



HAL
open science

Conception d'une méthode de diagnostic fonctionnel des microbiotes du sol en agriculture grâce à la millifluidique de gouttes

Arthur Goldstein

► To cite this version:

Arthur Goldstein. Conception d'une méthode de diagnostic fonctionnel des microbiotes du sol en agriculture grâce à la millifluidique de gouttes. Chimie analytique. Université Paris sciences et lettres, 2021. Français. <NNT : 2021UPSL038>. <tel-03219526>

HAL Id: tel-03219526

<https://pastel.hal.science/tel-03219526v1>

Submitted on 6 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'École supérieure de physique et de chimie
industrielles de la ville de Paris (ESPCI Paris)

**Conception d'une méthode de diagnostic fonctionnel
des microbiotes du sol en agriculture grâce à la
millifluidique de gouttes**

Soutenue par

Arthur Goldstein

Le 24 Mars 2021

Ecole doctorale n° 388

**Ecole doctorale de Chimie
Physique et de Chimie
Analytique de Paris Centre**

Spécialité

Chimie analytique

Composition du jury :

Fernando, LEAL-CALDERON Professeur, Bordeaux INP	<i>Président et rapporteur</i>
Fabrice, MARTIN-LAURENT Directeur de recherche, INRAE	<i>Rapporteur</i>
Laure, VIEUBLE-GONOD Maîtresse de conférence, AgroParisTech	<i>Examinatrice</i>
Jean, BAUDRY Directeur de recherche, ESPCI Paris	<i>Directeur de thèse</i>
Jérôme, BIBETTE Professeur, ESPCI Paris	<i>Directeur de thèse</i>

Remerciements

Je tiens à remercier Florence Condamine, pour avoir mené avec moi une grande partie des expériences et pour sa conscience professionnelle sans faille.

Je remercie Jean Baudry pour m'avoir encadré au quotidien pendant ces trois années, pour sa disponibilité et pour la formation scientifique qu'il m'a dispensée.

Je remercie également Jérôme Bibette pour ses conseils tout au long de mon doctorat ; Bernard Cabane, pour m'avoir aidé lors de la formulation de mes suspensions colloïdales ; et Hicham et Leïla, pour m'avoir fourni les sols à partir desquels j'ai mené mes expériences et Julie, pour son soutien et ses conseils.

Enfin, je tiens à remercier les membres de MilliDrop, notamment Denis, Elisa, Jairo, Jean-Baptiste et Laurent pour avoir joué le jeu jusqu'au bout ; pour leur disponibilité aussi bien quand il a fallu intervenir sur ma machine que lorsqu'il a fallu répondre à mes interrogations techniques et scientifiques.

Table des matières

1	Introduction générale.....	5
2	Les microorganismes du sol fournissent des services écosystémiques à l'agriculture....	7
2.1	Les microorganismes représentent la majorité de la biomasse des sols	7
2.1.1	Les microbes du sol ont des rôles majeurs en écologie et agronomie	8
2.2	Les microbes du sol sont variés et peu connus.....	10
2.2.1	La phylogénie donne peu d'information sur les fonctions agricoles	11
2.2.2	L'étude des microbiotes des sols a besoin d'outils de caractérisation fonctionnelle	12
2.3	Conclusion.....	13
3	Etat de l'art sur la solubilisation du phosphate en agriculture	14
3.1	Le phosphore est nécessaire à la vie	14
3.2	Les plantes ont besoin de phosphore pour se développer.....	14
3.3	Seule une fraction du phosphore des sols est accessible aux plantes	14
3.3.1	Le phosphore minéral se lie avec des ions métalliques du sol.....	15
3.3.2	Les formes organiques se lient avec les ions métalliques du sol et doivent être hydrolysées	16
3.4	Le phosphore épandu n'est pas toujours intégré au sol	18
3.5	Les microorganismes du sol ont une influence sur la disponibilité du phosphore.....	19
3.5.1	La production d'acides organiques et autres chélatants rend le phosphate disponible	19
3.6	Comment déterminer qu'un microbe solubilise le phosphate ?	21
3.6.1	La voie de la génétique	21
3.6.2	La détection de halos après culture	22
3.7	Conclusion sur la solubilisation du phosphate en agriculture	24
4	Présentation de notre dispositif millifluidique	25
4.1	Qu'est-ce que la millifluidique/microfluidique de goutte ?	25
4.1.1	Généralités.....	25
4.1.2	La microfluidique multi-phases.....	25
4.2	Notre dispositif d'étude : la millifluidique de gouttes MilliDrop.....	27
4.3	Génération d'un train de gouttes dans une machine MilliDrop	28
4.3.1	Préparation de la plaque.....	28
4.3.2	Génération des gouttes (durée totale : environ une heure).....	28
4.3.3	L'incubation (jusqu'à 50h environ)	29
4.3.4	Traitement des données	30
4.3.5	Récupération de gouttes d'intérêt (facultatif)	31
4.4	Les intérêts de notre dispositif	31
5	Validation de la technologie sur l'énumération de microorganismes du sol	32
5.1	L'estimation de la biomasse microbienne du sol.....	32
5.1.1	La mesure d'un nombre de cellules microbiennes :	32
5.1.2	La mesure de la masse de carbone digestible.....	32
5.1.3	La mesure d'une activité métabolique.....	33

5.1.4	La mesure de la quantité d'ADN microbien	33
5.1.5	Conclusion sur ces méthodes.....	33
5.2	Comment cultiver et détecter des microorganismes en gouttes ?	35
5.2.1	Choix du milieu	35
5.2.2	Comment détecter les microbes qui poussent en goutte ?	35
5.3	Comment estimer le nombre de cellules cultivables dans une suspension ?	37
5.3.1	Calcul d'espérance pour $\lambda = 1$	38
5.3.2	Afin de couvrir une gamme de concentrations large, nous avons réalisé des dilutions successives 39	
5.3.3	Conclusion.....	39
5.4	Validation de la méthode de comptage en gouttes avec quelques souches de laboratoire 39	
5.4.1	Préparation des milieux de culture	40
5.4.2	Protocole.....	40
5.4.3	Résultats.....	43
5.5	Transfert à des échantillons de microbes du sol.....	43
5.5.1	Protocole.....	43
5.5.2	Résultats.....	46
5.5.3	Variabilité entre les sols.....	48
5.6	Analyse des paramètres de croissance.....	49
5.6.1	Protocole d'analyse des courbes	50
5.6.2	Présentation des résultats	52
5.7	Conclusion sur l'évaluation de la biomasse en gouttes	54
6	Transfert en gouttes des tests de solubilisation du phosphate	56
6.1	Le test classique sur boîtes de Petri	56
6.2	Adaptation du test en milieu liquide.....	57
6.2.1	Phase I : recherche d'une taille de particules suffisamment faible	58
6.2.2	Phase II : recherche d'un dispersant biocompatible	59
6.2.3	Phase III : Stérilisation de notre milieu	60
6.2.4	Toxicité du polyacrylate	63
6.2.5	Conclusion.....	63
6.3	La dissolution de l'hydroxyapatite est en théorie contrôlée par le pH et la présence de chélatants.....	63
6.3.1	Simulation	63
6.3.2	Mesure du pH en gouttes	64
6.3.3	Lien entre pH et état des particules.....	66
6.4	La biomasse fait augmenter le signal de scattering, mais dans des proportions négligeables face aux particules minérales	67
6.5	Analyse des sols	69
6.5.1	Notre dispositif expérimental permet de distinguer les sols selon leur capacité à faire diminuer le signal de scattering	69
6.5.2	Étude du lien entre scattering et pH.....	75
6.6	Les concentrations trouvées sont-elles comparables avec les concentrations en solubilisateurs d'après la méthode sur boîte de Petri ?	83
6.6.1	Choix d'une durée d'incubation sur boîte de Petri	84

6.6.2	La corrélation halos/chutes du signal de scattering est beaucoup moins bonne que pour la biomasse.	86
6.7	Conclusion sur le phosphate.....	89
7	Conclusion générale.....	92
8	Annexes.....	95
8.1	Recette du Milieu Pikovskaya.....	95
8.2	Protocole de suspension des microbes du sol.....	95
8.3	Calcul des intervalles de confiance pour le comptage sur boîte de Petri.....	95
8.4	Identité des souches microbiennes utilisées.....	96
8.5	Loi de Poisson/Nombre le Plus Probable.....	96
8.6	Origine des sols et méthodes de prélèvement.....	97
9	Bibliographie.....	99

1 Introduction générale

Les microbes des sols sont utiles à l'agriculture : ils aident les plantes à acquérir des nutriments, dégradent les déchets, protègent des plantations contre les pathogènes... Cela a fait d'eux un sujet de recherche agronomique majeur depuis le début du XXème siècle et particulièrement ces dernières décennies, suite au développement de modes d'agriculture sobres en intrants. Comprendre les interactions entre les microorganismes, les plantes et les autres éléments du sol est vu comme une solution potentielle pour gagner en productivité tout en se passant de produits agrochimiques de synthèse dont le coût, les dégâts environnementaux et les effets sur la santé humaine sont problématiques. Dans cet optique, un des enjeux importants en agronomie est d'être capable de caractériser la communauté microbienne des sols de manière fonctionnelle ; c'est-à-dire de quantifier les services qu'elle peut rendre à l'agriculture et à la société de manière générale. Un microbiote riche d'un point de vue fonctionnel protégera les plantes des maladies, leur permettra d'acquérir facilement des nutriments et les protégera contre les aléas climatiques, il dégradera les éventuels polluants néfastes, améliorera la structure physique du sol et limitera les efflux de gaz à effet de serre.

Malheureusement, cette caractérisation est rendue difficile par plusieurs caractéristiques des microbes du sols. Ainsi, les microbiotes des sols sont complexes et variés et on estime qu'un gramme de sol contient typiquement plusieurs milliards de cellules de microorganismes visibles au microscope, qui peuvent appartenir à entre 500 et 10 000 espèces différentes. La majorité des espèces de microorganismes sont inconnues et parmi celles connues, on ignore pour beaucoup leurs fonctions agronomiques éventuelles. En outre, de nombreuses espèces sont difficiles à cultiver. Enfin, les interactions (physico-chimiques, hormonales...) entre microbes et avec les autres éléments du sol sont variées et difficiles à détecter.

Les progrès des technologies de séquençage ont permis d'étudier les génomes de communautés entières de microbes du sol, ce qui a apporté beaucoup à la compréhension des microbiotes. Cependant, il demeure difficile de lier un gène à une fonction et dans certains cas, le séquençage ne suffit pas à connaître les fonctions. C'est pourquoi certains chercheurs visent à mettre en place des modes de caractérisation qui reposent directement sur les phénotypes des microbes (les traits biologiques observables). C'est ce que nous avons fait dans ce travail de thèse, en choisissant de nous concentrer sur un paramètre et une fonction importants : le nombre de cellules cultivables et la solubilisation du phosphate. Dans chaque cas, nous avons adopté une approche purement phénotypique : caractériser le comportement de microorganismes sans chercher à savoir à quelles espèces ils appartenaient.

Pour développer notre protocole de caractérisation, nous avons choisi d'utiliser la millifluidique de gouttes. Elle consiste à manipuler des gouttes de quelques centaines de nanolitres, généralement séparées les unes des autres par une phase continue huileuse. Elle permet notamment de réaliser des opérations de microbiologie de façon plus précise, plus répétable et plus rapide qu'avec des méthodes traditionnelles, en utilisant moins de réactifs. Nous avons choisi d'utiliser une machine conçue par une startup de notre laboratoire et actuellement commercialisée : l'analyseur MilliDrop. Cette machine permet de générer jusqu'à 1000 gouttes et de les incubé pendant 48 heures. On peut également mesurer la fluorescence de chaque goutte au fil du temps ainsi que la lumière qu'elles diffusent au fil du temps. Le compromis entre tailles des gouttes et nombre de gouttes permet à la fois de cultiver une fraction importante de la diversité d'un échantillon de microbes du sol et de leur laisser suffisamment de volume pour produire une communauté avec des traits phénotypiques visibles, tout en présentant une grande facilité d'utilisation.

Pour mettre au point notre méthode d'évaluation de la biomasse cultivable et de la concentration en microorganismes cultivables, nous avons dû mener un travail de formulation physico-chimique important et croiser différentes mesures optiques menées sur nos gouttes. Grâce à cela, nous avons à la fois apporté un éclairage nouveau sur la solubilisation du phosphate par les microorganismes et prouvé le potentiel de notre machine en tant qu'outil de diagnostic agricole.

Ce manuscrit se décompose en cinq parties. La première partie est une présentation des enjeux et difficultés de l'étude des microorganismes du sol. La deuxième est une revue de littérature qui vise à expliquer en quoi l'acquisition du phosphate est un problème pour les plantes et comment les microorganismes peuvent les aider. La troisième partie est une présentation de la millifluidique de gouttes et du cas particulier de notre dispositif expérimental. Dans la quatrième et la cinquième partie, nous présentons les résultats d'expériences d'incubation que nous avons menées sur une douzaine de sols agricoles fournis par notre partenaire AgroNutrition. Nous présentons d'abord les résultats que nous avons obtenus concernant la concentration en microorganismes cultivables dans nos sols et leur métabolisme, puis concernant la solubilisation de particules de phosphate.

2 Les microorganismes du sol fournissent des services écosystémiques à l'agriculture

2.1 Les microorganismes représentent la majorité de la biomasse des sols

Les sols sont des milieux complexes, composés typiquement de 25% d'air, 25% d'eau, 45% de minéraux et 5% de matière organique en volume¹. Substrat de la majorité des végétaux terrestres, le sol est aussi le lieu de vie d'une grande diversité d'organismes hétérotrophes. On divise fréquemment ceux-ci en macro-organismes (organismes de plus de 2mm), méso-organismes (0,1-2mm) et micro-organismes (moins de 0,1mm).

Les macro-organismes du sol comprennent par exemple les taupes, les fourmis et les lombrics.

1



Figure 2-1: Trois macro-organismes du sol célèbres : un rat-taupe nu (*Heterocephalus glaber*), une fourmi (*Camponotus nylanderi*) et une poignée de lombrics.

¹ Lombrics - Photo par [sippakorn yamkasikorn](#) sur [Unsplash](#)

Fourmi - Photo par [Peter F. Wolf](#) sur [Unsplash](#)

Rat-taupe nu : Ltshears - Trisha M Shears – domaine public – Wikipedia



Figure 2-2 : un méso-organisme emblématique – le collembole : Photo Jean-Pierre Bertrand http://www.avecousanssables.fr/2017_148.html

Les méso-organismes comprennent des espèces telles que les collemboles et les acariens, dont les rôles dans la décomposition des déchets organiques ont été abondamment documentés².

Alors que la plupart des macro-organismes et méso-organismes appartiennent au règne animal, les microorganismes appartiennent à des taxons plus variés. Ainsi, si l'on trouve dans un sol naturel des métazoaires comme les nématodes et des tardigrades, on y trouve aussi des bactéries, des algues, des archées et des champignons.

La biomasse microbienne est la masse que pèsent les microbes d'un sol donné. Son estimation est un sujet complexe et de nombreuses méthodes de mesure existent. Un parcours de littérature semble cependant indiquer que la biomasse carbone microbienne représente environ 500 mg de carbone microbien par kg de sol, d'après la méthode de fumigation-extraction³⁻⁷. Ce chiffre est à mettre en regard de la biomasse des autres organismes : Ainsi Weil et Al estiment que dans les horizons supérieurs du sol, la biomasse des microorganismes est comprise entre 180 et 2580 grammes par mètre carré, alors que celle des macro-organismes et méso-organismes est comprise entre 13 et 450 grammes par mètre carré⁸. On peut donc retenir que dans le sol, en matière de biomasse, les microorganismes sont environ **dix fois plus importants que les macro et méso-organismes**.

En nombre de cellules, dans les 30 premiers centimètres du sol, on peut trouver 10 milliards de cellules détectables au microscope par gramme de sol^{9,10}. En plus de représenter la majorité de la biomasse du sol, les microorganismes sont donc **extrêmement nombreux**.

Or, ces microorganismes réalisent des opérations à l'importance majeure en agronomie et en écologie.

2.1.1 Les microbes du sol ont des rôles majeurs en écologie et agronomie

Les microorganismes sont des acteurs clés des cycles géochimiques.

- A presque toutes les étapes du cycle de l'azote, des microorganismes sont présents. Le diazote contenu dans l'air entre dans la biomasse après avoir été fixé par des microorganismes. Par la suite, il peut être oxydé par des bactéries nitrifiantes, puis renvoyé dans l'atmosphère par des microorganismes dénitrifiants. Les microorganismes sont également responsables d'une partie du recyclage de la matière azotée contenu dans la biomasse des végétaux et des animaux morts¹¹.

- Le cycle du carbone est également en partie déterminé par des microorganismes du sol : les composés organiques, au premier rang desquels la cellulose et la lignine contenues dans les tissus végétaux, sont dégradés par des microorganismes, qui peuvent s'en servir comme source d'énergie et relâcher du CO₂ dans l'atmosphère ; ou participer au stockage de carbone dans les sols¹². Dans un contexte de dérèglement climatique, ces mécanismes ont été largement étudiés, dans l'espoir d'exploiter le potentiel de puits de carbone des microbiotes.
- Les microorganismes sont également responsables de la dégradation de nombreux polluants chimiques. Certains produits phytosanitaires, comme le 2,4,5-T (agent orange), ou le chlordécone sont connus pour les dégâts environnementaux qu'ils peuvent causer. Si ces composés ne sont pas rapidement dégradés, ils peuvent se retrouver dans les cours d'eau et dans l'alimentation du bétail ou des humains et causer des problèmes de santé publique parfois dramatiques. Or, les microbiotes sont au cœur de cette éventuelle dégradation^{13,14}. Il en est de même, pour certains polluants industriels non liés à l'agriculture¹⁵.

Ces propriétés font que les microbiotes des sols sont abondamment étudiés par les chercheurs en écologie. Mais les microorganismes entretiennent également des relations avec les plantes qui intéressent les agronomes. En effet, depuis leur apparition sur Terre, les végétaux aériens sont au contact avec des microbes. Cette longue histoire de coévolution a abouti au développement d'interactions mutuellement bénéfiques pouvant aller jusqu'à la symbiose. Il en résulte que les microbiotes ont une grande influence sur le développement des plantes et de nombreux rôles en agriculture :

- Ils ont des rôles bien documentés dans l'alimentation des plantes : ils sont capables de rendre le diazote de l'air et le phosphore du sol assimilables par les plantes, de constituer des stocks labiles de ces nutriments et d'étendre la surface de captage des nutriments dans le cas des mycorhizes.
- Les sols renferment à la fois des microorganismes pathogènes des plantes et des remèdes contre ces maladies. Il a ainsi été prouvé que certains microbiotes des sols protégeaient les plantes contre les infections et les parasites¹⁶⁻¹⁹. La souche bactérienne *Bacillus thuringiensis*, principal succès du biocontrôle est connue pour ses propriétés insecticides et elle est aujourd'hui massivement utilisée pour lutter contre certains ravageurs²⁰.
- De nombreux microorganismes sécrètent des hormones végétales qui influent sur le développement des plantes (ce qui prouve au passage le niveau d'intrication entre microorganismes et végétaux)²¹
- Les microorganismes structurent le sol. Il a par exemple été montré que la synthèse de glomaline par certains champignons favorisait la formation d'agrégats solides, eux-mêmes bénéfiques à la fertilité des sols²². Ils sont également responsables de la dégradation de la matière végétale introduite dans les champs, et de la formation de l'humus.
- Certains microbes protègent les plantes de différents stress abiotiques^{23,24} : manque d'eau, hyper salinité, acidité...
- Des champignons sont étudiés pour leur potentiel d'herbicides biologiques^{25,26}

Une vaste littérature scientifique s'y intéresse donc depuis le début du XX^{ème} siècle. Dès cette époque, on avait compris que les microorganismes du sol avaient un rôle dans la nutrition des plantes²⁷, donc une utilité potentielle. Aujourd'hui, conscients des dégâts causés par l'épandage d'engrais et de produits phytosanitaires chimiques, la communauté scientifique et les industriels du secteur voient dans les microorganismes des alternatives a priori moins polluantes à ces substances ; une opportunité de concilier productivité et préservation de l'environnement. Les avancés dans ce secteur sont particulièrement utiles aux exploitations qui ont fait le choix d'une agriculture sobre en intrants, par exemple celles en agriculture biologique.

On peut identifier deux approches dans la littérature scientifique :

- Une approche consiste à utiliser les microorganismes comme produits alternatifs ou complémentaires aux produits phytosanitaires de synthèse^{19,28-31}. On peut épandre soit les microorganismes vivants d'une espèce, soit des communautés de microorganismes vivants multi-espèces, soit des extraits de microorganismes^{24,32-34}. Malheureusement, la littérature s'accorde à dire que ces démarches échouent souvent³⁵ pour différentes raisons :
 - Les microorganismes se dégradent rapidement lorsqu'ils sont stockés²⁵.
 - Ils sont plus difficiles à épandre : une fois épandus, ils peuvent se dessécher et être dégradés par le soleil
 - Une fois introduits dans le sol, les microbes ne se développeront que s'ils ont un avantage compétitif par rapport à ceux déjà présents (par exemple la capacité à dégrader une molécule xénobiotique¹⁴). Si tel n'est pas le cas, la compétition avec les microorganismes présents, parfaitement adaptés au milieu dans lequel ils se trouvent, ou la rencontre de prédateurs^{14,36} les réduiront rapidement à des quantités indétectables.
 - Quand bien même le microorganisme parviendrait à se faire une place dans le sol dans lequel on l'introduit, il n'est pas garanti que l'activité pour laquelle on l'a choisi soit exprimée. Les microorganismes peuvent ainsi perdre toute activité métabolique une fois dans le sol^{14,37}.
- L'autre approche consiste à étudier les microorganismes présents dans les sols, leurs activités, leurs fonctions et leurs dynamiques pour éventuellement comprendre comment ces dynamiques peuvent être influencées. Des travaux ont par exemple montré que l'apport d'engrais, la pollution aux métaux lourds et le type de culture altéraient les microbiotes des sols, en matière de répartition d'espèces³⁸⁻⁴², de potentiel à protéger contre les maladies des plantes (biocontrôle)⁴³ ou d'activité solubilisatrice de phosphate^{39,44}. Des équipes s'intéressent également à la répartition spatiale et temporelle de différentes activités enzymatiques dans le sol^{45,46}. Ces démarches sont souvent le fait d'écologues, qui cherchent à comprendre le fonctionnement des microorganismes naturels pour mieux le prendre en compte dans leurs modèles. Cependant, nous estimons que ces données pourraient un jour servir à conseiller aux agriculteurs des pratiques agricoles ; à construire des modèles d'aide à la décision. Par exemple, nous pensons que l'on pourrait conseiller une pratique agricole à un agriculteur en se basant sur un diagnostic qui prendrait en compte le nombre de fixateurs d'azote, de solubilisateurs de phosphate ou de champignons présents dans son sol. Certains auteurs proposent déjà des indicateurs de qualité des sols reposant partiellement sur des paramètres microbiologiques^{47,48}.

Pour une démarche comme pour l'autre, les chercheurs se heurtent à une difficulté majeure : la grande biodiversité microbiologique des sols. Ce paramètre est incontournable pour appréhender les microbiotes du sol.

2.2 Les microbes du sol sont variés et peu connus

Dans les articles sur les microbiotes de sols, les horizons supérieurs sont presque toujours décrits comme étant le berceau d'une grande diversité d'espèces de microbes. On lit souvent en introduction qu'un gramme de sol contiendrait jusqu'à 10 000 espèces de microbes, en citant principalement les travaux de Torsvik dans les années 1990^{9,49,50}.

Quelles sont les connaissances actuelles sur le sujet ?

Chez les organismes macroscopiques, on mesure classiquement la biodiversité d'un écosystème en dénombrant les espèces présentes. Pour ce faire, on prélève des spécimens de plantes ou d'animaux que l'on identifie sur des critères anatomiques et par une analyse génétique lorsqu'il y a une ambiguïté

entre espèces d'apparences similaires. On compte ensuite les espèces rencontrées et les fréquences auxquelles on les a rencontrées, puis on calcule un indicateur de biodiversité.

Chez les microorganismes, une telle démarche poserait plusieurs problèmes : le nombre de microorganismes peut atteindre des valeurs telles qu'étudier manuellement chaque cellule d'un échantillon (par exemple de sol) est irréaliste. Par ailleurs, des cellules même très éloignées génétiquement sont souvent indiscernables sur des critères anatomiques⁵¹. L'identification repose donc aujourd'hui presque exclusivement sur des méthodes génomiques. Or, la notion d'espèce chez les procaryotes ne va pas de soi.

La notion d'espèce chez les procaryotes :

Qu'est-ce qu'une espèce ? Chez les eucaryotes pluricellulaires, même si ce concept n'est pas parfaitement applicable à toutes les espèces, on accepte souvent la définition donnée par Ernst Mayr⁵² : une espèce est « une population naturelle dont les membres se reproduisent effectivement ou potentiellement entre eux et qui est isolée des autres groupes sur le plan reproductif »⁵³. La reproduction sexuée est donc au cœur de la définition d'une espèce eucaryote.

Or, les procaryotes ne réalisent pas de reproduction sexuée... La définition d'une espèce procaryote varie donc selon les auteurs, mais on la fait généralement reposer sur le degré de similarité entre l'information génétique de deux cellules : des microbes sont d'une même espèce s'ils partagent suffisamment de similarités et sont suffisamment différents d'autres souches proches. Expérimentalement, l'identification repose aujourd'hui presque exclusivement sur l'ARN 16S (pour les procaryotes) et 18S (pour les eucaryotes, notamment les champignons) : chaque espèce est définie par une souche-type étalon et une cellule appartient à cette espèce si son ARN 16S/18S est suffisamment similaire à celui de la souche-type. On prend une valeur de similarité arbitraire : 97%^{54,55} et on parle de UTO Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU en Anglais) plutôt que d'espèce.

A l'échelle de la France, sur 2150 parcelles agricoles réparties sur tout le territoire et en se basant sur l'ARN 16S, Terrat et al⁵⁶ trouve 9^E4 UTO bactériennes différentes, avec en moyenne 1288 UTO différentes par gramme de sol par parcelle dans les 30 centimètres supérieurs du sol et cela ne prend pas en compte les champignons, qui ajoutent encore à la biodiversité.

Ces résultats confirment donc que les sols sont le berceau d'une grande biodiversité microbienne, et qu'il existe au demeurant une diversité phylogénique entre les sols (chaque parcelle en France ne renferme que 1,4% de la biodiversité totale du pays, d'après ces mêmes travaux). En conséquent, leur étude est très complexe et nécessite de fortes capacités de criblage. Mais pour compliquer le problème, de nombreuses espèces n'ont encore jamais été décrites et dans la plupart des cas, on connaît trop mal les espèces décrites pour savoir quelles fonctionnalités agricoles elles pourraient avoir.

2.2.1 La phylogénie donne peu d'information sur les fonctions agricoles

Ainsi, selon Torsvik et Øvreås⁹, « Il est probable que le plus grand problème que rencontre la microbiologie aujourd'hui [en 2002] est de lier la phylogénie et les fonctions ». En effet, les résultats de séquençage de l'ARN 16S ou 18S des sols donnent **peu d'information fonctionnelle**, pour deux raisons : D'une part, **de nombreuses espèces sont inconnues**. Un peu plus de 20 500 espèces de procaryotes ont été décrites dans la base des génomes de procaryotes LSPN (le 09/12/2020), soit environ 23% du nombre d'UTO trouvées rien qu'en France par Terrat et al⁵⁷. D'autre part, les espèces connues sont souvent décrites sommairement et nos connaissances ne permettent généralement pas de leur associer des propriétés agronomiques.

Tous ces éléments convergent vers le fait que l'analyse des microbiotes du sol d'aujourd'hui devrait être fonctionnelle : pour servir l'agriculture, **on doit s'intéresser** à la capacité à exprimer une **fonction agronomique** (par exemple, la capacité à solubiliser le phosphate) **plutôt** qu'à la **composition phylogénique** des microbiotes. Ainsi, dans un article récent, Thiele-Bruhn et Al⁴⁷ écrit que « les nouvelles méthodes [d'évaluation de la qualité des sols] devraient se concentrer plus sur les fonctions microbiennes des sols, notamment les cycles des nutriments et des gaz à effet de serre, le bio contrôle, la promotion de la croissance, la séquestration du carbone, mais aussi la structuration du sol et la fonction de filtre ».

2.2.2 L'étude des microbiotes des sols a besoin d'outils de caractérisation fonctionnelle

Car en effet, des études montrent que d'un point de vue fonctionnel, il existe des différences quantifiables entre les microbiotes des champs.

Si l'on prend l'exemple des fixateurs d'azote atmosphérique, dans⁵⁸, huit sols néerlandais sont étudiés avec des méthodes moléculaires, à la recherche du gène *nifH*, qui est impliqué dans la fixation de l'azote atmosphérique. L'abondance de ce gène dans le sol varie du simple au décuple entre Avril et Novembre, et environ du simple au centuple entre les sols à certains moments de l'année.

Si l'on prend l'exemple du phosphore, les solubilisateurs de phosphate, microorganismes susceptibles d'aider les plantes à acquérir du phosphate à partir des particules du sol, sont également présents en quantités variables. Dans³⁹, un même sol est divisé en parcelles sur lesquelles différentes plantes sont cultivées, dans différentes conditions agronomiques. Après deux ans, les concentrations en microbes cultivables solubilisateurs du phosphate varient de $6,5 \times 10^4$ à $6,2 \times 10^6$ cellules par gramme de sol selon les parcelles. De façon similaire, dans⁵⁹, sur 52 échantillons de sol issu de 5 lieux de prélèvement, les auteurs ont trouvé entre $1,2 \times 10^2$ (en réalité moins que ça, mais cela dépassait leur seuil de détection) et $2,8 \times 10^5$ cellules solubilisatrices de phosphore par gramme de sol.

Enfin, Latz et al⁴³ a trouvé que la diversité des végétaux sur une parcelle avait une influence positive sur la capacité des microorganismes à lutter contre les phytopathogènes, en se basant sur la présence du gène *phlD*, impliqué dans la synthèse de composés connus pour leur rôle dans la protection contre les maladies fongiques des plantes.

Dans les exemples de la littérature, on voit que deux types de méthodes se dégagent :

- Les méthodes **moléculaires**. On séquence la totalité de l'ADN présent dans un sol, et on va chercher une famille de gènes dont on sait qu'ils sont liés à une fonction agronomique, par exemple les gènes *nifH*, *amoA* ou *hao*⁶⁰ qui codent la synthèse des enzymes du cycle de l'azote, ou les gènes *phlD* et *prnD*, impliqués dans la protection contre les champignons pathogènes⁴³. On peut également s'intéresser au transcriptome (l'ARN), ce qui fournit une information a priori plus proche de ce qui a lieu dans le sol. L'intérêt principale de ces technologies réside dans leur très haut débit et dans leur simplicité d'utilisation : de nombreux échantillons peuvent être analysés par un technicien en une journée. Ces méthodes ont cependant une limite : la présence d'un gène ne garantit pas sa transcription, et sa transcription ne garantit pas son expression. Le séquençage fonctionnel reste au demeurant **coûteux**, ce qui limite son utilisation en dehors de la recherche scientifique. Par ailleurs, dans certains cas, on ne connaît pas de gène associé à une fonction. Il nous semble par exemple que les gènes impliqués dans la solubilisation du phosphate inorganique ou les biocontrôle sont peu connus. On estime enfin que seuls 0,1 à 2% de la biomasse microbienne du sol est active à un moment donné³⁷.

- Les méthodes **phénotypiques**. On évalue une fonction agronomique directement sur un microorganisme, soit directement dans le sol, soit sur des microorganismes que l'on a isolés ; en général après les avoir cultivés : sécrétion d'auxine, capacité à hydrolyser la cellulose, capacité à solubiliser le phosphate... Ces méthodes présentent l'avantage d'être a priori plus directement reliés à des fonctions écologiques dans le sol, mais elles sont généralement beaucoup plus laborieuses.

Il nous semble qu'aujourd'hui, les méthodes moléculaires sont les technologies les plus en vue⁴⁷. Nous pensons cependant que des méthodes phénotypiques, notamment avec culture ont encore leur place dans certains cas, et peuvent en tout cas évoluer aux côtés des méthodes moléculaires, à la condition de **gagner en productivité** et en **précision**. C'est là l'objectif de notre projet de recherche : utiliser de nouvelles technologies de culture automatisée de microorganismes pour mettre au point des protocoles d'analyse fonctionnelle plus simples d'utilisation, moins exigeants en main d'œuvre et plus rapides que les méthodes pasteurienues traditionnelles.

2.3 Conclusion

Finalement, les sols sont des milieux complexes, peuplés de nombreuses espèces d'organismes. Parmi eux, les microorganismes représentent l'essentiel de la biomasse. Ces microbes sont des fournisseurs de services écosystémiques auxquels la recherche agronomique s'intéresse de plus en plus. Cependant, leur grande diversité génétique, leur petite taille, la difficulté à lier phénotype et génotype et les innombrables interactions entre eux et avec les autres éléments du sol rendent leur étude très difficile. Cela empêche la démocratisation de leur prise en compte dans les choix cultureux.

Pourtant, nous estimons que caractériser les microbes de leurs sols serait utile aux agriculteurs, si cela peut par exemple les aider à lutter contre ravageurs, à régler des problèmes d'acquisition de nutriments ou à limiter leur empreinte environnementale. Les agriculteurs réalisent tous les ans des bilans chimiques de leurs sols, mais presque jamais de bilan microbiologique. Pour changer cela, un dispositif d'analyse fonctionnel, rapide, standardisé et peu onéreux est nécessaire. Nous avons choisi d'utiliser la millifluidique, une technologie maîtrisée par notre laboratoire pour poser les bases de ce qui pourrait un jour devenir un tel dispositif.

Nous avons choisi d'étudier une fonction importante en agriculture : la capacité des microorganismes à aider les plantes à acquérir du phosphate. Nous commencerons par faire un état de l'art sur l'importance du phosphate en agriculture et le rôle que jouent les microbiotes sur l'acquisition de ce nutriment, puis nous présenterons notre dispositif expérimental dans un prochain chapitre.

3 Etat de l'art sur la solubilisation du phosphate en agriculture

Nous avons choisi de concevoir un protocole d'analyse phénotypique des microbes des sols pour l'agriculture. Comme nous ne pouvions pas étudier toutes les fonctions à la fois, nous avons choisi de nous concentrer sur l'une d'entre elle : l'acquisition du phosphate inorganique.

3.1 Le phosphore est nécessaire à la vie

Le **phosphore** est un élément essentiel à la vie sur Terre. Il entre dans la composition de molécules capitales chez les êtres vivants, comme **l'ADN et l'ARN**, l'Adénosine Tri Phosphate (**ATP**) et les **phospholipides**. En nombre d'atomes, on estime qu'il est le **6^{ème} élément dans le corps humain**⁶¹. Chez E. Coli, on estime qu'il représente en masse 4% de la biomasse sèche⁶², ce qui en fait le 5^{ème} élément à égalité avec le potassium.

Les plantes terrestres notamment en sont composées et en ont besoin pour leur développement. Elles le puisent dans le sol, grâce à leurs racines.

Preuve de son importance, à l'échelle d'un écosystème, il **peut être limitant pour la production primaire**, c'est-à-dire qu'il est présent en si faible quantité qu'un ajout de phosphore augmente la biomasse totale, ou la vitesse de production de cette biomasse dans l'écosystème⁶³. Dans certains sols très âgés par exemple, le phosphore présent dans la roche mère a progressivement été extrait et exporté par lixiviation, jusqu'à être présent à des niveaux suffisamment bas pour limiter la production de biomasse ; dans d'autres sols, il est présent en quantités importantes, mais est libéré de la roche-mère trop lentement par rapport à l'apport d'autres nutriments⁶³.

3.2 Les plantes ont besoin de phosphore pour se développer

A l'échelle de la plante maintenant, le phosphore a une grande importance. De par sa présence dans l'ATP, il est nécessaire aux processus énergétiques comme la photosynthèse, la respiration ou le stockage de sucres dans les racines⁶⁴⁻⁶⁷.

Une **plante en déficit de phosphore rencontrera** donc des **problèmes de développement**. Elle sera généralement naine et fusiforme. Elle aura souvent une tige anormalement fine et parfois des feuilles foncées, presque bleu-vert. Les plantes en déficit de phosphore sont également caractérisées par une maturité retardée, moins de fleurs et moins de fruits^{66,68}. Dans les cas les plus graves, la carence en phosphore peut causer le jaunissement et la senescence des feuilles⁶⁶.

A l'inverse, jusqu'à une certaine limite, augmenter la quantité de phosphore disponible pour une plante aura un effet positif sur la photosynthèse, la floraison, la fructification (notamment la production de graines) et la maturation. La croissance des racines est favorisée par le phosphore, en particulier le développement des racines latérales et des radicelles. Un bon apport en phosphore est essentiel pour une **fixation de l'azote efficace** et pour la **synthèse des protéines** qui en résultent chez les légumineuses comme le soja, les pois et les haricots⁶⁶.

Les **plantes terrestres extraient la totalité du phosphore qu'elles consomment par leurs racines**. En effet, le phosphore étant un élément quasiment absent en phase gazeuse sur Terre, on le trouve uniquement dans les sols et dans les masses d'eau, soit dissout en solution, soit intégré à la matrice solide. Or, dans les sols, cet élément est soumis à des équilibres physico-chimiques complexes.

3.3 Seule une fraction du phosphore des sols est accessible aux plantes

Dans les sols, le phosphore est présent sous deux types de forme : minérale et organique.

- **Les formes minérales** désignent l'acide phosphorique (**H₃PO₄**) et les orthophosphates, ions formés d'un atome de phosphore, de quatre atomes d'oxygène et d'un nombre variable

d'atomes d'hydrogène selon le pH (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}). Ces derniers peuvent être en solution, adsorbés à la surface de particules du sol comme les argiles ou intégrés à des réseaux cristallins.

- **Les formes organiques** quant à elles, désignent une **variété de molécules issues du vivant**, qui contiennent des éléments phosphore et parmi lesquels on trouve les inositol phosphates, formes de stockage du phosphate chez les végétaux.

La répartition entre phosphore organique et minéral varie selon les sols. La fraction organique représente ainsi entre 20% et 80% du phosphore total, mais des valeurs de 4% (dans un podzosol) et de 90% (dans de l'humus de montagne) ont été observées^{66,69-71}.

Chaque forme présente des difficultés d'accès pour les plantes.

3.3.1 Le phosphore minéral se lie avec des ions métalliques du sol

L'acide phosphorique et les orthophosphates (H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} et PO_4^{3-} pour rappel) sont sujets à différentes réactions qui tendent à les **retirer de la solution du sol** et à produire des composés phosphatés **très peu solubles**. Ainsi, le fer, l'aluminium et le calcium présents dans les particules minérales du sol peuvent former des complexes avec les ions phosphates. Au-delà de la formation de complexes, les ions phosphate peuvent également s'adsorber à la surface de différents minéraux du sol⁷². Il en résulte que dans un sol donné, seul une fraction (typiquement moins de 0,01%⁶⁶) du phosphore minéral total est en solution. Or, les racines des plantes ne sont capables d'assimiler des orthophosphates que si ceux-là sont dissouts. On parle alors de phosphate **biodisponible**, ou **assimilable**.

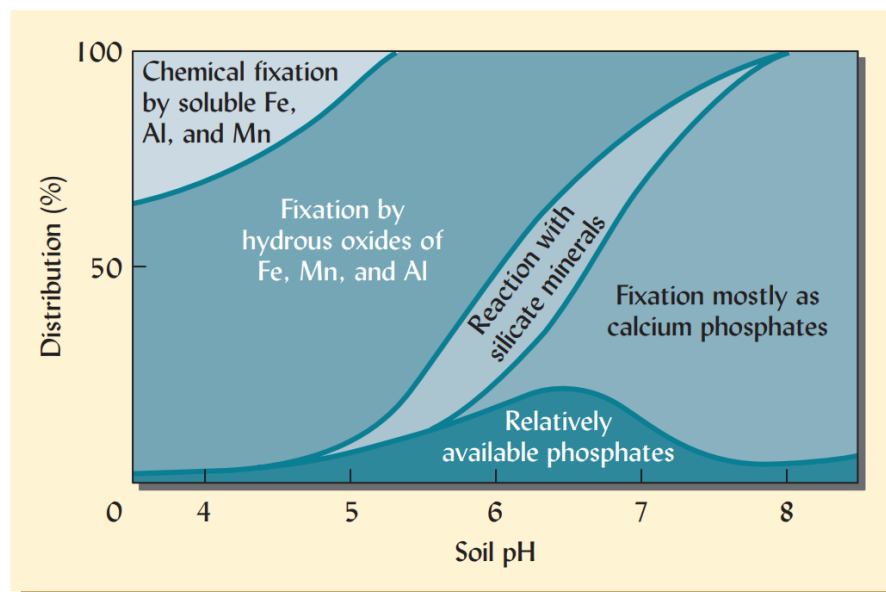


Figure 3-1 : Disponibilité du phosphore dans le sol en fonction du pH du sol

Ces mécanismes sont fortement dépendants du pH du sol. En sol acide, le phosphate se liera avec le fer ou l'aluminium, alors qu'en sol basique, il se liera avec des atomes de calcium. Voir la Figure 3-1, issue de ⁶⁶ pour une illustration de ce phénomène.

On notera qu'en Europe, environ la moitié des sols sont alcalins ou neutres, comme illustré sur la carte ci-dessous, issue de⁷³ :

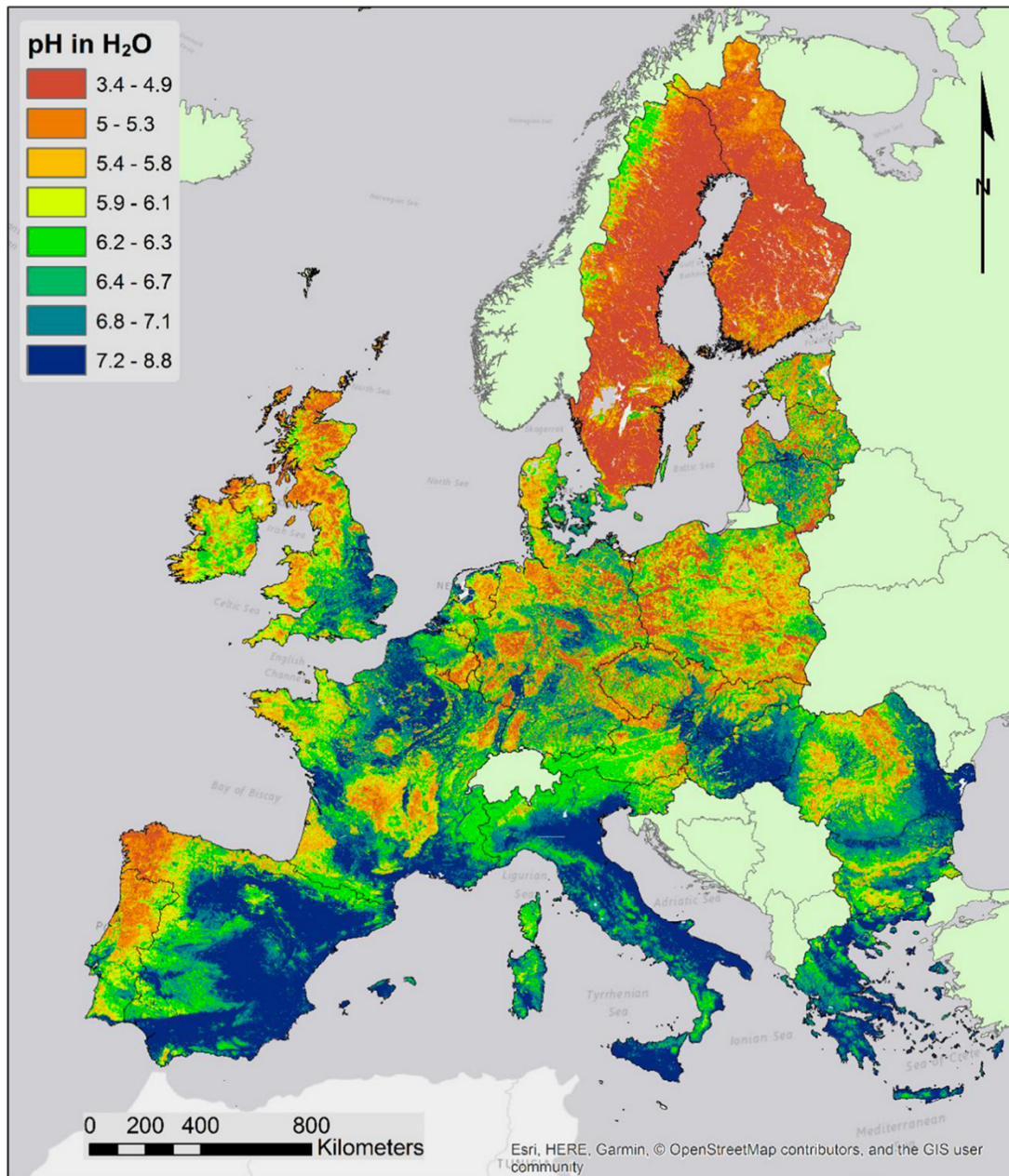


Figure 3-2 : pH superficiel des sols de l'Union Européenne

3.3.2 Les formes organiques se lient avec les ions métalliques du sol et doivent être hydrolysées

Les molécules organiques phosphorées incluent une variété de molécules, allant des orthophosphates liés à des acides humiques par des ponts métalliques⁷⁴ aux acides nucléiques, en passant par des phospholipides, des phosphoprotéines et des « ose-phosphates »⁶⁹. Cependant, la famille des **inositols phosphate** est la mieux identifiée et certainement la plus étudiée de ces molécules phosphorées.

Des auteurs ont cherché à identifier les molécules phosphorées des sols et à établir leurs importances relatives. Une méthode mise en place par plusieurs d'entre eux est l'étude des liaisons des atomes de phosphore en spectroscopie RMN. On en tire les fractions relatives de phosphore qui est pris, par exemple dans une liaison de type monoester de phosphate ou diester de phosphate^{75,76}. Par un recoupement avec d'autres méthodes, comme par exemple la chromatographie^{77,78} on arrive à une estimation de la répartition des molécules organiques phosphorées dans le sol. Il en résulte que :

1. Une grosse partie du phosphore organique (environ 50%⁶⁹) est présent sous forme de **molécules non-identifiées**^{66,74,79}.
2. D'après⁷¹, les **inositol hautement phosphorylés** (c'est-à-dire à cinq ou six phosphates) représentent une part très variable du phosphore organique du sol : entre 0,4% et 100%, avec une médiane autour de 23%. Dalal⁶⁹ donne des résultats comparables. Les inositols phosphates moins phosphorylés sont moins présents, certainement parce qu'ils adhèrent peu aux particules du sol⁷⁹.
3. Les autres parties identifiables représentent une part bien inférieure du phosphore organique du sol : entre 0,5 et 7% avec une médiane de 1% pour les phospholipides, au maximum 3% pour les acides nucléiques^{66,69}.

Nous allons nous intéresser à la fraction la plus importante parmi les fractions connues : les inositol hautement phosphorylés (IHP), dont le plus connu est le **phytate**.

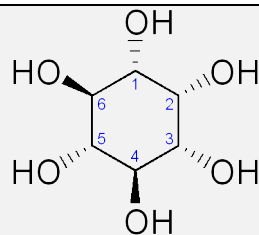


Figure 3-3 : Représentation de Cram du myo-inositol, une des conformations de l'inositol, le squelette carboné sur lequel les plantes fixent des phosphates

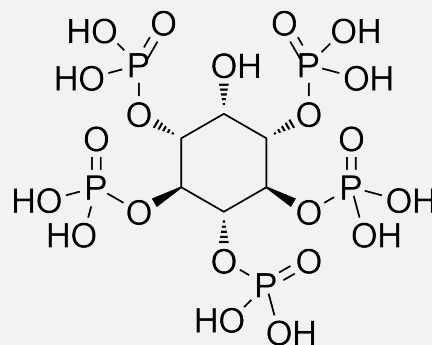


Figure 3-4 : Représentation de Cram d'un myo-inositol penta-phosphaté. Ses cinq phosphates en font un membre des inositols hautement phosphorylés (IHP)

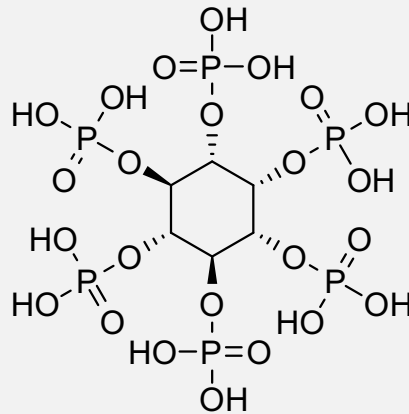


Figure 3-5 : Représentation de Cram d'une molécule d'acide phytique, le membre des IHP le plus étudié et le plus fréquent chez les plantes

Sources :

1 et 2 : © Edgar181 / Wikimedia Commons, domaine public. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Inositol> et https://fr.wikipedia.org/wiki/Inositol_pentaphosphate

3 : © Harbinary / Wikimedia Commons, domaine public. https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_phytique

Comme les orthophosphates minéraux, les IHP sont susceptibles de se **sorber** aux **particules solides du sol** et de précipiter, par exemple avec les ions calcium⁸⁰. Des études montrent même que les IHP se lient plus fortement au sol que les orthophosphates^{81,82}. Mais, alors qu'il s'agit d'une forme de stockage de phosphore chez les végétaux, les IHP ne sont pas assimilés tels quels par les racines des plantes ; ils doivent **préalablement être hydrolysés**. Pour cela, des enzymes appelées phosphatases sont nécessaires. Or, il est vraisemblable que ces enzymes ne peuvent pas cliver les IHP si ceux-ci sont sorbés au sol.

