

Interactions entre microbiologie anaérobie et géochimie du sol

Description des dynamiques microbiennes

F. Dassonville⁽¹⁾ et P. Renault⁽²⁾

(1) CIRAD, UPR 78, Domaine Agropolis, TA 40/01, Avenue Agropolis, 34398 MONPELLIER cedex 5.

(2) INRA, Unité "Climat, Sol et Environnement", Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France.

RÉSUMÉ

L'anaérobiose dans le sol peut avoir des impacts néfastes sur le sol, la zone non saturée profonde, la nappe, et l'atmosphère. Dans ces conditions, les activités microbiennes sont en étroite interaction avec les transformations géochimiques abiotiques tant au niveau de la solution que des phases solides. Quelques modèles combinent la description des processus microbiens et des transformations géochimiques dans le sol. Jusqu'à présent, les évolutions quantitatives et qualitatives des populations microbiennes n'ont pas été mesurées simultanément pour attester de la fiabilité des modèles proposés. Les dynamiques microbiennes globales peuvent être caractérisées en quantifiant la biomasse ou en comptant les microorganismes. Les dynamiques de groupes microbiens spécifiques peuvent être suivies par des techniques de biologie moléculaire en utilisant des amorces spécifiques de l'ARNr16S. Toutefois, aucune méthode n'a été mise au point pour analyser simultanément les dynamiques de nombreuses communautés microbiennes fonctionnelles en relation avec les processus géochimiques du sol. Récemment, une nouvelle méthode combinant biologie moléculaire (PCR-SSCP) et dénombrements directs a permis de caractériser les dynamiques des communautés microbiennes fonctionnelles en relation avec les transformations géochimiques du sol.

Mots clés

Microbiologie anaérobie, géochimie, dynamiques microbiennes, sol.

SUMMARY

INTERACTIONS BETWEEN ANAEROBIC MICROBIOLOGY AND SOIL GEOCHEMISTRY:

Description of the microbial dynamics

Anaerobiosis in soil can have undesirable environmental effects on the soil, the deep vadose zone, the aquifer and the atmosphere. In these conditions, microbial activities closely interact with soil abiotic geochemical transformations in solution and at the solid/solution interface level. Only a few models combine microbial and geochemical transformations. However until now, qualitative and quantitative evolutions in microbial populations have not been measured simultaneously to check the reliability of the proposed models. Bulk

microbial dynamics can be characterized by quantifying biomass or by counting micro-organisms. The dynamics of specific microbial populations or groups can be monitored using molecular biological techniques using specific probes targeting 16SrRNA genes. So far, however, no attempt had been made to analyze the dynamics of numerous coexisting microbial groups in relation to soil biogeochemical processes. Recently, a new method combining PCR-SSCP and direct counts have enabled to study the dynamics of microbial functional communities in relation with soil abiotic geochemical transformations.

Key-words

Anaerobic microbiology, geochemistry, microbial dynamics, soil.

RESUMEN**INTERACCIONES ENTRE MICROBIOLOGÍA ANAEROBIA Y GEOQUÍMICA DEL SUELO:****Descripción de las dinámicas microbianas**

La anaerobiosis en el suelo puede tener impactos nefastos sobre el suelo, la zona no saturada profunda, el manto freático y la atmósfera. En estas condiciones, las actividades microbianas son en estrechas interacciones con las transformaciones geoquímicas abióticas tanto al nivel de la solución que de las facies sólidas. Algunos modelos combinan la descripción de los procesos microbianos y de las transformaciones geoquímicas en el suelo. Hasta ahora, las evoluciones cuantitativas y cualitativas de las poblaciones microbianas no fueron medidas simultáneamente para atestar de la fiabilidad de los modelos propuestos. Las dinámicas microbianas globales pueden ser caracterizadas cuantificando la biomasa y contabilizando los microorganismos. Las dinámicas de grupos microbianos específicos pueden ser seguidas por las técnicas de biología molecular usando esbozos específicos de ARNr16S. No obstante, no existe ningún método para analizar simultáneamente las dinámicas de las numerosas comunidades microbianas funcionales en relación con los procesos geoquímicos del suelo.

Recientemente, un nuevo método que combina biología molecular (PRR-SSCP) y enumeraciones directas permitió caracterizar las dinámicas de las comunidades microbianas funcionales en relación con las transformaciones geoquímicas del suelo.

Palabras claves

Microbiología, anaerobiosis, dinámicas microbianas, suelo.

Les sols sont généralement bien aérés et présentent des zones anaérobies limitées à des microniches. L'existence de conditions anaérobies généralisées découle de faibles possibilités de transfert d'O₂ et/ou d'activités microbiennes respiratoires élevées (Hojberg *et al.*, 1994; Parry *et al.*, 1999; Parry *et al.*, 2000). De telles conditions se rencontrent notamment dans les sols engorgés voire submergés, avec les rizières, les tourbières, et certaines zones de bas-fonds (Reddy *et al.*, 1998). L'anaérobiose peut avoir des impacts sur (i) le fonctionnement du sol, (ii) la zone non saturée profonde et la nappe, ainsi que (iii) l'atmosphère. Les effets indésirables de l'anaérobiose incluent la mobilisation de métaux (De Cockborne *et al.*, 1999; Förstner, 1987), et l'émission de gaz à effet de serre (Bouwman, 1990). Les effets positifs incluent la réduction de la pollution au NO₃ (Curmi *et al.*, 1997), la dégradation des contaminants organiques (Lovley, 1995), et l'immobilisation de métaux toxiques et de radionucléides (Lovley et Coates, 2000).

En anaérobiose, les activités microbiennes sont en étroite interaction avec les transformations géochimiques abiotiques (Dassonville et Renault, 2002). Si cette interdépendance entre processus biotiques et abiotiques existe déjà en conditions aérobies, elle n'est que plus marquée en conditions anaérobies. La prise en compte explicite de ces couplages dans les modèles s'avère alors incontournable, car (i) beaucoup de transformations se font hors équilibre thermodynamique (Stumm et Morgan, 1996) et (ii) les lois qui régissent les activités biologiques diffèrent fortement des celles qui régissent les réactions physico-chimiques (Dassonville et Renault, 2002). Peu de modèles combinent la description des processus microbiens et des transformations géochimiques dans le sol, ou dans d'autres environnements dont la zone non saturée et l'aquifère, les digesteurs anaérobies, et le rumen (Dassonville et Renault, 2002). Parmi ceux-ci, le modèle de Dassonville *et al.* (2004a) propose une description des communautés microbiennes au regard de leurs fonctions (dénitrification, réduction des oxyhydroxydes, fermentations, acétogénèse, réduction des sulfates); il simule leurs activités et dynamiques, alors que les réactions géochimiques abiotiques incluent les réactions en solution (réduction/oxydation, complexations, réactions acides/bases) et la précipitation et la dissolution de minéraux. Ces modèles ont été évalués en comparant des données expérimentales et simulées au cours du temps. Les données expérimentales retenues incluent des concentrations en substrats et produits dans la solution du sol et dans l'atmosphère gazeuse; quelquefois, elles concernent aussi d'autres paramètres géochimiques, dont le pH et le potentiel d'oxydo/réduction (Eh) de la solution du sol. Cependant, jusqu'à présent, les évolutions quantitatives et qualitatives des populations microbiennes n'ont pas été mesurées simultanément pour attester de la fiabilité des modèles proposés.

Les dynamiques microbiennes globales peuvent être caractérisées en quantifiant la biomasse (Witt *et al.*, 2000) ou en comptant les microorganismes (Küsel *et al.*, 1999). L'utilisation de la microscopie à épifluorescence (principalement par marquage à l'acidine orange et au DAPI) permet de contourner les difficultés liées à l'extraction et à la culture des micro-organismes (Kepner et Pratt, 1994).

Cependant, les dynamiques microbiennes globales reflètent seulement le bilan entre mort et croissance de populations ou de communautés microbiennes fonctionnelles, et ne permettent par ailleurs pas d'identifier des populations microbiennes stagnantes capables de survivre dans de telles conditions. Les dynamiques de populations microbiennes spécifiques peuvent être suivies par des techniques biologiques moléculaires comme la « fluorescent *in situ* hybridization » (FISH) (Weber *et al.*, 2001) ou l'hybridation dot blot utilisant des amorces spécifiques de l'ARNr16S (Scheid et Stubner, 2001). Plusieurs études ont utilisé ces techniques pour déterminer les profils de groupes microbiens (Teske *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 2001); d'autres études ont combiné les mesures moléculaires avec la caractérisation de processus particuliers et de paramètres environnementaux (Teske *et al.*, 1996). D'autres méthodes fournissent une visualisation rapide de la complexité des communautés microbiennes et permettent d'apprécier leurs fluctuations; elles incluent la D/TGGE (Denaturing or temperature gradient gel electrophoresis) (Weber *et al.*, 2001), la TRFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) (Scheid et Stubner, 2001), et la PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) (Delbès *et al.*, 2001; Godon *et al.*, 1997a). Cette dernière méthode a été beaucoup utilisée pour étudier les dynamiques des communautés bactériennes et aussi des archéobactéries dans les digesteurs anaérobies (Zumstein *et al.*, 2000). Malgré ces nombreuses études, aucun travail n'a été fait pour analyser les dynamiques simultanées de nombreuses communautés microbiennes fonctionnelles en relation avec les processus géochimiques abiotiques du sol.

