4ème Session : impacts des épandages sur la vie des sols

Structure des communautés microbiennes

Thierry Lebeau (UHA)

Avec la collaboration de V. Edel-Hermann, J. Kuntz, T. Beguiristain, N. Gautheron, P. Leglize, C. Leyval, C.Steinberg, A. Schaub, M. Le Villio-Poitrenaud et S. Houot

Pourquoi étudier la microflore des sols ?

Rôle clé des microorganismes

- ✓ Bactéries : 1,5 t/ha
  Champignons : 3,5 t/ha
- ✓ 1 à 5% MO du sol
- ✓ Protozoaires : 250 t/ha
  Microfaune : 750 t/ha
  Racines : 6000 t/ha

- ✓ Fertilité des sols
- ✓ Devenir de contaminants

Analyse des sols
physico-chimique et **biologique**

Compréhension fine du fonctionnement

(perspective de durabilité des agrosystèmes)

Types d'approches et méthodologies

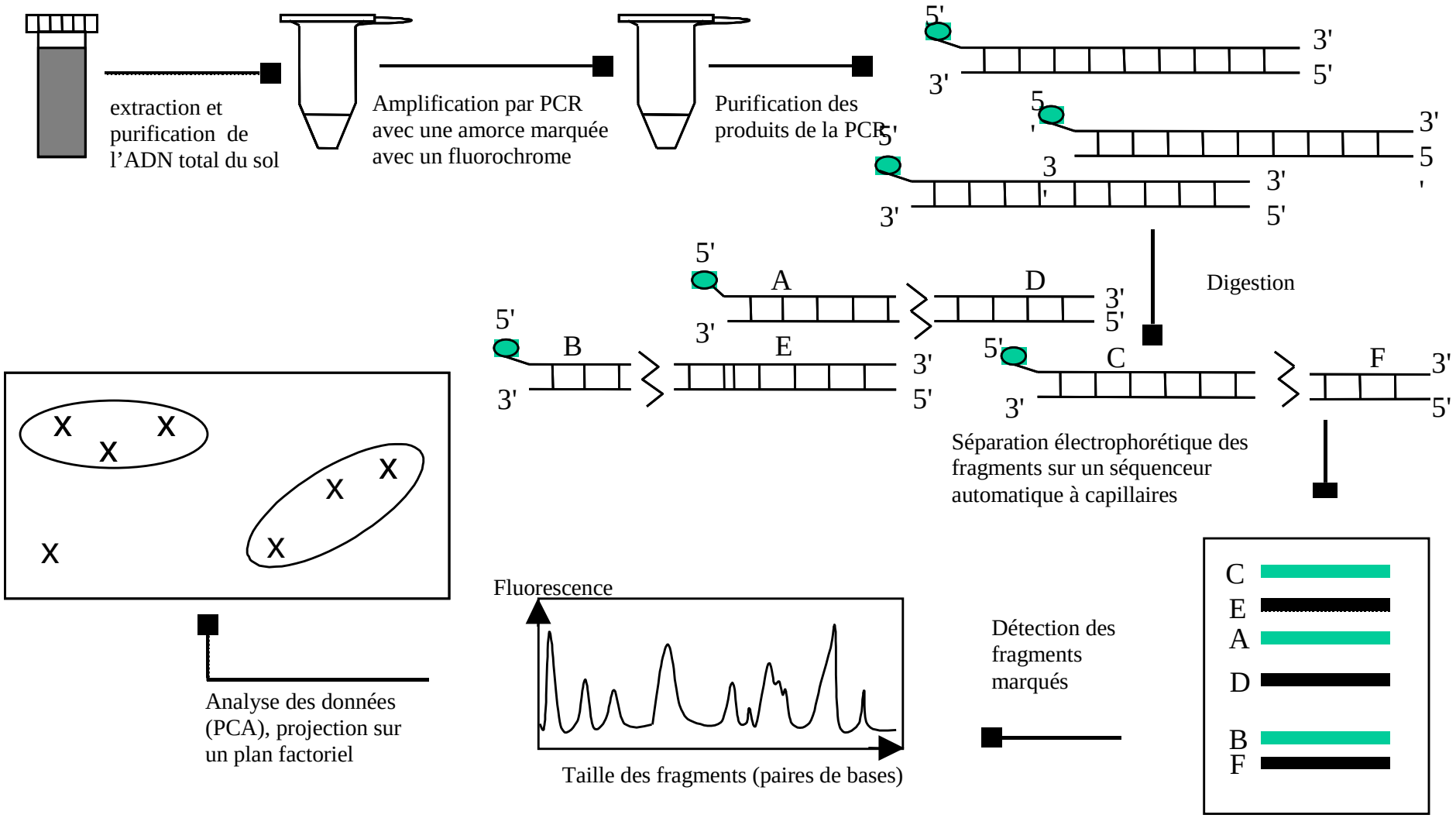
Quantitatives et qualitatives :