L'acquisition de phosphore à partir des IHP présente donc une double difficulté : il doit être désorbé ou dissout comme le phosphate minéral ; puis il doit être hydrolysé. Cependant, Gerke⁷⁹ présente une analyse comparée des résultats de⁸³⁻⁸⁹, dans lesquels la capacité à acquérir du phosphore à partir de phytate est évaluée dans différents contextes, en fonction de la disponibilité du phytate et de l'intensité de l'activité phytase (l'hydrolyse du phytate). L'auteur estime que dans les sols, il est **probable que la concentration de phytate en solution est plus limitante** à son acquisition **que la capacité des organismes à l'hydrolyser** ; en d'autres termes, que **l'activité phytase n'est probablement jamais limitante**. Il reconnaît cependant que des résultats contradictoires existent sur ce sujet.

Finalement, la capacité des plantes à acquérir du phosphate du sol est limitée par la disponibilité de celui-ci en solution. Afin de remédier à cela, les agriculteurs épandent du phosphore dans leurs champs. Si cela règle en général les problèmes de nutrition des plantes, nous allons voir que cela entraîne parfois des pollutions et ne garantit pas toujours une bonne nutrition des plantes.

3.4 Le phosphore épandu n'est pas toujours intégré au sol

Lors de l'épandage d'engrais phosphoré, le phosphore est d'abord présent en solution puis s'intègre progressivement à la phase solide du sol (en l'absence de phénomène qui pourrait l'extraire du sol comme la lixiviation ou la croissance végétale)^{90,91}. **Les agriculteurs épandent donc de l'engrais phosphaté** non pas pour augmenter la quantité totale de phosphore dans le sol, mais **pour maintenir temporairement une concentration élevée de phosphate** dans la solution du sol. On notera cependant que comme une grosse partie du nutriment n'aura pas le temps d'être assimilé, les agriculteurs augmentent aussi ce faisant la quantité totale de phosphore.

Les décennies passant, les sols des agriculteurs suffisamment riches pour épandre de l'engrais se sont donc chargés en phosphore et aujourd'hui, les sols européens par exemple contiennent largement plus de phosphore qu'au sortir de la seconde guerre mondiale⁹²... Et si ce stock était rendu accessible, les besoins en phosphore des végétaux seraient comblés pour de nombreuses années. Pourtant, les agriculteurs, y compris européens, continuent d'épandre du phosphore. Eurostat estime ainsi qu'un million de tonnes d'engrais phosphaté sont épandues chaque année en Europe, avec un rythme de consommation stable depuis 2010⁹³.

Par ailleurs, durant le laps de temps entre l'application du phosphore assimilable et son acquisition par les plantes, ou sa fixation au sol, il risque de subir une **lixiviation**, ce qui le retire des champs où on voudrait le voir agir et l'emporte vers des cours d'eau, ce qui peut poser des problèmes d'**eutrophisation**.

L'EUTROPHISATION

Adapté de Weil et Brady⁶⁶

En milieu terrestre, la croissance abondante de plantes est généralement considérée comme une bonne chose. Dans les écosystèmes aquatiques à l'inverse, une forte croissance végétale est souvent mauvaise pour la qualité de l'eau.

Dans les cours d'eau et les lacs non-pollués, l'eau est généralement transparente, on trouve un certain niveau de biodiversité et les algues sont peu présentes. Lorsque l'on ajoute du phosphore à un lac dans lequel cet élément est limitant, on stimule une explosion de la croissance des algues : l'efflorescence algale. L'eau va alors devenir verte, avec parfois une couche de végétaux à la surface. Lorsque ces espèces opportunistes tombent au fond de l'eau, elles vont être décomposées par des microorganismes, ce qui va stimuler la consommation d'oxygène jusqu'à son épuisement.

Le manque d'oxygène va alors limiter la croissance de nombreuses espèces, notamment des poissons. Dans les cas graves, on peut assister à des chutes de biodiversité et à la disparition d'espèces d'intérêt économique.

Par ailleurs, l'eutrophisation favorise la croissance de cyanobactéries, qui produisent des toxines, de l'ammoniac et des composés malodorants^{66,94}. Cela rend l'eau inutilisable pour la boisson et la baignade, aussi bien des humains que du bétail et peut causer la mort d'espèces animales sauvages qui ingèrent cette eau⁹⁴. Pour remédier à cela, les services de traitement de l'eau doivent mettre en place des dispositifs de purification qui entraînent des surcoûts.

L'eutrophisation peut être causée par un excès d'azote ou de phosphate.

Finalement, le phosphore peut être présent en abondance sans être disponible pour les plantes. Son épandage coûte de l'argent aux agriculteurs et peut entraîner des pollutions préoccupantes. On aimerait donc pouvoir **en épandre moins souvent et mieux tirer parti de celui présent dans le sol**.

3.5 Les microorganismes du sol ont une influence sur la disponibilité du phosphore

Ces problèmes de disponibilité du phosphore se posent aux plantes, mais également aux microorganismes du sol. Pour y remédier, différents mécanismes ont été sélectionnés par l'évolution comme la production d'acides organiques, l'augmentation de la surface de captage et l'utilisation avec parcimonie du phosphore⁹⁵. Nous allons nous intéresser au cas de la sécrétion d'acides organiques.

3.5.1 La production d'acides organiques et autres chélatants rend le phosphate disponible

Pour acquérir du phosphate, une stratégie présente chez certaines plantes⁹⁶ et chez certains microorganismes consiste à **sécréter des acides organiques**⁹⁷ : des molécules de quelques centaines de daltons

contenant un ou plusieurs carboxyles : acides citrique, malique, gluconique⁹⁸⁻¹⁰⁰... Certaines plantes sécrètent également des chélatants sans groupe carboxyliques (par exemple l'alfafuran chez la luzerne¹⁰¹). Ces molécules rendent le phosphate assimilable pour au moins une des trois raisons suivantes :

- Parce que leur sécrétion libère des protons, qui **acidifient** la solution du sol¹⁰²
- Pour certaines, parce qu'elles **chélatent** les contre ions du phosphate comme le calcium et l'aluminium ¹⁰³. La capacité à chélater dépend de caractéristiques structurales, comme le nombre de groupes carboxyles et alcools et la distance entre ces groupes¹⁰³.
- En milieu acide, parce qu'elles se **substituent** aux ions phosphates **adsorbés** sur les cristaux de $Fe(OH)_3$ et $Al(OH)_3$ ¹⁰⁴.

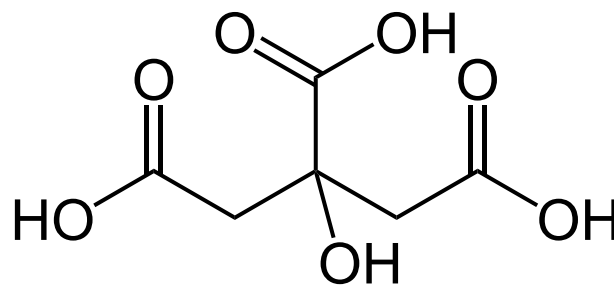


Figure 3-6 : Une molécule d'acide citrique, un des acides organiques fréquemment sécrétés par les plantes. Il rend le phosphore du sol assimilable. Source :

NEUROtiker / Wikimedia Commons, domaine public.
https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_citrique

Chez les plantes, la capacité à sécréter des acides organiques pour acquérir du phosphore serait présente surtout chez les dicotylédones¹⁰¹. Certaines plantes ont des mécanismes sophistiqués d'acquisition ; on a par exemple montré que le colza était capable de limiter la sécrétion d'acides malique et citrique aux zones où du phosphate était présent mais non-disponible⁹⁹ ou que *Lupinus labus* sécrétait des substances antifongiques et antibactériennes lorsqu'il sécrétait du citrate afin d'éviter que celui-ci ne soit dégradé par les microbes¹⁰⁵ (en effet, en plus d'être un chélatant, le citrate est une source de carbone et d'énergie). On peut également citer les racines protéoïdes (ou cluster roots), présentes chez plusieurs espèces poussant sur des sols pauvres en phosphore et qui permettent de maintenir des concentrations élevées d'acides organiques aux alentours des racines^{95,106,107}. Quoiqu'il soit, on sait que **certaines plantes sont capables par elles-mêmes d'acquérir du phosphate** à partir de sources peu solubles et que **d'autres ne le sont pas**¹⁰¹.

Afin d'assister les plantes qui en ont besoin, une stratégie fréquemment étudiée est de supplémenter le sol avec des acides organiques, des chélatants organiques ou des microbes capables d'en sécréter. En effet, les engrais phosphatés traditionnels sont créés en traitant des roches phosphatées à l'acide. Le coût élevé de ce procédé rend ces engrais inaccessibles aux agriculteurs des pays en voie de développement¹⁰⁸. Les **phosphorites** constituent une source de phosphore moins chère que les engrais phosphatés, mais dans laquelle le phosphate est **nettement moins soluble**. Il s'agit simplement de roches non traitées naturellement riches en phosphate. Des auteurs comme ¹⁰⁸ suggèrent donc de les utiliser additionnées d'acides organiques en remplacement des engrais phosphatés traditionnels. L'intérêt de cette démarche a été confirmé par des travaux qui montrent qu'un apport d'oxalate dans un sol améliore la nutrition phosphorée des plantes comme le maïs¹⁰⁹.

Dans ¹¹⁰, du blé a été cultivé dans du sol stérile, en serre, dans des conditions où le seul phosphate présent est sous forme de phosphorite. L'ajout de différentes souches solubilisatrices du phosphate a permis d'augmenter la masse des plantes, ainsi que leur contenu en phosphate et en azote par rapport au contrôle non inoculé. Des travaux ont montré un effet comparable sur la luzerne³³ et sur la fève *Vicia faba*^{111,112}. Cet effet est également décrit lorsque le sol n'est pas stérilisé pré-inoculation, comme par exemple dans les études ¹¹³⁻¹¹⁵, qui présentent des résultats similaires, respectivement sur du blé, des haricots mungo et du soja.

L'utilisation de souches solubilisatrices exogènes est donc prometteuse. Cependant, il est fréquent qu'une souche qui marche bien dans un contexte particulier se révèle inefficace sur une autre culture, dans un autre sol, d'autres conditions climatiques... La simple survie d'une souche après inoculation est rare,

La plupart des articles sur le sujet s'accordent à **dire que le passage du laboratoire ou de la serre expérimentale au champ** est souvent un **échec**, pour différentes raisons, pas toutes comprises ^{102,116,117}. Le rapport coût-bénéfice de remplacer des produits phytosanitaires conventionnels par des souches solubilisatrices est généralement en défaveur de ces dernières, notamment car leur efficacité varie beaucoup d'un champ à l'autre ¹⁰². Même si des souches solubilisatrices sont déjà commercialisées dans plusieurs pays^{116,118}, du travail doit encore être fait pour un jour espérer utiliser de façon fiable les microbes solubilisateurs comme substitut aux engrais.

Une autre approche est d'essayer de comprendre les **dynamiques naturelles** des microorganismes solubilisateurs présents dans les sols : dans quels sols les solubilisateurs sont-ils les plus abondants ? quels facteurs stimulent la solubilisation ? quelles pratiques agricoles favorisent leur développement ? Cette approche, prometteuse aux vues des difficultés de l'introduction de souches exogènes est pourtant peu développée. Quelques auteurs s'y sont intéressés, comme Azziz et Al³⁹ qui mesurent l'abondance de solubilisateurs du phosphore en fonction du traitement agricole appliqué à une parcelle expérimentale. Par ailleurs, si des études d'envergure comme ¹¹⁹ ont étudié la répartition de la biomasse microbienne sur de vastes territoires, aucune équipe n'a à notre connaissance mené de tels tests sur le nombre de solubilisateurs de phosphate. Cela pourrait pourtant nous renseigner sur les facteurs qui favorisent leur développement. Pour cela, il nous semble qu'une méthode **simple, rapide et peu onéreuse** est **nécessaire**. Au-delà de ça, cette méthode pourrait permettre de mener des tests personnalisés pour les agriculteurs, qui pourraient obtenir des informations sur le microbiote présent dans leurs sols. Pour faire cela, il faudrait être capable de mesurer la capacité solubilisatrice d'un microbiote de façon rapide, simple et peu onéreuse. Voyons les techniques qui permettent aujourd'hui de faire cela.

3.6 Comment déterminer qu'un microbe solubilise le phosphate ?

3.6.1 La voie de la génétique

Des travaux ont été menés sur les **bases génétiques de la solubilisation** du phosphate inorganique :

- Goldstein et son équipe ont révélé dans les années 1990 plusieurs **gènes** impliqués dans la solubilisation du phosphate via la sécrétion d'**acide gluconique**^{98,120,121}.
- Les travaux de Illmer et Schinner ont révélé des gènes similaires chez d'autres espèces bactériennes¹²².

D'autres travaux ont mis en lumière différents gènes impliqués dans la synthèse de phytase¹²³. Cependant, compter les microorganismes solubilisateurs avec cette méthode pose plusieurs problèmes :

- A notre connaissance, aucun gène n'a été identifié pour la sécrétion d'autres acides organiques comme le citrate et le malate, pourtant connus comme ayant des rôles majeurs dans la solubilisation.

- Il est possible que l'on passe à côté de familles entières de gènes impliqués dans la solubilisation du phosphate.
- Quand bien même nous aurions une bonne connaissance de ces mécanismes, seule une fraction des microbes possédant un gène l'expriment réellement. Trouver un gène ne signifie pas qu'il est exprimé.

Pour ces raisons, la détection de solubilisateurs repose encore majoritairement sur des méthodes avec culture, même si l'abondance du gène *gcd*¹²⁴, impliqué dans la sécrétion de protons à partir du glucose, est parfois étudiée¹²⁵. On notera également des initiatives comme GeoChip, une puce qui permet de sonder la présence de gènes de l'environnement, notamment ceux impliqués dans le cycle du phosphate¹²⁶. Elle a par exemple été utilisée pour estimer le niveau de stress lié au manque de phosphate dans les microbiotes de tourbières¹²⁷. A notre connaissance cependant, cette sonde ne permet de détecter que les gènes liés à la synthèse d'enzymes impliquées dans l'obtention de phosphate à partir de molécules organiques : phytase, phosphatase...

3.6.2 La détection de halos après culture

Dans la totalité des articles que nous avons trouvé sur le sujet, un microorganisme est réputé solubilisateur si un **halo transparent** apparaît autour de sa colonie lorsqu'on le cultive sur un milieu contenant des **particules de phosphate**. Ce halo transparent est le signe que les particules ont été dissoutes. Dans

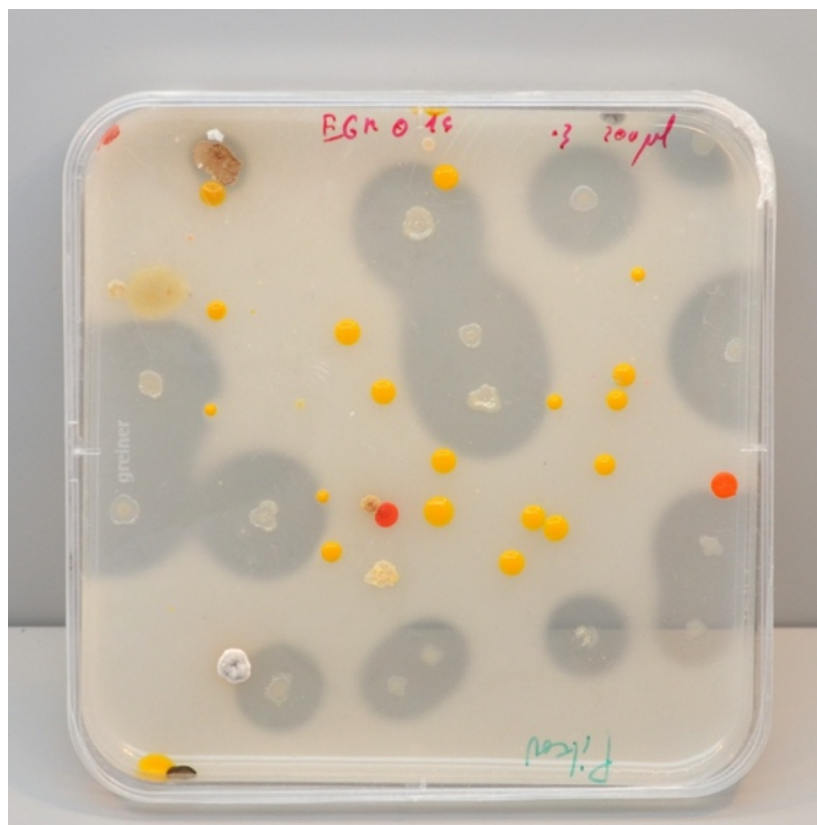


Figure 3-7 : Une suspension de sol cultivée sur du milieu Pikovskaya, après 5 jours d'incubation. Notez les halos transparents autour de certaines colonies. Travail personnel. La boîte mesure 12cm de côté (« grande boîte de Petri »)

la quasi-totalité des cas, ces particules sont du phosphate de calcium (hydroxyapatite, ou tricalcium phosphate) et le milieu de culture est généralement du Pikovskaya¹²⁸. Plus récemment, suite aux travaux de Nautiyal¹²⁹ une partie des auteurs se sont mis à utiliser du milieu NBRIP, un milieu similaire au Pikovskaya dont on aurait enlevé la partie organique (l'extrait de levure) et modifié la concentration

de certains sels (voir par exemple^{39,130,131}). Selon Nautiyal, dans ce milieu, les microorganismes solubilisent plus de phosphate que dans du Pikovskaya¹²⁹. Voir la Figure 3-7 pour une illustration de cette méthode avec du milieu Pikovskaya.

Certains auteurs complètent leur étude par une analyse en milieu liquide : les microorganismes sont cultivés dans du milieu Pikovskaya ou NBRIP liquide (c'est-à-dire sans agar) agité, dont on dose la concentration en phosphate libre au cours du temps (avec un méthode telle que celle de Olsen¹³²) et parfois la concentration en différents acides organiques. Voir par exemple^{100,113,131}.

Ces méthodes ont plusieurs limites. Tout d'abord, comme vu plus haut, le phosphate ne se lie au calcium qu'en milieu basique (pH supérieur à 6). Or, **de nombreux sols agricoles sont acides** : en France par exemple, le Massif Central et la Bretagne ont des pH majoritairement acides. Dans ces sols, les ions aluminium et fer seront plus problématiques que le calcium. Certains auteurs se sont intéressés à cette question, comme¹³³ et¹³⁴. Il semble qu'il est plus difficile d'obtenir des halos transparents dans des particules de phosphate de fer ou d'aluminium que dans des particules de phosphate de calcium¹³⁴. Cependant, les mécanismes qui permettent de libérer le phosphate du calcium sont les mêmes que ceux qui le libèrent des autres ions métalliques : l'acidification et la chélation. En conséquent, on peut faire **l'hypothèse** qu'un **bon solubilisateur de phosphate de calcium sera également capable de solubiliser du phosphate de fer**. Par la suite, nous avons choisi de travailler avec du phosphate de calcium pour cette raison, mais également car en France, **la plupart des régions de culture céréalière sont sur des sols alcalins**. Par ailleurs, nous voulions pouvoir nous comparer à la littérature existante, beaucoup plus abondante sur le calcium que sur le fer et l'aluminium.

Ensuite, seule une fraction (0,1%-2%) des microorganismes poussent lorsqu'on les cultive. On peut toutefois penser que les microorganismes cultivables sont les plus importants d'un point de vue fonctionnel. Parmi les microorganismes non-cultivables par cette méthode figurent cependant une partie des **champignons mycorrhiziens**, importants notamment dans l'acquisition de phosphate par les plantes¹³⁵.

Enfin, comme dit plus haut, la dissolution des particules de phosphate de calcium peut être causée par la chélation des ions calcium et/ou par une chute du pH. Dans ce dernier cas, il faut prendre en compte deux facteurs : l'effet tampon et la nature des sucres fournis aux microbes. Ainsi, un **tampon pH** peut empêcher l'acidification, donc la libération du phosphate. Or, **les sols sont des milieux tamponnés**¹³⁶⁻¹³⁸. Certains auteurs ont étudié cette question, avec la conclusion que de nombreuses souches capables de solubiliser le phosphate dans un milieu comme le Pikovskaya en étaient incapables si l'on y ajoutait un tampon pH^{130,139}. Par ailleurs, des études ont montré que selon le sucre fournis aux microorganismes, leur capacité à modifier le pH et à sécréter des chélatants organique était affectée¹³⁰.

C'est pourquoi il serait **utile de séparer l'effet acidification de l'effet chélation** dans la caractérisation de souches solubilisatrices. En effet, un microbe capable de solubiliser de phosphate grâce à un fort effet chélateur sera probablement plus efficace qu'un autre qui ne fait qu'abaisser le pH de son environnement proche. A notre connaissance, cela n'a pas **jamais été fait de manière quantitative** : aucune étude ne s'est intéressée à la fraction de solubilisateurs qui ne fait qu'acidifier et à celle qui a un fort pouvoir chélatant.

Malgré cela, cette méthode présente plusieurs avantages notables. Il s'agit tout d'abord d'une méthode **simple et bon marché** : elle donne des résultats en quelques jours et ne nécessite que du matériel de microbiologie de base (un autoclave, une hotte stérile). En outre, il s'agit d'une **méthode fonctionnelle** ; elle mesure directement un métabolisme, un phénotype. Enfin, cette méthode nous a semblé facilement **transposable en gouttes** millifluidiques. Nous pensons qu'elle aura sa place au côté

de méthodes plus modernes comme la génomique dans les décennies à venir, surtout si elle peut être modernisée, rendue plus rapide, plus précise et moins chère comme nous souhaitons le faire.

3.7 Conclusion sur la solubilisation du phosphate en agriculture

Finalement, le phosphate est un nutriment clef en agriculture. Pour des raisons agronomiques et environnementales, la majorité des pays cherchent aujourd'hui à limiter son épandage. En conséquence, une abondante littérature scientifique s'intéresse à des manières alternatives d'assurer l'alimentation phosphorée des cultures. Une piste régulièrement explorée est d'utiliser les microorganismes solubilisateurs du phosphate pour aider les plantes à en acquérir. De nombreuses souches solubilisatrices ont été découvertes et pour certaines, commercialisées. Malheureusement, leur épandage, comme celui de microorganismes pour d'autres usages agricoles a rencontré un succès mitigé pour différentes raisons, pas toutes comprises. En conséquence, nous pensons qu'il serait pertinent d'aborder la question par un autre angle, en cherchant à influencer sur les microbiotes du sol sans apporter de souches exogènes. Pour cela, il serait nécessaire de pouvoir facilement étudier l'abondance en solubilisateurs et la capacité des microbiotes à solubiliser le phosphate.

Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser une technologie innovante de culture de microorganismes à haut débit : la millifluidique de gouttes.

4 Présentation de notre dispositif millifluidique

4.1 Qu'est-ce que la millifluidique/microfluidique de goutte ?

4.1.1 Généralités

La microfluidique est un ensemble de technologies qui permet la **manipulation de fluides à l'échelle du micromètre**. Son développement a profité de celui de la micro-électronique : les technologies qui permettent de confectionner des circuits imprimés peuvent être adaptées à la confection de canaux de quelques micromètres de large dans lesquels on peut faire circuler des fluides¹⁴⁰.

En travaillant à des échelles microscopiques, on gagne en **productivité** : les quantités de réactifs chimiques sont réduites et les temps d'analyse raccourcis. Il devient alors possible de **paralléliser** et d'automatiser des expériences. Ces propriétés de la microfluidique ont été mises à profit notamment pour concevoir des **machines d'analyse à très haut débit pour le séquençage de l'ADN**, aujourd'hui dans le quotidien des chercheurs en biologie, par exemple par l'entreprise Illumina.

Par ailleurs, travailler à l'échelle microscopique permet d'observer et de manipuler des **objets de la taille d'une cellule**. Cela a été mis à profit durant la dernière décennie pour la culture et l'observation de cellules animales ou de microorganismes, par exemple en microbiologie :

- Pour l'étude du lien entre résistance aux antibiotiques et variabilité phénotypique de populations monoclonales de bactéries¹⁴¹
- Pour l'étude des divisions et du vieillissement de cellules procaryotes : on est capable de suivre une cellule bactérienne division après division en l'immobilisant au bout d'un canal microfluidique¹⁴²
- Pour la culture de microorganismes de l'environnement (notamment du sol). En confinant des microorganismes dans des cellules faites de parois perméables aux molécules, mais suffisamment fines pour empêcher le passage des microorganismes, des chercheurs ont réussi à découvrir un nouvel antibiotique sécrété par des microbes du sol jusque-là considérés comme incultivables¹⁴³
- Pour tester rapidement la réactivité d'un échantillon à des dizaines de molécules : 500nl d'un échantillon liquide suffisent à tester sa réactivité à 48 réactifs avec la SlipChip et ce avec du matériel de terrain (c'est-à-dire en dehors d'un laboratoire d'analyse)¹⁴⁴

4.1.2 La microfluidique multi-phases

La microfluidique peut se diviser en deux familles : la microfluidique simple phase et la microfluidique multiphase. En microfluidique simple phase, toutes les réactions ont lieu dans une même phase, qui se trouve généralement être une solution aqueuse. Les exemples précédents appartiennent à cette famille de technologies.

La microfluidique multi-phase quant à elle consiste à générer des **gouttes de solution aqueuse** (et éventuellement des bulles de gaz) dans une **phase continue huileuse**. A la condition de choisir correctement les paramètres expérimentaux tels que la composition de l'huile, la température et éventuellement le surfactant :

- Les transferts de soluté à travers l'huile sont négligeables
- Les gouttes peuvent être maintenues plusieurs jours sans coalescer

Chaque goutte peut alors servir de **micro-réacteur**, isolé chimiquement de ses voisins. Ces technologies ont déjà largement pénétré le marché de l'analyse scientifique, avec par exemple l'entreprise 10x Genomics, qui propose d'étudier l'expression génétique de cellules uniques. Voir les revues^{145,146} pour une présentation des applications de la microfluidique de gouttes en chimie et biologie.

Parmi les intérêts notables de la microfluidique multi-phases figurent la possibilité de mener des expériences sur un **grand nombre de gouttes en parallèle**, chacune pouvant contenir soit une **cellule unique**, soit une **communauté de microorganismes**, avec un débit d'analyse élevé (jusqu'à $2,5 \times 10^5$ gouttes par seconde) et des procédures qui peuvent être standardisées^{146,147}. On peut ainsi étudier des **événements rares** tels que la détection de cellules cancéreuses pour des prix nettement inférieurs aux méthodes classiques¹⁴⁸.

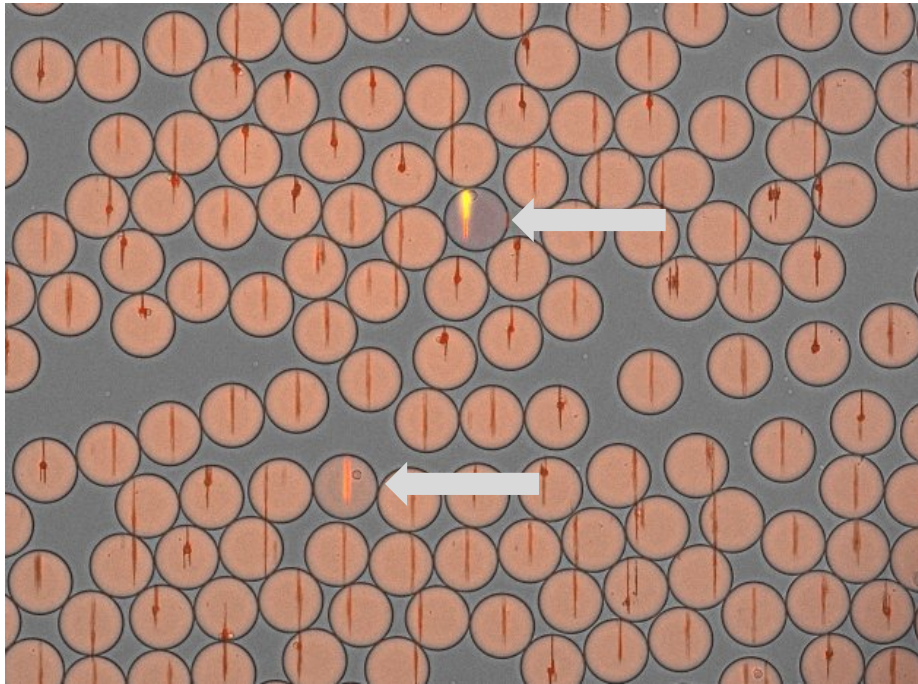


Figure 4-1 : Un exemple de microfluidique de gouttes. Des gouttes sont enfermées dans une chambre stérile transparente. Chaque goutte contient au maximum un lymphocyte et des antigènes fluorescents. Si la cellule sécrète des anticorps contre l'antigène, les antigènes se concentrent au centre de la goutte, ce qui permet de facilement repérer les lymphocytes qui sécrètent le bon anticorps (indiqués par les flèches noires). Chaque goutte mesure $50\mu\text{m}$ de diamètre. Crédit : Nathan Aymerich

Il est aujourd'hui possible de réaliser diverses opérations sur ce type de gouttes : on peut par exemple faire fusionner deux gouttes, en diviser une en deux ou trier des gouttes en se basant sur des paramètres physiques comme la fluorescence de leur contenu. Cela a permis l'adoption de cette technologie dans la recherche en biologie, par exemple :

- Pour la **culture de microorganismes rares ou difficiles à cultiver**¹⁴⁹. Dans notre laboratoire, des travaux ont été menés sur les microorganismes du sol : en encapsulant une suspension de sol dans des millions de gouttes de quelques dizaines de picolitres, on se donne une chance de faire pousser des espèces très rares, ce qui nécessiterait de réaliser des milliers de boîtes de Petri¹⁵⁰.
- Pour la détection de **mutations** liées à des cancers¹⁵¹
- Pour la recherche d'**anticorps thérapeutiques** par phage display¹⁵²
- Pour l'étude de la **variabilité phénotypique** à l'échelle de la cellule individuelle au sein d'échantillons monoclonaux^{153,154}

Cependant, certaines **contraintes** viennent avec la **miniaturisation** : pour étudier un grand nombre de gouttes en parallèle, il est souvent **impossible de mesurer plusieurs fois la même goutte**¹⁵⁵, soit parce qu'il est difficile d'identifier les gouttes, soit parce que la mesure ne peut se faire qu'en fin d'incubation. Il est par ailleurs difficile de récupérer les gouttes d'intérêt si celles-ci sont trop petites. Globalement, les montages de microfluidique sont réservés à des spécialistes.

Pour pallier ce problème, une solution consiste à **générer des gouttes plus grosses**. Cela est particulièrement vrai lorsque le nombre de gouttes n'a pas besoin d'être très élevé. On parle alors plutôt de **millifluidique**. Si le nombre de gouttes est à volume égal plus faible qu'en microfluidique, il devient cependant possible de manipuler finement les gouttes (voir les travaux pionniers de l'équipe de Kohler¹⁵⁶). De manière générale, contrairement aux gouttes micro fluidiques, on peut avoir plusieurs conditions au sein de la même expérience. On peut par exemple réaliser des gradients de concentration, ce qui a été utilisé au sein de notre laboratoire pour étudier la dose minimale inhibitrice d'antibiotique de façon précise et rapide¹⁵⁷.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'utiliser la millifluidique de gouttes pour étudier les microorganismes du sol. Cette technologie nous a permis de tester au sein d'une même expérience plusieurs échantillons microbiens simultanément, à plusieurs concentrations, comme nous le verrons dans de prochains chapitres.

4.2 Notre dispositif d'étude : la millifluidique de gouttes MilliDrop

Notre dispositif expérimental repose sur les machines de MilliDrop Instruments (une entreprise spin-off du laboratoire). Ces machines sont des automates de culture pour la microbiologie, conçus pour générer, incuber et suivre dans le temps jusqu'à 940 gouttes d'environ 700nl. Certains paramètres optiques tels que la fluorescence et la diffusion de la lumière peuvent ensuite être mesurés au cours du temps pour chaque goutte. On peut enfin récupérer les gouttes que l'on souhaite en fin d'incubation.

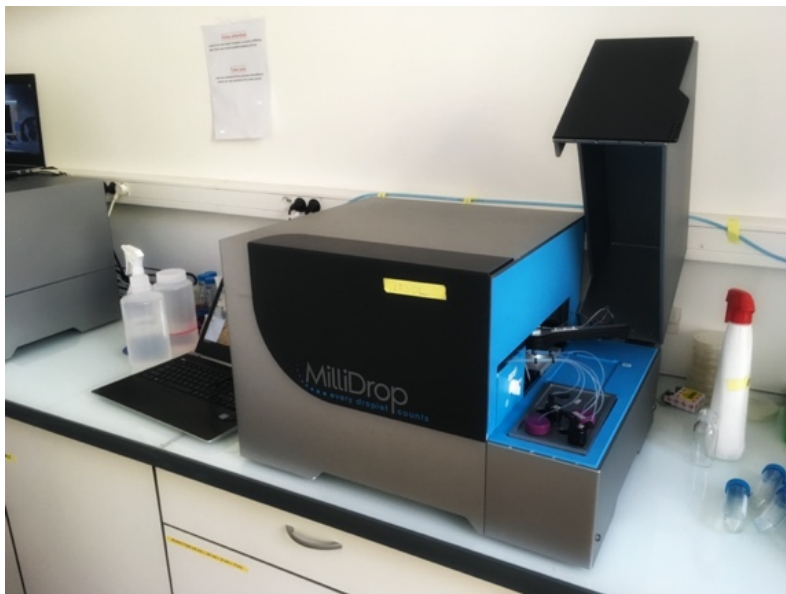


Figure 4-2 : une machine MilliDrop

Pour mieux saisir le fonctionnement de notre machine, voici le déroulement type d'une expérience menée en son sein (Figure 4-3) :

4.3 Génération d'un train de gouttes dans une machine MilliDrop

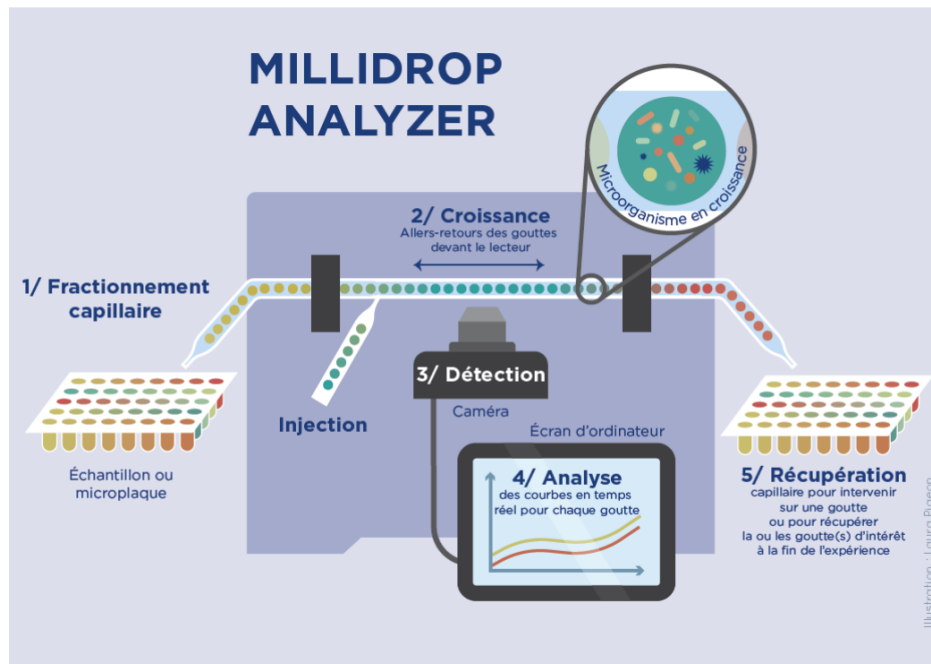


Figure 4-3 : Illustration du fonctionnement d'une machine MilliDrop

4.3.1 Préparation de la plaque

Les machines MilliDrop génèrent des gouttes à partir de **plaque multipuits classiques** (96 puits dans notre cas), que l'on aura préalablement préparées comme n'importe quelle plaque pour une incubation en microbiologie. Chaque puits de la plaque doit contenir **une solution aqueuse** (qui sera dans la majorité des cas un milieu de culture) dans laquelle on est libre d'ajouter n'importe quel élément nécessaire aux expériences :

- Un inoculum : souches pures, mélange de plusieurs souches microbiennes, extrait de sol, enzymes...
- Des sondes moléculaires fluorescentes et/ou absorbantes
- Des particules colloïdales
- Des antibiotiques, antifongique ou autres molécules chimiques

4.3.2 Génération des gouttes (durée totale : environ une heure)

Une fois la plaque préparée, on l'introduit dans la machine. Grâce à un bras robotique (Figure 4-4), celle-ci va alors aspirer du liquide dans chaque puits, pour former des gouttes. Un injecteur permet d'**entourer les gouttes d'une gaine d'huile fluorée**. Chaque goutte est alors aspirée dans un **tube en teflon transparent** d'une vingtaine de mètres, préalablement rempli d'huile fluorée et enroulé sur lui-même, dans lequel aura lieu l'incubation. Toute cette génération est fait automatiquement, sans intervention humaine.

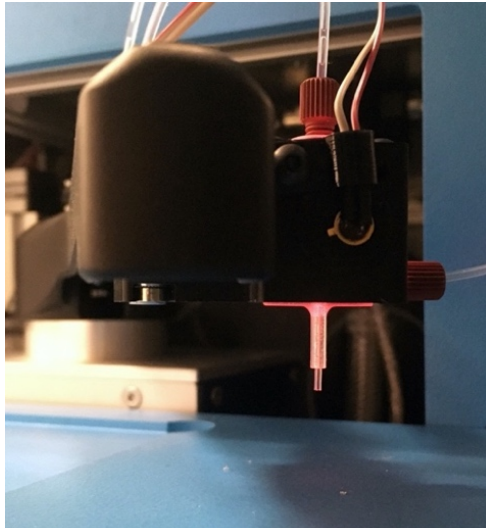


Figure 4-4 : le bras robotique et la tête d'aspiration responsables de la génération des gouttes

En outre, **une bulle d'air est générée entre chaque goutte**, pour les séparer physiquement et éviter qu'elles ne fusionnent. La bulle sert également de réservoir d'air pour les microorganismes qui poussent dans les gouttes. Voir Figure 4-5.

4.3.3 L'incubation (jusqu'à 50h environ)

Une fois dans le tube, des pompes font réaliser au train de gouttes des **allers-retours à intervalles réguliers**. De cette manière, les gouttes **ne sont immobiles qu'un bref instant** (moins d'une seconde) lors du changement de sens, ce qui permet de **maintenir un film d'huile entre elles et les parois du tube**, évitant ainsi que des microbes ne s'y fixent et contaminent les gouttes voisines. Cela crée par ailleurs un courant de convection dans les gouttes, ce qui permet de les **mélanger**, donc de les maintenir **homogènes**. Là aussi, toute l'incubation est automatique.

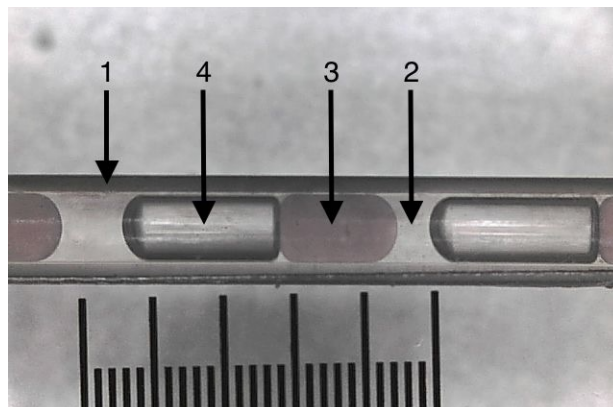


Figure 4-5 : Une goutte au cours de son incubation. 1 : tube en teflon. 2 : huile. 3 : goutte. 4 : bulle d'air. Les grandes graduations sont espacées d'un millimètre.

Un trajet dure environ 30 minutes.

Le tube étant transparent, il est possible de réaliser des **mesures optiques** sur les gouttes. Pour ce faire, à certains points du tube, la machine est équipée de lecteurs optiques :

- **Bloc fluorescence** : une photodiode envoie des rayons lumineux à une longueur d'onde donnée, un photomultiplicateur récupère la lumière émise à une autre longueur d'onde. Cela permet d'utiliser des sondes fluorescentes dans la machine (des produits dont la fluorescence dépend de caractéristiques chimiques ou métaboliques du contenu des gouttes) ou de suivre des microorganismes eux-mêmes fluorescents. Nous avons les deux blocs suivants :
 - Fluorescence 1 : excitation à 497 nm, lecture à 527 nm
 - Fluorescence 2 : excitation à 565 nm, lecture à 620 nm
- **Bloc scattering** : un laser de longueur d'onde 635 nm est envoyé sur les gouttes, on mesure le signal lumineux diffusé à 90° par rapport au laser. Il s'agit d'une mesure de néphélométrie en goutte, c'est-à-dire d'une mesure de la **diffusion de la lumière**. Le scattering varie dans le même sens que la concentration en particules (notamment en microorganismes) et que l'indice de réfraction de ces particules (des particules minérales diffusent plus la lumière que de la matière organique, à taille et concentration équivalentes). Notez que cette grandeur est utilisée depuis longtemps comme proxy de la concentration en microorganismes¹⁵⁸. Elle peut aussi servir à mesurer la concentration en particules minérales, comme nous le verrons plus loin.
- **Une caméra, activée manuellement.**

L'enceinte d'incubation est maintenue à **température constante à 28°C** pour toute la durée de l'expérience.

4.3.4 Traitement des données

Les différents signaux optiques sont enregistrés en continu sur un ordinateur associé à la machine. A partir de ces signaux bruts, un logiciel reconstitue le signal optique de chaque goutte au cours du temps. Voir Figure 4-6.

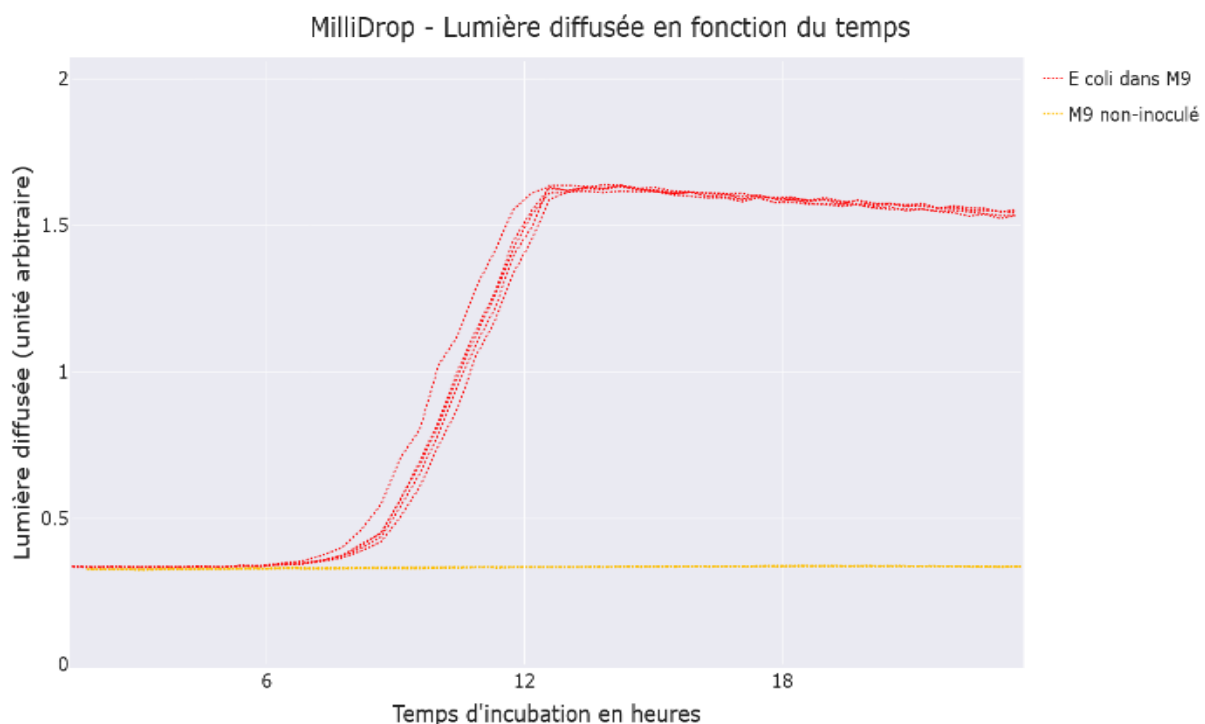


Figure 4-6 : Signal de scattering de quelques gouttes de milieu M9 inoculées avec des *E coli* – une dizaine de gouttes sont représentées. Chaque goutte contenait environ 10^6 cellules en début d'incubation, environ 10^8 cellules en fin d'incubation

4.3.5 Récupération de gouttes d'intérêt (facultatif)

Il est possible de récupérer les gouttes que l'on désire dans une plaque 96 puits préparée à cet effet. Cela met cependant fin à l'incubation du train entier.

4.4 Les intérêts de notre dispositif

Ce dispositif propose des propriétés à mi-chemin entre la microbiologie pasteurienne classique et la microfluidique de goutte :

- Il est possible de suivre chaque goutte au cours du temps, ce qui est souvent impossible avec les dispositifs microfluidiques
- Il est possible d'incuber jusqu'à 940 gouttes, avec 94 conditions différentes, ce qui représente un gain de productivité d'environ 10 par rapport à une expérience en plaque 96 puits dans un lecteur de plaque. Si cela reste nettement inférieur à la microfluidique de gouttes, qui permet de créer des millions de gouttes, cela permet :
 - D'une part de facilement accéder à des expériences en « **cellule unique** » (en diluant suffisamment, on peut être quasi-certain de n'avoir qu'une cellule par goutte en début d'incubation).
 - D'autre part, d'**encapsuler ensemble** jusqu'à **plusieurs** centaines de **microorganismes** différents et d'observer d'éventuelles interactions entre eux.
- Il est aisé de récupérer des gouttes d'intérêt en fin d'expérience, ce qui est difficile et peu fiable avec la microfluidique de goutte
- Les gouttes sont en permanence mélangées, ce qui assure leur **homogénéité**, notamment vis-à-vis de **l'oxygène**. Ce paramètre peut représenter une forte limitation aux expériences en plaques multipuits, où l'oxygène diffuse très lentement jusqu'au fond des puits, qui se trouvent rapidement en anoxie. Par ailleurs, dans des expériences non présentées, nous avons constaté que lorsque l'on cultive des microorganismes dans un même puits, certains peuvent sédimenter au fond, et être ainsi physiquement éloignés des autres. Ce problème ne se pose pas en gouttes.
- Le module de scattering offre une **lecture de la diffusion lumineuse** qui serait **impossible en puits**. Les propriétés optiques des gouttes sont en générale meilleures pour une expérience en gouttes qu'en puits.
- Le **confinement permet d'atteindre rapidement des concentrations élevées** (en microorganismes ou en solutés). De nombreux phénomènes peuvent donc être détectés plus tôt qu'avec les méthodes classiques.
- **En plaque multi-puits, les puits proches des bords sont plus en contact avec l'air** que ceux du centre. Il en résulte que ces puits sont **plus oxygénés** et que leur contenu est plus susceptible de **s'évaporer**. Les conditions ne sont donc pas exactement les mêmes selon la position sur la plaque, ce qui peut poser problème pour des incubations de plusieurs jours. Avec notre setup, les conditions sont plus homogènes le long d'un train. De manière générale, travailler en gouttes millifluidique va permettre **d'être plus précis et répétable** que travailler en puits.
- Enfin, et c'est peut-être là l'argument le plus important, la machine MilliDrop est **beaucoup plus simple d'utilisation que les montages expérimentaux de microfluidiques**, opérables uniquement par des spécialistes. Pour preuve, elle est déjà commercialisée.

Nous avons donc choisi de mettre à profit ce dispositif pour cultiver des microorganismes du sol. La première étape a consisté à s'assurer que l'on pouvait cultiver des microorganismes du sol dans notre machine, que leur présence était détectable avec nos modules optiques et de comparer le nombre de microorganismes avec la méthode traditionnelle.

5 Validation de la technologie sur l'énumération de microorganismes du sol

Notre dispositif de génération et d'incubation fonctionnel, nous avons voulu nous en servir pour énumérer les microorganismes cultivables du sol.

Nous avons choisi de mesurer la concentration en microorganismes cultivables car sans être directement impliquées dans la fertilité des sols ou la qualité des services écosystémiques rendus, des variations du nombre de cellules cultivables sont souvent des signes avant-coureurs de modifications plus profondes. On peut penser que toutes choses égales par ailleurs, plus un sol est riche en microorganismes, meilleures seront ses propriétés fonctionnelles. En outre, si l'on souhaite évaluer des fonctions d'un sol (par exemple le nombre de microorganismes capables de solubiliser le phosphate), il est nécessaire de rapporter la fonction au nombre de microorganismes ; par exemple de savoir si le faible score obtenu sur une fonction est lié à une rareté en microorganismes ou à une population microbienne abondante mais qui n'exprime pas la fonction étudiée.

