

Microbiologie de l'émission du méthane par les sols de rizière

Projet de recherche ECLAT
Rapport final (Dec. 1996)

P.A. Roger, J. LeMer, C.Joulian, S. Escoffier

ORSTOM

Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération

Laboratoire ORSTOM de Microbiologie des Anaérobies (LOMA)
Université de Provence, CESB/ESIL, Case 925, 163 Avenue de Luminy,
F-13288, Marseille Cedex 9 FRANCE

Tel.: 91 82 85 71, Fax.: 91 82 85 70, E-Mail: rogerpa@loma.orstom.fr

1. INTRODUCTION

Le méthane est l'un des gaz atmosphériques responsables du réchauffement de la biosphère par effet de serre. Un triplement de sa concentration durant les cent dernières années expliquerait environ 25% de l'accroissement de 0,7°C de la température de la biosphère observé au cours de cette période. Les implications écologiques possibles de cet accroissement de température (effets sur la végétation, sur le niveau des océans ...) ont été discutées dans les revues scientifiques et abondamment vulgarisées par les médias.

L'émission de méthane par les sols est le résultat de deux activités microbiennes antagonistes: la méthanogénèse, productrice de méthane, et la méthanotrophie, consommatrice de méthane.

La méthanogénèse est un phénomène strictement anaérobie qui se développe dans les environnements anoxiques des milieux naturels ou cultivés et dans les organismes vivants. Les processus physico-chimiques et les étapes de l'établissement de conditions anaérobies permettant la méthanogénèse dans les sols sont relativement bien connus.

La réoxydation du méthane par les bactéries méthanotrophes est un processus aérobie qui se développe dans les zones oxydées du sol et dans la rhizosphère des plantes submergées. Des travaux sur l'émission de méthane par les rizières indiquent que seulement environ un quart du méthane produit est libéré dans l'atmosphère et indiquent l'importance écologique de la méthanotrophie.

Les rizières inondées constituent le biotope cultivé le plus important en termes d'émission de méthane. Pour assurer les besoins de la population mondiale, la production annuelle de riz doit augmenter d'environ 60% en trente ans ce qui devrait augmenter significativement la production de méthane par les rizières si des pratiques culturales adéquates ne sont pas mises au point.

Dans les études de l'émission du méthane par les sols de rizière, la microbiologie est l'aspect le moins étudié. Il n'existe que deux études présentant des numérations et trois études rapportant l'isolement et la caractérisation de bactéries méthanogènes des sols de rizières. Trois genres (*Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* et *Methanosarcina*) ont été isolés alors qu'on connaît au moins 18 genres de méthanogènes. Deux espèces de bactérie méthanotrophe a été isolée d'un sol de rizière (*Methylosinus sporium* et *Methylocystis* sp.). Il n'existe pratiquement pas de données quantitatives sur les populations de méthanotrophes dans les sols exondés ou submergés car les méthodes de numération demandent à être élaborées et validées.

La rareté des données qualitatives et quantitatives sur les populations de méthanogènes et de méthanotrophes, et sur leur dynamique dans les sols et la rhizosphère, constitue un obstacle certain à la compréhension des mécanismes impliqués et à la mise au point de méthodes culturales permettant de diminuer l'émission de méthane par les rizières irriguées.

2. OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif principal de la partie du projet bénéficiant d'un financement par le projet ECLAT était la mise au point des méthodes pour étudier l'écologie microbienne des flores méthanogènes et méthanotrophes dans des sols ayant un potentiel élevé d'émission de méthane et l'application de ces méthodes à un échantillonnage représentatif de sols de rizières inondées. Les études réalisées et les études en cours ont pour but de déterminer (1) la nature et la diversité des populations concernées, (2) la localisation fine des différents types d'organismes dans l'écosystème (3) les potentiels méthanogène et méthanotrophe de sols représentatifs, (3) des relations entre d'une part les propriétés physico-chimiques des sols et d'autre part les microflores et les potentiels méthanogènes et méthanotrophes.

Les bénéfices attendus sont: (1) la connaissance des microflores responsables de l'émission de méthane par les sols submergés et de leur écologie, (2) une contribution à la mise au point de méthodes pour diminuer l'émission de méthane par les sols et (3) l'isolement de souches de bactéries pouvant présenter un intérêt industriel pour la méthanogénèse et la dépollution.

Ces études sont conduites en collaboration avec l'International Rice Research Institute aux Philippines.