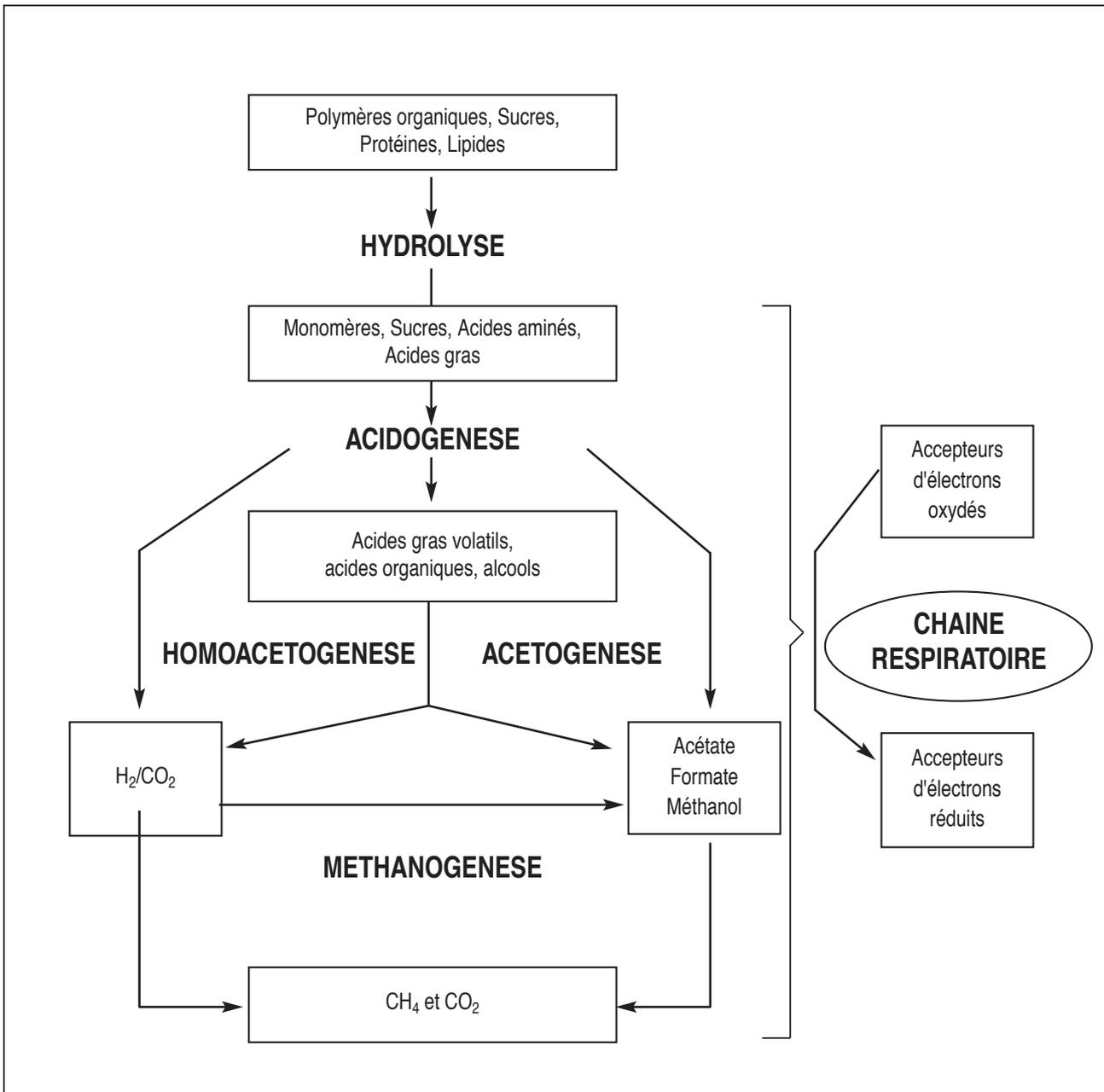
Le but de cette synthèse est dans un premier temps de faire un rappel sur les communautés microbiennes fonctionnelles anaérobies du sol, leurs activités métaboliques et sur les principales interactions entre leurs activités et les transformations géochimiques du sol en anaérobiose. Nous présentons ensuite les différentes approches méthodologiques actuellement disponibles pour l'analyse des dynamiques des communautés microbiennes fonctionnelles du sol. Nous ne faisons pas dans ce cadre une analyse exhaustive de toutes les méthodes existantes car des revues sur ce sujet sont déjà disponibles (Kepner et Pratt, 1994; Liesack *et al.*, 1997; O'Donnell et Görres, 1999; Torvisk *et al.*, 1996; Wintzingerode *et al.*, 1997). Lors d'une dernière étape, nous présentons une nouvelle méthode combinant une technique de biologie moléculaire (PCR-SSCP) et une technique de dénombrement direct qui permet d'étudier les dynamiques des communautés microbiennes fonctionnelles en relation avec les transformations géochimiques du sol.

DYNAMIQUES MICROBIENNES, BIOTRANSFORMATIONS ET RÉACTIVITÉ GÉOCHIMIQUE ABIOTIQUE.

Les principales activités microbiennes en anaérobiose dans le sol ont été largement étudiées et comprennent (*figure 1*) (i) la réduction d'accepteurs terminaux d'électrons variés pendant les proces-

Figure 1 - Les principales voies mis en jeu dans la dégradation anaérobie de la matière organique.

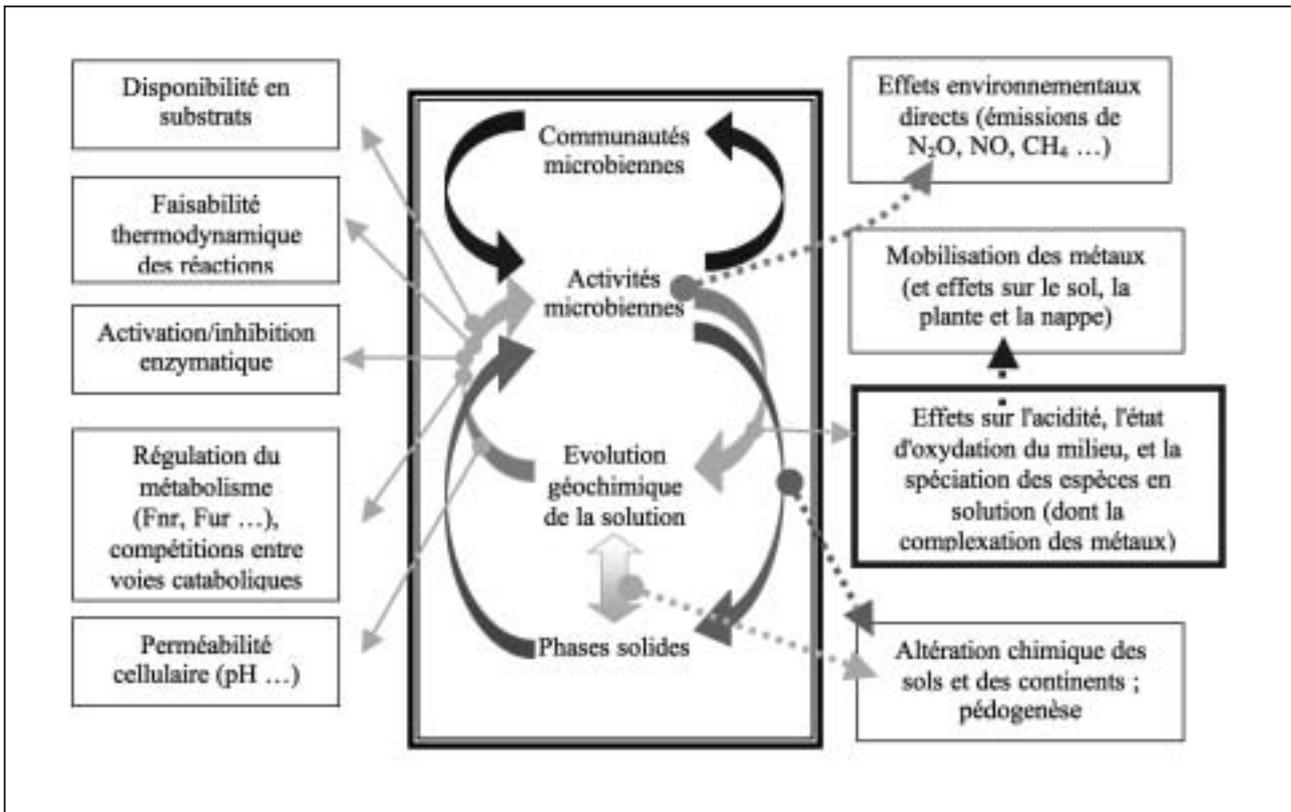
Figure 1 - Main pathways involved in the anaerobic degradation of organic matter.



sus respiratoires, incluant les oxydes de N, de Mn, de Fe, et les oxydes de S (Peters et Conrad, 1996), (ii) les réactions d'acétogénèse (Dolfing, 1988), d'homoacétogénèse (Diekert et Wohlfarth, 1994) et de fermentations (Pelmont, 1993a) et (iii) la méthanogénèse (Oremland, 1988). Ces activités sont réalisées par de nombreuses espèces bactériennes dont l'importance dépend de l'environnement. Pour ne pas avoir à décrire exhaustivement la diversité des

espèces microbiennes, on peut définir des communautés microbiennes fonctionnelles selon les voies cataboliques anaérobies qu'elles peuvent mettre en oeuvre. Elles peuvent parfois être définies par la possibilité de mise en œuvre simultanée ou successive de plusieurs de ces voies métaboliques (en fonction des conditions environnementales). Ainsi, plusieurs réducteurs du Fe et du Mn possèdent aussi une réductase NO_3^- dans leur chaîne respiratoire

Figure 2 - Principales interactions entre les activités microbiennes anaérobies et les transformations géochimiques abiotiques du sol.
Figure 2 - Main interactions between anaerobic microbial activities and soil geochemical transformations.



(Pelmont, 1993b). Dans le cas des voies fermentaires, certains micro-organismes peuvent favoriser les voies métaboliques les plus efficaces d'un point de vue énergétique quand aucun accepteur d'électron inorganique autre que le CO_2 est disponible (Hedderich *et al.*, 1999; Widdel, 1988). Chez les méthanogènes, la mise en œuvre simultanée ou successive de plusieurs voies n'est pas très répandue, mais certaines communautés peuvent réaliser à la fois les voies hydrogénoclastes (i.e. à partir de H_2 et CO_2) et acétoclastes (i.e. à partir de l'acétate) (Oremland, 1988). Il est donc très important de comprendre les règles qui déterminent les priorités des réactions ainsi que leurs contributions aux besoins énergétiques lorsqu'on s'intéresse à la modélisation des processus biogéochimiques du sol. Les dynamiques microbiennes sont spécifiques de chaque communauté microbienne fonctionnelle et contribuent à la capacité de ces communautés à s'adapter à des environnements spécifiques. Elles peuvent être reliées à la consommation en substrat et au rendement énergétique en ATP des réactions, qui diffère selon les voies cataboliques et entre les différentes chaînes respiratoires. L'adaptation des communautés microbiennes dépend aussi de leur capacité à survivre pendant des périodes défavorables comme les conditions de faible température, de faible pH, et dans le cas des micro-organismes anaérobies, les périodes transitoires oxygènes.

