

Milieux sélectifs pour la numération des algues eucaryotes, procaryotes et fixatrices d'azote

PAR

Pierre Adrien REYNAUD et Pierre Armand ROGER

Centre O.R.S.T.O.M., Dakar-Hann - B.P. 1386 Dakar - République du Sénégal

I. — INTRODUCTION

Dans le but d'étudier les variations absolues et relatives des Cyano-phycées en sol de rizière nous avons recherché une méthode et des milieux permettant l'évaluation optimale des Algues classées en trois catégories :

- Algues procaryotes fixatrices d'azote ;
- Algues procaryotes non fixatrices d'azote ;
- Algues eucaryotes.

A) Choix d'une méthode de numération :

L'évaluation quantitative des Algues dans un milieu donné peut être effectuée par comptage direct au moyen d'un hématimètre (UTERMOHL, 1958) ou par des méthodes indirectes consistant à réaliser des cultures à partir de suspensions-dilutions (POCHON, 1962).

La méthode par comptage direct permet à la fois une évaluation qualitative et quantitative de la flore ; elle est facilement applicable aux eaux. Par contre elle est plus difficilement utilisable pour les sols car les particules minérales et organiques gênent le comptage. D'autre part cette méthode ne permet un isolement rapide des organismes que si l'on dispose d'un micromanipulateur.

Les méthodes de numération indirectes font appel à l'ensemencement de tubes de milieux liquides ou de boîtes de milieux gélosés au moyen de suspensions-dilutions.

L'utilisation des milieux liquides pour la détermination du nombre le plus probable de germes au moyen des tables de Mac GRADY présente l'avantage de demander peu de manipulations et de permettre une lecture rapide.

Toutefois cette méthode n'est pratiquement pas utilisable si l'on veut évaluer la biomasse d'une population hétérogène. En effet le résultat obtenu correspondra à l'espèce dont les unités de comptage (colonie, filament ou cellule suivant les organismes) sont les plus nombreuses et qui n'est pas forcément celle dont la biomasse est la plus importante.

Reçu le 24-3-76.

23 MAI 1978
O. R. S. T. O. M. M
Collection de Références
9153 Bio Sols

Considérons par exemple la numération d'une population composée de *Chlorella* sp. et de *Spirogyra* sp. comportant cent fois moins de filaments de *Spirogyres* que de cellules de *Chlorelles*.

Prenons comme valeur moyenne de la biomasse d'un filament de *Spirogyre* $7,6 \cdot 10^6 \mu^3$ et $3,8 \cdot 10^2$ pour celle d'une cellule de *Chlorelle* (ROGER-REYNAUD, 1976). On voit que la biomasse des *Spirogyres* dans le mélange sera deux cent fois plus importante que celle des *Chlorelles* alors que le nombre de filament de *Spirogyres* est égal à 10^{-2} fois celui des cellules de *Chlorelles* qui constitueront la totalité de la flore développée dans les tubes des deux dernières dilutions positives.

Pour évaluer avec exactitude la biomasse du mélange il faudrait donc examiner successivement au microscope tous les tubes inoculés afin de déterminer toutes les espèces présentes ; cette opération est nettement plus facile à réaliser après un étalement sur boîte des suspensions-dilutions. C'est donc cette dernière méthode que nous avons retenue.

B) Facteurs sélectifs.

Pour évaluer de façon satisfaisante les différents composants de la flore Algale d'un biotope donné il est préférable d'utiliser des milieux et (ou) des conditions d'incubation sélectifs.

On pourra ainsi mettre en évidence les composants minoritaires masqués par les composants dominants et le comptage de chaque type d'Algue sera effectué à la dilution optimale.

De plus on limitera les phénomènes de compétition qui peuvent être une source d'erreur dans les évaluations.

Les principaux facteurs sélectifs sont les suivants :

1° Azote

Un milieu sans source d'azote ne permet théoriquement que le développement des formes fixatrices (ALLEN et STANIER, 1968).

2° Température

Une température d'incubation élevée (35° C) favorise le développement des Algues procaryotes et ralentit celui des Algues eucaryotes.

A une température plus basse (25° C) c'est l'inverse qui se produit (ALLEN et STANIER, 1968).

3° Antibiotiques

L'utilisation d'antibiotiques spécifiques permet la séparation entre Algues procaryotes et Algues eucaryotes :

— L'actidione (cycloheximide), inhibiteur de la synthèse de la membrane nucléaire, est sans effet sur les Cyanophycées alors que, suivant la concentration (1 à 200 ppm) il inhibe totalement ou partiellement les Algues eucaryotes (HUNTER et McVEIGH, 1961). Une concentration de 20 ppm est utilisée par JACKSON et CAESTENHOLZ (1975) pour éliminer les Algues eucaryotes.