Nous avons choisi de nous intéresser à la biomasse cultivable (et non la biomasse totale) notamment parce qu'en cultivant les microorganismes, on accède facilement à leur phénotype, donc à leurs fonctions.

Pour ce faire, nous avons incubé différentes suspensions de microorganismes dans la machine et estimé le nombre de cellules qui poussaient. Afin de valider la pertinence de cette mesure, ces résultats ont été comparés à ceux obtenus sur boîtes de Petri, la méthode de comptage de référence.

Nous commencerons par présenter un bref état de l'art sur les méthodes existantes d'estimation de la biomasse microbienne des sols.

5.1 L'estimation de la biomasse microbienne du sol

La biomasse microbienne du sol est la masse que pèsent les microbes d'un sol donné. Elle est difficilement accessible directement et il a donc fallu inventer différentes méthodes indirectes pour l'estimer dont voici un échantillon des plus communes^{6,159} :

5.1.1 La mesure d'un nombre de cellules microbiennes :

Les premières équipes de recherche à s'intéresser aux microorganismes du sol ont mesuré la biomasse du sol grâce par le nombre de cellules. On peut soit compter les cellules en les cultivant sur un milieu de culture (dans ce cas, on n'a accès qu'à la biomasse cultivable), soit compter les cellules au microscope après les avoir marquées avec des sondes fluorescentes¹⁶⁰⁻¹⁶². Dans le premier cas, les microorganismes sont extraits du sol puis étalés sur une boîte de Petri ou dilués dans un milieu de culture liquide avant d'être incubé pour plusieurs jours. On détecte ensuite leur croissance visuellement : des colonies se forment sur boîte ; le milieu liquide change d'apparence. Dans le second cas, les cellules sont simplement comptées visuellement par un opérateur après avoir été déposées sur un filtre ou dans une chambre de comptage. Des études ont montré que seuls 0,1 à 2% des cellules détectables au microscope étaient susceptibles de pousser³⁷. En d'autres termes, la grande majorité des microbes du sol ne pousseront pas lorsqu'on essaiera de les cultiver.

5.1.2 La mesure de la masse de carbone digestible

La fumigation-incubation (FI) consiste à fumer un échantillon de sol avec du chloroforme, ce qui tue la majorité de la biomasse vivante contenue dans l'échantillon. Une fois la fumigation terminée, on inocule l'échantillon avec un peu de sol frais. En se développant, les microbes du sol frais vont se nourrir des restes de la biomasse fumigée, ce qui relâche du CO₂. Plus l'échantillon contenait de biomasse,

plus l'efflux de gaz carbonique sera important. L'efflux est donc utilisable comme mesure de la biomasse du sol ^{163,164}. La fumigation-extraction (FE) est similaire si ce n'est qu'on ne ré-inocule pas l'échantillon fumigé, mais que l'on mesure la quantité de carbone directement avec une méthode de dosage chimique.

Notez que ces procédés sont lourds : le chloroforme est classé CMR (Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique) et doit donc être manipulé avec précaution. La fumigation dure 24 heures, l'incubation 10 jours, et le dosage chimique nécessite de chauffer l'échantillon à 150°C.

5.1.3 La mesure d'une activité métabolique

Plusieurs méthodes d'estimation de la biomasse microbienne reposent sur la **mesure d'une activité métabolique**. Cette activité est supposée corrélée avec la masse de microbes dans le sol. Citons la mesure de l'efflux de CO₂ : On mélange un substrat (généralement du glucose) à un échantillon de terre, puis on mesure l'activité respiratoire pendant plusieurs heures ^{165,166}. Il est également possible de mesurer la quantité de chaleur générée par les microbes, qui dépend aussi de la biomasse ¹⁶⁷. Citons également la mesure d'une activité enzymatique : on mesure une activité enzymatique non-spécifique en incubant un échantillon avec un substrat fluorescent tel que le diacétate de fluorescéine ¹⁶⁸. On peut ensuite mesurer l'activité enzymatique grâce à la fluorescence.

5.1.4 La mesure de la quantité d'ADN microbien

Il est aussi possible de mesurer l'ADN par gramme de sol ¹⁶⁹. Même s'il ne s'agit pas d'une mesure de la biomasse, elle corrèle avec la biomasse des sols. Cette mesure s'est développée dans les précédentes décennies suite au développement des méthodes moléculaires dans l'analyse du sol. Elle est « plus pratique et efficace » que les méthodes classiques selon ¹¹⁹.

5.1.5 Conclusion sur ces méthodes

Comment choisir une méthode ? Pourquoi se baser sur l'une plutôt que sur l'autre ? Une première réponse est qu'en général, **on peut choisir celle que l'on souhaite**. En effet, plusieurs études ont cherché à comparer les résultats obtenus pour un même sol avec différents modes de mesure. Sur deux sols, prélevés à différentes profondeurs, Taylor et Al ¹⁰ a par exemple quantifié la biomasse microbienne avec différentes méthodes (respiration après ajout de substrat, comptage direct, comptage après culture, dosage de l'ADN microbien...). Ces travaux montrent une **forte corrélation positive entre les différentes mesures**. Plusieurs auteurs ont comparé l'ADN extrait du sol et les résultats issus de la fumigation. Ils en ont conclu que ces méthodes étaient équivalentes ^{119,170}. De façon similaire, Sparling et Al a trouvé une bonne corrélation entre FE et respiration après ajout de substrat sur sept sols ³.

Cependant, dans certains cas, on trouve des différences notables entre les méthodes d'estimation de biomasse microbienne. Ainsi par exemple, si les champignons représentent une part importante de la biomasse, comme dans les sols forestiers, le dosage de l'ADN risque de sous-estimer la biomasse microbienne ¹⁷¹. De même, si le sol a récemment subi un amendement avec de la matière organique, le dosage du CO₂ après ajout de substrat est peu fiable ^{7,172}. D'après ⁷, il existe également divers biais aux mesures par fumigation : la FI ne marche que pour des sols avec un pH supérieur à 5 et qui ne contiennent pas de source de carbone facilement extractible (par exemple ne marche pas si on a récemment ajouté des racines de blé broyées ¹⁷³) et que pour des sols suffisamment humides ³.

Un bon analyste du sol doit donc pouvoir utiliser un éventail de méthodes et savoir les utiliser à bon escient. Selon ¹⁶¹, « chaque méthode mesure une facette légèrement différente de la biomasse microbienne et il serait stupide de ne reposer que sur une méthode si la mesure de la biomasse est au cœur de ce que l'on étudie ». On notera cependant que la FE et le dosage de l'ADN microbien semblent être les plus pratiqués.

Malgré la standardisation des modes de mesures de la biomasse microbienne du sol dont témoignent notamment les normes ISO pour la mesure par fumigation-extraction (ISO (14240 : 2 : 1997)) et pour le dosage de l'ADN microbien du sol (ISO 11063:2020), malgré tous les phénomènes agricoles connus pour être influencés par la biomasse microbienne^{6,47,174} et malgré les parutions suggérant que celle-ci devrait être utilisée comme indicateur de qualité des sols^{175,176} (Il a notamment été suggéré que les changements de biomasse microbienne pouvaient être un signe avant-coureur de perte de carbone organique dans le sol^{174,177}), il semble que la mesure de la biomasse microbienne du sol n'est pratiquement jamais menée par les agriculteurs¹⁶¹.

Selon Stockdale et Brookes¹⁶¹, cela tient à plusieurs aspects :

- Pour qu'un agriculteur prenne en compte un procédé, il faut qu'il puisse intervenir dessus et que cela soit rentable. Or, les auteurs de la revue n'ont trouvé aucun article de recherche « qui expliquerait [...] les étapes pratiques à mettre en œuvre par un fermier pour manipuler de façon fiable la biomasse microbienne du sol, à part pour le cas limité de l'apport de souches fixatrices d'azote ou de souches de bio-contrôle ».
- « En général, seule une petite proportion des agriculteurs adopte les nouvelles technologies ; la majorité continue de se reposer sur la compréhension des principes de gestion du sol et de la fertilisation acquise par l'éducation, ou transmise au fil des générations. »

Les auteurs concluent qu'une révolution est nécessaire dans la communauté scientifique afin que les connaissances « qui reposent au fond des journaux scientifiques » soient partagées avec les gestionnaires d'exploitations.

Si nous comptons sur les agriculteurs, sur le monde de la recherche et sur les instituts de formation pour progressivement démocratiser la quantification de la biomasse microbienne et de ses sous-parties (champignons, fixateurs d'azote libres...), il nous semble que du travail doit encore être fait pour simplifier la mesure, qui demeure coûteuse et laborieuse. Nous pensons que la millifluidique pourrait constituer un mode de mesure rapide, simple et bon marché.

Nous avons choisi de mener une estimation de la biomasse par **comptage de cellules cultivables après incubation**. Cette méthode est peu utilisée aujourd'hui pour la mesure de la biomasse microbienne, mais elle présente différents intérêts qui nous ont fait la choisir :

- Elle est **simple** à mettre en place : il suffit d'extraire les microorganismes puis de les cultiver dans du milieu de culture. Aucun réactif cher ou difficile à utiliser n'est exigé. Les milieux de culture peuvent être conservés longtemps au congélateur ou au frigo et sont peu coûteux. Notez que la simplicité est un élément crucial dans le choix d'une méthode de mesure : plus une méthode est simple et bon marché, plus elle sera utilisée et plus les résultats qu'elle donnera seront utiles
- Dans une optique de caractérisation fonctionnelle, il paraît pertinent de cultiver les microorganismes car cela donne accès à leurs **phénotypes**, donc il sera a priori facile d'évaluer des fonctions agronomiques en plus du nombre de cellules (voir chapitre suivant)
- On peut penser que **la partie cultivable des microbiotes est celle qui a le plus d'importance** ; il s'agit des microorganismes actifs, donc de ceux qui doivent avoir l'impact fonctionnel le plus important
- Elle est particulièrement bien compatible avec notre automate de culture de microorganismes.

Au demeurant, comme expliqué plus haut, la **biomasse totale** semble **généralement corrélée positivement avec le nombre de microorganismes cultivables**.

Afin de mener nos mesures, nous avons dû concevoir un protocole expérimental pour extraire du sol, cultiver, détecter la croissance des microorganismes dans nos gouttes puis mener un traitement statistique adapté.

5.2 Comment cultiver et détecter des microorganismes en gouttes ?

5.2.1 Choix du milieu

Afin de cultiver des microorganismes du sol, nous avons d'abord dû choisir un milieu de culture.

Pour laisser une chance de se développer au maximum de microorganismes différents, il est souhaitable de choisir un milieu qui contient une variété de sels minéraux et d'extraits organiques complexes. De cette manière, mêmes les éventuels microorganismes auxotrophes doivent pouvoir se développer. Nous avons donc choisi le **milieu Pikovskaya** ; un mélange de différents sels, de glucose et d'extraits de levure fréquemment utilisé dans l'étude des microorganismes du sol. Il contient également des particules de phosphate de calcium qui lui donnent un aspect laiteux et dont l'utilité sera précisée dans un prochain chapitre.

Voir annexe pour la composition détaillée.

5.2.2 Comment détecter les microbes qui poussent en goutte ?

Afin de savoir si de la croissance a eu lieu dans une goutte, nous ne disposions initialement que de lecteurs de **fluorescence**. Nous avons donc choisi de détecter le développement de microorganismes en ajoutant au milieu Pikovskaya une sonde fluorescente bien connue : la résazurine.

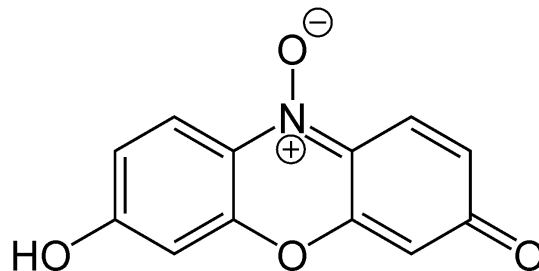


Figure 5-1 : une molécule de résazurine

Source : © Gardini / Wikimedia Commons, domaine public.

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Résazurine#/media/Fichier:Resazurin.PNG>

La résazurine est fréquemment utilisée en microbiologie et en écologie et permet de mesurer la quantité d'oxygène dégagée par un microbiote naturel ou de détecter la présence de microbes métaboliquement actifs^{157,178,179}.



Figure 5-2 : Les différentes formes de la résazurine | Source : © Vicinius Waldow / Wikimedia Commons, domaine public.

C'est une molécule bleue et légèrement fluorescente. Mise en présence de microorganismes qui respirent, elle est réduite de façon irréversible en résorufine, une molécule rose et très fluorescente.

La résorufine peut à son tour être réduite en dihydrorésorufine, une molécule transparente et non-fluorescente ; bien que cette transformation soit réversible¹⁸⁰.

En conséquent, si une goutte contient de la résazurine et des microorganismes actifs, sa fluorescence doit nettement **changer au cours du temps** : elle doit augmenter et/ou diminuer (selon la fraction résorufine/dihydrorésorufine). A l'inverse, si la goutte est vide, son signal doit rester **constant**.

En guise d'illustration, voir la Figure 5-3, qui présente le signal de fluorescence au cours du temps de gouttes inoculées avec différents microorganismes issus d'un sol et où chaque ligne représente une goutte. Le milieu de culture est du Pikovskaya, dans lequel nous avons préalablement introduit 39µM de résazurine de sodium.

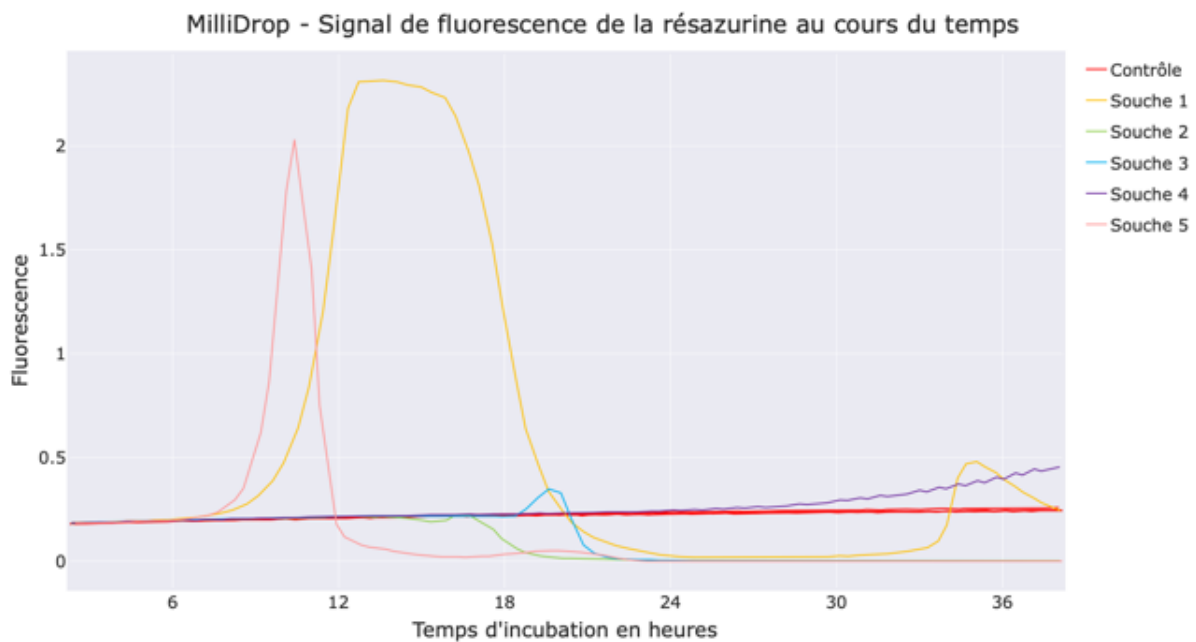


Figure 5-3 : fluorescence de différents microorganismes du sol en fonction du temps

Ce graphique illustre bien la variabilité phénotypique des microorganismes d'un échantillon naturel tel qu'un sol : certaines souches font beaucoup augmenter le signal de résazurine (S1 et S5), d'autres à peine (S3) et d'autres enfin le font descendre sans l'avoir fait augmenter (S2). Des microbes tels que la souche 5 ont un impact précoce et rapide sur le signal de résazurine alors que d'autres comme la souche 4 ont un effet plus lent.

Quoi qu'il en soit, toutes les courbes en couleur sur ce graphique à l'exception des courbes rouges montrent des signes d'activité métabolique. Nous considérerons donc dans la suite de notre analyse

que des telles courbes contenaient au moins un microorganisme cultivable en début d'incubation. A l'inverse, des courbes comme celles en rouge seront considérées comme négatives.

Nous avons finalement une méthode pour détecter l'activité métabolique de microorganismes en gouttes ; un mode de décision pour séparer des gouttes « positives » de gouttes « négatives ». Nous allons maintenant la mettre en œuvre pour estimer une concentration de microorganismes cultivables, à partir d'une culture en gouttes.

5.3 Comment estimer le nombre de cellules cultivables dans une suspension ?

Soit un échantillon liquide dont on cherche à connaître la concentration en microorganismes cultivables.

Pour estimer cette concentration avec un dispositif en gouttes, on peut inoculer du milieu de culture avec notre échantillon, l'incuber et compter combien de gouttes ont un signal résazurine positif. Il risque alors de se poser un problème : si notre échantillon est très riche en microbes, toutes les gouttes seront positives. On n'aura alors aucun moyen de savoir si les gouttes contenaient une, dix, ou dix mille cellules cultivables en début d'incubation. Inversement, si l'échantillon est trop pauvre en microbes, toutes les gouttes risquent d'être vides, et on sera autant dans l'ignorance quant à la concentration de l'échantillon.

Mettons maintenant qu'une partie des gouttes est positive et une autre négative. On a alors une meilleure idée de la concentration initiale de l'échantillon, mais peut-on réellement l'estimer ? Comment savoir si les gouttes pleines contenaient une, dix ou cent cellules en début d'incubation ?

Formellement, on ne le peut pas, mais on peut estimer la probabilité que cela ait lieu. Pour ce faire, on va avoir recours à la loi de Poisson ; une loi de probabilité qui permet de modéliser la survenue d'évènements « rares ».

Soit un liquide de volume V contenant des microorganismes cultivables à une concentration C . On suppose que ce liquide a été homogénéisé et que chaque microbe a une probabilité égale de se trouver en n'importe quel point du liquide. On suppose par ailleurs que l'homogénéisation du milieu a séparé les microbes les uns des autres et qu'ils n'adhèrent pas entre eux.

Supposons maintenant que l'on divise le liquide initial en i gouttes de volumes v_i . En moyenne, chaque goutte i contiendra donc $C \times v_i$ microorganismes cultivables.

(On suppose que la goutte est suffisamment grande et la suspension suffisamment diluée pour que la présence d'un microbe dans la goutte ne modifie pas la probabilité d'un autre microbe de s'y trouver).

On peut alors appliquer à la goutte i la loi de Poisson de paramètre $\lambda = C \times v_i$:

$$P(X = k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}$$

Avec :

- X le nombre de microbes cultivables dans la goutte en début d'incubation
- k un entier
- $P(X = k)$ la probabilité d'avoir k microbes cultivables dans la goutte i en début d'incubation

Voyons maintenant un exemple pour $\lambda = 1$ afin de se faire une idée du comportement de cette loi de probabilité.

5.3.1 Calcul d'espérance pour $\lambda = 1$

La machine est réglée pour avoir des gouttes d'environ $0,7\mu\text{l}$. Nous prendrons ce volume pour nos calculs. Supposons que l'on génère 70 gouttes identiques à partir d'une suspension de concentration en cellules viables C.

Supposons que l'échantillon contient $1,43^{\text{E}3}$ cellules par millilitre, soit une espérance d'une cellule par goutte, ou $\lambda = 1$. On applique la formule citée plus haut et on affiche les résultats sur la Figure 5-4.

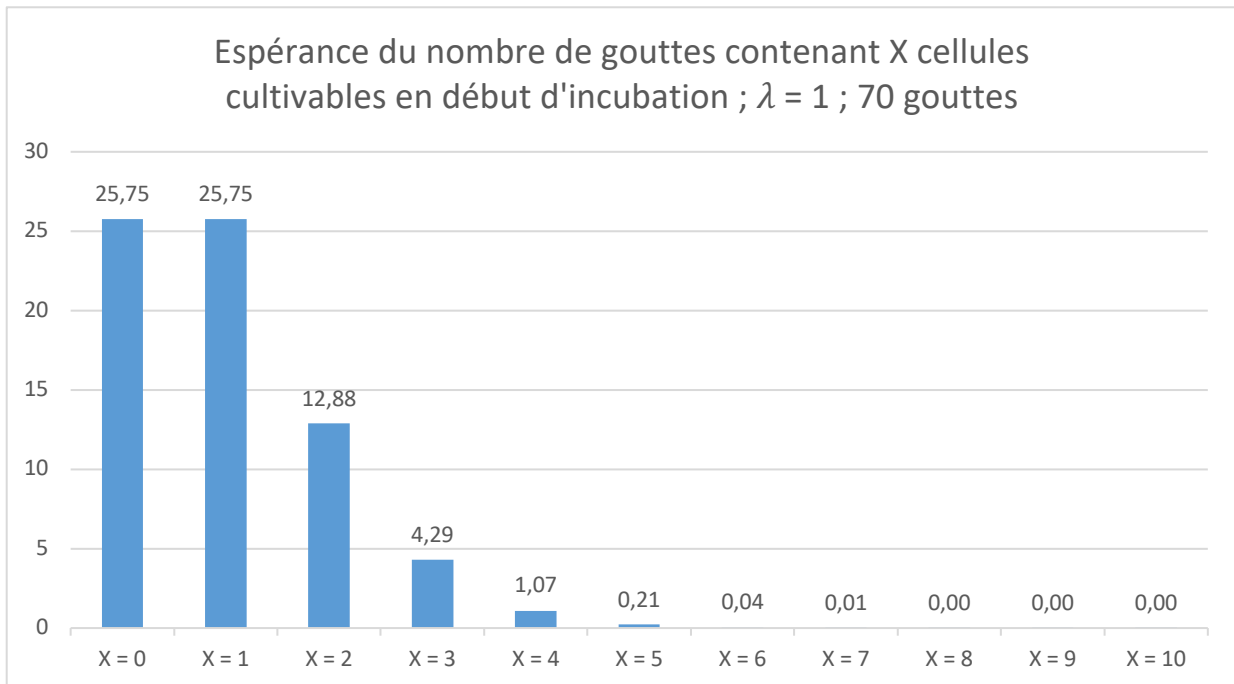


Figure 5-4 : Espérance de la loi de Poisson pour 70 gouttes, avec $\lambda = 1$

En espérance, on trouve :

- 25,75 gouttes vides,
- 25,75 gouttes contenant une cellule viable
- 12,88 gouttes en contenant deux
- 4,29 gouttes en contenant trois
- 1,33 gouttes en contenant quatre ou plus

On note donc que le nombre de cellules viables initialement présentes dans une goutte est limitée : il est très improbable d'obtenir plus de six cellules par goutte. Cela s'explique par le fait que la variance de la loi de Poisson est égale à λ .

En réalité, il est très difficile de dire combien de microorganismes contenait une goutte en début d'incubation à partir de sa courbe de croissance ; de différencier les gouttes contenant un microorganisme viable de celles en contenant deux, trois ou quatre. On ne peut de façon univoque que différencier les gouttes vides des gouttes pleines. En conséquent, sur le calcul précédent, ce qui nous intéresse est qu'en espérance, on trouvera 25,75 gouttes vides et 44,25 gouttes pleines.

On comprend intuitivement qu'en inversant la logique, si l'on incube 70 gouttes d'un liquide de concentration C inconnue et que l'on en trouve 26 vides et 44 pleines, la concentration C la plus probable était proche d'une cellule par goutte (autrement dit, de $\lambda = 1$), soit $1,43^{\text{E}3}$ cellules cultivables/ml.

Une formule (cas particulier de la loi de Poisson pour $X = 0$, voir ¹⁸¹) permet de préciser cette intuition et de calculer formellement la concentration en microorganismes la plus probable à partir du nombre de gouttes vides et du nombre de gouttes pleines. Soient :

- C le nombre de cellules cultivables par millilitre de suspension le plus probable
- w le volume des gouttes
- n le nombre de gouttes
- x le nombre de gouttes vides

$$C = \frac{-\ln(x/n)}{w}$$

Cette formule n'est valable que lorsque $x \neq 0$ et $x \neq n$ (c'est-à-dire lorsqu'au moins une goutte a poussé et lorsque qu'au moins une goutte n'a pas poussé). Et c'est bien là la limite de cette méthode : il n'est possible d'estimer une concentration que dans une gamme de concentrations dont l'amplitude dépend du nombre total de gouttes. Afin de couvrir une gamme plus large, il est possible de diluer la suspension initiale, une ou plusieurs fois.

5.3.2 Afin de couvrir une gamme de concentrations large, nous avons réalisé des dilutions successives

Lorsque l'ordre de grandeur de la concentration en cellules cultivables de l'échantillon étudié est inconnu, il est courant de réaliser des dilutions successives et d'incuber chaque niveau de dilution indépendamment des autres. De cette manière, on se donne une chance d'avoir au moins un groupe de gouttes composé de positives et de négatives. Au passage, notez que cette méthode a été une des premières utilisées pour dénombrer les microbes du sol, au début du XX^{ème} siècle¹⁶¹.

Nous ignorions initialement combien de microbes seraient contenus dans les sols et quelle serait la diversité des sols, c'est pourquoi nous avons adopté la méthode des dilutions successives dans la majorité de nos expériences.

Pour remonter à une concentration initiale en microorganismes, il devient alors nécessaire d'appliquer un traitement statistique un peu plus sophistiqué. Chaque dilution n'est pas prise indépendamment des autres, mais considérées comme apportant une information sur la suspension initiale. Le traitement de nos données repose sur la méthode de Jarvis et al¹⁸² et est détaillé en annexes.

5.3.3 Conclusion

Nous avons un set up qui permet en théorie d'estimer une concentration initiale en microorganismes cultivables d'une suspension à partir du ratio gouttes vides/gouttes pleines de dilutions successives de cette suspension. Nous avons voulu valider expérimentalement la pertinence de ce modèle, en le comparant à la méthode classique des boîtes de Petri, d'abord sur des souches de laboratoire pures, puis sur des échantillons complexes de sol.

5.4 Validation de la méthode de comptage en gouttes avec quelques souches de laboratoire

Afin de vérifier la pertinence de notre modèle théorique, nous avons cultivé quelques souches de laboratoire (dont les identités sont données en annexe), que nous avons incubées dans la machine à différentes dilutions. Pour chaque dilution, nous avons aussi étalé les suspensions de microbes sur des boîtes de Petri contenant le même milieu. Après incubation, nous avons estimé les concentrations initiales en microorganismes par les deux méthodes, puis comparé les résultats obtenus ; les boîtes de Petri étant considérées comme la méthode de référence.

5.4.1 Préparation des milieux de culture

Le milieu de culture est du Pikovskaya. Deux versions en sont faites : une avec agar et une sans agar. Les deux versions sont autoclavées trois minutes à 121°C afin de les stériliser et de dissoudre l'agar. La version gélosée est coulée sur des boîtes de Petri stériles de 14cm de diamètre (boîte grand format) immédiatement après autoclavage. La version liquide est additionnée de 39µM de résazurine de sodium.

5.4.2 Protocole

On dispose un inoculum de 200µl de la souche à étudier dans 10ml de milieu Pikovskaya liquide. On place cette culture dans un incubateur à 28°C pendant trois heures environ. A partir de cette suspension, on réalise trois dilutions dans du milieu Pikovskaya liquide frais d'un facteur 10^4 , 10^5 et 10^6 . A partir de ces dilutions, on prépare des boîtes de Petri et une plaque 96 puits destinée à être incubée dans la machine millifluidique.

5.4.2.1 Boîtes de Petri :

On étale 200µl de chaque dilution sur une boîte de milieu Pikovskaya gélosé. Les boîtes sont disposées dans un incubateur à 28°C ; on compte les colonies dès que celles-ci sont nettement visibles à l'œil nu (72 heures pour les souches de laboratoire), on fait une deuxième lecture au bout d'une semaine pour valider que de nouvelles colonies ne sont pas apparues.

5.4.2.2 Gouttes MilliDrop :

La machine millifluidique génère des trains de gouttes à partir de microplaques. Ici, on en prépare une composée de puits inoculés et de puits vides ; ces derniers servant de contrôle. Plus précisément, chaque dilution est déposée dans sept puits, de façon à avoir 70 gouttes par dilution (voir Figure 5-5). On place alors la microplaque dans la machine et on lance la génération ; on laisse incuber pendant 38 heures. En fin d'incubation, on traite les données récoltées par la machine puis on compte le nombre de gouttes dont la fluorescence a varié au cours du temps (positives) et le nombre de gouttes dans lesquelles le signal est resté plat (négatives), pour chaque dilution. Voir Figure 5-6, Figure 5-7 et Figure 5-8 pour une illustration avec notre souche d'*E coli* ; notez que toutes les gouttes ont poussé à 1 :100, ce qui démontre l'intérêt des dilutions successives.

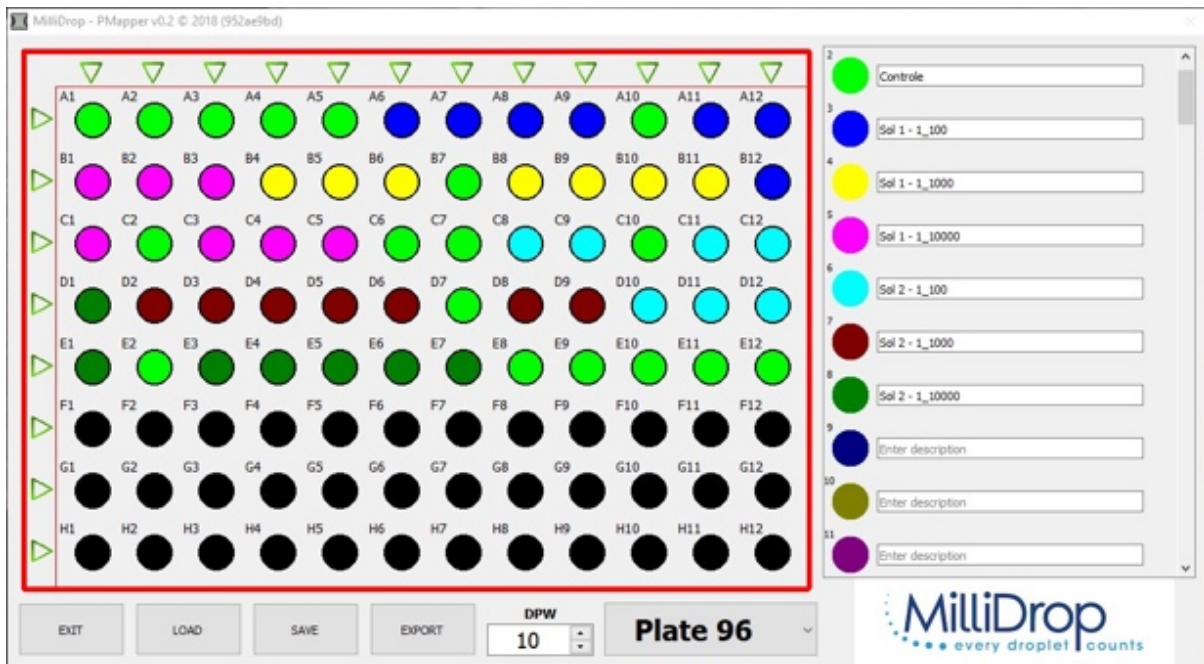


Figure 5-5 : Plan de plaque utilisé dans les expériences de calcul de concentration la plus probable, pour des souches pures et des suspensions de sol

A partir de là, on applique le traitement statistique évoqué plus haut pour obtenir la concentration la plus probable. Notez que dans le cadre de ce calcul, il est possible de traiter chaque dilution indépendamment des autres ou de les grouper ensemble. Le but ici étant de valider que pour une suspension donnée, on obtient la même concentration en cellules cultivables sur boîte et en plaque, nous avons traité les résultats pour chaque dilution indépendamment.

5.4.2.3 Temps d'incubation

Les souches clonales avec lesquelles nous travaillons poussent vite : au bout de 48 heures sur boîte et 24h en gouttes, plus aucune colonie ou goutte positive n'apparaît. On garde donc ces temps d'incubation pour les souches pures.

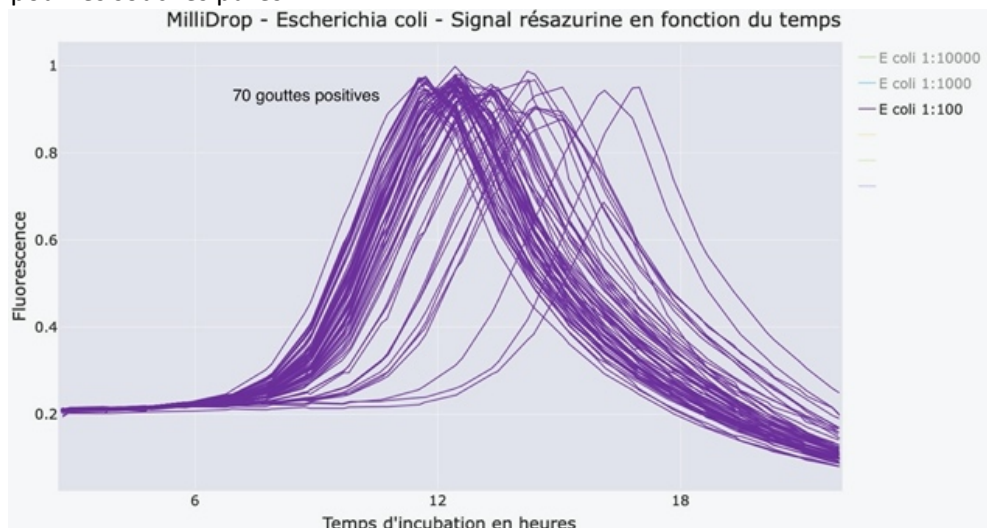


Figure 5-6 : Escherichia coli dilué 100 fois - fluorescence de la résazurine en fonction du temps – 70 gouttes par dilution. A cette dilution, toutes les gouttes ont poussé. Il est impossible de calculer une concentration initiale en cellules.

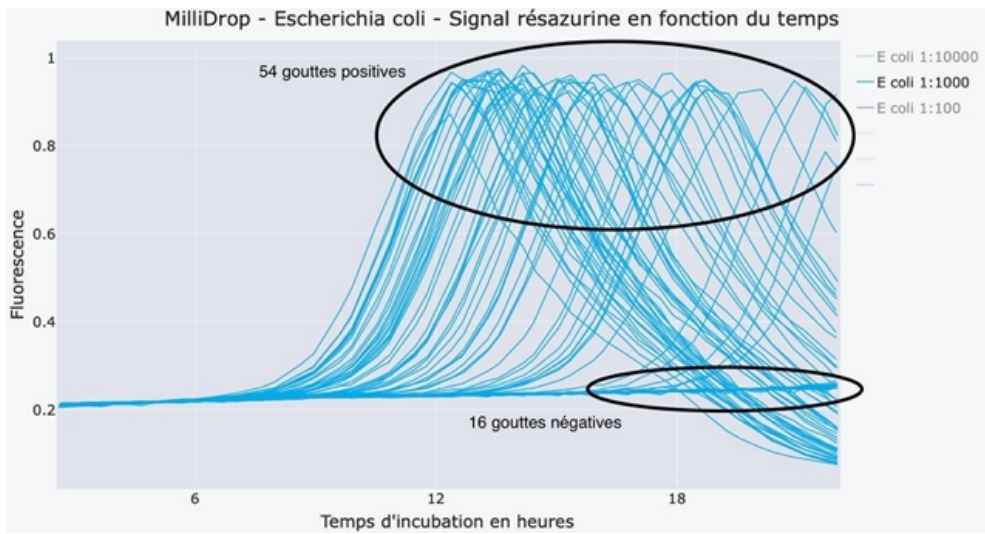


Figure 5-7 Escherichia coli dilué 1000 fois - fluorescence de la résazurine en fonction du temps – 70 gouttes par dilution. On constate une absence de croissance dans certaines gouttes, signe qu'elles étaient vides de microbes en début d'incubation. Le calcul de la concentration la plus probable pour ce seul niveau de dilution donne 2100 cellules par ml dans la suspension initiale après dilution, soit $2,1 \times 10^6$ cellules par ml avant dilution

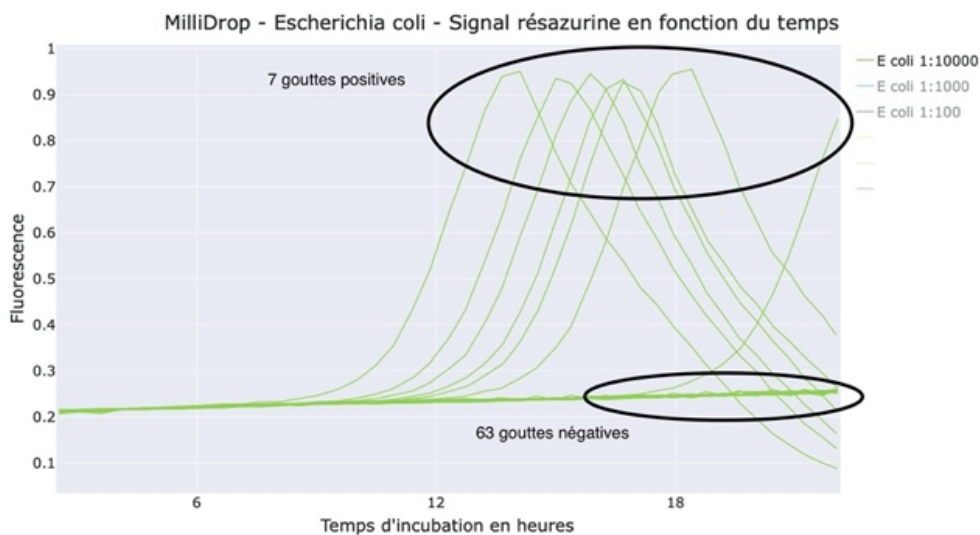


Figure 5-8 Escherichia coli dilué 10000 fois - fluorescence de la résazurine en fonction du temps – 70 gouttes par dilution – Le calcul de la concentration la plus probable pour ce seul niveau de dilution donne 150 cellules par ml dans la suspension initiale après dilution, soit $1,5 \times 10^6$ cellules par ml avant dilution

5.4.3 Résultats

Voir Figure 5-9. On ne présente ici que les dilutions pour lesquelles il y avait au moins une goutte vide et une goutte pleine et pour lesquelles des colonies nettes étaient visibles sur les boîtes. La ligne transversale représente une régression linéaire.

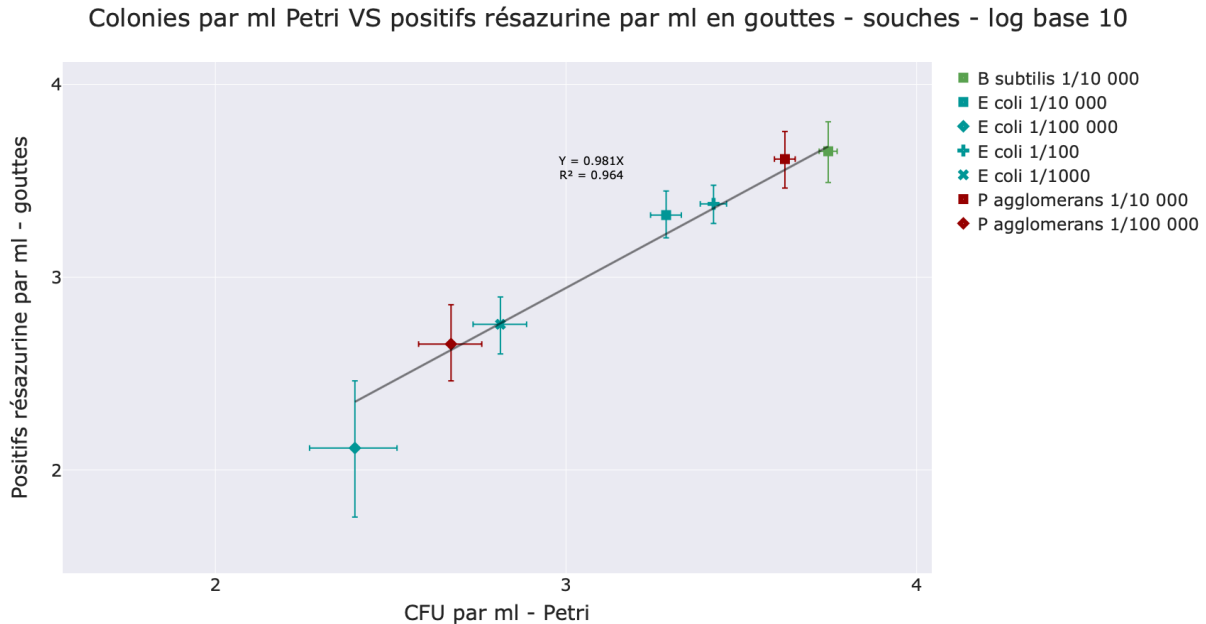


Figure 5-9 : logarithme en base 10 de la concentration la plus probable en microbes cultivables en gouttes en fonction du logarithme en base 10 de la concentration la plus probable de microbes sur boîte de Petri

Les barres d'erreurs verticales représentent l'intervalle de confiance à 95% calculé à partir du modèle de Jarvis, Wilrich et Wilrich¹⁸² – voir annexe pour plus de détails. Les barres horizontales sont calculées à partir de la formule donnée en annexe.

On trouve des concentrations quasi-identiques par la méthode en gouttes et la méthode sur boîte de Petri. Tous les points sont à une distance de la ligne $y=x$ inférieure à leur intervalle de confiance.

5.5 Transfert à des échantillons de microbes du sol

Avec des suspensions clonales, on trouve les mêmes nombres de cellules cultivables sur boîtes de Petri et en gouttes. Mais sera-ce le cas avec des échantillons de microbes du sol ?

Pour le savoir, nous avons mené une série de tests avec des sols de jardin publique prélevés en face de notre établissement et des sols agricoles, fournis par notre partenaire AgroNutrition. Voir annexe pour une description détaillée de ces sols et des méthodes de suspension des microorganismes.

5.5.1 Protocole

Après avoir suspendu les microorganismes du sol et retiré les particules minérales, on réalise une microplaque similaire à celles décrites précédemment pour des souches pures, en diluant d'un facteur 10^2 et 10^3 cette fois-ci (les extraits de sol étant des milieux moins riches en microbes que des bouillons de culture). Nous nous sommes basés sur les résultats obtenus par Dequiedt et al¹¹⁹ pour choisir ces dilutions. Dans une étude d'envergure sur la totalité du territoire français (2150 parcelles testées) et basée sur le dosage de l'ADN microbien du sol, cette équipe a trouvé que la biomasse microbienne du sol suivait une répartition « ni normale ni lognormale » mais quelque part entre les deux. On constate en observant les graphes de l'étude qu'environ 90% des sols comprenaient entre 2 et 20 μg d'ADN par

gramme de sol (voir Figure 5-10). En conséquent, nous nous attendions à trouver des valeurs de biomasse cultivable variant du simple au décuple. Après des expériences préliminaires, nous avons décidé de garder ces deux niveaux de dilution. Initialement nous travaillions avec 70 gouttes par dilution par sol, puis nous sommes passés à 110 gouttes.

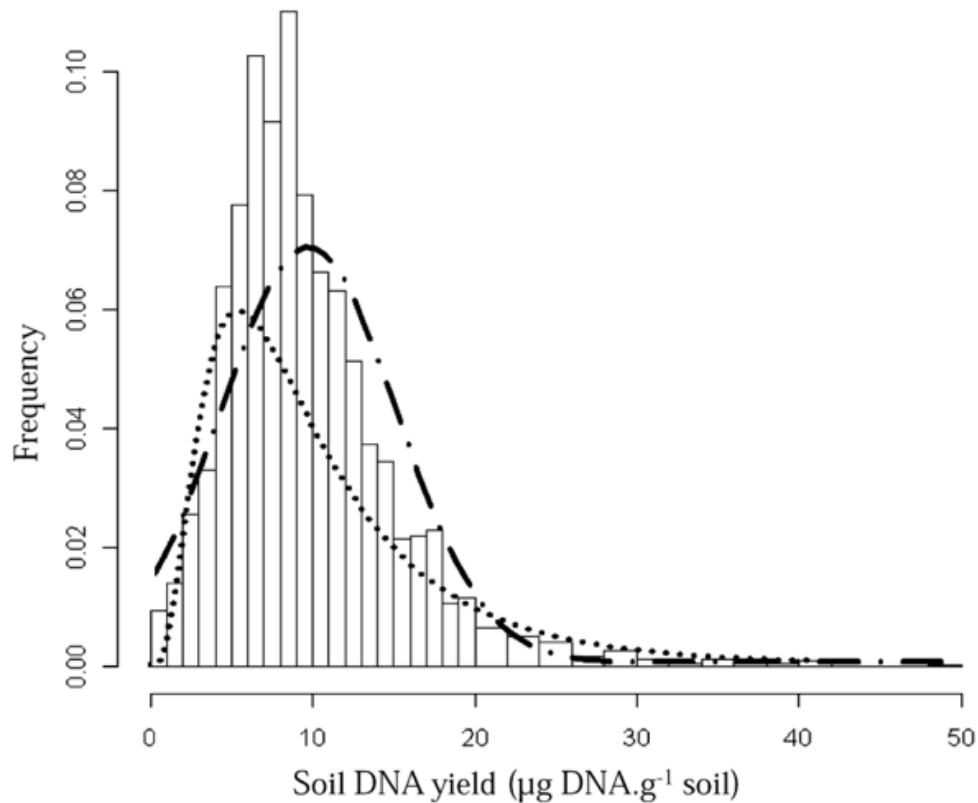


Figure 5-10 : Distribution des rendements d'ADN extrait pour des sols français. Les courbes représentent les simulations de répartition normale (courbe en pointillés) et lognormale (traits et pointillés).

En parallèle, les mêmes tubes qui ont servi à remplir la plaque sont étalés sur des boîtes de Petri, de façon identique au protocole pour les suspensions clonales.

5.5.1.1 Temps d'incubation

Nous avons constaté que sur boîtes de Petri, les colonies apparaissaient plus progressivement et globalement plus tard qu'avec nos souches pures. Voyant que cela pouvait poser un problème de reproductibilité, nous avons noté à différentes dates le nombre de colonies visibles sur chaque boîte. Après les avoir tracées en fonction du temps, nous avons constaté que le nombre de colonies ralentissait fortement autour de 12 jours (voir Figure 5-11 et Figure 5-12 pour un exemple avec quatre de nos sols ; tous les sols montrent des courbes comparables). Nous avons donc choisi de garder ce temps d'incubation,

CFU par boîte en fonction du temps

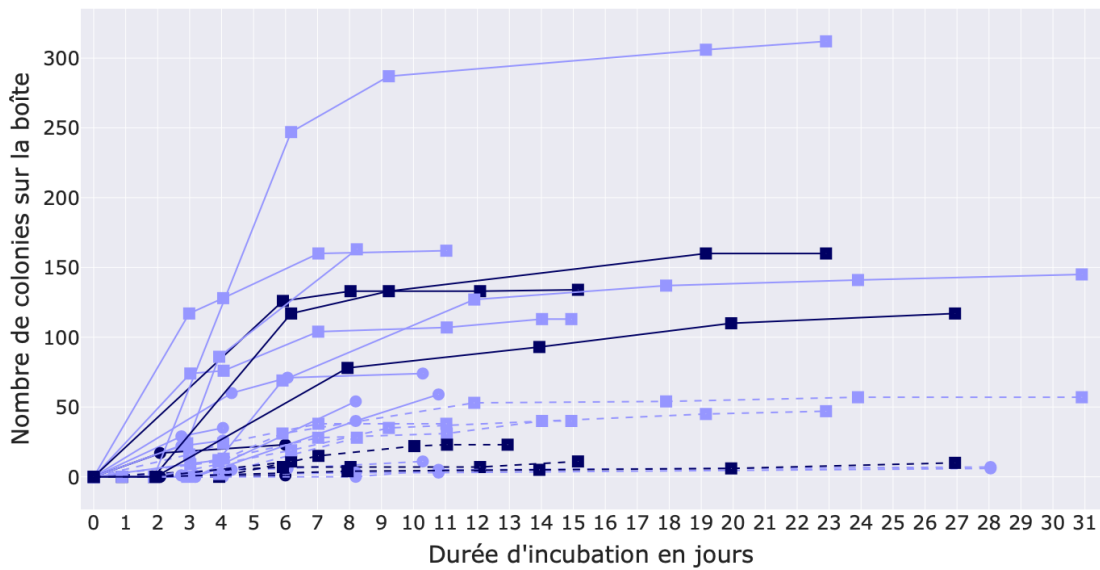


Figure 5-11 : Nombre de colonies par boîtes en fonction de la durée d'incubation, pour deux sol étudiés plusieurs fois. Chaque ligne représente une boîte. Deux niveaux de dilution (ligne pleine : 100^{ème} pointillés : 1000^{ème}). Lignes mauves : sol PS 251119. Lignes bleues marine : sol PS 151119

CFU par boîte en fonction du temps

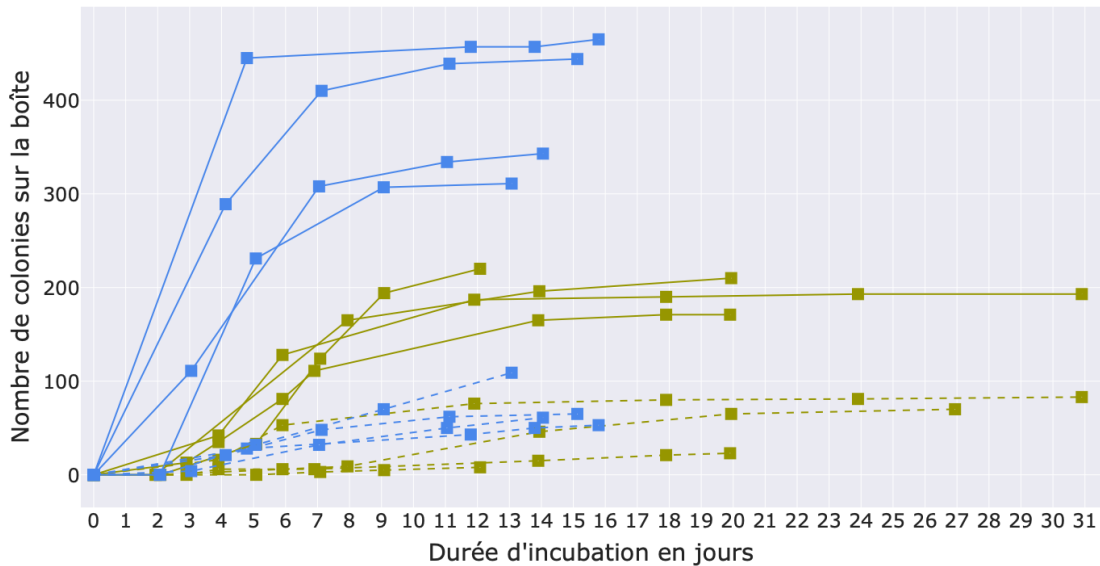


Figure 5-12 : Nombre de colonies par boîtes en fonction de la durée d'incubation, pour deux sol étudiés plusieurs fois. Chaque ligne représente une boîte. Deux niveaux de dilution (ligne pleine : 100^{ème} pointillés : 1000^{ème}). Lignes bleues : sol IA 300920. Lignes ocre : sol TS 020120

Pour ce qui est de la détection en gouttes, là aussi, l'apparition des positifs est plus progressive qu'avec des souches pures. On arrête l'analyse à 38h et on prend le nombre de gouttes positives à ce temps, car au-delà, trop de gouttes coalescent, ce qui gêne l'identification des gouttes.