Les activités microbiennes sont en étroite interaction avec les transformations géochimiques abiotiques (figure 2). Si cette interdépendance entre processus biotiques et abiotiques existe déjà en conditions aérobies, elle n'est que plus marquée en conditions anaérobies (Dassonville *et al.*, 2002). Dans ces dernières conditions, les activités microbiennes affectent le pH par la production ou consommation microbienne de H^+ , de CO_2 , de NH_4^+ , de HS^- , d'acides organiques, etc. (Ponnampuruma, 1972; Reddy *et al.*, 1998), le niveau d'oxydoréduction en influençant les différents couples redox dont $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, H^+/H_2 , $\text{SO}_4^{2-}/\text{HS}^-$, CO_2/CH_4 , et les concentrations en ligands organiques (acétate, propionate, and butyrate) (Peters et Conrad, 1996) et minéraux pouvant complexer des métaux. Les activités microbiennes affectent aussi les phases solides. Ainsi, les réactions d'adsorption/désorption sont affectées par les productions microbiennes (H^+ et autres cations) qui interagissent avec les phases solides selon leurs caractéristiques spécifiques (Stumm et Morgan, 1996). La dissolution de minéraux (oxydes et oxyhydroxydes métalliques, calcite, etc.) est affectée par le pH du milieu et par la réduction microbienne d'éléments métalliques des phases solides (Stumm et Morgan, 1996; Lefebvre-Drouet et Rousseau, 1995). Les activités microbiennes peuvent aussi affecter en dernier lieu la précipitation d'autres minéraux

comme les rouilles vertes, la magnétite... (Brown *et al.*, 1999). Les conséquences des activités microbiennes peuvent être partiellement tamponnées par l'existence de phases solides réactives (carbonates, oxydes et oxyhydroxydes métalliques) via les processus de dissolution ou de précipitation. Mais, les activités microbiennes dépendent elles-mêmes des caractéristiques géochimiques du milieu et de leur évolution qui affectent (i) la disponibilité en substrat en solution et à l'interface liquide/solide (Vavilin *et al.*, 1996), et (ii) la faisabilité des réactions microbiennes, à travers les mécanismes d'inhibition par des espèces chimiques (NO_2^- ; acides gras volatils...) et les régulations thermodynamiques (H_2). Au travers de ces mécanismes, les couplages entre activités microbiennes et transformations géochimiques abiotiques conditionnent l'apparition et/ou le devenir de certaines pollutions (NO_3^- , ETM...) et la biodisponibilité d'éléments pouvant induire des carences ou des toxicités (P et ETM...).

MÉTHODES D'ÉTUDE DES DYNAMIQUES MICROBIENNES DU SOL.

Estimation de la biomasse microbienne

Les dynamiques microbiennes peuvent être caractérisées de manière globale en quantifiant la biomasse. Les méthodes les plus utilisées pour estimer la biomasse des sols sont les techniques de fumigation/incubation au chloroforme (CFI) (Jenkinson et Powlson, 1976), fumigation/extraction au chloroforme (CFE) (Vance *et al.*, 1987), et de respiration induite par un substrat (SIR) (Anderson et Domsch, 1978). La technique SIR présente l'avantage d'obtenir une estimation plus rapide de la biomasse microbienne par rapport aux techniques de fumigation (quelques heures contre dix jours pour les techniques de fumigation). Ces méthodes ont été appliquées dans l'étude des effets de polluants sur l'activité de la biomasse microbienne du sol. Par exemple, Chander *et al.* (1995) ont utilisé la technique de fumigation/extraction au chloroforme pour étudier l'effet des métaux lourds contenus dans des boues de station d'épuration sur l'évolution de la quantité de biomasse totale d'un sol. Si ces méthodes permettent d'établir un bilan entre mort et croissance microbienne, elles ne permettent en revanche ni de distinguer la biomasse « active » (i.e. la biomasse qui croît) de la biomasse « inactive » (i.e. biomasse qui se maintient sans croissance), ni de distinguer des communautés microbiennes fonctionnelles. Or, les vitesses de diverses biotransformations comme la dégradation de la matière organique dépendent majoritairement de la fraction active de la biomasse. D'autres méthodes d'estimation de la biomasse microbienne, développées plus récemment, sont basées sur la description mathématique de la croissance de la biomasse microbienne, dont les déterminants peuvent être facilement déterminés par l'analyse cinétique des courbes de respiration obtenues expérimentalement (ex. courbes de production de CO_2) (Panikov, 1995; Blagodatsky *et al.*,

2000). A partir de ce type d'analyse, Blagodatsky *et al.* (2000) répartissent la biomasse microbienne selon deux pools distincts : la biomasse dite « active » qui correspond à la part de la biomasse qui croît suite à un amendement (glucose), et la biomasse dite « inactive » correspondant à la biomasse stimulée aussi par un amendement mais sans croissance apparente (i.e. biomasse qui se maintient). Toutefois, suivant les approches employées par les différents auteurs, les définitions se rapportant à la biomasse dite « active » et à la biomasse dite « inactive » des sols peuvent varier. Ainsi, Werf et Verstraete (1987a,b) considèrent, que la biomasse microbienne dite « active » comprend la biomasse croissant de manière exponentielle suite à un amendement (i.e. en glucose) ainsi que la biomasse qui se maintient, ce qui rend les comparaisons entre les différentes approches cinétiques impossibles malgré un degré de description supérieur aux méthodes conventionnelles d'estimation de la biomasse totale (fumigation/extraction au chloroforme...). Au final, l'ensemble des méthodes d'estimation de la biomasse totale permet seulement d'approcher de manière très globale les dynamiques microbiennes car elles considèrent que l'ensemble des populations microbiennes du sol peut être traité comme une seule et unique entité.

Les méthodes de dénombrement indirect et direct

Les dynamiques microbiennes peuvent aussi être appréhendées par dénombrement des bactéries par deux grands types de méthodes. La première consiste en un comptage indirect sur des milieux de culture (Josephson *et al.*, 2000). La seconde méthode consiste en un comptage direct par observation au microscope (Roane et Pepper, 2000). Parmi les méthodes de dénombrement indirectes, les deux méthodes les plus utilisées sont la méthode standard de culture sur boîte de pétri et la technique de dénombrement dite « technique du nombre le plus probable » (MPN) (Josephson *et al.*, 2000). Cette dernière est très utilisée car elle permet l'estimation des populations bactériennes ayant des fonctionnalités données comme la dénitrification (Cannavo *et al.*, 2002) (figure 3), la réduction du Fe^{3+} , etc... Malheureusement ces techniques restent limitées dans l'approche des dynamiques microbiennes car moins de 1 % des bactéries présentes dans le sol sont cultivables (Liesack *et al.*, 1997). Les techniques de dénombrement sur milieu de culture ne mettent ainsi en évidence que les bactéries viables (i.e. les bactéries capables de croître sur un milieu de culture spécifique) qui ne sont pas forcément les bactéries responsables des processus majoritaires dans l'écosystème étudié. De plus, les résultats associés à ces techniques sont influencés par plusieurs facteurs comme la composition du milieu de culture (pH, concentrations en substrats...), les conditions d'incubation et la méthode d'extraction des bactéries du sol (Liesack *et al.*, 1997; Torvick *et al.*, 1996). Les techniques de dénombrement direct permettent de contourner les difficultés liées à l'extraction et à la mise en culture des micro-organismes

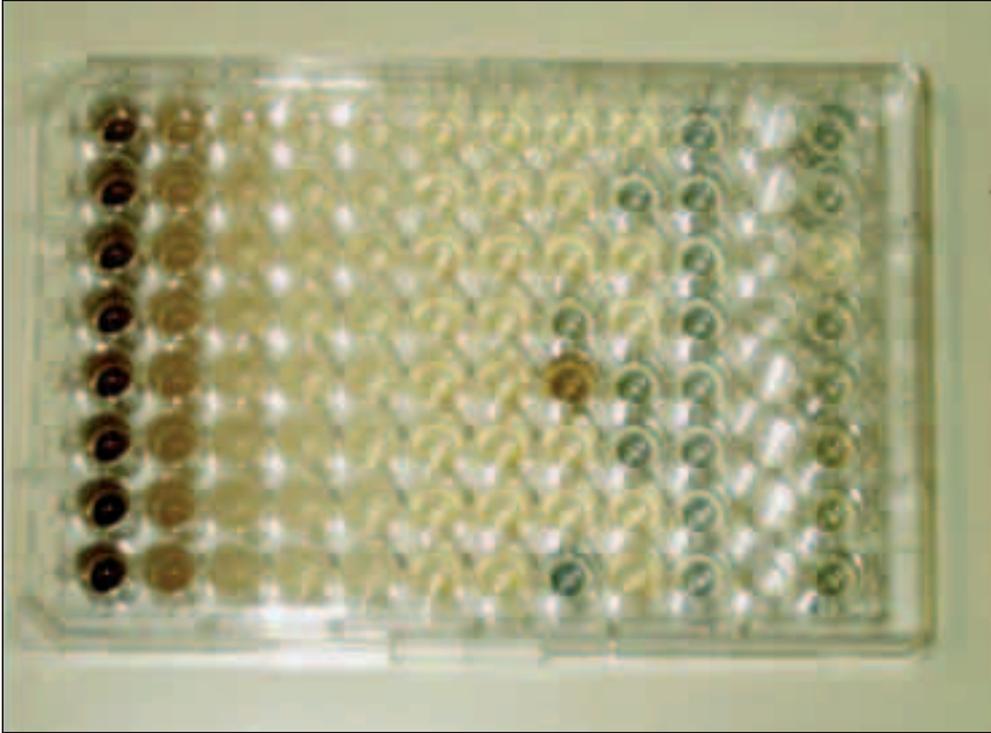


Figure 3 - Dénombrement des dénitrifiants sur micro-plaque par technique MPN. Révélation des dénitrifiants après ajout du réactif de Morgan (Debroux, communication personnelle).

Figure 3 - Enumeration of denitrifying bacteria by the Most Probable Number (MPN) method. The presence of denitrifiers is revealed by Morgan's reagent (Debroux, personal communication).

Figure 4 - Dénombrement des bactéries par microscopie à épifluorescence après marquage à l'acridine orange. Cas d'un échantillon de sol (Richaume, communication personnelle).