— L'anisomycine présente des propriétés voisines mais à l'inconvénient d'être sans action sur certaines Algues eucaryotes telles que des Xantophycées (HUNTER et McVEIGH, 1961).

— A l'opposé, le chloramphénicol, utilisé à une concentration de 80 ppm, inhibe le développement des Algues procaryotes et permet le développement des Algues eucaryotes (JACKSON et CASTENHOLZ, 1975). DROOP (1967) l'emploie à des concentrations comprises entre 1 et 50 ppm pour purifier des Algues eucaryotes.

— La bacitracine inhibe le développement des Cyanophycées à des concentrations qui sont sans effet sur les Chlorophycées et les Bacillariophycées (HUNTER et McVEIGH, 1961).

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons cherché à mettre au point des milieux sélectifs permettant le dénombrement des Algues réparties en :

Procaryotes fixatrices

Procaryotes non fixatrices

Eucaryotes.

Le milieu de culture de base est le milieu BG 11 (ALLEN et STANIER, 1968) utilisé soit tel quel (GN) soit après omission du nitrate de sodium (GO). Ce milieu, gélosé à 1 % est réparti à raison de 30 ml par boîte de Pétri. Les boîtes sont inoculées par 1 ml de suspension-dilution soigneusement étalé au moyen d'un étaloir en verre.

Les incubations sont faites sous une intensité lumineuse de 500 lux produite par des tubes au néon type lumière du jour (MAZDAFLUOR 40 W).

Au cours de l'incubation on fait subir tous les trois jours une permutation aux boîtes de Pétri afin d'éliminer toute hétérogénéité due à la position relative des boîtes dans l'étuve.

Les comptages sont effectués après 21 jours d'incubation sous un microscope stéréoscopique (Wild M5 grossissement : 15×12). Dans certains cas on effectue à 10 et 15 jours d'incubation des comptages de contrôle.

Les différents facteurs sélectifs testés ont été les suivants :

- Présence ou non d'azote dans le milieu de culture ;
- Actidione (cycloheximide) Sigma C-6255 ;
- Chloramphénicol Sigma C-0378 ;
- Bacitracine Sigma B-0125.

Nous avons utilisé les inoculum suivants :

- Une souche unialgale d'*Anabaena* sp. isolée d'un sol de rizière de Casamance (Sud du Sénégal) ;
- Une souche unialgale de *Pseudanabaena catenata* isolée d'un sol de rizière de la région du Fleuve (Nord du Sénégal).
- Une souche unialgale d'*Aphanothece* sp. isolée d'un sol de rizière de Casamance ;
- Une souche unialgale de *Chlorella* sp. isolée d'un sol organique submergé de la région du Cap Vert (Sénégal) ;
- Le mélange de ces quatre souches ;
- Deux sols de la région du Fleuve ;
- Pour l'étude de l'action de la bacitracine nous avons utilisé en plus huit sols de rizière dont quatre sols argileux organiques et quatre sols à texture sableuse.

III. — RÉSULTATS

A) Azote.

En ce qui concerne les Algues eucaryotes et procaryotes non fixatrices de N_2 , le développement des différents inoculum testés parallèlement sur milieu GN et GO peut être schématiquement divisé en trois stades :

— Pendant la première semaine d'incubation on observe un développement à peu près identique sur GN et sur GO.

— Au cours de la deuxième semaine d'incubation, les Algues non fixatrices ne se développent plus sur le milieu GO mais gardent leur coloration.

— Au cours de la troisième semaine on observe la décoloration des formes non fixatrices sur milieu GO, et après 21 jours d'incubation il n'y a plus d'ambiguïté pour le comptage.

En ce qui concerne les Algues procaryotes fixatrices d'azote, on observe une excellente corrélation entre les numérations effectuées avec et sans source d'azote combiné. La comparaison a porté sur quinze couples de valeurs ; les points se répartissent suivant une droite d'équation $\log y = \log x$ (Fig. 1).

Pour chaque couple aucune valeur ne diffère significativement de l'autre : (ROGER et REYNAUD, 1976) le rapport de la valeur la plus élevée à la valeur la plus faible reste inférieur à 2 pour 13 des points et est compris entre 2 et 2,4 pour les deux points s'écartant le plus de la droite de régression.