5.5.2 Résultats

Voir Figure 5-13 et Figure 5-14 pour une illustration des courbes de croissance pour un sol dilué 100 et 1000 fois.

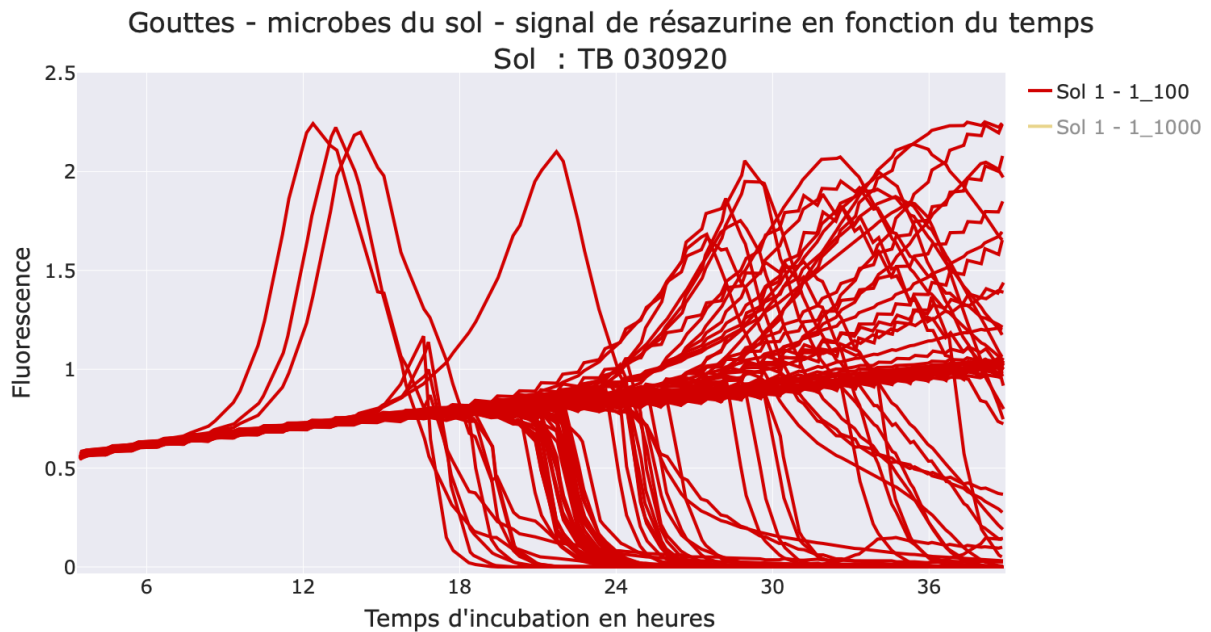


Figure 5-13 : suspension du sol TB 030920 diluée 100 fois - fluorescence de la résazurine en fonction du temps – 110 gouttes par dilution. A cette dilution, 89 gouttes sur 110 ont poussé. Notez la dérive du signal de base, probablement dû à la dégradation de la résazurine.

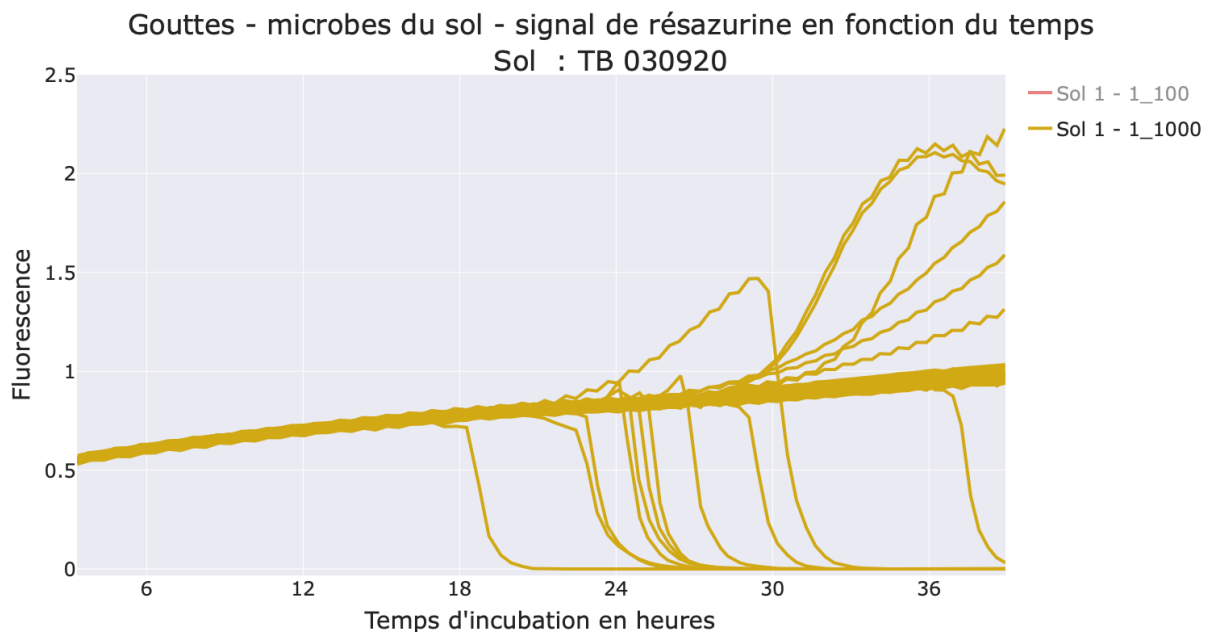


Figure 5-14 : suspension du sol TB 030920 diluée 1000 fois - fluorescence de la résazurine en fonction du temps – 110 gouttes par dilution. A cette dilution, 17 gouttes sur 110 ont poussé. Notez la dérive du signal de base, probablement dû à la dégradation de la résazurine.

Voir Figure 5-15 pour les résultats sur tous nos sols. On ne garde pour l'analyse que les dilutions pour lesquelles il y avait au moins une goutte vide et une goutte pleine et pour lesquelles des colonies nettes étaient visibles sur les boîtes.

Nous constatons d'abord que le modèle de la régression linéaire donne un **coefficient proche de 1**, signe qu'en tendance, **ni les boîtes de Petri ni les expériences en gouttes ne surestiment la concentration en cellules cultivables** l'une par rapport à l'autre.

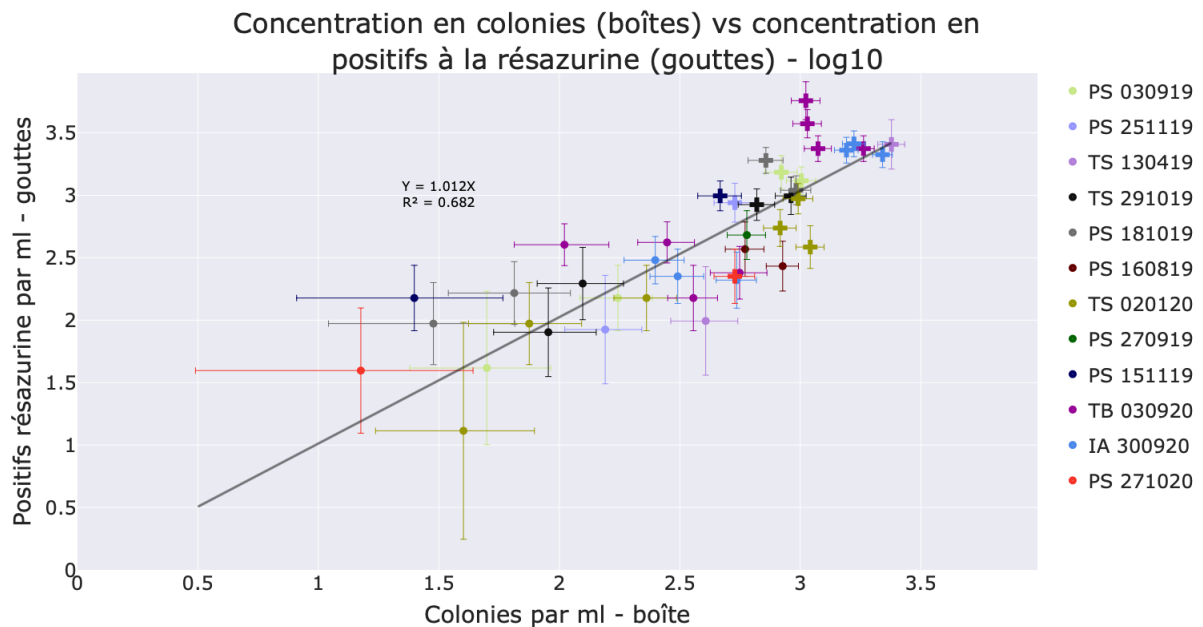


Figure 5-15 : Concentration la plus probable en microbes cultivables en gouttes en fonction de la concentration la plus probable de microbes sur boîte de Petri pour l'ensemble de nos sols agricoles. Les croix représentent les dilutions au 100^{ème} et les points les dilutions au 1000^{ème}

Nous constatons ensuite que comparé aux souches pures, le modèle de la régression linéaire n'explique qu'une partie de la variance ($R^2 = 0,68$). Cela reflète la **grande diversité** de microorganismes qui doit être contenue dans nos échantillons. Différents phénomènes peuvent entraîner une surestimation avec l'un ou l'autre des modes de mesure, par exemple :

- Ces extraits peuvent contenir des microorganismes **anaérobies**, qui ne feraient donc pas virer la résazurine mais pourraient former des colonies visibles sur boîte
- Le **niveau d'oxygénation** est certainement différent entre boîte de Petri et gouttelettes
- Nous avons pu constater que certaines **souches recouvrent** une partie des boîtes de Petri et empêchent le développement ou le comptage des colonies proches
- Certaines souches pourraient sécréter des **substances qui inhibent la croissance d'autres microbes** (on pense par exemple aux antibiotiques ou aux composés fongistatiques¹⁸³) ou au contraire des substances qui **favorisent la croissance d'autres microbes** (par exemple les sidérophores¹⁸⁴)
- Certains microorganismes du sol pourraient **traverser l'huile minérale** et passer de goutte en goutte, entraînant la contamination de gouttes initialement vides. Des expériences préliminaires nous ont montré que cela posait peu de problème avant 38 heures, mais que des contaminations précoces avaient parfois lieu.
- Certaines colonies sont quasiment **invisibles à l'œil nu** : trop petites, trop fines ou trop transparentes, alors que les mêmes souches en gouttes font certainement virer la résazurine

- Au demeurant, nous ajoutons un polymère probablement légèrement toxique (le polyacrylate de sodium) dans le milieu de culture liquide, qui est présenté dans le prochain chapitre.

Une partie au moins de ces phénomènes doivent concourir à expliquer la variabilité de ces résultats comparée aux souches pures.

Finalement, nous avons confirmé avec quelques souches pures et des sols agricoles qu'il était possible de cultiver des échantillons de microbiotes du sol dans notre machine et qu'on en cultivait autant qu'avec la méthode classique de la boîte de Petri. Ces résultats qui peuvent sembler évidents a posteriori ont été une **bonne surprise** pour nous, tant les microorganismes du sol sont variés (on rappelle les chiffres du premier chapitre : en moyenne 1288 espèces par gramme de sol en France⁵⁶) et tant les points évoqués ci-dessus auraient pu faire varier la tendance dans un sens ou dans l'autre.

5.5.3 Variabilité entre les sols

Maintenant que nous avons confirmé que le comptage en gouttes donnait des résultats proches du comptage sur boîte, voyons quels résultats nous obtenons pour nos différents échantillons de sols.

Pour cette partie, nous calculons la concentration la plus probable en microorganismes cultivables à partir de la formule donnée par Jarvis et al¹⁸², mais pour chaque expérience, les différents niveaux de dilution sont cette fois-ci regroupés ensemble et participent au calcul d'une seule concentration la plus probable (CPP) par expérience. On exclut les résultats avec un indice de rareté inférieur à 0,01 comme recommandé par Jarvis et al¹⁸². Voir Figure 5-16.

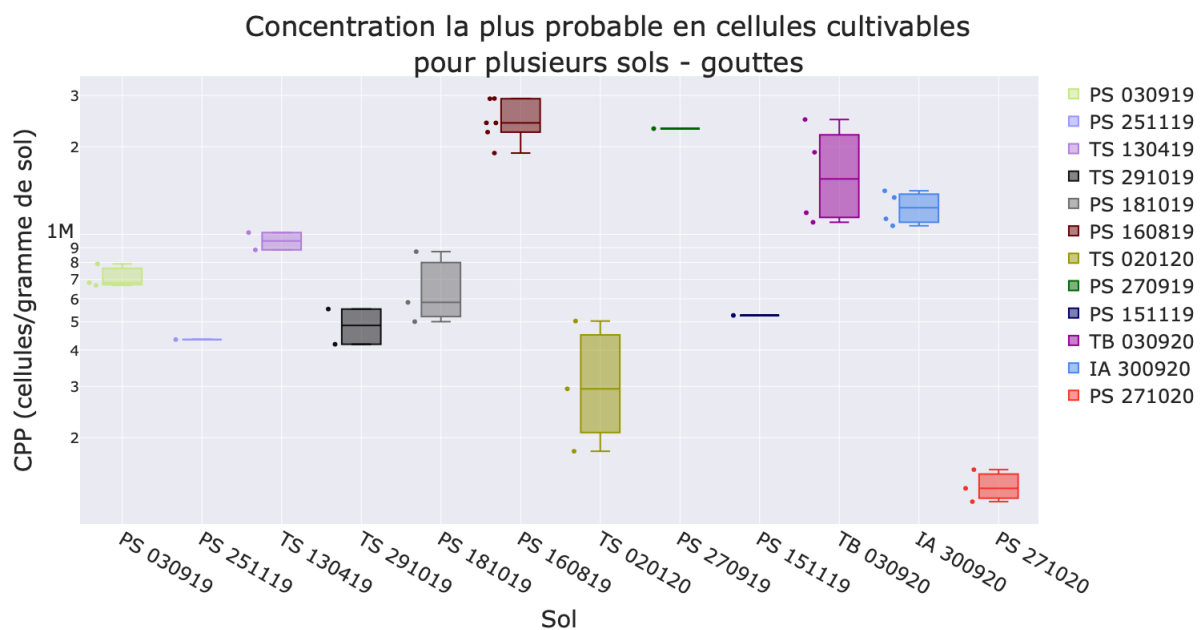


Figure 5-16 : Concentration la plus probable en cellules cultivables pour différents sols agricoles, estimée à partir de la culture en gouttes. Échelle logarithmique

Notez que pour tous les sols sauf trois, nous avons testé le sol plusieurs fois. Tous les tests sur un même sol sont menés au maximum dans un intervalle de 6 semaines. Tous les sols sont stockés dans des sachets plastiques clos, à environ 5°C à l'obscurité. Nous n'avons pas constaté d'effet de vieillissement pour un même sol testé plusieurs fois.

On constate que :

- Les sols ont des concentrations différentes les uns des autres. La distribution des nombres de cellules cultivables est de l'ordre de grandeur évoqué dans la littérature¹¹⁹ : le sol le plus riche (PS 160819) a une concentration de $2,4 \times 10^6$ cellules par gramme et le sol le plus pauvre (PS 271020) de $1,3 \times 10^5$ cellules par gramme.
- Pour un sol donné, les résultats varient peu : si l'on calcule les coefficients de variation (écart-type/moyenne), on trouve des valeurs inférieures à 50% pour tous nos sols. Voir Figure 5-17. Notre méthode donne donc des résultats répétables. Ils sont légèrement plus répétables que ceux sur boîtes de Petri (coefficient de variation moyen gouttes : 22%, coefficient de variation moyen colonies par ml Petri : 35%).

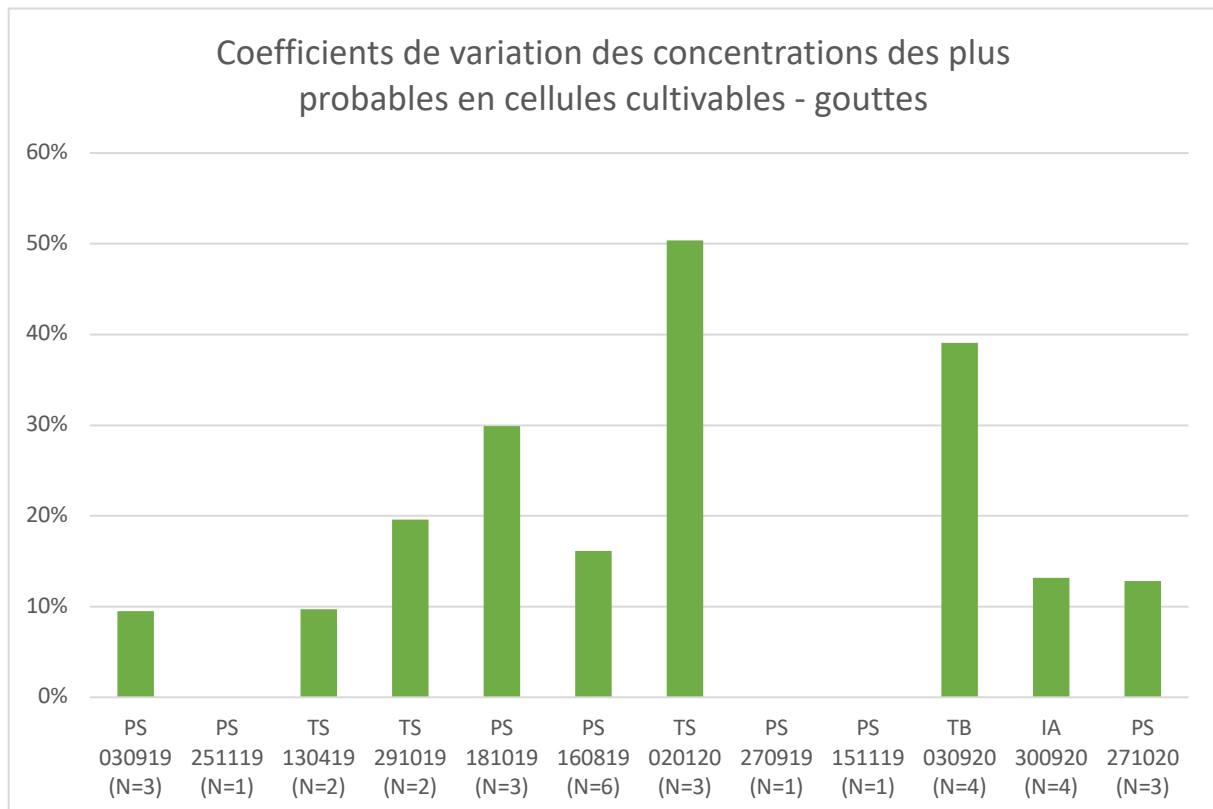


Figure 5-17 : Coefficients de variation des valeurs de concentrations les plus probables en cellules cultivables par gramme de sol, pour nos différents sols (écart-type/moyenne des mesures pour chaque sol). En gouttes. N représente le nombre de fois où le sol a été testé avec succès en gouttes

Les signaux de résazurine n'ont jusqu'ici été utilisés que pour compter si un microbe avait poussé ou non et obtenir une concentration. Cependant, comme présenté plus tôt, les signaux présentent une grande diversité et il nous a semblé que nous pouvions retirer de l'information supplémentaire des formes des courbes.

5.6 Analyse des paramètres de croissance

Au-delà du signal oui/non, il est possible d'obtenir différentes informations sur les microorganismes à partir de la forme des courbes de fluorescence de la résazurine en fonction du temps. Puisque dans la majorité des gouttes positives, le début du signal ressemble à une **exponentielle**, nous avons décidé de mener une régression par un modèle exponentiel sur chacune des courbes de nos échantillons et d'extraire un **temps de division** et un **temps de latence** pour chacune de nos gouttes positives. Cela correspond au demeurant au modèle mathématique classiquement utilisé pour décrire la croissance microbienne.

Il existe probablement des différences entre espèces microbiennes en termes de vitesse à laquelle une cellule réduit la résazurine. Cependant, dans le cadre d'une croissance exponentielle, on montre facilement que ces différences sont équivalentes à du temps de latence. Nous avons donc décidé de négliger ce phénomène.

Nous avons déployé la démarche suivante pour analyser nos données :

5.6.1 Protocole d'analyse des courbes

5.6.1.1 Obtention d'un signal de résazurine « net »

La première étape consiste à obtenir un signal de résazurine « net » : la résazurine subit généralement une légère détérioration au cours du temps, probablement causée par la réduction de la résazurine par le milieu. On choisit donc pour chaque expérience une goutte « de référence » dans laquelle aucun microorganisme n'a poussé, puis on soustrait aux autres gouttes le signal de la goutte de référence. Pour améliorer encore le signal, on soustrait à chaque goutte le signal moyen de ses quatre premiers runs (trajets dans le tube), ce qui fait commencer toutes les courbes presque à zéro.

Voir Figure 5-18 pour une illustration.

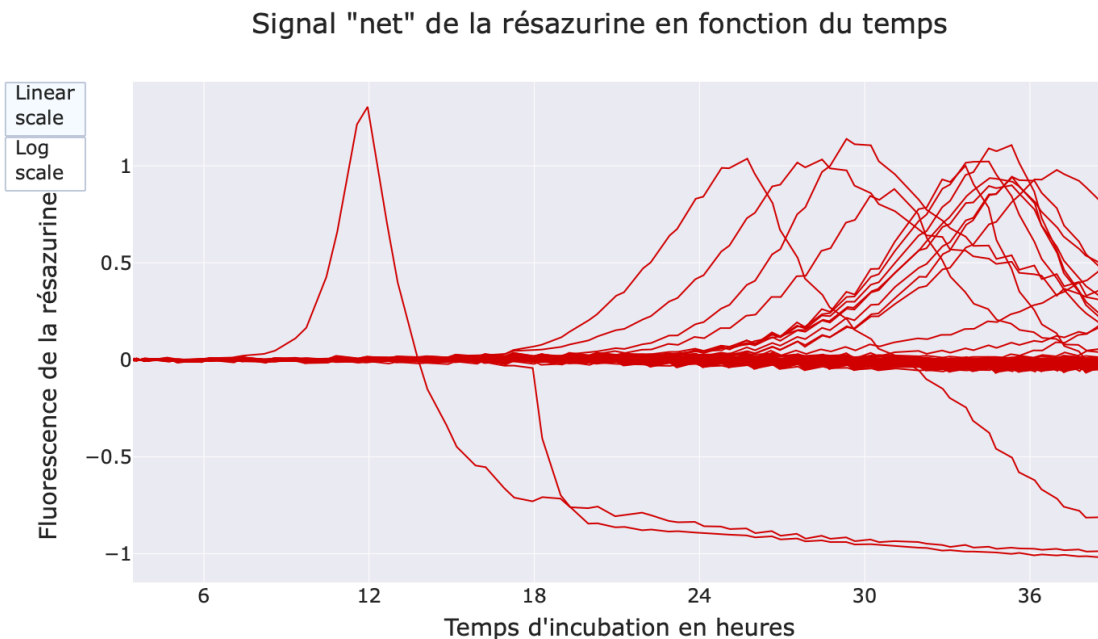


Figure 5-18 : Signal de la résazurine après soustraction du signal de la goutte de référence, puis du signal des quatre premiers runs de chaque goutte, pour un sol, dilué 1000 fois. Chaque ligne représente une goutte. Constatez qu'on n'observe plus de dérive du signal de base de la résazurine.

5.6.1.2 Sélection des points pour la régression

On fixe un seuil (« seuil de régression ») qui va nous servir à deux choses : à déterminer quelle goutte on garde pour l'analyse et à choisir quels points on utilise pour la régression.

On garde pour l'analyse les gouttes dont le signal a franchi notre seuil pendant plus de trois runs. Cela exclut donc les gouttes dans lesquelles rien n'a poussé, mais aussi certaines rares gouttes dans lesquelles le signal de résazurine baisse quasi-immédiatement après le début de la croissance des microorganismes (revoir Figure 5-3). Nous appellerons par la suite les gouttes que l'on garde pour l'analyse « gouttes positives ».

Une fois ces gouttes choisies, on cherche le run de pente maximal pour chaque goutte et on ne garde pour notre régression que les points :

- Dont le signal « net » de résazurine est au-dessus du seuil de régression
- Situés avant le run de pente maximale, ou après 15 runs

Le seuil de régression est choisi à la main et varie entre 0,02 et 0,08 unités arbitraires de fluorescence. Voir Figure 5-19.

On constate que sur ces points, les courbes ont presque toutes une allure exponentielle.

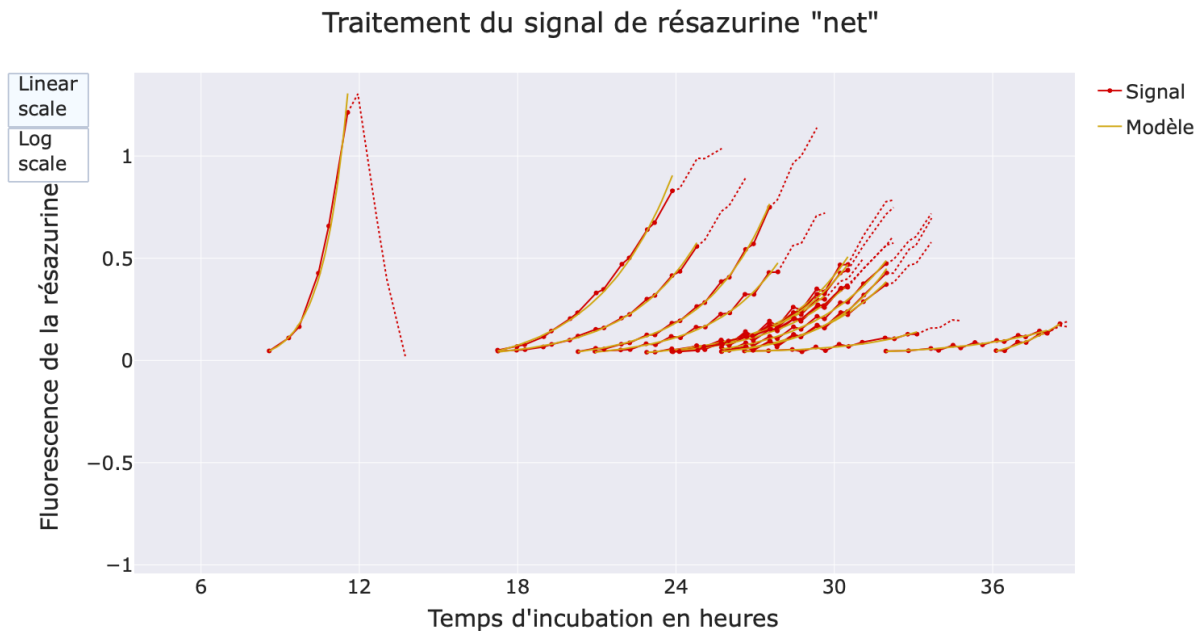


Figure 5-19 : Illustration du traitement mené sur les mêmes courbes que la figure précédente. Les courbes rouges pleines correspondent aux points que l'on garde pour l'analyse. Les traits jaunes correspondent aux résultats de la régression linéaire menée avec la méthode ci-dessous. Les pointillés ne sont pas pris en compte pour la régression.

5.6.1.3 Régression

Sur Python, on utilise le module `scipy.optimize.curve_fit` (https://docs.scipy.org/doc/scipy/reference/generated/scipy.optimize.curve_fit.html) qui fait appel à la méthode des moindres carrés pour mener une régression avec le modèle suivant :

$$Fluo = 2^{\frac{t-lag}{a}} + \varepsilon$$

Avec :

- *Fluo* le signal « net » de la résazurine
- *t* le temps en heure
- *lag* une variable liée au temps de latence
- *a* une variable qui représente le temps de division
- ε une variable qui permet de compenser la variabilité du signal de base entre gouttes

La régression menée avec python détermine les variables *lag*, *a* et ε qui approchent le mieux les points mesurés, en se basant sur la méthode des moindres carrés.

On calcule ensuite un temps au seuil, qui est égal à la valeur théorique de *t* lorsque *Fluo* = seuil de régression.

Les scripts utilisés sont disponibles sur ce lien : <https://gitlab.com/Atakalaka/droplet-analyser>

5.6.2 Présentation des résultats

Pour chaque courbe qu'on a réussi à approximer avec notre modèle, on enregistre le temps au seuil et la variable a (le temps de division). On peut alors représenter chaque goutte sur un graphique.

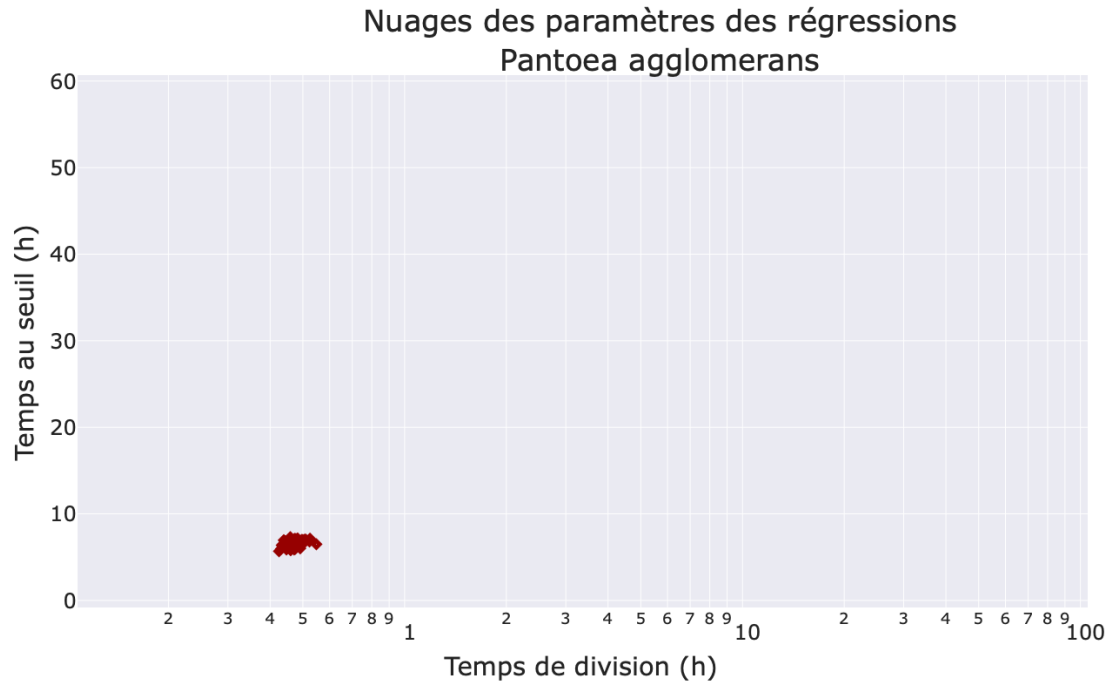


Figure 5-20 : Temps au seuil en fonction du temps de division pour chaque goutte positive d'une culture de *P agglomerans*. Résultat d'une expérience représentés (110 gouttes). Environ 50 bactéries par gouttes en début d'incubation.

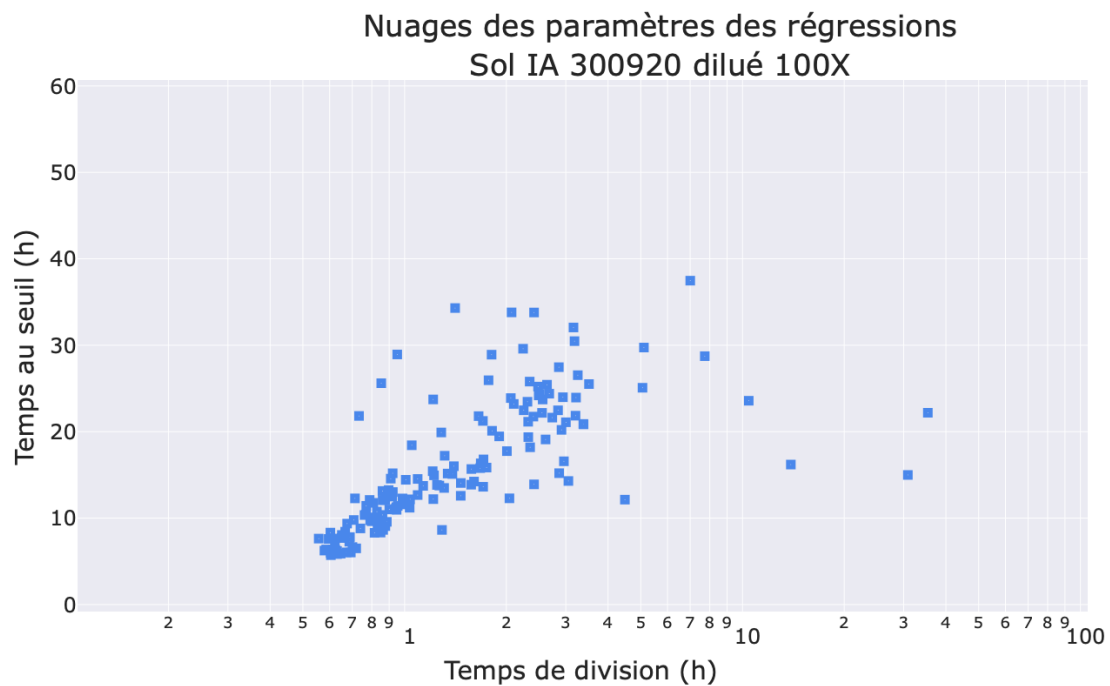


Figure 5-21 : Temps au seuil en fonction du temps de division pour chaque goutte positive du sol IA 300920. Résultats de deux expériences représentés. Environ 5 microorganismes par goutte en début d'incubation.

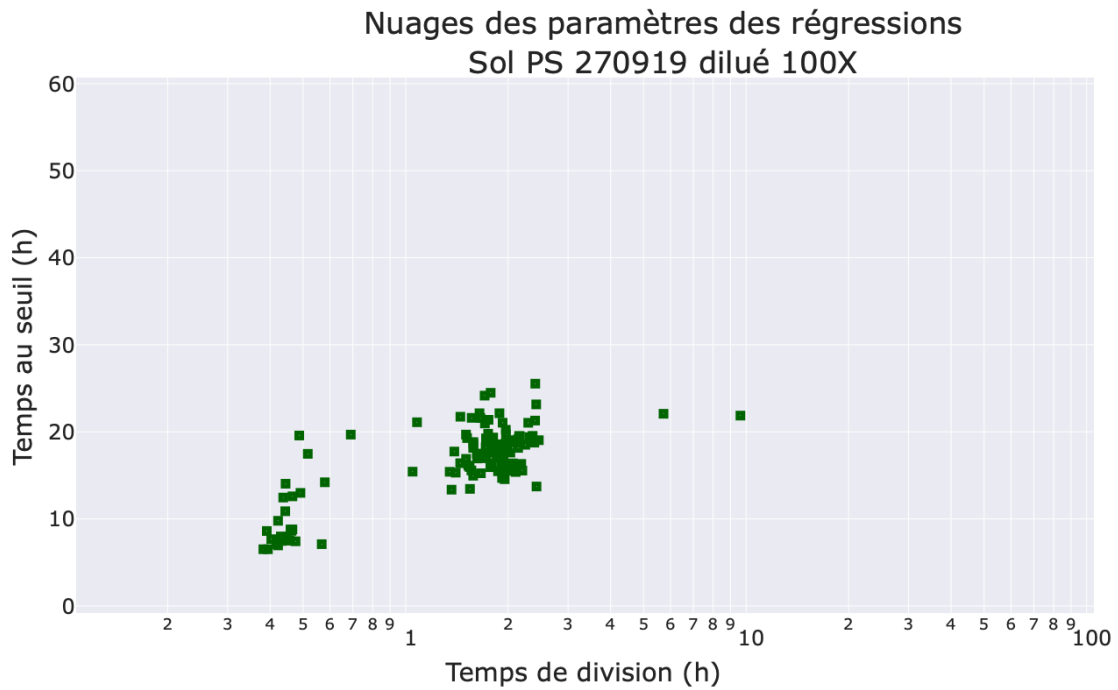


Figure 5-22 : Temps au seuil en fonction du temps de division pour chaque goutte positive du sol PS 270919. Résultats de deux expériences représentés. Environ 5 microorganismes par goutte en début d'incubation.

On constate sur les figures ci-dessus que :

- Les cultures pures donnent des points beaucoup plus groupés que des extraits composés d'un mélange d'espèces du sol
- Les sols ont des signatures différentes les unes des autres

A partir de ces résultats, nous avons cherché à grouper les sols entre eux, à calculer un degré de similarité entre sols ; en se basant sur la distance entre les points de chaque sol.

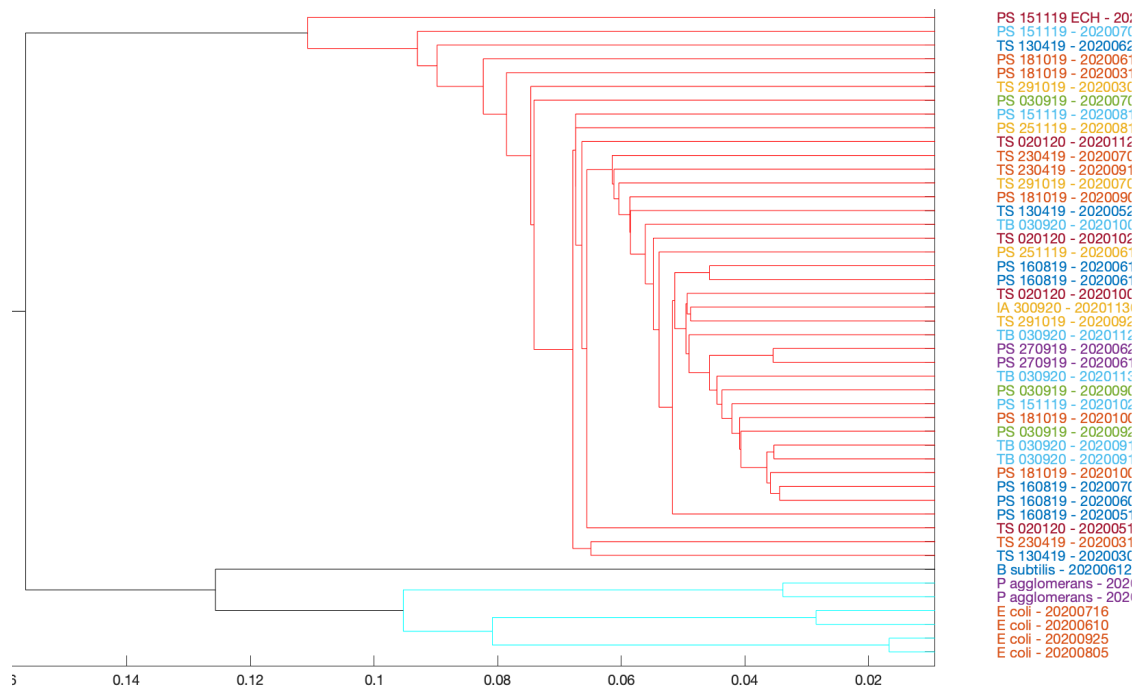


Figure 5-23 : Arbre de classification des sols obtenu en se basant sur les paramètres de croissance des gouttes. Plus les sols sont proches sur le graphe, plus leurs gouttes avaient des paramètres de croissance (temps au seuil et temps de division) proches.

Ces résultats sont plus exploratoires et moins aboutis que le reste de nos travaux, mais ils ouvrent la voie à une méthode de classification des microbiotes des sols qui se baserait sur des paramètres purement phénotypiques et non génotypiques comme aujourd'hui.

5.7 Conclusion sur l'évaluation de la biomasse en gouttes

Finalement, nous avons réussi à mettre en place un test pour évaluer le nombre de microorganismes cultivables par gramme de sol, simple et répétable. Nous avons eu la bonne surprise de constater qu'**en tendance**, on comptait le **même nombre de cellules cultivables en gouttes et sur boîtes de Petri**, aussi bien avec des souches pures qu'avec des échantillons de sols. De nombreux phénomènes biologiques ou chimiques auraient pourtant pu nous faire surestimer la biomasse cultivable par un mode par rapport à l'autre. Nos résultats sur des échantillons sauvages multi-espèces sont plus variables que ceux obtenus avec des souches pures, ce qui vient rappeler la complexité des microbiotes des sols.

On notera cependant que notre protocole présente deux limites importantes, que l'on retrouve aussi bien en gouttes que sur boîtes de Petri :

- **Il surestime les bactéries par rapport aux champignons.** En effet, de nombreux champignons sont connus pour être mycorhiziens, on peut penser que de tels organismes ne se développeront pas en l'absence d'un symbiote végétal. En outre, les champignons représentent dans les sols une biomasse importante mais peu de cellules cultivables. Ce dernier point pourrait être contourné en menant des incubations spécialement pour les champignons en parallèle de nos expériences principales : on incuberait nos extraits à des concentrations plus élevées et on y intégrerait un antibiotique afin de ne laisser que les champignons se développer.
- Il ne permet d'accéder qu'aux organismes cultivables. En effet, comme expliqué plus haut, une partie des microorganismes du sol sont considérés comme incultivables. Cependant, les études que nous avons pu lire semblent indiquer qu'en termes de biomasse, le nombre de cellules cultivables sur milieu riche corrèle bien avec le nombre de cellules total visibles au microscope. Par ailleurs, on peut penser que la biomasse cultivable est la plus active dans le sol.

Notre protocole d'estimation de la biomasse représente malgré cela un premier succès pour notre projet. Il est aussi simple et environ sept fois plus rapide que le comptage sur boîtes de Petri (38 heures d'incubation contre 12 jours sur boîtes), et beaucoup plus simple que d'autres méthodes d'estimations sans culture.

Forts de ce succès, nous avons voulu aller plus loin et tenter de mesurer une caractéristique phénotypique d'intérêt agronomique sur nos microorganismes : la capacité à solubiliser le phosphate à partir de particules minérales.

6 Transfert en gouttes des tests de solubilisation du phosphate

Notre objectif central est de mettre au point un protocole pour évaluer la qualité des microbiotes des sols agricoles.

Nous cherchions à mettre au point un test dans la machine millifluidique pour évaluer la capacité des microbes d'un sol donné à solubiliser le phosphate. Nous avons donc cherché quels étaient les modes d'évaluation actuellement utilisés et dans quelle mesure ils pouvaient être transférés en milieu liquide, puis dans notre machine.

Nous avons cherché à adapter un test mené sur boîte de Petri pour qu'il puisse être réalisé dans notre machine millifluidique. Le but du test est de :

- Dénombrer les microbes capables de solubiliser des particules de phosphate de calcium. Habituellement, cela est fait en comptant les colonies autour desquelles se sont développés des halos sur boîte de Petri.
- Avoir si possible un indicateur de l'intensité de la solubilisation pour chaque solubilisateur. Certains auteurs mesurent la taille des halos, et la rapporte à la taille des colonies, pour avoir une mesure quantitative de la dissolution³⁹.
- Si possible, quand il y a dissolution des particules, déterminer la part de la dissolution due à de la chélation et la part due à de l'acidification.

6.1 Le test classique sur boîtes de Petri

Comme présenté dans le chapitre sur le phosphore en agriculture, la méthode la plus répandue pour déterminer si un microorganisme est capable de solubiliser le phosphate est de cultiver celui-ci sur un milieu de culture gélosé contenant suffisamment de particules de phosphate de calcium pour qu'il ait un aspect laiteux. Si après quelques jours de culture une zone translucide se forme autour de la colonie, on considère que le microbe est capable de solubiliser le phosphate.

Pour les microorganismes du sol, on utilise généralement le milieu Pikovskaya¹²⁸ (voir le chapitre 2 sur le phosphate pour une présentation plus exhaustive, voir annexes pour la recette exacte); un milieu contenant des sels minéraux, du glucose et de l'extrait de levure. Nous avons choisi ce milieu car nous estimions que les sels variés et l'extrait de levure faisaient de ce milieu un **milieu riche**, ce qui permettrait a priori de donner une chance de se développer à la plus grande diversité de microorganismes possible.

Les particules de phosphate de calcium du milieu Pikovskaya sont de l'**hydroxyapatite**, un minéral composé de cinq atomes de calcium pour trois atomes de phosphore, de formule $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Certains auteurs utilisent du tricalcium phosphate (TCP) à la place, qui a une stœchiométrie légèrement différente (3 calcium pour 2 phosphore – mais il semble que ce qui est vendu comme du TCP soit en réalité souvent de l'hydroxyapatite). Nous avons choisi d'utiliser de l'hydroxyapatite car on trouve beaucoup plus de références de ce minéral que de TCP dans le commerce.

L'hydroxyapatite est un composé peu soluble : d'après une simulation sur le logiciel de chimie MINTEQA¹⁸⁵, à pH 7, à l'équilibre avec la concentration d'hydroxyapatite contenue dans le milieu Pikovskaya (soit 5g/l), seul **0,15% du phosphate** toutes formes confondues (H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} et PO_4^{3-}) **est en solution**, soit $4,5 \times 10^{-5}$ mol/l. D'après Damoglou et Dawles¹⁸⁶, la concentration limite nécessaire chez *E coli* est de $1,8 \times 10^{-4}$ mol/l. En deçà de cette concentration, la croissance de Coli est limitée par le phosphate dans leurs conditions expérimentales. Il est donc probable que ce milieu stresse au moins certains microorganismes du sol en matière de disponibilité du phosphate.

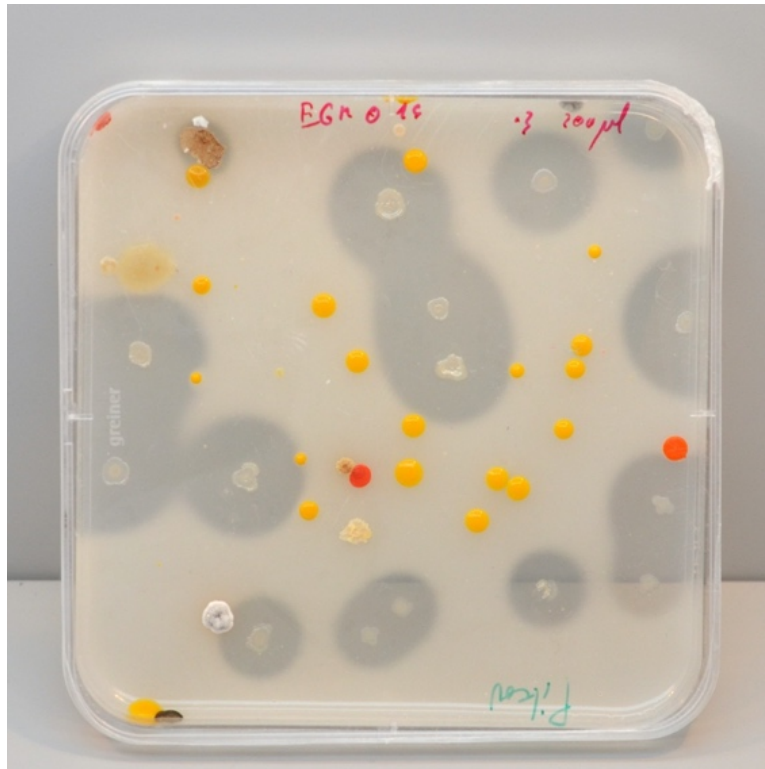


Figure 6-1 : Une suspension de sol cultivée sur du milieu Pikovskaya, après 5 jours d'incubation. Notez les halos transparents autour de certaines colonies. Travail personnel. La boîte mesure 14cm.