Figure 4 - Enumeration of bacteria by epifluorescent microscopy using acridine orange staining. Case for a soil sample (Richaume, personal communication).

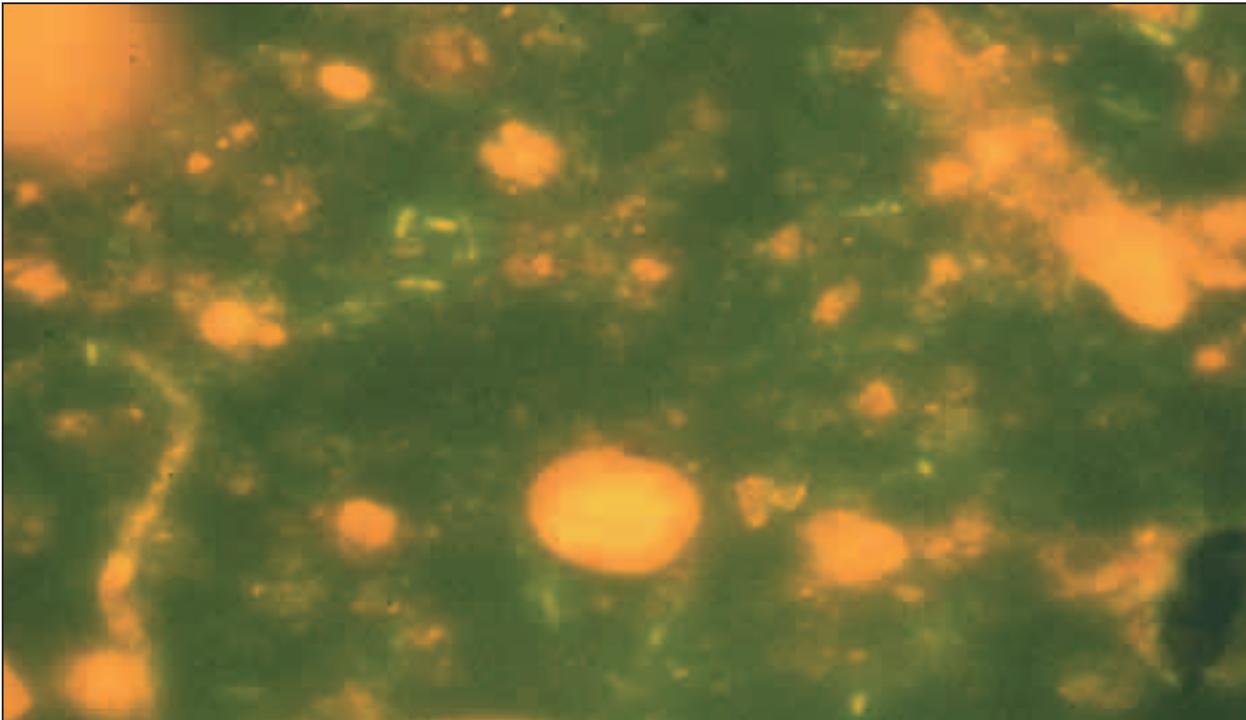
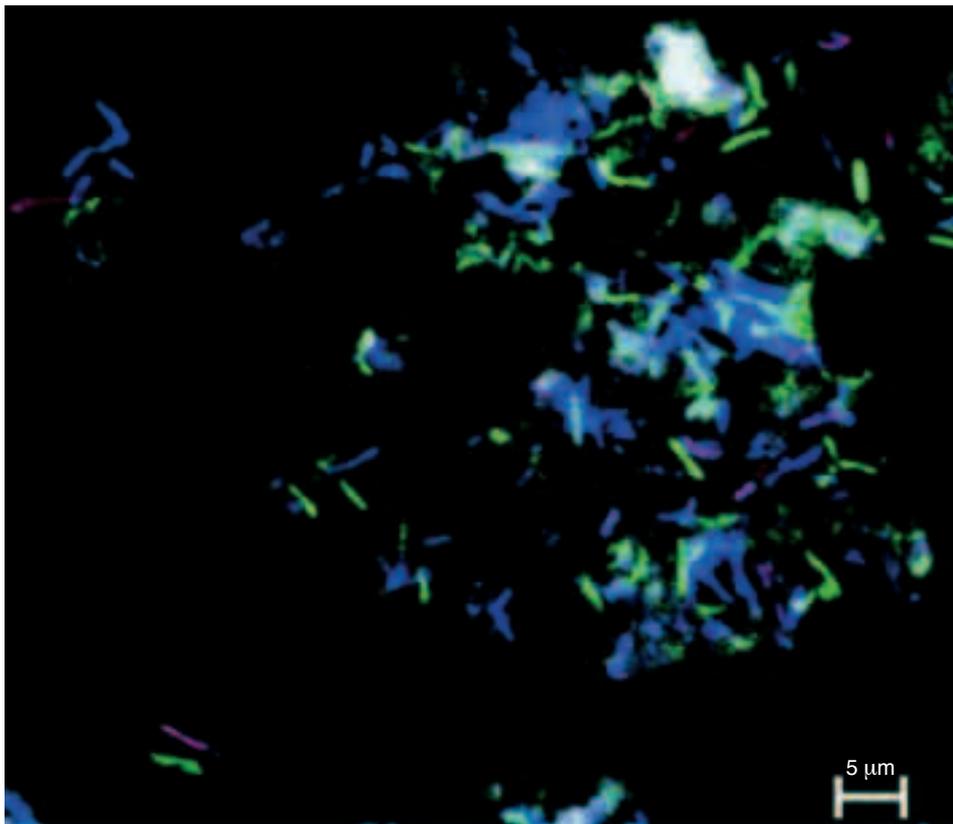


Figure 5 - FISH à partir de cellules bactériennes détachées mécaniquement d'une paille incubée pendant 8 jours dans un sol de rizière. Trois amorces de l'ADNr16S ont été utilisées simultanément pour l'hybridation. L'amorce marquée (bleu) Eub338 spécifique du domaine bactérien (Eub338) a été utilisée avec l'amorce marquée (rouge) Clost XIVA, spécifique d'une partie du cluster XIVA se rapportant au genre Clostridium, et avec l'amorce spécifique Clost XIVA-c (verte). La superposition des amorces Eub338 et Clost XIVA donne des cellules colorées en rose ; la superposition de l'amorce Eub338 et Clost XIVA-c donne des cellules vertes à turquoise. Le nombre de cellules hybridées avec les amorces spécifiques Clost XIVA et Clost XIVA-c (donnant des cellules blanches) est inférieur à 1 % de toutes les cellule détectées avec l'amorce Eub338. Echelle (barre), 5 μm (Weber *et al.*, 2001)

Figure 5 - FISH of fixed cells detached mechanically from straw incubated for 8 days in soil slurries. Three 16S rDNA probes were used simultaneously. CY5-labeled bacterial-domain probe Eub338 (blue) was used together with CY3-labeled probe Clost XIVA (red), specific for parts of clostridial cluster XIVA, and FITC-labeled probe Clost XIVA-c (green), designed from 16S rDNA sequence data. The overlay of probes Eub338 and Clost XIVA resulted in pink cells; the overlay of Eub338 and Clost XIVA-c resulted in green-to-turquoise cells. The number of cells hybridized simultaneously with the group-specific probes Clost XIVA and Clost XIVA-c (resulting in white cells) was less than 1% of all Eub338-detected cells. Scale bars, 5 μm (Weber *et al.*, 2001).



(Kepner et Pratt, 1994). Ainsi, l'utilisation de la microscopie à épifluorescence (principalement par marquage des bactéries à l'acridine orange et au DAPI) permet de dénombrer les bactéries totales présentes dans le sol et donc d'avoir accès aussi aux bactéries viables non cultivables. En théorie, les observations directes au microscope permettent de différencier les bactéries dénombrées au regard de leur activité. Dans le cas du marquage à l'acridine

orange, les bactéries avec un niveau élevé en ARN (révéléateur d'une activité métabolique) devraient apparaître en « vert » alors que les bactéries avec un niveau élevé en ADN devraient apparaître en « orange » (Kepner et Pratt, 1994). En pratique, il est très difficile de distinguer objectivement ces deux cas « extrêmes » et l'utilisation de ces techniques est donc restreinte à l'estimation du nombre de bactéries totales dans le système d'étude (figure 4).

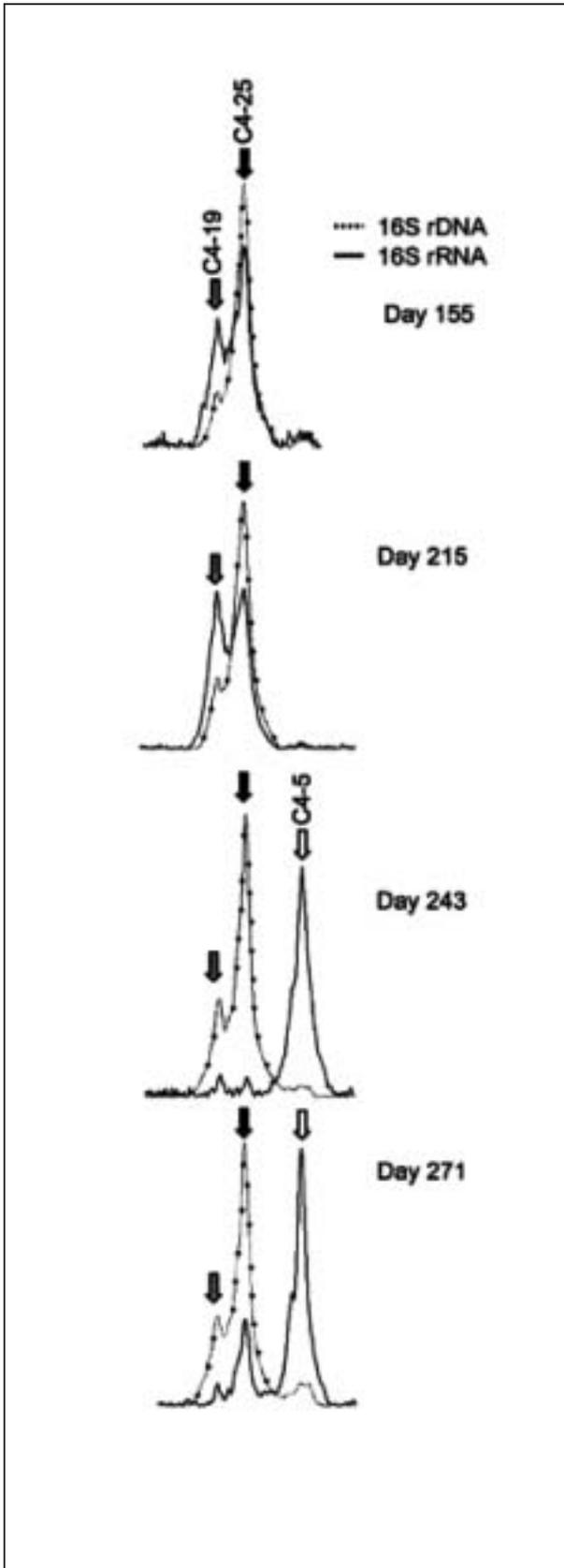


Figure 6 - Dynamique des archéobactéries dans un digesteur anaérobie en disfonctionnement (excès d'acétate). Evolution des profils SSCP des produits issus de l'amplification de la région V3 des ADNr16S et ARNr16S des archéobactéries. L'ADNr16S est représenté par une ligne continue et l'ARNr16S est représenté par une ligne en pointillé (Delbès *et al.*, 2001).