3. RESULTATS OBTENUS

3.1. Etablissement d'une base de données bibliographique informatisée

Environ 2000 références ont été répertoriées dans un programme "Hypercard". Les tirés à part de la majorité des articles sont disponibles au laboratoire. Les références concernent les sujets suivants:

- Emission de méthane, méthanogénèse et méthanotrophie dans les sols et les environnements naturels.
- Bactéries méthanogènes et méthanotrophes, physiologie, écologie, taxonomie.
- Biodépollution par les bactéries méthanotrophes.

3.2. Mise au point méthodologiques

L'objectif était la mise au point de méthodes standardisées pour (1) la numération des microflores méthanogènes et méthanotrophes, (2) l'isolement des souches dominantes, et (3) l'estimation du potentiel méthanogène et méthanotrophe dans des échantillons de sol.

3.2.1. Enumération et isolement des bactéries méthanogènes

La numération sur boîtes de Pétri, bien que techniquement possible pour les bactéries anaérobies, n'a pas été retenue car elle est d'un emploi extrêmement malaisé et coûteux et est peu adaptée aux études de séries d'échantillons de sols.

Une méthode de numération des différents groupes trophiques de méthanogènes a été établie à partir des techniques classiques de Hungate pour la cultures des anaérobies en tubes de milieu liquide suivant le principe des numérations par la détermination du nombre le plus probable de bactéries (MPN). Les groupes trophiques sont énumérés sur quatre milieux sélectifs (H_2/CO_2 , formate, méthanol, acétate). La croissance dans chaque tube est estimée par comparaison du CH_4 produit après six et huit semaines dans le tube enrichi en substrat sélectif et un contrôle non enrichi en substrat.

Les souches dominantes sont isolées à partir des derniers tubes positifs par un minimum de trois repiquages successifs en roll-tubes. Elles sont ensuite testées simultanément pour leur pureté et leur métabolisme sur 11 milieux spécifiques.

La méthode présente l'avantage de permettre la quantification des différents groupes trophiques et l'isolement des souches dominantes de ces différents groupes.

Les inconvénients de la méthode sont:

- sa lourdeur, résultant d'une part de la lenteur de la croissance de certains groupes trophiques et surtout du grand nombre de substrats à tester et donc du grand nombre de tubes à préparer et à inoculer.
- le fait que les données quantitatives obtenues pour chaque groupe trophique ne peuvent être additionnées pour déterminer un nombre total de bactéries méthanogènes dans la mesure où certaines espèces appartiennent à plusieurs groupes trophiques.
- le fait que les valeurs quantitatives obtenues pour les populations d'acétotrophes sont forcément largement sous-estimées car ce groupe comporte des sarcines qui forment des agrégats très cohérents qui sont difficiles à séparer en cellules individuelles.

3.2.2. Caractérisation de l'activité méthanogène potentielle d'un sol

L'activité méthanogène potentielle est estimée par la mesure de la production de méthane à partir d'un sol sec remis sous eau avec et sans addition de paille (1%) et incubé sous azote pendant six semaines.

3.2.3. Enumération et isolement des bactéries méthanotrophes

Les deux techniques classiques d'énumération des microorganismes dans les sols ont été testées pour quantifier les populations de bactéries méthanotrophes: comptages sur milieu solide en boîtes de Pétri (53 énumérations sur 7 sols) et MPN (70 énumérations sur 18 sols).

3.2.3.1. *La méthode par comptage de colonies sur boîtes de milieu gélosé* se heurte à un problème majeur: il n'existe pas de milieux sélectifs pour les méthanotrophes qui sont des microorganismes autotrophes dont certains peuvent fixer l'azote. L'incubation des boîtes inoculées, dans des enceintes closes, sous atmosphère air/méthane, conduit au développement de contaminants: bactéries, champignons et actinomycètes. Les colonies de contaminants bactériens sont largement supérieures en nombre à celles des bactéries méthanotrophes. Les formes mycéliennes et pseudo mycéliennes envahissent rapidement les boîtes et interdisent les comptages.