- ✓ Approches complémentaires
- ✓ Analyse de la diversité plus révélatrice de l'impact environnemental

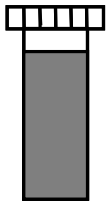
Méthodes :

- ✓ biochimiques
  - *Extraction/culture*
  - *Diversité fonctionnelle potentielle (BIOLOG)*
- ✓ de biologie moléculaire
  - *Microorganismes cultivables ou pas*
  - *Sans PCR (G+C, FISH, puces)*
  - *Avec PCR (RISA, **TTGE**, **T-RFLP**)*

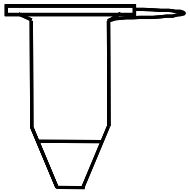
T-RFLP


extraction et purification de l'ADN total du sol
Amplification par PCR avec une amorce marquée avec un fluorochrome
Purification des produits de la PCR
5'
3'
Digestion
A
B
C
D
E
F
Séparation électrophorétique des fragments sur un séquenceur automatique à capillaires
Analyse des données (PCA), projection sur un plan factoriel
Fluorescence
Taille des fragments (paires de bases)
Détection des fragments marqués
C
E
A
D
B
F

TTGE

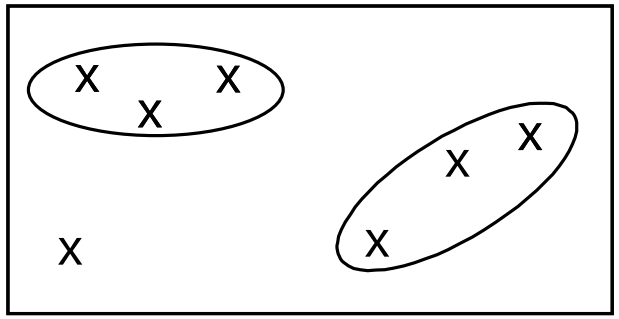


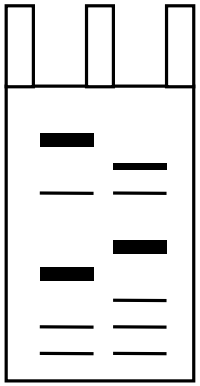
Extraction et purification
de l'ADN total du sol

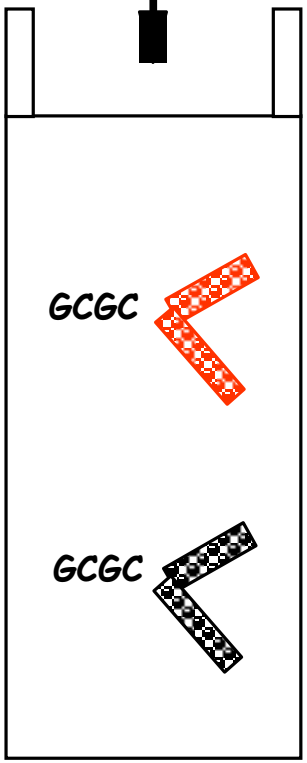


Amplification par PCR
avec une amorce «clampée »
(40-GC en 5 ')

Séparation électrophorectique des
amplicons dans un gel d'acrylamide
soumis à un gradient de température







Analyse des données
(PCA), projection sur
un plan factoriel

Détection et détermination de la
localisation des bandes
d'ADN dans le gel

TTGE & T-RFLP

Avantages :