Figure 6 - Archeal populations dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. Dynamics of SSCP patterns of archeal 16S rDNA and 16S rRNA V3 region amplification products. 16S rDNA and 16S rRNA are indicated by black and dotted lines respectively (Delbès *et al.*, 2001).

Les méthodes de dénombrement direct et indirect constituent donc un bon outil d'approche des dynamiques microbiennes, mais les dynamiques microbiennes globales mises en évidence par ces techniques reflètent seulement le bilan entre la mort et la croissance de diverses populations ou communautés microbiennes fonctionnelles, et ne permettent pas d'identifier des populations microbiennes stagnantes capables de survivre dans de telles conditions.

Les méthodes basées sur les techniques de biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire basées sur l'étude de l'ADNr 16S permettent d'atteindre l'ensemble des groupes microbiens présents dans le sol y compris ceux qui ne sont pas cultivables (Kemp et Aller, 2003; O'Donnell and Görres, 1999). Si ces techniques ont été dans un premier temps beaucoup utilisées pour étudier la diversité microbienne du sol (Borneman *et al.*, 1996; Dunbar *et al.*, 1999; McCaig *et al.*, 1999; Scheid et Stubner, 2001), elles sont désormais utilisées pour analyser les dynamiques de groupes microbiens. Ces méthodes sont basées sur l'hybridation d'amorces spécifiques de gènes comme l'ARNr 16S. A l'aide de ces techniques, les dynamiques de populations microbiennes spécifiques peuvent être suivies. Ces méthodes incluent la « fluorescent in situ hybridization » (FISH) ou l'hybridation slot- ou dot-blot qui utilisent des amorces spécifiques de l'ARNr16S (Scheid et Stubner, 2001; Weber *et al.*, 2001). Par exemple, Weber *et al.* (2001) quantifie par FISH l'abondance relative de différents groupes phylogénétiques lors de l'incubation de paille de riz dans un sol de rizière et mettent en évidence l'abondance du genre *Clostridium* dans ces conditions (figure 5). Pour ces deux techniques, le problème majeur reste l'auto-fluorescence des échantillons pouvant générer des artefacts (O'Donnell Görres, 1999). Récemment, deux nouvelles techniques quantitatives (PCR en temps réel et PCR compétitive (cPCR)) ont été développées (Rayemaekers, 2000). Elles sont basées sur la quantification de gènes spécifiques (« marqueurs fonctionnels »)

représentatifs de groupes microbiens. Par exemple, l'existence d'un gène spécifique chez les bactéries oxydatrices d'ammonium (gène *amoA*) a permis à Kowalchuk *et al.* (2000) de quantifier l'abondance de ce gène dans un sol et par extension l'abondance du groupe microbien en question. Toutefois, l'utilisation de ces techniques nécessite au préalable l'identification d'un gène spécifique universel au sein du groupe microbien et aussi spécifique de ce dernier.

D'autres méthodes moléculaires fournissent une visualisation rapide de la complexité des communautés microbiennes et permettent d'apprécier leurs fluctuations ; elles incluent la D/TGGE (Denaturing or temperature gradient gel electrophoresis) (Marschner *et al.*, 2003 ; Teske *et al.*, 1996 ; Weber *et al.*, 2001), la TRFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) (Scheid et Stubner, 2001), et la PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism). Cette dernière méthode a été utilisée pour étudier les dynamiques des communautés bactériennes et aussi des archéobactéries dans les digesteurs anaérobies (Delbès *et al.*, 1998 ; Delbès *et al.*, 2000 ; Godon *et al.*, 1997a ; Godon *et al.*, 1997b ; Zumstein *et al.*, 2000). Delbès *et al.* (2001) ont ainsi utilisé la PCR-SSCP pour étudier la composition (ADNr16S) et les dynamiques (ARNr16S) des bactéries et des archéobactéries dans un digesteur anaérobie en période de disfonctionnement (excès d'acétate) (figure 6).

Certaines approches combinent l'utilisation de techniques moléculaires avec la caractérisation de processus particuliers et de paramètres environnementaux. Teske *et al.* (1996) quantifient les populations microbiennes dans un Fjord stratifié par hybridation *in situ* qu'ils mettent en relation avec les flux verticaux de donneurs d'électrons et d'accepteurs d'électrons.

L'utilisation des outils moléculaires présente un potentiel très important dans l'étude des dynamiques microbiennes. Même si certaines études prennent en compte les caractéristiques environnementales du milieu, les approches existantes ne proposent pas d'analyse des dynamiques des communautés microbiennes fonctionnelles en relation avec les processus géochimiques. Nous présentons dans le paragraphe suivant une nouvelle méthode dont la logique s'inscrit dans une prise en compte des dynamiques microbiennes en relation avec les composantes géochimiques du sol, et qui a été appliquée dans le cas d'un sol soumis à l'anaérobiose.

UNE NOUVELLE MÉTHODE D'ANALYSE DES DYNAMIQUES DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES FONCTIONNELLES EN RELATION AVEC LES PROCESSUS GÉOCHIMIQUES DU SOL

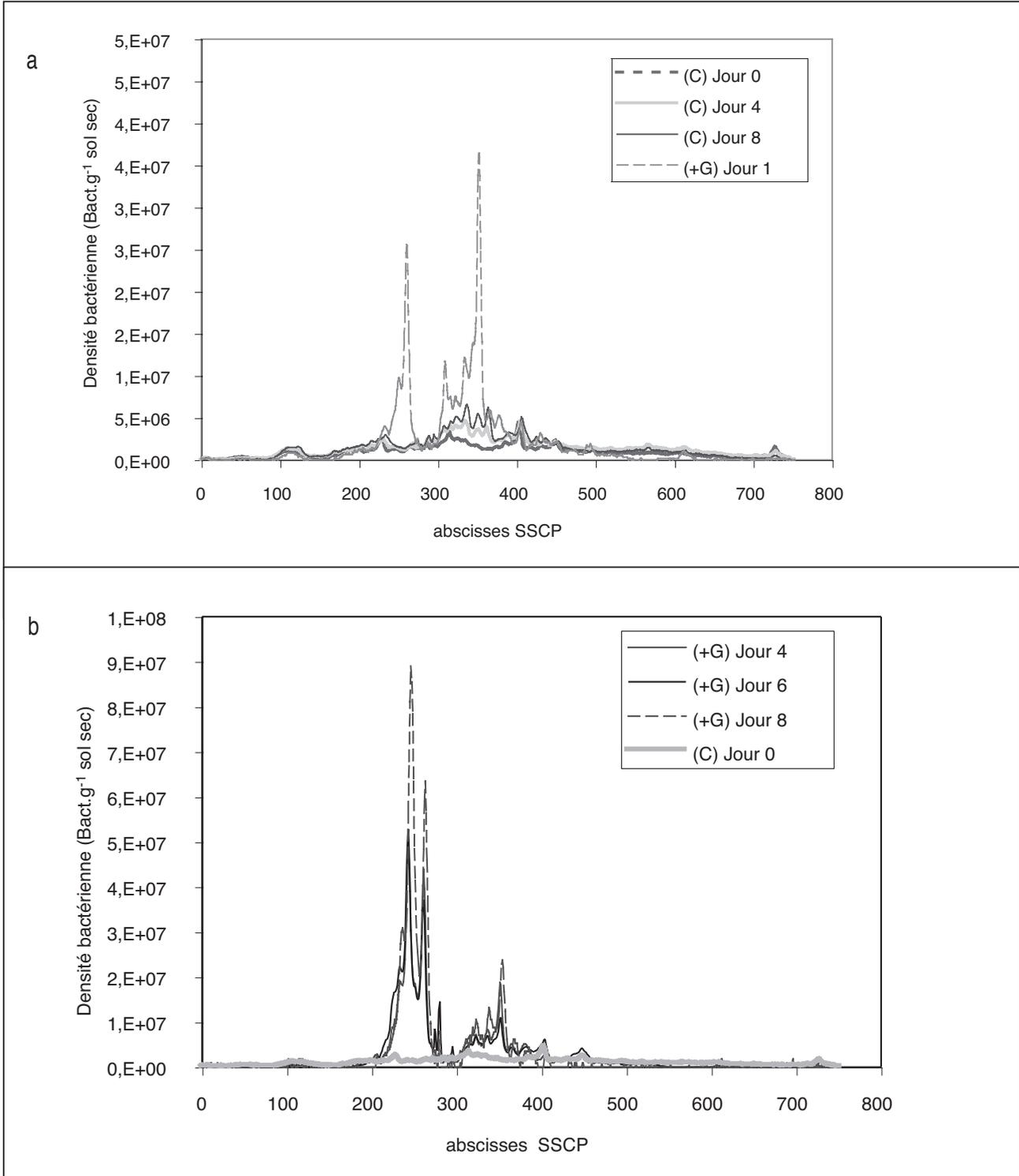
Une nouvelle méthode d'analyse des dynamiques des communautés microbiennes fonctionnelles anaérobies en relation avec les processus géochimiques du sol a récemment été mise au point par Dassonville *et al.* (2004b). Les dynamiques microbiennes ont été étudiées en combinant la méthode de PCR-SSCP et une méthode

de dénombrement direct (dénombrement direct des bactéries totales après marquage à l'acridine orange). La méthode a été testée sur des incubations en batch (petit réacteur) d'un Calcic Cambisol (WRB) amendé pendant 8 jours, sans amendement (traitement C), ou avec un amendement en glucose (traitement +G). La méthode a permis (i) de suivre l'évolution au cours de l'incubation des densités bactériennes pour les deux traitements étudiés (figures 7a, 7b) et (ii) de définir, dans les conditions expérimentales envisagées, 78 groupes microbiens dont les dynamiques ont pu être suivies au cours de l'incubation pour chaque traitement (figures 8a, 8b).

