxième expérience confirme la diminution de la valeur du paramètre V_m avec la profondeur. Par ailleurs, pour l'horizon de surface, la valeur de V_m calculée à partir des

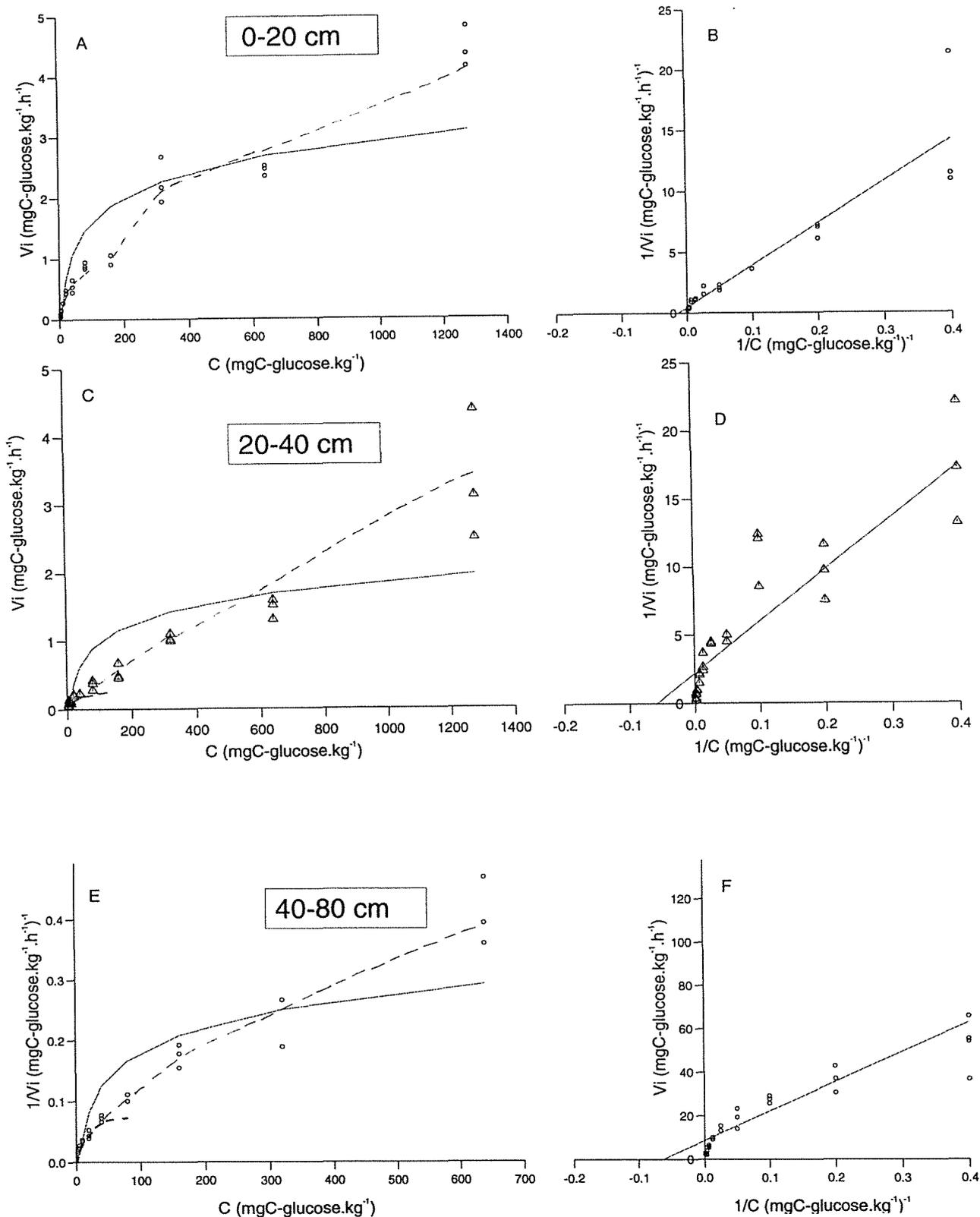


Figure 43 : Variation de la vitesse de minéralisation (V_i) du glucose en fonction de la concentration en substrat (C) (2,5-1280 mg.kg⁻¹sol). Représentation en doubles inverses (Lineweaver et Burk) de la vitesse initiale de minéralisation du glucose (V_i) et la concentration initiale (C) dans les horizons 0-20, 100-140 et 180-250 cm. La courbe en trait plein représente l'ajustement michaelien de la totalité des points. Les courbes en pointillés représentent l'ajustement après séparation des points expérimentaux en 2 lots.

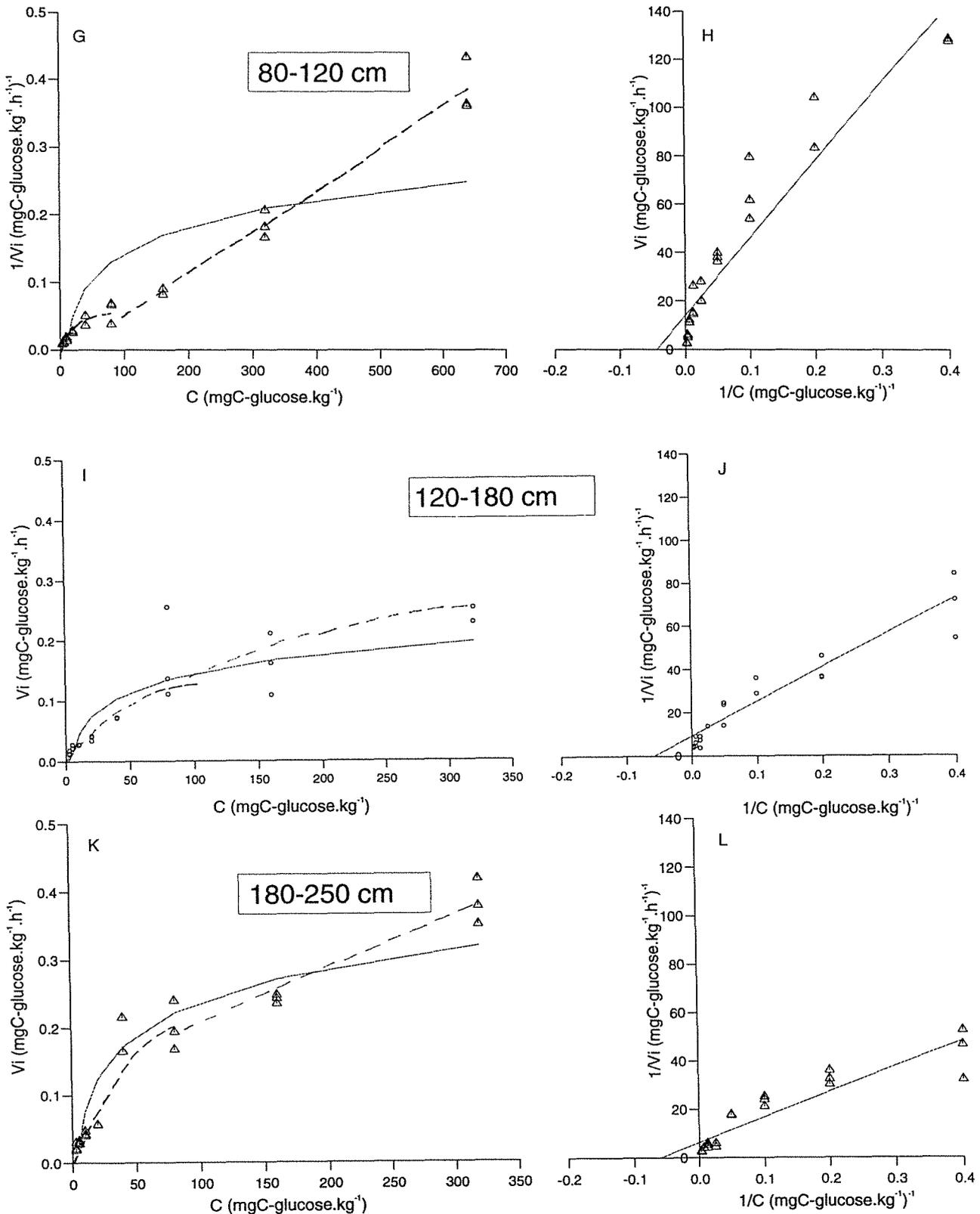


Figure 44 : Variation de la vitesse de minéralisation (V_i) du glucose en fonction de la concentration en substrat (C) (2,5-1280 mg.kg⁻¹sol). Représentation en doubles inverses (Lineweaver et Burk) de la vitesse initiale de minéralisation du glucose (V_i) et la concentration initiale (C) dans les horizons 80-120, 120-180 et 180-250 cm. La courbe en trait plein représente l'ajustement michaelien de la totalité des points. Les courbes en pointillés représentent l'ajustement après séparation des points expérimentaux en 2 lots.

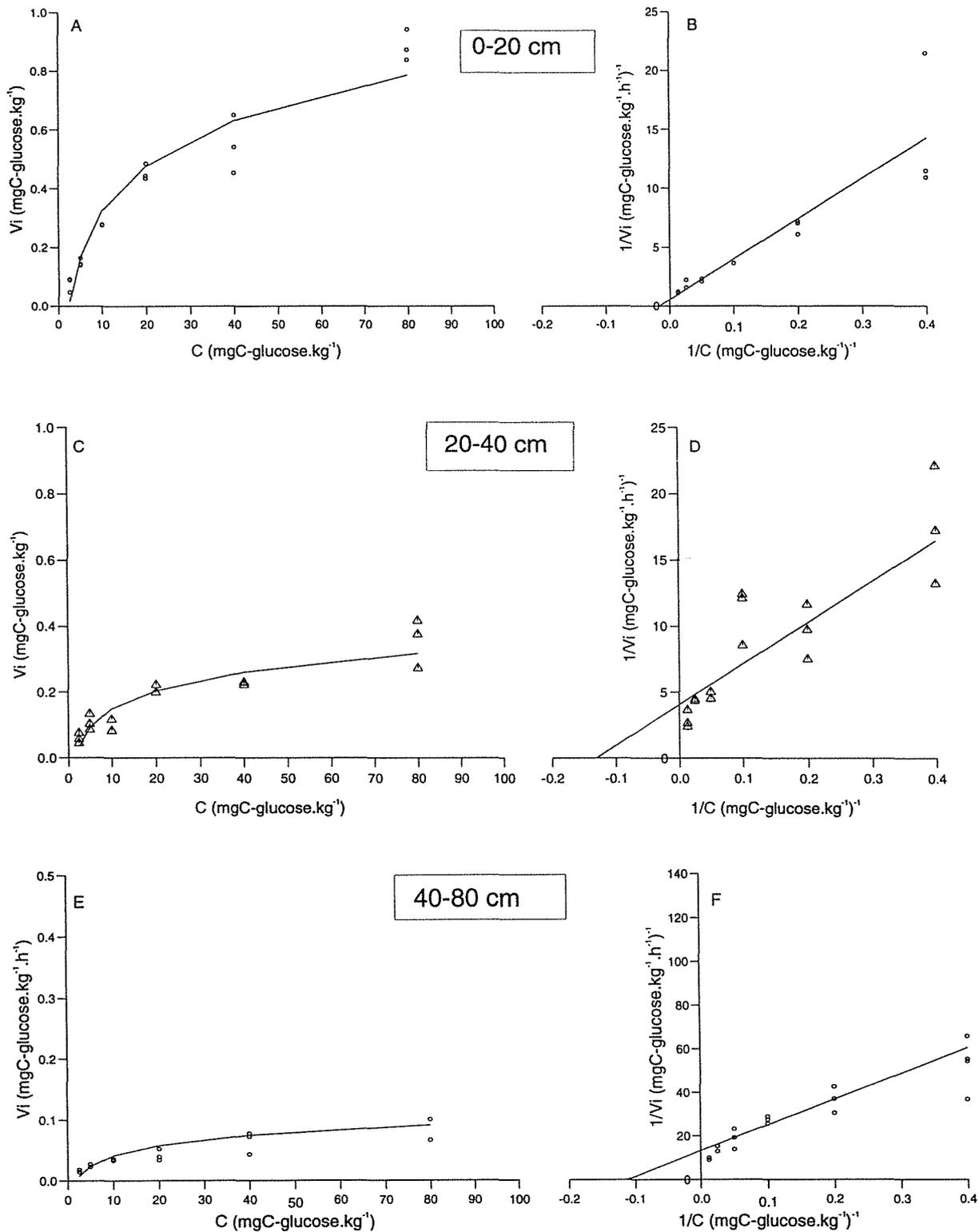


Figure 45 : Variation de la vitesse de minéralisation (V_i) du glucose en fonction de la concentration en substrat (C) (2,5-80 mg.kg⁻¹sol). Représentation en doubles inverses (Lineweaver et Burk) de la vitesse initiale de minéralisation du glucose (V_i) et la concentration initiale (C) dans les horizons 0-20, 20-40 et 40-80 cm.

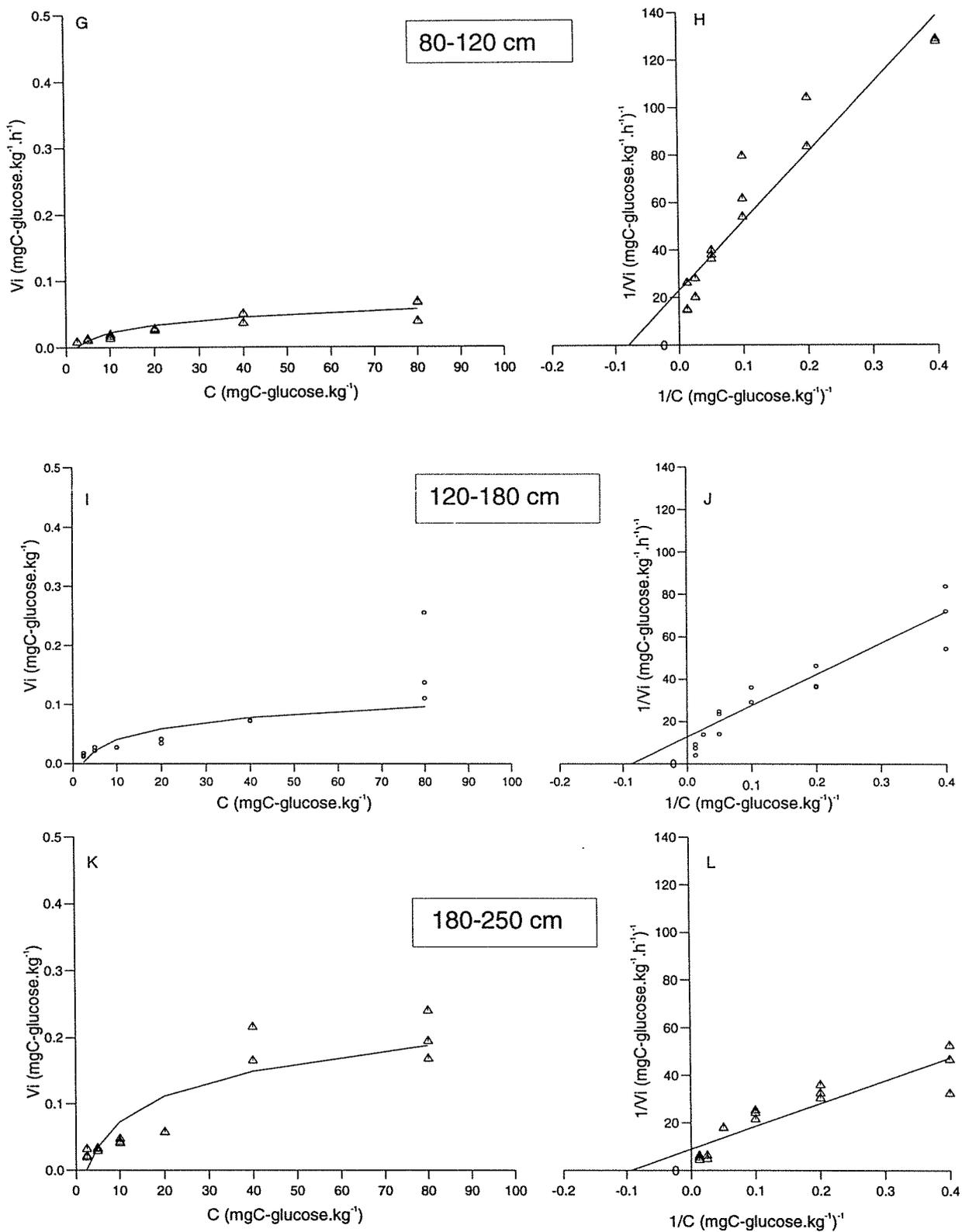


Figure 46 : Variation de la vitesse de minéralisation (V_i) du glucose en fonction de la concentration en substrat (C) ($2,5-80 \text{ mg.kg}^{-1}\text{sol}$). Représentation en doubles inverses (Lineweaver et Burk) de la vitesse initiale de minéralisation du glucose (V_i) et la concentration initiale (C) dans les horizons 80-120, 120-180 et 180-250 cm.

données de cette dernière expérience est 2 à 4 fois plus élevée que celle que nous avons estimé dans la première expérience. L'observation la plus intéressante concerne la diminution de la valeur du paramètre K_m avec la profondeur. La diminution conjuguée des deux paramètres V_m et K_m va dans le sens d'une restriction de la biomasse en sol profond accompagnée d'une certaine spécialisation à de faibles concentrations en substrat.

1-2 MINÉRALISATION DU GLUCOSE.

Les figures 43 et 44 (courbes A, C, E, G, I et K) représentent les variations de la vitesse de minéralisation du glucose en fonction de la concentration en substrat pour l'ensemble du domaine de concentrations considéré allant de 2,5 à 1280 mg C-glucose.kg⁻¹sol. Les valeurs calculées des paramètres V_m et K_m apparaissent dans le tableau 26.

Profondeur (cm)	V_m mgC.kg ⁻¹ sol.h ⁻¹	K_m mgC.kg ⁻¹ sol
0-20	2,08	71,65
20-40	0,45	17,31
40-80	0,12	15,97
80-120	0,07	22,83
120-180	0,11	17,13
180-250	0,16	16,74

Tableau 26 : Valeurs des paramètres cinétiques V_m et K_m relatifs à la minéralisation du glucose dans la gamme de concentrations 2,5-1280 mgC-glucose.kg⁻¹sol. Les valeurs sont déterminées à partir des droites de régression calculées à partir de la représentation graphique de Lineweaver-Burk de la relation entre la vitesse initiale de minéralisation et la concentration en substrat.

Comme dans le cas précédent, compte tenu du mauvais ajustement des données au modèle Michaelien, nous avons considéré les résultats obtenus dans le domaine de concentrations comprises entre 2,5 et 80 mgC-glucose.kg⁻¹sol. D'une manière générale, l'ajustement des données au modèle Michealien semble plus satisfaisant ainsi que l'indiquent les courbes théoriques représentées sur les figures 45 et 46.

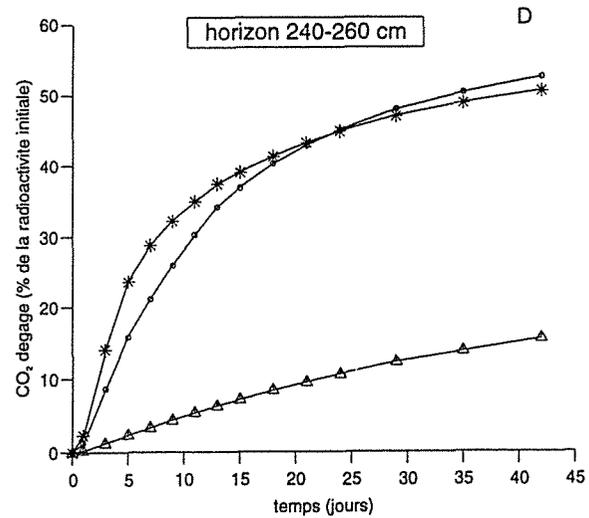
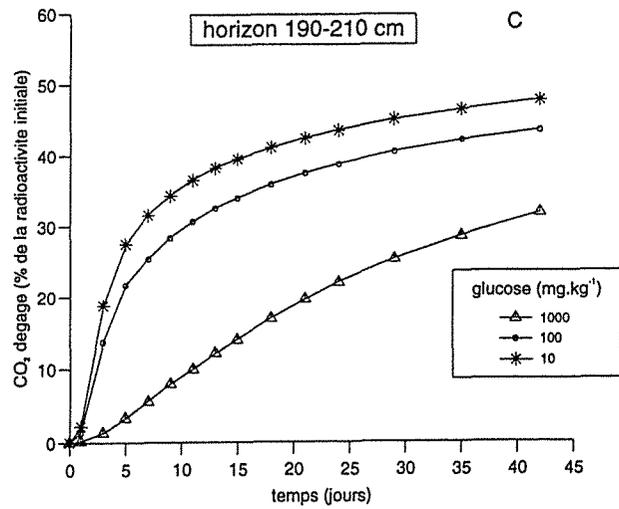
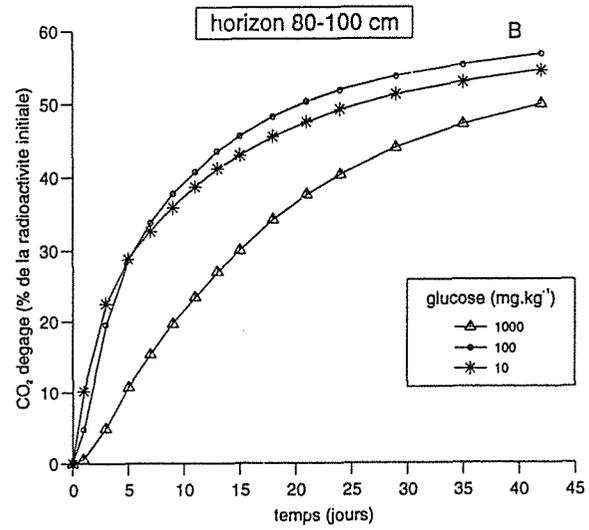
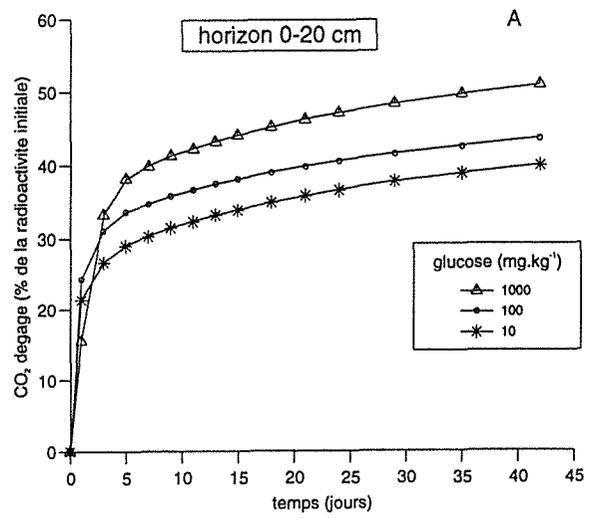
Profondeur	V_m	K_m
(cm)	mgC.kg ⁻¹ sol.h ⁻¹	mgC.kg ⁻¹ sol
0-20	1,77	60,57
20-40	0,25	7,62
40-80	0,08	8,86
80-120	0,04	12,58
120-180	0,08	11,64
180-250	0,11	10,85

Tableau 27 : Valeurs des paramètres cinétiques V_m et K_m déterminées à partir des représentations graphiques de Lineweaver-Burk dans la gamme de concentrations 2,5-80 mgC-glucose.kg⁻¹sol. Les résultats sont exprimés en mgC.kg⁻¹sol.h⁻¹ pour V_m et en mgC.kg⁻¹sol pour K_m .

Le calcul des paramètres cinétiques V_m et K_m fait apparaître une diminution significative des valeurs estimées avec la profondeur (tableau 27), confirmant ainsi la conclusion déjà donnée lorsque le substrat carboné est l'acétate : à une diminution générale de l'activité microbienne, probablement liée à un appauvrissement général de la microflore totale correspond une spécialisation physiologique qui se traduit par une plus grande affinité de la population microbienne pour les substrats carbonés.

Nous venons de montrer que la technique de mesure de l'activité hétérotrophe de la microflore présente dans les différents horizons du profil de sol permet de distinguer, sur des critères physiologiques, au moins deux systèmes enzymatiques correspondant aux 2 gammes de concentrations 2,5-80 mg C-substrat.kg⁻¹ sol et 80-1280 mg C-substrat.kg⁻¹ sol.. Ces différents systèmes enzymatiques peuvent être liés à deux populations microbiennes qui coexistent dans le sol. C'est la conclusion à laquelle parviennent Wright et Hobbie (1965) qui ont mis en évidence, dans les eaux lacustres, deux systèmes de transport du glucose dans une population hétérotrophe mixte : un système de transport actif lié à la population bactérienne et une diffusion simple plus caractéristique de la population algale. Anderson et Gray (1990) font également l'hypothèse que l'augmentation du dégagement de CO₂ observée immédiatement après amendement de glucose dans le sol implique un système de transport actif alors que celle qu'ils observent aux fortes concentrations pourrait être la cause d'une simple diffusion dans la cellule.

D'autres auteurs ont montré qu'un même micro-organisme pouvait posséder deux systèmes enzymatiques dont les caractéristiques cinétiques différentes permettraient une expression dans plusieurs domaines de concentrations. C'est le cas d'un *Flavobacterium* sp. qui dégrade le méthyle parathion (MP) en faisant intervenir deux systèmes enzymatiques : le



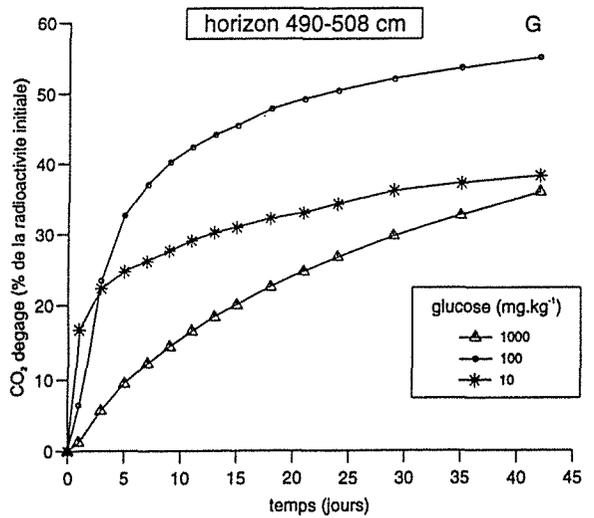
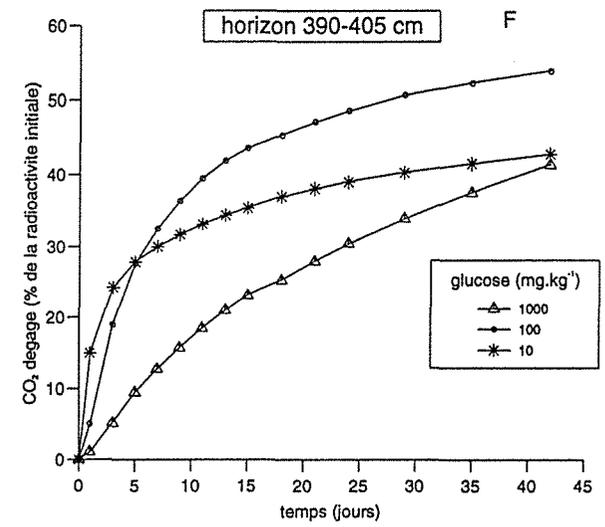
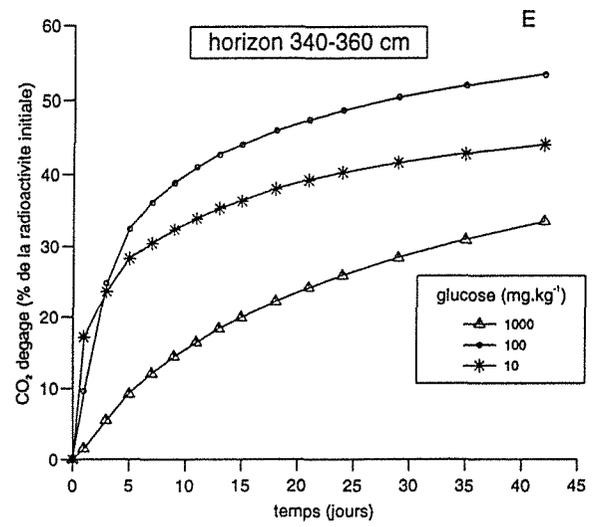


Figure 47 : Cinétiques de minéralisation du ¹⁴C-glucose à 3 concentrations (1000, 100 et 10 mg.kg⁻¹ sol) dans des sols prélevés à différentes profondeurs.

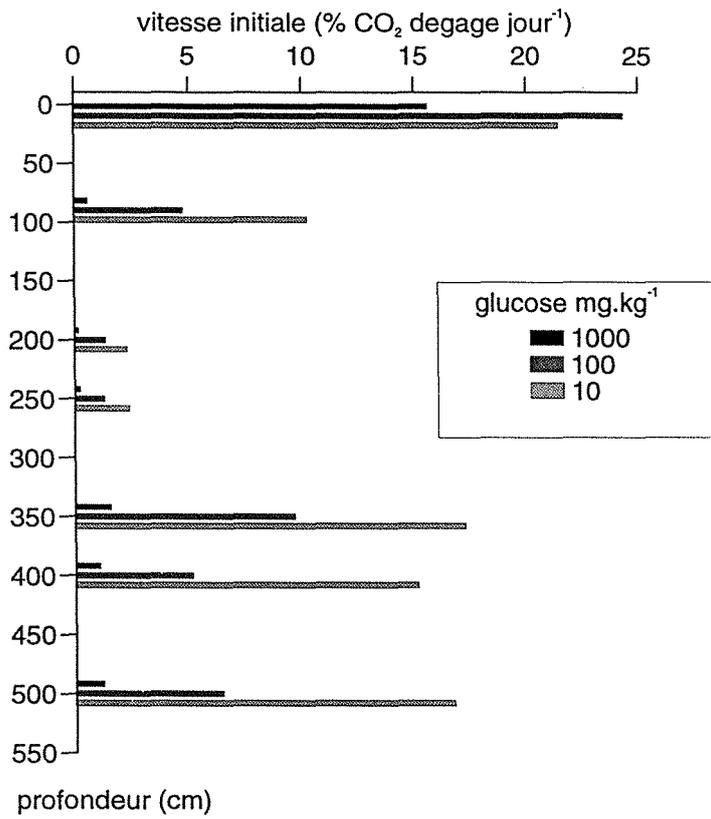


Figure 48 : Comparaison des vitesses initiales de minéralisation du glucose à 3 concentrations en fonction de la profondeur.

système I à haute affinité pour le substrat s'exprimant préférentiellement pour des concentrations inférieures à $20 \mu\text{g.l}^{-1}$ et le système II à faible affinité pour le substrat et s'exprimant lorsque la concentration devient supérieure à 4mg.l^{-1} (Lewis *et al.*, 1985). Un deuxième exemple est donné par des bactéries présentes dans des eaux marines dont Azam et Hodson (1981) ont montré que certaines espèces pouvaient posséder six systèmes enzymatiques différents de transformation du glucose. Leur conclusion est que la coexistence de ces différents systèmes efficaces dans différents domaines de concentrations en glucose montre une adaptation bactérienne aux variations du régime nutritionnel dans les eaux marines.