- ✓ Fiables et reproductibles
- ✓ Rapides (automatisation : **T-RFLP**) & peu coûteuses (**TTGE**)
- ✓ Identification possible par séquençage (**TTGE**) : biodiversité
- ✓ Choix d'amorces en fonction de l'objectif (16S, 18S)

Limites :

- ✓ Biais possibles de PCR
- ✓ Populations dominantes (**TTGE**)
- ✓ Pas d'analyses en routine actuellement
- ✓ Pas de référentiels disponibles actuellement

Prélèvements et mesures

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Feucherolles	Sept 04 Avt 4ème épandage	Nov 04 2 mois après 4ème épandage	Avr 05 7 mois après 4ème épandage	Juin 05 9 mois après 4ème épandage	Oct 05 13 mois après 4ème épandage	Sept 06 24 mois après 4ème épandage	Oct 06 1 mois après 5ème épandage
Mesures	Structure des communautés bactériennes et fongiques par TTGE et T-RFLP						
Ensisheim	Fev 05 11 mois après 5ème épandage	Sept 05 18 mois après 5ème épandage	Avr 06 24 mois après 5ème épandage	Nov 06 27 mois après 5ème épandage			
Mesures	TTGE bactéries	TTGE bactéries, mycorhizes, bactéries nitrifiantes					

<u>Objectif</u> : **Comparer effet traitements et effet temporel sur la structure des communautés microbiennes dans les sols**

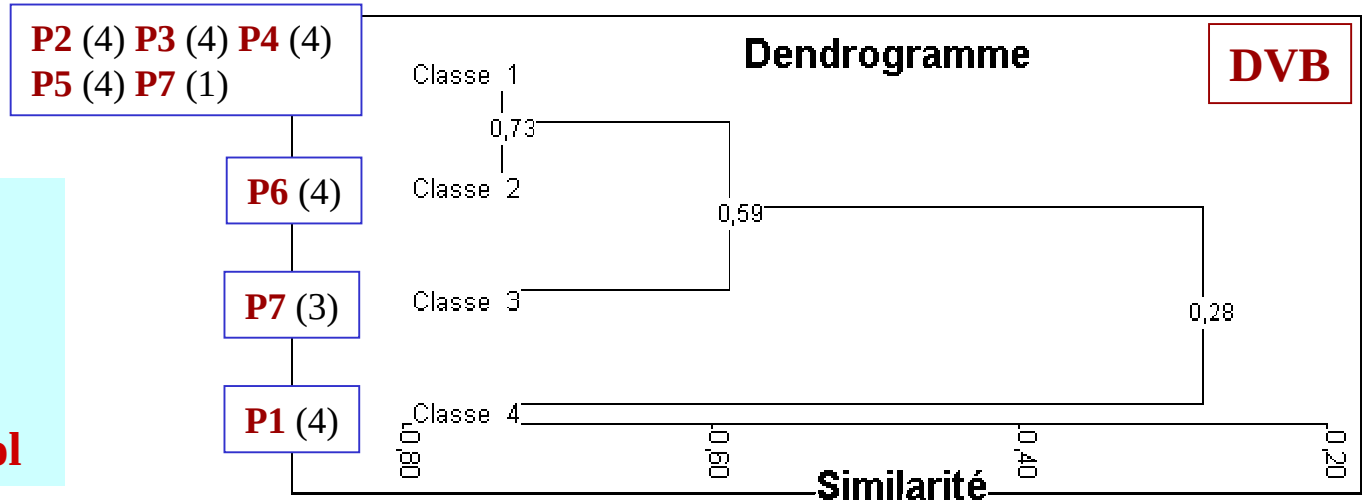
TTGE Feucherolles et Ensisheim

Bactéries, Feucherolles

Par temps de prélèvement :