Au niveau des évolutions géochimiques, les processus microbiens prépondérants liés à la dégradation du glucose ont été mis en évidence dans le traitement +G : (i) réduction du NO_3^- et du NO_2^- respectivement pendant les 12 et 24 premières heures d'incubation, (ii) fermentation pendant les 6 premiers jours avec en parallèle une fixation non symbiotique de l'azote nécessaire à la croissance microbienne du 2^e au 6^e jour inclus, et (iii) réduction du Fe^{3+} concomitante avec oxydation de H_2 sur l'ensemble de la période. Parallèlement, pour ce même traitement, les 78 groupes microbiens mis en évidence par la méthode ont été ensuite regroupés en 7 sous ensembles (A-G) au vu de leurs dynamiques temporelles (figures 9a-d). Il a alors été possible de relier les différents sous-ensembles mis en évidence aux principales évolutions biogéochimiques. Ainsi, les groupes microbiens appartenant aux sous-ensembles A, E et F croissent pendant les périodes intenses de fermentation et sont probablement capables de fixer le N_2 , comme c'est le cas d'une bactérie identifiée dans ce sous-ensemble (*Clostridium butyricum*, sous-ensemble A). Les bactéries appartenant aux sous-ensembles B, D et G sont probablement capables de réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} avec oxydation concomitante de l' H_2 en H_3O^+ , mais probablement incapables de fixer le N_2 . Deux groupes microbiens appartenant à ces sous-ensembles sont proches de *Clostridium favosporum* (sous-ensemble B) et du genre *Bacillus* (sous-ensemble B). Les bactéries appartenant au sous-ensemble C sont probablement seulement capables de réduire les oxydes de N. Des estimations similaires de la croissance brute de la biomasse microbienne ont été obtenues en tenant compte (i) des croissances brutes des 78 groupes microbiens définis par la méthode et (ii) des énergies fournies par les activités cataboliques prépondérantes mises en évidence (réduction du NO_3^- et NO_2^- , fermentations et réduction du Fe^{3+}). La méthode proposée par Dassonville *et al.* (2004b) permet d'approcher les dynamiques microbiennes en relation avec les évolutions géochimiques du sol, dans des conditions (anaérobiose) où ces interactions sont importantes. Certaines limites méthodologiques liées à l'utilisation de cette méthode ont tout de même été soulevées par les auteurs (limites liées aux techniques de biologie moléculaire (dont SSCP), limites liées à la procédure de définition des groupes microbiens au sein du profil SSCP...). De plus, cette méthode n'a pour l'instant été testée que pour un seul type de conditions environnementales (i.e. incubations en batch d'un sol) qui diffèrent beaucoup des conditions générale-

Figure 7 - Evolution au cours de l'incubation des densités bactériennes obtenues à partir de la méthode combinant PCR-SSCP et dénombrements directs pour le traitement témoin (C) et le traitement avec glucose (+G) (Dassonville *et al.*, 2004b).

Figure 7 - Bacterial density variations for treatment (C) and treatment (+G) using the method combining PCR-SSCP and direct counts (Dassonville *et al.*, 2004b).



ment rencontrées in-situ (« simplicité » du système expérimental en batch éloigné de conditions *in situ*, quantité de glucose initiale apportée au sol...) et il est néanmoins nécessaire de tester cette méthode dans d'autres contextes environnementaux se différenciant par le type de sol utilisé, la nature et la quantité de(s) substrat(s) apporté(s)...

CONCLUSION

Les conditions anaérobies dans les sols se rencontrent notamment dans les sols engorgés voire submergés, avec les rizières, les tourbières, et certaines zones de bas-fonds. L'anaérobiose peut avoir des impacts sur (i) le fonctionnement du sol, (ii) la zone non saturée profonde et la nappe, ainsi que (iii) l'atmosphère. En anaérobiose, les multiples communautés microbiennes fonctionnelles sont à la base de nombreuses activités en étroite interaction avec les transformations géochimiques abiotiques tant au niveau de la solution que des phases solides. La prise en compte explicite de ces couplages dans les modèles s'avère parfois incontournable, car les lois qui régissent les activités biologiques diffèrent fortement de celles qui régissent les réactions géochimiques. Peu de modèles combinent la description des processus microbiens et des transformations géochimiques dans le sol. Ces modèles ont été évalués en comparant des données expérimentales (concentrations en substrats et produits dans la solution de sol et dans l'atmosphère gazeuse...) et simulées au cours du temps. Cependant, jusqu'à présent, les évolutions quantitatives et qualitatives des populations microbiennes n'ont pas été mesurées simultanément pour attester de la fiabilité des modèles proposés. Les dynamiques microbiennes globales peuvent être caractérisées en quantifiant la biomasse ou en comptant les microorganismes. Cependant, les dynamiques microbiennes globales reflètent seulement le bilan entre la mort et la croissance des populations ou communautés microbiennes fonctionnelles, et ne permettent pas d'identifier des populations microbiennes stagnantes capables de survivre dans de telles conditions. Les dynamiques de populations microbiennes spécifiques peuvent être suivies en utilisant des techniques biologiques moléculaires, en utilisant des amorces spécifiques de l'ARNr16S, avec parfois la caractérisation de processus particuliers et de paramètres environnementaux. D'autres méthodes fournissent une visualisation rapide de la complexité des communautés microbiennes et permettent d'apprécier leurs fluctuations. Malgré ces nombreuses études, aucune méthode n'avait été élaborée pour analyser les dynamiques de nombreuses communautés microbiennes fonctionnelles du sol en relation avec les processus géochimiques. Dassonville *et al.* (2004b) ont récemment proposé une nouvelle méthode combinant une technique de biologie moléculaire (PCR-SSCP) et une technique de dénombrement direct (dénombrements de bactéries marquées à l'acridine orange) permettant d'étudier les dynamiques des communautés microbiennes fonctionnelles en relation avec les transformations géochimiques du sol. Cette méthode doit néanmoins être testée dans d'autres contextes envi-

ronnementaux. Une telle approche devrait permettre à terme d'optimiser les modèles décrivant explicitement les interactions entre microbiologie et géochimie du sol au niveau de la description et de la paramétrisation des dynamiques des communautés microbiennes fonctionnelles.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le Programme ACI « Ecologie Quantitative » du ministère de la recherche française, et par le programme national « Ecosphère Continentale : processus et modélisation » (ECCO).

BIBLIOGRAPHIE

- Anderson J.P.E. et Domsch K.H., 1978 - A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology et Biochemistry*, 10 : pp. 215-221.
- Blagodatsky S.A., Heinemeyer O. et Richter J., 2000 - Estimating the active and total soil microbial biomass by kinetic respiration analysis. *Biology et Fertility of Soils*, 32 : pp. 73-81.
- Borneman J., Skroch P.W., O'Sullivan K.M., Palus J.A., Rumjanek N.G., Jansen J.L., Nienhuis J. et Triplett E.W., 1996 - Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied et Environmental Microbiology*, 62 : pp. 1935-1943.
- Bouwman, A.F., 1990 - *Soils and the greenhouse effects*, John Wiley et Sons, New York.
- Brown G.E., Henrich V.E., Clark D.L., Eggleston C., Felmy A., Goodman D.W., Grätzel M., Maciel G., MacCarthy M.I., Nealon K.H., Sverjensky D.A., Toney M.F. et Zachara J.M., 1999 - Metal oxide and their interactions with aqueous solutions and microbial organisms. *Chemical Reviews*, 99 : pp. 77-174.
- Cannavo P., Richaume A., Renault P., Emblanch C., Bertuzzi P. et Lafolie F., 2002 - Denitrification in the upper vadose zone layers : a comparison between a fluvic hypercalcic cambisol and a haplic calcisol. *Agronomie*, 22 : pp. 479-488.
- Chander K., Brookes P.C. et Harding S.A., 1995 - Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched sewage sludges to a sandy loam. *Soil Biology et Biochemistry*, 27 (11) : pp. 1409-1421.
- Curmi P., Bidois P. et Bourrie J., 1997 - Rôle du sol sur la circulation et la qualité des eaux au sein de paysages présentant un domaine hydromorphe. Incidence sur la teneur en nitrate des eaux superficielles d'un bassin versant armoricain. *Etude et gestion des sols*, 4 : pp. 95-114.
- Dassonville F. et Renault P., 2002 - Interactions between microbial processes and geochemical transformations under anaerobic conditions : a review. *Agronomie*, 22 : pp. 51-68.
- Dassonville F., Renault P. et Vallès V., 2004a - A model describing the interactions between anaerobic microbiology and geochemistry in a soil amended with glucose and nitrate. *European Journal of Soil Science*, 55 : pp. 29-45.
- Dassonville F., Godon J.J., Renault P., Richaume A. et Cambier P., 2004b - Microbial dynamics in an anaerobic soil slurry amended with glucose, and their dependence on geochemical processes. *Soil Biology et Biochemistry*, 36 : pp. 1417-1430.
- De Cockborne A.M., Vallès V., Bruckler L., Sévenier G., Cabibel B. et Bertuzzi P., 1999 - Environmental Consequences of Apple Waste Deposition on Soil. *Journal of Environmental Quality*, 28 : pp. 1031-1037.
- Delbès C., Godon J.J. et Moletta R., 1998 - 16S rDNA sequence diversity of a cul-

Figure 8 - Limites initiales et finales des groupes microbiens obtenus en utilisant la méthode combinant PCR-SSCP et dénombrements directs pour a/ le traitement avec glucose (+G) et b/ pour le traitement témoin (C) à 8 jours d'incubation (Dassonville *et al.*, 2004b). Les pics sont indiqués par des croix.