A notre connaissance, la mesure du potentiel hétérotrophe n'a pas trouvé d'application dans le cadre de l'étude de l'activité des micro-organismes en sol profond. Nous ne disposons donc pas de référence qui nous permettrait de comparer les résultats que nous avons présentés et discutés.

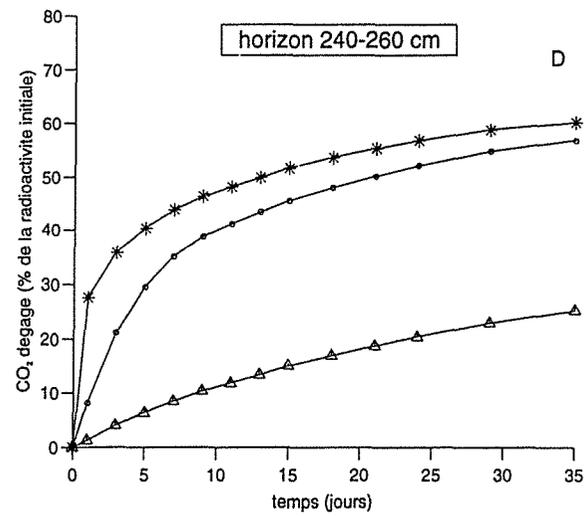
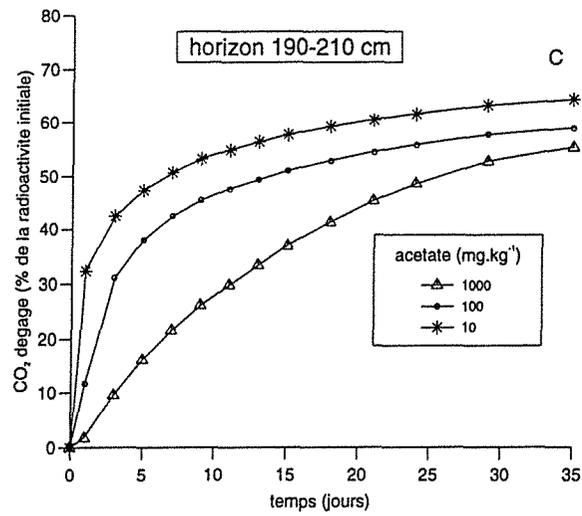
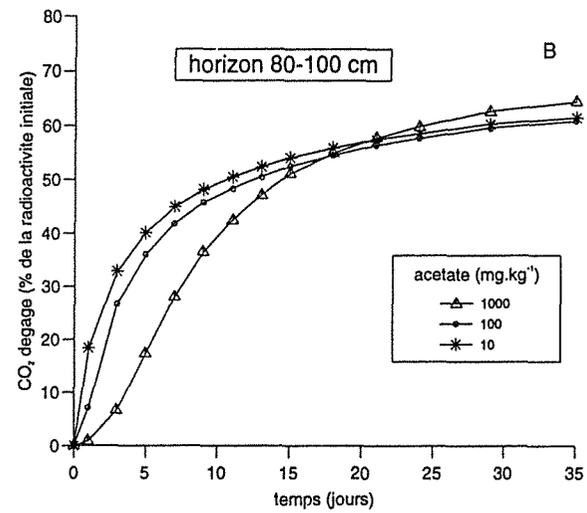
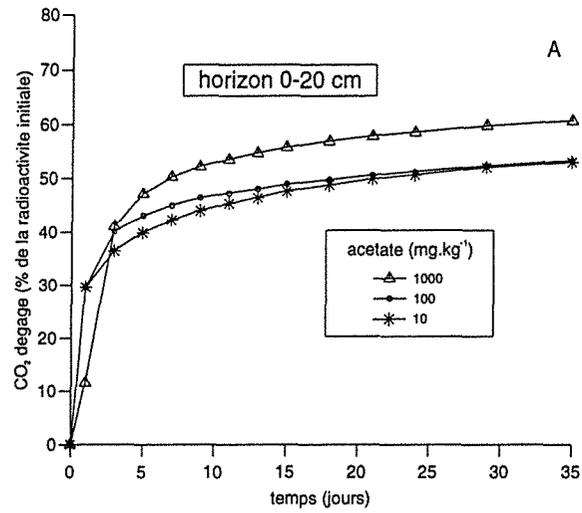
2- Cinétiques de minéralisation de moyenne durée de substrats carbonés.

2-1 SUBSTRATS NATURELS.

2-1-1 Cinétiques de minéralisation de moyenne durée.

2-1-1-1 Influence de la structure chimique du substrat.

Les graphes de la figure 47 montrent l'évolution de la radioactivité dégagée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ dans différents horizons de sol traités avec du glucose à trois concentrations. D'une manière générale, nous observons des cinétiques de minéralisation avec des phases de latence, lorsqu'elles se manifestent, extrêmement réduites excepté à la concentration la plus élevée. Dans ce cas, un phénomène d'enrichissement se manifeste de façon systématique sauf dans le sol provenant de l'horizon 240-260 cm. Nous observons un comportement cinétique différent selon la dose considérée. A la dose de 1000mg.kg^{-1} sol, la tendance générale est à une diminution à la fois de la vitesse et du taux de minéralisation avec la profondeur. Le phénomène est particulièrement marqué dans le sol provenant de l'horizon 240-260 cm. Cette tendance reflète probablement l'appauvrissement général de la microflore en profondeur. A la dose la plus faible, la tendance évolutive qui se manifeste avec la profondeur est plus complexe : jusqu'à 260 cm, le potentiel de minéralisation reste pratiquement inchangé même s'il se manifeste un peu plus tardivement que dans le sol de surface. Par contre, à partir de l'horizon 340 cm il diminue progressivement. Deux explications sont possibles, soit il s'agit réellement d'une baisse de l'activité de la microflore en sol profond, soit, compte tenu de la faible concentration en substrat, nous aurions une



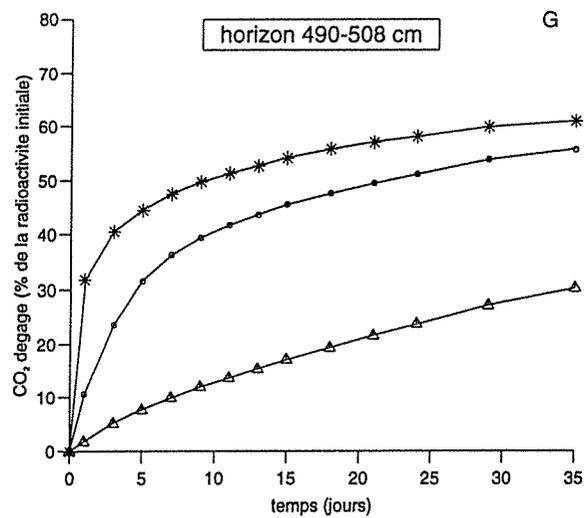
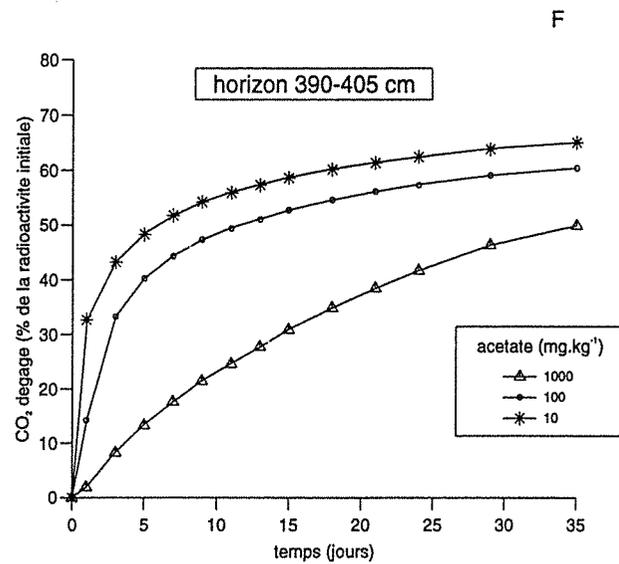
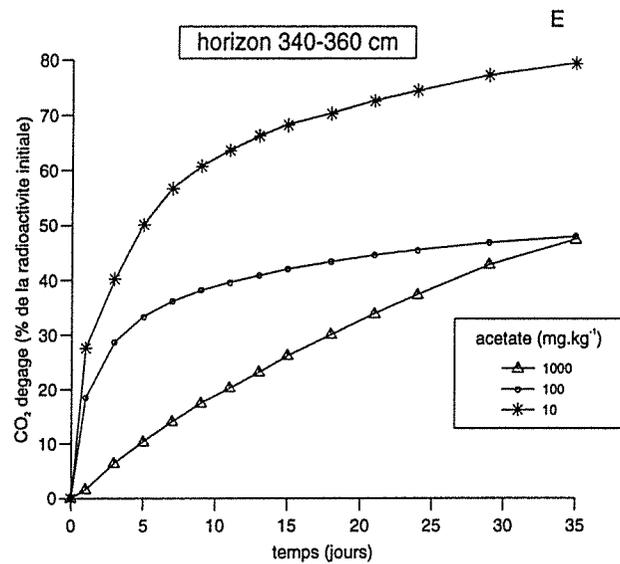


Figure 49 : Cinétiques de minéralisation du ¹⁴C-acétate à 3 concentrations (1000, 100 et 10 mg.kg⁻¹ sol) dans des sols prélevés à différentes profondeurs.

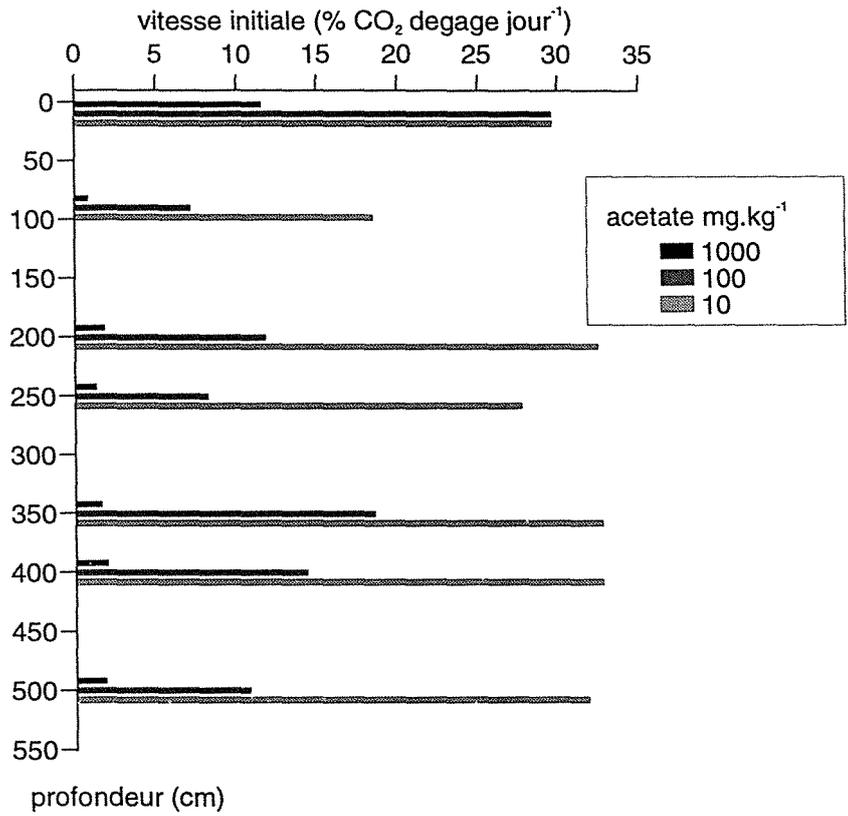
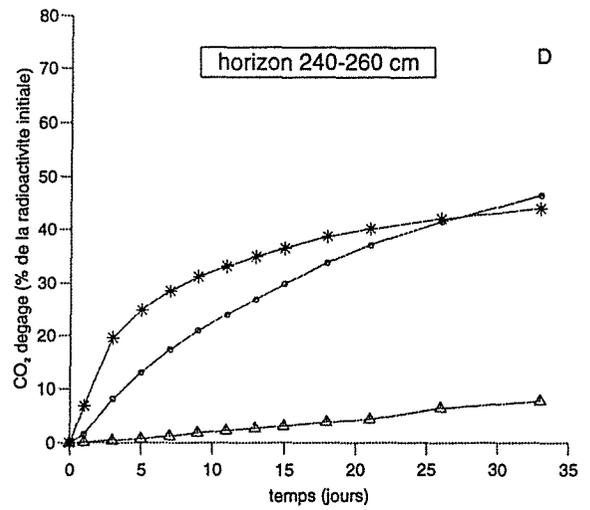
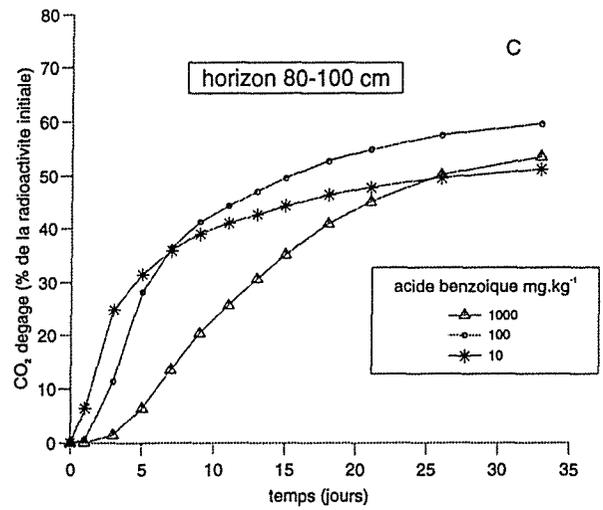
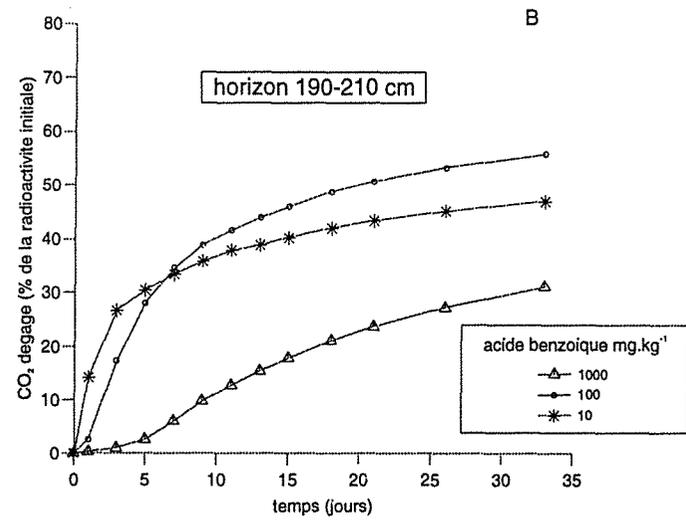
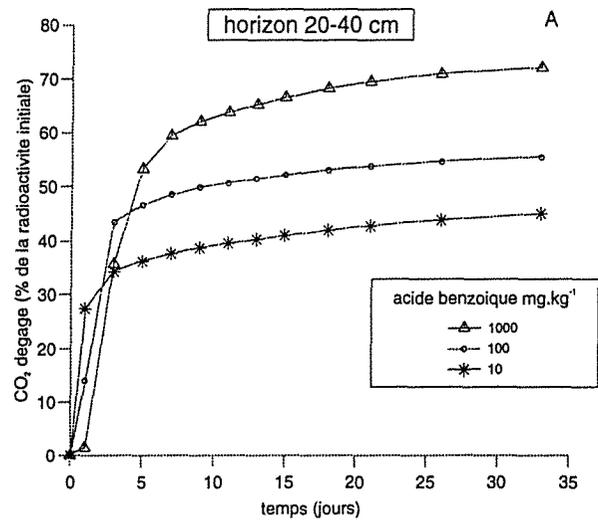


Figure 50 : Comparaison des vitesses initiales de minéralisation de l'acétate à 3 concentrations en fonction de la profondeur.



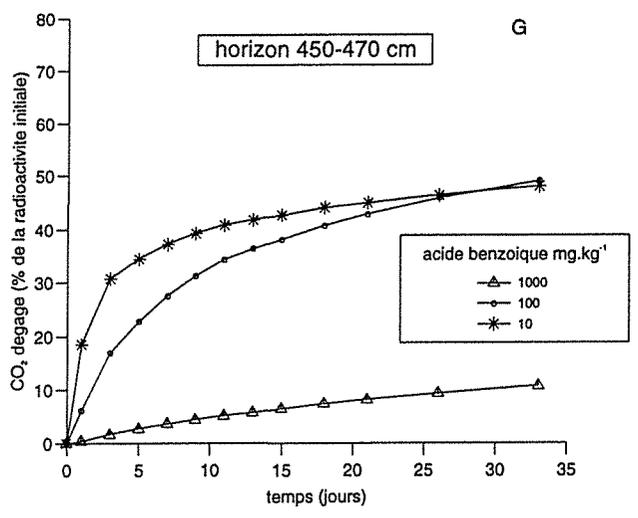
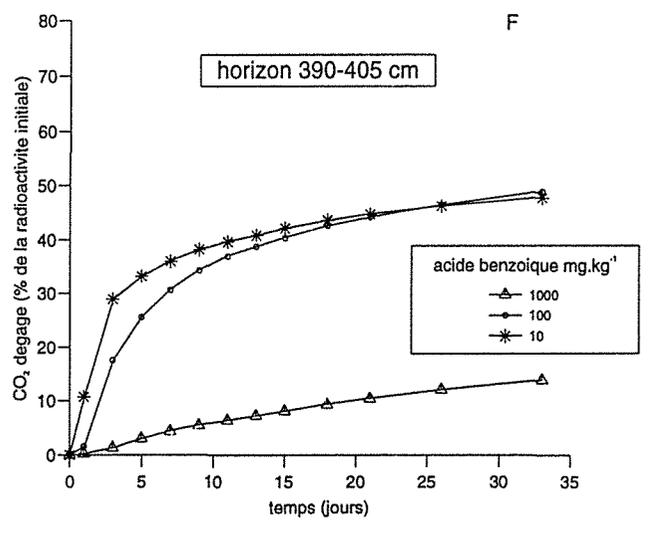
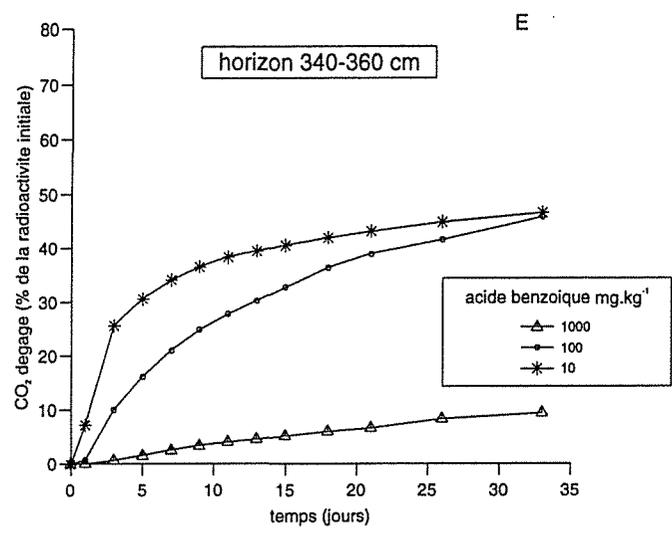


Figure 51 : Cinétiques de minéralisation du ¹⁴C-acide benzoïque à 3 concentrations (1000, 100 et 10 mg.kg⁻¹ sol) dans des sols prélevés à différentes profondeurs.

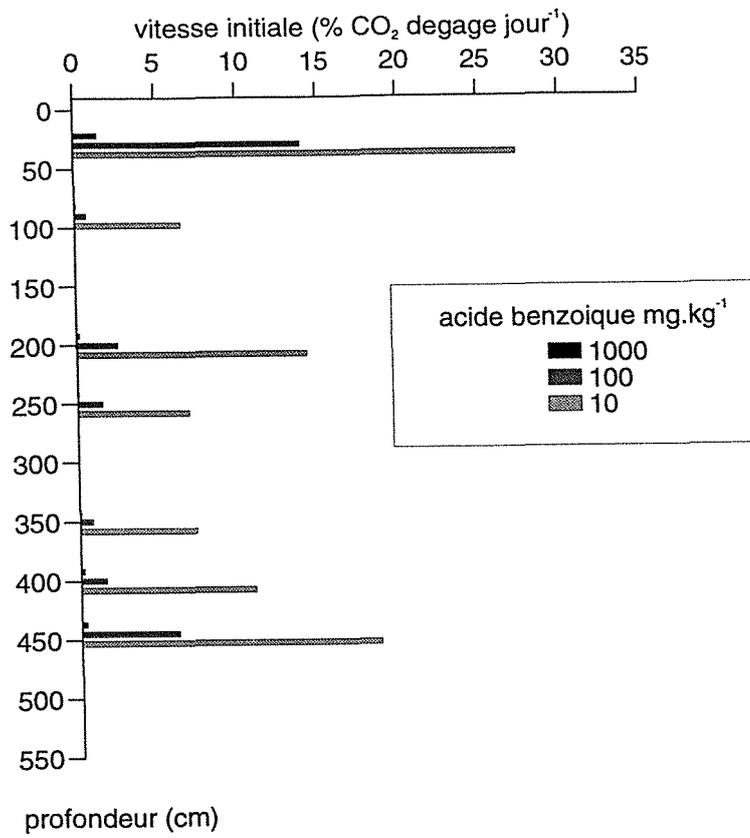


Figure 52 : Comparaison des vitesses initiales de minéralisation de l'acide benzoïque à 3 concentrations en fonction de la profondeur.

activité prédominante d'organismes oligotrophes qui privilégieraient l'incorporation de carbone plutôt que la minéralisation. Curieusement, à la dose intermédiaire de $100 \text{ mg. kg}^{-1} \text{ sol}$ le potentiel de minéralisation ne semble pas être affecté quelle que soit la profondeur d'origine du sol.

Nous avons représenté dans la figure 48, les vitesses initiales de minéralisation du glucose (V_{ig}) déterminées par le pourcentage de radioactivité libérée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ après un jour d'incubation en fonction de la profondeur. Nous observons une diminution de cette vitesse jusqu'à 250-300 cm de profondeur. Au-delà de 340 cm de profondeur, elle augmente à nouveau très sensiblement dans les sols traités à la dose la plus faible où elle est comprise entre 15,1 et 17,2% de radioactivité dégagée par jour, de façon moindre à la dose intermédiaire et pratiquement pas à la dose la plus élevée où elle ne dépasse pas quelques pour-cent de radioactivité par jour.

Les cinétiques de minéralisation de l'acétate dans les différents horizons étudiés sont reportées sur la figure 49. Globalement, les cinétiques obtenues sont comparables à celles que nous avons observées après traitement avec du glucose à une différence près : les cinétiques de minéralisation des deux doses les plus faibles restent comparables et pratiquement inchangées quelle que soit la profondeur considérée, contrairement à ce qui se passe à la dose la plus élevée où la vitesse initiale ainsi que le taux de minéralisation diminuent avec la profondeur (figure 50). Ainsi, pour la concentration de $1000 \text{ mg. kg}^{-1} \text{ sol}$ d'acétate, V_{ia} décroît de 27,4 % de radioactivité dégagée par jour dans le sol de surface à 0,4% dans l'horizon 140-150 cm. En troisième lieu, les vitesses de minéralisation de $10 \text{ mg. kg}^{-1} \text{ sol}$ d'acétate sont constantes dans tous les horizons de sol (27,7 à 31,8% de radioactivité dégagée par jour) à l'exception de l'horizon 80-100 cm.

Nous avons reporté les cinétiques de minéralisation de l'acide benzoïque sur la figure 51. Les principales conclusions que nous pouvons tirer de leur examen sont d'abord la remarquable stabilité des cinétiques de minéralisation de l'acide benzoïque apporté à la dose de $10 \text{ mg. kg}^{-1} \text{ sol}$ quelle que soit la profondeur considérée. Ensuite, le taux de minéralisation de ce substrat diminue rapidement après le traitement à une concentration de $1000 \text{ mg. kg}^{-1} \text{ sol}$ depuis l'horizon de surface où ce taux dépasse 70% jusqu'à l'horizon 450-470 cm où il n'atteint pas 10% après 42 jours d'incubation. La vitesse initiale de minéralisation décroît conjointement avec l'augmentation de la profondeur et la concentration en substrat (figure 52). Dans les horizons compris entre 340 et 470 cm de profondeur, nous notons une augmentation de la vitesse initiale de minéralisation dans les traitements de 10 et $100 \text{ mg. kg}^{-1} \text{ sol}$ de substrat.

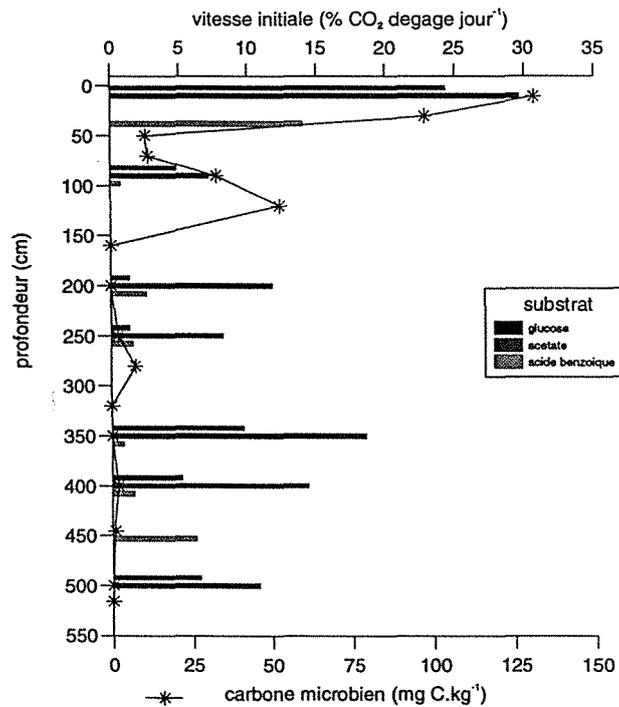
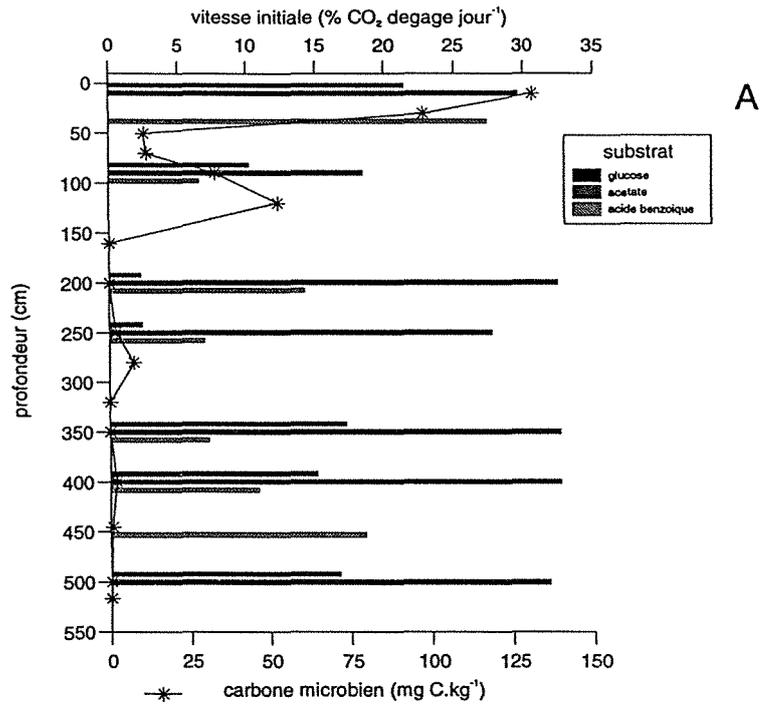


Figure 53 : Relation entre les vitesses initiales de minéralisation de 10 mg.kg⁻¹sol (A) et de 100 mg.kg⁻¹sol (B) de glucose, d'acétate et d'acide benzoïque et la quantité de carbone microbien en fonction de la profondeur.

2-1-1-2 Influence de la concentration.

Le phénomène majeur concerne l'inversion que nous observons, lorsque nous descendons dans le profil, de l'importance des taux de minéralisation des substrats carbonés à différentes doses d'application. Dans les horizons de surface, une élévation de la concentration va de pair avec une augmentation du taux de minéralisation. Dans les horizons inférieurs, cette relation tend à s'inverser sans présenter un caractère de généralité.

2-1-1-3 Influence de la profondeur.

L'observation des cinétiques de minéralisation des trois substrats dans des sols provenant des différents horizons fait apparaître une distinction très nette entre la dose la plus élevée et les deux autres doses de traitement. Pour tous les substrats considérés, à la dose la plus élevée, nous observons une réduction considérable du taux de minéralisation qui passe de valeurs comprises entre 50% pour le glucose et 70% pour l'acide benzoïque dans l'horizon de surface à des valeurs de l'ordre de 30% (glucose) à moins de 10% (acide benzoïque) au delà de 450 cm. En même temps, les cinétiques de minéralisation sont modifiées avec l'apparition d'une phase de latence dans les horizons intermédiaires caractéristique d'un phénomène d'enrichissement et, au-delà de deux mètres, une tendance à une certaine libéralisation des courbes de dégagement de $^{14}\text{CO}_2$. Au contraire, les cinétiques de minéralisation des substrats introduits aux doses les plus faibles semblent relativement insensibles à l'effet "profondeur". Par ailleurs, l'observation des vitesses initiales de minéralisation, c'est à dire les quantités de radioactivité retrouvées sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ après 24 heures d'incubation (figures 53) ne permet pas de déceler de tendance bien marquée avec la profondeur et, excepté dans les horizons de surface, ne semble pas directement liée à la quantité de carbone microbien. Soulignons enfin le comportement particulier du sol provenant de l'horizon 240-260 cm où, quel que soit le substrat considéré, la dégradation est plus faible à la dose la plus élevée y compris par rapport aux sols prélevés dans les horizons sous-jacents.

2-1-2 Cinétiques de minéralisation en temps court.

Les résultats de cette expérimentation sont rassemblés sur la figure 54.