Ce test présente plusieurs inconvénients sur lesquels nous reviendront plus bas, mais on retiendra déjà qu'il est **laborieux** et **très dépendant du manipulateur** : certains voient des halos là ou d'autres n'en voient pas. Afin de gagner en productivité et en reproductibilité, nous avons voulu le transférer en gouttes.

6.2 Adaptation du test en milieu liquide

Afin de transférer ce test en goutte, il suffisait a priori de « retirer » l'agar du milieu Pikovskaya pour en faire un milieu liquide. C'est ce que nous avons essayé. Il s'est alors posé un problème :

Dans une boîte de Petri, l'agar rend le **milieu visqueux**, même à haute température. Par ailleurs, la boîte ne fait que **quelques millimètres de profondeur**. En conséquent, les particules de phosphate n'ont pas le temps de sédimenter complètement et même si cela arrivait, les particules resteraient suffisamment proches de la surface pour que des microbes déposés sur la boîte puissent interagir avec (voir Figure 6-1 : le rayon des auréoles formées par les colonies blanches est d'environ un centimètre et demi, soit trois ou quatre fois l'épaisseur de la couche d'agar).

En l'absence d'agar pour rendre le milieu visqueux, les particules de phosphate de calcium s'agrègent pour donner des floccs et sédimement au bout de quelques minutes, ce qui pose un double problème :

- La génération d'un train de gouttes dans notre machine dure environ une heure et le liquide est prélevé par le haut. La concentration en particules serait donc plus élevée dans les premières gouttes que dans les dernières. Il serait difficile de contrôler cette concentration.
- Les gouttes ainsi générées seraient très hétérogènes, avec un flocc à un endroit et aucune particule ailleurs, ce qui gênerait la mesure de la quantité de particules par lumière diffusée.

Nous avons donc dû reconcevoir le milieu Pikovskaya classique.

Pour des particules d'un matériau donné, deux phénomènes peuvent expliquer la sédimentation des particules :

- Soit elles sont trop grosses. D'après la loi d'écoulement de Stokes, toutes choses égales par ailleurs, la vitesse de chute des particules varie avec le carré de leur rayon. En conséquent, plus les particules sont petites, moins vite elles sédimentent, jusqu'à une valeur à partir de laquelle l'agitation brownienne compense la sédimentation.
- Soit elles sont suffisamment petites, mais **s'agrègent** les unes avec les autres. Cela forme alors des floccs qui vont à leur tour sédimer. Différents paramètres entrent en jeu dans ce phénomène, notamment la **force ionique du milieu** et la **charge de surface** des particules. Pour maintenir les particules suspendues, une méthode courante consiste à ajouter un **dispersant**, (aussi appelé **antifloculant** ou **agent de surface**) à la suspension.

Afin de déterminer s'il était possible de suspendre des particules d'hydroxyapatite, ou de ralentir suffisamment leur sédimentation pour pouvoir en faire des gouttes, nous avons mis au point un protocole de test en deux phases :

1. On cherche (dans le commerce) des particules suffisamment petites pour ne pas sédimer en ajoutant un agent de surface dont on est sûr de l'efficacité (mais qui dans notre cas, n'était pas bio-compatible).
2. On cherche ensuite un agent de surface **bio-compatible** suffisamment dispersant pour remplacer l'agent de la phase précédente.

6.2.1 Phase I : recherche d'une taille de particules suffisamment faible

Nous avons d'abord cherché une taille de particules suffisamment petite. Pour déterminer si une formulation est satisfaisante, on applique le protocole suivant :

Protocole :

Dans un flacon en verre transparent, on verse 20 ml de solution de NaCl à 8g/l (137mM) et 100 mg d'hydroxyapatite (soit 5g/l, la concentration du milieu Pikovskaya classique¹²⁸). On ajoute une goutte de **liquide vaisselle** (environ 400mg), qui est connu comme un excellent dispersant. On **sonique** avec une sonde plongeante, pendant 20 secondes à **forte intensité** : 20kHz pour une puissance de 750 watts et une énergie totale appliquée de 550 joules (cette étape est indispensable pour suspendre correctement les particules). On laisse ensuite le flacon reposer pendant une heure.

Si **au bout d'une heure**, le flacon a un aspect laiteux, on considère que les particules sont suffisamment suspendues, donc suffisamment petites. Voir Figure 6-3 pour une illustration.

Après quelques essais, nous avons retenu l'hydroxyapatite (Numéro CAS : 12167-74-7, Aldrich), qui est décrite comme une suspension de particules de moins de 200nm. Nous avons tout de même analysé la taille des particules dans un dispositif Zetasizer Ultra du fabricant Malvern Panalytical (diffusion dynamique de la lumière). Les résultats indiquent qu'à pH 6,6, on observe une répartition bi-disperse des diamètres, avec un pic centré sur 92nm (la quasi-totalité des particules) et un pic centré sur 4,7µm (environ une particule sur 200 000). Ces résultats correspondent à ce que nous observons au microscope : quelques gros cristaux sont visibles et on perçoit une grande quantité de particules quasiment invisibles.

Si l'on modélise la sédimentation de telles particules avec la loi de Stokes dans de l'eau pure, on trouve qu'en une heure (le temps de génération d'un train de 1000 gouttes), elles auront parcouru 44 µm,

sauf les plus grosses, qui chutent d'1,2 cm sur cette même durée. On peut donc conclure que si le milieu a encore un aspect laiteux au bout d'une heure, c'est parce que les particules d'hydroxyapatite chutent suffisamment lentement, d'autant plus que certaines molécules peuvent rendre le milieu plus visqueux que l'eau pure.

6.2.2 Phase II : recherche d'un dispersant biocompatible

Malheureusement, le liquide vaisselle n'est pas biocompatible. Nous avons donc cherché à le remplacer par un dispersant avec cette propriété. Différents dispersants sont décrits dans la littérature. Nous avons choisi d'essayer le citrate¹⁸⁷ et le polyacrylate de sodium¹⁸⁸. D'après Bernard Cabane, chercheur émérite de notre laboratoire, une formule empirique utilisée dans l'industrie est qu'il faut 2 mg de dispersant par m² de particules.

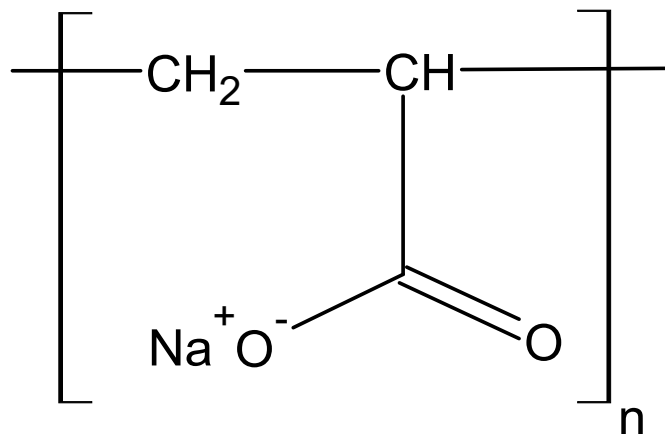


Figure 6-2 : un résidu de polyacrylate de sodium.

Source : Muso - Wikipedia Commons - CC BY-SA 3.0

En nous basant sur cette approximation, nous avons essayé plusieurs références de dispersants à différentes concentrations. A chaque étape les flacons sont soniqués et laissés à décanter pendant une heure. On observe l'état de la suspension après cela. Nous avons trouvé qu'à pH 7, le **polyacrylate** de sodium Sigma 416037 permettait de maintenir les particules correctement dispersées, à condition d'en introduire environ **0,35 gramme par gramme d'hydroxyapatite**. Cet acide est un polymère de formule $[-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COONa})-]_n$ dont chaque résidu comporte un groupe carboxylate. Il est fourni en solution et décrit comme ayant une masse molaire moyenne d'environ $1,5^E4$ daltons, soit environ $1,6^E2$ résidus par chaîne. Voir Figure 6-2 et Figure 6-3.



Figure 6-3 : Hydroxyapatite sans (gauche) et avec (droite) polyacrylate de sodium longue chaîne, une heure après sonication. Les flacons contiennent 20ml de liquide.

6.2.3 Phase III : Stérilisation de notre milieu

Pour vérifier qu'il n'y a pas d'interaction avec les milieux de culture (par exemple qui annulerait l'effet du dispersant), nous avons introduit ces ingrédients dans du milieu Pikovskaya liquide plutôt que dans notre suspension de NaCl. Après sonication, les particules étaient toujours visibles et stables plus d'une heure en flacon.

L'hydroxyapatite fine est fournie en suspension dans de l'eau et des microorganismes sont souvent présents dans cette eau, ce qui pose un problème de stérilité. Or, il est impossible de stériliser le Pikovskaya en le filtrant à 200nm contrairement aux milieux sans particules (les particules se bloquent dans le filtre). Nous avons donc dû l'autoclaver.

La cuisson peut altérer les composants présents, ce qui aurait pu par exemple dégrader notre dispersant, mais cela n'a pas posé de problème : l'hydroxyapatite reste correctement suspendue après un passage de trois minutes à 121°C à l'autoclave (une légère agrégation peut avoir lieu, mais une agitation vigoureuse de la bouteille règle le problème). Au demeurant, nous avons vérifié que ces paramètres d'autoclavage étaient suffisants pour stériliser notre milieu. Un cycle de congélation/décongélation n'altère pas non plus la qualité de notre dispersion. Voir Figure 6-4.

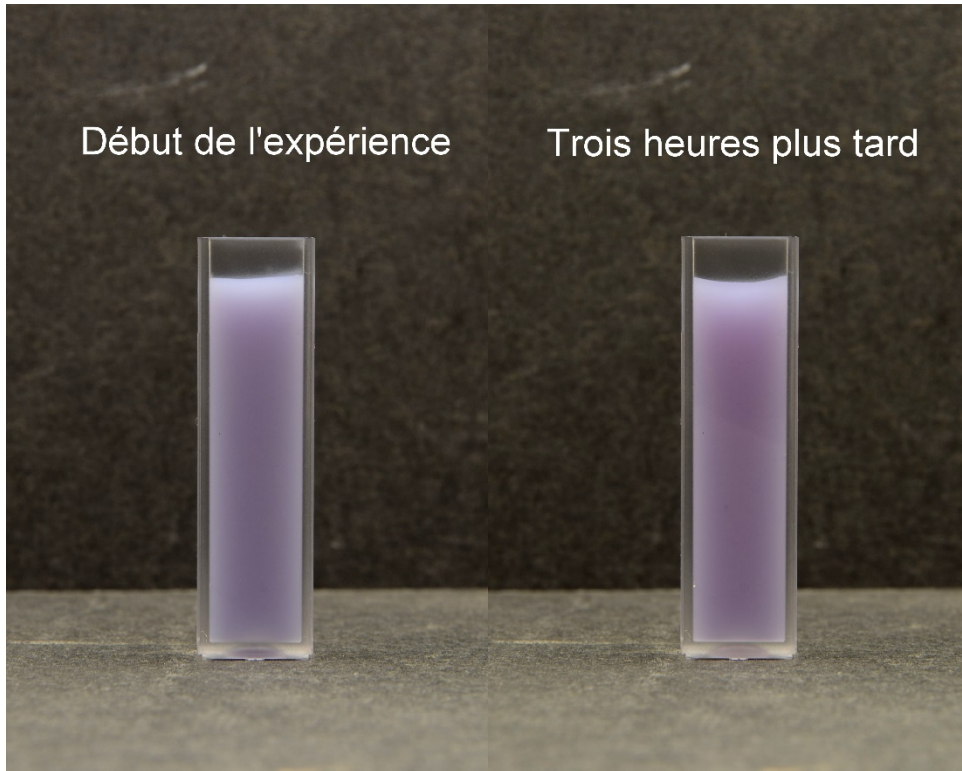


Figure 6-4 : Une cuve transparente de milieu liquide Pikovskaya après cuisson, congélation et décongélation laissée à décanter 3 heures à température ambiante. Le milieu contient 5g/l de particules et 1,75g/l de polyacrylate. La cuve mesure 2,5 cm de hauteur.

Afin de valider à l'échelle de gouttes millifluidiques la stabilité que nous constatons à l'échelle macroscopique, nous avons réalisé un train de gouttes avec notre milieu (Figure 6-5).

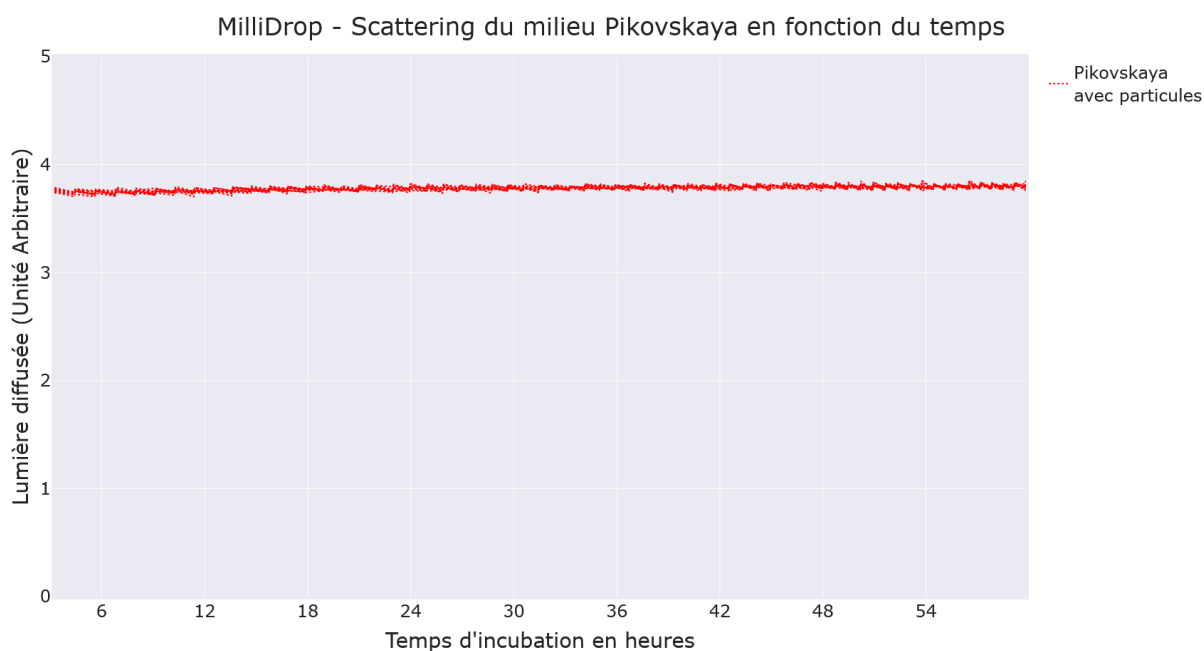


Figure 6-5 : Lumière diffusée par des gouttes de milieu Pikovskaya en fonction du temps (5 grammes par litre d'hydroxyapatite) – 10 gouttes sont affichées (leurs signaux se superposent)

On constate que le signal de lumière diffusée des gouttes est stable sur plus de 60 heures.

Éléments d'explication physico-chimique

Il est généralement difficile de prévoir a priori si une formulation va permettre d'obtenir une suspension suffisamment stable. Afin de comprendre ce qui expliquait la sédimentation ou non de nos particules, nous avons mesuré leur potentiel zêta. Cette grandeur donne une indication sur les charges de surfaces des particules. Plus elle est proche de zéro, moins les particules se repoussent et plus elles risquent de flocculer.

Nous avons mesuré le potentiel zêta de notre milieu après l'avoir stérilisé. Cette mesure est faite dans le même appareil que pour la granulométrie : un Zetasizer Ultra du fabricant Malvern Panalytical (diffusion dynamique de la lumière). On trouve un potentiel zêta centré sur -54mV. Selon Bernard Cabane, chercheur émérite au sein de notre laboratoire, un potentiel de +/- 40mV est suffisant pour empêcher l'agrégation dans nos gammes de forces ioniques (sans compter le polyacrylate, le milieu a une force ionique de 31mM). Il est donc probable que la répulsion électromagnétique suffit à expliquer la stabilité de la suspension. Un effet stérique n'est cependant pas à exclure, vue la taille des chaînes et vus des résultats préliminaires (non présentés) qui suggéraient qu'à concentration massique égale, le polyacrylate avec des chaînes plus courtes stabilisait moins bien les particules.

On notera cependant que l'utilisation du polyacrylate, ou de n'importe quel antifloculant comportant des groupes carboxyles soulève un problème : ces substances stabilisent les particules par chélation des ions calcium, ce qui limite la présence de charges positives dans la double couche des particules. Or, ce faisant, il est probable que l'on solubilise une fraction de l'hydroxyapatite, donc des orthophosphates. Ces dispersants « facilitent » donc la tâche des microorganismes, ce qui peut introduire une surestimation du nombre de microbes solubilisateurs. A l'inverse, on sait que certains mécanismes d'acquisition du phosphate sont commandés par le manque de phosphate dissout¹⁸⁹ ; il est donc possible que notre milieu réprime l'expression du caractère solubilisateur de certaines espèces microbiennes, par rapport au milieu Pikovskaya classique.

Il nous a cependant semblé qu'il s'agissait d'un risque acceptable, qu'il faudra garder en tête lors de l'interprétation de nos résultats.

6.2.4 Toxicité du polyacrylate

Pour tester la toxicité du polyacrylate de sodium, nous avons incubé un sol dans différentes conditions : sans particule et sans polyacrylate, puis dans notre milieu avec 5g/l de particules et 1,75g/l de polyacrylate de sodium. On ne trouve pas de différence significative en termes de gouttes positives à la résazurine entre les deux conditions, même s'il semble que le polyacrylate retarde la croissance des microorganismes, ce qui peut être le signe d'une légère toxicité.

6.2.5 Conclusion

Finalement, après avoir essayé différentes références d'hydroxyapatite et différents dispersants à des concentrations variées, nous avons réussi à formuler un milieu Pikovskaya biocompatible dont les particules restent suspendues suffisamment longtemps pour mener une incubation en gouttes. Par simplicité, nous décrivons désormais le milieu liquide ainsi obtenu comme « Pikovskaya liquide ».

Il nous restait maintenant à savoir si la dissolution des particules aurait lieu en gouttes et si nous pourrions la détecter. Intéressons-nous d'abord à la chimie derrière la dissolution de l'hydroxyapatite.

6.3 La dissolution de l'hydroxyapatite est en théorie contrôlée par le pH et la présence de chélatants

6.3.1 Simulation

Afin de bien comprendre ce qui permet la dissolution des particules de phosphate, voyons l'effet d'une acidification et d'un apport d'un chélatant sur l'hydroxyapatite, précipité de calcium et de phosphate. Les graphes qui vont suivre sont des simulations réalisées grâce au logiciel Visual MINTEQ ¹⁸⁵.

Soit une solution contenant 5 g/l d'hydroxyapatite, ou 10 mM. On fait varier le pH de la solution en ajoutant du HCl ou du NaOH et on affiche les concentrations molaires des ions calcium et phosphate en solution :

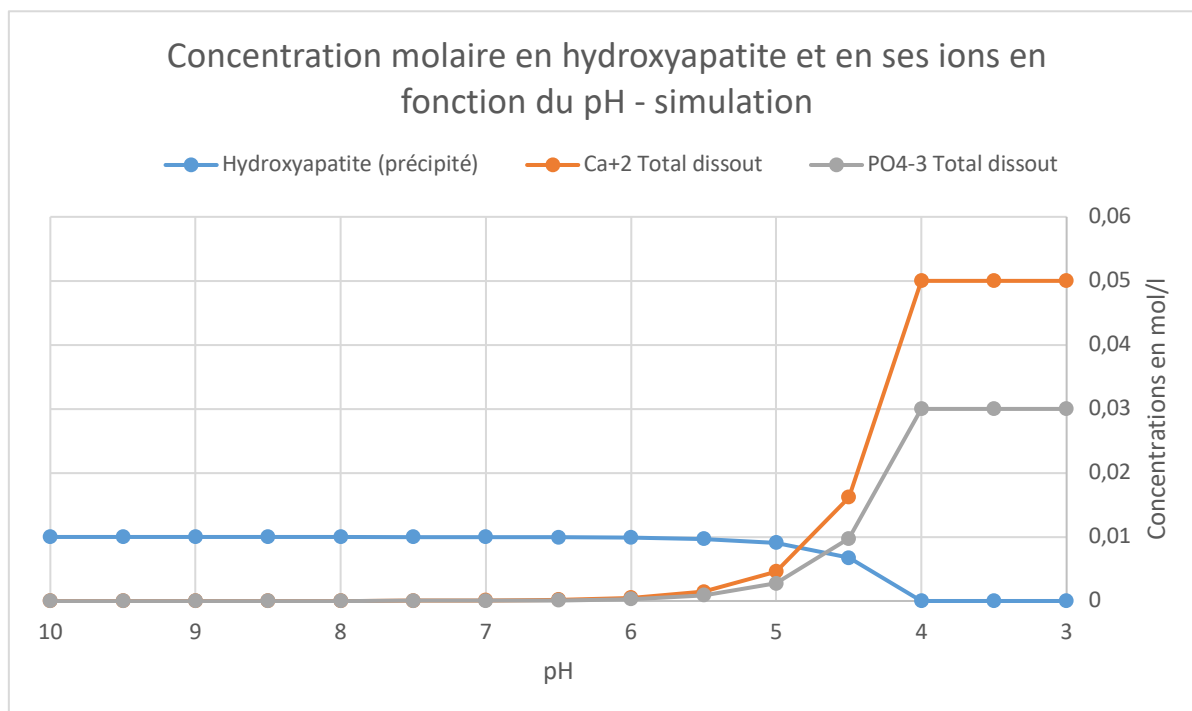


Figure 6-6 : Simulation de la dissolution de 5g/l d'hydroxyapatite par acidification progressive. Réalisé sous Visual MINTEQ

On constate qu'à pH acide, l'hydroxyapatite n'est pas stable et se dissocie en ses ions constitutifs (notamment le phosphate).

Voyons maintenant le comportement de cette même solution d'hydroxyapatite, maintenue à pH7, si l'on ajoute progressivement du citrate.

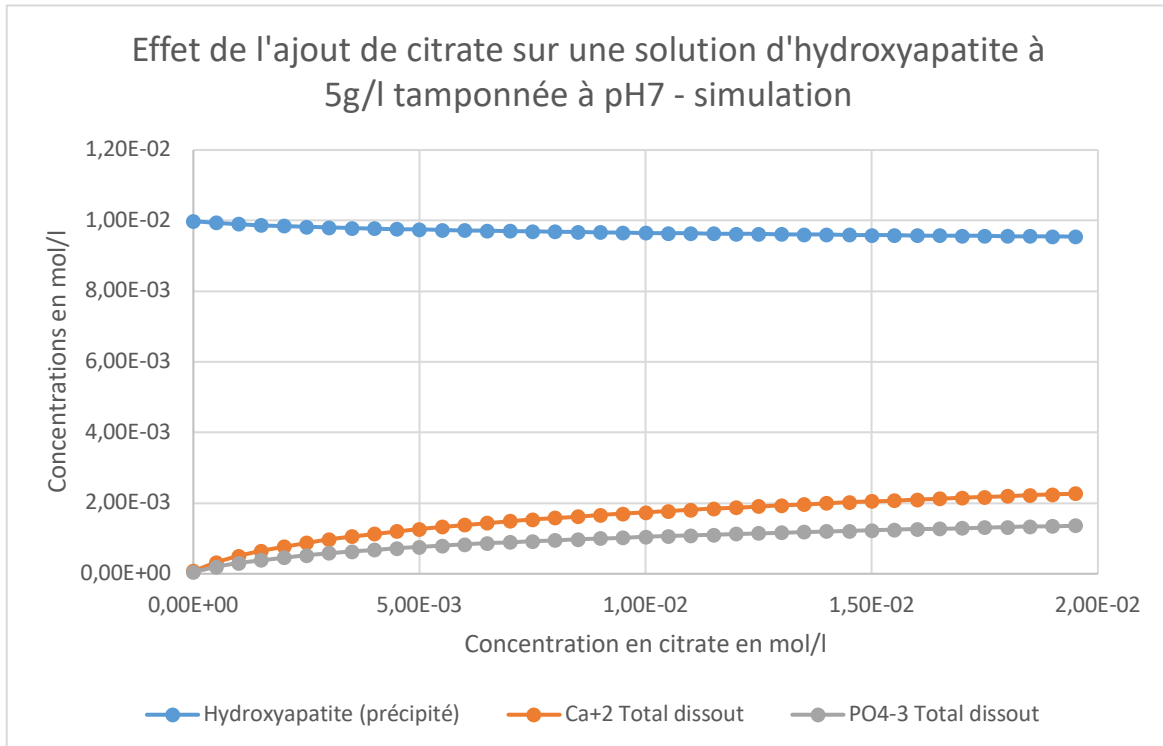


Figure 6-7 : Simulation de la dissolution de 5g/l d'hydroxyapatite par ajout de citrate, dans une solution maintenue à pH7. Réalisé sous Visual MINTEQ

On constate donc que même à pH constant, le citrate libère du phosphate en solution (3,5% du phosphate libéré à 10mM de citrate). Les autres chélatants organiques agissent de façon similaire, avec une quantité d'ions libérée variable en fonction de leur pouvoir chélatant. La sécrétion de ces molécules est donc là aussi une stratégie viable pour rendre le phosphate du sol disponible. On retrouve un mécanisme similaire avec les sidérophores, qui chélatent les fer en milieu acide^{97,102}. Dans du milieu Pikovskaya, on peut s'attendre à trouver les deux phénomènes. On notera au demeurant que **ces résultats peuvent être confirmés expérimentalement** : si l'on verse sur une boîte de milieu Pikovskaya une goutte de HCl ou de citrate concentré à pH7, il se crée un halo translucide.

Nous avons voulu savoir si l'on pouvait discerner ces deux effets en gouttes.

6.3.2 Mesure du pH en gouttes

Pour ce faire, il nous a semblé utile de mesurer le pH dans nos gouttes. A cette fin, nous avons introduit dans notre milieu Pikovskaya liquide **78µM de pyranine**. La pyranine, ou acide 8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonique (HPTS) est une molécule organique souvent utilisée comme **sonde pH fluorescente** et que nous avons choisie pour :

- Sa photo-stabilité (elle n'est pas détériorée par l'exposition répétée à nos lasers)
- Sa non-toxicité sur les microorganismes
- Son hydrophilie, qui assure qu'elle ne fuit pas dans la phase huileuse entre nos gouttes

- Sa compatibilité avec la résazurine : avec nos canaux de mesure de la fluorescence, il est possible de mesurer la fluorescence des deux sondes dans la même goutte, sans que le signal de l'une ne soit visible sur le canal de l'autre.
- Sa gamme de pH correcte (entre 10 et 4 environ), même si une sonde avec une gamme plus basse d'un ou deux points aurait mieux valu

Toutes ces propriétés ont été testées dans des expériences préliminaires (non présentées).

Afin de valider la précision de notre sonde, nous avons réalisé des étalonnages. Cela nous a permis d'avoir **une correspondance entre signal de fluorescence de la pyranine et pH**. Pour ce faire, on ajoute différentes quantités de HCl concentré à des tubes de milieu Pikovskaya liquide (stérile), que l'on incube dans la machine, puis dont on mesure le pH avec un pH-mètre. Après avoir essayé différents réglages de gain sur la machine, on constate que sur une plage de pH allant de 7 à 4,5 on a une relation linéaire entre le pH et le logarithme du signal de pyranine (Figure 6-8). Pour des pH plus acides, la fluorescence devient trop faible pour être mesurée. Pour des pH plus élevés à l'inverse, la relation n'est plus linéaire, et notre canal de détection sature. Cela pourrait être corrigé en abaissant le gain de notre module de fluorescence, mais on perdrait alors les mesures pour les points les plus acides.

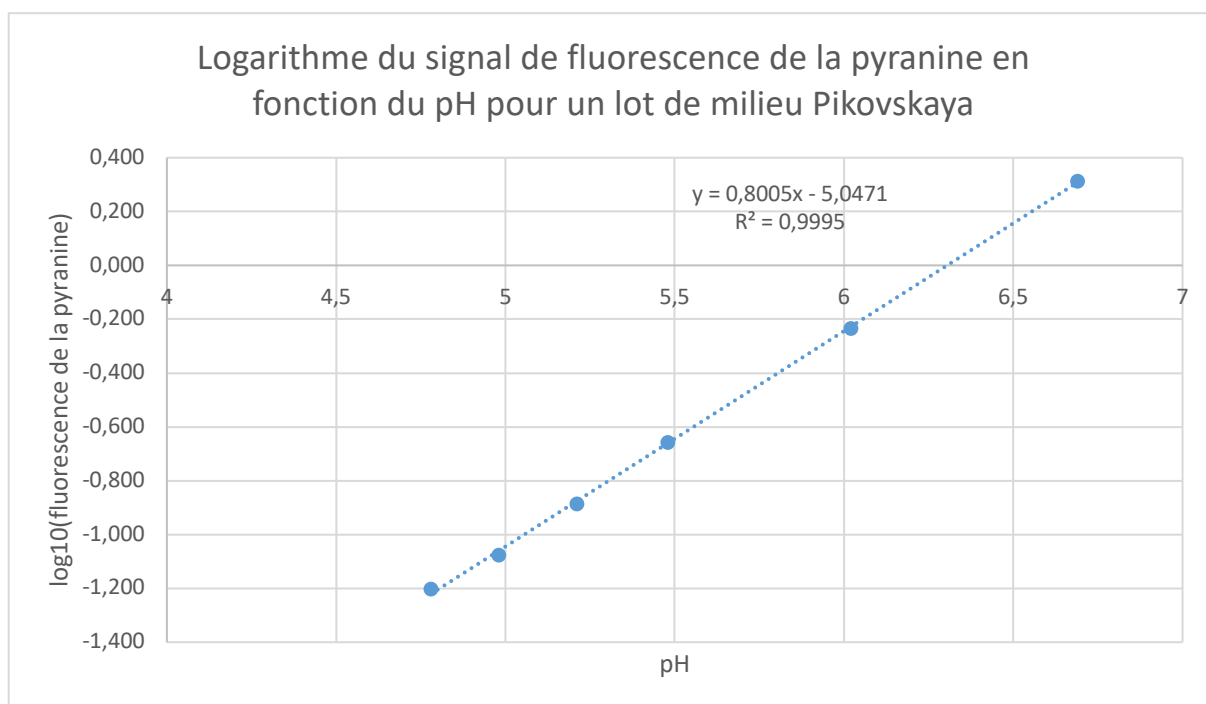


Figure 6-8 : Résultat de l'étalonnage d'un de nos lots de milieu Pikovskaya. Chaque point est la moyenne de 20 gouttes. Résultats au bout de 16 heures dans la machine. La fluorescence est celle mesurée sur le canal de fluorescence 1 (497nm/527nm) présenté dans la partie millifluidique.

Maintenant que l'on sait que l'hydroxyapatite est dissoute par la baisse du pH, et que l'on est capable de mesurer le pH précisément dans nos gouttes, on aimerait voir le lien entre lumière diffusée et pH. A priori, le signal de scattering doit diminuer avec le pH. Malheureusement, cela s'est avéré plus compliqué que prévu.

6.3.3 Lien entre pH et état des particules

En effet, en réalisant les tubes évoqués au paragraphe précédent, on observe un phénomène qui pose problème pour étudier le lien entre pH et niveau de scattering : avec la diminution du pH, non seulement les particules disparaissent progressivement, mais elles s'agrègent. La Figure 6-9 est une photo des tubes utilisés pour réaliser l'étalonnage ci-dessus, environ 15 minutes après avoir ajouté le chlorure d'hydrogène. On constate qu'à partir de pH 6,02, mais surtout de pH 5,21 les particules ont sédimenté, formant un **culot** et rendant le milieu **de moins en moins turbide**. En dessous de pH 5, la quantité totale de particules semble diminuer, signe de leur dissolution.

La sédimentation que l'on observe est très vraisemblablement le fait d'une agrégation. Nous n'avons pas analysé les causes de cette agrégation, mais il nous semble qu'elle est due à une modification des propriétés électrostatiques des particules, certainement causée par la protonation partielle du polycarboxylate. En effet, **le pKa du polycarboxylate est de 4,8¹⁹⁰**. En conséquent, plus on s'approche de cette valeur de pH, plus le polymère passera sous forme acide polyacrylique, ce qui lui fera **perdre ses charges**, sa capacité à interagir avec le calcium et donc à **stabiliser notre suspension colloïdale**.

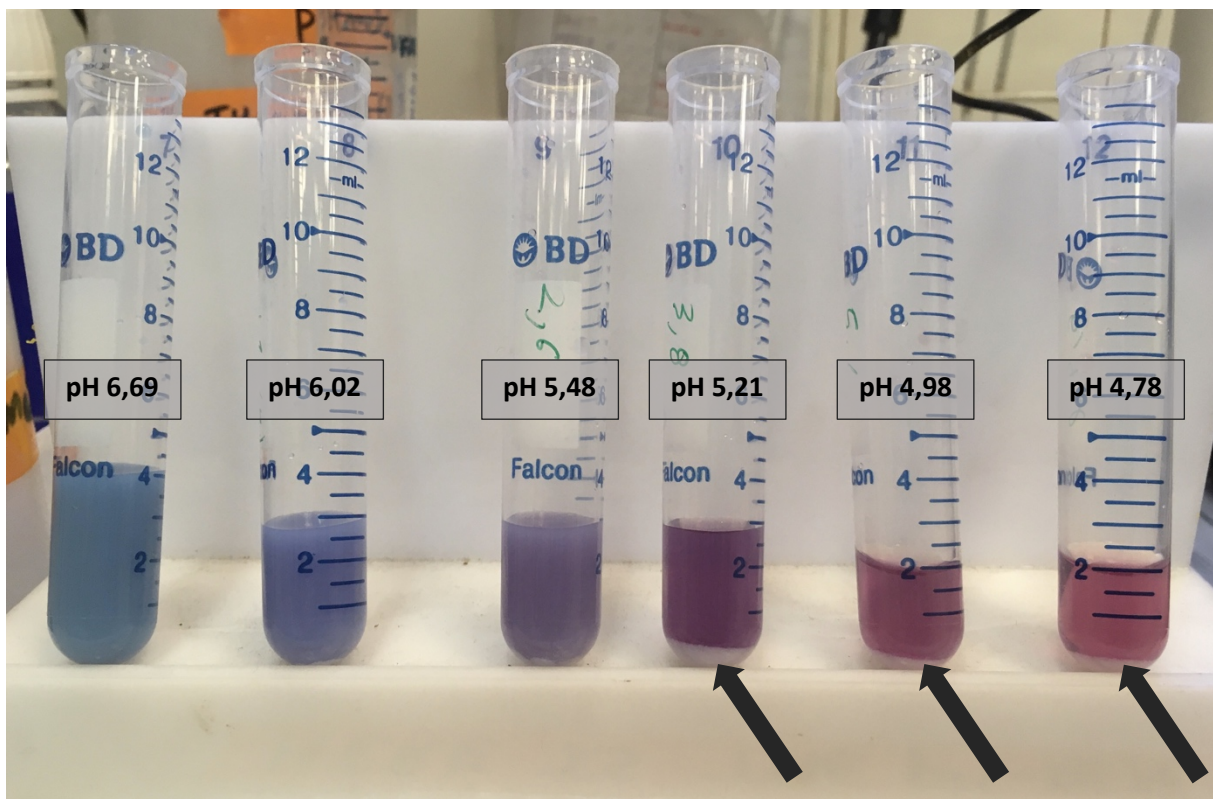


Figure 6-9 : tubes utilisés pour réaliser l'étalonnage du milieu Pikovskaya en fonction du pH. Observer le culot des tubes (flèches). Photo prise 15 minutes après l'ajout de HCl. Le niveau des tubes n'est pas en lien avec le pH. Les variations de couleur sont dues à la résazurine.

Cela pose un problème lié au mode de génération de nos gouttes : comme expliqué plus tôt, la machine prélève le liquide contenu dans les puits d'une plaque multi puits **par le haut** et met **environ une heure** pour ce faire. Le phénomène de sédimentation visible sur la Figure 6-9 a lieu au bout de moins de dix minutes. En conséquent, si l'on essaye de générer une plaque avec ces tubes, le contenu des gouttes ne sera pas représentatif de celui des tubes : une partie des particules sera tombée au fond des puits, donc ne sera pas incorporée aux gouttes sans avoir été dissoute pour autant.

Ces résultats ont deux implications :

- Il est **impossible de réaliser un étalonnage du signal de scattering** du Pikovskaya liquide en dessous d'un certain pH. Nous jugeons que les résultats que l'on obtient sont trop peu fiables pour être utilisés.
- Une fois en gouttes, si les microorganismes acidifient beaucoup leur milieu, il est possible que cela mène à l'agrégation des particules, ce qui risque de fausser notre signal de scattering. Nous reviendrons sur ce dernier point plus loin

Finalement, nous avons réussi à **stabiliser une suspension de particules d'hydroxyapatite** avec du polyacrylate, un polymère fréquemment utilisé comme défloculant. A partir de là, nous avons pu reformuler une version liquide du milieu Pikovskaya, dont les propriétés colloïdales ne **sont pas altérées par la cuisson ni par la congélation**. Nous avons cependant constaté que la qualité de la dispersion des particules était altérée par l'acidification. L'ajout de **résaurine** et de **pyranine**, deux marqueurs fluorescents, nous permet de suivre à la fois l'activité métabolique (chapitre précédent) et le pH dans nos gouttes, sans que le signal d'une des deux molécules ne gêne la lecture du signal de l'autre. Nous avons alors voulu observer le comportement de microorganismes cultivés dans nos gouttes de milieu Pikovskaya liquide, afin de savoir si la dissolution de particules était détectable avec notre module de scattering.

6.4 La biomasse fait augmenter le signal de scattering, mais dans des proportions négligeables face aux particules minérales

Il nous restait maintenant à savoir si des microbes qui forment des auréoles lorsqu'ils poussent sur boîte de Petri font baisser le signal de scattering dans nos gouttes, avec notre milieu. En effet, en se divisant, les microorganismes font augmenter la turbidité de leur milieu, ce qui risque d'occulter l'éventuel effet lié à la solubilisation des particules en gouttes. Il était compliqué de prévoir quel effet l'emporterait avant d'avoir mené nos expériences. Nous avons donc cultivé sur milieu Pikovskaya liquide et solide des microorganismes identifiés. Les espèces que nous avons essayées sont les suivantes :

- *Pantoea agglomerans* : cette bactérie de l'environnement est capable de dissoudre des particules de phosphate de calcium si la concentration de phosphate en solution passe sous un certain seuil. Les mécanismes génétiques qui sous-tendent ce phénomène ont été décrits dans les années 90 par les équipes d'Alan Goldstein notamment^{98,191}. Nous utilisons la souche DSM 8570, du fournisseur DSMZ. Elle forme des auréoles sur boîtes de Petri après quelques jours de culture.
- *Escherichia coli* : bactérie du tube digestif bien connue du grand public. Nous utilisons la souche UMN 026 qui ne forme pas d'auréole si on la cultive sur milieu Pikovskaya.

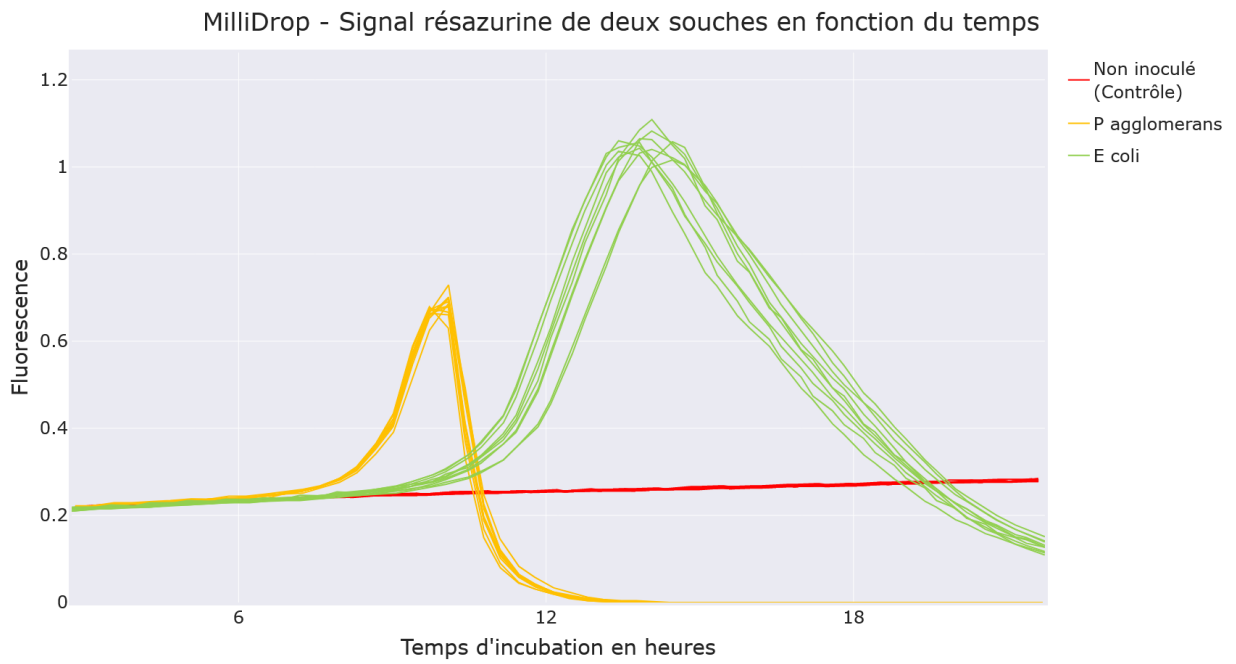


Figure 6-10 : Fluorescence de la résazurine de deux souches bactériennes en fonction du temps (10 gouttes par conditions sont représentées) – inoculum initial : 10 bactéries par goutte en moyenne

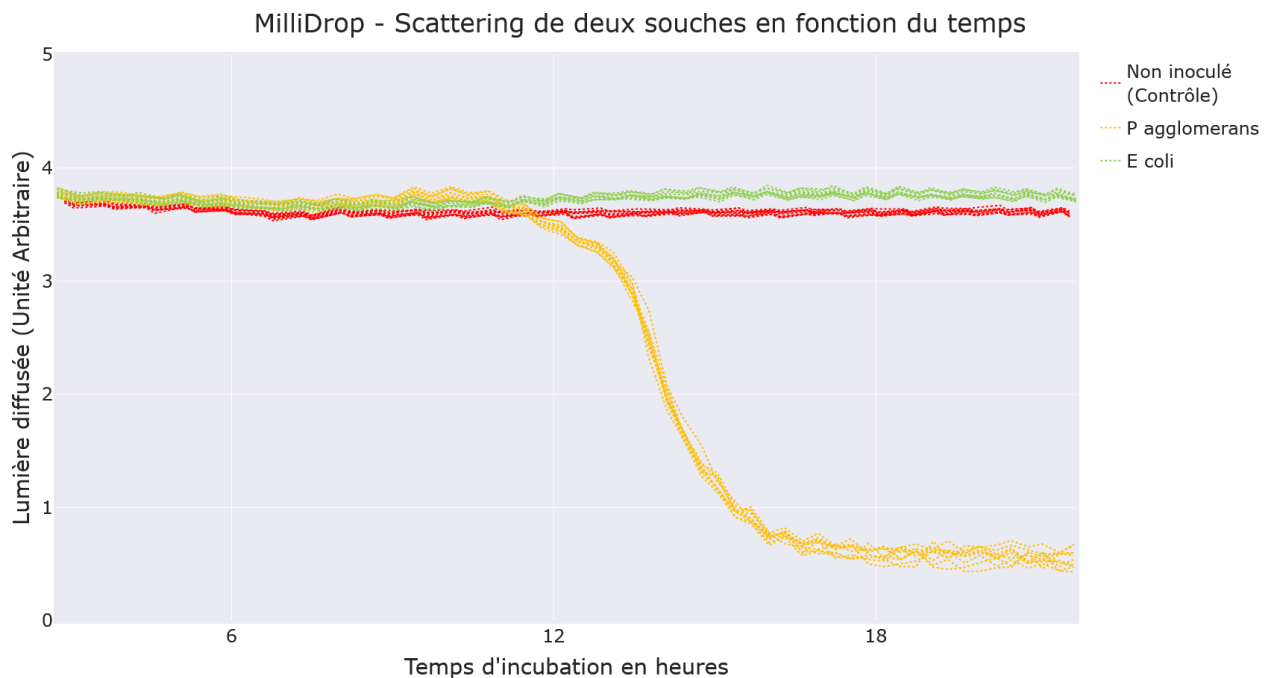


Figure 6-11 : Lumière diffusée par deux souches bactériennes en fonction du temps (10 gouttes par conditions sont représentées) – inoculum initial : 10 bactéries par goutte en moyenne

Nous avons montré qu'une souche connue pour former des auréoles sur milieu Pikovskaya solide faisait bel et bien chuter le signal de scattering dans nos gouttes. Nous avons également montré que *Escherichia coli* ne faisait pas chuter le signal de scattering et ne formait pas d'auréole sur boîte de Petri.

Nous avons également cultivé des microorganismes dans du milieu Pikovskaya sans particule pour estimer le signal de scattering maximal atteint par les microorganismes. On constate que les valeurs maximales de scattering dues à la biomasse sont environ 10 fois plus faibles que le signal de base des particules seules. Voir la Figure 6-12.

L'augmentation du signal de scattering dû à la biomasse ne doit donc pas impacter notre capacité à détecter la solubilisation des particules d'hydroxyapatite.

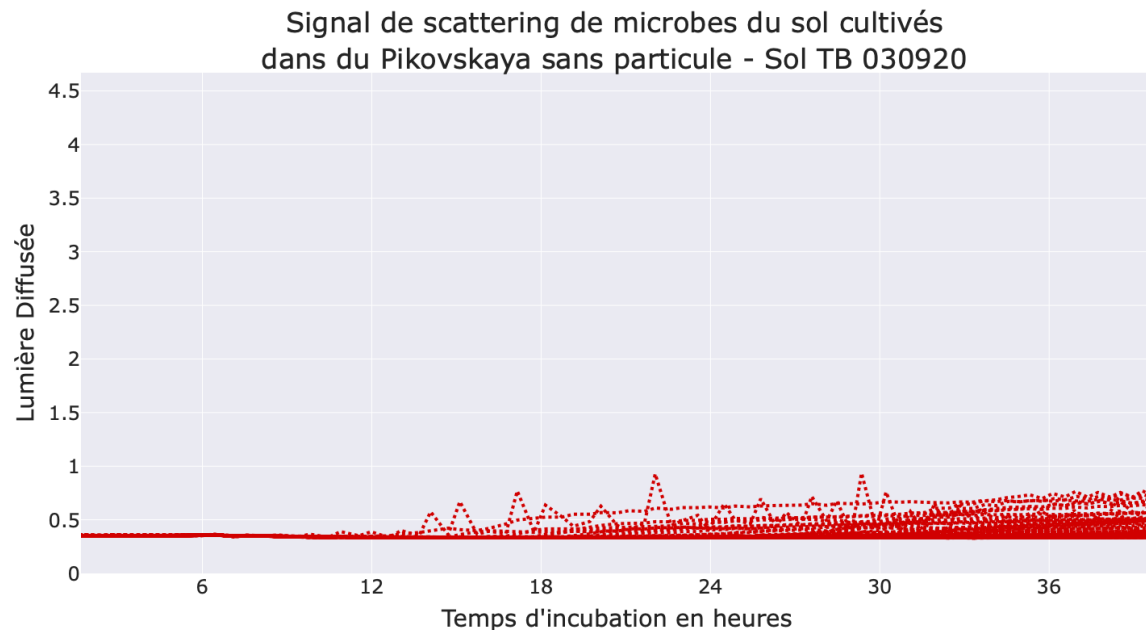


Figure 6-12 : Lumière diffusée (scattering) au cours du temps par des gouttes ensemencées avec des microorganismes du sol, dans du milieu Pikovskaya sans particule

Nous avons ensuite adapté ce protocole aux sols évoqués précédemment (Noter que les expériences sont en réalité les mêmes, mais la présentation des résultats a été scindée en deux chapitres pour une meilleure compréhension).

6.5 Analyse des sols

6.5.1 Notre dispositif expérimental permet de distinguer les sols selon leur capacité à faire diminuer le signal de scattering

6.5.1.1 Le problème des signaux, pas aussi clairs qu'avec la résazurine

Comme nous l'avons vu, la croissance de P agglomérants entraîne une diminution de la quantité de lumière diffusée. Qu'en est-il avec des microorganismes du sol ?

Comme pour la résazurine, les microorganismes du sol montrent des courbes de scattering très différentes les unes des autres, dont le signal baisse plus ou moins tôt, plus ou moins fort et augmente dans certains cas (voir Figure 6-13 et Figure 6-14 pour un aperçu). Pour la mesure de la fluorescence de la résazurine, on voyait parfois que le signal faisait des dents de scie. Cela vient du fait qu'on ne mesure pas exactement la même chose si la goutte va dans un sens ou dans l'autre (la goutte peut notamment aller légèrement plus vite dans un sens). Cependant, dans le cas du scattering, un autre paramètre entre en jeu : l'agrégation.