Figure 8 - The initial and final boundaries of all peaks, a/ for treatment +G and b/ for treatment C (8 days of incubation) using the method combining PCR-SSCP and direct cell counts. The peaks identified are indicated by black arrows.

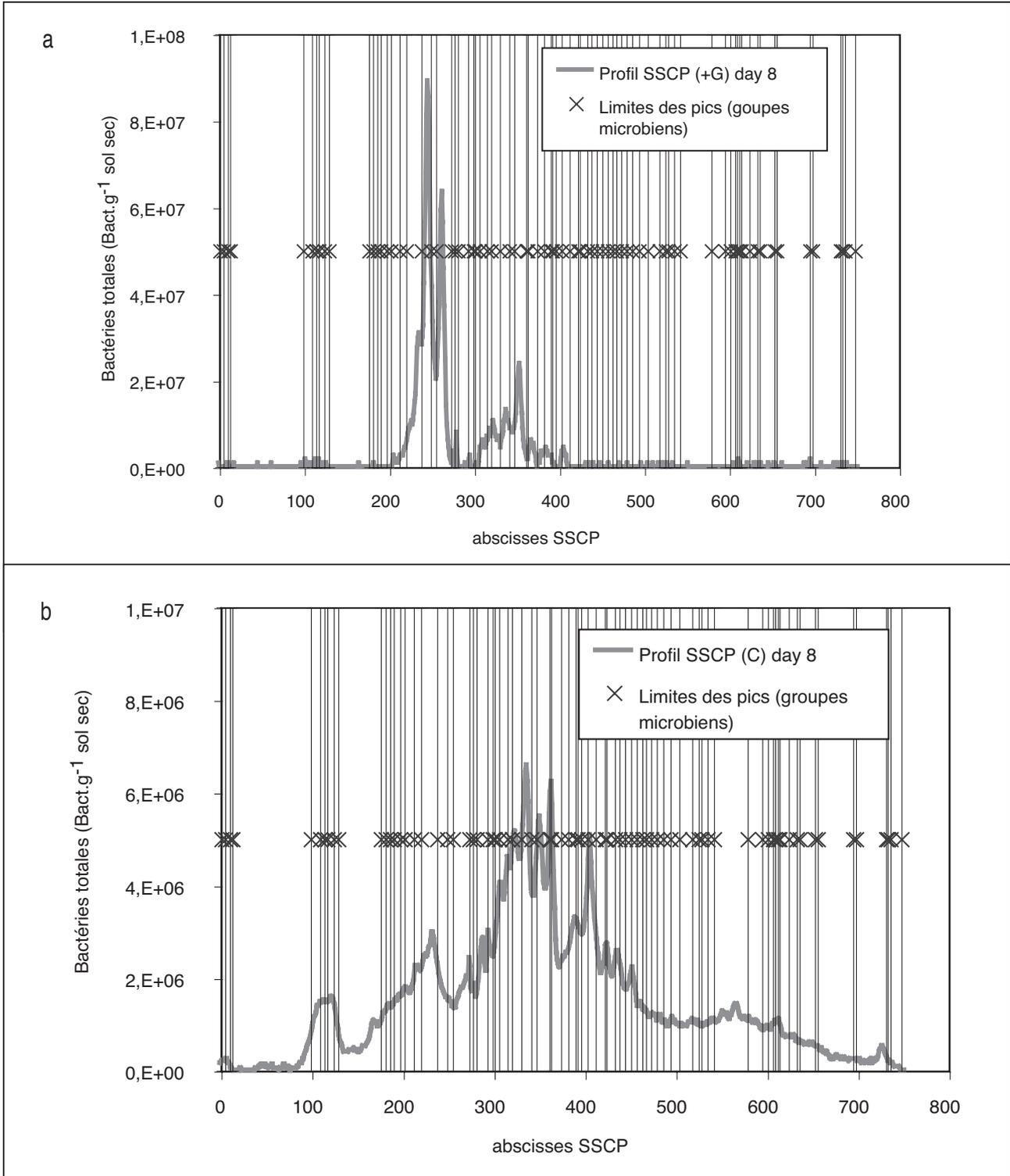


Figure 9 - Pics représentatifs de chaque sous-ensemble défini selon la méthode combinant PCR-SSCP et dénombrement direct.
 a/ pics représentatifs du sous-ensemble A et B, b/ pics représentatifs du sous-ensemble C et E,
 c/ pics représentatifs du sous-ensemble D et G, d/ pics représentatifs du sous-ensemble F.

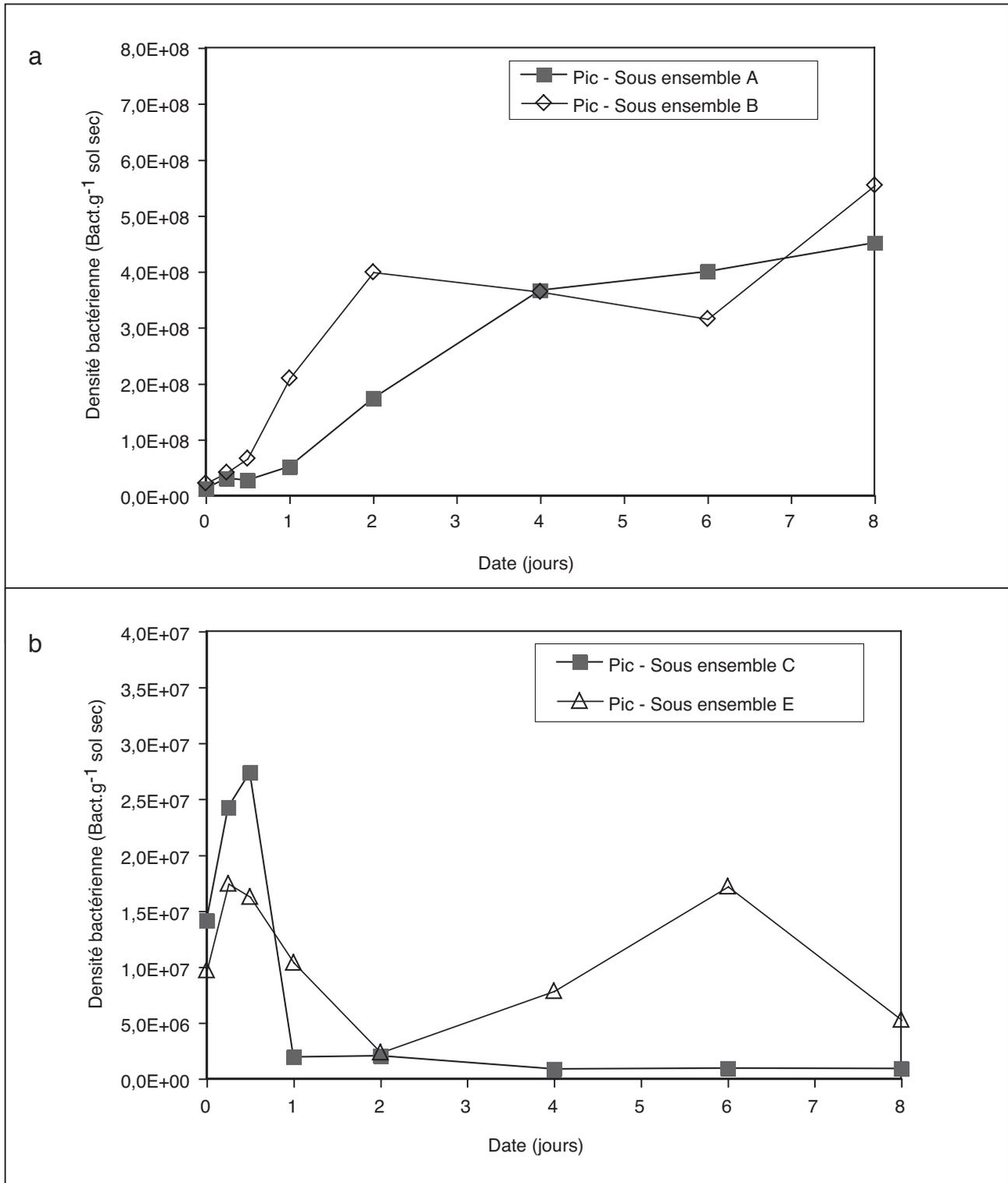
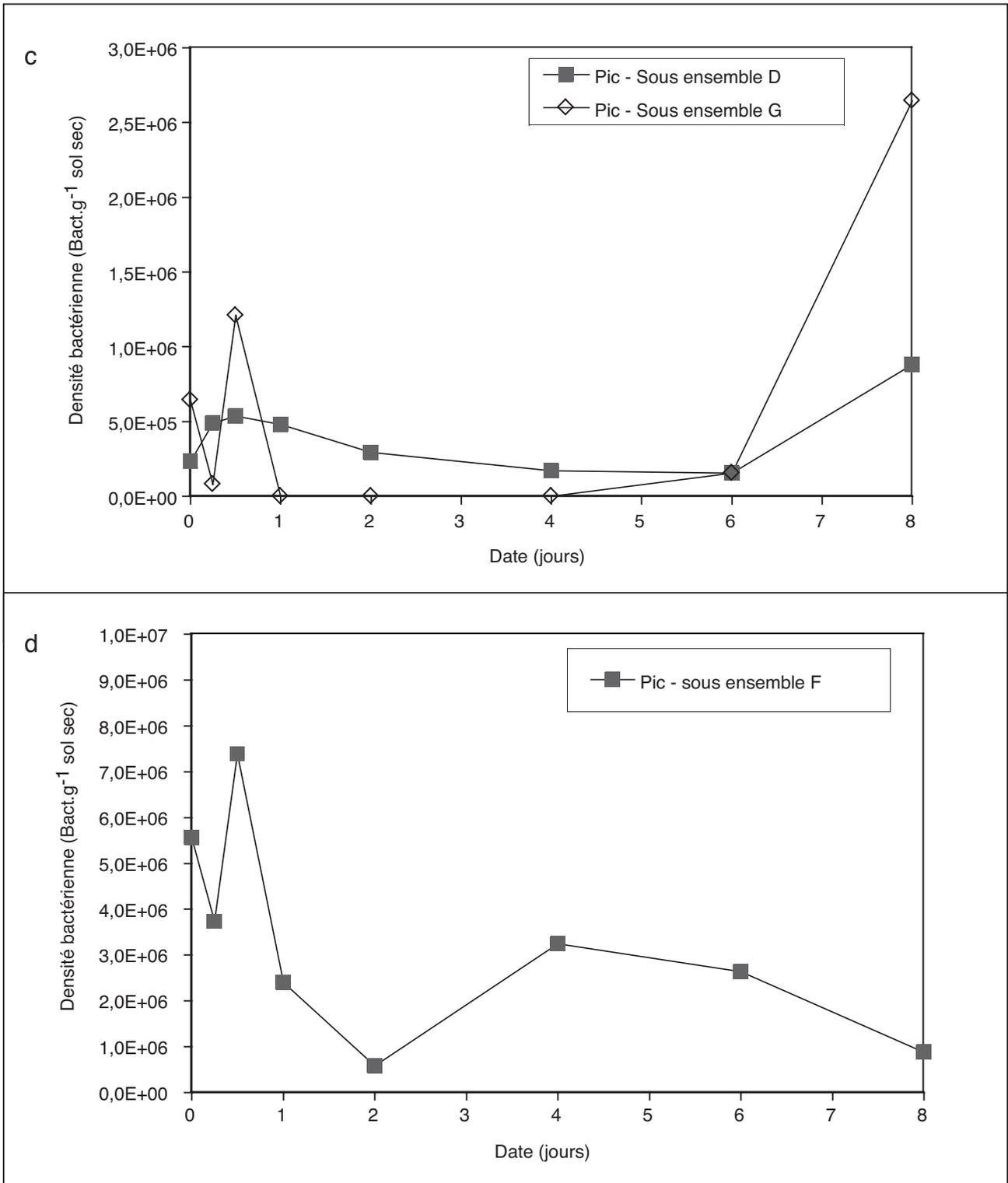