Nous avons cherché à estimer les populations de méthanotrophes par la différence des comptages obtenus sur des boîtes incubées dans une atmosphère avec et sans méthane, en utilisant un milieu susceptible de limiter le plus possible le développement des contaminants. Dans ce but, nous avons testé trois types d'agents gélifiants et 13 inhibiteurs dont 11 antibiotiques. Les conclusions de ces expériences sont:

- Des supports solides non gélosés ne résolvent pas les problèmes de contamination, due principalement à la nature des méthanotrophes et au milieu de culture. Le silicagel, long à préparer, est trouble ce qui rend difficile le repérage des colonies. Le "phytagel" amplifie les contaminations.
- L'utilisation de certains antibiotiques et du cristal violet permet de diminuer la contamination par les champignons et les actinomycètes. Par contre ces agents réduisent, à différents degrés, les populations de méthanotrophes.
- Quelque soit la dilution de sol, on observe toujours le développement de contaminants bactériens qui apparaissent dès le troisième jour d'incubation. Il est impossible de distinguer les colonies de méthanotrophes des colonies de contaminants.
- Dans les sols secs, en raison du faible pourcentage de bactéries méthanotrophes présentes et de la variabilité des comptages, leur population ne peut être estimée par la différence des comptages obtenus sur des boîtes incubées dans une atmosphère avec et sans méthane. Les mesures ne sont pas reproductibles, et des valeurs estimées négatives sont fréquentes.
- Dans les sols enrichis en bactéries méthanotrophes par préincubation sous méthane, une estimation à 10 jours, avant l'apparition des champignons, est statistiquement reproductible mais est généralement inférieure de dix fois aux valeurs obtenues par la méthode des MPN.

3.2.3.2. *L'estimation des populations de méthanotrophes par le MPN* déterminé à partir de la mesure de l'oxydation du méthane contenu dans les tubes, permet d'effectuer des dénombrements reproductibles aussi bien sur des échantillons de sols secs contenant de faibles populations (10^2 - 10^4 g⁻¹ sol sec) que sur des échantillons préincubés sous méthane et contenant des populations pouvant atteindre 10^{10} g⁻¹ sol sec). Les coefficients de variation estimés sur 18 sols secs vont de 0 à 19% avec une valeur moyenne inférieure à 10%.

3.2.3.3. *Isolement des souches.* La méthode des MPN, qui permet d'estimer les populations de méthanotrophes, permet également d'isoler la souche dominante à partir des derniers tubes positifs.

L'isolement des autres souches doit être effectué par étalement sur boîtes. La mise en évidence des colonies méthanotrophes de type II est facilitée par le fait qu'elles se colorent en rouge foncé en présence de cristaux de naphthalène et de o-dianizidine.

Après plusieurs étapes de purification, le matériel microbien obtenu est souvent polymorphe. Il est difficile de savoir s'il s'agit de souches pures polymorphes ou de mélanges de souches. Il n'existe pas de critères d'identification simples pour éliminer les souches identiques.

La culture des souches pose de sérieux problèmes car les cultures repiquées en milieu liquide peuvent nécessiter plus de deux mois pour se développer et cette croissance est souvent suivie d'une lyse rapide après la phase exponentielle.

3. 2.4. Caractérisation de l'activité méthanotrophe potentielle d'un sol

Les expériences ont montré que l'activité méthanotrophe (consommation de méthane) in vitro d'un sol:

- est un phénomène d'interface: au delà d'une quantité de sol correspondant à une épaisseur de plus de 10mm , la quantité de méthane consommée n'est pas proportionnelle à la quantité de sol incubé.
- dépend étroitement de la teneur en eau du sol; un optimum est atteint pour des valeurs voisines de la capacité au champ.
- passe par un maximum au cours de l'incubation puis décroît (courbe en cloche). Pour un sol conservé sec, ce maximum et le temps nécessaire pour l'atteindre sont constants pendant plusieurs mois. Ces deux paramètres varient suivant les sols .
- est en étroite corrélation avec la consommation d'oxygène et la production de CO₂. Les équations des régression deux à deux varient avec le sol et l'on peut définir une "stoechiométrie" de la méthanotrophie pour chaque sol .

La consommation maximum de méthane mesurée dans un flacon par unité de surface et par unité de temps, le temps nécessaire pour l'atteindre et la stoechiométrie de la réaction permettent de caractériser le potentiel méthanotrophe d'un sol.

La méthode est d'un emploi facile. Elle a cependant l'inconvénient d'utiliser en début d'incubation une concentration en méthane (20%) qui est supérieure à celle généralement rencontrée dans les environnements naturels.

3.3. Microbiologie de l'émission du méthane dans un sol de rizière de Camargue

Les méthodes décrites ci dessus ont été appliquées à un sol de rizière de Camargue sur lequel nous avons également testé la dynamique de la décomposition anaérobie de substrats organiques (paille, algues, cellulose, xylane).