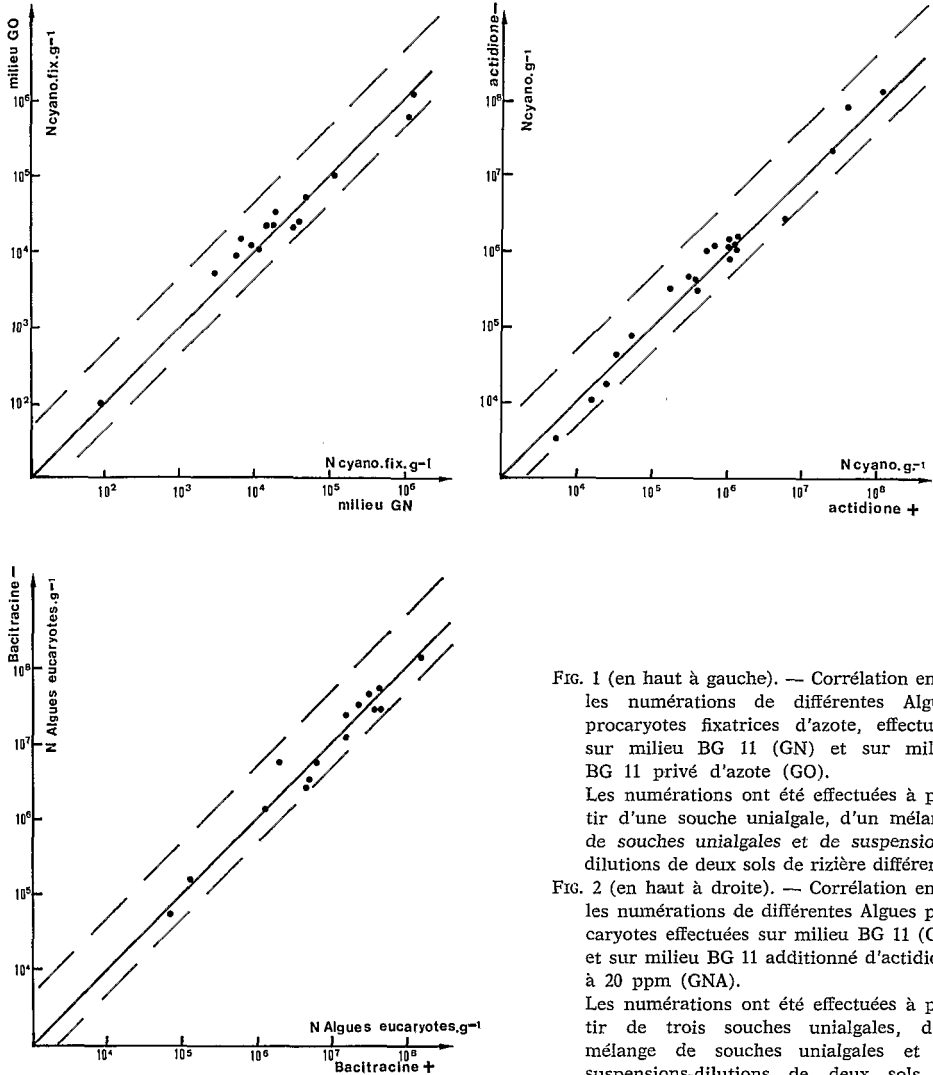


FIG. 1 (en haut à gauche). — Corrélation entre les numérations de différentes Algues procaryotes fixatrices d'azote, effectuées sur milieu BG 11 (GN) et sur milieu BG 11 privé d'azote (GO).

Les numérations ont été effectuées à partir d'une souche unialgale, d'un mélange de souches unialgales et de suspensions-dilutions de deux sols de rizière différents.

FIG. 2 (en haut à droite). — Corrélation entre les numérations de différentes Algues procaryotes effectuées sur milieu BG 11 (GN) et sur milieu BG 11 additionné d'actidione à 20 ppm (GNA).

Les numérations ont été effectuées à partir de trois souches unialgales, d'un mélange de souches unialgales et de suspensions-dilutions de deux sols de rizière différents.

FIG. 3 (en bas). — Corrélation entre les numérations de différentes Algues eucaryotes effectuées sur milieu BG 11 (GN) et sur milieu BG 11 additionné de bacitracine à 15 ppm (GNB).

Les numérations ont été effectuées à partir de suspensions-dilutions de 8 sols de rizière différents.

B) Actidione.

Utilisé à une concentration de 20 µg/ml, l'actidione provoque une inhibition totale des Algues eucaryotes sur les trois types d'inoculum utilisés : culture unialgale, mélange de souches et sols.

Par contre la croissance des Algues procaryotes n'est pas affectée et l'on observe une excellente corrélation entre les numérations effectuées avec et sans actidione. La comparaison a porté sur 21 couples de valeurs (Fig. 2) ; les points se répartissent suivant une droite d'équation $\log y = \log x$.