Nous pouvons tirer plusieurs conclusions de l'examen des différentes cinétiques de minéralisation en temps court. Elles concernent la nature du substrat carboné, sa concentration dans le sol, la profondeur et la date de prélèvement des échantillons de sol.

La nature chimique du substrat joue sur le taux de minéralisation qui n'atteint pas 20% après 24 heures d'incubation avec le glucose et peut dépasser 30% avec l'acétate et l'acide

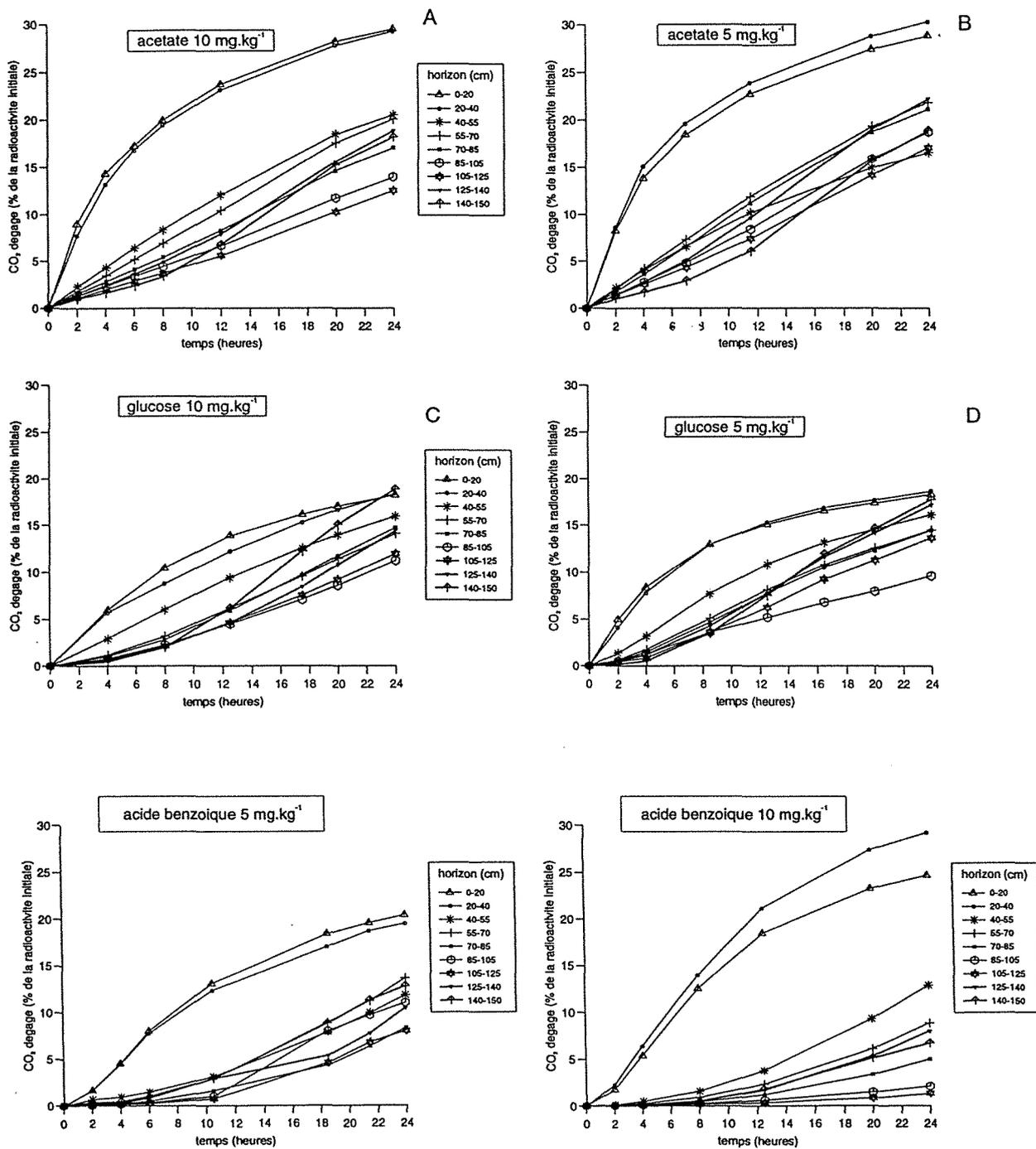


Figure 54 : Cinétiques de minéralisation sur 24 heures du glucose (A, B), de l'acétate (C, D) et de l'acide benzoïque (E, F) à 2 concentrations (10 et 5 mg.kg⁻¹ sol).

benzoïque dans les horizons supérieurs. Ceci pourrait être la conséquence d'une moindre incorporation de carbone à partir des deux substrats, une proportion plus importante qu'avec le glucose étant minéralisée.

La concentration en substrat semble avoir deux effets apparents. Avec le glucose, une augmentation de la concentration semble légèrement diminuer la vitesse de minéralisation. Avec l'acide benzoïque, c'est le taux de conversion du carbone marqué en $^{14}\text{CO}_2$ qui est substantiellement accru à la concentration de $10 \text{ mg.kg}^{-1}\text{sol}$ surtout dans les horizons de surface.

Le critère "profondeur de prélèvement" permet de distinguer trois types d'horizons en fonction des cinétiques de minéralisation. Nous retrouvons d'abord les sols des deux horizons de surface (0-20 et 20-40 cm) qui, quels que soient le substrat et sa concentration ont des comportements cinétiques tout à fait comparables. Se détachant de ce premier groupe, les échantillons prélevés à des profondeurs intermédiaires comprises entre 40 et 150 cm forment un second groupe relativement homogène où le pourcentage de minéralisation diminue progressivement avec la profondeur. Les sols en provenance des deux horizons inférieurs se distinguent des précédents par une augmentation sensible de la vitesse de minéralisation qui, dans le cas du glucose, peut égaler, après 24 heures, celle que l'on observe pour les sols de surface. Enfin, nous avons comparé les pourcentages de minéralisation des trois substrats dans des échantillons de sol prélevés à deux horizons de référence soit 0-20 et 80-100 cm en septembre 1990 (première expérience) et en décembre 1991 (deuxième expérience). Les résultats sont rapportés dans le tableau 28.

Profondeur (cm)	Vitesses de minéralisation					
	% $^{14}\text{CO}_2$ dégagé.jour $^{-1}$					
	acétate		glucose		acide benzoïque	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
0-20	21.43	18.17	29.63	29.56	27.43	24.60
80-100	10.24	11.22	18.45	13.96	6.54	2.06

Tableau 28 : Comparaison des vitesses de minéralisation après 24 heures d'incubation du glucose, de l'acétate et de l'acide benzoïque dans 2 horizons prélevés (1) en septembre 1990 et (2) en décembre 1991.

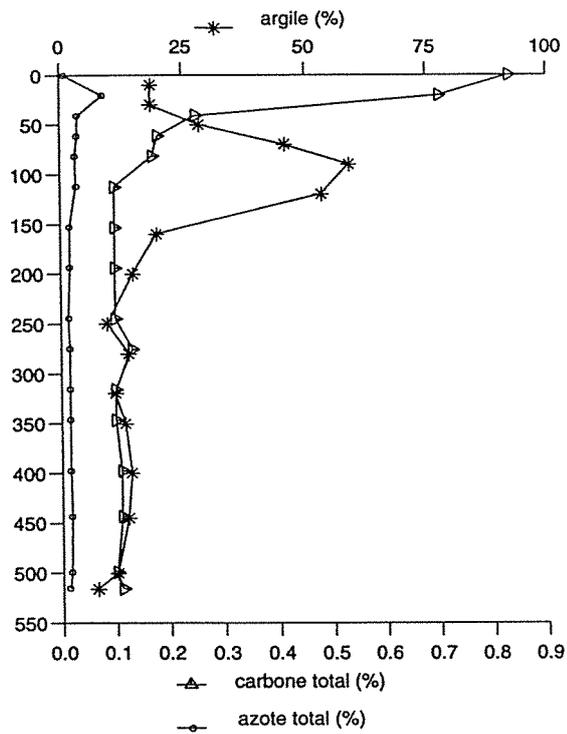


Figure 55 : Comparaison des teneurs en argile, en carbone organique total et en azote total du profil de sol de 5 mètres de profondeur.

Compte tenu de l'erreur expérimentale et sans en tirer de conclusion générale nous observons que les vitesses de minéralisation sont du même ordre de grandeur dans les horizons prélevés à deux époques différentes.

Les données précédentes démontrent l'existence d'une activité microbienne aérobie dans le sous-sol du site de Cîteaux qui se manifeste jusqu'à 5 mètres de profondeur, même si une diminution significative de la vitesse de minéralisation de différents substrats carbonés tels que le glucose, l'acétate et l'acide benzoïque apparaît avec la profondeur. Plusieurs facteurs sont susceptibles de jouer un rôle sur la diminution de la vitesse de minéralisation avec la profondeur. Ils sont d'ordre abiotique ou biotique.

La modification de la texture du sol peut contribuer à ce phénomène en modifiant l'accessibilité biologique des substrats et les transferts liquides et gazeux. Shanker *et al.* (1991) mesurent l'activité minéralisatrice de la microflore du sous-sol consécutive à un amendement de glucose dans le sol. Les sols provenant d'horizons avec une teneur élevée d'argile (>20%) ont une activité minéralisatrice moindre comparés aux sols issus d'horizons sableux dans lesquels le nombre de micro-organismes aérobies apparaît également supérieur. De même, Federle (1988) montre une augmentation de la constante de vitesse de minéralisation de l'acide benzoïque avec la profondeur, dans un profil de sol sableux de 20 mètres. D'après Subba-Rao et Alexander (1982), le pourcentage d'acide benzoïque minéralisé est inversement proportionnel au pourcentage du composé adsorbé. Pour notre part, nous n'avons pas mis en évidence de relation particulière entre la capacité de minéralisation des sols provenant des différents horizons du profil de Cîteaux et leurs caractéristiques physico-chimiques particulières.

A titre d'exemple, nous avons reporté sur le même graphique, les teneurs en argile, en carbone et en azote total du profil de sol de Cîteaux (figure 55). Nous n'avons pu établir de corrélation directe entre la teneur en argile, notamment dans l'horizon 100-120 cm, et le taux de minéralisation à long terme des différents substrats carbonés utilisés. Par contre, il apparaît clairement sur les cinétiques de minéralisation en temps court que la vitesse ainsi que les pourcentages de radioactivité dégagée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ après 24 heures sont plus faibles dans l'horizon le plus riche en argile (100-120 cm) que partout ailleurs dans le profil. Une limitation en azote ne semble pas pouvoir expliquer cette observation dans la mesure où la concentration en azote total reste pratiquement inchangée dès 50 cm de profondeur. Bien évidemment, cette observation demandera à être confirmée.

L'importance de la biomasse est également un facteur à prendre en compte et nous avons montré dans la première partie de ce travail que la biomasse microbienne diminue de façon importante avec la profondeur mais sans pour autant disparaître. Sur la figure 56, nous avons comparé les vitesses initiales de minéralisation du glucose, de l'acétate et de l'acide benzoïque en fonction de la profondeur et l'évolution correspondante de la quantité

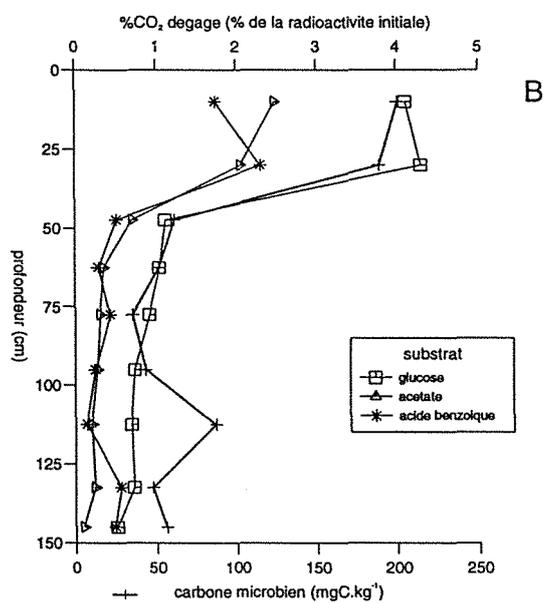
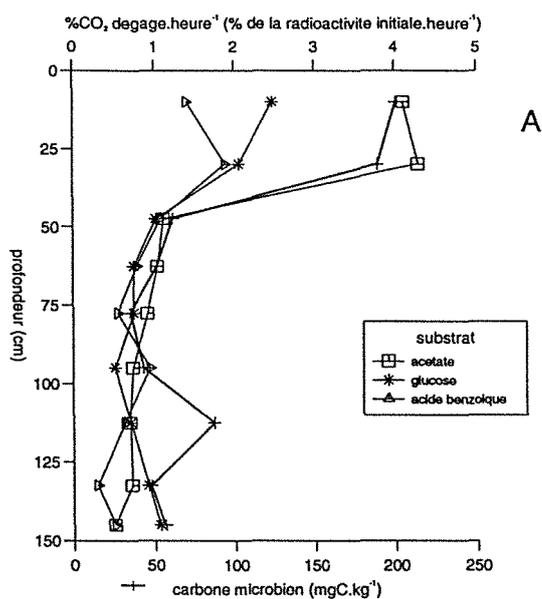


Figure 56 : Comparaison des vitesses de minéralisation du glucose, de l'acétate et de l'acide benzoïque et de la quantité de carbone microbien en fonction de la profondeur aux concentrations de 5 (A) et 10 (B) mg.kg⁻¹ sol.

de carbone microbien estimée par la technique de fumigation-extraction. La diminution de la vitesse de minéralisation semble liée à celle de la biomasse selon une relation qui n'est pas de simple proportionnalité et qui reste à définir. En particulier, ces résultats indiquent que l'activité minéralisatrice de la microflore des sols profonds diminue relativement moins que ne le laisserait supposer l'appauvrissement en micro-organismes. Ainsi, les cinétiques de minéralisation à long terme ne sont modifiées de façon sensible qu'à la dose d'apport la plus élevée, c'est à dire lorsqu'on sature les capacités de transformation de la microflore, ce qui ne semble pas être le cas aux doses de 10 et 100 mgC.kg⁻¹sol, excepté peut-être pour le glucose. Quoiqu'il en soit, les effets observés, lorsqu'ils existent, vont toujours dans le sens d'un ralentissement de la minéralisation, quel que soit le substrat considéré. De ce point de vue, nos résultats sont en désaccord avec ceux de Federle (1988) qui observe une augmentation du dégagement de ¹⁴CO₂ à partir d'acide benzoïque dans les horizons inférieurs de la zone non saturée d'un profil de sol. Signalons également que l'apport de quantités importantes de substrats devrait avoir pour conséquence une croissance microbienne qui devrait se traduire par une augmentation progressive des vitesses de minéralisation et l'apparition de cinétiques à forme logistique. Nos résultats montrent que c'est quelquefois le cas dans les horizons intermédiaires mais que le phénomène n'est jamais observé dans les horizons les plus profonds du profil de 5 mètres. Il y a probablement là l'indication d'une mauvaise adaptation de la microflore correspondante à des situations de pléthore carbonée. Par exemple, la diminution de la vitesse de minéralisation pourrait être le résultat d'une stratégie métabolique différente qui favoriserait l'incorporation des substrats carbonés dans les composants cellulaires plutôt que la voie respiratoire. C'est la conclusion à laquelle parviennent Dobbins *et al.* (1988) qui ont mis en évidence, dans la zone aquifère du sol de Lula, une incorporation préférentielle d'acides aminés par rapport à la quantité de substrat minéralisée.

3- Substrats xénobiotiques. Cas du 2,4-D et de l'atrazine.

3-1- CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION DU 2,4-D ET DE L'ATRAZINE.

Nous avons représenté sur la figure 57 le profil de minéralisation après 47 jours d'incubation du carbone provenant de la chaîne (figure 57A) et du cycle (figure 57B) de la molécule de 2,4-D sur un profil de sol allant jusqu'à 5 mètres de profondeur réalisé en 1991. Une première observation concerne la diminution du pourcentage de minéralisation de la chaîne et du cycle avec la profondeur. Après 47 jours d'incubation, 53 à 66% de la radioactivité portée sur la chaîne latérale et 38 à 63% de celle portée par le cycle de la molécule sont minéralisés dans le sol de surface. A partir de 60 cm, ces pourcentages de minéralisation décroissent jusqu'à atteindre moins de 5% dans les horizons inférieurs à l'exception de l'horizon 160-180 cm où nous observons un pic secondaire d'activité

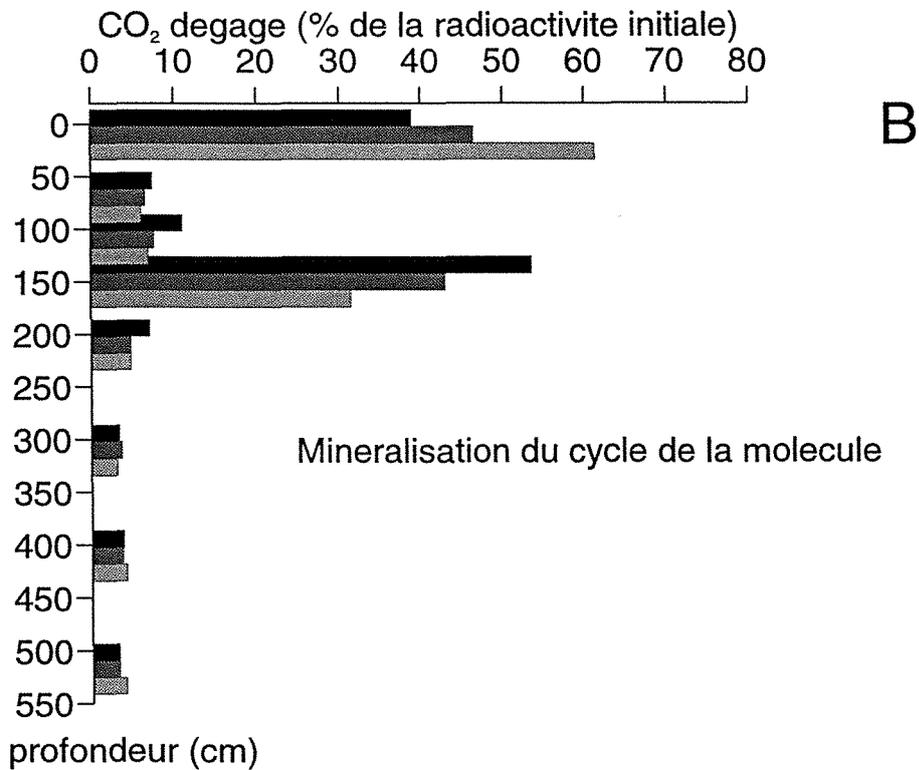
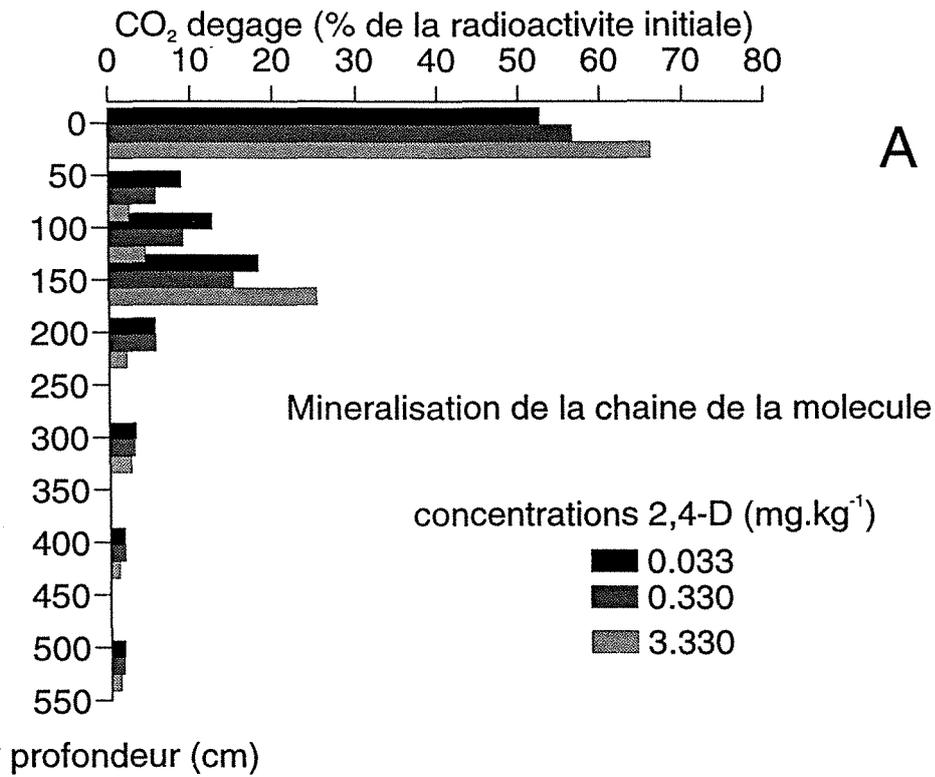


Figure 57 : Comparaison des pourcentages de minéralisation du 2,4-D en fonction de la profondeur, après 47 jours d'incubation. La molécule est marquée radioactivement sur le groupement carboxyl (A) et sur le cycle (B).

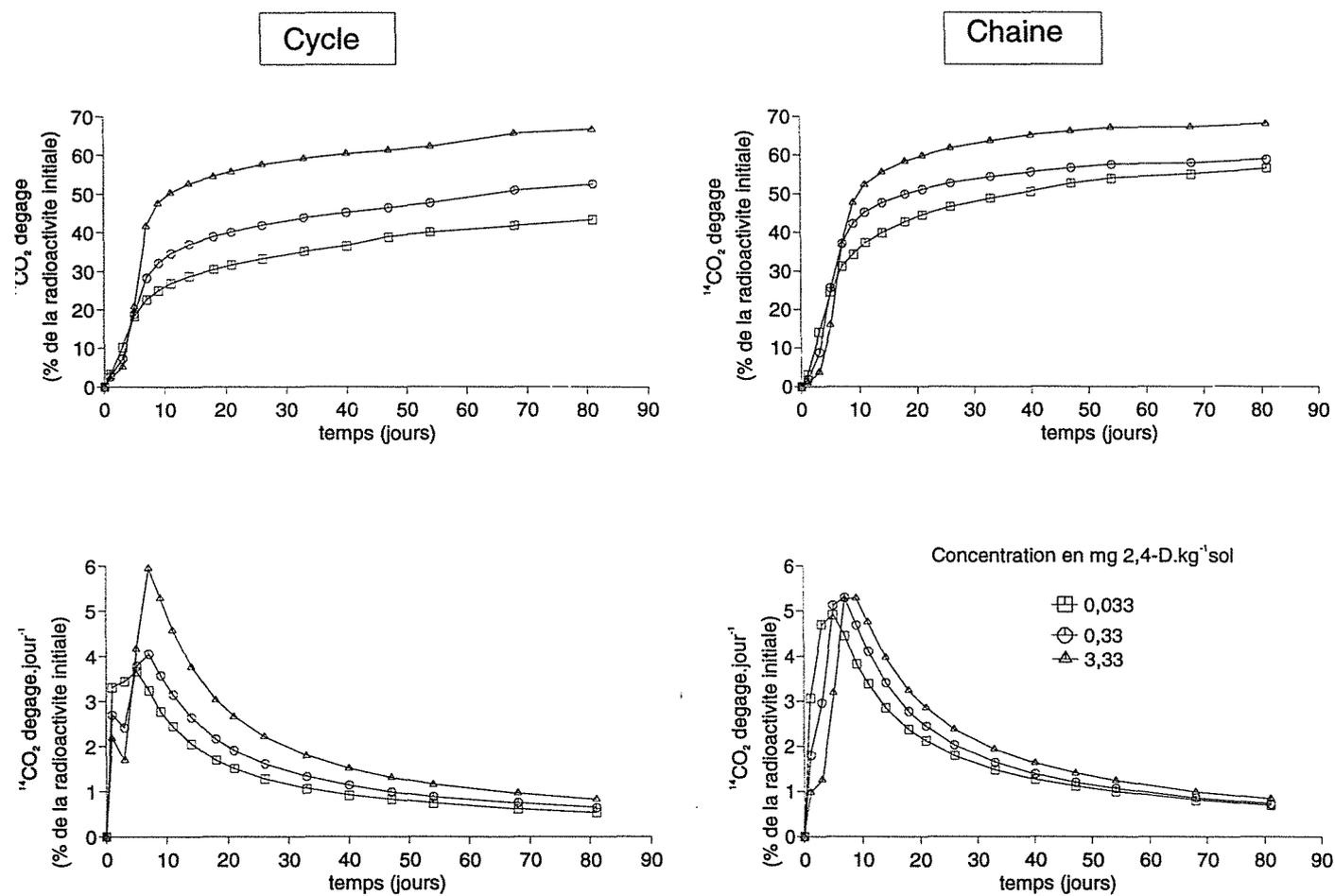


Figure 58 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D ^{14}C en fonction de la position du marquage et de la concentration dans l'horizon 0-20 cm. (A) courbes cumulées, (B) courbes des vitesses.

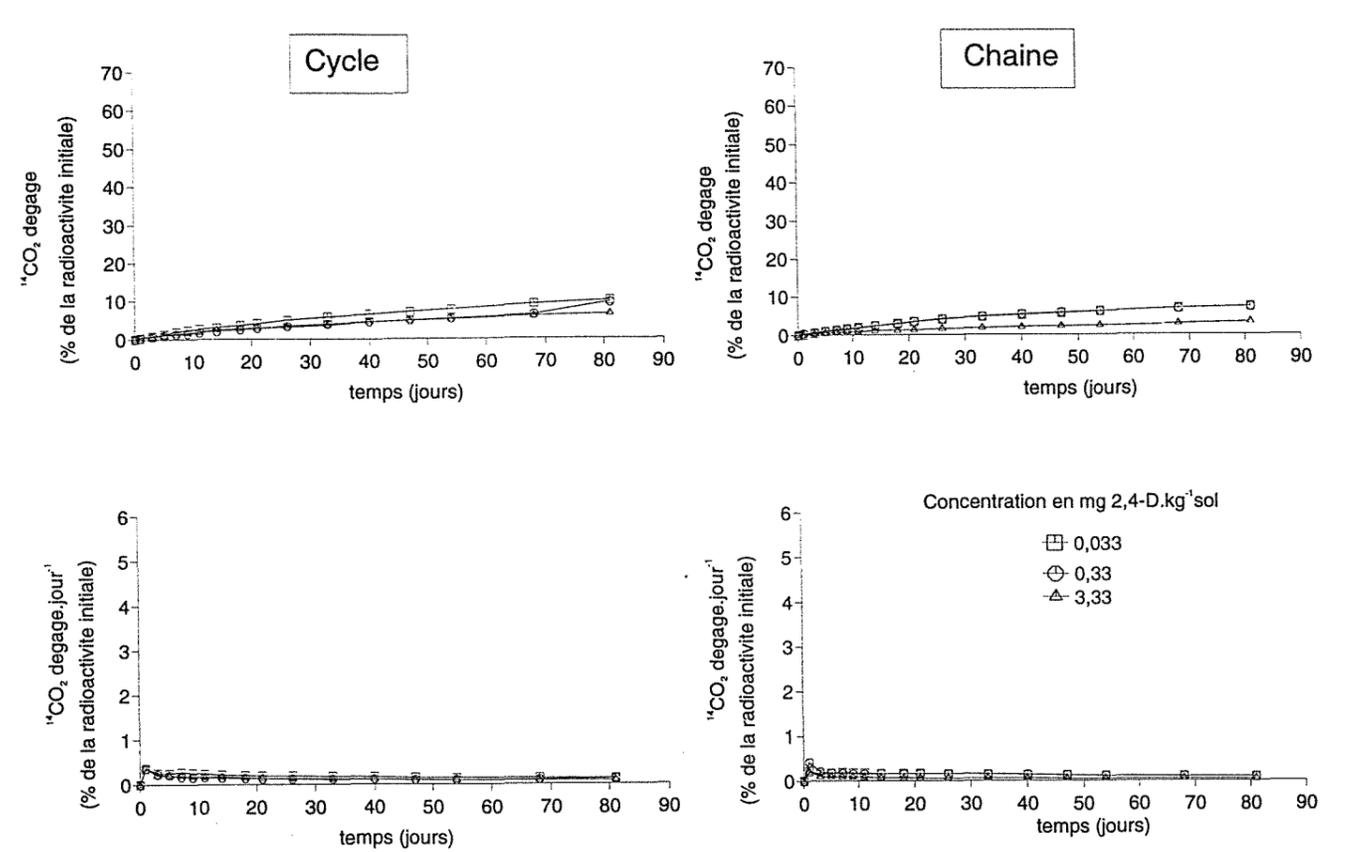
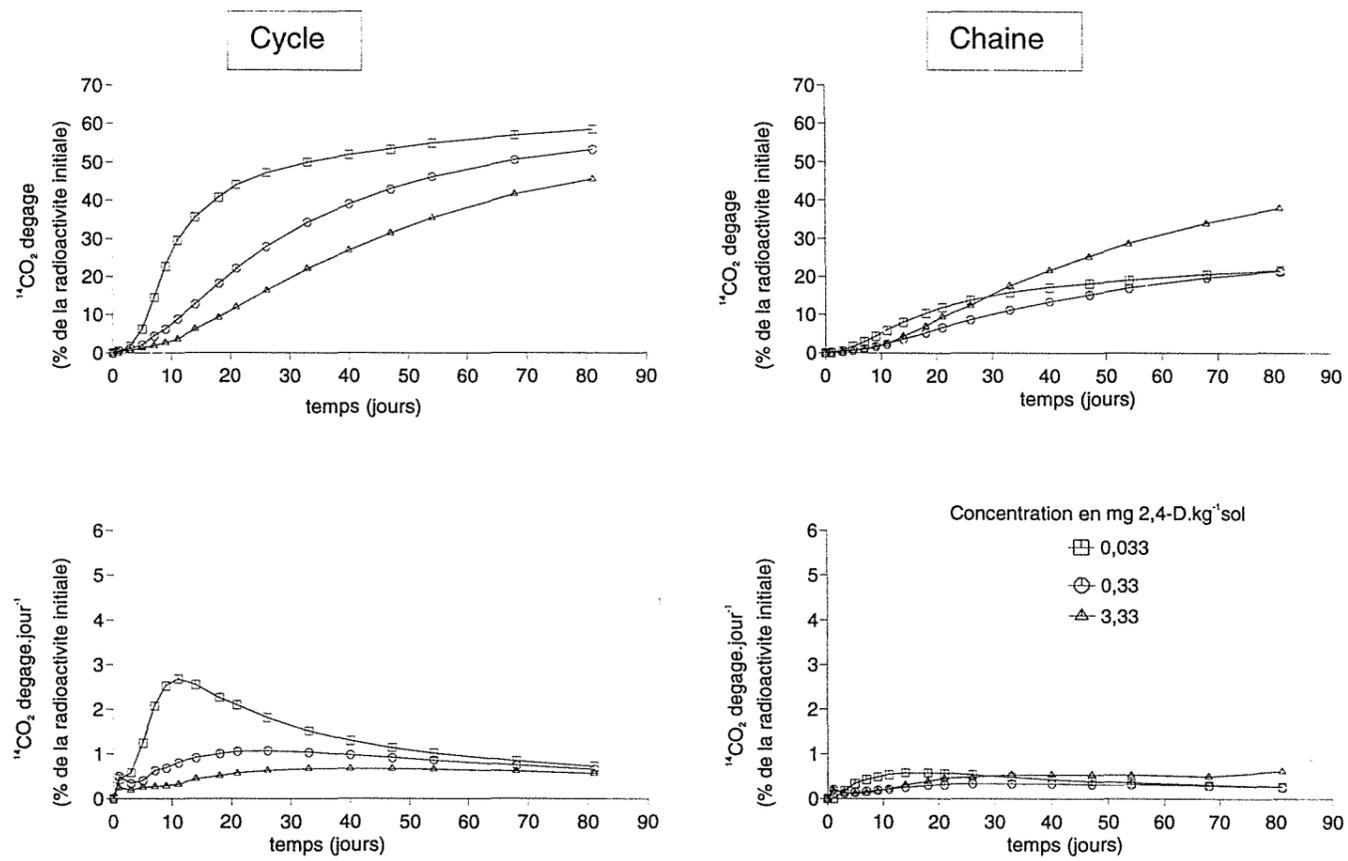


Figure 59 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D¹⁴C en fonction de la position du marquage et de la concentration dans l'horizon 160-180 cm. (A) courbes cumulées, (B) courbes des vitesses.