Les énumérations de méthanogènes effectuées sur le sol de Camargue indiquent que les populations sont de l'ordre de $10^3 - 10^4 \text{ g}^{-1}$ sur sol sec, $10^3 - 10^5$ sur sol conservé sous eau et $10^4 - 10^6$ sur sol incubé sous eau après addition de paille de riz. Les comptages les plus élevés sont obtenus sur

formate et H_2/CO_2 . Les populations de bactéries méthanogènes se conservent en aérobiose dans le sol séché sans diminution importante de la densité pendant plusieurs mois.

Les études montrent la présence des genres *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina* et *Methanospirillum*. Les souches dominantes ont été axénisées. Un bâtonnet hydrogénotrophe non formatotrophe a été isolé sur H_2/CO_2 ; il se rapproche phénotypiquement de *Methanobacterium uliginosum*. Une souche du genre *Methanosarcina* a été isolée sur méthanol. Un bâtonnet du genre *Methanobacterium* et des cocci ont été isolés sur formate.

L'étude de la décomposition de cellulose dans le sol de Camargue a mis en évidence l'existence d'une succession de deux types d'activités méthanogènes. Au cours d'un premier stade d'environ 300 heures ce sont surtout les bactéries hydrogénotrophes qui sont impliquées dans la méthanogénèse. Cette activité empêche l'accumulation d'hydrogène dans le milieu et permet la mise en place d'une microflore acétotrophe qui se traduit par une augmentation significative de la méthanogénèse. Dans le cas de la décomposition du xylane, substrat plus facilement métabolisable, on observe une acidification rapide du milieu qui inhibe l'activité des méthanogènes pendant plus de 150 heures.

Le suivi de la production de méthane par le sol de Camargue a montré des variations qui laissaient supposer l'existence d'une oxydation anaérobie du méthane dans ce sol. Les recherches entreprises pour vérifier l'existence d'un tel mécanisme n'ont pas abouti.

Nos résultats sont les premiers à mettre en évidence l'existence d'une flore méthanogène complexe et la présence de bactéries du genre *Methanospirillum* dans un sol de rizière.

Les estimations des populations de méthanotrophes sont de l'ordre de 10^3 g⁻¹ de sol poids sec sur sol sec, 10^5 sur sol incubé sous eau et une atmosphère à 20% de méthane, et 10^9 sur sol humide (20% eau) incubé sous une atmosphère à 20% de méthane.

Une trentaine de colonies méthanotrophes ont été collectées et sont utilisées pour des essais de purification. Deux souches ont été purifiées par repiquages successifs sur milieu Whittenbury gélosé, en présence d'actidione. La première est un coccobacille mobile, polymorphe, à cystes ovales qui forme des colonies muqueuses faiblement pigmentées, à croissance lente et préfère des teneurs en oxygène inférieures à 12%. La seconde est un bacille immobile, sans forme de résistance observée, formant des colonies blanches, à croissance rapide, et peu sensible aux teneurs en oxygène.

Les activités méthanogènes maximales mesurées sur le sol de Camargue correspondent grossièrement à la production de 19 kg de méthane par hectare et par jour dans un sol non enrichi en matière organique et 130 kg dans un sol enrichi en paille.

Les activités méthanotrophes potentielles sont d'environ 0,2 moles m⁻² jour⁻¹ pour le sol submergé et 1,5 moles m⁻² jour⁻¹ pour le sol à la capacité au champ et enrichi en azote. Cette dernière valeur est extrêmement élevée puisqu'elle correspondrait à une consommation d'environ 240 kg de méthane par hectare et par jour. Ces résultats démontrent que la microflore méthanotrophe présente dans le sol de Camargue a le potentiel suffisant pour réoxyder la totalité du méthane formé dans le sol.

4. ETUDES EN COURS

4.1. Ecologie des microflores et des potentiels méthanogènes et méthanotrophes dans les sols de rizière

Des énumérations de populations de méthanogènes et méthanotrophes et des mesures des potentiels méthanogène et méthanotrophe ont été effectuées sur 18 sols de rizière provenant de six pays (Australie, Trinidad, Californie, Colombie, France et Philippines). Une douzaine de sols reste à étudier.

Les résultats des numérations de méthanogènes sont de l'ordre de 10^3 à 10^6 bactéries par gramme de sol sec. Les comptages les plus élevés sont obtenus pour les populations d'hydrogénotrophes. Les activités méthanogènes potentielles varient de 0,1 à 2 $\mu\text{moles g}^{-1}$ sol sec jour⁻¹ pour les sols incubés sans paille et de 3 à 8 $\mu\text{moles g}^{-1}$ sol sec jour⁻¹ pour les sols incubés avec 1% de paille. A titre indicatif, une production de 1 $\mu\text{mole g}^{-1}$ sol sec jour⁻¹ correspond grossièrement à 19 kg de méthane ha⁻¹ jour⁻¹.