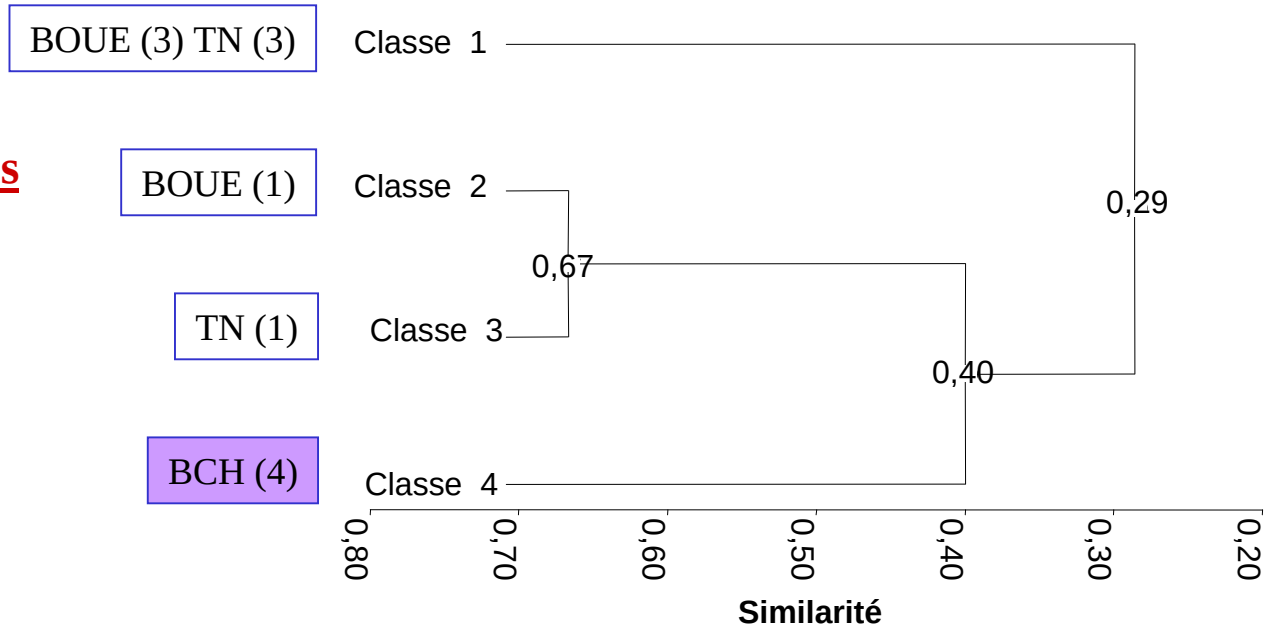
pas d'effet « traitement »	**P1**, **P2** (9&11/04) **P3** (4/2005) **P6** (9/2006)
léger effet DVB	**P4**, **P5** (6&10/05) **P7** (10/2006)