Figure 60 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D¹⁴C en fonction de la position du marquage et de la concentration dans l'horizon 200-220 cm. (A) courbes cumulées, (B) courbes des vitesses.

particulièrement prononcé dans le cas du 2,4-D marqué sur le cycle, puisqu'à la dose la plus faible, le pourcentage de minéralisation excède celui que nous observons dans l'horizon de surface.

Les graphes des figures 58, 59 et 60 montrent l'évolution de la radioactivité dégagée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ dans les horizons 0-20 cm, 160-180 cm et 200-220 cm. Dans l'horizon de surface (figure 58), les courbes cumulées de dégagement de CO_2 ont une phase de latence à peine marquée et le pourcentage de minéralisation augmente avec la concentration en 2,4-D quelle que soit l'origine du carbone considérée, chaîne latérale ou cycle. L'analyse des courbes des vitesses de minéralisation fait apparaître de façon à peu près systématique deux phases de minéralisation. La première suit immédiatement l'apport de produit; elle est plus marquée lorsque la radioactivité est située sur le cycle aromatique et à la concentration la plus élevée. La seconde atteint un maximum après environ une semaine d'incubation, ce maximum apparaissant d'autant plus tard que la concentration est plus élevée. Dans l'horizon 160-180 cm (figure 59), trois phénomènes apparaissent clairement. Le premier concerne le taux de minéralisation qui est nettement plus élevé lorsque le carbone provient du cycle que lorsqu'il provient de la chaîne latérale. Il est possible que la faible minéralisation du carbone de la chaîne latérale soit liée à une incorporation plus importante du carbone dans des constituants microbiens néoformés. Le second point concerne le sens de la relation entre le taux de dégradation du carbone aromatique et la concentration qui est inversé par rapport à ce que nous avons observé dans le sol de surface. Il faut également signaler l'existence d'une phase de latence très marquée notamment à fortes concentration qui traduit probablement un enrichissement important en micro-organismes dégradants. Nous retrouvons encore sur les courbes de vitesses, bien que moins marquées notamment pour le carbone de la chaîne latérale, les deux phases de minéralisation que nous avons déjà signalées pour le sol de surface. Dans l'horizon le plus profond (figure 60), nous décelons une très faible activité de minéralisation qui traduit le manque de micro-organismes dégradants capable d'utiliser une partie du carbone du 2,4-D comme source de carbone et d'énergie; en effet, la vitesse constante de minéralisation traduit l'absence d'adaptation de la microflore présente dans cet horizon.

Les figures 61, 62 et 63 représentent les cinétiques de minéralisation de l'atrazine à trois concentrations dans trois horizons 20-40 cm, 100-120 cm et 180-200 cm et pour les deux types de marquages. Quelle que soit la situation envisagée, les cinétiques de minéralisation ont un caractère linéaire très prononcé, confirmé par les faibles variations de la vitesse de minéralisation au cours du temps, y compris à la dose la plus élevée. Il n'y a que le sol de surface traité avec une molécule marquée sur la chaîne latérale qui fasse exception, d'une part parce que le passage à la dose de $3,33 \text{ mg.kg}^{-1}$ d'atrazine entraîne une baisse du pourcentage de minéralisation, d'autre part parce que la vitesse de minéralisation atteint rapidement un maximum, décroît ensuite au cours des dix premiers jours d'incubation puis

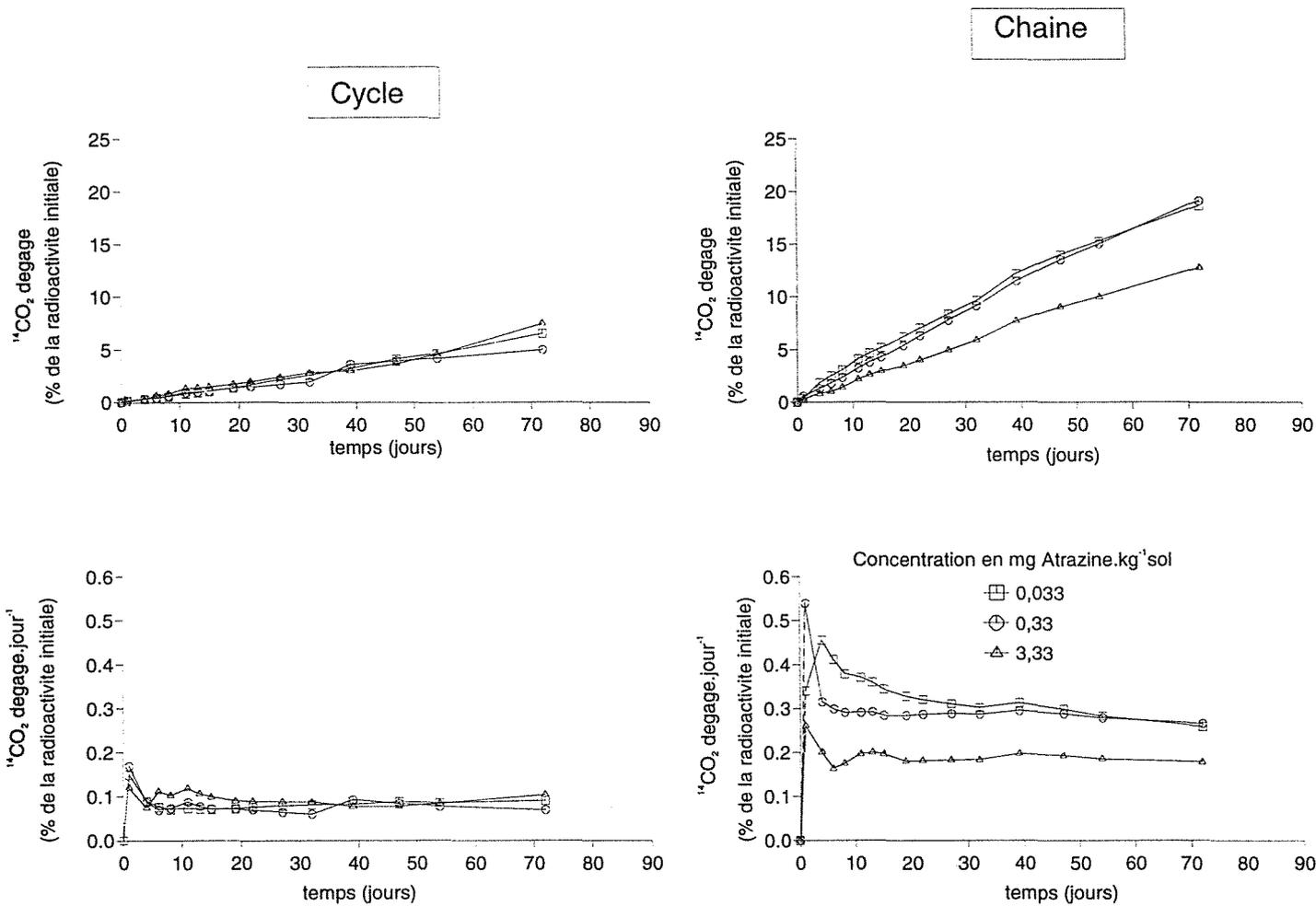


Figure 61 : Cinétiques de minéralisation de l'atrazine¹⁴C en fonction de la position du marquage et de la concentration dans l'horizon 20-40 cm. (A) courbes cumulées, (B) courbes des vitesses.

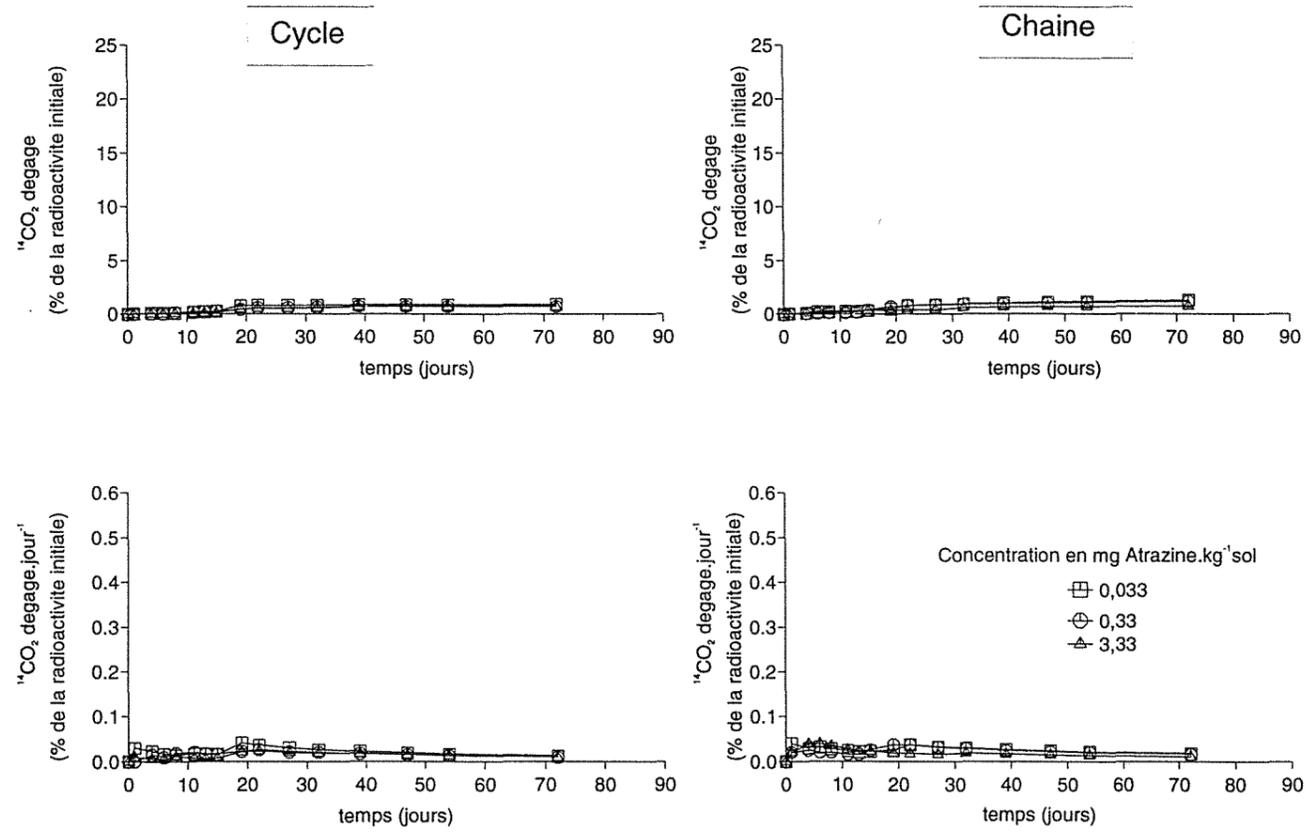


Figure 62 : Cinétiques de minéralisation de l'atrazine ^{14}C en fonction de la position du marquage et de la concentration dans l'horizon 100-120 cm. (A) courbes cumulées, (B) courbes des vitesses.

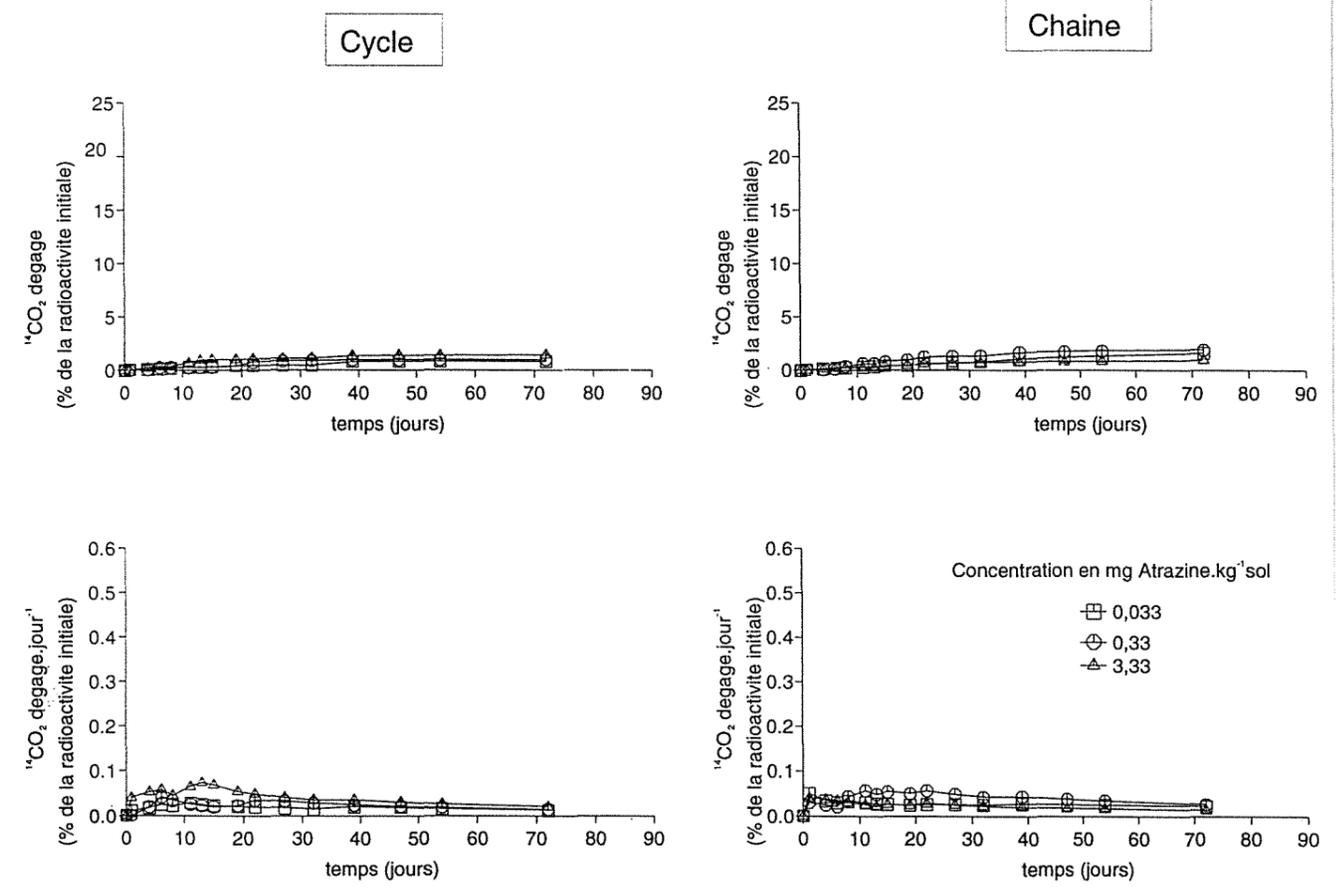


Figure 63 : Cinétiques de minéralisation de l'atrazine ^{14}C en fonction de la position du marquage et de la concentration dans l'horizon 180-200 cm. (A) courbes cumulées, (B) courbes des vitesses.

se stabilise au delà de dix jours d'incubation. Cette stimulation initiale de la dégradation tient probablement compte de la présence de matière organique dont la consommation favorise un processus co-métabolique de transformation de l'herbicide. Les horizons plus profonds ne disposant pas de cette fourniture carbonée accessoire ne donnent pas lieu au même phénomène.

L'examen des profils de minéralisation de l'atrazine marquée sur le groupement éthyle montre une diminution du pourcentage de minéralisation après 72 jours avec la profondeur (figure 64A). Les mêmes observations sont valables dans le cas de la minéralisation du cycle aromatique de la molécule (figure 64B). Dans le sol de surface, environ 20% de l'atrazine [éthyl-2-¹⁴C] et 10% de l'atrazine [cycle-2, 4, 6-¹⁴C] sont minéralisés après 91 jours d'incubation. Au delà de 180 cm de profondeur, moins de 2% de l'atrazine est minéralisé après trois mois d'incubation.

Dans le sol de surface, après 47 jours d'incubation, 63% du 2,4-D marqué sur le cycle est minéralisé. Ce résultat est proche de celui obtenu par Soulas (1990) dans un sol argilo limoneux prélevé dans la région de Dijon où le pourcentage de minéralisation est de 55% pour une concentration de 2,4-D et un laps de temps comparables. De même, les pourcentages de dégradation de l'atrazine sont comparables à ceux que nous trouvons habituellement dans la littérature (Skipper *et al.*, 1967; Kaufman et Kearney, 1970).

Pour ce qui concerne plus précisément la dégradation dans le sous-sol, nos résultats montrent une diminution des pourcentages de 2,4-D et d'atrazine minéralisés avec la profondeur. De nombreux exemples corroborant cette observation sont trouvés dans la littérature. Ainsi, dans une étude consacrée à la mise en évidence des capacités dégradantes de la microflore du sous-sol, Ward (1985) montre que moins de 3% du 2,4-D (marqué sur le carbone 2 de la chaîne) est minéralisé dans un sol saturé prélevé à 1,3 mètres de profondeur. Dans un profil de sol de 4 mètres de profondeur prélevé à Sainghin, Fournier (1989) constate également une augmentation de la persistance de l'herbicide avec la profondeur. Ce même auteur met en évidence une adaptation métabolique de la microflore dans les horizons profonds survenant après une phase de latence dont la longueur augmente avec la profondeur. Pour notre part, l'existence d'une inflexion nette sur les cinétiques de minéralisation du 2,4-D obtenues quel que soit le marquage, dans l'horizon 0-20 cm aux deux doses les plus élevés et dans l'horizon 160-180 cm à toutes les doses de traitement pourrait également apparaître comme l'indication d'une possible adaptation de la microflore à la dégradation du 2,4-D. Par contre, plus en profondeur (horizon 200-220 cm), le phénomène d'adaptation ne semble pas se manifester. Un retraitement des échantillons devrait permettre de confirmer ce point. Cependant, dans certaines conditions, le potentiel de dégradation du 2,4-D dans les sols profonds peut rester très actif. Ainsi, Lava *et al.* (1973) montrent que le 2,4-D est totalement minéralisé après cinq mois d'incubation dans

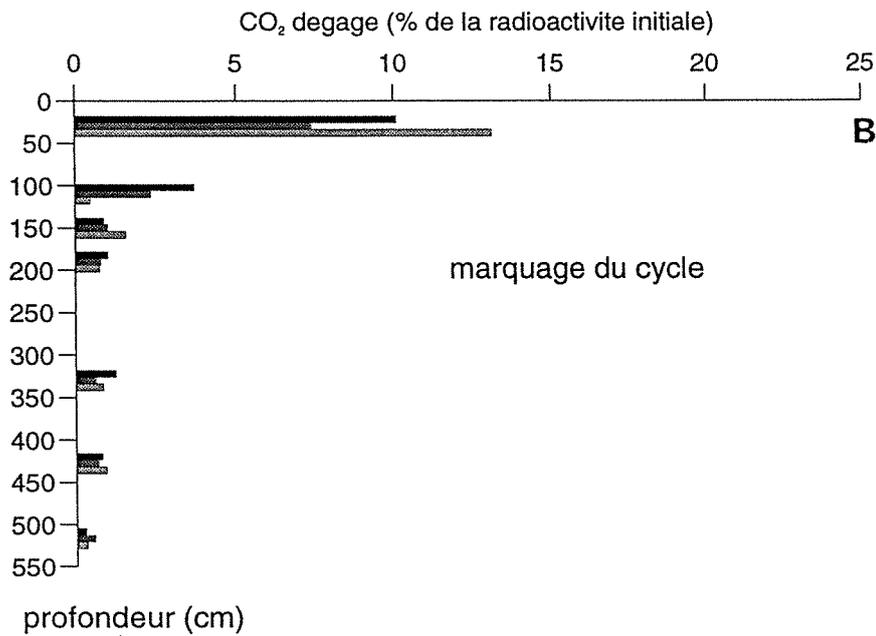
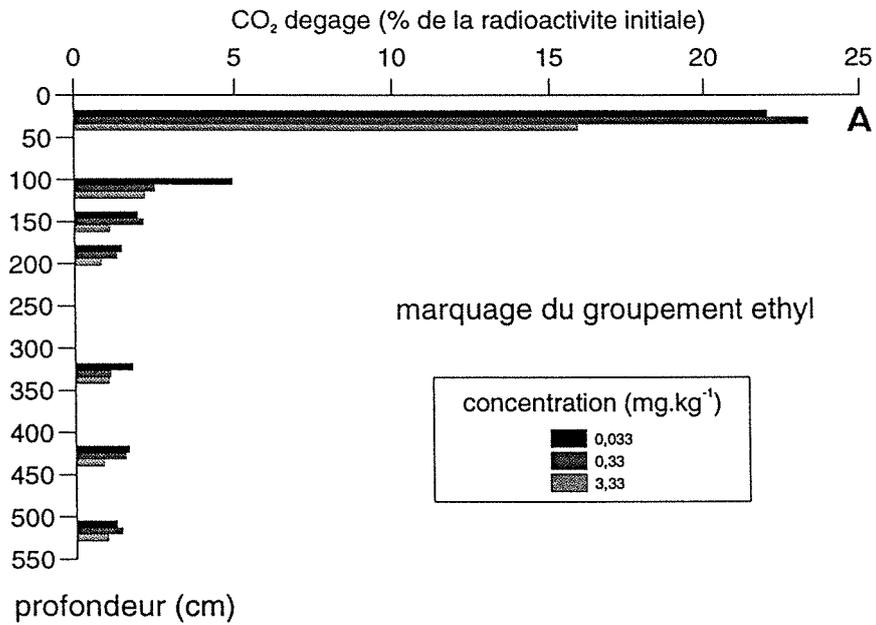


Figure 64 : Comparaison des pourcentages de minéralisation de l'atrazine en fonction de la profondeur, après 72 jours d'incubation. La molécule est marquée radioactivement sur le groupement éthyl (A) et sur le cycle (B).

des échantillons de sous-sol prélevés à 15, 40 et 90 centimètres de profondeur sur les sites de Sharpsburg et Keith.

La diminution du taux de dégradation du 2,4-D n'est pas due à une diminution de la disponibilité du pesticide adsorbé. Des études d'adsorption du 2,4-D dans les différents horizons du sol de Cîteaux montrent que le 2,4-D n'est pas adsorbé (A. Yassir, communication personnelle). Notre étude concernant la minéralisation de l'atrazine semble indiquer que la teneur en nutriments organiques et/ou minéraux est un facteur important de la dégradation de molécules xénobiotiques. Ainsi, dans un sous-sol saturé, contaminé par des effluents organiques, Ward (1985) met en évidence une minéralisation accrue du 2,4-D et conclut à un effet positif de ces substances organiques agissant probablement comme substrats nutritifs vis à vis de la microflore dégradante. De même, une augmentation de la dégradation de l'alachlor dans le sous-sol a été observée après addition d'une solution de glucose ou d'hydrolysate de caséine (Pothuluri *et al.*, 1990). De même, dans les horizons prélevés à trois et cinq mètres de profondeur sur le site de Sainghin, Fournier (1989) met en évidence l'effet positif d'un amendement de chitine ($4\text{g.kg}^{-1}\text{sol}$) sur la minéralisation du 2,4-D [$\text{C1-}^{14}\text{C}$] après une phase de latence d'une semaine. L'effet inverse peut cependant être observé. Ainsi, alors qu'une addition d'une solution de nitrate d'ammonium et de phosphate de potassium accélère la dégradation du bromure d'éthylène dans des horizons de sol prélevés entre 4,5 et 5,6 mètres de profondeur sur le site de Lula, l'addition de substrats organiques tels que le glucose et les acides aminés inhibent la minéralisation (Swindoll *et al.*, 1988), probablement en raison de leur utilisation préférentielle.

Cependant, à l'exception du dernier exemple, la tendance reste à une augmentation de la dégradation des molécules xénobiotiques en présence de substrats carbonés. Ceci signifierait que, même pour une molécule comme le 2,4-D, la voie co-métabolique serait majoritaire dans le processus de dégradation des composés xénobiotiques.

Dans le sol de surface, nous notons une minéralisation plus élevée pour le carbone 2 du groupement éthyle que pour le cycle. Cette observation corrobore les résultats de Skipper *et al.* (1966, 1967) qui rapportent, après 2 semaines d'incubation, des taux de minéralisation de 1,4 à 1,6% de la radioactivité présente sur la chaîne éthylamino et 0,4 à 0,6% de la radioactivité présente sur le cycle de la molécule. De même, Fondeur (1980) montre que, après 113 jours d'incubation, le pourcentage de radioactivité récupérée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ atteint 21% pour l'atrazine [éthyl-2- ^{14}C] et 9,6% dans le cas de l'atrazine [cycle-2,4,6- ^{14}C].

Nous avons observé que l'atrazine, indépendamment de la concentration d'application, n'était dégradée significativement que dans l'horizon de surface 20-40 cm. Nos résultats sont en accord avec ceux de Lavy *et al.* (1973) qui observent, après 17 mois d'incubation, que la majorité de l'atrazine est éliminée dans des sols prélevés à 15 cm et à 40 cm tandis

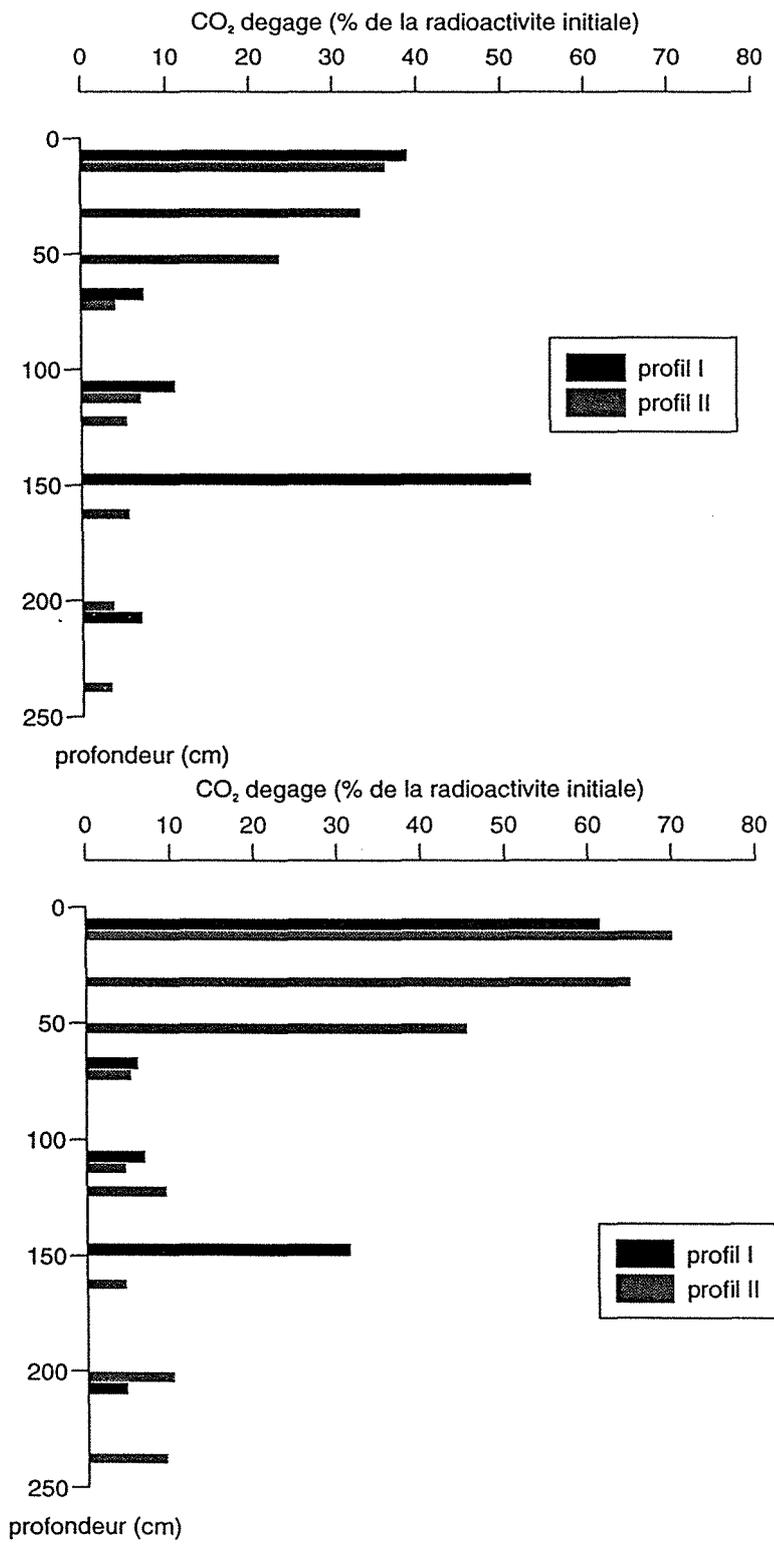


Figure 65 : Comparaison des pourcentages de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle dans 2 profils de sol après 47 jours (Profil I) et 40 jours d'incubation (Profil II) à 2 concentrations 0,033 (A) et 3,33 (B).

qu'après 91 mois, les auteurs peuvent encore extraire 80% de l'atrazine initialement introduite dans un sol prélevé à 90 cm de profondeur. De même, dans la zone aquifère d'un profil de sol de Scioto River (Ohio), moins de 1,5% d'atrazine marquée sur le groupement éthyle et moins de 0,1% d'atrazine marquée sur le cycle sont minéralisés en 23 jours d'incubation (McMahon *et al.*, 1992). Enfin, Konopka et Turco (1991) n'ont pas observé de dégradation du cycle de l'atrazine dans un profil de sol de 26 mètres de profondeur durant 128 jours d'incubation. Fournier (1989) a étudié la minéralisation de l'atrazine éthyle dans des échantillons de sol issus d'un profil de quatre mètres de profondeur situé à Sainghin-en-Mélantois. Après 76 jours d'incubation, environ 25% de la radioactivité est minéralisé dans le sol de surface contre seulement 5% au delà de 80 cm de profondeur.