Figure 9 - Representative peaks of each class defined according to the method combining PCR-SSCP and direct cell counts. a/ Representative peak from class A and B, b/ Representative peak from class C and E, c/ Representative peak from class D and G, d/ Representative peak from class F.



- ture-accessible part of an anaerobic digester bacterial community. *Environmental Microbiology*, 4 : pp. 267-275.
- Delbès C., Moletta R. et Godon J.J., 2000 - Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction - single - strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*, 2 : pp. 506-515.
- Delbès C., Moletta R. et Godon J.J., 2001 - Bacterial and archeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 35 : pp. 19-26.
- Diekert G. et Wohlfarth G., 1994 - Metabolism of homoacetogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66: pp. 209-221.
- Dolfing J., 1988. Acetogenesis. *In: Zehnder A.J.B. (Ed.), Biology of Anaerobic Microorganisms*, John Wiley et Sons, pp.417-469.
- Dunbar J., Takala S., Barns S.M., Davis J.A. et Kuske C.R., 1999 - Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied et Environmental Microbiology*, 65 : pp. 1662-1669.
- Förstner U., 1987 - *Metals speciation, separation, and recovery*, Lewis Publishers, Chelsea.
- Godon J.J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F. et Moletta R., 1997a - Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied et Environmental Microbiology*, 63 : pp. 2802-2813.
- Godon J.J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F. et Moletta R., 1997b - Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester. *Water Science et Technology*, 36 : pp. 49-55.
- Hedderich, R., Klimmek O., Kröger A., Dirmeier R., Keller M. et Stetter, K.O., 1999 - Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiology Ecology*, 22 : pp. 353-381.
- Højberg O., Revsbech N.P. et Tiedje J.M., 1994 - Denitrification in soil aggregates analyzed with microsensors for nitrous oxide and oxygen. *Soil Science Society of America Journal*, 58 : pp. 1691-1698.
- Jenkinson D.S.P. et Powlson D.S., 1976 - The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology et Biochemistry*, 8 : pp. 209-213.
- Josephson K.C., Gerba C.P. et Pepper I.L., 2000 - Cultural methods. *In: R. M. Maier, I.L. Pepper, C.P. Gerba (Ed.), Environmental Microbiology*, Academic Press, San Diego, USA, pp. 213-232.
- Kemp P.F. et Aller J.Y., 2003 - Bacterial diversity in aquatic and other environments : what 16S rDNA libraries cant tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, 1600: pp. 1-17.
- Kepner R.L. et Pratt, J.R., 1994 - Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples : past and present. *Microbiological reviews*, 58 : pp. 603-615.
- Kowalchuk G.A., Stienstra A.W., Heilig G.H.J., Stephen J.R. et Woldendorp J.W., 2000 - Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in wet, slightly acid grassland soils using 16S rDNA-analysis. *FEMS Microbiology and Ecology*, 31 : pp. 207-215.
- Küsel K., Wagner C. et Drake H.L., 1999 - Enumeration and metabolic profiles of the anaerobic microflora in the mineral soil and litter of a beech forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 29 : pp. 91-103.
- Lefebvre-Drouet E. et Rousseau M.F., 1995 - Dissolution de différents oxyhydroxydes de fer par voie chimique et par voie biologique : importance des bactéries réductrices. *Soil Biology et Biochemistry*, 27 : pp. 1041-1050.
- Liesack W., Janssen P.H., Rainey F.A., Ward-Rarney N. et Stackebrandt E., 1997 - Microbial diversity in soil : the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. *In: J. D. Van Elsland, Trevors, J.T., Wellington, M.H. (Ed.), Modern Soil Microbiology*, Marcel Dekker, New York, USA, pp. 375-440.
- Lovley D.R., 1995 - Bioremediation of organic metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *Journal of Industrial Microbiology*, 14 : pp. 85-93.
- Lovley D.R., Coates J.D., 2000 - Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance. *Current Opinion in Microbiology*, 3 : pp. 252-256.
- Marschner P., Kandeler E. et Marschner B., 2003 - Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology et Biochemistry*, 35 : pp. 453-461.
- McCaug A.E., Glover L.A. et Prosse J.L., 1999 - Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied et Environmental Microbiology*, 65 : pp. 1721-1730.
- O'Donnell A.G. et Görres H.E., 1999 - 16S rDNA methods in soil microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*, 10 : pp. 225-229.
- Oremland R.S., 1988 - Biogeochemistry of methanogenic bacteria. *In: Zehnder A.J.B. (Ed.), Biology of Anaerobic Microorganisms*, John Wiley et Sons, pp.641-707.
- Panikov N.S., 1995 - *Microbial growth kinetics*. Chapman and Hall, London.
- Parry S., Renault P. et Chenu C., 1999 - Denitrification in pasture and cropped soil clods as affected by pore space structure. *Soil Biology et Biochemistry*, 31 : 493-501.
- Parry S., Renault P., Chadoeuf J., Chenu C. et Lensi R., 2000 - Particulate organic matter as a source of denitrification variability in soil clods. *European Journal of Soil Science*, 51 : pp. 271-281.
- Pelmont J., 1993a - Fermentations en tout genre, *In: Presses Universitaires de Grenoble (Eds), Bactéries et environnement : adaptations physiologiques*, Grenoble, pp. 321-350.
- Pelmont J., 1993b - Les bactéries et les métaux, *In: Presses Universitaires de Grenoble (Eds), Bactéries et environnement : adaptations physiologiques*, Grenoble, pp. 761-768.
- Peters V. et Conrad R., 1996 - Sequential reduction processes and initiation of CH₄ production upon flooding of oxic upland soils. *Soil Biology et Biochemistry*, 28 : pp. 371-382.
- Ponnamperuma F.N., 1972 - The chemistry of submerged soils. *Advances in Agronomy*, 24 : pp. 29-96.
- Rayemaekers L., 2000 - Basic principles of quantitative PCR. *Molecular Biotechnology*, 15 : pp. 115-122.
- Reddy K.R., D'Angelo E.M. et Harris W., 1998 - Biogeochemistry of wetlands. *In: Summer M.E. (Ed.), Handbook of Soil Science*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 89-119.
- Roane T.M. et Pepper I.L., 2000 - Microscopic techniques. *In: R. M. Maier, I.L. pepper, C.P. Gerba (Ed.), Environmental Microbiology*, Academic Press, San Diego, USA, pp. 195-211.
- Scheid D. et Stubner S., 2001 - Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. *FEMS Microbiology and Ecology*, pp. 36 : 2-3.
- Stumm W. et Morgan J.J., 1996 - Kinetics at the solid-water interface : adsorption, dissolution of minerals, nucleation, and crystal growth. *In: John Wiley et Sons (Ed.), Aquatic chemistry. Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, New York. pp. 760-817.
- Teske A., Wawer C., Muyzer G. et Ramsing N.B., 1996 - Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Applied et Environmental Microbiology*, 62 : pp. 1405-1415.
- Torvisk V., Sorheim R. et Goksoyr J., 1996 - Total bacterial diversity in soil and sediment communities - a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 17 : pp. 170-178.
- Vance E.D., Brookes P.C. et Jenkinson D.S., 1987 - An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology et Biochemistry*, 19 : pp. 703-707.
- Vavilin V.A., Rytov S.V. et Lokshina L.Y., 1996 - A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresources Technology*, 56 : pp. 229-237.

- Weber S., Stubner S. et Conrad R., 2001 - Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 : pp. 1318-1327.
- Werf H. van de et Verstraete W., 1987a - Estimation of active soil microbial biomass by mathematical analysis of respiration curves : development and verification of model. *Soil Biology and Biochemistry*, 19 : pp. 253-260.
- Werf H. van de et Verstraete W., 1987b - Estimation of active soil microbial biomass by mathematical analysis of respiration curves : calibration of the test procedure. *Soil Biology and Biochemistry*, 19 : pp. 261-265.
- Widdel F., 1988 - Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria. *In*: Zehnder A.J.B. (Ed.), *Biology of Anaerobic Microorganisms*, John Wiley et Sons, pp.469-587.
- Wintzingerode F.V., Göbel U.B. et Stackebrandt E., 1997 - Determination of microbial diversity in environmental samples : pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21 : pp. 213-229.
- Witt C., Gaunt J.L., Galicia C.C., Ottow J.C.G. et Neue H.U., 2000 - A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. *Biology and Fertility of Soils*, 30 : pp. 510-519.
- Zumstein E., Moletta R. et Godon J.J., 2000 - Examination of two years community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*, 2 : pp. 69-78.