Evolution temporelle de la structure de la communauté bactérienne du sol

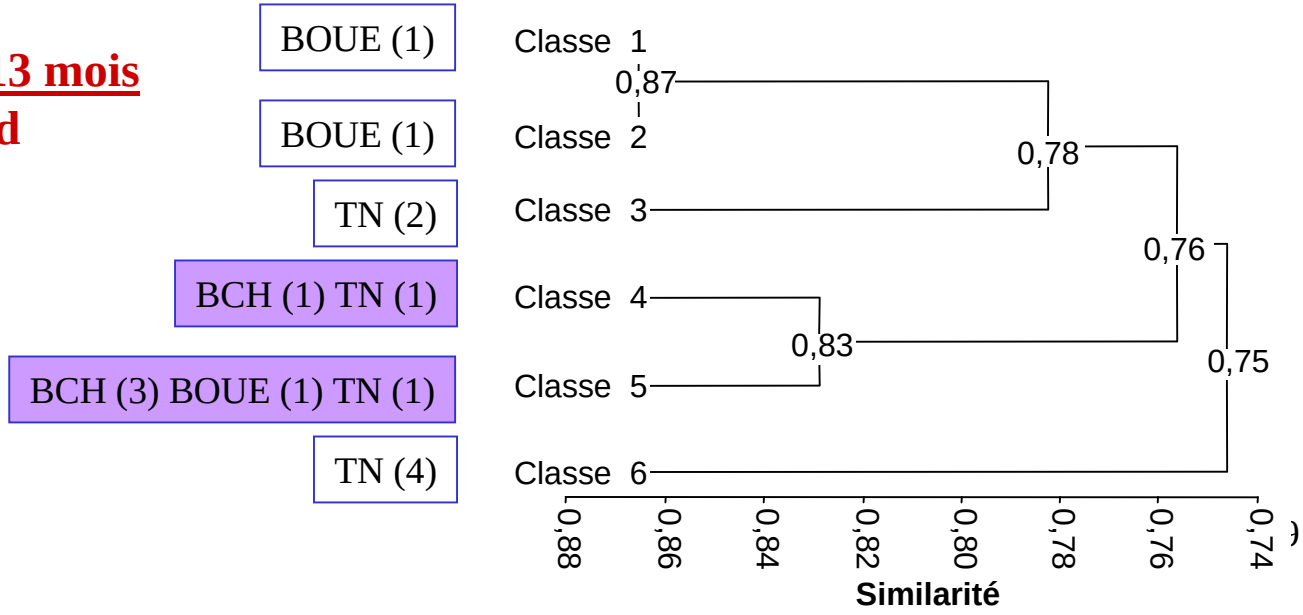


Bactéries, Ensisheim

Effet boue chaulée, 11 mois (P1) après épandage…



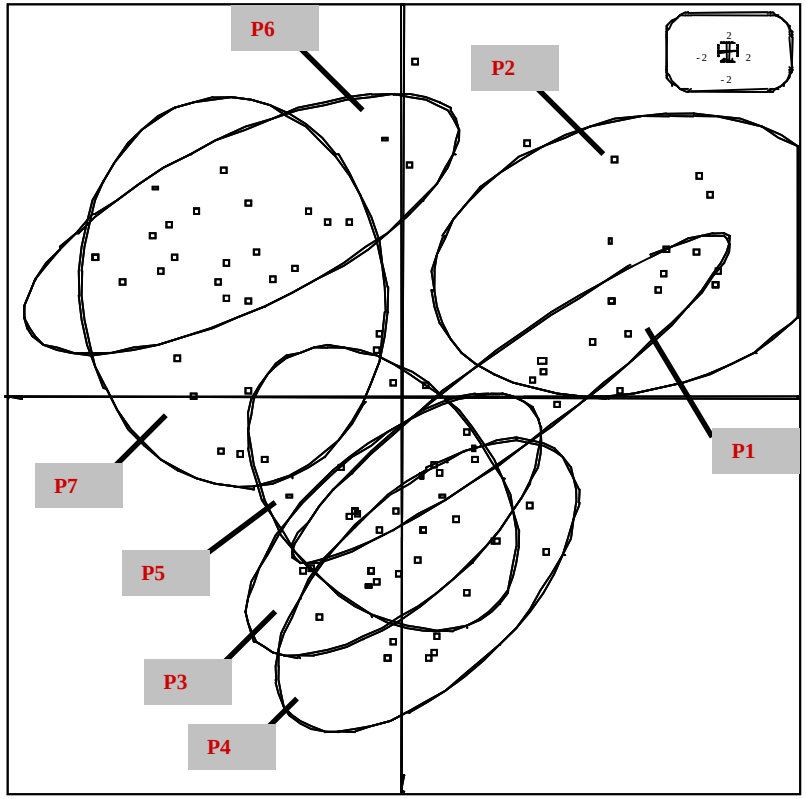
… qui s'estompe, 13 mois (P3) plus tard



Champignons, Feucherolles

Pas d'effet traitement

Evolution temporelle de la structure de la communauté fongique du sol



Champignons, Ensisheim

Effet de la boue chaulée (P3)

Variabilité méthodologique des résultats

Ex. de Feucherolles

Résultats T-RFLP = TTGE :

- ✓ Pas (peu) d'effet traitement
- ✓ Effet du temps de prélèvement
- ✓ Mêmes conclusions pour bactéries et champignons

Conclusions

Principaux résultats :

- ✓ Pas d'effet traitement (sauf BCH Ensisheim et DVB Feucherolles)
  - *Pas d'effet des PRO ou effet de dilution ?*
  - *Hétérogénéité des dispositifs ?*
- ✓ Résilience de 2 ans maximum (par rapport au témoin)
- ✓ Effet temporel (évolution « naturelle » de la diversité)
- ✓ Mêmes conclusions pour bactéries et champignons
- ✓ Mêmes conclusions quelle que soit la technique

Merci pour votre attention