Cette diminution de la dégradation de l'atrazine avec la profondeur pourrait être due à une diminution de la disponibilité du pesticide pour la microflore notamment en présence d'argile et de matières organiques. Dans notre étude, l'absence de minéralisation dans les horizons du sous-sol ne semble pas être liée à une diminution de l'accessibilité biologique de l'herbicide, car, entre 180 et 500 cm, les teneurs en argile et en matières organiques sont faibles. Elle semblerait davantage liée à d'une part à une faible teneur en substrat, d'autre part à des communautés microbiennes dégradantes trop limitées en taille pour avoir une activité métabolique appréciable.

3-2- CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION ET DE L'INCORPORATION BIOLOGIQUE DU CARBONE DU 2,4-D

3-2-1 Minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle .

Les résultats relatifs à la minéralisation du 2,4-D observée dans des échantillons de sol prélevés à différents niveaux d'un profil de sol de 2,5 mètres de profondeur réalisé en juillet 1992 sont donnés sur la figure 65 où nous avons également reporté les pourcentages de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle à deux concentrations, 0,033 et 3,33 mg.kg⁻¹sol estimés au cours de l'expérimentation réalisée sur le profil de cinq mètres de profondeur. Globalement les résultats de ce second essai confirment les précédents à l'exception du pic secondaire d'activité que nous avons mis en évidence dans l'expérience précédente et qui ne se confirme pas au cours de cette étude.

Nous avons reportés sur les figures 66A et 67A les vitesses de minéralisation du 2,4-D à 2 concentrations, 0,033 et 3,33 mg.kg⁻¹sol, dans les différents horizons du profil de sol de 2,5 mètres. La première observation concerne la diminution de la vitesse de minéralisation avec la profondeur, quelle que soit la concentration de l'herbicide. Pour la concentration la plus faible, la vitesse de minéralisation, exprimée en pourcentage de radioactivité dégagée sous forme de ¹⁴CO₂ par jour, atteint un maximum après 2 et 4 jours d'incubation dans les horizons 0-20 et 20-40 cm. Pour une concentration 100 plus élevée, nous observons une augmentation de la vitesse de minéralisation qui devient maximale après 6 et 12 jours

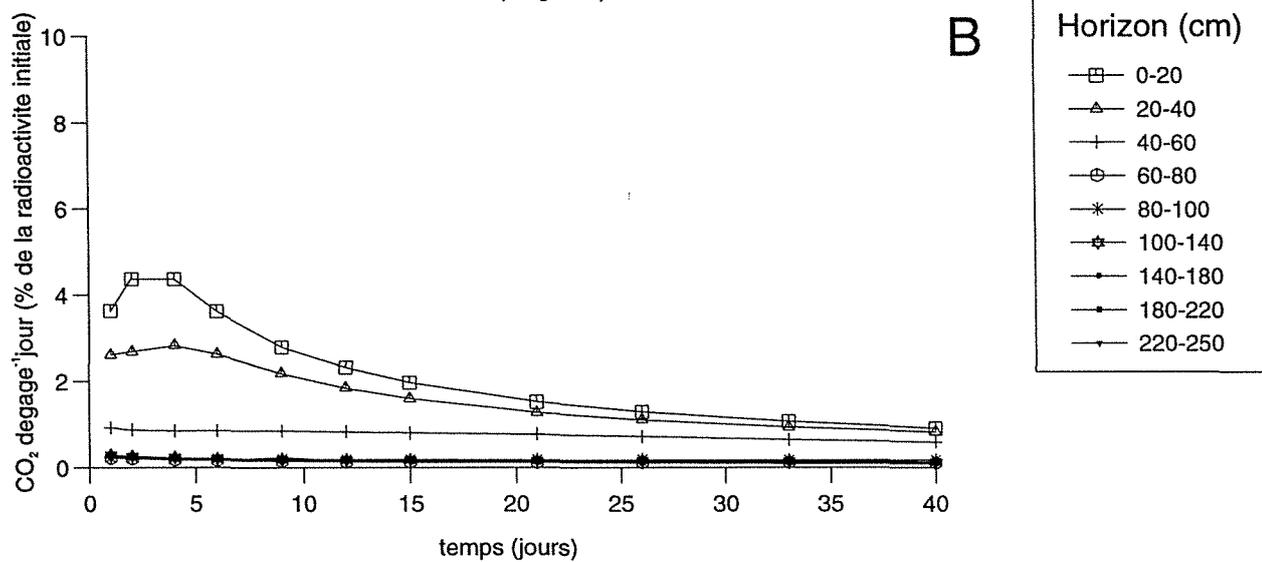
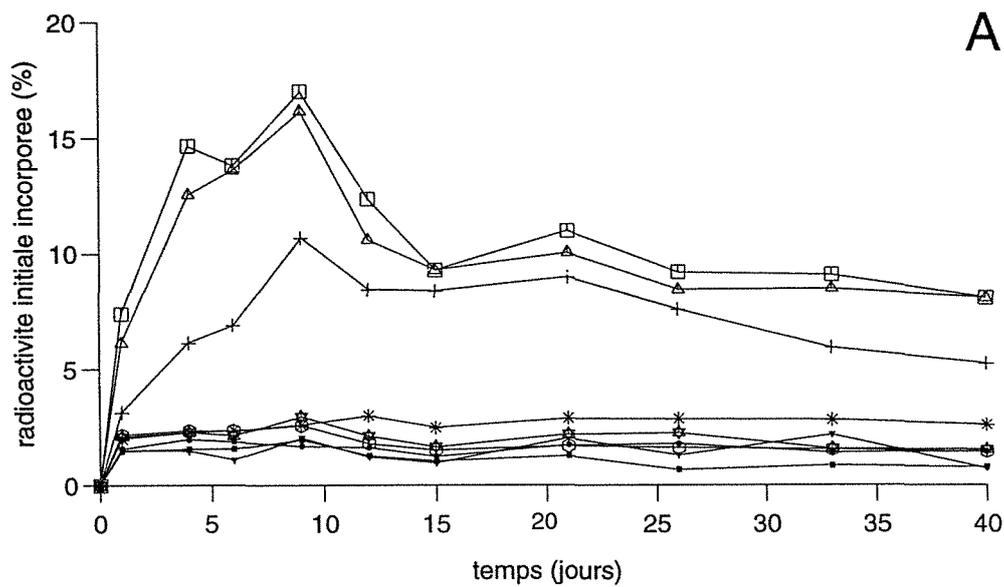


Figure 66 : Cinétiques d'incorporation (A) et de minéralisation (B) du 2,4-D marqué sur le cycle (concentration 0,047 mg.kg⁻¹sol) dans les différents horizons du profil de sol de 250 cm.

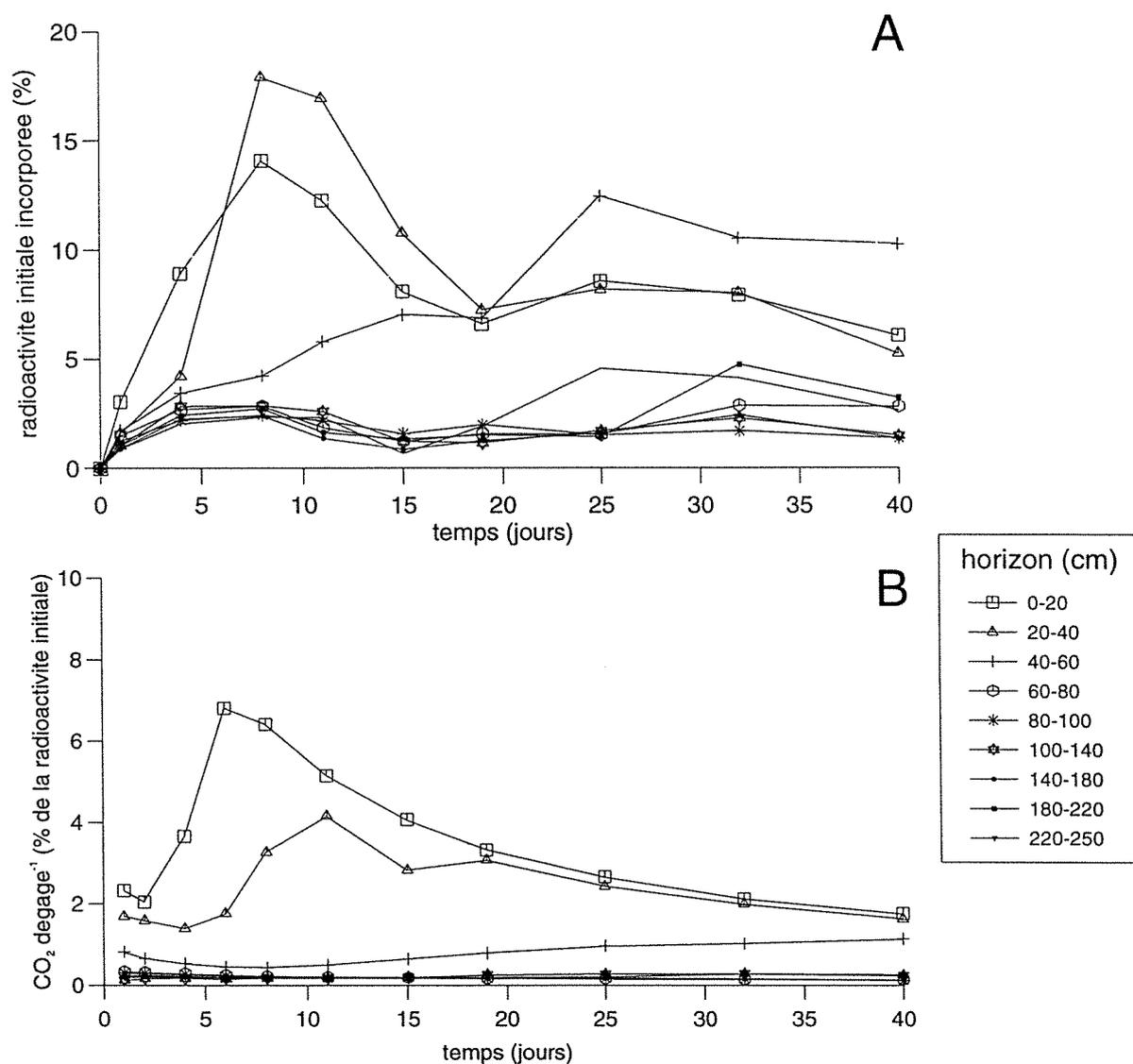


Figure 67 : Cinétiques d'incorporation (A) et de minéralisation (B) du 2,4-D marqué sur le cycle (concentration 3,33 mg.kg⁻¹sol) dans les différents horizons du profil de sol de 250 cm.

d'incubation pour respectivement les horizons 0-20 cm et 20-40 cm. Dans l'horizon 40-60 cm, la vitesse de minéralisation diminue puis augmente à partir du douzième jour d'incubation. Au delà de 60 cm de profondeur, la vitesse de minéralisation devient négligeable (figure 67A).

3-2-2 Cinétiques d'incorporation du carbone aromatique du 2,4-D.

Les résultats de cette étude sont rassemblés sur les figures 66 et 67 où nous avons comparé l'évolution des pourcentages de la radioactivité incorporée dans la biomasse présente à différents niveaux du profil réalisé en juillet 1992. Ces cinétiques d'incorporation varient avec la concentration en 2,4-D et la profondeur.

Quelle que soit la concentration considérée, seuls les trois horizons les plus superficiels contiennent une biomasse capable de fixer une part significative, légèrement supérieure à 20% de la radioactivité initiale ajoutée. En dessous de 60 cm, ce même pourcentage reste inférieur à 3% tout au long de la période d'incubation de 40 jours. Cette observation est en accord avec les faibles taux de minéralisation observés pendant cette période dans les échantillons prélevés dans ces horizons profonds. C'est donc bien la capacité intrinsèque de la microflore à dégrader le 2,4-D qui est en cause et non un comportement physiologique qui privilégierait l'incorporation de carbone aux détriments de sa minéralisation.

La concentration en 2,4-D fait apparaître quelques différences de détail dans les cinétiques d'incorporation, au moins lorsque le phénomène se manifeste avec une certaine importance, c'est à dire dans les horizons supérieurs. A la concentration de 0,033 mg. kg⁻¹sol, nous pouvons distinguer deux périodes d'activité (figure 66B). La première démarre immédiatement après l'apport de 2,4-D et présente un maximum après 4 jours d'incubation. La seconde, qui traduit probablement le développement d'une microflore dégradante spécifique, apparaît immédiatement après et atteint un maximum après 9 jours. Nous remarquons aussi que la quantité de radioactivité incorporée diminue de façon importante entre 9 et 15 jours puis se stabilise ensuite aux alentours de 10% de la radioactivité initiale. Cette stabilisation peut être le résultat d'une stabilisation de la population dégradante qui aurait régressé vers un niveau d'équilibre et dont l'activité métabolique se trouverait ralentie après disparition de son substrat préférentiel, le 2,4-D. Mais elle pourrait aussi correspondre au développement tardif soit d'une population dégradante utilisant les dernières traces de l'herbicide soit d'une population non dégradante secondaire recyclant les métabolites marqués produits par la population dégradante. A concentration plus élevée ne subsiste que le pic d'activité centré vers 9 jours dont l'individualisation est le résultat d'un enrichissement en micro-organismes dégradants spécifiques d'autant plus prononcé que la concentration est plus élevée (figure 67B). Après 20 jours d'incubation, ce qui apparaissait à faible concentration comme une stabilisation de la quantité de radioactivité incorporée correspond,

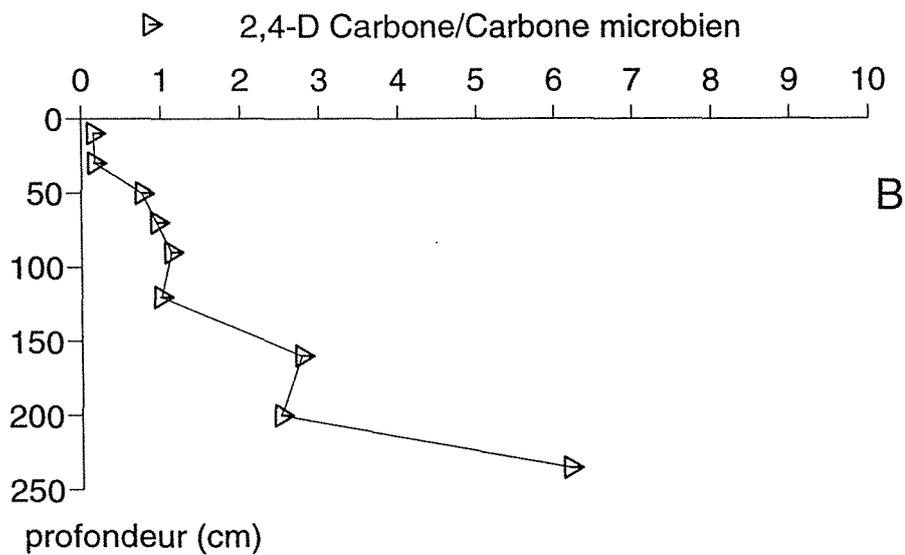
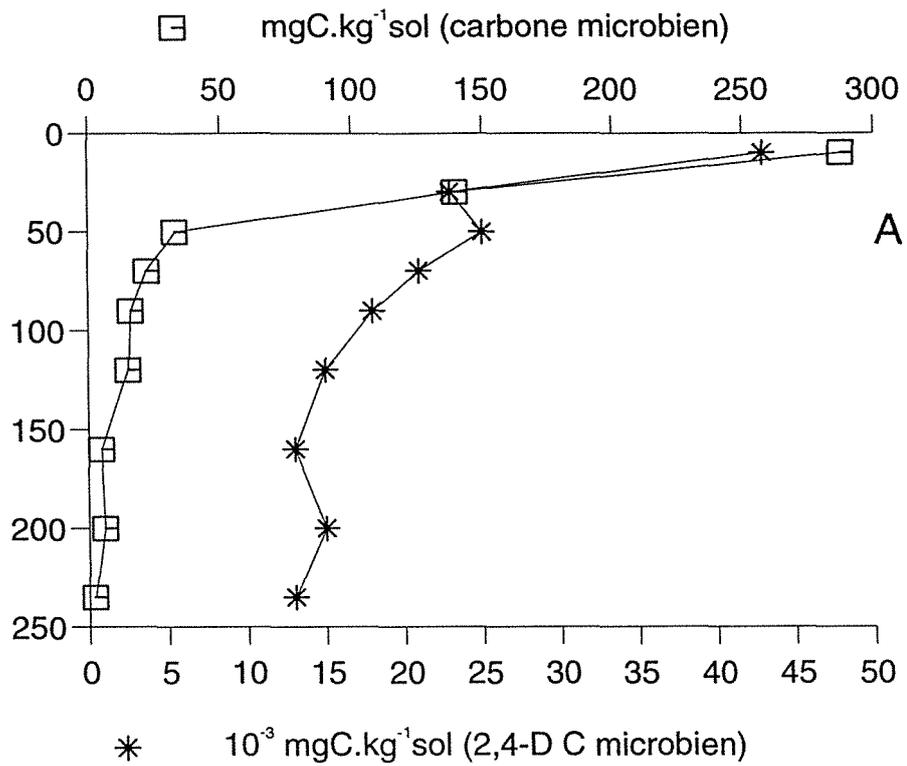


Figure 68 : Profils de biomasse microbienne totale et de biomasse microbienne dégradant le 2,4-D (A) (concentration 0,047 mg.kg⁻¹sol). Evolution du rapport entre la quantité de carbone microbien marqué avec du 2,4-D-¹⁴C et celle du carbone microbien total (B).

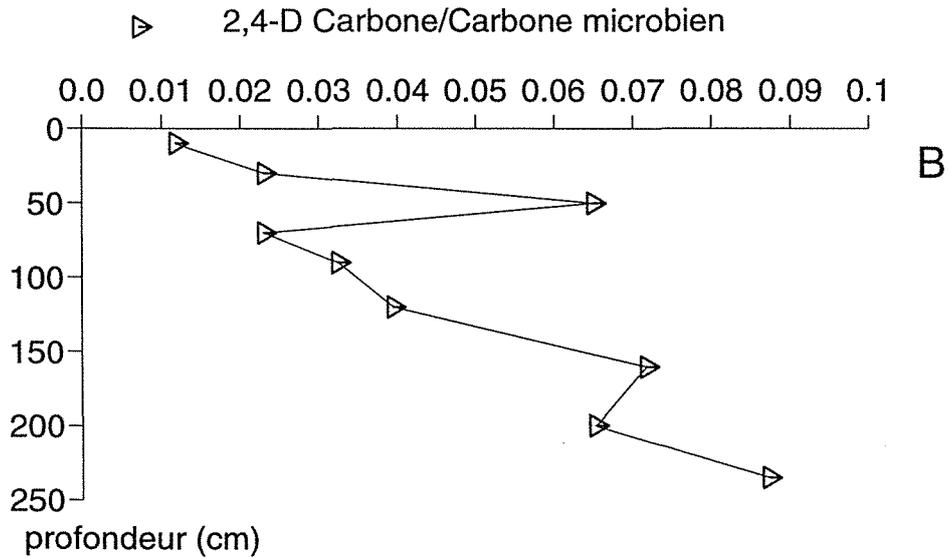
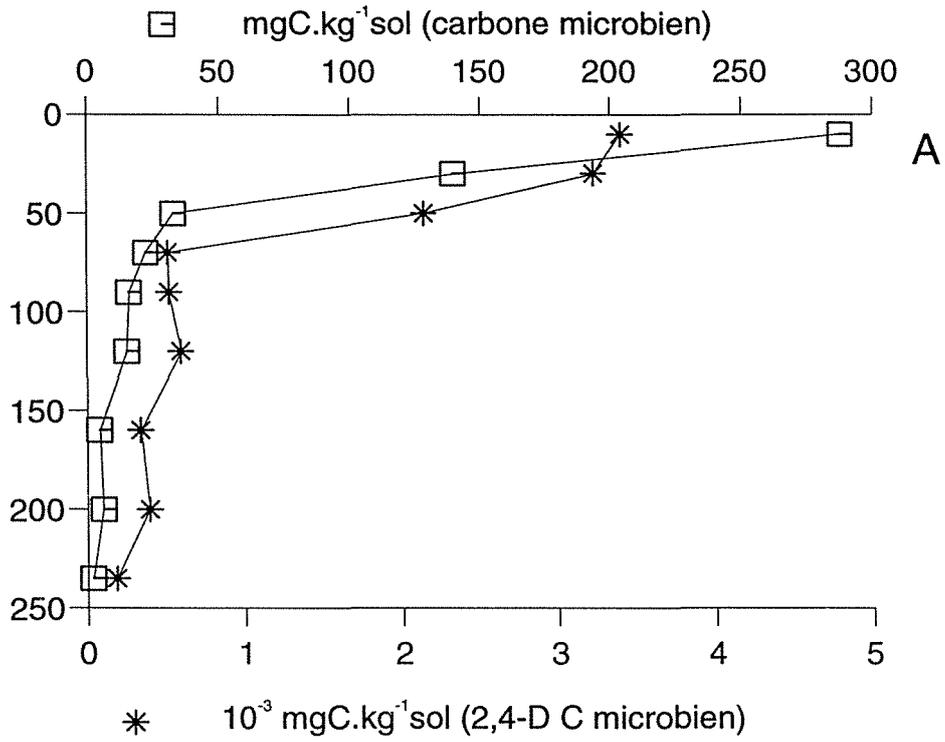


Figure 69 : Profils de biomasse microbienne totale et de biomasse microbienne dégradant le 2,4-D (A) (concentration $3,33 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ sol}$). Evolution du rapport entre la quantité de carbone microbien marqué avec du 2,4-D- ^{14}C et celle du carbone microbien total (B)

à plus forte concentration à une réelle tendance à une reprise de l'incorporation que l'on peut même observer dans les sols provenant d'horizons plus profonds (140-180 cm).

Dans les figures 68 et 69, nous avons reporté la courbe de l'incorporation biologique du 2,4-D ainsi que celle du carbone microbien estimé par la technique de Fumigation-Extraction. Nous avons choisi les valeurs de biomasse microbienne marquée au ^{14}C -2,4-D correspondant au pic observé après 9 jours d'incubation. Lors du traitement du sol avec une concentration de $0,033 \text{ mg } 2,4\text{-D.kg}^{-1}\text{sol}$ (figure 68A) ou de $3,33 \text{ g } 2,4\text{-D.kg}^{-1}\text{sol}$ (figure 69A), nous remarquons une similitude de forme entre les 2 courbes. En effet, la quantité de carbone microbien marqué et total diminue rapidement de la surface jusqu'à 60 cm de profondeur puis se stabilise entre 60 et 250 cm de profondeur. Le rapport entre la biomasse microbienne 2,4-D et celle de carbone microbien augmente avec la profondeur (figures 68B et 69B).

Nous constatons un comportement différent de la microflore du sous-sol. Dans un sol de surface prélevé sur un site expérimental à Dijon, Soulas (1990) conclut à l'existence de 2 communautés microbiennes dégradant le 2,4-D. La première est active dès l'introduction de l'herbicide et serait majoritairement composée d'organismes co-métabolisants surtout efficaces à faible concentration, la seconde intervient plus tardivement surtout lorsque la concentration augmente. Les micro-organismes qui appartiennent à cette seconde communauté seraient capables d'utiliser le pesticide comme seule source de carbone et d'énergie et sont à l'origine du phénomène d'adaptation. Ils sont également relativement peu nombreux, de l'ordre de 10 à 100 germes dans les sols agricoles. C'est leur complète disparition dans les horizons profonds du sous-sol qui expliquerait le caractère co-métabolique exclusif de la dégradation du 2,4-D.

CONCLUSION

L'utilisation de la méthode de mesure de l'activité hétérotrophe de la microflore dans un profil de sol reflète l'existence de 2 systèmes enzymatiques de transformation du glucose et de l'acétate dans la population microbienne. En ce qui concerne la gamme de concentration $2,5\text{-}80 \text{ mg C-substrat.kg}^{-1} \text{ sol}$, l'évolution de la vitesse initiale de minéralisation suit une cinétique de type Michaelis-Menten. La diminution de la vitesse maximale de minéralisation est corrélée avec celle de la taille de la microflore. Mais, le résultat le plus intéressant est la diminution de la constante d'affinité pour le substrat ce qui s'interprète comme une augmentation de l'affinité pour le substrat des micro-organismes indigènes dans le sous-sol. L'activité potentielle de minéralisation et/ou d'incorporation des 2 herbicides, le 2,4-D et l'atrazine, dans le profil de sol de Cîteaux est faible dans les horizons situés en dessous de la zone cultivée de sol

- DISCUSSION GENERALE -

DISCUSSION GÉNÉRALE

Bilan des résultats obtenus

CARACTÉRISTIQUES ENVIRONNEMENTALES DU MILIEU " SOUS-SOL "

Les différents aspects de ce travail expérimental contribuent à une connaissance plus approfondie du comportement de la microflore de la zone profonde du sol de Cîteaux. Dans le schéma suivant, nous avons résumé les principaux éléments susceptibles d'intervenir dans la capacité de survie de la microflore du sous-sol. L'évolution des paramètres environnementaux tels que la température et la teneur en oxygène à différentes profondeurs dans le profil de sol de Cîteaux sont compatibles avec une activité microbienne aérobie dans le sous-sol. D'une manière générale, nous avons montré que le nombre de micro-organismes décroît d'un facteur de 10 à 100 avec la profondeur et que la microflore du sous-sol de Cîteaux est constituée majoritairement de bactéries aérobies. De même, l'activité microbienne, estimée par la mesure de la quantité de CO₂ dégagée, diminue aussi avec la profondeur.

QUANTIFICATION DE LA BIOMASSE MICROBIENNE PRÉSENTE DANS LE SOUS-SOL

Aucune des 3 méthodes d'estimation de la taille de la microflore du sol ne semble directement applicable à la détermination de la quantité de biomasse microbienne dans le sous-sol. La technique de dénombrement présente plusieurs limites. Tout d'abord, seulement 1 à 10% des micro-organismes du sol sont capables de se développer sur milieux de culture standards qui sont sélectifs de part la nature des substrats qu'ils contiennent. L'autre problème méthodologique important concerne la concentration élevée en substrats carbonés des milieux de culture qui pourrait inhiber la croissance des micro-organismes du sous-sol adaptés à de faibles teneurs en nutriments.

Les techniques biocidales et physiologiques d'estimation de la quantité de carbone microbien dans le sol sont, elles aussi, inadaptées dans le cas d'estimation du carbone microbien dans le sous-sol. Les coefficients de conversion en carbone microbien, K_{ec} et K_c , qui ont été calibrés dans les sols de surface, se révèlent être inadaptés dans le cas de la détermination de la quantité de biomasse microbienne du sous-sol. Comme l'a montré notre

travail, le coefficient K_{ec} varie avec la profondeur dans le profil de sol de Cîteaux et l'ignorance de cette variation peut entraîner, dans certains cas, une sous-estimation de la biomasse microbienne de 90%. D'une façon générale, nous pouvons soulever le problème de l'utilisation directe de méthodes mises au point dans le sol de surface, en profondeur. Un prolongement de ce travail serait de redéfinir les coefficients de conversion en carbone microbien, dans différents profils de sol de manière à confirmer ou à infirmer la tendance que nous avons observée.

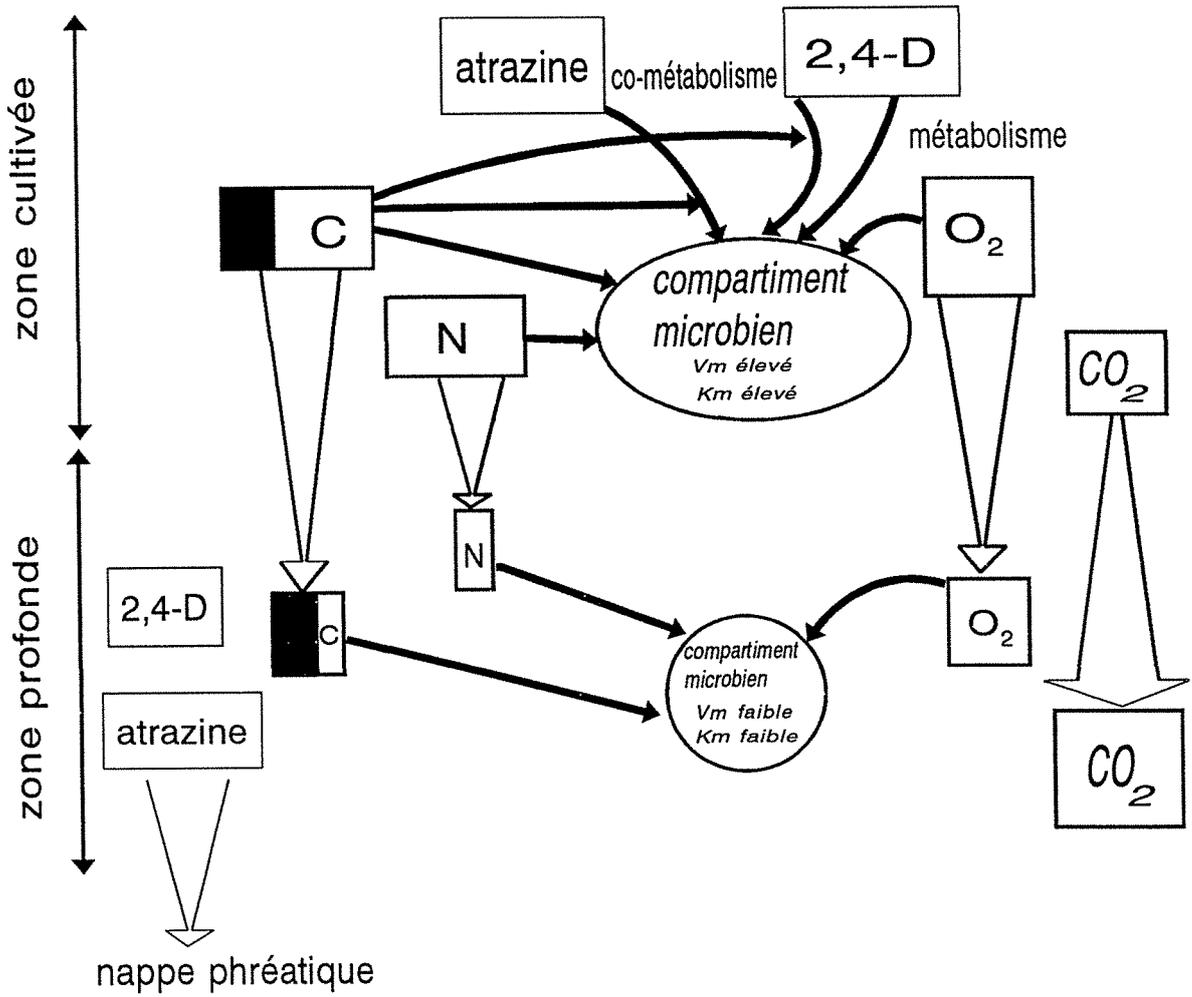
La méthode d'Anderson et Domsch dont le principe repose sur la saturation des capacités de transformation de la microflore du sol après un apport important d'un substrat carboné tel que le glucose pourrait elle aussi être inadaptée à la mesure de la biomasse en sol profond en raison de caractéristiques physiologiques des micro-organismes du sous-sol qui diffèrent de celles des micro-organismes présents dans les sols. En particulier, une stratégie d'incorporation préférentielle du substrat, plutôt que de minéralisation, pourrait entraîner une invalidation de la méthode SIR ou, du moins, la nécessité de sa recalibration.