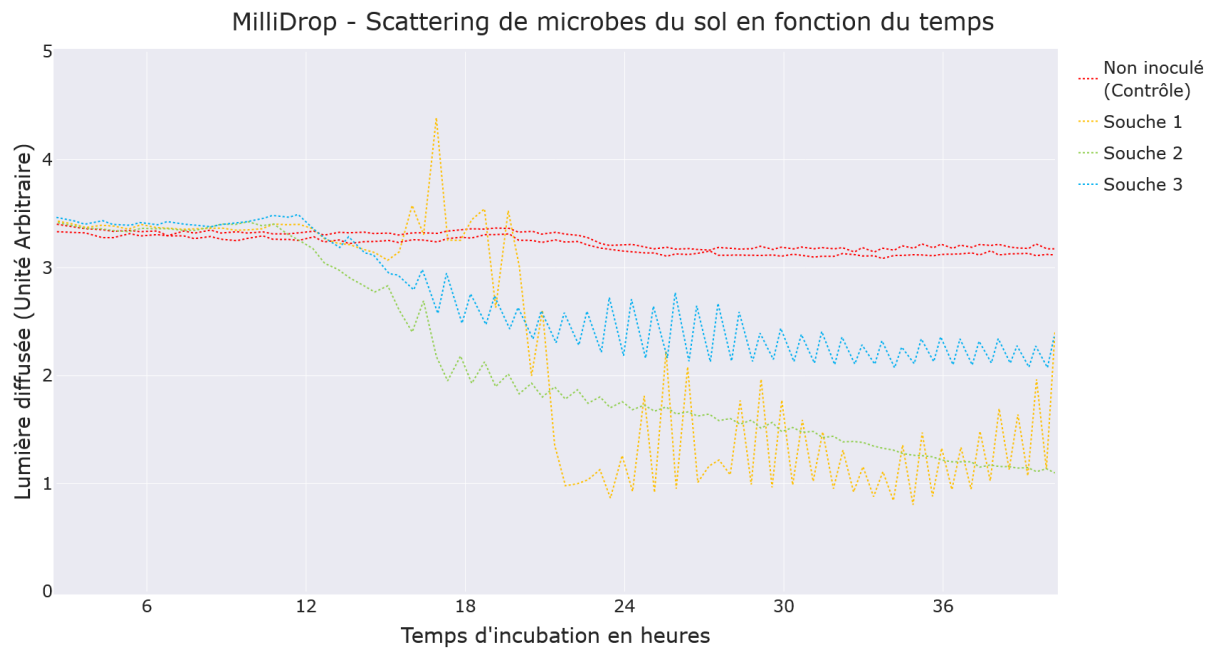


Figure 6-13 : Signal de scattering au cours du temps de gouttes de Pikovskaya liquideensemencées avec des microbes du sol - environ une cellule par goutte en début d'incubation

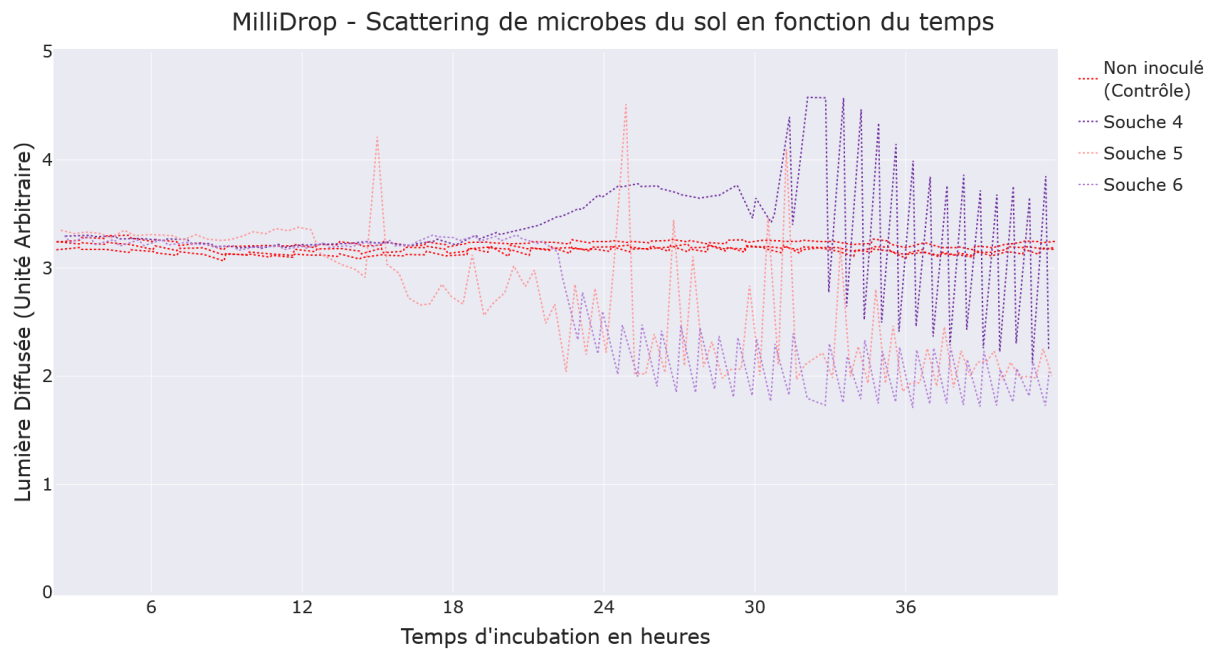


Figure 6-14 : Signal de scattering au cours du temps de gouttes de Pikovskaya liquideensemencées avec des microbes du sol - environ une cellule par goutte en début d'incubation

En effet, après avoir pris en photos des gouttes en cours d'incubation, on constate que le contenu de certaines d'entre elles n'est pas homogène : on voit des amas par endroits. Voir Figure 6-15 pour un échantillon de ce que l'on rencontre en gouttes. Or, on constate que lorsqu'un amas de forme, il est généralement attiré vers le bas de la goutte par gravité, ce qui peut donner des paramètres optiques très différents dans un sens et dans l'autre. Cela obscurcit par ailleurs parfois tellement la goutte qu'une « éclipse » se crée : le laser de détection des gouttes est absorbé par l'agglomérat et une partie (voire la totalité) du signal n'est pas détectée comme faisant partie de la goutte. Cela peut donc amener le logiciel de traitement du signal à surestimer ou sous-estimer le signal réel de scattering. Notez que pour des raisons techniques, ce dernier phénomène est plus important sur le canal scattering que sur le canal de fluorescence.

On peut penser que d'un point de vue biologique, il s'agit d'une création de biofilm. En effet, des auteurs ont rapporté que le manque de phosphate pouvait entraîner la formation de biofilm chez certains procaryotes¹⁸⁹.

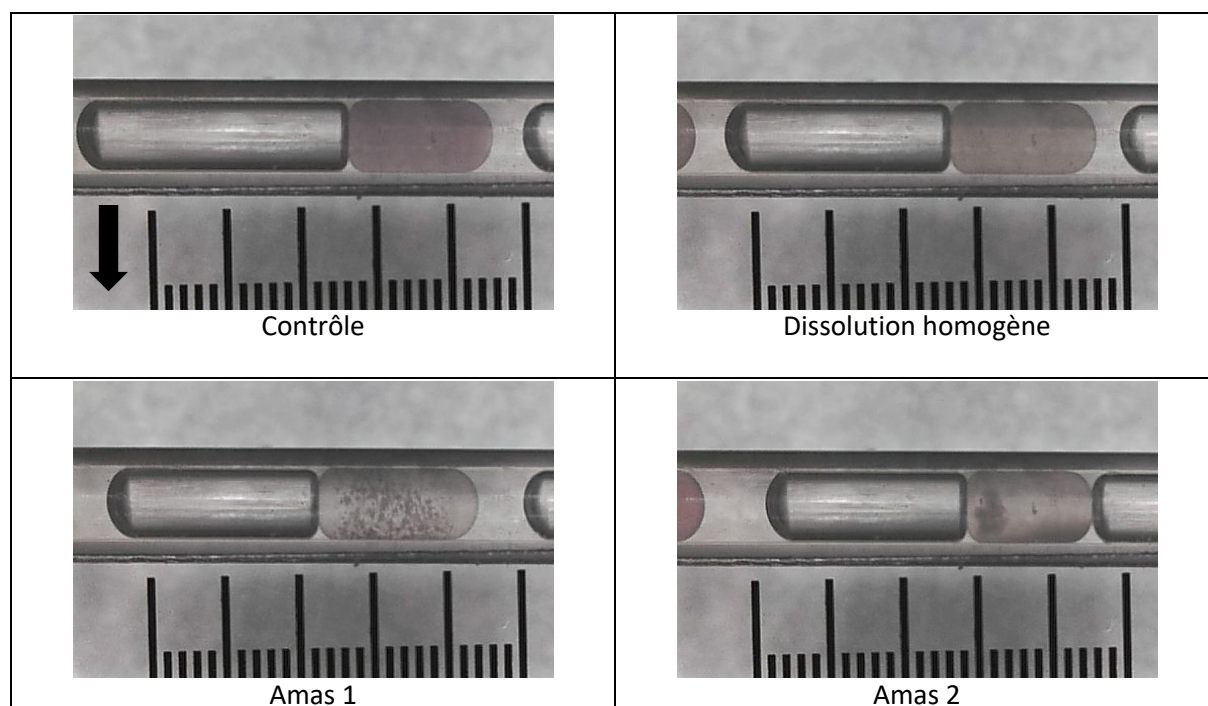


Figure 6-15 : Photos de différentes gouttes au bout de 30 heures d'incubation, milieu Pikovskaya inoculé avec une suspension de microorganismes du sol. La règle en bas des photos mesure 5mm. La flèche représente le sens de la gravité.

On peut donc se demander ce que l'on détecte réellement avec le canal de scattering. Nous étudierons cette question plus tard. Dans un premier temps, considérons que toute goutte dont le signal de scattering a baissé d'un certain niveau par rapport à son signal en début d'incubation contient au moins une souche de microbes solubilisateurs. Comme dans le chapitre précédent, nous nous baserons là-dessus pour identifier des gouttes comme « positives » au scattering et des gouttes comme « négatives ». A partir de là, nous réutiliserons la méthode des zéros de Poisson pour estimer une concentration la plus probable en microorganismes solubilisateurs, en appliquant les formules de Jarvis et al¹⁸².

6.5.1.2 Choix d'un seuil de scattering

Afin de déterminer à partir de quelle valeur de scattering une goutte est considérée comme contenant des bactéries solubilisatrices cultivables nous avons suivi le protocole de traitement de données suivant :

- 1) On retire à chaque goutte sa valeur de scattering initiale, moyennée sur les quatre premiers runs.
- 2) On note les gouttes qui ont poussé en se basant sur leur signal de résazurine (même données qu'au chapitre précédent)
- 3) On cherche la valeur de scattering la plus basse par rapport au signal initial ; le « $\Delta_{scattering}$ » le plus important
- 4) A partir de ces valeurs, on trace un histogramme de répartition des valeurs de scattering les plus basses atteintes par chaque goutte. Notez que chaque lot de milieu a un pH et une concentration en particules légèrement différents des autres lots, c'est pourquoi nous menons cette analyse indépendamment pour chaque groupe d'expériences menées avec le même milieu (c'est-à-dire avec la même bouteille de milieu).

A partir de cet histogramme, on extrait une valeur seuil en-dessous de laquelle on considère qu'il y a eu dissolution. Par exemple, sur la Figure 6-16, on a représenté ces valeurs pour un de nos lots de milieu, avec lequel nous avons mené une dizaine d'expériences, sur différents sols. On constate qu'environ 75% des gouttes n'ont pas dépassé -0,25 point par rapport à leur valeur initiale. On prend donc cette valeur comme seuil ; pour ce lot de milieu et on considère les gouttes qui ont dépassé -0,25 comme peuplées de solubilisatrices.

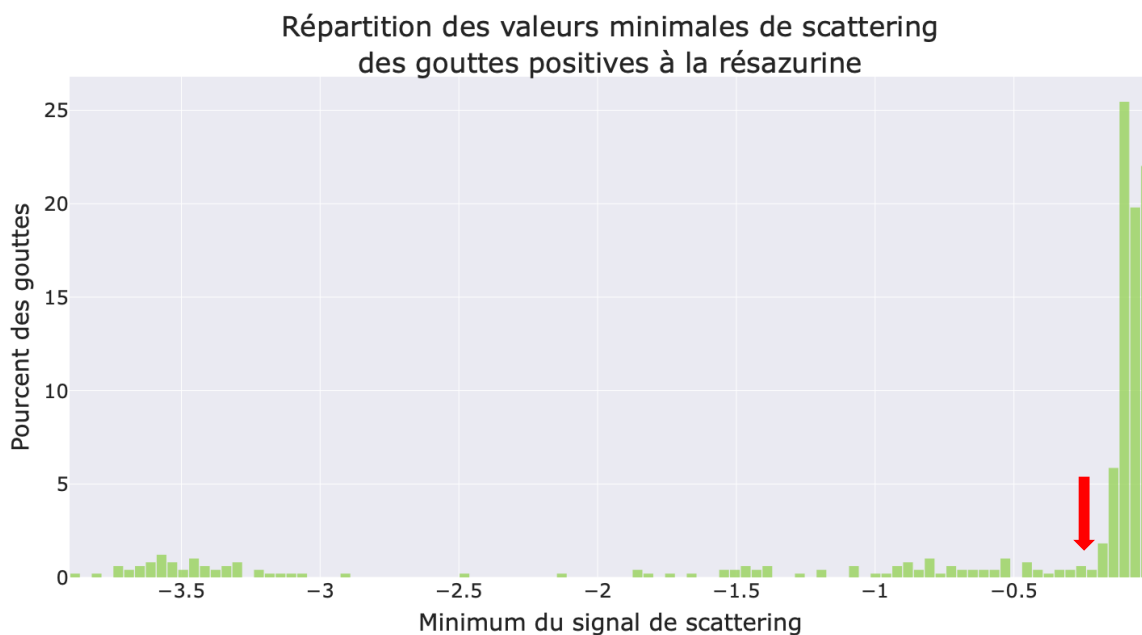


Figure 6-16 : Histogramme représentant la valeur de scattering la plus basse atteinte par chaque goutte dans laquelle au moins un microorganisme a poussé, pour un même lot de milieu Pikovskaya liquide. La flèche représente le seuil choisi.

Pour chaque lot de milieu, on détermine un seuil à partir de ces histogrammes.

A partir de là, on peut calculer les concentrations les plus probables en solubilisateurs, exactement comme dans le chapitre sur la biomasse cultivable. Comme expliqué au chapitre précédent, on arrête l'analyse à 38h, car au-delà, trop de gouttes coalescent, ce qui gêne l'identification des gouttes.

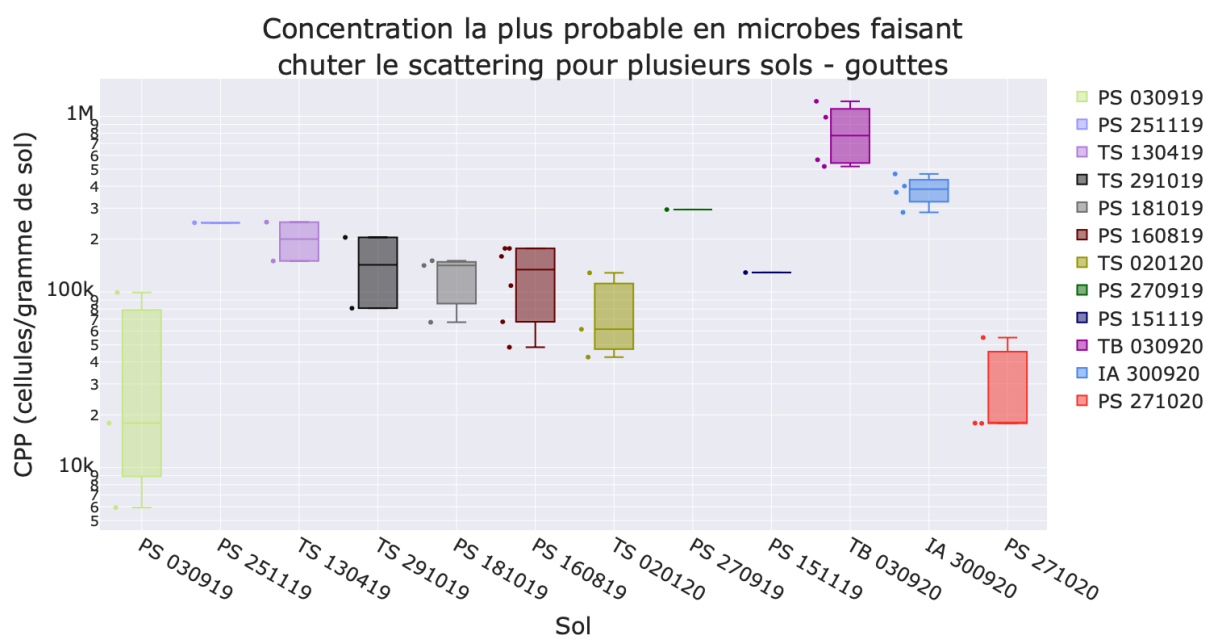


Figure 6-17 : concentrations la plus probable en microbes solubilisateurs cultivables pour plusieurs sols, en cellules par gramme de sol. Ces résultats correspondent aux données disponibles à 38 heures d'incubation.

On constate que le nombre de solubilisateurs varie entre 2^E4 et 7^E5 cellules par gramme de sol. Notez par ailleurs qu'avec notre expérience, il est possible de détecter les points entre $6,0^E3$ et $3,4^E7$ cellules par gramme de sol. Les sols pauvres comme PS 030919 sont donc en limite de plage dynamique, pour chaque expérience, on ne compte typiquement que trois ou quatre gouttes positives au scattering, d'où une plus grande variabilité des mesures.

Comme ces valeurs variaient environ comme la biomasse, nous avons divisé la concentration en microorganismes faisant chuter le scattering par la concentration en microorganismes cultivables (c'est-à-dire positifs à la résazurine), ce qui donne les fractions de solubilisateurs présumés. On constate que des différences plus marquées apparaissent alors, avec certains sols proportionnellement très riches (60% des cellules) ou très pauvres (2,5% des cellules) en microbes faisant chuter le signal de scattering (Figure 6-18) :

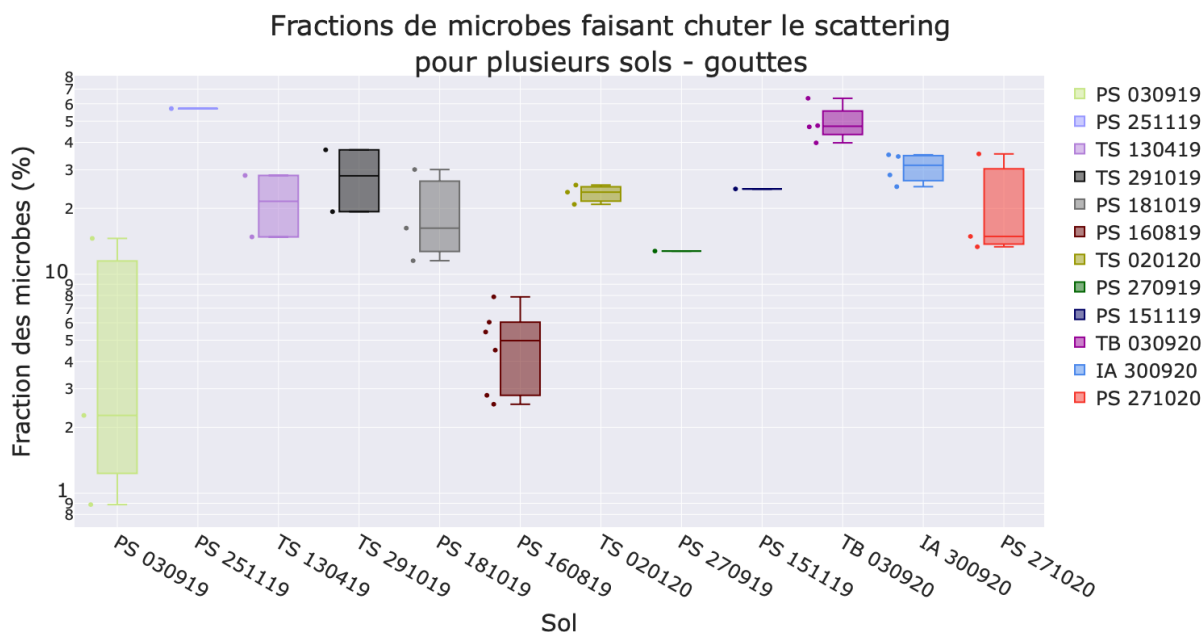


Figure 6-18 : Fractions de microorganismes faisant chuter le signal de scattering parmi les cellules cultivables pour nos différents sols agricoles. Les fractions sont calculées en divisant les concentrations calculées à partir du scattering par celles calculées à partir de la résazurine.

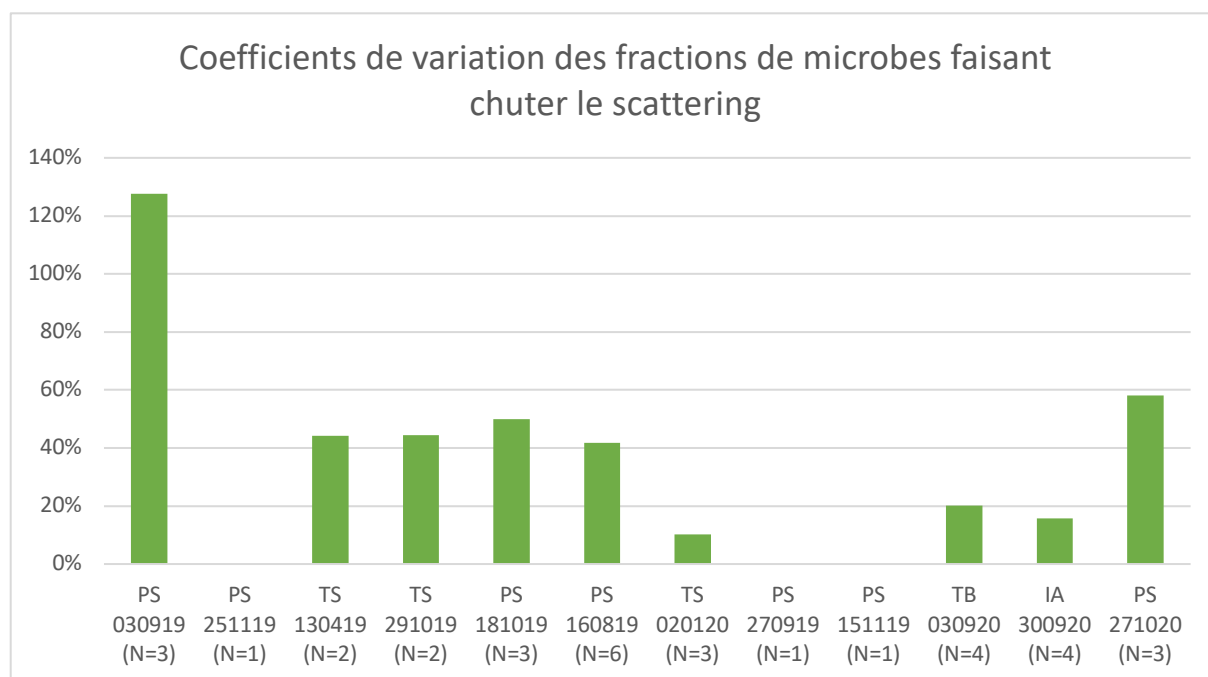


Figure 6-19 : Coefficient de variation (écart-type/moyenne) de du ratio nombre de solubilisateurs/nombre de cellules cultivables. Notez que les sols les plus variables sont aussi ceux pour lesquels on a le moins de microorganismes. Le nombre N représente le nombre d'expériences.

Les coefficients de variation sont tous inférieurs à 50%, sauf pour les sols en limite de plage dynamique. On a donc une reproductibilité satisfaisante.

Finalement, on trouve que notre protocole donne des résultats reproductibles et que sur notre lot de sols, une diversité apparaît en matière de fractions des microorganismes capables de faire diminuer le signal de scattering : entre 2% et 60% selon les sols, avec des extrêmes à 0,8% et 64% pour certaines expériences. Ces résultats sont supérieurs à ceux que l'on trouve dans la littérature : dans une étude

de Azziz et al³⁹, les microorganismes solubilisateurs cultivables sont entre $6,5^{E4}$ et $6,2^{E6}$ par gramme de sol. Ils représentent entre 0,2% et 13,1% de la population totale de microorganismes cultivables, avec des moyennes à 2,9% et 3,8%. Dans une étude de Reyes et al¹⁹², en moyenne 19% de la population microbienne étudiée est capable de solubiliser le phosphate. Nous verrons en 6.6 que cela peut s'expliquer par différents éléments.

Il nous reste maintenant à savoir si notre protocole mesure bien la capacité à solubiliser les particules de phosphate. Pour ce faire, nous allons analyser le lien entre baisse du signal de scattering et pH dans nos gouttes. Dans une dernière partie, nous comparerons nos résultats avec ceux obtenus sur boîtes de Petri.

6.5.2 Étude du lien entre scattering et pH

L'acidité a un impact majeur sur la solubilité de l'hydroxyapatite. Nous avons donc comparé les résultats du scattering avec ceux issus de la fluorescence de la pyranine, notre indicateur pH. Nous souhaitons savoir si les gouttes dont le signal de scattering baissaient avaient subi une **acidification** et si l'acidification était **suffisante** pour expliquer la baisse du signal de scattering (cf Figure 6-6).

Pour cela, penchons-nous d'abord sur le signal de pyranine dans nos gouttes et sur la **diversité** des courbes que l'on peut obtenir.

6.5.2.1 Présentation du signal de pyranine

On constate facilement que beaucoup de gouttes dans lesquelles un microorganisme se développe font au moins légèrement baisser le signal de pyranine, signe qu'elles s'acidifient (cf Figure 6-8). Cela s'explique probablement par le fait que le milieu contient du glucose, dont on sait que l'hydrolyse fait baisser le pH. Dans certains cas, le pH peut augmenter, mais il finit presque toujours par baisser.

Dans des expériences préliminaires, nous nous sommes assurés qu'en l'absence de pyranine, le signal de fluorescence sur le canal « fluorescence 1 »² (qui pourrait être dû à l'autofluorescence du milieu ou des microorganismes, ou à la fluorescence de la résazurine) était suffisamment faible pour être négligé. Nous sommes donc confiants dans le fait que la fluorescence que l'on détecte sur ce canal est bien due à la pyranine, donc dépendant uniquement du pH.

Au demeurant, lorsqu'un train de gouttes contient des microorganismes cultivables, on constate que même les gouttes vides subissent une baisse de leur signal de pyranine, bien que celle-ci soit moins marquée que pour les gouttesensemencées. Nous pensons que cela s'explique par un transfert de CO₂ entre les gouttes.

Enfin, on constate que les vitesses d'acidification et les niveaux minimum atteints sont variables d'une goutte à l'autre : certaines gouttes sont acidifiées très tôt, d'autres très tard et les gouttes acidifiées n'atteignent pas toutes le même niveau en fin d'incubation. Voir Figure 6-20 et Figure 6-21.

² Excitation 497nm/ émission 527nm

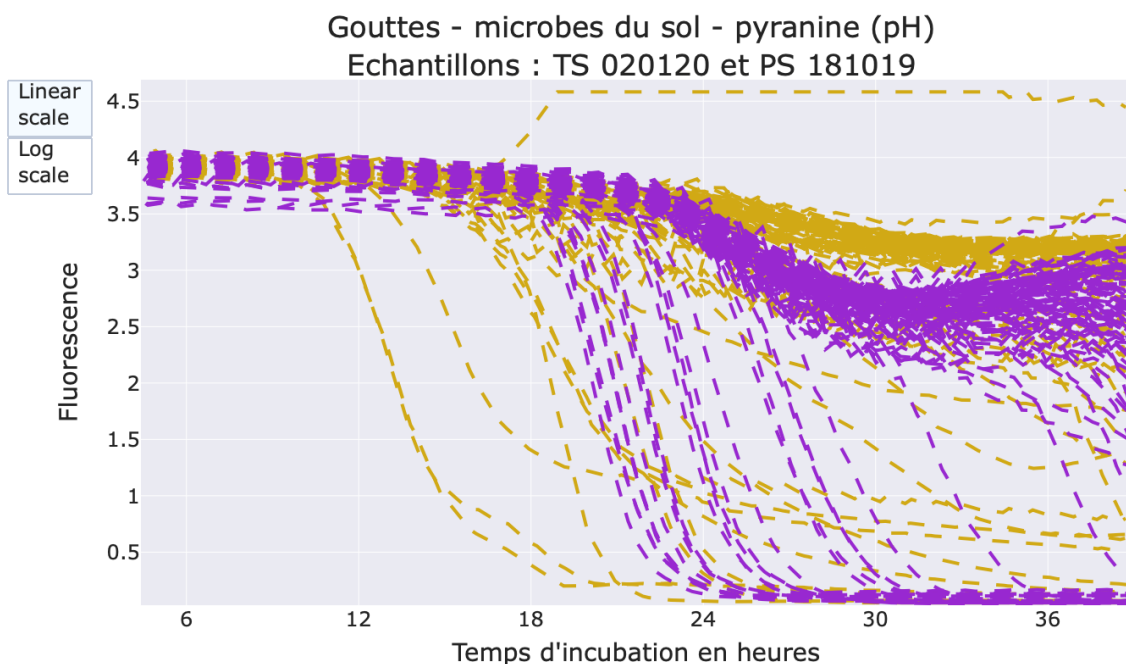


Figure 6-20 : Signal de la pyranine en fonction du temps pour deux sols. Chaque ligne représente une goutte. Échelle linéaire. Lignes jaunes : sol TS 020120 ; lignes mauves : sol PS 181019. Notez qu'une goutte jaune a été alcalinisée

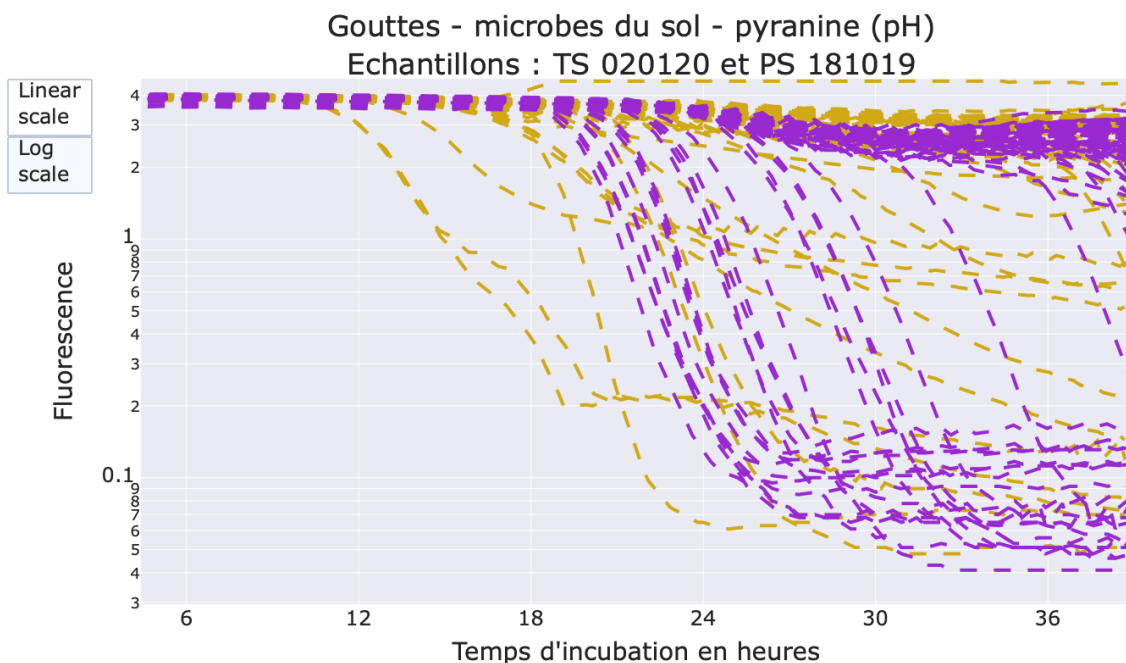


Figure 6-21 : Signal de la pyranine en fonction du temps pour deux sols. Chaque ligne représente une goutte. Échelle logarithmique. Lignes jaunes : sol TS 020120 ; lignes mauves : sol PS 181019

6.5.2.2 Dénombrement des microbes acidificateurs

Comme précédemment avec le scattering, nous avons voulu savoir s'il était possible de mettre en place une catégorisation simple des gouttes : d'une part les gouttes acidifiées, d'autre part les gouttes dont

le pH n'a pas varié, ou a augmenté par rapport aux gouttes contrôles. Pour savoir si cela était le cas, là encore, nous avons tracé les histogrammes des valeurs les plus basses atteintes par chaque goutte au bout de 38 heures d'incubation, indépendamment pour chaque lot de milieu. Voir Figure 6-22 et Figure 6-23 pour une illustration.

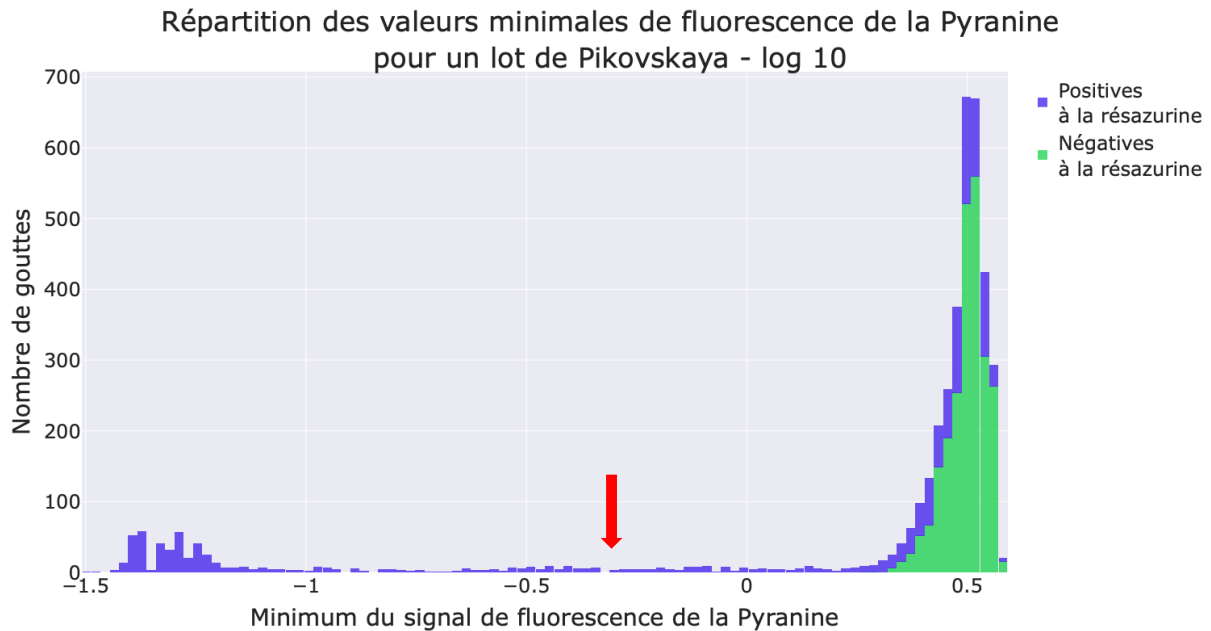


Figure 6-22 : Histogramme représentant les logarithmes en base 10 des valeurs de fluorescence de la pyranine les plus basses atteintes par chaque goutte pour un même lot de milieu Pikovskaya. La flèche rouge représente le seuil pH 5,8 choisi plus bas. Les barres vertes représentent les gouttes pour lesquelles aucune croissance bactérienne n'est détectable par la signal de résazurine, à l'inverse des barres violettes.

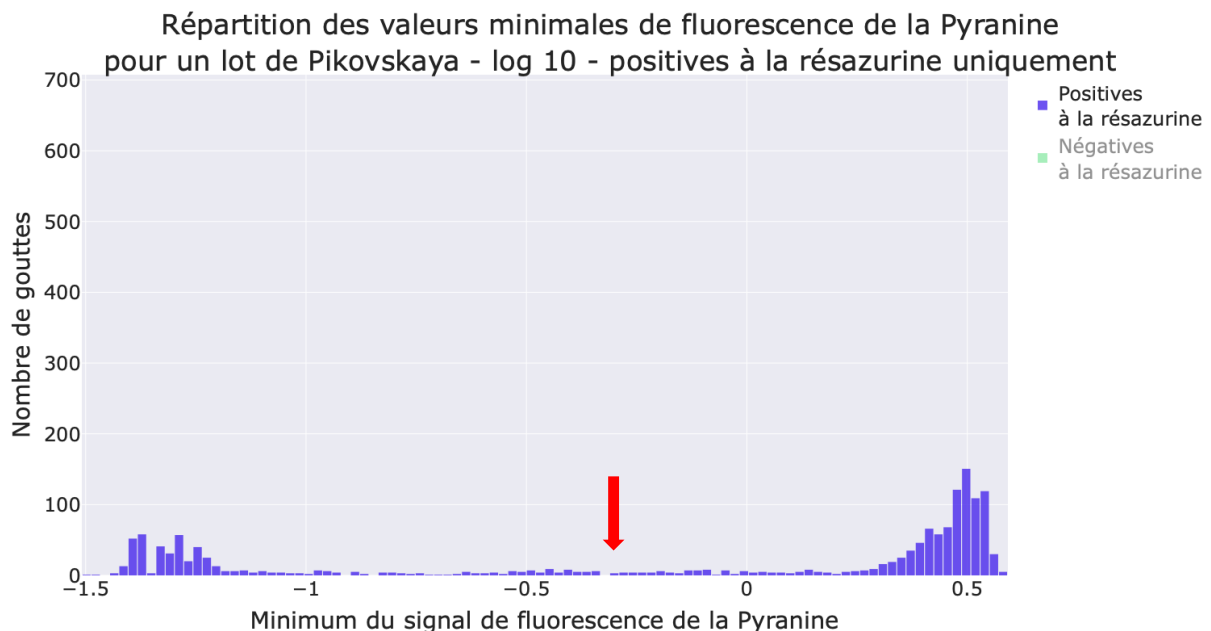


Figure 6-23 : le même histogramme sans les gouttes dans lesquelles rien n'a poussé d'après le signal de résazurine

Pour simplifier notre analyse, nous avons choisi de ne créer que deux catégories de gouttes : celles acidifiées et celles non-acidifiées. En nous basant sur les étalonnages fluorescence de la pyranine/pH

établis plus haut, nous avons choisi de prendre un **seuil de fluorescence correspondant à pH 5,8** pour les raisons suivantes :

- L'hydroxyapatite commence à se dissoudre à ce pH (voir Figure 6-6 et Figure 6-7 ci-dessus).
- A cette valeur, notre polymère, dont le pKa est de 4,8 a déjà perdu environ 10% de sa capacité dispersante

Ainsi, on considère comme « acidifiée » toute goutte dont le pH est passé sous 5,8 (représenté par les flèches rouges sur les graphes ci-dessus). Une fois ce seuil choisi, nous avons cherché à comparer le nombre de microbes acidificateurs et le nombre de microbes faisant chuter le scattering.

Une observation attentive des courbes de fluorescence et de scattering en fonction du temps (Figure 6-24) suggère qu'au moins dans certaines gouttes, il y a un décalage temporel de quelques heures entre la baisse du signal de pyranine et la diminution de la lumière diffusée.

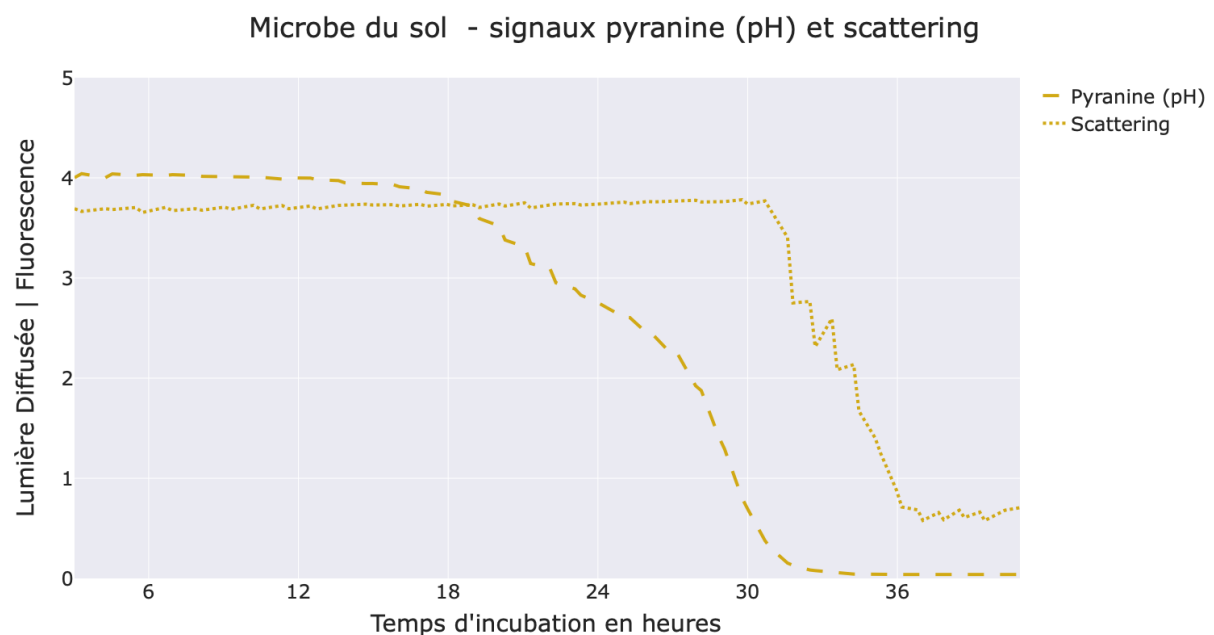


Figure 6-24 : Illustration du décalage temporel entre baisse du pH et baisse du scattering - signaux de scattering et de fluorescence de la pyranine pour une même goutte inoculée avec des microorganismes du sol

Afin de préciser cette constatation, nous avons tracé l'écart de temps entre le passage du seuil de scattering et du seuil de pyranine, pour les gouttes qui franchissent les deux (Figure 6-25). On constate qu'en moyenne, les gouttes qui franchissaient les deux seuils mettaient une heure de plus à franchir leur seuil de scattering qu'à franchir leur seuil de pH. Pour prendre en compte cela, on fait cesser l'analyse une heure plus tôt pour la pyranine que pour le scattering (c'est-à-dire à 37 heures d'incubation pour la pyranine et 38 heures pour le scattering).

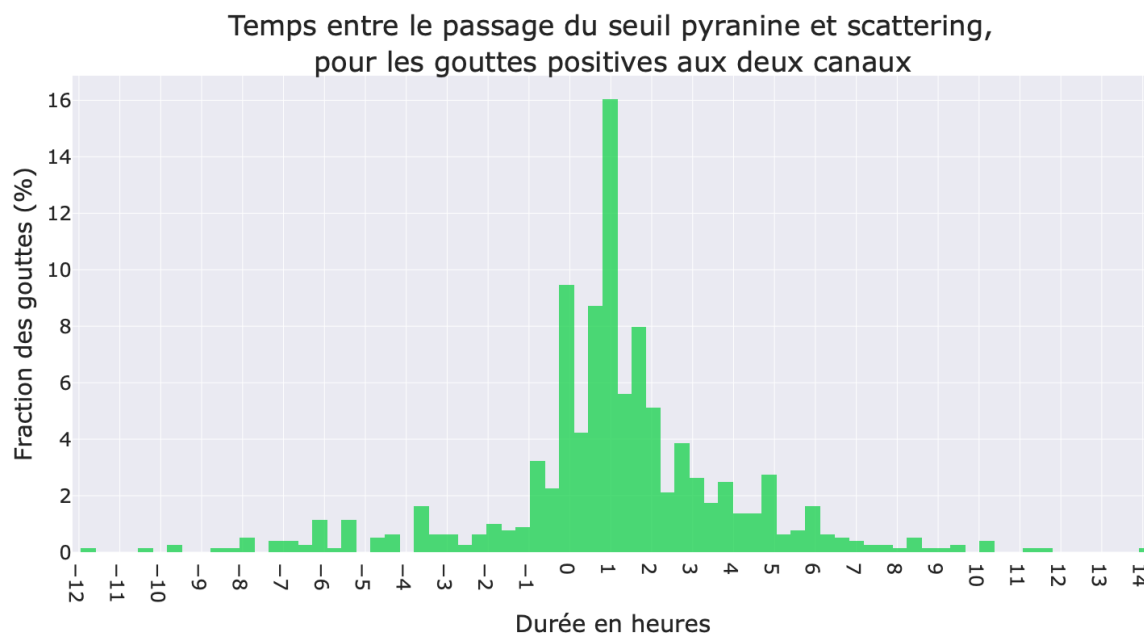


Figure 6-25 : répartition des écarts de temps de passage entre le seuil de scattering et le seuil de fluorescence de la pyranine, avec des seuils de fluorescence correspondant à pH 5,8. Moyenne : 1,0 heure. L'analyse prend fin à 38 heures d'incubation pour les deux canaux.

Pour chaque trio sol/expérience/dilution, on trace la concentration la plus probable en microbes acidificateurs en fonction de la concentration en microorganismes faisant chuter le scattering, avant et après les avoir ramenées à la concentration en microorganismes cultivables. On calcule les concentrations **individuellement, comme s'il s'agissait d'expériences indépendantes**, et sans prendre en compte leur niveau de dilution. Les résultats sont présentés sur la Figure 6-26 et la Figure 6-27.

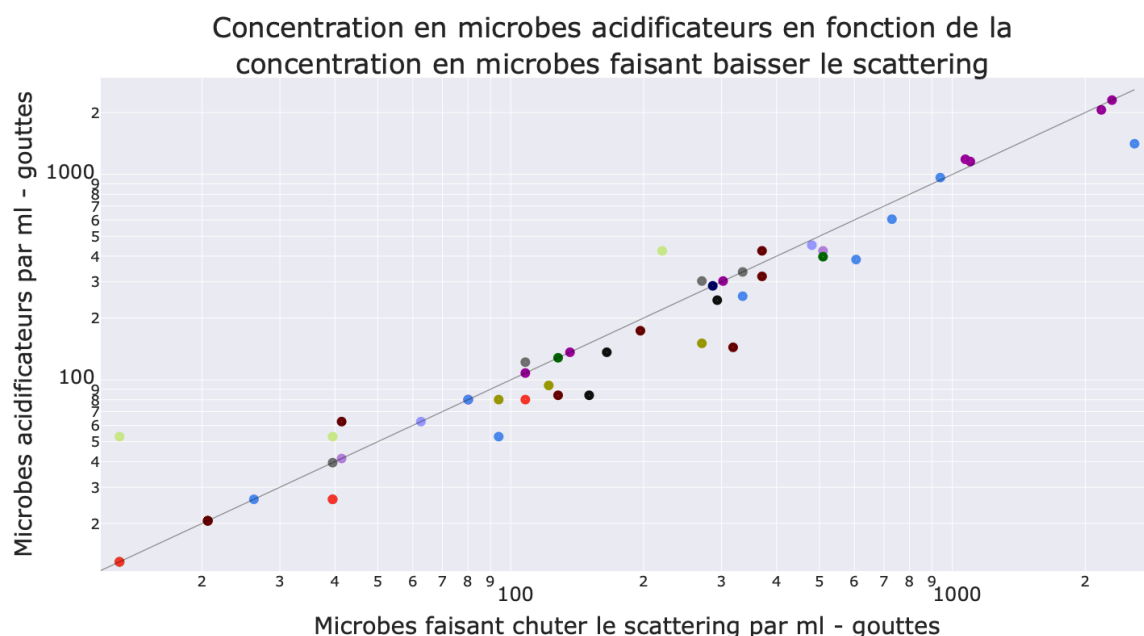


Figure 6-26 : Concentration en microorganismes faisant franchir le seuil de fluorescence de la pyranine en fonction de la concentration en microorganismes faisant franchir le seuil de scattering. Chaque dilution est représentée séparément. La ligne noire représente l'égalité. Seuil pyranine correspondant à pH 5,8. Chaque couleur correspond à un sol.

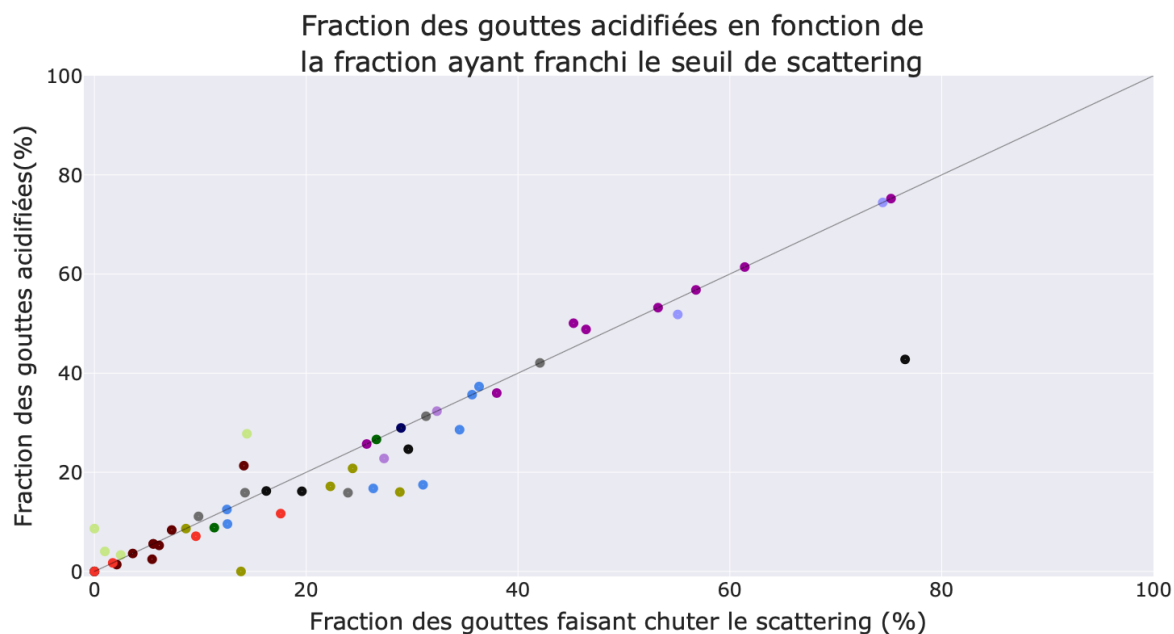


Figure 6-27 : Fraction des gouttes positives à la résazurine ayant franchi le seuil de fluorescence de la pyranine en fonction de la fraction de gouttes ayant franchi le seuil de scattering. La ligne noire représente l'égalité. Seuil pyranine correspondant à pH 5,8. Chaque couleur correspond à un sol.