Pour chaque couple aucune valeur ne diffère significativement de l'autre : le rapport de la valeur la plus élevée à la valeur la plus faible reste inférieur à 2 pour 19 des points, et est compris entre 2 et 2,7 pour les deux points s'écartant le plus de la droite de régression.

C) Chloramphénicol.

Le tableau I indique le pourcentage moyen d'inhibition de trois doses de chloramphénicol (20-40-80 µg/ml) sur différents types d'Algues.

TABLEAU I

Action inhibitrice de trois concentrations de Chloramphénicol sur différents types d'Algues eucaryotes et procaryotes. Les valeurs indiquées sont la moyenne de deux résultats exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport à un témoin sans Chloramphénicol

		Concentration en Chloramphénicol µg/ml		
		20	40	80
Procaryotes	<i>Anabaena sp.</i>	76,1	100	100
	<i>Scytonema sp.</i>	100	100	100
	<i>Pseudanabaena catenata</i>	99,9	100	100
	<i>Oscillatoria sp.</i>	100	100	100
	Cyanophycées unicellulaires.....	98,4	100	100
Eucaryotes	Diatomées.....	—	85,9	97,0
	Chlorophycées unicellulaires.....	92,8	93,3	98,0
	Chlorophycées filamenteuses.....	—	96,6	100

Des concentrations de 80 et 40 µg/ml inhibent totalement le développement des Algues procaryotes, mais provoquent également une inhibition partielle ou totale de celui des Algues eucaryotes.

La concentration inférieure (20 µg/ml) commence à permettre un développement des Procaryotes et inhibe encore celui des Eucaryotes.

Dans ces conditions on voit que, bien que les Cyanophycées manifestent une plus grande sensibilité au chloramphénicol que les Algues eucaryotes, cet antibiotique ne peut être utilisé pour effectuer des numérations sélectives ; par contre il peut servir à purifier les Algues eucaryotes.

D) Bacitracine.

Une expérience préliminaire nous a permis de déterminer la concentration optimale à employer (Tabl. II).

TABLEAU II

Résultats de la numération des principaux types d'algues d'un échantillon de sol de rizière sur différents milieux :

GO = milieu BG 11 sans azote

GN = milieu BG 11

GNA = milieu BG 11 avec actidione 20 ppm.

GNB = milieu BG 11 avec bacitracine ; le chiffre placé en indice indique la concentration de bacitracine en ppm.

Les valeurs indiquées correspondent au nombre de germes par cm² de sol.

Milieux	GO	GN	GNA	GNB 2	GNB 4	GNB 8	GNB 16	GNB 32
Diatomées.....	16,3.10 ⁴	16,7.10 ⁴	0	10,0.10 ⁴	9,8.10 ⁴	13,9.10 ⁴	13,3.10 ⁴	11,2.10 ⁴
Chlorophycées unicellulaires.....	46,7.10 ⁵	50,0.10 ⁵	0	—	57,0.10 ⁵	31,0.10 ⁵	46,0.10 ⁵	50,0.10 ⁵
<i>Anabaena</i> sp.....	24,7.10 ³	13,0.10 ³	15,3.10 ³	26,3.10 ³	16,7.10 ³	1,0.10 ³	0	0
<i>Pseudanabaena catenata</i>	0	47,3.10 ⁴	41,0.10 ⁴	49,3.10 ⁴	4,3.10 ⁴	0	0	0
Cyanophycées unicellulaires.....	14,0.10 ⁴	13,8.10 ⁴	8,7.10 ⁴	14,7.10 ⁴	14,0.10 ⁴	4,0.10 ⁴	0	0

Une concentration comprise entre 8 et 16 ppm est suffisante pour inhiber les Algues procaryotes sans affecter le développement des Algues eucaryotes.

Les travaux de Hunter et McVeight (1961) ayant montré qu'une concentration de 50 ppm inhibe totalement le développement de certaines diatomées, nous avons choisi une concentration efficace la plus faible possible (soit 15 ppm) et nous l'avons testée sur dix échantillons de sol.

Les résultats montrent que la bacitracine utilisée à une concentration de 15 ppm provoque une inhibition pratiquement totale des Algues procaryotes.

Par contre la croissance des Algues eucaryotes n'est pas affectée, et l'on observe pour ces dernières une excellente corrélation entre les numérations effectuées avec et sans bacitracine (Fig. 3).

La comparaison a porté sur 15 couples de valeurs : les points se répartissent suivant une droite d'équation $\log y = \log x$.