ACTIVITÉS POTENTIELLES DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL

Au sujet de l'activité de cette microflore, nos résultats montrent l'existence d'une activité microbienne aérobie significative jusqu'à 5 mètres de profondeur dans le profil de sol de Cîteaux. La modification des caractéristiques de l'activité hétérotrophe de la microflore issue de différents horizons par rapport à celle du sol de surface, à savoir une diminution de la vitesse de minéralisation V_m et de la constante de Michaelis K_m met en évidence un comportement différent des micro-organismes du sous-sol, caractéristique du phénomène d'adaptation de la population microbienne aux conditions oligotrophes du milieu. En particulier, la diminution de la valeur du paramètre K_m est le signe d'une grande affinité des micro-organismes pour les substrats carbonés. Cette stratégie de "type K" est probablement la plus adaptée à l'exploitation de milieux pauvres en ressources nutritives.

La réduction de la vitesse potentielle de minéralisation de différents substrats carbonés tels que le glucose, l'acétate et l'acide benzoïque avec la profondeur serait due à l'influence des facteurs abiotiques (teneur en argile, en nutriments carboné et azoté) et à des facteurs biotiques tel que la diminution de la quantité de biomasse microbienne dans le sol. Mais, l'absence d'une relation de proportionnalité entre la vitesse potentielle de minéralisation du substrat carboné et la quantité de biomasse présente dans les différents horizons du profil de sol traduirait une adaptation de la biomasse, à de faibles quantité de substrat, dans les horizons profonds.

En ce qui concerne la dégradation des molécules xénobiotiques telles que le 2,4-D et l'atrazine, la tendance est non seulement à une diminution des capacités dégradantes de la



■ Carbone non disponible
 □ Carbone disponible

Shéma récapitulatif montrant l'évolution du carbone (C), de l'azote (N), de l'oxygène (O₂) et du dioxyde de carbone (CO₂) dans un profil de sol. Influence de ces différents facteurs sur la microflore du sol.

microflore du sous-sol mais, pour le premier produit nommé, à une modification de la nature du processus de dégradation qui deviendrait de nature essentiellement co-métabolique donc tributaire de la fourniture carbonée même si dans certains horizons du sous-sol de Cîteaux, nous avons mis en évidence la possibilité d'une légère adaptation de la microflore à la dégradation du 2,4-D. Il est probable que la dégradation des pesticides dans le sous-sol soit largement conditionnée par les flux de carbone dont le caractère discontinu entraîne probablement des variations très importantes dans la dégradation des molécules xénobiotiques. Comme nos résultats le montrent, la microflore du sous-sol ne possède pas les capacités enzymatiques nécessaires à la dégradation des molécules aromatiques xénobiotiques. Par contre, nous avons montré sa capacité à minéraliser un composé aromatique, l'acide benzoïque. Ceci signifierait que les micro-organismes présents dans le sous-sol ne disposeraient pas des enzymes réalisant les premières étapes du clivage de la molécule de 2,4-D.

CAPACITÉS DE SURVIE DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL

L'ensemble des mesures d'activités potentielles dégradantes que nous avons accomplies nous permet d'apporter quelques éléments complémentaires quant à la compréhension du fonctionnement de la microflore dans le sous-sol. Nous avons résumé les principales informations obtenues concernant le fonctionnement de la microflore dans le sous-sol sur le schéma suivant. La chute de la quantité de nutriments carboné et azoté avec l'augmentation de la profondeur a pour corollaire de diminuer la quantité de biomasse microbienne avec la profondeur. En raison de la quantité limitée de nutriments dans le sous-sol, la microflore indigène a dû développer une stratégie d'adaptation aux conditions d'oligotrophie régnant dans leur environnement. Ceci s'est traduit par une augmentation de l'affinité pour le substrat caractérisée par une faible constante d'affinité. Dans le sol de surface, la dégradation biologique de pesticides tels que le 2,4-D et l'atrazine s'effectue essentiellement selon les voies métaboliques (2,4-D) et co-métabolique (2,4-D, atrazine). Il n'en est pas de même dans le sous-sol où la minéralisation de ces composés est très faible. Les résultats publiés dans la littérature montrent une dégradation des composés xénobiotiques par voie co-métabolique majoritaire.

Perspectives

MESURES D'ACTIVITÉS DÉGRADANTES DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL *IN SITU*.

La démarche expérimentale que nous avons développée nous a permis de mesurer des activités potentielles de dégradation de composés organiques naturels et xénobiotiques. Pour ce faire, nous nous sommes placés en condition contrôlée de température, d'humidité et de teneurs en oxygène identiques quel que soit l'horizon de sol étudié. Or, dans la partie expérimentale intitulée " Présentation du site de Cîteaux ", la température, la teneur en oxygène ainsi que l'humidité variaient avec la profondeur. La suite de ce travail va consister à mesurer des activités dégradantes au champ. Dans cette optique, un puits sec de 3 mètres de profondeur a été installé sur la parcelle de Cîteaux à l'intérieur duquel 2 chambres d'incubation *in situ* sont placées à 0,5 et 1,5 mètres de profondeur. Une série de capteurs répartis sur la totalité du profil permettra de suivre les variations journalières de la température et des teneurs en oxygène et en eau.

CARACTÉRISTIQUES PHYSIOLOGIQUE ET MÉTABOLIQUE DE LA MICROFLORE DU SOUS-SOL

Nous avons montré que la microflore du sous-sol avait développé des systèmes enzymatiques de transformation du substrat à haute affinité pour le substrat que ceux de la microflore indigène du sol de surface. Une étude approfondie de la diversité métabolique et physiologique de la microflore du sous-sol permettrait une meilleure compréhension du fonctionnement de la microflore du sous-sol et de son comportement vis à vis des composés xénobiotiques dans l'environnement.

CARACTÉRISATION DE L'ÉTAT NUTRITIONNEL DU MILIEU SOUTERRAIN

Parce que, dans le sous-sol, le processus co-métabolique semble être majoritaire dans la dégradation des composés xénobiotiques, il serait intéressant de corrélérer le taux de dégradation des composés xénobiotiques à la quantité de carbone disponible aux différentes profondeurs dans le sol. Nous proposons quelques pistes. Il s'agirait en premier lieu de préciser l'état nutritionnel du milieu souterrain en caractérisant les différentes formes de carbone et en mesurant la biodisponibilité du carbone dans le profil. Par la suite, l'étude de l'influence de la nature ainsi que de la teneur en carbone sur la dégradation des pesticides dans le sous-sol pourrait être envisagée.

- ANNEXES -

- ANNEXE 1 -
Caractéristiques physico-chimiques du profil de sol de Cîteaux.

Profondeur (cm)	granulométrie (%)			humidité équivalente (%)	Carbone (%)		Azote total (%)	C/N	pH KCl	C.E.C. meq.100 ⁻¹ g sol	bases échangeables (meq.100 g ⁻¹ sol)			
	argile	limon	sable		total	MO					Ca ⁺⁺	Na ⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺
0-20	18,6	57,8	23,6	21,2	0,83	1,43	0,090	9,22	7,4	10,0	27,9	0,028	0,33	0,527
20-40	18,6	57,6	23,8	19,3	0,70	1,20	0,079	8,86	7,3	9,1	26,0	0,034	0,30	0,338
40-60	28,5	53,6	17,9	21,5	0,25	0,43	0,033	7,58	7,1	12,3	16,3	0,044	0,35	0,265
60-80	45,9	58,9	15,2	31,2	0,18	0,36	0,032	6,56	7,0	22,5	27,8	0,057	0,80	0,376
100-120	59,0	26,0	15,0	46,1	0,15	0,26	0,028	5,36	6,9	28,4	34,5	0,091	1,28	0,412
120-140	47,6	28,0	24,4	39,6	0,19	0,33	0,032	5,94	7,2	21,0	55,7	0,088	1,20	0,363
140-160	21,4	44,5	34,1	19,9	0,10	0,17	0,017	5,88	7,5	9,9	46,2	0,044	0,53	0,183
160-180	17,9	53,0	29,1	20,0	0,10	0,17	0,016	6,25	7,5	9,1	45,7	0,044	0,48	0,200
180-200	14,9	53,7	31,4	19,3	0,09	0,15	0,016	5,63	7,6	7,7	44,4	0,048	0,44	0,197
200-220	14,4	44,5	41,4	18,1	0,10	0,17	0,017	5,88	7,6	6,7	43,1	0,043	0,40	0,176
220-240	10,7	32,4	56,9	15,8	0,09	0,15	0,013	6,92	7,7	5,2	41,7	0,042	0,35	0,142
240-260	8,2	33,0	58,8	14,2	0,09	0,15	0,015	6,00	7,7	4,9	41,1	0,04	0,34	0,130
260-280	11,6	31,5	56,9	16,1	0,09	0,15	0,015	6,00	7,6	5,6	41,9	0,042	0,37	0,136
280-300	16,0	39,6	44,4	18,4	0,09	0,15	0,017	5,29	7,6	6,5	42,8	0,055	0,42	0,168
300-320	8,4	20,2	71,4	13,2	0,08	0,14	0,015	5,33	7,7	5,0	40,4	0,058	0,39	0,123
320-340	13,7	37,4	48,9	16,6	0,09	0,15	0,017	5,29	7,6	5,7	42,4	0,057	0,44	0,155
340-360	14,0	37,0	53,0	16,7	0,09	0,15	0,018	5,00	7,6	5,9	42,5	0,062	0,44	0,161
360-380	11,9	43,2	44,9	16,1	0,09	0,15	0,014	6,43	7,7	5,0	42,0	0,057	0,39	0,140
380-390	12,7	58,1	29,2	18,2	0,10	0,17	0,015	6,67	7,6	6,1	42,3	0,060	0,42	0,149
390-405	15,9	62,1	22,0	19,5	0,15	0,26	0,017	8,33	7,6	6,4	42,9	0,064	0,43	0,185
405-420	14,0	58,8	28,2	18,3	0,10	0,17	0,018	5,56	7,6	6,2	42,1	0,061	0,42	0,176
420-435	14,8	56,4	28,8	18,3	0,12	0,21	0,017	7,06	7,6	6,3	42,2	0,065	0,44	0,180
435-450	13,8	48,0	38,2	17,4	0,10	0,17	0,017	5,88	7,7	6,0	42,1	0,062	0,43	0,178
450-470	11,8	36,0	52,2	15,6	0,11	0,19	0,017	6,47	7,7	5,1	41,3	0,062	0,39	0,146
470-490	10,5	33,9	55,6	15,2	0,1	0,17	0,016	6,25	7,7	4,9	41,4	0,067	0,35	0,146
490-508	11,2	30,6	58,2	15,1	0,12	0,21	0,016	7,5	7,7	4,7	41,3	0,066	0,35	0,134
508-525	7,1	12,4	80,5	10,5	0,11	0,19	0,012	9,17	7,8	3,9	39,8	0,078	0,32	0,089

Profondeur (cm)	fer EDTA mg.kg ⁻¹	Manganèse (mg.kg ⁻¹)			CaCO ₃ (g.kg ⁻¹ sol)		P ₂ O ₅ (g.kg ⁻¹ sol) OLSEN
		Mn ²⁺	Mn réd.	Mn EDTA	total	active	
0-20	26,4	0,9	0,614	17,9	17	0	0,148
20-40	22,1	0,7	0,601	15,1	16	0	0,054
40-60	33,7	0,6	0,827	72,6	3	0	0,012
60-80	12,1	0,5	0,362	5,8	0	0	0,004
100-120	15,0	0,9	0,602	6,2	0	0	0,004
120-140	11,5	2,6	0,145	4,0	159	27	0,006
140-160	6,8	1,5	0,061	2,3	464	50	0,003
160-180	7,4	1,2	0,120	2,7	440	55	0,003
180-200	7,3	1,7	0,050	2,7	480	70	0,005
200-220	8,2	2,1	0,036	3,4	538	57	0,005
220-240	9,5	3,2	0,037	4,2	614	30	0,008
240-260	9,6	2,7	0,013	3,8	634	20	0,008
260-280	9,2	2,6	0,039	3,9	622	35	0,017
280-300	8,4	2,3	0,150	4,9	556	40	0,024
300-320	8,9	3,2	0,020	3,6	718	35	0,010
320-340	9,4	3,0	0,147	4,5	517	50	0,021
340-360	9,5	2,8	0,065	4,3	579	45	0,017
360-380	8,9	2,5	0,040	4,0	554	40	0,016
380-390	8,7	2,7	0,043	4,2	458	50	0,020
390-405	9,1	2,7	0,050	3,9	418	50	0,015
405-420	9,7	3,1	0,053	4,5	435	45	0,012
420-435	9,4	3,5	0,051	4,6	415	50	0,010
435-450	9,5	3,7	0,051	4,7	464	50	0,012
450-470	9,0	3,9	0,061	5,1	575	50	0,012
470-490	8,3	5,5	0,056	6,9	631	50	0,008
490-508	8,8	5,7	0,069	8,4	664	45	0,013
508-525	8,8	6,9	0,033	8,4	796	35	0,010

- ANNEXE 2 -
Description pédologique du profil de sol de Cîteaux.

Profil N°1-Bourlet pour INRA-02/04/1993-Cîteaux.21

Contrat CEE-INRA Dijon

❶ Situation

IGN 50000 Dijon (Alt 206 mètres)
100000 Pedo/Feuille 0-12 Dijon 1975 INRA (J. Chrétien)
Route de Villebichot, à environ 1 Km au carrefour RN 396.

❷ Environnement

Glacis, Pente générale S-SW < 3%, formation du quaternaire récent, formation limoneuses de recouvrement du pliocène.

Présence d'une nappe phréatique semi-permanente. Profondeur : apparition d'eau libre à 2,50 mètres le 02/04/93.

Parcelle aménagée pour des études hydrologiques. Pelouses graminées et végétation herbacée spontanée. Pierrosité nulle. Battance et sol compact observés en surface.

Profil creusé à la pelle mécanique d'une profondeur de 2,10 mètres.

Présence d'un drainage (poteries obstruées à 80 %) à une profondeur de 1,20 mètres. Âge du drainage : 130 ans.

Après la caractérisation du profil :

- mesure de la densité apparente in situ
- prélèvements d'échantillons pour les analyses physico-chimiques non remaniés (cylindres) pour des mesures hydrodynamiques en saturé et non saturé.
- mottes et agrégats.
- analyse de la porosité
- courbe de retrait, Potentiel.

❸ Caractérisation pédogénétique

profil A/E/B/IIM à drainage interne défavorable.

Le sol est remanié à proximité de la tranchée drainante sur 1,20 mètre.

S/GR sols lessivés hydromorphes.

FM limons anciens tronqués et resaturés par la mise en culture.

Classification R.P.F. : Luvisol rédoxique.

❹ Description des caractères morphologiques

Horizon 0-10 cm, anciennement cultivé, LA1.

- Frais, couleur uniforme 10YR/4/3 (brun), très peu taché, moyen organique.
- Texture limono-argileuse, (18-20 % argile), non calcaire.
- Structure fragmentaire très nette, polyédrique (taille 5-10 mm).
- Matériau friable et fragile, horizon poreux, racines assez bien réparties, nombreuses et fines, activité biologique faible.
- Transition distincte et régulière.

Horizon 10-35 cm, récemment cultivé, LA2.

- Frais, couleur assez uniforme 10YR/4/6 (brun jaunâtre foncé), un peu taché (<2 %), taches de dimensions 5-15 cm contrastées 10YR/3/2 (brun grisâtre très foncé), moyennement organique, texture limono-argileuse (20-22 % argile), non calcaire.
- Structure : apparence continue, sous-structure : polyédrique émoussée 20-50 mm.
- Matériau friable à consistance fragile à peu fragile.
- Racines peu nombreuses fines et inégalement réparties dans la masse, pas d'activité biologique apparente, horizon peu poreux.
- Transition nette et légèrement ondulée.

Horizon 35-70 cm, E.

- Humide, taché avec quelques décolorations 10YR/6,5/4 (brun jaunâtre clair à très pale), taches argilo-ferromanganiques 10YR/5/8 (brun-jaunâtre) 10 à 15 % de la surface peu contrastées car diffuses dans la masse taille 5-10 mm, très peu organique, un caillou arrondi de 20-50 mm.
- Texture argilo-limoneuse (25-30 % argile), présence de sable, non calcaire.
- Structure continue, sous-structure polyédrique peu nette (taille 10-20 mm), tendance à desquamation.
- Matériau peu collant et consistance peu plastique, horizon peu poreux, très peu de racines, pas d'activité biologique.
- Transition graduelle irrégulière.

Horizon 50-70 cm, Eg.

- Humide, l'intensité des plages d'illuviation augmente ainsi que le contraste avec les éléments de Btg et des concrétions ferromanganiques peu consolidées, couleur des plages décolorées 10YR/6,5/1 (gris clair), couleur des éléments Btg reliques 10YR/5/8 (brun jaunâtre), Couleur des concrétions 7,5YR/4/2 (brun à brun foncé), inorganique.
- Texture argilo-limoneuse et sable grossier? (30-35 % argile), non calcaire.
- Structure continue, sous-structure polyédrique peu affinée.
- Matériau peu collant à consistance peu plastique, horizon peu poreux, très rares racines, sans activité biologique apparente.
- Transition distincte interrompue.

Horizon 70-140 cm, Btg.

- Humide, marmorisé, larges plages oblongues décolorées, orientées verticalement 10YR/6,5/1 (gris clair) à 15-20 % de la surface, matrice couleur 7,5YR/5/8 (brun foncé), peu de concrétions ferromanganiques qui sont localisées au niveau du drain, présence de revêtements argilo-ferriques, inorganique.
- Texture argileuse (45 % argile), non calcaire.
- Structure continue à débits squameux convexes.
- Pores fins et moyens entre 1,20 et 1,40 mètres, souvent colmatés.
- Matériau peu collant à consistance plastique, horizon compact à très faible porosité, pas de racines, pas d'activité biologique.
- Transition diffuse et régulière.

Horizon 140-160 cm, BT-G.

- Humide à très humide, marmorisé 10YR/5/6 (brun jaunâtre), plages d'oxydoréduction peu contrastées (Battement de la nappe ?) couleur 7,5 YR/5/8 (brun foncé) et 7,5YR/6/8 (jaune rougeâtre) diffuses, quelques taches de décoloration brun grisâtre, inorganique.
- Texture argileuse (55-60 % argile), non calcaire.
- Structure massive nette à prismes grossiers peu individualisés.
- Matériau collant de consistance plastique, rares pores (1-2 mm), horizon très compact très peu poreux, sans activité biologique.
- Transition nette et irrégulière.

Horizon 160-175 cm, II-Mfe.

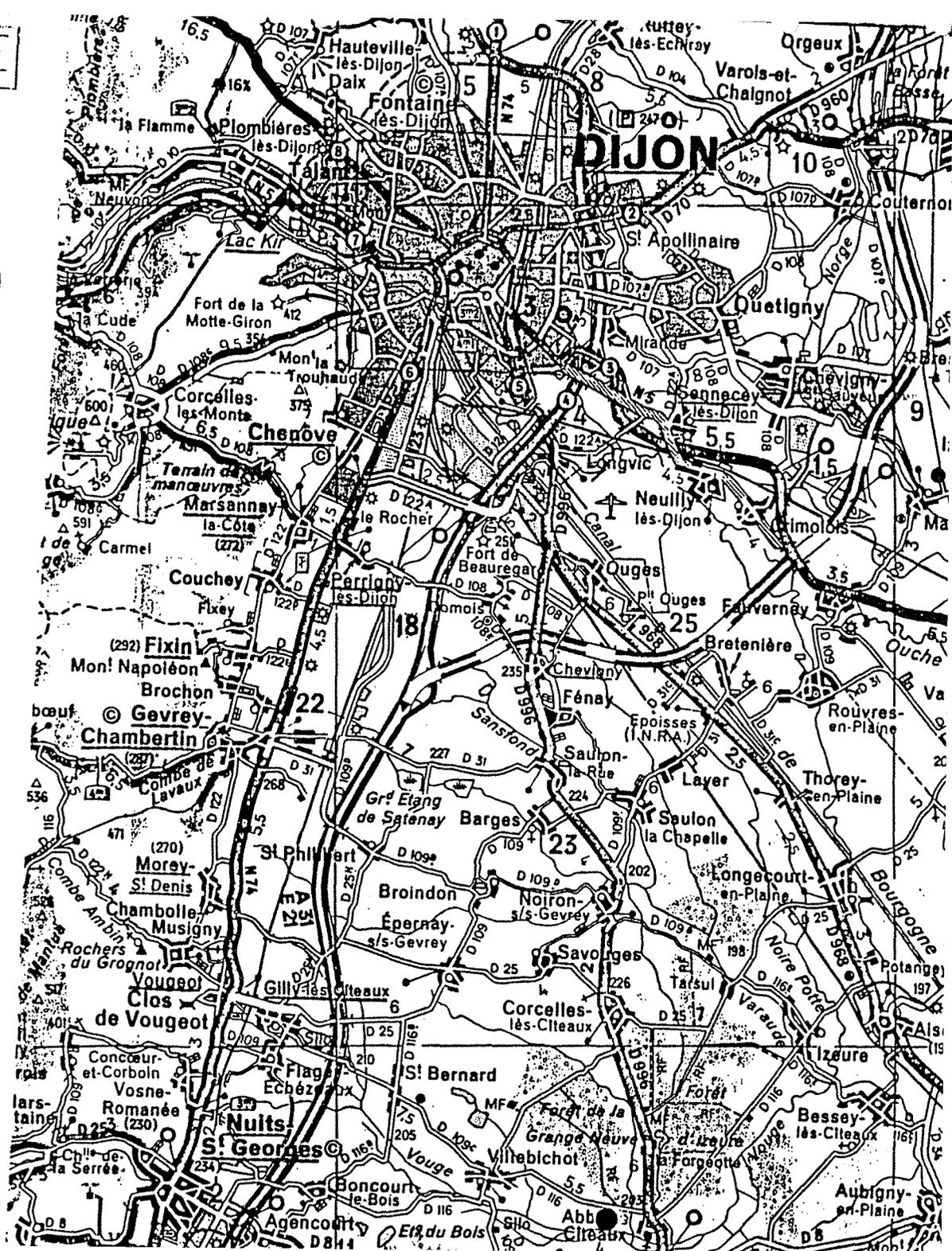
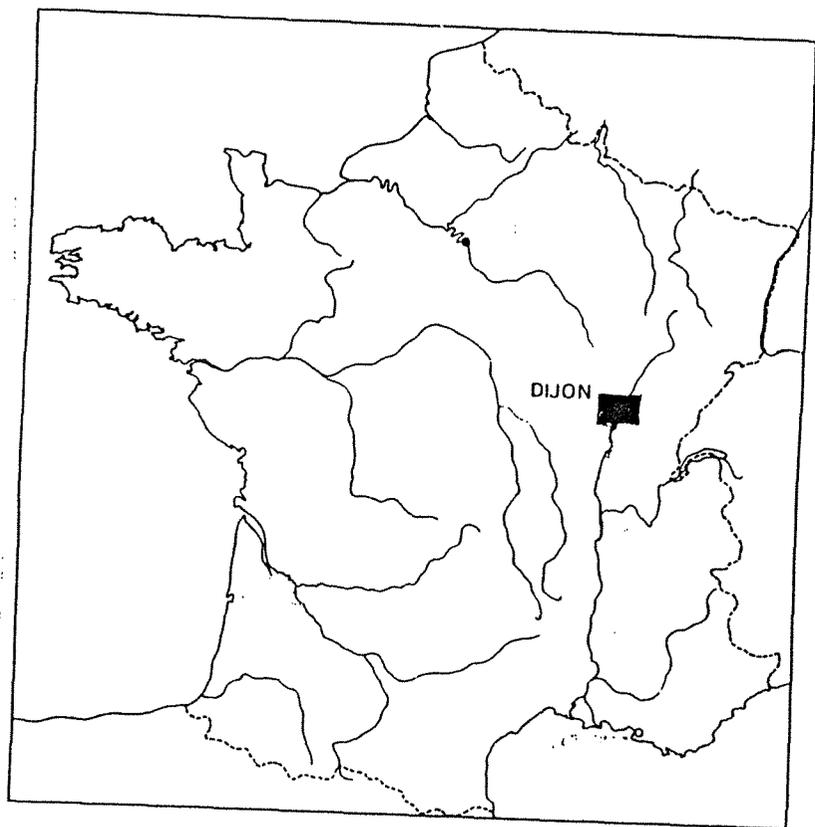
- Très humide, couleur assez uniforme 10YR.6/8 (brun jaunâtre), quelques indentations peu profondes prenant naissance dans l'horizon sus-jacent de couleur brun à brun clair, petites plages d'oxydes et d'hydroxydes de fer diffuses de couleur 7,5YR.6,5/8 (jaune rougeâtre).
- Texture sablo-argileuse, calcaire, effervescence vive et généralisée, granules calcaires de 2-4 mm durs et arrondis.
- Structure continue nette.
- Matériau collant et légèrement plastique, horizon peu poreux à poreux, sans activité biologique.
- Transition nette et régulière.

Horizon 175-210 cm, II-M.

- Très humide, couleur claire uniforme 10YR.7/3 (brun très pale).
- Texture argilo-sableuse, calcaire, effervescence vive et généralisée, granulations ferro-calcaires (2-4 mm) dures.
- structure continue, horizon poreux.
- 2,10 mètres, fond du profil, eau libre vers 2,50 mètres.

SITUATION GEOGRAPHIQUE

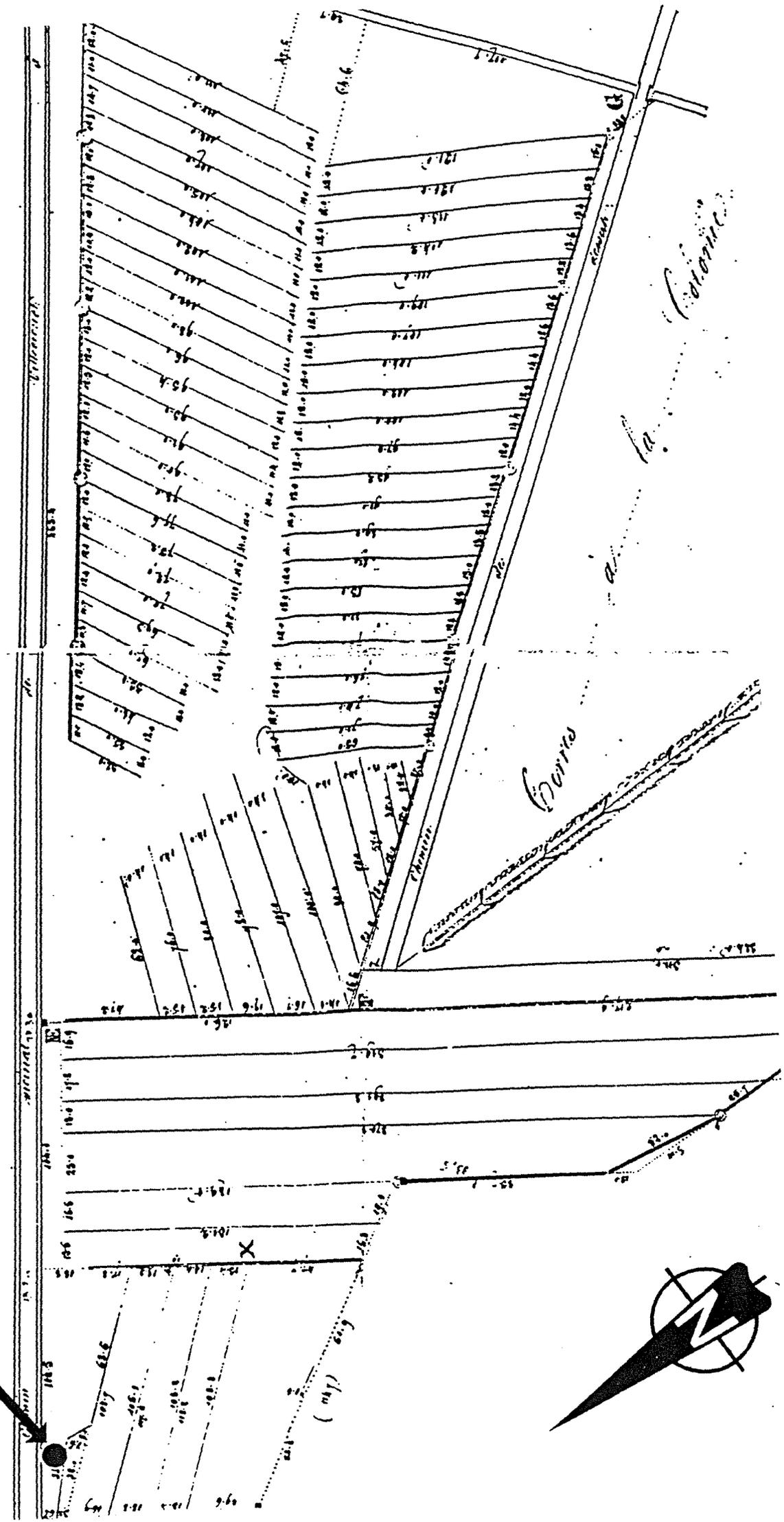
RTE PEDOLOGIQUE - DIJON 1/100000 ème
J. CHRETIEN - I.N.R.A. 1975



● Profil

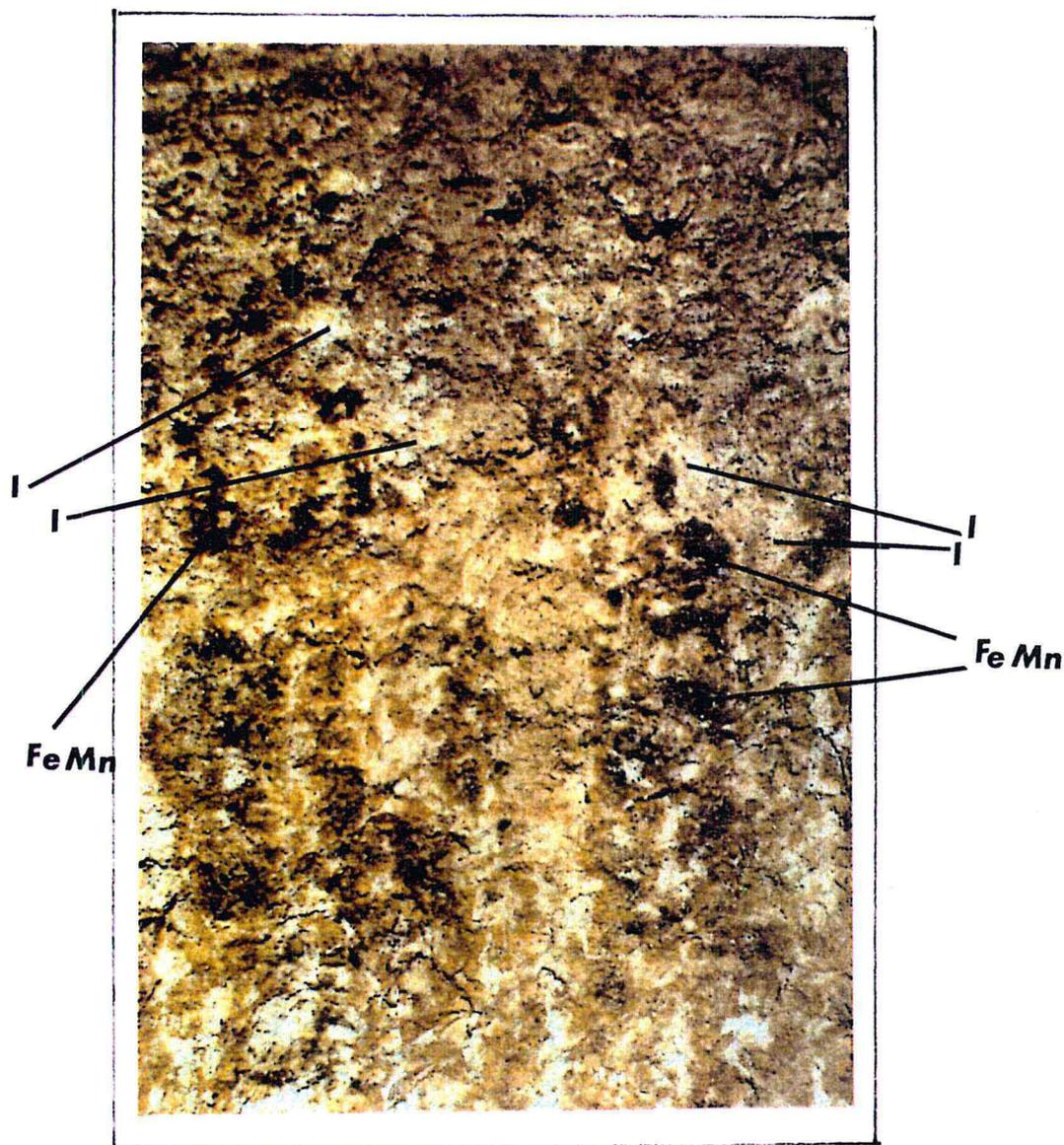
CITEAUX - Drainage.