En plus de ces résultats, on trouve que sur toutes les expériences confondues, avant 38 heures d'incubation pour le scattering et 37h pour la pyranine :

- 85,7% des gouttes positives au scattering le sont également à la pyranine
- 91,0% des gouttes positives à la pyranine le sont également au scattering

6.5.2.3 Interprétation des résultats

On constate que **les points se répartissent autour de la droite $y=x$** . Dans presque la moitié des cas, on a même une égalité parfaite entre ces deux grandeurs.

On peut cependant se demander pourquoi 9,0% des gouttes qui passent notre seuil de pH n'ont pas leur niveau de scattering qui diminue. Une analyse minutieuse révèle que dans la quasi-totalité des cas, il s'agit de gouttes limites :

- Dont le signal de pyranine s'est arrêté juste après le seuil de pH 5,8 (donc peu acidifiées, relativement aux gouttes acidifiées)
- Qui ont été acidifiées et ont franchi le seuil de pH 5,8 avant de voir leur pH remonter. Cas rare mais pas inexistant, cela pourrait être dû à un métabolisme original
- Dans lesquelles la croissance microbienne a commencé juste avant la fin de l'incubation (par exemple si la goutte franchi le seuil de fluorescence à 36 heures et 30 minutes d'incubation et le seuil de scattering deux heures plus tard, donc trop tard pour être comptabilisée)
- Ou dont le signal de scattering a augmenté avant de descendre, mais sans franchir le seuil, ce qui doit être le signe d'une forte création de biomasse, ou de propriétés optiques exotiques.

On retiendra donc que **toute goutte dont le pH passe sous 5,8 et y reste va voir ses particules d'hydroxyapatite se dissoudre**, à des artefacts expérimentaux près.

Pour ce qui est des **14,3% des gouttes qui n'ont pas vu leur pH passer sous 5,8 parmi les gouttes positives au scattering**, on peut identifier à la fois des cas limites, « symétriques » à ceux évoqués plus haut et des cas qui suggèrent qu'un autre mécanisme de solubilisation est à l'œuvre :

- Nous avons introduit une différence d'une heure entre les dates de fin d'incubation comme précisé plus haut. Dans certains cas, le seuil de scattering est passé peu de temps après le seuil de fluorescence, voire en même temps. Si ce passage a lieu entre 37 et 38 heures, la goutte peut ne pas être comptée comme positive à la pyranine, alors qu'elle le sera au scattering. En enlevant ce décalage d'une heure, **on descend à 13,7%** des gouttes positives uniquement au scattering, parmi celles positives au scattering. Ce phénomène n'explique donc que moins d'un pourcent des cas.
- Dans certaines gouttes, le signal de scattering fait de grandes « dents de scie » ; signe d'une grosse différence entre les passages (« runs ») dans un sens et dans l'autre. Ces dents de scie suffisent souvent à faire passer la goutte sous le seuil de scattering. D'après les photos que nous avons pu prendre de quelques-unes d'entre elles, il semble que cela soit lié à la formation d'un gros agrégat. Or, si généralement ces gouttes passent sous le seuil de fluorescence de la pyranine (ce qui s'explique certainement par le fait que le polyacrylate perd progressivement son effet en dessous de pH 5,8, ce qui doit faire s'agréger nos particules minérales) il arrive qu'elles soient peu acidifiées. Dans de tels cas, on peut penser qu'un agrégat s'est formé pour une autre raison : microorganismes filamenteux, sécrétion d'une substance agrégeante par les microorganismes, hydrolyse du polyacrylate... sans savoir si les particules ont été dissoutes ou non. Voir Figure 6-28 et Figure 6-29 pour une illustration.

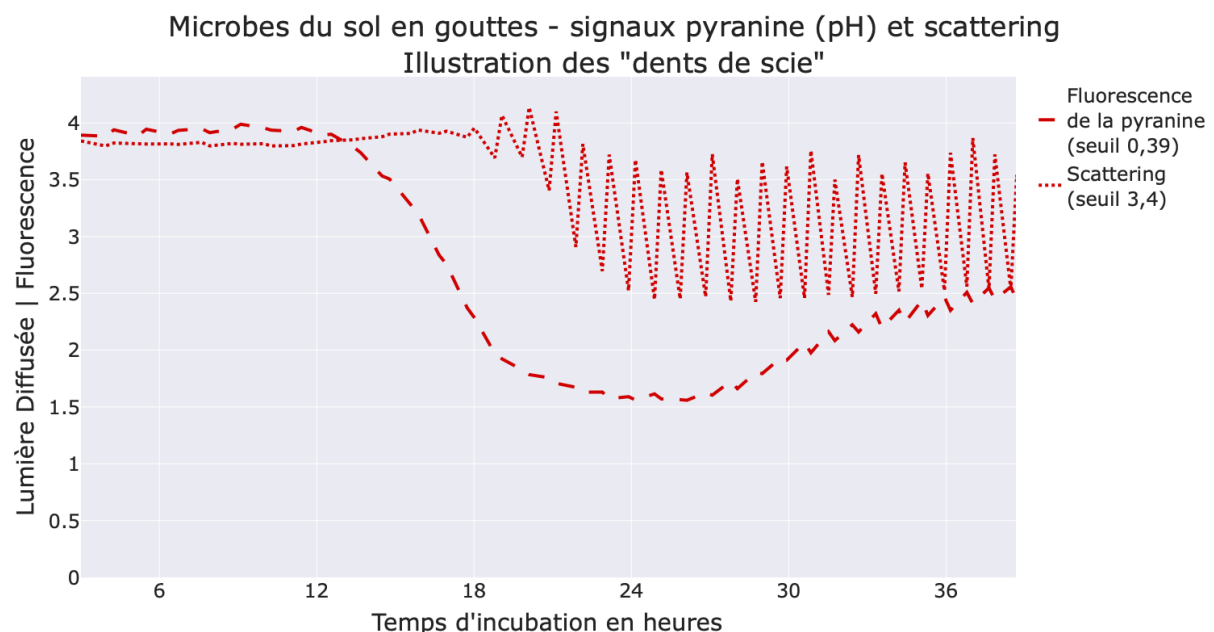


Figure 6-28 : Signaux scattering et pyranine d'une même goutte. Le signal du scattering est brut (on ne lui a pas soustrait sa valeur initiale). Le seuil de fluorescence de la pyranine équivaut à pH 5,8 est de 0,39 pour cette expérience. Pour le scattering, le seuil est à -0,4 par rapport à la valeur initiale, soit environ 3,4.

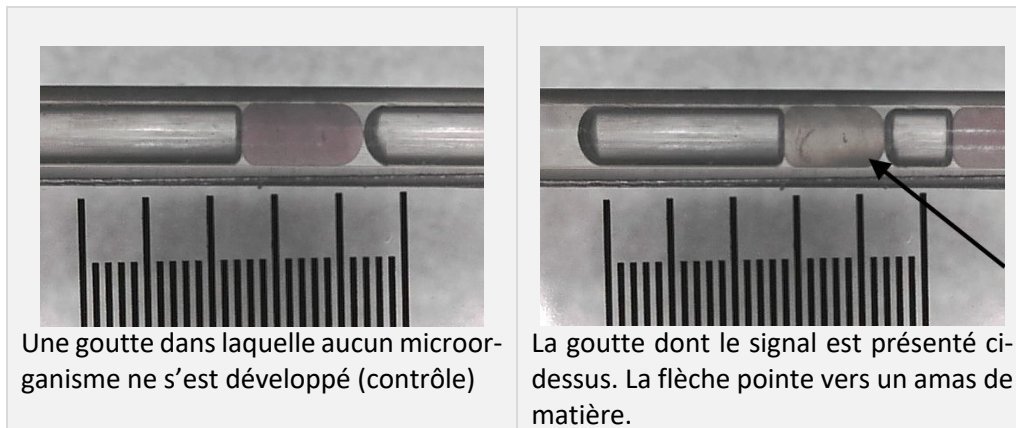


Figure 6-29 : photo d'une goutte contrôle et de la goutte dont le signal est présenté ci-dessus, à 39 heures d'incubation. On a l'impression que les particules ont été concentrées en bas de la goutte. Cela a effectivement éclairci la goutte, mais on peut se demander si des particules ont effectivement été dissoutes.

- Dans certains cas enfin, le signal de scattering a effectivement diminué sans que le pH de la goutte ne chute sous 5,8 et alors que les dents de scie gardent des proportions modestes. Il n'est pas toujours facile de séparer ces cas des cas précédents et on observe plutôt un gradient qui va de grandes dents de scie/niveau moyen du scattering en légère baisse à de plus petites dents de scie/niveau moyen du scattering en baisse nette. Il est possible que de tels cas correspondent à un fort effet chélation couplé à un faible effet acidification. Si tel est le cas, ces gouttes représentent un intérêt agricole particulier : les sols étant des milieux tamponnés et pauvres en nutriments, libérer du phosphate en ne jouant que sur le pH doit être moins efficace que de sécréter des chélatants des contre-ions du phosphate. Voir Figure 6-30 et Figure 6-31 pour un cas extrême, où aucune dent de scie n'était visible. Notez qu'il s'agit des mêmes gouttes sur les deux figures, et que le signal de scattering commence à diminuer avec celui de la pyranine, signe que le pH n'a pas été nécessaire pour faire baisser le scattering.

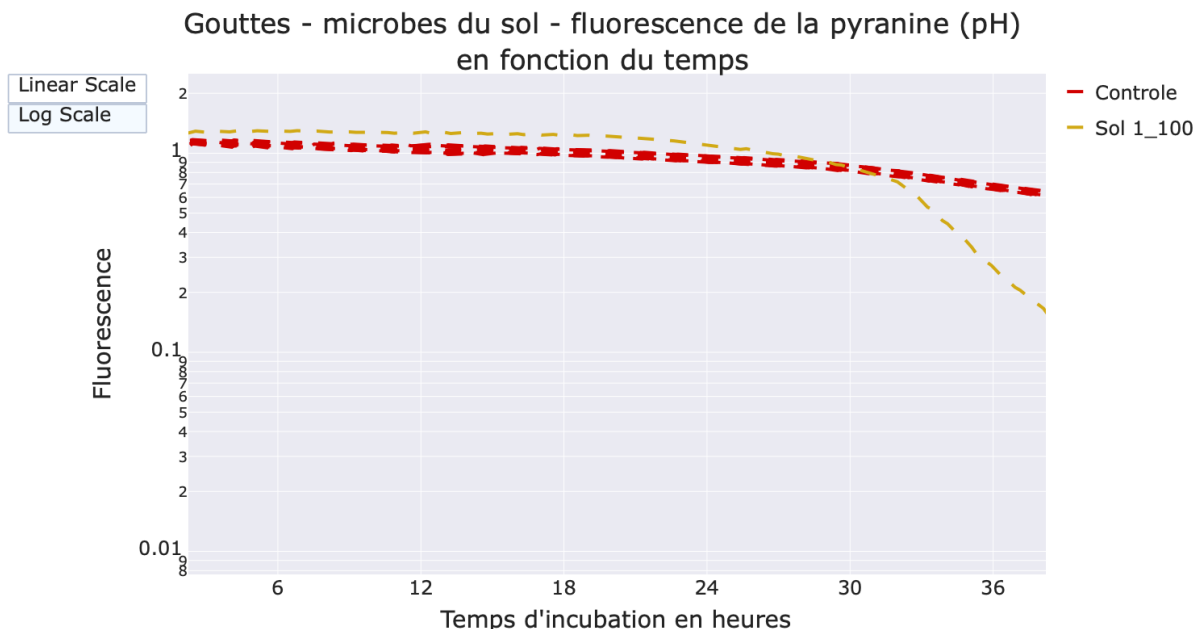


Figure 6-30 : signal de pyranine en fonction du temps d'une goutte qui montre des signes de solubilisation sans chute du pH en dessous de 5,8. Le seuil de fluorescence correspondant à 5,6 est 0,1 sur ce lot de milieu.

Gouttes - microbes du sol - signal "net" de scattering en fonction du temps

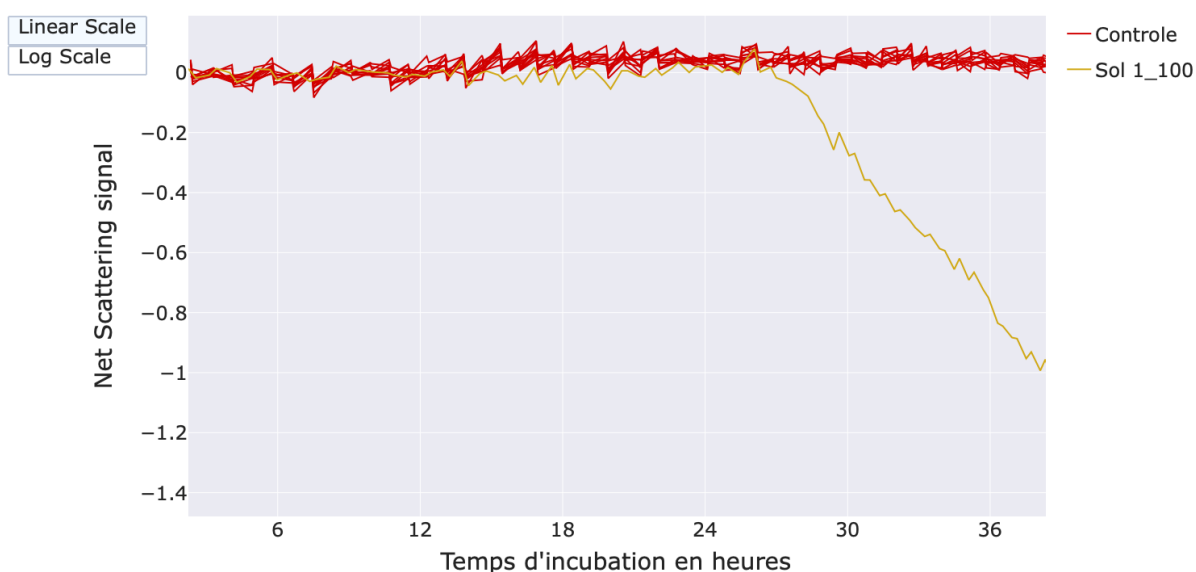


Figure 6-31 : signal de scattering « net » en fonction du temps d'une goutte qui montre des signes de solubilisation sans chute du pH en dessous de 5,8. Le seuil de scattering correspondant est de -0,2 sur ce lot de milieu. Notez que le scattering a commencé à baisser avant la fluorescence de la pyranine, ce qui prouve que la baisse n'est pas due qu'au pH.

Plus tôt, nous nous demandions si à l'échelle d'une population de microbes, la solubilisation des particules de phosphate était causée par l'acidification ou par la chélation. Nos résultats apportent des éléments de réponse à cette question : la capacité à faire diminuer le signal de scattering est fortement corrélée à la capacité à acidifier notre milieu de culture, bien que certains cas (au maximum 13,7% des gouttes qui franchissent le seuil de scattering net, probablement plutôt de l'ordre de 5% des gouttes) puissent être expliqués par un effet de chélation qui dominerait sur l'effet acidification.

Avec les méthodes de culture traditionnelles, cette information serait quasiment impossible à obtenir :

- Sur boîtes de Petri, on peut accéder à la diversité du sol, mais la mesure du pH est peu précise
- En milieu liquide, on peut prélever du milieu pour mener des tests chimiques, mais il serait trop laborieux d'étudier des centaines de souches comme nous l'avons fait

Notre protocole apporte donc un éclairage nouveau sur le mécanisme de solubilisation du phosphate par les microorganismes du sol.

6.6 Les concentrations trouvées sont-elles comparables avec les concentrations en solubilisateurs d'après la méthode sur boîte de Petri ?

Demandons-nous maintenant si les résultats que l'on obtient correspondent à ceux obtenus sur boîtes de Petri, la méthode de référence dans la littérature. Pour cela, pour chaque expérience en goutte, nous avons en parallèle réalisé des boîtes de Petri et compté le nombre de halos qui apparaissaient (il s'agit en réalité des mêmes boîtes qu'au chapitre précédent). Certains auteurs proposent des approches quantitatives, dans lesquelles la taille des halos est mesurée, éventuellement ramenée à la taille des colonies. Nous avons choisi de simplement noter si un halo était visible ou non, pour des raisons de simplicité et parce que la taille des halos nous a semblé fortement dépendante de la concentration en colonies sur les boîtes : lorsque les colonies sont serrées entre elles, les éventuels halos

qu'elles forment sont plus petits et plus rares que lorsque les colonies sont éloignées les unes des autres. Voir Figure 6-32.

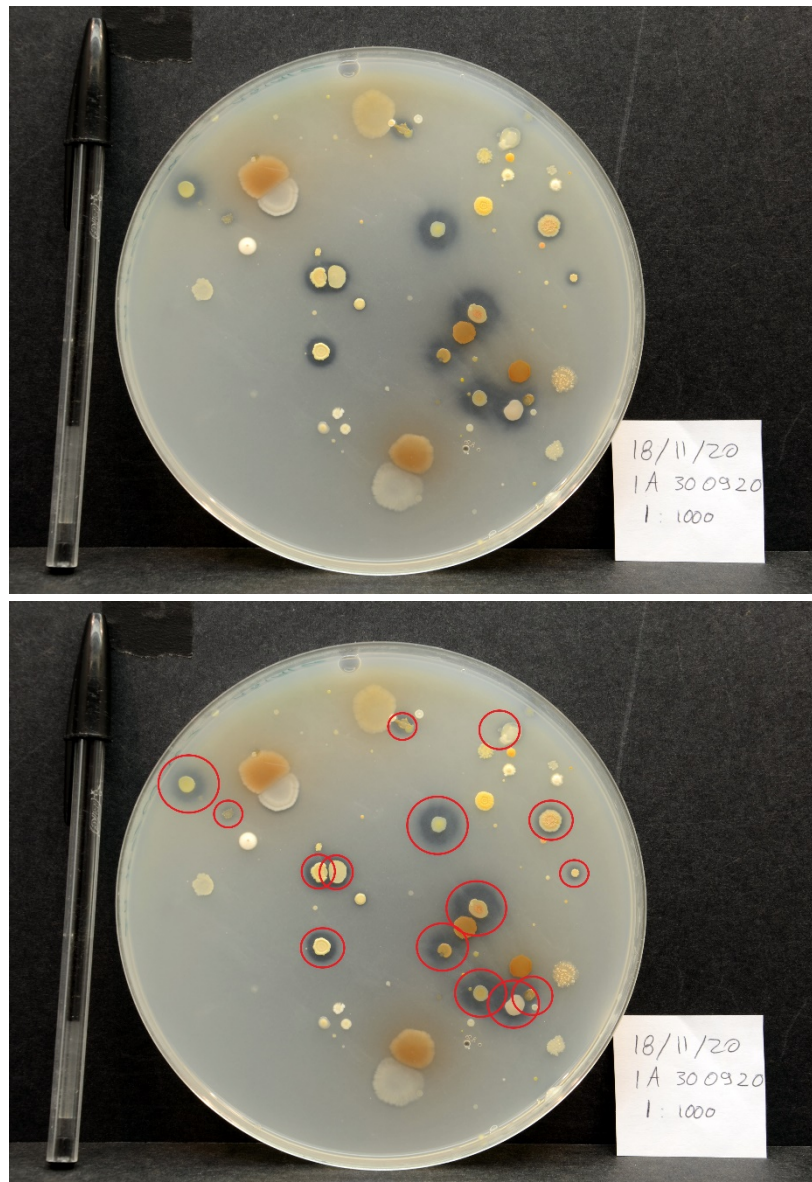


Figure 6-32 : une boîte de milieu Pikovskayaensemencée avec le sol IA 300920, après 15 jours d'incubation à 28°C. Les colonies que nous considérons comme formant des halos sont entourées en rouge. La boîte mesure 14cm de diamètre.

6.6.1 Choix d'une durée d'incubation sur boîte de Petri

Les halos mettent un certain temps à apparaître sur boîte. Nous avons mesuré à différentes dates le nombre de halos visibles sur une boîte. L'apparition des halos semble se stabiliser au bout de 11 jours (voir Figure 6-33 et Figure 6-34 et pour une illustration sur deux de nos sols).

Halos par boîte en fonction du temps pour différentes expériences

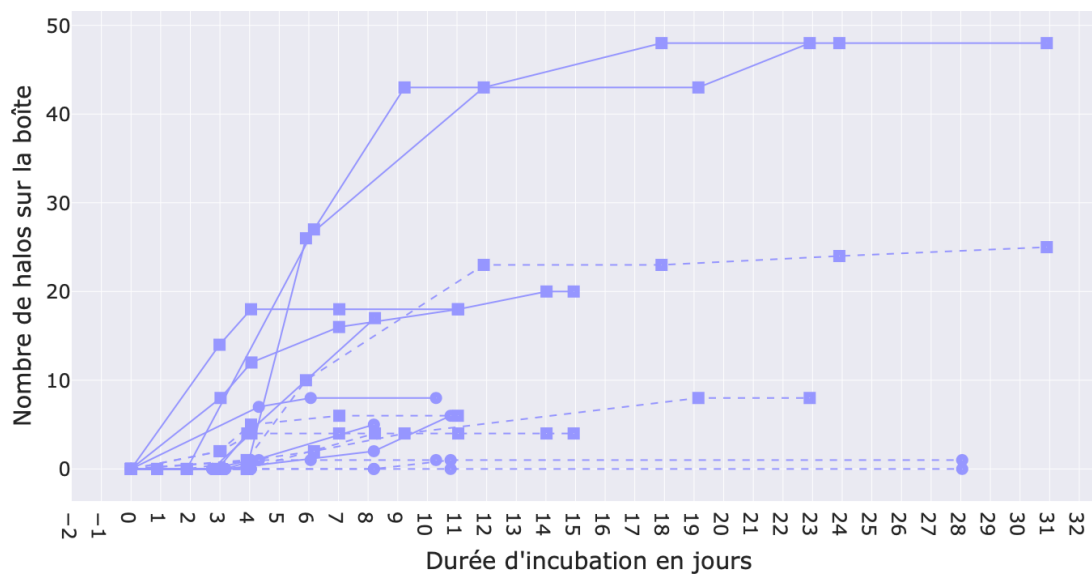


Figure 6-33: Nombre de halos par boîte en fonction du temps pour différentes expériences sur le même sol (PS 251119), à deux niveaux de dilution (ligne pleine : 100^{ème} pointillés : 1000^{ème}). Chaque ligne représente une boîte de Petri.

Halos par boîte en fonction du temps pour différentes expériences

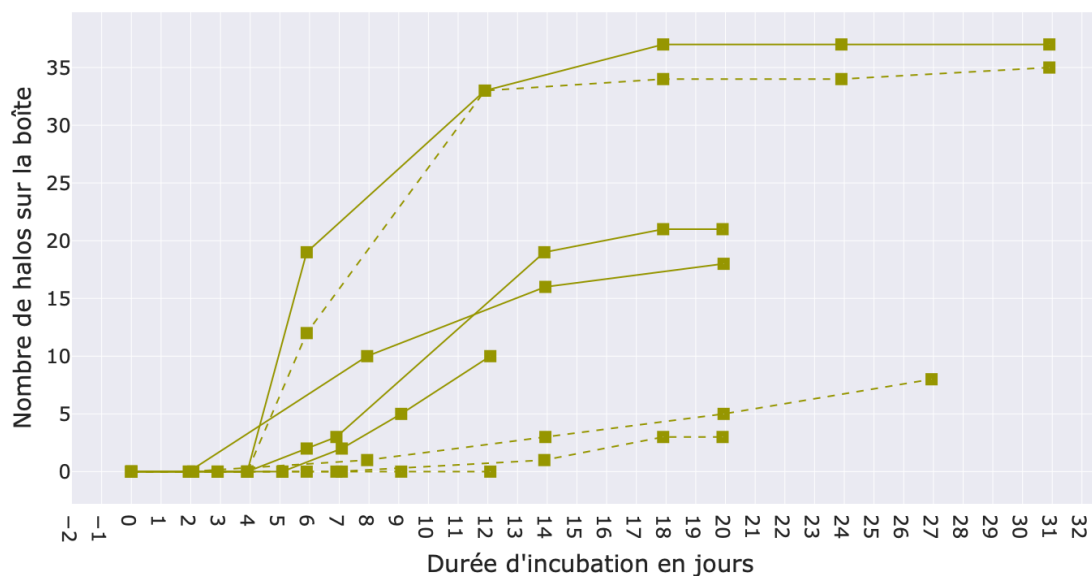


Figure 6-34 : Nombre de halos par boîte en fonction du temps pour différentes expériences sur le même sol (TS 020120) à deux niveaux de dilution (ligne pleine : 100^{ème} pointillés : 1000^{ème}). Chaque ligne représente une boîte de Petri.

Nous décidons donc d'exclure les boîtes pour lesquelles nous avons arrêté les mesures avant 11 jours d'incubation. Ce manque de données après 11 jours peut être dû par exemple à l'apparition de colonies envahissantes (Figure 6-35) ou à des accidents de manipulation. Pour la suite de l'analyse, nous

avons décidé de garder la première mesure réalisée après 11 jours. (Par exemple, si des relevés ont été réalisés à 10 jours, à 13 jours et à 25 jours d'incubation, on garde celui à 13 jours).

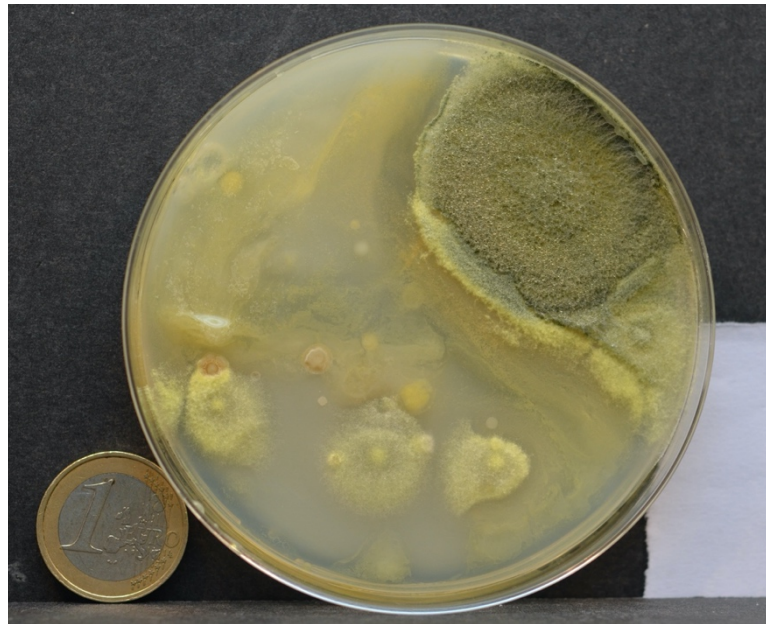


Figure 6-35 : Une boîte de Petri (milieu Pikovskaya) ensemencée avec une suspension de sol, après 10 jours d'incubation. De telles boîtes doivent être retirées de l'analyse

Maintenant que nous avons une durée d'incubation cible, nous allons pouvoir comparer les données recueillies sur boîtes de Petri et en gouttes.

6.6.2 La corrélation halos/chutes du signal de scattering est beaucoup moins bonne que pour la biomasse.

Comme présenté précédemment, pour chaque expérience, nous réalisons deux dilutions d'une suspension initiale de microorganismes du sol (1:100 et 1:1000). En gouttes, on calcule la concentration la plus probable d'après la même méthode que précédemment, en séparant chaque dilution comme s'il s'agissait d'une expérience indépendante. On trace ensuite pour chaque dilution d'une même expérience la concentration en microorganismes faisant chuter le signal de scattering en fonction de la concentration en microorganismes ayant généré un halo sur boîte de Petri. Les suspensions utilisées pour ensemencer les gouttes et les boîtes sont exactement les mêmes, ce qui exclut une variabilité due au manipulateur (par exemple une imprécision dans la dilution). On réalise une régression linéaire sur le logarithme base 10 des concentrations trouvées. Les résultats sont présentés sur la Figure 6-36. Les barres d'erreurs verticales représentent l'intervalle de confiance à 95% calculé à partir du modèle de Jarvis, Wilrich et Wilrich¹⁸² – voir annexe pour plus de détails. Les barres horizontales sont calculées à partir de la formule donnée en annexe.

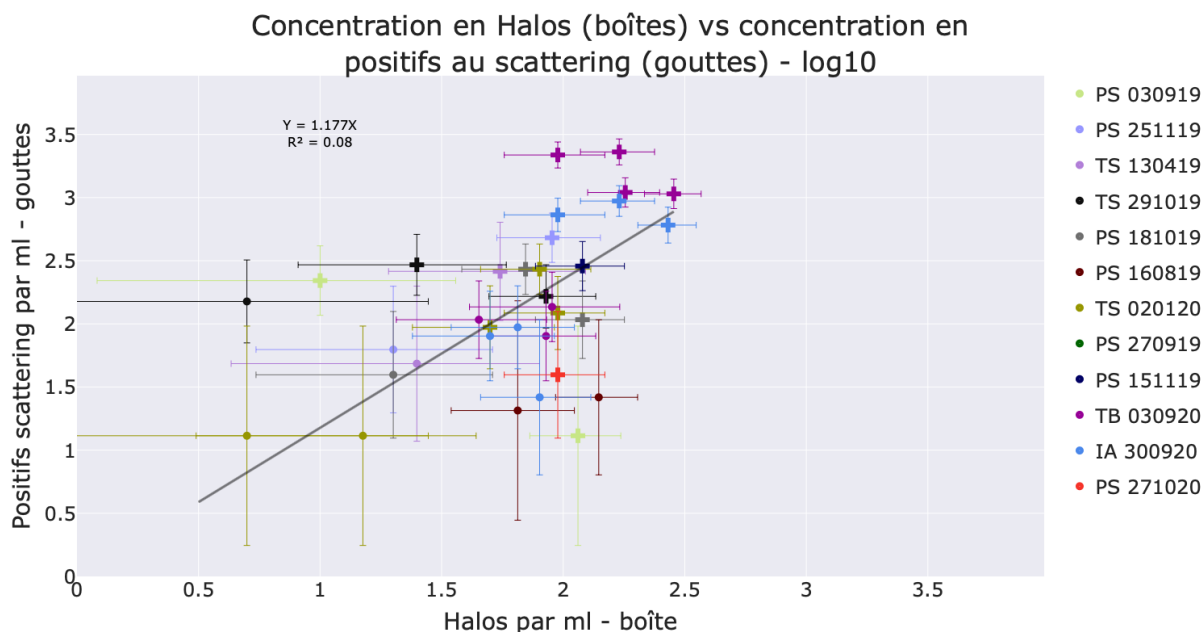


Figure 6-36 : Concentration la plus probable en microbes faisant chuter le scattering en fonction de la concentration en microbes faisant apparaître des halos sur boîte de Petri. La ligne grise représente le résultat de la régression linéaire. Chaque point représente une dilution donnée, d'un sol donné dans une expérience donnée. Chaque couleur représente un sol. Les croix représentent la dilution au 100^{ème}, les points celle au 1000^{ème}

On constate que la corrélation est nettement moins bonne avec ces données que lorsque l'on compare les nombre de cellules cultivables en gouttes et sur boîtes (chapitre précédent).

Pour enlever la part de variabilité due au nombre de cellules cultivables, on peut diviser les quantités de microorganismes qui forment un halo ou qui font chuter le signal de scattering par le nombre de microorganismes qui poussent. Voir Figure 6-37.

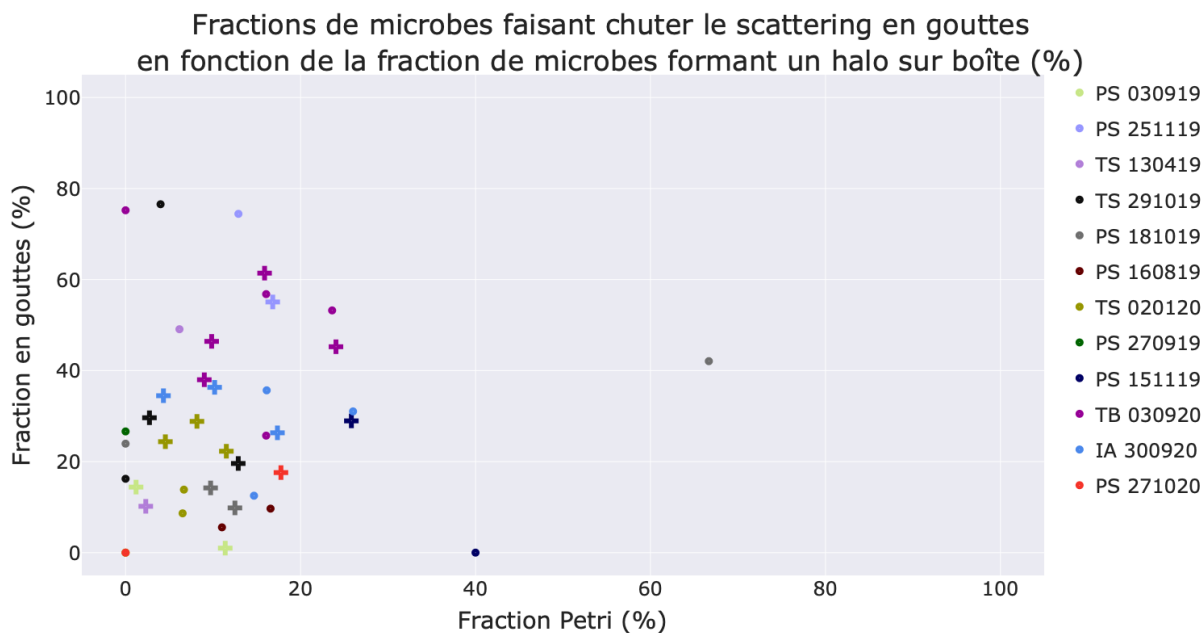


Figure 6-37 : Fraction de microbes franchissant le seuil de scattering avant 38 heures, en fonction de la fraction des colonies présentant un halo sur boîte de Petri, pour différentes expériences. Chaque point représente une dilution donnée, d'un sol donné dans une expérience donnée. Chaque couleur représente un sol. Les croix représentent la dilution au 100^{ème}, les points au 1000^{ème}

On note que dans presque tous les cas, on trouve plus de microbes faisant chuter le signal de scattering que de microbes formant des halos sur boîte de Petri. Cependant, on constate aussi que les fractions semblent très peu corrélées. Cela se confirme lorsque l'on essaye de mener une régression linéaire sur ces données.

Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cela :

- Il est probable que notre dispositif en gouttes est **plus sensible** que la méthode sur milieu solide. En gouttes, les molécules à l'origine de la solubilisation, qu'il s'agisse de protons ou de chélatants sont confinées dans un petit volume. Cela leur permet probablement d'atteindre des concentrations plus élevées que dans la gélose, donc a priori de dissoudre plus fortement les particules. Au demeurant, notre mesure en gouttes est sensible à des variations de lumière diffusée plus faible que ce que l'œil peut percevoir. On pourrait donc ne pas voir sur boîte des halos là où la machine détecterait une variation du signal de scattering. Cependant, nous avons essayé de faire varier le seuil de scattering pour ne garder que les gouttes fortement éclaircies. Cela n'améliore pas la corrélation avec les halos sur boîte.
- On sait que les microorganismes ont des comportements différents lorsqu'ils sont dans un état planctonique ou dans un biofilm. A priori, les microorganismes sont dans le premier état en gouttes, et dans le second sur boîte. Or, il est possible que le comportement « solubilisateur » ne soit activé que dans l'un des deux cas de figure.
- Sur boîtes, lorsque de nombreuses colonies poussent proches les unes des autres, il peut devenir difficile de les distinguer, et il semble qu'au-delà d'un certain seuil, les microorganismes ne génèrent plus du tout de halos, ou que l'intensité des halos diminue au point de rendre hasardeux leur comptage. Peut-être parce que les nutriments sont partagés entre colonies proches. A l'inverse, en gouttes, les microorganismes n'ont accès qu'aux nutriments présents dans leurs gouttes lors de la génération ; chaque goutte est un réservoir isolé chimiquement de ses voisines. Sur la Figure 6-38 et la Figure 6-39 ci-dessous par exemple, une suspension de sol a été étalée sur quatre boîtes de Petri, à deux dilutions différentes (1 :100 et 1 :1000). On constate que diluée à 1 :1000, la quasi-totalité des colonies forment un (petit) halo. A l'inverse, diluée au 1 :100, presque aucune colonie ne forment de halo. Pourtant, les colonies concernées ont le même phénotype et semblent appartenir à la même espèce. Au demeurant, le milieu de culture est exactement le même, la suspension utilisée pour faire les boîtes est exactement la même, étalée le même jour et incubée dans les mêmes conditions.
- Comme expliqué au point 6.5.2, nous suspectons qu'une agrégation des particules a lieu dans certaines gouttes. Cette agrégation peut amener à compter comme solubilisateurs des microorganismes qui ne le sont pas.
- Les effets de communauté : lorsque l'on cultive plusieurs souches différentes dans la même goutte, il n'est pas sûr que la communauté résultante hérite des propriétés de chaque souche. Ainsi, si l'on mélange une souche solubilisatrice et une souche non-solubilisatrice, il est possible que le mélange des deux ne solubilise pas le phosphate. Nous avons montré qu'un mélange de P agglomerans et de E coli faisait baisser le signal de scattering moins vite que des P agglomerans seules. Cependant, cet effet devrait disparaître aux fortes dilutions : lorsque nos échantillons sont très dilués, les gouttes ne contiennent que très rarement plusieurs souches en début d'incubation (comme expliqué au chapitre précédent). Nous pensons si ce phénomène peut expliquer une partie de la différence entre boîtes et goutte, il a un impact marginal car la corrélation halos/scattering n'est pas meilleure aux faibles concentrations de microorganismes.



Figure 6-38 : Boîtes de Petri (milieu Pikovskaya)ensemencées avec une suspension du sol PS 270919, diluée 100 fois. Après 12 jours d'incubation. On ne distingue presque aucun halo

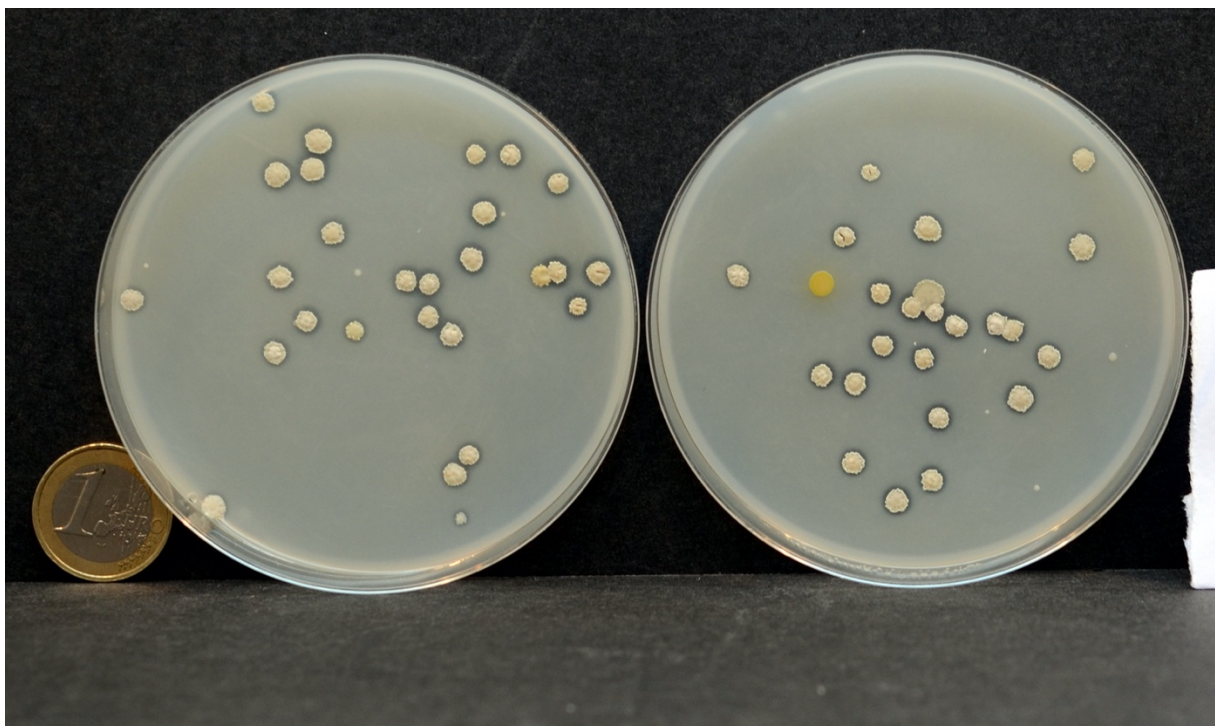


Figure 6-39 : Boîtes de Petri (milieu Pikovskaya)ensemencées avec la même suspension du sol PS 270919, diluée 1000 fois. Après 12 jours d'incubation. La majorité des colonies forment un petit halo.

6.7 Conclusion sur le phosphate

Finalement, nous avons réussi à adapter en gouttes millifluidique un test de mesure de la solubilisation du phosphate inventé dans les années 1940. Le travail en gouttes nous a permis de facilement ajouter une mesure du pH par fluorescence. Grâce à elle, nous avons révélé que la chute du pH sous 5,8 et la dissolution du phosphate corrélaient fortement : la quasi-totalité des gouttes dont le pH passe sous

5,8 ont vu leur signal de scattering baisser (hors artefacts dus à la méthode de mesure) et 86,3% des gouttes dont le signal de scattering a baissé ont vu leur pH passer sous 5,8. Parmi les 13,7% restants :

- La majorité des gouttes forment des agrégats sans que l'on puisse affirmer ou infirmer que les particules ont été dissoutes
- Une minorité ont franchi le seuil sans montrer de signe d'agrégation, ou en montrant des signes suffisamment faibles pour que l'on puisse penser qu'une partie des particules ont bien été dissoutes. Il est possible que l'on trouve dans ces gouttes des microorganismes sécrétant de grandes quantités de chélatants, ce qui apporte un éclairage sur cette question, à laquelle il est quasiment impossible de répondre avec les méthodes de culture traditionnelles

Si les nombres de solubilisateurs présumés en gouttes ne corrèlent pas avec ceux sur boîtes de Petri, on peut penser que notre protocole millifluidique mesure en partie autre chose que la capacité à solubiliser le phosphate. Cependant, la remarque peut être prise à l'envers : il est possible que le protocole sur boîte de Petri soit une mauvaise façon d'estimer le nombre de solubilisateurs. Cette mesure est souvent remise en cause et des études ont par exemple montré que certaines souches qui ne formaient pas de halo sur boîte de Petri pouvaient quand même faire augmenter la concentration en phosphate dissout en milieu liquide^{193,194}. Il serait intéressant de voir si de telles souches feraient baisser le signal de scattering dans nos gouttes.

Afin d'approfondir nos recherches, plusieurs pistes pourraient être explorées :

- Nous n'avons presque pas utilisé la possibilité de tri de gouttes : faire sortir de la machine des gouttes d'intérêt pour les étudier. A l'avenir, il pourrait être intéressant de le faire pour séquencer et identifier les souches solubilisatrices, pour évaluer lesquelles forment des halos sur boîte ou pour étudier les molécules qu'elles sécrètent.
- La prise d'image n'est pas automatisée sur notre appareil, ce qui a limité son usage. Si tel était le cas, nous pourrions mieux comprendre les formes des courbes de scattering, et peut-être pouvoir discriminer les solubilisateurs des « agrégateurs ».

Finalement, il est à noter que notre protocole remplit plusieurs des conditions qui en feraient un bon protocole d'analyse fonctionnel des microbiotes, d'après l'article de Thiele-Bruhn et al⁴⁷.

Ainsi, il donne des résultats environ 7 fois plus vite que la méthode sur boîtes de Petri (38 heures d'incubation en gouttes contre 11 jours sur boîtes). Par ailleurs, les consommables que nous avons utilisés sont peu onéreux : sucres et sels minéraux pour le milieu ; pyranine, résazurine et polyacrylate (des produits communs) pour les fonctions étudiées. Le fait de travailler en gouttes permet en outre de n'utiliser que de petites quantités de réactifs. Les manipulations ne demandent pas de formation au-delà de compétences de bases en microbiologie et les protocoles d'analyse de données sont facilement automatisables. A part la machine MilliDrop, le matériel que nous utilisons est le matériel classique d'un laboratoire de microbiologie. La majorité des manipulations et une partie du traitement de données ont d'ailleurs été menées par une technicienne de notre laboratoire (Florence Condamine, que l'on remercie). Par ailleurs, le travail au champ se résume à prélever quelques dizaines de grammes de terre.

En se basant sur les critères de prix présentés dans l'article évoqué plus haut, l'acquisition de la machine et l'huile fluorée nécessaire à son fonctionnement placent déjà notre méthode dans une gamme de prix correcte, mais de prochaines générations de machines et un programme de recyclage de l'huile fluorée (que nous menons déjà au laboratoire pour d'autres projets) pourraient considérablement abaisser ces prix.

Une piste d'amélioration qui nous paraît importante consisterait à comprendre mieux et si possible empêcher l'agrégation dans nos gouttes, afin de mieux quantifier la part de la dissolution due au simple pH et la part due à la chélation. Il serait essentiel pour cela de savoir de quoi ils sont composés : particules, microbes ou sécrétions microbiennes ? Pour cela, nous pourrions sortir de la machine quelques gouttes représentatives à chaque expérience et les analyser par exemple au microscope après marquage. En améliorant la qualité de la prise d'image et en l'automatisant, on pourrait également mieux voir à quoi ressemblent nos agrégats et donc peut-être mieux caractériser leur formation. Si on constate qu'il s'agit de biofilms, différentes options pourraient être envisagées pour limiter leur formation, notamment limiter le stress sur les bactéries, par exemple en trouvant un dispersant plus biocompatible que le polyacrylate, ou en menant un travail de transcriptomique pour comprendre quel facteur déclenche la formation du biofilm. Si les agrégats sont composés de particules, il pourrait être pertinent de remplacer l'hydroxyapatite par un minéral qui se dissout à des pH plus élevés (dans l'idéal, la totalité du minéral serait dissoute à un pH égal au pKa du polyacrylate), par exemple du calcium phosphate dibasique.

Enfin, une perspective intéressante consisterait à analyser les gouttes en spectrométrie de masse, afin d'identifier les substances sécrétées par les microorganismes en fonction de leur profil scattering et pH.

7 Conclusion générale

Les microbiotes des sols sont complexes et variés. On estime qu'un gramme de sol contient typiquement plusieurs milliards de cellules de microorganismes visibles au microscope, qui peuvent appartenir à entre 500 et 10 000 espèces différentes. Or, ces organismes ont des rôles majeurs sur la chimie du sol et la biologie des plantes. Malheureusement, malgré les progrès technologiques considérables dans l'identification et l'analyse génétique des microbiotes, il demeure difficile de mener une analyse fonctionnelle sur les microbiotes agricoles, c'est-à-dire de déterminer en quoi le patrimoine microbien d'un sol donné est meilleur ou moins bon qu'un autre pour accomplir une fonction agronomique d'intérêt.

Parmi ces fonctions, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à la solubilisation du phosphate. Ce nutriment est essentiel à la vie et doit être assimilé en quantités suffisantes par les plantes pour permettre leur développement. Certains microorganismes sécrètent des molécules qui aident les plantes à acquérir du phosphate du sol. Pour détecter cela, les méthodes moléculaires (métagénomique et transcriptomique) apportent des résultats difficiles à interpréter, alors que les méthodes traditionnelles (culture sur boîtes de Petri) demandent trop de main d'œuvre. Une méthode rapide, fiable et bon marché était donc nécessaire pour être capable d'évaluer le potentiel d'un microbe à solubiliser le phosphate.

Nous avons choisi de nous occuper de ce problème en exploitant une technologie qui n'avait pas été employée jusqu'ici en agriculture : la millifluidique de gouttes. La millifluidique de gouttes consiste à manipuler des gouttes de quelques centaines de nanolitres, généralement séparées les unes des autres par une phase continue huileuse. En l'occurrence, nous avons mené nos travaux sur un automate de culture microbiologique en gouttes conçu par MilliDrop, une startup de notre laboratoire. Cette machine est déjà commercialisée.