Pour chaque couple aucune valeur ne diffère significativement de l'autre ; le rapport de la valeur la plus élevée à la valeur la plus faible reste inférieur à 2 pour 13 des couples, et est compris entre 2 et 2,8 pour les deux points s'écartant le plus de la droite de régression.

E) Température.

Les sélectivités de l'actidione et de la bacitracine sont largement suffisantes pour ne pas avoir à utiliser deux températures différentes pour les numérations sélectives des procaryotes et des eucaryotes.

Dans le cas des Algues eucaryotes l'utilisation d'une température basse (25° C) s'est même révélée néfaste, la croissance étant ralentie et les colonies étant de plus petite taille que celles qui se sont développées à 35° C, donc plus difficiles à compter. Ceci est à mettre en relation avec le fait que les espèces étudiées sont des espèces tropicales.

IV. — CONCLUSIONS

Trois milieux sélectifs ont été élaborés pour la numération des Algues classées en fonction de leur pouvoir fixateur et de leurs caractères caryotiques.

a) Le milieu BG 11, privé d'azote et additionné de 20 ppm d'actidione ne permet la croissance que des seules Cyanophycées fixatrices d'azote. Toutefois les comptages ne devront être effectués qu'après trois semaines d'incubation, des Cyanophycées non fixatrices pouvant présenter un développement fugace pendant les premiers temps de mise en culture.

b) Le milieu BG 11 additionné de 20 ppm d'actidione ne permet la croissance que des Algues procaryotes et est utilisé pour effectuer la numération de la totalité des Cyanophycées.

c) Le milieu BG 11 additionné de 15 ppm de bacitracine ne permet la croissance que des Algues eucaryotes et est utilisé pour effectuer la numération des Algues autres que les Cyanophycées.

L'utilisation de trois milieux sélectifs oblige à tripler le nombre de manipulations pour effectuer la numération des Algues d'un échantillon de sol donné ; mais cet inconvénient est largement compensé par les avantages suivants :

1. Mise en évidence de composants minoritaires qui seraient masqués par les composants dominants sur milieu non sélectif.
2. Comptage de chaque type d'Algues effectué à la dilution optimale.
3. Limitation des compétitions possibles entre différents groupes.
4. Commodité d'isolement des différentes espèces.

RÉSUMÉ

La numération sélective des Algues classées en procaryotes fixatrices d'azote, procaryotes et eucaryotes peut être effectuée respectivement sur les trois milieux suivants :

- BG 11 sans azote + actidione 20 ppm
- BG 11 + actidione 20 ppm
- BG 11 + bacitracine 15 ppm

Cette méthode présente de nombreux avantages par rapport à la numération sur milieu non sélectif :

- mise en évidence des espèces non dominantes facilitée.
- comptage de chaque type d'Algue effectué à la dilution optimale.
- limitation des compétitions interspécifiques.
- isolement plus facile des colonies.

SUMMARY

Selective enumeration of Algae, classified as nitrogen fixing, procaryotics and eucaryotics, can be made by using the three following media, respectively :

- BG 11 without nitrogen + Cycloheximide 20 ppm
- BG 11 + Cycloheximide 20 ppm
- BG 11 + Bacitracin 15 ppm

The advantages of this method are :

- Easier enumeration of non dominant species.
- Enumeration of the different groups at the optimal dilution.
- Limitation of interspecific competition.
- Easier isolation of algal colonies.

BG 11 (Allen et Stanier 1968)

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN (M. M.) & STANIER (R. Y.), 1968. — Selective isolation of blue-green Algae from water and soil. *J. Gen. Microbiol.*, **51**: 203-209.
- DROOP (M. R.), 1967. — A procedure for routine purification of Algae cultures with antibiotics. *Brit. Phycol. Bull.*, **3**: 295-299.
- HUNTER (E. O.), Jr & McVEIGHT (J.), 1961. — The effect of selected antibiotics on pure culture of Algae. *Am. J. Bot.*, **48**: 179-185.
- JACKSON (J. E.), & CASTENHOLZ (R. W.), 1975. — Habitat fidelity of thermophilic blue-green Algae Department of Biology, Limn. Oc., **20**: 305-322.
- POCHON (J.) & TARDIEUX (P.), 1962. — Technique d'analyse en microbiologie du sol, 111 p. Éditions de la Tourelle, 5, rue Guynemer, St-Mandé, France.
- ROGER (P.) & REYNAUD (P.), 1976. — Dynamique de la population algale au cours d'un cycle de culture dans une rizière sahélienne. *Rev. Écol. Biol. du Sol*, **13**: 545-560.
- UTERMOHL (H.), 1958. — Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, **9**: 1-38.