Profil



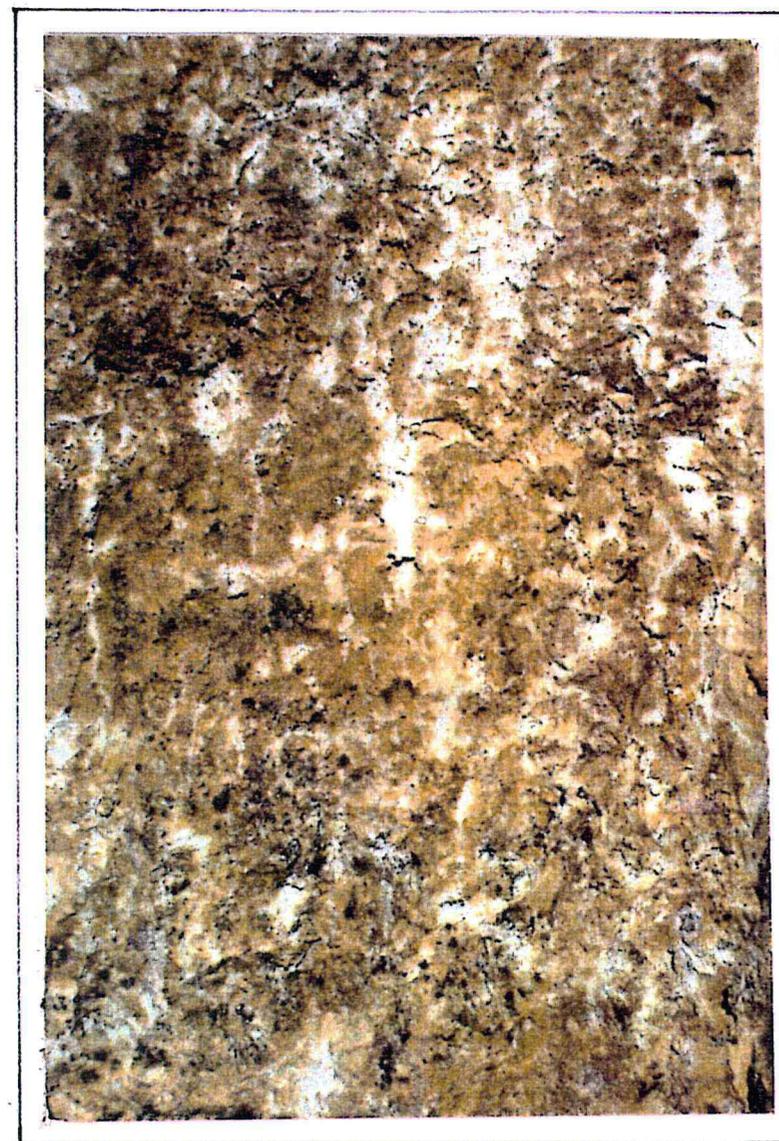
PARCELLE " MESURES PHYSIQUES ET HYDRODYNAMIQUES "

MICROBIOLOGIE DES SOLS - CITEAUX (21)



HORIZON E-g (50-70 cm)

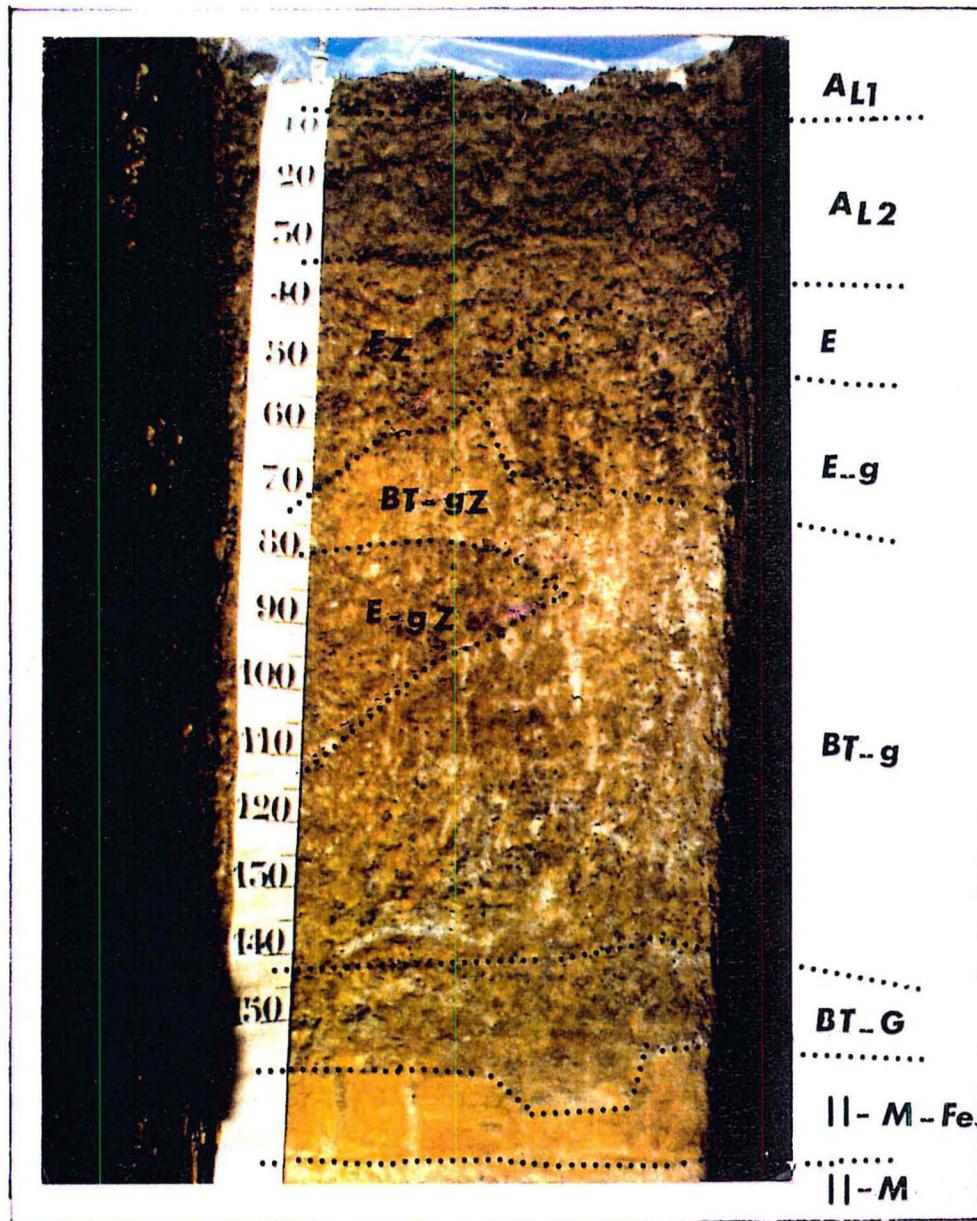
Plages claires d'illuviation
et concrétions ferro-manganiques



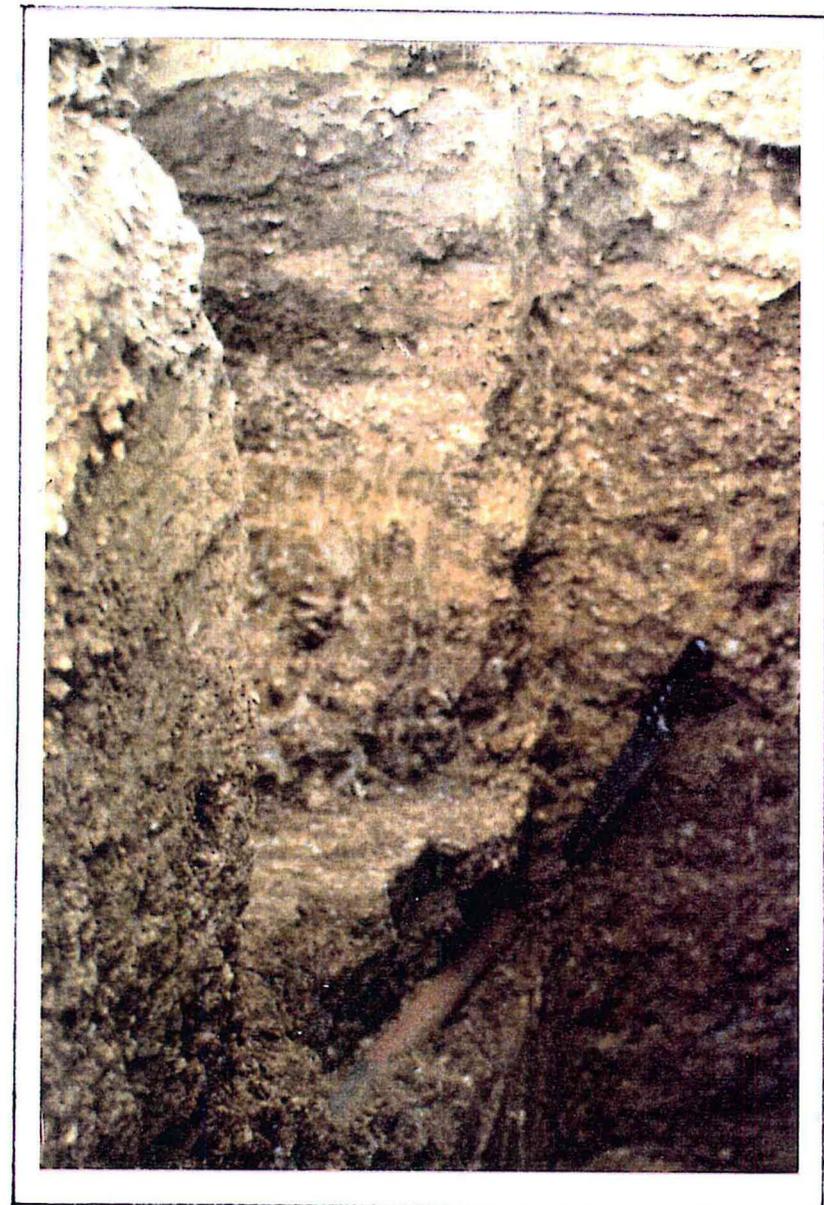
HORIZON BT-g (70-140 cm)

Le bariolage montre l'intensité
des caractères rédoxiques de l'horizon

LUVISOL REDOXIQUE EPAIS SUR ALLOUVIONS ANCIENNES
 SABLO-LIMONEUSES CALCAIRES A NAPPE PHREATIQUE PEU PROFONDE

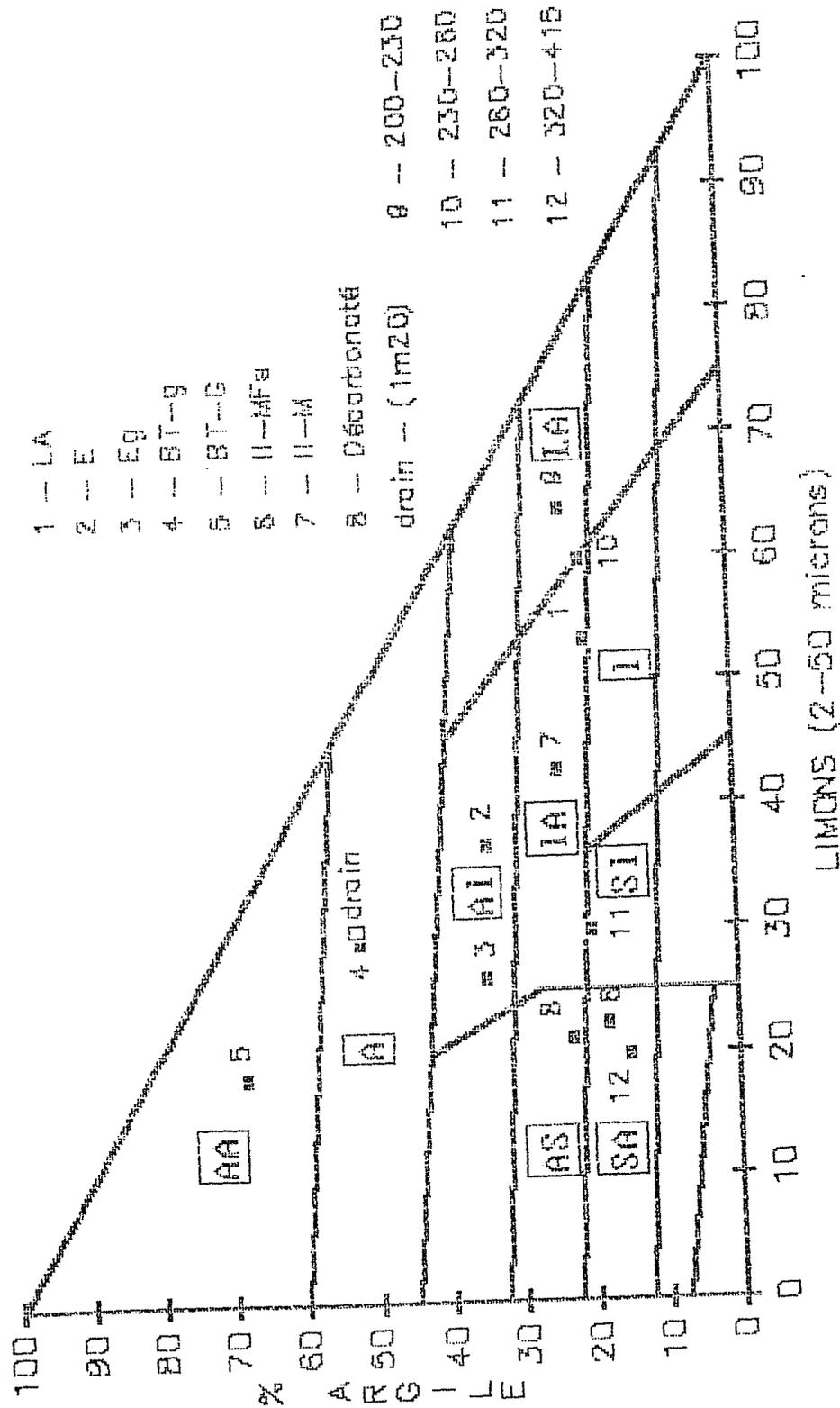


Horizons perturbés par la tranchée
 du drainage (notés Z) jusqu'à 1,20 m
 de profondeur environ

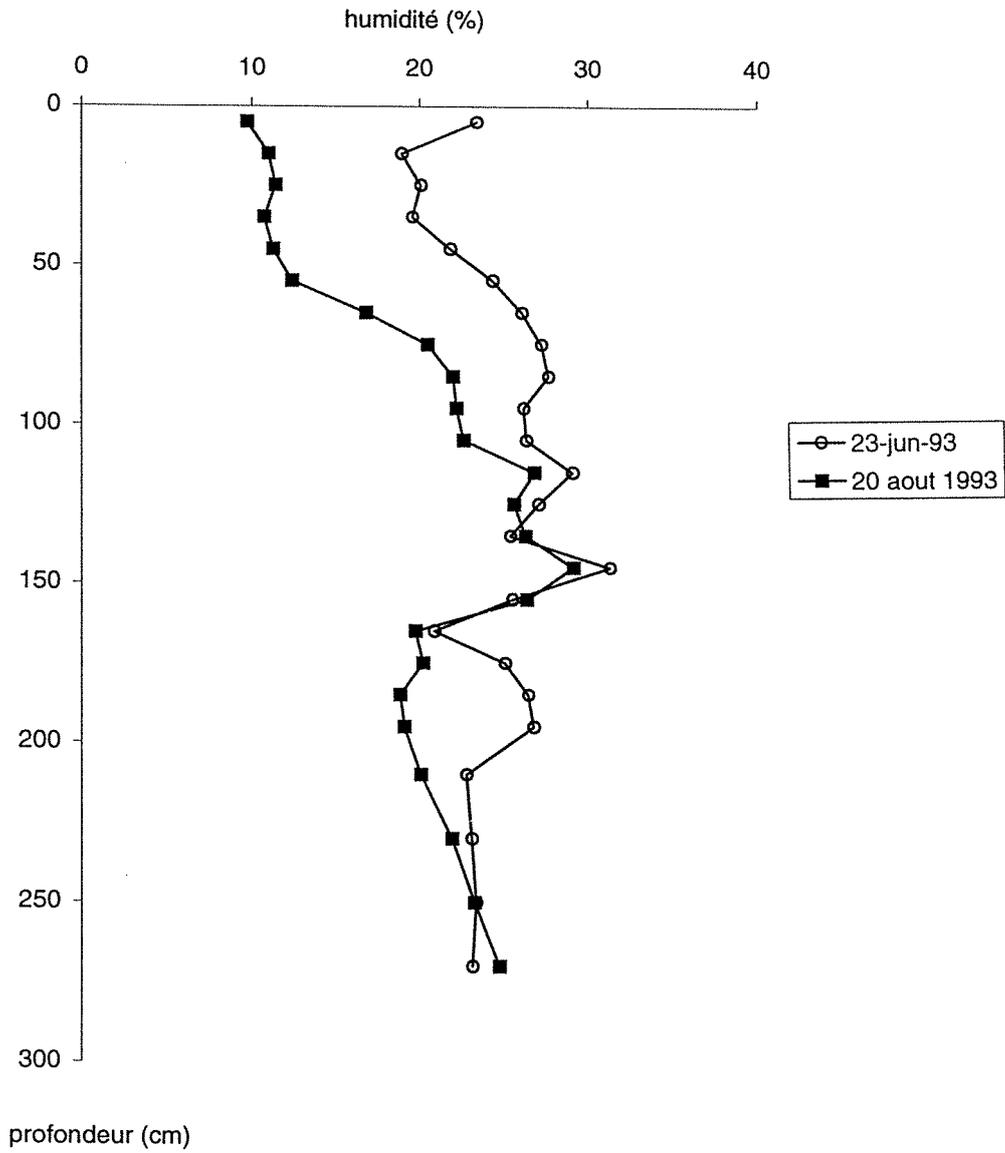


Assainissement du sol par
 drainage ancien (1862)
 (poteries obstruées)

DIAGRAMME DES TEXTURES



profil hydrique- sol de Cîteaux



- ANNEXE 3 -

**Caractéristiques techniques et analytiques
du chromatographe en phase gazeuse "Girdel 30"**

Caractéristiques techniques		Caractéristiques analytiques	
Gaz vecteur	Hélium U	Gaz analysés	N ₂ O - CO ₂ - Kr - C ₂ H ₂
Colonne longueur support	6 m Porapak Q - 100-120 mesh	Seuil de détection	N ₂ O : 500 vpm autres gaz : 100 vpm
Détecteur nature température	catharomètre 50° C	Sensibilité	100 vpm
Four température	60° C	Linéarité	excellente
Injecteur température	110 °C		

ANNEXE 4 :
-Composition des milieux-

1- Dénombrement de la microflore totale.

milieu NA (Difco, Michigan, USA) (g) :

Nutrient Agar (NA).....23
Eau déminéralisée..... 1000 ml.

milieu TSA (Difco, Michigan, USA) (g) :

Tryptic Soy Agar (TSA)23
Eau déminéralisée..... 1000 ml.

milieu ESA (Extrait de sol Agar) (g) :

milieu ES (C organique soluble: 108 mgC.l⁻¹) 1000 ml.
Agar 15

milieu NA 1/40 (même teneur en C organique soluble que le milieu ES) (g) :

Nutrient Agar (NA).....0,375
Agar 15
Eau déminéralisée..... 1000 ml.

2- Dénombrement des bactéries aérobies

milieu LPGA (g) :

Glucose..... 10
Peptone.....5
Extrait de Levure5
Eau déminéralisée..... 1000 ml.

milieu NA 1/40 (même teneur en C organique soluble que le milieu ES) (g) :

Nutrient Agar (NA).....0,375
Agar 15
Eau déminéralisée..... 1000 ml.

Après autoclavage des milieux à 120°C pendant 20 minutes et refroidissement jusqu'à 60°C, l'Actidione est ajouté au milieu à raison de 0,05 gl⁻¹ dissout dans l'éthanol.

3- Dénombrement des champignons

milieu Malt acide (g) :

Malt 10
Agar 15
Eau déminéralisée..... 1000 ml.

Après autoclavage du milieu à 120°C pendant 20 minutes et refroidissement à 60°C, le milieu est acidifié avec de l'acide citrique en poudre (250 mg l⁻¹).

4- Dénombrement des bactéries anaérobies

milieu YPG (g) (Molongoski et Klug, 1976) :

Glucose.....	10
Peptone.....	10
Extrait de levure	10
Solution saline.....	1000 ml.

Composition de la solution saline (g) :

K ₂ HPO ₄	0,56
KH ₂ PO ₄	0,33
Na ₂ CO ₃	0,22
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,11
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,22
NaCl.....	0,53
FeCl ₃	0,005
Eau déminéralisée.....	1000 ml.

Solution stock de rézaurine (LABOSI) 0,1% :

0,25 g de rézaurine (sous forme de sels) sont dissous dans 250 ml d'eau déminéralisée. La solution est stérilisée par filtration à l'aide d'une seringue pourvue d'un filtre Millipore 0,22 mm, dans une fiole à plasma, sous un courant d'azote gazeux. La fiole est ensuite bouchée puis scellée.

Solution stock de cystéine-HCl (LABOSI) 1% :

2,5 g de cystéine-HCl sont dissous dans 250 ml d'eau déminéralisée et stérilisés comme précédemment.

Milieu de dilution des suspensions de sol (g) :

K ₂ HPO ₄	6,50
KH ₂ PO ₄	3,50
NaCl.....	1,00
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,05
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50
Eau déminéralisée.....	1000 ml.

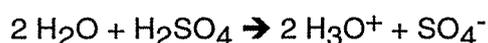
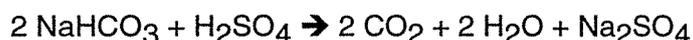
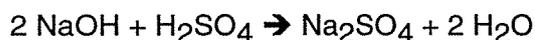
- ANNEXE 5 -

Dosage du CO₂ total avec l'autoanalyseur à flux continu.

Le gaz carbonique total est piégé dans une solution d'hydroxyde de sodium puis dosé à l'aide d'un autoanalyseur à flux continu.

Le dosage s'effectue en 2 temps :

① - Libération du CO_2 fixé par acidification du milieu par l'acide sulfurique. Les réactions de neutralisation sont les suivantes :

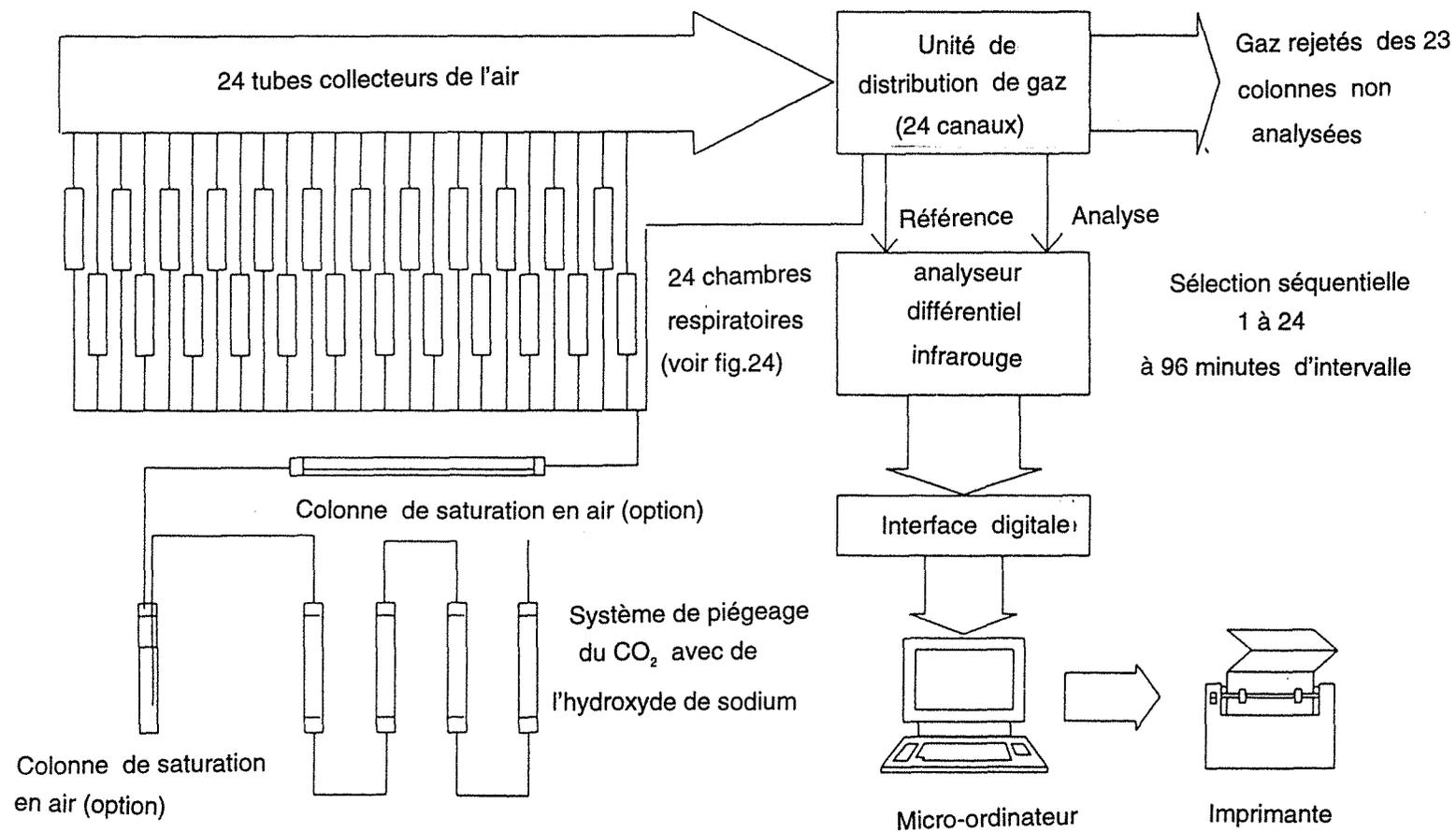


② - Le CO_2 ainsi dégagé est repris par diffusion dans un réactif tamponné carbonate-bicarbonate coloré par la phénolphtaléine ($\text{pH} = 8,6$). L'acidification du milieu due au CO_2 se traduit par une diminution de la couleur rose de l'indicateur coloré et se fait de la façon suivante :

$\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$ (l'équilibre de la réaction est déplacé vers la droite par diffusion du gaz carbonique).

Une cuve colorimétrique incorporée à l'autoanalyseur enregistre et traduit par une courbe les variations de la densité optique à 420 nm de l'échantillon liquide analysé. Le passage de l'échantillon provoque la réaction colorée qui se traduit par un pic à l'enregistrement dont la hauteur est proportionnelle à la densité optique. La comparaison des hauteurs des pics de la gamme étalon (solution de carbonate de sodium) et des échantillons permet le calcul de la concentration en C- CO_2 total dégagé lors de l'incubation.