Les populations de méthanotrophes dénombrées sur sol sec sont relativement faibles (entre 10^2 et 10^4 ; médiane $5 \cdot 10^3$). Une préincubation du sol sous méthane permet pour certains sols d'arriver à des densités de l'ordre de 10^{10} bactéries par gramme de sol sec, ce qui traduit un important pouvoir inducteur du méthane sur le développement de ces populations. Toutefois nous avons également rencontré des sols dans lesquels la méthanotrophie reste pratiquement nulle ou extrêmement faible malgré une incubation prolongée sous méthane. Les activités méthanotrophes potentielles ont une valeur médiane de 0,4 moles m⁻¹ jour⁻¹.

Les propriétés physico-chimiques des sols utilisés sont en cours de détermination à l'IRRI. L'objectif est d'étudier les corrélations entre ces propriétés et les populations et activités potentielles méthanogènes et méthanotrophes afin de définir différents groupes de sol en fonction de leurs potentialités pour l'émission de méthane.

4.2. Dynamique des microflores méthanogène et méthanotrophe au cours du cycle cultural

De septembre à décembre 1995, Catherine Joulian a effectué à l'IRRI une étude in situ de la dynamique des populations et des activités potentielles méthanogènes et méthanotrophes dans deux rizières expérimentales soumises l'une à une submersion continue, l'autre à une submersion intermittente. Simultanément l'émission de méthane a été estimée dans les parcelles au moyen d'un dispositif automatisé, mis en place par l'IRRI. Les derniers prélèvements pour l'étude microbiologique sont en cours d'analyse et les mesures permettant le calcul de l'émission de méthane sont en cours de traitement.

Cette expérience permettra de mettre en relation la dynamique des populations et des activités potentielles méthanogènes et méthanotrophes avec une mesure de la dynamique de l'émission du méthane par la rizière.

5. ORIENTATION PREVUE DES RECHERCHES

Trois thèmes sont prévus pour la poursuite des recherches:

- Caractérisation de la biodiversité des bâtonnets méthanogènes isolés de sols de rizière par le séquençage de l'ARN 16S.
- Localisation des bactéries méthanotrophes dans les microenvironnements de la rizière au moyen de sondes moléculaires.
- Etude du potentiel des souches méthanotrophes isolées de sols de rizière pour la biodépollution.

Les deux premiers thèmes seront poursuivis en collaboration avec l'Université Griffith de Brisbane (Australie). Le troisième thème sera poursuivi en collaboration avec le laboratoire de Chimie de l'Environnement de l'Université de Provence et l'implantation ORSTOM de l'Université Autonome de Mexico.

6. PUBLICATIONS

6.1. Articles publiés

Neue HU, Roger PA (1994) Potential of methane emission in major rice ecologies. Pages 65-93 in Climate Biosphere interaction: Biogenic emissions and environmental effects of climate change. RG Zepp (ed.), John Wiley and Sons (Pub.)

Joulian C, Le Mer J, Escoffier S, Neue H-U, Lantin R, Roger PA (1995) Microbiological aspects of methane emission in wetland rice soils. Paper presented at the Workshop "Methane emissions from ricefields" organized by US Environmental protection Agency, UNDP, and IRRI, 19-26 Nov. 1995, Chonburi, Thailand.

6.2. Articles soumis

C. Joulian, B. Ollivier, H.U. Neue, P.A. Roger (1996) Microbiological aspects of methane emission by a ricefield soil of Camargue (France) : 1. Methanogenesis and related microflora . Eur. J. Soil Biol.

J. Le Mer, S. Escoffier, C. Chessel, P.A. Roger (1996) Microbiological aspects of methane emission in a ricefield soil of Camargue (France) : 2. Methanotrophy and related microflora. Eur. J. Soil Biol.

6.3. Articles en cours de rédaction

S. Escoffier, Le Mer J, Roger PA (1996) Enumeration and isolation of methanotrophic bacteria in soils by plating and MPN techniques : A critical approach.

Joulian C, Lantin R (1996) Dynamics of methanogens, methanogenic potential and methane emission during a crop cycle in ricefields submitted to continuous and intermittent flooding.