Annexe 6 :
- Analyseur infra-rouge et Systeme respiratoire -



**- REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES -**

- Aelion C.M., Swindoll C.M., Pfaender F.K. 1987. Adaptation to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a pristine aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2212-2217
- Albrechtsen H.J., Winding A. 1992. Microbial biomass ; activity in subsurface sediments from Vejen, Denmark. *Microb. Ecol.*, 23, 303-317
- Alexander M. 1982. Most probable number method for microbial populations. *Methods of soil analysis Part 2 : chemical and microbiological properties.*, Agronomy monograph n°9 ASA-SSSA, Madison.p 815-820.
- Alexander M., 1977. *Introduction to soil microbiology*. 2nd edition. Ed. Wiley J. et sons N.Y.
- Anderson T.H., Gray T.R.G., 1990. Soil microbial carbon uptake characteristics in relation to soil management. *FEMS Microb. Ecol.*, 74, 11-20
- Anderson J.P.E., Domsch K.H. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10, 215-221.
- Anderson J.P.E. 1993. Annual report of E.E.C. STEP program
- Anderson T.H., Domsch K.H. 1993. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 393-395.
- Angle J.S., Mc Grath S.P., Chaney R.L., 1991. New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations founds in the soil solution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3674-3676.
- Azam F., Hodson R.E., 1981. Multiphasic kinetics for D-glucose uptake by assemblage of natural marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 6, 213-222.
- Balkwill D.L., 1989. Numbers, diversity and morphological characteristics of aerobic, chemoheterotrophic bacteria in deep subsurface sediments from a site in South Carolina. *Geomicrobiol.J*, 7, 33-52.
- Balkwill D.L., Ghiorse W.C., 1985. Characterization of subsurface bacteria associated with 2 shallow aquifers in Oklahoma. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 580-588.
- Balkwill D.L., Leach F.R., Wilson J.T., Mc Nabb J.F., White D.C., 1988. Equivalence of microbial biomass measures based on membrane lipid and cell wall components, adenosine triphosphate, and direct counts in subsurface aquifer sediments. *Microb. Ecol.*, 16, 73-84.
- Balkwill D.L., Fredrickson J.K., Thomas J.M., 1989. Vertical and horizontal variations in the physiological diversity of the aerobic chemoheterotrophic bacteria microflora in deep southeast coastal plain subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1058-1065.
- Beloin R.M., Sinclair J.L., Ghiorse W.C., 1988. Distribution and activity of microorganisms in subsurface sediments of a pristine study site in Oklahoma. *Microb. Ecol.*, 16, 85-97.

- Bitton G., Gerba C.P., 1984. Groundwater pollution microbiology : the emerging issue. In " Groundwater pollution microbiology ". Ed. Bitton G., Gerba C.P. , Wiley J. and sons N.Y., 1-7.
- Bolton H., Li S.W., Workman D.S., Girvin D.C., 1993. Biodegradation of synthetic chelates in subsurface sediments from the Southeast coastal plain. *J. Environ. Qual.*, 22, 125-132.
- Bone T.L., Balkwill D.L., 1986. Improved flotation technique for microscopy of in situ soil sediment microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 462-468.
- Bone T.L., Balkwill D.L., 1988. Morphological and cultural comparison of microorganisms in surface soil and subsurface sediments at a pristine study site in Oklahoma. *Microb. Ecol.*, 16, 49-64.
- Bouwer H., 1984. Elements of soil science and groundwater hydrology. In "Groundwater pollution microbiology". Ed. Bitton G. and Gerba C.P., Wiley J. and sons, 9-38.
- Bremer E., van Kessel C., 1990. Extractability of microbial ^{14}C and ^{15}N following addition of variable rates of labelled glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to soil. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 703-713.
- Brockman F.J., Kieft T.L., Fredrickson J.K., Bjornstad B.N., Li S.W., Spangenburg W., Long P.E., 1992. Microbiology of vadose paleosols in South-Central Washington state. *Microb. Ecol.*, 23, 279-301.
- Campbell A.T., Nicholls P.H. and Bromilow R.H., 1991. Factors influencing rates of degradation of an arylamide in subsoils. *Pesticides in soils and water*, 47, 155-161.
- Chaussod R., Nicolardot B., 1982. Mesure de la biomasse microbienne dans les sols cultivés. I. Approche cinétique et estimation simplifiée du carbone facilement minéralisable. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 19, 501-512.
- Chesbro W., Arbige M., Eifert R., 1990. When nutrient limitation places bacteria in the domains of slow growth : metabolic, morphologic and cell cycle behavior. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 74, 103-120.
- Choquet C.G., Ferroni G.D., Leduc L.G., 1987. A different approach to generating the data for parameter estimation with the heterotrophic activity method. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45, 59-64.
- Colwell F.S., 1989. Microbiological comparison of surface soil and unsaturated subsurface soil from a semi arid high desert. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2420-2423.
- Dobbins D.C., Pfaender F.R., 1988. Methodology for assessing respiration and cellular incorporation of radiolabeled substrates by soil microbial communities. *Microb. Ecol.*, 15, 257-273.
- Dobbins D.C., Thornton-Manning J.R., Jones D.D., Federle T.W., 1987. Mineralization potential for phenol in subsurface soils. *J. Environ. Qual.*, 16, 54-58.

- Domsch K.H., Beck T., Anderson J.P.E., Soderström B., Parkinson D., Trolldenier G., 1979. A comparison of methods for soil microbial population and biomass studies. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* 142, 520-533.
- Faulkner S.P., Patrick W.H., J.R., Gambrell R.P. 1989. Field techniques for measuring Wetland soil parameters. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 53, 883-890.
- Federle T.W., 1988. Mineralization of monosubstituted aromatic compounds in unsaturated and saturated subsurface soils. *Can. J. Microbio.*, 34, 1037-1042.
- Federle T.W., Dobbins D.C., Thornton-Manning J.R., Jones D.D., 1986. Microbial biomass, activity, and community structure in subsurface soils. *Ground Water*. 24, 365-374.
- Federle T.W., Ventullo R.M., White D.C., 1990. Spatial distribution of microbial biomass, activity, community structure, and the biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and linear alcohol ethoxylate (LAE) in the subsurface. *Microb. Ecol.*, 20, 297-313
- Ferroni G.D., Leduc L.G., Choquet C.G., 1983. Preliminary studies on the use of the heterotrophic activity method to evaluate acid-stress effects in aquatic environments. *Water Res.*, 17, 1379-1384.
- Ferroni G.D., Leduc L.G., Winterhalder E.K., 1985. The measurement of mineralization activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 727-728.
- Fondeur J.M., 1980. Dégradation de l'atrazine en présence de différents substrats organiques. Mémoire de fin d'études de l'ESITPA.
- Fournier J.C., 1989. Aspects du comportement de la microflore dégradant les produits phytosanitaires dans le sol. Thèse Université de Perpignan
- Fredrickson J.K., Balkwill D.L., Zachara J.M., Li S.W.W., Brockman F.J., Simmons M.A., 1991. Physiological diversity and distributions of heterotrophic bacteria in deep Cretaceous sediments of the Atlantic Coastal plain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 402-411.
- Fredrickson J.K., Garland T.R., Hicks R.J., Thomas J.M., Li S.W., Mc Fadden K.M., 1989. Lithotrophic and heterotrophic bacteria in deep subsurface sediments and their relation to sediments properties. *Geomicrobiol. J.*, 7, 53-66.
- Fredrickson J.K., Hicks R.J., Li S.W.W., Brockman F.J., 1988. Plasmid incidence in bacteria from deep subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2916-2923.
- Gams W., Domsch K.H., 1967. Beiträge zur anwendung der boden waschtenich für die isolierung von bodenpilze. *Archive für Mikrobiologie*, 58, 134-144.
- Gehron M.J., Davis J.D., Smith G.A., White D.C., 1984. Determination of the gram-positive content of soils and sediments by analysis of teichoic acid components. *J. Microbiol. methods.*, 2, 165-176.
- Ghiorse W.C., Balkwill D.L., 1983. Enumeration and morphological characterization of bacteria indigenous to subsurface environments. *Dev. Ind. Microbiol.* 24, 213-224.

- Ghiorse W.C., Wilson J.T., 1988. Microbial ecology of the terrestrial subsurface. *Adv. Appl. Microbiol.*, 33, 107-172.
- Ghiorse W.C., Balkwill D.L., 1985. Microbiological characterization of subsurface environments. In "Ground water quality". Ed. Wards C.H., Giger W., Mc Carty P.L., 387-401.
- Gottschal J.C., 1985. Some reflections on microbial competitiveness among heterotrophic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 51, 473.
- Harkin J.M., Jones F.A., Fathulla R.N., Dzantor E.H., Kroll D.G., 1986. Fate of aldicar in Wisconsin ground water. In "Evaluation of pesticides in ground water". Ed. Garner W.Y., Honeycutt R.C., Nigg H.N. ACS Symp. Ser., 315, 219-255.
- Harper S.S., Moorman T.B., Locke M.A., 1990. Pesticide biodegradation in the subsurface terrestrial environment and impact on groundwater pollution. *Dev. Ind. Microbiol.* 31, 65-73.
- Hazen T.C., Jimenez L., 1988. Enumeration and identification of bacteria from environmental samples using nucleic acid probes. *Microbiol. Sci. J.*, 5, 340-343.
- Hazen T.C., Jimenez L., Lopez de Victoria G., Fliermans C.B., 1991. Comparison of bacteria from deep subsurface sediment and adjacent groundwater. *Microb. Ecol.*, 22, 293-304.
- Helweg A., 1992. Degradation of pesticides in subsurface soil. In "Proceedings of the international symposium on environmental aspects of pesticide microbiology". Ed. Anderson J.P.E., Arnold D.J., Lewis F., Torstensson L. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala., 249-265.
- Hicks R.J., Fredrickson J.K., 1989. Aerobic metabolic potential of microbial populations indigenous to deep subsurface environments. *Geomicrobiol. J.*, 7, 67-77.
- Hirsch P., Rades-Rohkohl E., 1983. Microbial diversity in a groundwater aquifer in Northern Germany. *Dev. Ind. Microbiol.*, 24, 183-200.
- Hungate R.E., 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In "Method in microbiology", vol 3B. Ed. Norris J.R., Ribbons D.W. Academic Press, London N.Y., 117-132.
- Jenkinson D.S., 1966. Studies on the decomposition of plant material in soil. II-Partial sterilization of soil and the soil biomass. *J. Soil Sci.*, 17, 280-302.
- Jenkinson D.S., 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. IV-The decomposition of fumigated organisms in soil. *Soil Biol. Biochem*, 8, 203-208.
- Jenkinson D.S., Powlson D.S., 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V-A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem*, 8, 209-213.
- Jimenez L., 1990. Molecular analysis of deep-subsurface bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2108-2113.

- Joergensen R.G., Brookes P.C., Jenkinson D.S., 1989. Some relationships between microbial ATP and soil biomass measured by the fumigation-extraction procedure and soil organic matter. *Mitteilungen der deutschen bodenkundlichen gesellschaft*, 59, 585-588.
- Jones R.L., Hansen J.L., Romine R.R., Marquardt T.E., 1986. Unsaturated zone studies of the degradation and movement of aldicarb and aldoxycarb residues. *Environ. Tox. Chem.*, 5, 361-372.
- Jones R.L., Hunt T.W., Norris F.A., Harden C.F., 1989. Field research studies on the movement and degradation of thiodicarb and its metabolite methomyl. *J. Contam. Hydrol.*, 4, 359-371.
- Kaiser J.P., Bollag J.M., 1990. Microbial activity in the terrestrial subsurface. *Experientia*. 46, 797-806.
- Kaspar H.F., Tiedje J.M., 1982. Anaerobic bacteria and processes. In "Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Agronomy Monograph n°9 (2nd édition), 989-1009.
- Kaufman D.D., Kerney P.C., 1970. Microbial degradation of s-triazine herbicides. *Residue Reviews*, 32, 235-265.
- Köbel-Boelke J., Tienken B., Nehr Korn A., 1988. Microbial communities in the saturated groundwater environment I : methods of isolation and characterization of heterotrophic bacteria. *Microb. Ecol.* 16, 17-29.
- Konopka A., Turco R., 1991. Biodegradation of organic compounds in vadose zone and aquifer sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2260-2268.
- Kuznetsov S.I., Dubinina G.A., Lapteva N.A., 1979. Biology of oligotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 33, 377-387.
- Larson R.J., 1984. Kinetic and ecological approaches for predicting biodegradation rates of xenobiotic organic chemicals in natural ecosystems. In "Current perspectives in microbial ecology". Ed Klug M.J. and Reddy C.A., A.S.M., 677-686.
- Latham M.J., Wolin M.J., 1978. Use of a serum bottle technique to study interactions between strict anaerobes in mixed culture. In "Techniques for the study of mixed populations". Ed. Lovelock D.W., Davies R. Academic Press ., 113-124.
- Lavy T.L., Roeth F.W., Fenster C.R., 1973. Degradation of 2,4-D and atrazine at three soil depths in the field. *J. Environ. Qual.*, 2, 132-137.
- Leach F.R., 1984. Biochemical indicators of groundwater pollution. In " Groundwater pollution microbiology ".Ed. Bitton G., Gerba C.P. , Wiley J. and sons N.Y., 303-351.
- Leduc L.G., Ferroni G.D., 1984. Glucose mineralization activity and the use of the heterotrophic activity method in an acidified lake. *Water Res.*, 18, 609-612.

Lewis D.L., Hodson R.E., Freeman III L.F., 1985. Multiphasic kinetics for transformation of methyl parathion by *flavobacterium* species. Appl. Environ. Microbiol. 50, 553-557.

Lewis D.L., Hodson R.E., Hwang H.M., 1988. Kinetics of mixed microbial assemblages enhance removal of highly dilute organic substrates. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2054-2057.

Lewis K.J., Lewis F.J., Takagi K., Anderson J.P.E., Dictor M.C., Soulas G., 1992. Microbial diversity and activity of subsoil : characterisation of microflora from the unsaturated zone. In "Proceedings of the international symposium on environmental aspects of pesticide microbiology". Ed. Anderson J.P.E., Arnold D.J., Lewis F., Torstensson L. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 278-283.

Madsen E.L., Bollag J.M., 1989. Aerobic and anaerobic activity in deep subsurface sediments from the Savannah River Plant. Geomicrobiol. J, 7, 93-101.

Madsen E.L., Winding A., Malachowsky K., Thomas C.T., Ghiorse W.C., 1992. Contrasts between subsurface microbial communities and their metabolic adaptation to polycyclic aromatic hydrocarbons at a forested and an urban coal-tar disposal site. Microb. Ecol., 24, 199-213.

Marden P., Nyström T., Klülleberg S., 1987. Uptake of leucine by a marine gram-negative heterotrophic bacterium during exposure to starvation conditions. FEMS Microbiol. Ecol., 45, 233-241.

Mc Mahon P.B, Chapelle F.H., Jagucki M.L., 1992. Atrazine mineralization potential of alluvial-aquifer sediments under aerobic conditions. Environ. Sci. Technol., 26, 1556-1559.

Mc Nabb J.F., Dunlap W.J., 1975. Subsurface biological activity in relation to ground-water pollution. Ground Water, 13, 33-44.

Mc Nabb J.F., Mallard G.E., 1984. Microbiological sampling in the assessment of groundwater pollution. In "Groundwater pollution microbiology". Ed. Bitton G., Gerba C.P., Wiley J. and sons, N.Y., 235-260.

Miles C.J., Delfino J.J. ,1985. Fate of aldicarb, aldicarb sulfoxide, and aldicarb sulfone in Floridan groundwater.,J. Agric. Food Chem., 33, 455-460.

Miller, T.L., Wolin M.J., 1974. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. Appl. Microbiol., 27, 985-987.

Molongoski J.J., Klug M.J., 1976. Characterization of anaerobic heterotrophic bacteria isolated from freshwater lake sediments. Appl. Environ. Microbiol., 31, 83-90.

Moorman T.B., Harper S.S., 1989. Transformation and mineralization of metribuzin in surface and subsurface horizons of a Mississippi Delta soil. J. Environ. Qual., 18, 302-306.

Moreale, A., van Bladel R., 1980. Behavior of 2,4-D in Belgian soils. J. Environ. Qual., 9, 627-633.

Nicolardot B, Chaussod R., Catroux G., 1984. Décomposition de corps microbiens dans les sols fumigés au chloroforme : effets du type de sol et de microorganisme. *Soil Biol. Biochem.*, 16, 453-458.

Novick N.J., Mukherjee R., Alexander M., 1986. Metabolism of alachlor and propachlor in suspensions of pretreated soils and in samples from ground water aquifers. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 721-725.

Olsen R.A., Bakken L.R., 1987. Viability of soil bacteria : optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microb. Ecol.*, 13, 59-74

Ou L.T., Edvardsson K.S.V., Rao P.S.C., 1985. Aerobic and anaerobic degradation of aldicarb in soils. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 72-78.

Ou L.T., Rao P.S.C., Edvardsson K.S.V., Jessup R.E., Hornsby A.G., 1988. Aldicarb degradation in sandy soils from different depths. *Pestic. Sci.*, 23, 1-12

Panikov N.S., Blagodatsky S.A., Blagodatskaya J.V., Glagolev M.V., 1992. Determination of microbial mineralization activity in soil by modified Wright and Hobbie method. *Biol. Fertil. Soils.*, 14, 280-287.

Parsons T.R., Strickland J.D., 1962. On the production of particulate organic carbon by heterotrophic processes in sea water. *Deep-sea Res.* 8, 211-222.

Patrick W.H., 1977. Oxygen content of soil air by a field method. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 41, 651-652.

Paul E.A., Clark F.E., 1989a. Chap.5 : Occurrence and distribution of soil organisms. In "Soil microbiology and Biochemistry". Ed. Paul E.A., Clark F.E. (Academic Press, Inc.) p 74-90.

Paul E.A., Clark F.E., 1989b. Chap.2 : Soil as a habitat for organisms and their reactions. In "Soil microbiology and Biochemistry". Ed. Paul E.A., Clark F.E. (Academic Press, Inc.)

Paul E.A., Clark F.E., 1989c. Chap.3 : Methods for studying soil organisms. In "Soil microbiology and Biochemistry". Ed. Paul E.A., Clark F.E. (Academic Press, Inc.) p 32-48.

Pfaender F. K., Bartholomew G.W., 1982. Measurement of aquatic biodegradation rates by determining heterotrophic uptake of radiolabeled pollutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 159-164.

Phelps T.J., Hedrick D.B., Ringelberg, D., Fliermans, C.B., White D.L.. 1989. Utility of radiotracer activity measurements for subsurface microbiology studies. *J. Microb. Methods.* 9, 15-27.

Phelps T.J., Fliermans C.B., Garland, T.R., Piiffner S.M., White D.L., 1989. Methods for recovery of deep terrestrial subsurface sediments for microbiological studies. *J. Microb. Methods.*, 9, 267-279

- Poindexter J.S., 1981. Oligotrophy : fast and famine existence. *Adv. Microbiol. Ecol*, 5, 63-89.
- Pothuluri J.V., Moorman T.B., Obenhuber D.C., Wauchope R.D., 1990. Aerobic and anaerobic degradation of alachlor in samples from a surface to groundwater profile. *J. Environ. Qual.*, 19, 525-530.
- Reaney D.C., Gowland P.C., Slater H., 1983. Genetic interactions among microbial communities. In "Microbes in their natural environments". Ed. Slater J.H., Whittenburg R., Winpenny J.W.T. (Society for general microbiology Cambridge University Press.)
- Ross D.J., 1990. Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method : influence of seasons, soils and calibration with the fumigation-incubation procedure. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 295-300.
- Ross D.J., 1991. Microbial biomass in a stored soil : a comparison of different estimation procedures. *Soil Biol. Biochem.*, 23, 1005-1007.
- Sargent K.A., Fliermans C.B., 1989. Geology and hydrology of the deep subsurface microbiology sampling site at Savannah River Plant, south Carolina. *Geomicrobiol. J*, 7, 3-13.
- Schmidt S.K., Gier M.J., 1990. Coexisting bacterial populations responsible for multiphasic mineralization kinetics in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2692-2697.
- Semenov A.M., 1991. Physiological bases of oligotrophy of microorganisms and the concept of microbial community. *Microb. Ecol.*, 22, 239-247
- Shanker R., Kaiser J.P., Bollag J.M., 1991. Microbial transformation of heterocyclic molecules in deep subsurface sediments. *Microb. Ecol.*, 22, 305-316.
- Sinclair J.L., Ghiorse W.C., 1987. Distribution of protozoa in subsurface sediments of a pristine groundwater study site in Oklahoma. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1157-1163.
- Sinclair J.L., Ghiorse W.C., 1989. Distribution of aerobic bacteria, protozoa, algae and fungi in deep subsurface sediments. *Geomicrobiol. J.*, 7, 15-31.
- Skipper H.D., Gilmour C.M., Furtick W.R., 1967. Microbial versus chemical degradation of atrazine in soils. *Proc. Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 31, 653-656.
- Smelt J.H., Leistra M., Houx N.W.H., Dekker A., 1978a. Conversion rates of aldicarb and its oxidation products in soils. I. Aldicarb sulphone. *Pestic. Sci.*, 9, 279-285.
- Smelt J.H., Leistra M., Houx N.W.H., Dekker A., 1978b. Conversion rates of aldicarb and its oxidation products in soils. II. Aldicarb sulphoxide. *Pestic. Sci.*, 9, 286-292.
- Smelt J.H., Dekker A., Leistra M., Houx N.W.H., 1983. Conversion of four carbamoyloximes in soil samples from above and below the soil water table. *Pestic. Sci.*, 14, 173-181.
- Smith G.A., Nichels J.S., Kerger B.D., Davis J.D., Collins S.P., Wilson J.T., Mc Nabb J.F., White D.C., 1986. Quantitative characterization of microbial biomass and community structure in

subsurface material : a prokaryotic consortium responsive to organic contamination. *Can. J. Microbiol.*, 32, 104-111.

Smith C.J., 1990. Hydrogeology with respect to underground contamination. In "Environmental fate of pesticides". Ed. Hutson D.H., Roberts T.R., Wiley J. and sons, 47-99.

Soulas G., 1990. Dégradation biologique d'un herbicide l'acide 2,4 dichloroph noxyac tique (2,4-D) dans le sol: aspects cinétiques. Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine. ENSAIA Nancy.

Spain J.C., Pritchard P.H., Bourquin A.W., 1980. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediments, water cores from estuarine and freshwater environments. *Appl. Environ. Micro.*, 40, 726-734.

Sparling G.P., 1981. Microcalorimetry and other methods to asses biomass and activity in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 13, 93-98.

Sparling G.P., Feltham C.W., Reynolds J., West A.W., Singleton P., 1990. Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method : use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the K_{EC} -factor. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 301-307.

Sparling G.P., West A.W., 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial C : calibration "in situ" using microbial respiration and ^{14}C labelled cells. *Soil Biol. Biochem.*, 20, 337-348.

Subba-Rao R.V., Alexander M., 1982. Effect of sorption on mineralization of low concentrations of aromatic compounds in lake water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 659-668.

Swindoll C.M., Aelion C.M., Dobbins D.C., Jiang U., Long S.C., Pfaender F.K., 1988. Aerobic biodegradation of natural and xenobiotic organic compounds by subsurface microbial communities. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7, 291-299.

Swindoll C.M., Aelion C.M., Pfaender F.K., 1988. Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 212-217.

Takagi K., Anderson J.P.E., Dictor M.C., Soulas G., Lewis K.J., Lewis F.J., 1992. Microbial diversity and activity in subsoils : methods, field sites, seasonal variations in subsoil temperatures and oxygen. In "Proceedings of the international symposium on environmental aspects of pesticide microbiology". Ed. Anderson J.P.E., Arnold D.J., Lewis F., Torstensson L. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 270-277.

Tate K.R., Ross D.J., Feltham C.W., 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial C : effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biol. Biochem.*, 20, 329-335.

Tempest D.W., Neijssel O.M., 1978. Eco-physiological aspects of microbial growth in aerobic nutrient-limited environments. In "Advances in microbial ecology". Vol.2. Ed. Alexander M., Phenum Press N.Y., 105-153.

- Thorn P.M., Ventullo R.M., 1988. Measurement of bacterial growth rates in subsurface sediments using the incorporation of tritiated thymidine into D.N.A. *Microbio. Ecol.*, 16, 3-16.
- Thurman E.M., 1984. Organic carbon in natural waters : amount origin and classification. In "Organic geochemistry of natural waters". Ed. Nijhoff M., Junk W., 5-66.
- Thorstenson D.C., Weeks E.P., Haas H., Fisher D.W. 1983. Distribution of gaseous $^{12}\text{CO}_2$, $^{13}\text{CO}_2$ and $^{14}\text{CO}_2$ in the subsoil unsaturated zone of the western U.S. great plains. *Radiocarbon*, 25, 315-346.
- Torstensson N.T.L., 1987. Microbial decomposition of herbicides in soil. In "Herbicides". Ed. Hutson D.H., Roberts T.R., Wiley J. and sons Ltd, 249-270.
- Trolldenier G., 1973. The use of fluorescence microscopy for counting soil microorganisms. In "Modern methods in the study of microbial ecology". Ed. Rosswall T. *Bull Ecol. Res. Comm.*, 17, 53-59.
- Van Beelen P., Fleuren-Kemilä A.K., Huys M.P.A., van Montfort A.C.P., van Vlaardingen P.L.A., 1991. The toxic effects of pollutants on the mineralization of acetate in subsoil microcosms. *Environ. Tox. Chem*, 10, 775-789.
- van Veen J.A., Ladd J.N., Amato M., 1985. Turnover of carbon and nitrogen through the microbial biomass in a sandy loam and a clay soil incubated with [$^{14}\text{C}(\text{U})$] glucose and [^{15}N] $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ under different moisture regimes. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 747-756.
- Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S., 1987. Microbial biomass measurements in forest soils : determination of K_C values and tests of hypotheses to explain the failure of the chloroform fumigation-incubation method in acid soils. *Soil Biol. Biochem.*, 19, 689-686.
- Ventullo R.M., Larson R.J., 1985. Metabolic diversity and activity of heterotrophic bacteria in ground water. *Environ. Tox. Chem.*, 4, 759-771.
- Vink J.P.M., Groen K.P., 1992. Mathematical descriptions of accelerated transformation of 1,3 - dichloropropene in soil : a microbiological assessment. *Sci. Tot. Environ.*, 123-224 : 591-603.
- Voroney R.P., Paul E.A., 1984. Determination of K_C and K_H in situ for calibration of the chloroform fumigation-incubation method. *Soil Biol. Biochem*, 16, 9-14.
- Wagner G.H, 1975. Microbial growth and carbon turnover. In "Soil biochemistry" vol.3. Ed. Paul E.A., Mc Laren A.D., Dekker M., N.Y., 269-305.
- Waksman, S.A., 1916. Bacterial numbers in soils at different depths and in different seasons of the year. *Soil Science.*, 1, 363-380.
- Wallis P.M., Ladd T.I., 1983. Organic biogeochemistry of groundwater at a mountain coal mine. *Geomicrobiol. J.*, 3, 49-77.
- Ward, T.E., 1985. Characterizing the aerobic and anaerobic microbial activities in surface and subsurface soils. *Environ. Tox. Chem.* 4, 727-737.

Webster J.J., Hampton G.J., Wilson J.T., Ghiorse W.C., Leach F.R., 1985. Determination of microbial cell numbers in subsurface samples. *Ground Water*, 23, 17-25.

White D.C., 1983. Analysis of microorganisms in terms of quantity and activity in natural environments. In "Microbes in their natural environments". Ed. Slater J.H., Whittenbury R., Winpenny J.W.T., (Society for general microbiology, Cambridge University Press.) p 37-66.

Wilson J.T., Mc Nabb J.F., Balkwill D.L., Ghiorse W.C., 1983. Enumeration and characterization of bacteria indigenous to a shallow water-table aquifer. *Ground water*, 21, 134-142.

Wollum II A.G., 1982. Cultural methods for soils microorganisms. In "Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties". Agronomy Monograph n°9 (2nd édition), 781-802.

Wood B.D., Keller C.K., Johnstone D.L., 1993. In situ measurement of microbial activity and controls on microbial CO₂ production in the unsaturated zone. *Water Resour. Res.*, 29, 647-659.

Wright R.T., 1978. Measurement and significance of specific activity in the heterotrophic bacteria of natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 297-305.

Wright R.T., Hobbie J.E., 1965. The uptake of organic solutes in lake water. *Limnol. Oceanogr.*, 10, 22-28.

Wright R.T., Hobbie J.E., 1966. Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ecology* 47, 447-464.

Wu J., Joergensen R.G., Pommerening B., Chaussod R., Brookes P.C., 1990. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction ; an automated procedure. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 1167-1169.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o o o

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur ANDREUX Francis, Professeur, Université de Dijon,
Monsieur FUSI Paolo, Professeur, Université de Firenze (Italie).**



Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Mademoiselle DICTOR Marie-Christine

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Caractérisation de la distribution et du comportement métabolique de
la microflore indigène dans un profil de sol"**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité : **"SCIENCES AGRONOMIQUES"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDOEUVRE CEDEX

Fait à Vandoeuvre le, **2 Mars 1994**

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIUS



RÉSUMÉ

La distribution de la microflore dans un profil de sol ainsi que son comportement métabolique ont été caractérisés au cours de ce travail. L'installation d'un dispositif expérimental sur une parcelle cultivée de Bourgogne nous a permis de suivre les variations des facteurs physiques comme la température et la teneur en oxygène à différentes profondeurs dans le sol. Les fluctuations saisonnières de ces 2 facteurs permettent une activité microbienne aérobie jusqu'à une profondeur de 5 mètres. Nous avons mis en évidence que la microflore du sous-sol est à prédominance bactérienne. Le nombre de micro-organismes aérobies est de 10^7 g⁻¹sol et décroît à 10^5 - 10^6 g⁻¹sol à partir de 60 centimètres de profondeur puis reste constant au delà. Les mesures d'estimations de la teneur en carbone microbien (estimées par les méthodes biocidales et physiologiques) corroborent le résultat précédent. Nous avons aussi déterminé que le coefficient de conversion du carbone extrait par la méthode de Fumigation-Extraction en carbone microbien, K_{ec} , variait avec la profondeur. Nos résultats montrent l'existence d'une activité microbienne aérobie diversifiée jusqu'à 5 mètres de profondeur. Toutefois, la vitesse de minéralisation des composés organiques (glucose, l'acétate, l'acide benzoïque) diminue avec la profondeur et cette diminution semble être liée à celle de la biomasse microbienne. La diminution de l'activité hétérotrophe de la microflore du sous-sol, à savoir une diminution des paramètres V_m et K_m , met en évidence une adaptation des micro-organismes aux conditions oligotrophes de leur environnement. Les études de dégradation des molécules xénobiotiques telles que le 2,4-D et l'atrazine dans le sous-sol montreraient la nature co-métabolique de la dégradation.