Nous avons mis au point un milieu de culture adapté d'une recette fréquemment utilisée pour étudier la solubilisation du phosphate par les microorganismes du sol : le milieu Pikovskaya. Il contient des particules phosphate de calcium et nous avons dû mener un travail de formulation physico-chimique important pour réussir à transférer ces particules en gouttes et à les y maintenir dispersées. Une fois ce travail mené avec succès, nous sommes devenus capables de repérer la dissolution de ces particules, grâce à notre module de néphélométrie en gouttes. Nous avons alors ajouté au milieu deux sondes fluorescentes qui nous ont permis à la fois de suivre le pH de nos gouttes et d'y suivre l'activité respiratoire. Ce protocole expérimental prêt, nous l'avons appliqué à une douzaine de sols agricoles.

Grâce à la fluorescence de la résazurine, notre sonde d'activité respiratoire, nous avons estimé la concentration en cellules cultivables dans nos échantillons. Cette grandeur a un intérêt en agriculture en ce que des variations de la biomasse cultivable peuvent être des signes avant-coureurs de variations importantes pour l'agriculture. Nous avons montré que l'on obtenait en tendance le même nombre de microorganismes cultivables avec notre méthode en gouttes qu'avec la méthode classique de dénombrement de colonies sur boîtes de Petri. De plus, on obtient des résultats environ sept fois plus vite en gouttes que sur boîtes. En nous basant sur une analyse fine du signal de fluorescence de la résazurine dans nos gouttes, nous avons également montré qu'il était possible d'exploiter des informations cinétiques sur nos gouttes, et pas seulement une mesure en « endpoint ».

En exploitant un bloc optique spécialement conçu pour notre projet, nous avons pu mener des mesures de néphélométrie (scattering) en gouttes et évaluer la capacité de nos microorganismes à faire baisser ce signal, ce que nous interprétons au moins partiellement comme la dissolution des particules, donc la capacité des microorganismes à rendre le phosphate disponible pour la nutrition des plantes. En appliquant un traitement statistique simple, nous avons pu estimer le nombre de microorganismes solubilisateurs dans nos échantillons. Grâce à la pyranine (notre sonde pH), nous avons pu montrer

que dans environ 90% des cas, la baisse du signal de scattering était associée à une chute du pH sous 5,8 (qui correspond au pH théorique en-dessous duquel les particules doivent se dissoudre par seul effet de l'acidité). Il est possible que parmi les 10% des gouttes restantes, on trouve des microorganismes qui sécrètent de grandes quantités de chélatants, et qui présenteraient a priori un intérêt agricole particulier. Nos résultats semblent peu corrélés avec le test équivalent sur boîtes de Petri, mais on trouve presque systématiquement plus de microbes solubilisateurs en gouttes. Si différentes hypothèses pourraient être testées pour éclaircir ce phénomène à l'avenir, ces résultats remettent en question le test traditionnel sur boîtes de Petri.

Là aussi, nous avons obtenus ces résultats 7 fois plus vite que sur boîtes de Petri, avec des réactifs peu coûteux. Notre protocole est particulièrement simple : toutes nos expériences ont pu être réalisées par une technicienne sans formation spécialisée, le traitement de données est automatisable et une demi-heure de travail suffit à analyser quatre sols (voire plus avec de prochaines versions de la machine). C'est d'ailleurs la simplicité de notre méthode qui nous a permis d'analyser une douzaine de sols, plusieurs fois de suite en l'espace de quelques mois. Cela fait de notre protocole un bon candidat pour devenir un test fonctionnel utilisé à grande échelle.

Ces résultats montrent qu'il est encore possible d'obtenir des résultats intéressants en se basant sur la culture et l'étude des phénotypes des microorganismes du sol. Plusieurs pistes nous semblent ouvertes à partir de là.

Perspectives :

Nous avons réussi à caractériser une fonctionnalité du microbiote des sols : la solubilisation du phosphate inorganique. Une première piste serait d'explorer d'autres fonctions, comme la capacité des microorganismes à fixer le diazote de l'air, qui nécessiterait probablement de travailler en conditions micro-aérobies ou la capacité des microbiotes à protéger contre les pathologies de plantes (par exemple en menant des expériences de compétition en gouttes). Cependant, les fonctions qui devraient selon nous être explorées en premières sont toutes celles qui consistent à rendre soluble un solide, car il nous semble facile de reprendre une partie du protocole que nous avons développé pour le phosphate. Il nous semble en effet que la méthode de détection de particules que nous avons inventée pourrait être adaptée à de nombreuses autres caractéristiques phénotypiques : à partir du moment où il est possible de formuler une suspension colloïdale d'une substance d'intérêt, il devrait être possible de générer des gouttes qui en contiennent, de les inoculer avec des microorganismes du sol et de détecter son éventuelle disparition. Cela pourrait servir à la fois dans des démarches de diagnostic comme la nôtre et dans des démarches de recherche de souches microbiennes d'intérêt, que l'on peut isoler puis cultiver pour les utiliser dans des procédés industriels ou agricoles (criblage, ou screening). Quelques exemples de la littérature ont retenu notre attention :

- Les autres particules phosphatées : on sait que dans les sols, le phosphate se lie à d'autres métaux que le calcium. Il serait intéressant d'étudier la capacité de microorganismes à dissoudre une suspension de phosphates d'aluminium ou de fer. Par ailleurs, on pourrait formuler des particules contenant d'autres formes de phosphate comme le phytate, une molécule de stockage du phosphate fréquente dans les sols.
- Les polymères biologiques : nous avons réussi à mettre dans nos gouttes des particules de chitine ou de cellulose et à détecter leur présence au scattering. On sait que certains microorganismes sont capables de les hydrolyser. Nous pensons qu'il serait facile de détecter leur présence avec notre dispositif expérimental, avec un peu de travail de formulation. L'hydrolyse de ces particules présente un intérêt agricole et écologique car elle influe sur la capacité d'un

microbiote à décomposer de la matière organique, donc à recycler des nutriments. Au demeurant, la capacité à hydrolyser la chitine est parfois présentée comme un proxy de la capacité à tuer des champignons, notamment pathogènes (leurs parois étant formées de chitine). En outre, différents procédés industriels nécessitent de bons microorganismes capables d'hydrolyser ces polymères.

- Les polluants d'origine anthropique : de nombreuses substances posent des problèmes de pollution. On pense par exemple aux micro-plastiques ou à des pesticides comme le chlordécone. A partir du moment où ces substances sont suffisamment insolubles, il doit être possible d'en faire une suspension colloïdale. On peut alors en mettre dans nos gouttes avec un inoculum bactérien, et détecter d'éventuels microbes capables de les dégrader. Cela pourrait permettre de mener des criblages sur des populations de microorganismes et d'isoler des souches aux propriétés intéressantes, que l'on pourrait alors utiliser dans des procédés de dépollution, ou de suivre les dynamiques des populations naturellement présentes.

Cependant, pour que ces tests soient intéressants et réalisables à grande échelle, les machines Milli-Drop doivent gagner en robustesse et en praticité. Et c'est là une seconde piste : ajouter certaines fonctionnalités sur les machines millifluidiques. Un module de prise d'image, une meilleure gestion des coalescences et la prise en charge d'un plus grand nombre de gouttes permettraient de rendre les protocoles d'analyse en gouttes plus pratiques et plus robustes, donc plus démocratisables. Une nouvelle gamme de machines est sur le point d'être commercialisée, elle sera disponible à grande échelle. Les équipes de MilliDrop ont pris en compte les remarques que nous avons formulées lors de ce travail de thèse et les ont incluses au cahier des charges de la nouvelle génération.

Enfin, une dernière piste qui nous semblerait très intéressante consisterait à mener nos tests à grande échelle et à les inscrire dans une démarche de recherche agronomique. Ainsi :

- La simplicité d'utilisation de notre protocole permettrait de mener des mesures sur un même champ fréquemment, par exemple toutes les semaines, voire plusieurs fois par semaine. Cela permettrait d'observer l'effet d'opérations agricoles, de conditions météorologiques ou d'autres phénomènes ponctuels sur la biomasse cultivable et sur la quantité de microbes solubilisateurs du phosphate. On pourrait également observer l'évolution de ces populations au court du temps, par exemple selon le stade de développement des plantes
- De même, la simplicité et la rapidité de nos tests permettraient de tester de nombreux échantillons en peu de temps, ce qui permettrait de faire des tests à grande échelle, par exemple sur un pays entier et de dégager des tendances géographiques, comme cela a été fait avec la biomasse microbienne et la biodiversité microbienne dans les travaux liés à Genosol
- Enfin, ces tests pourraient s'inscrire dans une démarche commerciale : les agriculteurs font régulièrement tester les qualités physico-chimiques de leurs sols et prennent des décisions agronomiques en fonction des résultats. Si suffisamment de connaissance agronomique est générée, il deviendra possible d'ajouter une dimension microbiologique à ces tests : les laboratoires d'analyse s'équiperont de machines millifluidiques et les agriculteurs feront évaluer le nombre de microorganismes solubilisateurs régulièrement

En conclusion, nous espérons que ce travail aura convaincu qu'il est possible de caractériser facilement les fonctions des microbiotes des sols, à condition d'exploiter de nouvelles technologies. Comme lors de l'essor de du séquençage, une avancée technologique permettra peut-être d'étendre le champ de nos connaissances.

8 Annexes

8.1 Recette du Milieu Pikovskaya

Composé	Concentration en grammes pour un litre d'eau	Soit en moles par litre
Dextrose	10	$5,6^{E-2}$
Hydroxyapatite	5 ou 1 selon les cas	
(NH₄)₂SO₄	0,5	$3,79^{E-3}$
NaCl	0,2	$3,42^{E-3}$
MgSO₄	0,1	$8,31^{E-4}$
KCl	0,2	$2,68^{E-3}$
Extrait de levure	0,5	
MnSO₄	0,002	$1,32^{E-5}$
FeSO₄	0,002	$1,32^{E-5}$

On ajuste le pH pour qu'il soit entre 6 et 7. Dans notre cas, on ajoute 40µl de NaOH 5M pour un litre de milieu.

En plus de ça :

- Pour le milieu solide, on ajoute 18 grammes d'agar.
- Pour le milieu liquide, afin de maintenir les particules en suspension, on ajoute 0,35 grammes de polyacrylate de sodium (voir chapitre V)

On stérilise à l'autoclave à 121°C pendant trois minutes (plus temps de chauffe et de refroidissent).

Pour le milieu liquide, on ajoute (sauf précisé) 9,8 mg de résazurine de sodium et 40,9 mg de pyranine après cuisson par litre de milieu.

Force ionique totale hors polyacrylate : 31mM

8.2 Protocole de suspension des microbes du sol

Lorsqu'ils ne sont pas utilisés, tous les échantillons sont conservés au réfrigérateur dans des sachets plastiques fermés hermétiquement.

On prélève dix grammes de sol, on les place dans un tube à centrifuger stérile en plastique contenant quarante grammes de solution stérile de chlorure de sodium (NaCl) à huit grammes par litre. Le tube est fermé puis placé sur un agitateur rotatif pendant trente minutes à température ambiante. Après cela, le tube est centrifugé à 900g pendant cinq minutes ; il se forme alors un culot solide et un surnageant. On prélève le surnageant puis on le filtre avec un tamis cellulaire de maille 100µm afin de la débarrasser d'éventuels débris végétaux qui pourraient gêner la manipulation.

8.3 Calcul des intervalles de confiance pour le comptage sur boîte de Petri

On se base sur les résultats de ¹⁹⁵. Nous retenons des intervalles de confiance à 95%. Ils sont calculés avec les formules qui suivent. Pour une boîte de Petri donnée, soient :

- x le nombre de colonies visibles après incubation
- $\chi_{n,\alpha}^2$ la loi du chi deux inversée de degré de liberté n et de probabilité α
- μ_b la limite basse de l'intervalle de confiance
- μ_h sa limite haute
- C la concentration la plus probable estimée à partir du nombre de colonies

$$\mu_b = C \times \frac{\chi_{2x,0.025}^2}{2}$$

$$\mu_h = C \times \frac{\chi_{2(x+1),0.975}^2}{2}$$

8.4 Identité des souches microbiennes utilisées

Escherichia coli : souche UMN 026 (don gracieux du laboratoire IAME à l'hôpital Bichat)

Bacillus subtilis : DSM 10, fournisseur DSMZ

Pantoea agglomerans : DSM 8570, fournisseur DSMZ

8.5 Loi de Poisson/Nombre le Plus Probable

Le calcul du Nombre le Plus Probable (NPB ; ou MPN en anglais) est une méthode statistique pour estimer une concentration en microorganismes cultivables d'un échantillon liquide, à partir du fractionnement de cet échantillon en plusieurs compartiments, éventuellement après l'avoir dilué ou concentré. Il repose sur la loi de Poisson.

Soit un échantillon dont on cherche à estimer la concentration μ en microorganismes. On réalise plusieurs dilutions différentes du même échantillon, de facteurs d_i (par exemple $d_1 = 0,01$; $d_2 = 0,001$ et $d_3 = 0,0001$)

On fragmente chaque niveau de dilution en n_i compartiments (dans notre cas des gouttes, mais ces compartiments pourraient être des puits de microplaque ou des tubes à essai). Chaque goutte pourra donc alors contenir zéro, un ou plusieurs microorganismes en début d'incubation. Les compartiments sont alors mis à incuber le temps nécessaire pour que les microorganismes se développent. Notez que deux hypothèses importantes doivent être vérifiées pour que le modèle soit applicable :

- La suspension est suffisamment mélangée pour que les microbes en son sein soient répartis de façon aléatoire et homogène à l'échelle macroscopique¹⁸².
- Chaque goutte qui contient au moins une cellule viable montrera des signes de croissance (ou du phénotype que l'on cherche à observer) après incubation¹⁸².

En fin d'incubation, on compte les gouttes dans lesquelles il y a des traces de croissance et les gouttes dans lesquelles rien n'a poussé, pour chaque niveau de dilution. Nous reprenons ici les notations et les principaux résultats du papier de Jarvis, Wilrich et Wilrich, à consulter pour de plus amples explications. Soient :

- $\hat{\mu}$ L'estimation du nombre de cellules cultivables par millilitre de suspension non-diluée
- d_i le niveau de dilution (par exemple, si la suspension initiale a été diluée 100 fois, $d = 0,01$)
- w_i le volume des gouttes (on suppose que les gouttes font toutes le même volume : 0,7 μ l)
- n_i Le nombre de gouttes à la dilution i . En général dans nos expériences, ce nombre est le même pour chaque niveau de dilution.

- x_i le nombre de gouttes positives (c'est-à-dire qui montrent des signes de croissance) à la dilution i .

Pour estimer μ , on résout l'équation :

$$\sum_{i=1}^k \left(\frac{x_i d_i w_i}{1 - \exp(-d_i w_i \hat{\mu})} \right) - n_i d_i w_i = 0$$

On prend les intervalles de confiance à 95% recommandés par les auteurs.

Avec cette méthode, une nouvelle dimension apparaît : la vraisemblance des résultats obtenus vis-à-vis du modèle des dilutions successives.

Est-il vraisemblable d'obtenir les résultats que l'on a obtenus si l'on a dilué notre échantillon comme prévu ? Par exemple, si l'on a 27 gouttes positives sur 100 pour une solution diluée 100 fois et 3 gouttes sur 100 pour la même solution diluée 1000 fois, on peut être confiant dans nos résultats. A l'inverse, il est très improbable de trouver la même fraction de gouttes positives dans une suspension diluée 100 fois et dans cette même suspension diluée 1000 fois. De tels résultats peuvent être dus par exemple à des erreurs de manipulation ou à des contaminations. Les auteurs du papier cité précédemment préconisent de calculer à cet effet un indice de rareté dont la formule est donnée dans l'article. Nous avons exclu de nos données les expériences pour lesquelles cet indice de rareté est inférieur à 0,01 ; comme préconisé.

Tous les calculs de NPB ont été effectués grâce au fichier excel fourni par les auteurs, disponible à cette adresse :

<https://www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich/index.html>

Ou avec le script à cette adresse :

<https://gitlab.com/Atakalaka/droplet-analyser/-/blob/master/detectionPositifsVSTemps.py>

La fonction utilisée par ce script est mostProbableNumber, disponible à cette adresse :

<https://gitlab.com/Atakalaka/droplet-analyser/-/blob/master/functionsArthur.py>

Noter que pour une expérience avec plusieurs dilutions, il est possible de calculer des NPB indépendants pour chaque dilution ou des suivre la méthode décrite dans notre exemple. Dans le cas où les NPB sont calculés indépendamment, l'équation a une solution analytique simple (loi de Poisson).

8.6 Origine des sols et méthodes de prélèvement

Le sol est prélevé à environ 15 cm de profondeur avec une tarière et conservé au réfrigérateur dans un sachet plastique hermétique. Les sols nous sont fournis par notre partenaire AgroNutrition, qui nous a fourni les informations suivantes :

Code échantillon	Origine sol	Localisation - département
TS 130419	Terrain de sport type STADE	33
TS 291019	Terrain de sport type STADE	16
PS 181019	Terre issue d'un chantier d'aménagement des espaces verts d'un parc	93

TS 230419	Terrain de sport type STADE	87
TS 020120	Terrain de sport type GOLF ZONE FAIRWAY	83
PS 160819	Terre issue d'un chantier d'aménagement des espaces verts d'un parc	38
PS 270919	Terre issue d'un chantier d'aménagement des espaces verts d'un parc	74
PS 151119	Terre issue d'un chantier d'aménagement des espaces verts d'un parc	Inconnu
PS 251119	Terre issue d'un chantier d'aménagement d'un espace vert d'une voie	25
PS 030919	Terrain agricole grande culture	Sénégal
TB 030920	Vignoble	21
IA 300920	Inconnu	Inconnu
PS 271020	Inconnu	Inconnu

9 Bibliographie

1. Weil, R. R. & Brady, N. C. The soils around us. in *the nature and properties of soils* 1–32 (Pearson, 2017).
2. Rusek, J. Biodiversity of Collembola and their functional role in the ecosystem. *Biodivers. Conserv.* **7**, 1207–1219 (1998).
3. Sparling, G. P., Feltham, C. W., Reynolds, J., West, A. W. & Singleton, P. Estimation of soil microbial c by a fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the kec-factor. *Soil Biol. Biochem.* **22**, 301–307 (1990).
4. Dalal, R. C. Soil microbial biomass - What do the numbers really mean? *Aust. J. Exp. Agric.* **38**, 649–665 (1998).
5. Vance, E. D., Brookes, P. C. & Jenkinson, D. S. AN EXTRACTION METHOD FOR MEASURING SOIL MICROBIAL BIOMASS C. *Soil Biol. Biochem.* **19**, 703–707 (1987).
6. Gonzalez-Quinones, V. *et al.* Soil microbial biomass — Interpretation and consideration for soil monitoring. 287–304 (2011).
7. Martens, R. Current Methods for Measuring Microbial Biomass-{C} in Soil - Potentials and Limitations. *Biol. Fertil. Soils* **19**, 87–99 (1995).
8. Weil, R. R. & Brady, N. C. Organisms and ecology of the soil. in *the nature and properties of soils* 464–521 (Pearson, 2017).
9. Torsvik, V. & Øvreås, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 240–245 (2002).
10. Taylor, J. P., Wilson, B., Mills, M. S. & Burns, R. G. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol. Biochem.* **34**, 387–401 (2002).
11. Stein, L. Y. & Klotz, M. G. The nitrogen cycle. *Curr. Biol.* **26**, R94–R98 (2016).
12. Stockmann, U. *et al.* The knowns, known unknowns and unknowns of sequestration of soil organic carbon. *Agric. Ecosyst. Environ.* **164**, 80–99 (2013).
13. Aislabie, J. M., Richards, N. K. & Boul, H. L. Microbial degradation of DDT and its residues—A review. *New Zeal. J. Agric. Res.* **40**, 269–282 (1997).
14. van Veen, J. A., van Overbeek, L. S. & van Elsas, J. D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 121–35 (1997).
15. Middeldorp, P. J. M., Briglia, M. & Salkinoja-Salonen, M. S. Biodegradation of pentachlorophenol in natural soil by inoculated *Rhodococcus chlorophenolicus*. *Microb. Ecol.* **20**, 123–139 (1990).
16. Raaijmakers, J. M. & Mazzola, M. Soil immune responses. *Science (80-)*. **352**, 1392–1394 (2016).
17. Elhady, A., Adss, S., Hallmann, J. & Heuer, H. Rhizosphere microbiomes modulated by pre-crops

- assisted plants in defense against plant-parasitic nematodes. *Front. Microbiol.* **9**, 1–9 (2018).
18. Schlatter, D., Kinkel, L., Thomashow, L., Weller, D. & Paulitz, T. Disease suppressive soils: New insights from the soil microbiome. *Phytopathology* **107**, 1284–1297 (2017).
 19. Haas, D. & Défago, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 307–319 (2005).
 20. Bardin, M. & Nicot, P. L'utilisation des microorganismes comme produits de biocontrôle. in *Biocontrôle* 151–160 (Quae, 2019).
 21. Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 425–448 (2007).
 22. Rillig, M. C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can. J. Soil Sci.* **84**, 355–363 (2004).
 23. Vílchez, J. I., García-Fontana, C., Román-Naranjo, D., González-López, J. & Manzanera, M. Plant drought tolerance enhancement by trehalose production of desiccation-tolerant microorganisms. *Front. Microbiol.* **7**, 1–11 (2016).
 24. Van Oosten, M. J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S. & Maggio, A. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **4**, 1–12 (2017).
 25. Pfirter, H. A., Guntli, D., Ruess, M. & Défago, G. Preservation, mass production and storage of *Stagonospora convolvuli*, a bioherbicide candidate for field bindweed (*Convolvulus arvensis*). *BioControl* **44**, 437–447 (1999).
 26. Triolet, M., Guillemin, J. P., Andre, O. & Steinberg, C. Fungal-based bioherbicides for weed control: a myth or a reality? *Weed Res.* **60**, 60–77 (2020).
 27. Fred, E. B. & Haas, A. R. C. The etching of marble by roots in the presence and absence of bacteria. *J. Gen. Physiol.* 631–638 (1919).
 28. GroundWork BioAg. <https://groundworkbioag.com>.
 29. AgroNutrition - Technologies nutritionnelles. <https://www.agronutrition.com/fr/technologies-nutritionnelles>.
 30. BioIntrant. <https://www.biointran.com>.
 31. Mycostop. https://icl-sf.com/fr-fr/products/turf_amenity/mycostop-mycostop/.
 32. Loznik, B. & OOSTERKAMP, P. J. Fertilizer comprising bacteria and protozoa. (2017).
 33. Piccini, D. & Azcon, R. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the utilization of Bayovar rock phosphate by alfalfa plants using a sand-vermiculite medium. *Plant Soil* **101**, 45–50 (1987).
 34. Jha, C. K. & Saraf, M. Evaluation of Multispecies Plant-Growth-Promoting Consortia for the Growth Promotion of *Jatropha curcas* L. *J. Plant Growth Regul.* **31**, 588–598 (2012).
 35. Soumare, A. *et al.* From Isolation of Phosphate Solubilizing Microbes to Their Formulation and Use as Biofertilizers: Status and Needs. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 1–14 (2020).
 36. Rosenberg, K. *et al.* Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *ISME J.* **3**, 675–684 (2009).
 37. Blagodatskaya, E. & Kuzyakov, Y. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation

- criteria and approaches. *Soil Biol. Biochem.* **67**, 192–211 (2013).
38. Kelly S. Ramirez Rob Knight, Mark A. Bradford, and Noah Fierer, C. L. L. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology* **91**, 3463–3470 (2010).
 39. Azziz, G. *et al.* Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop-pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. *Appl. Soil Ecol.* **61**, 320–326 (2012).
 40. Nacke, H. *et al.* Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS One* **6**, (2011).
 41. Sandaa, R. A., Torsvik, V. & Enger. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biol. Biochem.* **33**, 287–295 (2001).
 42. Wakelin, S. A. *et al.* Shifts in the phylogenetic structure and functional capacity of soil microbial communities follow alteration of native tussock grassland ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* **57**, 675–682 (2013).
 43. Latz, E. *et al.* Plant diversity improves protection against soil-borne pathogens by fostering antagonistic bacterial communities. *J. Ecol.* **100**, 597–604 (2012).
 44. Widdig, M. *et al.* Nitrogen and Phosphorus Additions Alter the Abundance of Phosphorus-Solubilizing Bacteria and Phosphatase Activity in Grassland Soils. *Front. Environ. Sci.* **7**, 1–15 (2019).
 45. Wallenstein, M. D. & Weintraub, M. N. Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 2098–2106 (2008).
 46. Pereira e Silva, M. C., Semenov, A. V., Van Elsas, J. D. & Salles, J. F. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **77**, 57–68 (2011).
 47. Thiele-Bruhn, S. *et al.* Identification of new microbial functional standards for soil quality assessment. *Soil* **6**, 17–34 (2020).
 48. Karlen, D. L. *et al.* Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **61**, 4–10 (1997).
 49. Torsvik, V., Sørheim, R. & Goksøyr, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities - A review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 170–178 (1996).
 50. Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A. & Øvreås, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* **64**, 53–62 (1998).
 51. Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Amann, R. I. & Ludwig, W. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation . Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. **59**, 143–169 (1995).
 52. Rosselló-Mora, R. & Amann, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 39–67 (2001).
 53. Ernst, M. Systematics and the Origin of Species. *Columbia Univ. Press* (1942).
 54. Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 846–849 (1994).

55. Ventosa, A. & Sanchez-Porro, C. Species (Prokaryote). in *Encyclopedia of Astrobiology* (eds. Gargaud, M. et al.) 1548–1549 (Springer Berlin Heidelberg, 2011). doi:10.1007/978-3-642-11274-4_1876.
56. Terrat, S. *et al.* Mapping and predictive variations of soil bacterial richness across France. *PLoS One* **12**, 1–19 (2017).
57. Terrat, S. *et al.* Mapping and predictive variations of soil bacterial richness across France. *PLoS One* **12**, 5–8 (2017).
58. Pereira e Silva, M. C., Semenov, A. V., Van Elsas, J. D. & Salles, J. F. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **77**, 57–68 (2011).
59. Yahya, A. I. & Al-Azawi, S. K. Occurrence of phosphate-solubilizing bacteria in some Iraqi soils. *Plant Soil* **117**, 135–141 (1989).
60. He, Z. *et al.* GeoChip 3.0 as a high-throughput tool for analyzing microbial community composition, structure and functional activity. *ISME J.* **4**, 1167–1179 (2010).
61. Milo, R., Jorgensen, P., Moran, U., Weber, G. & Springer, M. BioNumbers The database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic Acids Res.* **38**, 750–753 (2009).
62. Heldal, M., Norland, S. & Tumyr, O. X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1251–1257 (1985).
63. Vitousek, P. M., Porder, S. & Houlton, B. Z. Terrestrial phosphorus limitation : mechanisms , implications , and nitrogen – phosphorus interactions. *Ecol. Appl.* **20**, 5–15 (2010).
64. Reich, P. B. & Schoettle, A. W. Role of phosphorus and nitrogen in photosynthetic and whole plant carbon gain and nutrient use efficiency in eastern white pine. *Oecologia* **77**, 25–33 (1988).
65. Fredeen, A. L., Raab, T. K., Rao, I. M. & Terry, N. Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in Glycine max (L.) Merr. *Planta* **17**, 71–74 (1990).
66. Weil, R. R. & Brady, N. C. Soil phosphorus and potassium. in *the nature and properties of soils* 643–695 (Pearson, 2017).
67. Theodorou, M. E. & Plaxton, W. C. Metabolic Adaptations of Plant Respiration to Nutritional Phosphate Deprivation. *Plant Physiol.* 339–344 (1993).
68. Grant, C. A., Flaten, D. N., Tomasiewicz, D. J. & Sheppard, S. C. The importance of early season phosphorus nutrition. *Can. J. Plant Sci.* **81**, 211–224 (2001).
69. Dalal, R. C. Soil Organic Phosphorus. *Adv. Agron.* **29**, 83–117 (1977).
70. Hooda, P. S. *et al.* Manuring and fertilization effects on phosphorus accumulation in soils and potential environmental implications. *Adv. Environ. Res.* **5**, 13–21 (2001).
71. Turner, B. L., Papházy, M. J., Haygarth, P. M. & McKelvie, I. D. Inositol phosphates in the environment. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **357**, 449–469 (2002).
72. Kuo, S. Application of a Modified Langmuir Isotherm to Phosphate Sorption by some Acid Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **52**, 97–102 (1988).
73. Ballabio, C. *et al.* Mapping LUCAS topsoil chemical properties at European scale using Gaussian process regression. *Geoderma* **355**, 113912 (2019).
74. Gerke, J. Humic (organic matter)-Al(Fe)-phosphate complexes: An underestimated phosphate

- form in soils and source of plant-available phosphate. *Soil Sci.* **175**, 417–425 (2010).
75. Cade-Menun, B. J. & Preston, C. M. A comparison of soil extraction procedures for ³¹P NMR spectroscopy. *Soil Sci.* **161**, 770–785 (1996).
 76. CONDRON, L. M., GOH, K. M. & NEWMAN, R. H. Nature and distribution of soil phosphorus as revealed by a sequential extraction method followed by ³¹P nuclear magnetic resonance analysis. *J. Soil Sci.* **36**, 199–207 (1985).
 77. Quideau, S. A. *et al.* Extraction and analysis of microbial Phospholipid fatty acids in soils. *J. Vis. Exp.* **2016**, 1–9 (2016).
 78. McKERCHER, R. B. & ANDERSON, G. Content of Inositol Penta- and Hexaphosphates in Some Canadian Soils. *J. Soil Sci.* **19**, 47–55 (1968).
 79. Gerke, J. Phytate (Inositol hexakisphosphate) in soil and phosphate acquisition from inositol phosphates by higher plants. A review. *Plants* **4**, 253–266 (2015).
 80. Evans, W. J. & Pierce, A. G. Calcium-phytate complex formation studies. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 850–851 (1981).
 81. McKercher, R. B. & Anderson, G. Organic phosphate sorption by neutral and basic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **20**, 723–732 (1989).
 82. Anderson, G., Williams, E. G. & Moir, J. O. A comparison of the sorption of inorganic orthophosphate and inositol hexaphosphate by six acid soils. *J. soil Sci.* **25**, 51–62 (1974).
 83. Hayes, J. E., Simpson, R. J. & Richardson, A. E. The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant Soil* **220**, 165–174 (2000).
 84. George, T. S., Richardson, A. E., Hadobas, P. A. & Simpson, R. J. Characterization of transgenic *Trifolium subterraneum* L. which expresses phyA and releases extracellular phytase: Growth and P nutrition in laboratory media and soil. *Plant, Cell Environ.* **27**, 1351–1361 (2004).
 85. Beißner, L. Mobilisierung von Phosphor aus Organischen und Anorganischen Verbindungen Durch Zuckerrübenwurzeln. (Georg-August Universität, Göttingen, Germany, 1997).
 86. Lung, S. C. & Lim, B. L. Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate. *Plant Soil* **279**, 187–199 (2006).
 87. Tarafdar, J. C. & Claassen, N. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biol. Fertil. Soils* **5**, 308–312 (1988).
 88. Findenegg, G. R. & Nelemans, J. A. The effect of phytase on the availability of P from myo-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. *Plant Soil* **154**, 189–196 (1993).
 89. Adams, M. A. & Pate, J. S. Availability of organic and inorganic forms of phosphorus to lupins (*Lupinus* spp.). *Plant Soil* **145**, 107–113 (1992).
 90. Fardeau, J. Le phosphore assimilable des sols: sa représentation par un modèle fonctionnel à plusieurs compartiments. *Agronomie* **13**, 317–331 (1993).
 91. Jalali, M. & Ranjbar, F. Aging effects on phosphorus transformation rate and fractionation in some calcareous soils. *Geoderma* **155**, 101–106 (2010).
 92. Tunney, H., Csathó, P. & Ehlert, P. Approaches to calculating P balance at the field-scale in

- Europe. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **166**, 438–446 (2003).
93. Eurostat. Consumption of inorganic fertilizers - AEI_FM_USEFERT. https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/aei_fm_usefert/default/line?lang=en (2017).
 94. Codd, G. A., Lindsay, J., Young, F. M., Morrison, L. F. & Metcalf, J. S. HARMFUL CYANOBACTERIA. in *Harmful Cyanobacteria. Aquatic Ecology Series, vol 3* (eds. Huisman, J., Matthijs, H. C. & Visser, P. M.) 1–23 (Springer, Dordrecht, 2005). doi:10.1007/1-4020-3022-3_1.
 95. Lambers, H. *et al.* Phosphorus nutrition in Proteaceae and beyond. *Nat. Plants* **1**, (2015).
 96. DINKELAKER, B., RÖMHELD, V. & MARSCHNER, H. Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant. Cell Environ.* **12**, 285–292 (1989).
 97. Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. & Gobi, T. A. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* **2**, 1–14 (2013).
 98. Goldstein, A. H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biol. Agric. Hort.* **12**, 185–193 (1995).
 99. HOFFLAND, E., VAN DEN BOOGAARD, R., NELEMANS, J. & FINDENEGG, G. Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. *New Phytol.* **122**, 675–680 (1992).
 100. Chen, Y. P. *et al.* Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **34**, 33–41 (2006).
 101. Raghothama, K. G. Phosphate acquisition. *Plant Soil* 665–693 (1990) doi:10.1040-2519/99/0601-0665\$08.00 665.
 102. Jones, D. L. & Oburger, E. Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. in *Phosphorus in Action* vol. 26 215–243 (2011).
 103. Kpombekou, K. & Tabatabai, M. A. Effect of organic acids on release of phosphorus from Phosphate rocks. *Soil Science* vol. 158 442–453 (1994).
 104. Arcand, M. M. & Schneider, K. D. Plant- And microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: A review. *An. Acad. Bras. Cienc.* **78**, 791–807 (2006).
 105. Weisskopf, L. *et al.* White lupin has developed a complex strategy to limit microbial degradation of secreted citrate required for phosphate acquisition. *Plant, Cell Environ.* **29**, 919–927 (2006).
 106. Lamont, B. B. Structure, ecology and physiology of root clusters - A review. *Plant Soil* **248**, 1–19 (2003).
 107. Shu, L., Shen, J., Rengel, Z., Tang, C. & Zhang, F. Cluster root formation by *Lupinus albus* is modified by stratified application of phosphorus in a split-root system. *J. Plant Nutr.* **30**, 271–288 (2007).
 108. Kpombekou-a, K. & Tabatabai, M. A. Effect of low-molecular weight organic acids on phosphorus release and phytoavailability of phosphorus in phosphate rocks added to soils. **100**, 275–284 (2003).
 109. Ström, L., Owen, A. G., Godbold, D. L. & Jones, D. L. Organic acid mediated P mobilization in the

- rhizosphere and uptake by maize roots. *Soil Biol. Biochem.* **34**, 703–710 (2002).
110. Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M. J. & Ouhdouch, Y. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Appl. Soil Ecol.* **40**, 510–517 (2008).
 111. Kucey, R. M. N. Increased Phosphorus Uptake by Wheat and Field Beans Inoculated with a Phosphorus-Solubilizing *Penicillium bilaji* Strain and with Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2699–2703 (1987).
 112. Maghraoui, T. *et al.* Effect of inoculation by Moroccan rock phosphate-solubilizing rhizobia, Versus phosphorus fertilization, on the growth and the phosphorus uptake by *Vicia faba*. *Pakistan J. Agric. Sci.* **53**, 817–826 (2016).
 113. Kapoor, K. K. & Singh, S. Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. 139–144 (1999).
 114. Singh, S. & Kapoor, K. K. Effects of inoculation of phosphate-solubilizing microorganisms and an arbuscular mycorrhizal fungus on mungbean grown under natural soil conditions. *Mycorrhiza* **7**, 249–253 (1998).
 115. Singh, H. P. & Singh, T. A. The interaction of rockphosphate, Bradyrhizobium, vesicular-arbuscular mycorrhizae and phosphate-solubilizing microbes on soybean grown in a sub-Himalayan mollisol. *Mycorrhiza* **4**, 37–43 (1993).
 116. Eida, A. A., Hirt, H. & Saad, M. M. Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation. *Rhizotrophs Plant Growth Promot. to Bioremediation* 125–143 (2017) doi:10.1007/978-981-10-4862-3.
 117. Fernández, L. A., Zalba, P., Gómez, M. A. & Sagardoy, M. A. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biol. Fertil. Soils* **43**, 805–809 (2007).
 118. Rodríguez, H. & Fraga, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* **17**, 319–339 (1999).
 119. Dequiedt, S. *et al.* Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **20**, 641–652 (2011).
 120. Goldstein, A. H. & Liu, S. T. Molecular Cloning and Regulation of a Mineral Phosphate Solubilizing Gene from *Erwinia Herbicola*. *Bio/Technology* **5**, 72–74 (1987).
 121. Babu-Khan, S. *et al.* Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 972–978 (1995).
 122. Illmer, P. & Schinner, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **24**, 389–395 (1992).
 123. Ushasree, M. V., Shyam, K., Vidya, J. & Pandey, A. Microbial phytase: Impact of advances in genetic engineering in revolutionizing its properties and applications. *Bioresour. Technol.* **245**, 1790–1799 (2017).
 124. Cleton-Jansen, A. M., Goosen, N., Fayet, O. & Van de Putte, P. Cloning, mapping, and sequencing of the gene encoding *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **172**, 6308–6315 (1990).
 125. Bergkemper, F. *et al.* Novel oligonucleotide primers reveal a high diversity of microbes which

- drive phosphorous turnover in soil. *J. Microbiol. Methods* **125**, 91–97 (2016).
126. Tu, Q. *et al.* GeoChip 4: A functional gene-array-based high-throughput environmental technology for microbial community analysis. *Mol. Ecol. Resour.* **14**, 914–928 (2014).
 127. Morrison, E. *et al.* Microbial genetic and enzymatic responses to an anthropogenic phosphorus gradient within a subtropical peatland. *Geoderma* **268**, 119–127 (2016).
 128. Pikovskaya, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* **17**, 367–370 (1948).
 129. Nautiyal, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**, 265–270 (1999).
 130. Crespo, J. M., Boiardi, J. L. & Luna, M. F. Mineral phosphate solubilization activity of gluconacetobacter diazotrophicus under P-limitation and plant root environment. *Agric. Sci.* **02**, 16–22 (2011).
 131. KUMAR, A. & RAI, L. C. Soil organic carbon and phosphorus availability regulate abundance of culturable phosphate-solubilizing bacteria in paddy fields. *Pedosphere* **30**, 405–413 (2020).
 132. Watanabe, F. S. & Olsen, S. R. Test of an Ascorbic Acid Method for Determining Phosphorus in Water and NaHCO₃ Extracts from Soil 1 A NEED EXISTS for a more suitable method to determine. *Soil Sci. Soc. Proc.* 677–678 (1965).
 133. Whitelaw, M. A., Harden, T. J. & Helyar, K. R. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil Fungus penicillium radicum. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 655–665 (1999).
 134. Gadagi, R. S. & Sa, T. New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. *Soil Sci. Plant Nutr.* **48**, 615–618 (2002).
 135. Bolan, N. S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil* **134**, 189–207 (1991).
 136. Weaver, A. R. *et al.* Mapping Soil pH Buffering Capacity of Selected Fields in the Coastal Plain. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **68**, 662–668 (2004).
 137. Weil, R. R. & Brady, N. C. Soil acidity. in *the nature and properties of soils* 374–419 (2017).
 138. Nelson, P. N. & Su, N. Soil pH buffering capacity: A descriptive function and its application to some acidic tropical soils. *Aust. J. Soil Res.* **48**, 201–207 (2010).
 139. Joseph, S. & Jisha, M. S. Buffering Reduces Phosphate Solubilizing Ability of Selected Strains of Bacteria. *Public Health* **5**, 135–137 (2009).
 140. Tabeling, P. *Introduction to microfluidics*. (OUP Oxford, 2005).
 141. Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science (80-)*. **305**, 1622–1625 (2004).
 142. Wang, P. *et al.* Robust growth of escherichia coli. *Curr. Biol.* **20**, 1099–1103 (2010).
 143. Berdy, B., Spoering, A. L., Ling, L. L. & Epstein, S. S. In situ cultivation of previously uncultivable microorganisms using the ichip. *Nat. Protoc.* **12**, 2232–2242 (2017).
 144. Du, W., Li, L., Nichols, K. P. & Ismagilov, R. F. SlipChip. *Lab Chip* **9**, 2286–2292 (2009).
 145. Song, H., Chen, D. L. & Ismagilov, R. F. Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **45**, 7336–7356 (2006).

146. Kaminski, T. S., Scheler, O. & Garstecki, P. Droplet microfluidics for microbiology: Techniques, applications and challenges. *Lab Chip* **16**, 2168–2187 (2016).
147. Martin, K. *et al.* Generation of larger numbers of separated microbial populations by cultivation in segmented-flow microdevices. *Lab Chip* **3**, 202–207 (2003).
148. Agresti, J. J. *et al.* Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2010) 107 (4004-4009) DOI: 10.1073/pnas.0910781107). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6560 (2010).
149. Zengler, K. *et al.* Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 15681–15686 (2002).
150. de la Motte Saint Pierre, M. Microfluidique digitale pour la croissance de micro-organismes difficiles à cultiver. (PSL Research University, 2017). doi:tel-02337717.
151. Pekin, D. *et al.* Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip* **11**, 2156–2166 (2011).
152. Derda, R., Tang, S. K. Y. & Whitesides, G. M. Uniform Amplification of Phage with Different Growth Characteristics in Individual Compartments Consisting of Monodisperse Droplets. *Angew. Chemie* **122**, 5429–5432 (2010).
153. Boitard, L. *et al.* Monitoring single-cell bioenergetics via the coarsening of emulsion droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 7181–7186 (2012).
154. Eyer, K. *et al.* Single-cell deep phenotyping of IgG-secreting cells for high-resolution immune monitoring. *Nat. Biotechnol.* **35**, 977–982 (2017).
155. Boitard, L., Cottinet, D., Bremond, N., Baudry, J. & Bibette, J. Growing microbes in millifluidic droplets. *Eng. Life Sci.* **15**, 318–326 (2015).
156. Köhler, J. M. *et al.* Digital reaction technology by micro segmented flow - components, concepts and applications. *Chem. Eng. J.* **101**, 201–216 (2004).
157. Jiang, L. *et al.* Digital antimicrobial susceptibility testing using the MilliDrop technology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **35**, 415–422 (2016).
158. Monod, J. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* **3**, 371–394 (1949).
159. Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. & Margesin, R. *Methods in Soil Biology. Methods in Soil Biology* (Springers, 1996). doi:10.1007/978-3-642-60966-4.
160. Trolldenier, G. Counting by Fluorescence Microscopy. in *Methods in Soil Biology* (eds. Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. & Margesin, R.) 15–19 (Springer, 1996).
161. Stockdale, E. A. & Brookes, P. C. Detection and quantification of the soil microbial biomass - Impacts on the management of agricultural soils. *J. Agric. Sci.* **144**, 285–302 (2006).
162. Trolldenier, G. Physiological Groups by Most Probable number Method. in *Methods in Soil Biology* (eds. Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. & Margesin, R.) 26–28 (Springer, 1996).
163. Kuhnert-Finkernagel, R. Biomass-C by Fumigation-Incubation Technique. in *Methods in Soil Biology* (eds. Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. & Margesin, R.) 52–56 (Springer, 1995).
164. Jenkinson, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—IV. The decomposition of fumigated organisms in soil. *Soil Biol. Biochem.* **8**, 203–208 (1976).
165. Öhlinger, R., Baumgarten, A. & Beck, T. Substrate-Induced Respiration. in *Methods in Soil*

- Biology* (eds. Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. & Margesin, R.) 64–68 (Springer, 1995).
166. Anderson, J. P. E. & Domsch, K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* **10**, 215–221 (1978).
 167. Heilmann, B. Substrate-Induced Heat Output. in *Methods in Soil Biology* (eds. Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. & Margesin, R.) 68–73 (Springer).
 168. Schnurer, J. & Rosswall, T. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in soil and Litter. **43**, 1256–1261 (1982).
 169. Torsvik, V. L. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol. Biochem.* **12**, 15–21 (1980).
 170. Marstorp, H., Guan, X. & Gong, P. Relationship between dsDNA, chloroform labile C and ergosterol in soils of different organic matter contents and pH. *Soil Biol. Biochem.* **32**, 879–882 (2000).
 171. Leckie, S. E., Prescott, C. E., Grayston, S. J., Neufeld, J. D. & Mohn, W. W. Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 529–532 (2004).
 172. Insam, H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma* **100**, 389–402 (2001).
 173. Martens, R. Limitations in the application of the fumigation technique for biomass estimations in amended soils. *Soil Biol. Biochem.* **17**, 57–63 (1985).
 174. Powlson, D. S., Prookes, P. C. & Christensen, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. *Soil Biol. Biochem.* **19**, 159–164 (1987).
 175. Schloter, M., Dilly, O. & Munch, J. C. Indicators for evaluating soil quality. *Agric. Ecosyst. Environ.* **98**, 255–262 (2003).
 176. Bending, G. D., Turner, M. K., Rayns, F., Marx, M. C. & Wood, M. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 1785–1792 (2004).
 177. Powlson, D. S. & Jenkinson, D. S. A Comparison of The Organic Matter, Biomass, Adenosine Triphosphate and Mineralizable Nitrogen Contents of Ploughed and Direct-Drilled Soils. *J. Agric. Sci.* **97**, 713–721 (1981).
 178. González-Pinzón, R., Haggerty, R. & Myrold, D. D. Measuring aerobic respiration in stream ecosystems using the resazurin-resorufin system. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **117**, 1–10 (2012).
 179. Boedicker, J. Q., Li, L., Kline, T. R. & Ismagilov, R. F. Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics. *Lab Chip* **8**, 1265–1272 (2008).
 180. TWIGG, R. S. OXIDATION-REDUCTION ASPECTS OF RESAZURIN. *Nature* 401–402 (1945).
 181. Jarvis, B., Wilrich, C. & Wilrich, P. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers , their standard deviations , confidence bounds and rarity values. 1660–1667 (2010) doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x.
 182. Jarvis, B., Wilrich, C. & Wilrich, P. T. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 1660–1667 (2010).

183. Li, X. *et al.* Volatile-mediated antagonism of soil bacterial communities against fungi. **00**, 1–11 (2019).
184. D’Onofrio, A. *et al.* Siderophores from Neighboring Organisms Promote the Growth of Uncultured Bacteria. *Chem. Biol.* **17**, 254–264 (2010).
185. Gustafsson, J. P. Visual MINTEQ. (2013).
186. Damoglou, A. P. & Dawes, E. A. Studies on the lipid content and phosphate requirement of glucose-and acetate-grown *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **110**, 775–781 (1968).
187. Swain, S. K., Dorozhkin, S. V & Sarkar, D. Synthesis and dispersion of hydroxyapatite nanopowders. *Mater. Sci. Eng. C* **32**, 1237–1240 (2012).
188. Pretto, M., Costa, A. L., Landi, E., Tampieri, A. & Galassi, C. Dispersing behavior of hydroxyapatite powders produced by wet-chemical synthesis. *J. Am. Ceram. Soc.* **86**, 1534–1539 (2003).
189. Santos-beneit, F. The Pho regulon : a huge regulatory network in bacteria. **6**, 1–13 (2015).
190. Michaels, A. S. & Morelos, O. Polyelectrolyte Adsorption by Kaolinite. *Ind. Eng. Chem.* **47**, 1801–1809 (1955).
191. Goldstein, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* **1**, 51–57 (1986).
192. Reyes, I., Valery, A. & Valdus, Z. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. in *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization* (eds. Velazquez, E. & Rodriguez-Barrueco, V.) 69–75 (2002).
193. Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R. C., Saxena, R. K. & Gupta, R. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **40**, 255–260 (1994).
194. LOUW, H. A. & WEBLEY, D. M. A STUDY OF SOIL BACTERIA DISSOLVING CERTAIN MINERAL PHOSPHATE FERTILIZERS AND RELATED COMPOUNDS. *J. Appl. Bacteriol.* **22**, 227–233 (1959).
195. Sahai, H. & Khurshid, A. Confidence Intervals for the Mean of a Poisson Distribution: A Review. *Biometrical J.* **35**, 857–867 (1993).

RÉSUMÉ

Les microorganismes du sol sont capables d'aider les plantes à se développer de différentes façons. Ils peuvent notamment rendre le phosphate soluble, donc facilement assimilable par les végétaux. Nous avons développé un test pour évaluer le nombre de microorganismes capables de réaliser cette fonction dans un sol donné, ce qui est difficile et coûteux à réaliser avec les technologies actuelles. Pour ce faire, nous avons cultivé des extraits de sol dans des gouttes de milieu de culture d'environ 700nl que nous avons observées au cours du temps grâce à une technologie conçue dans notre laboratoire. Avec notre milieu, toutes les gouttes sont initialement laiteuses ; celles dans lesquelles un microorganisme est capable de se développer et de solubiliser le phosphate deviennent translucides, ce qui est facile à détecter.

Nous avons mené ce test sur une douzaine de sols et montré que la majorité des gouttes qui étaient devenues transparentes avaient été fortement acidifiées.

MOTS CLÉS

Microbes du sol, millifluidique, solubilisation du phosphate, agriculture

ABSTRACT

Soil microorganisms can help plants grow in different ways. In particular, they can render phosphorus soluble, thus easy to assimilate by crops. We have developed a test to evaluate the number of microorganisms able to carry out this function in a given soil, which is difficult and costly to do with current technologies. In order to do this, we cultivated soil extracts in culture medium drops of about 700nl using a technology developed at our lab. We then optically monitored each drop over time. With our culture medium, the drops are initially milky; those that contain a microorganism able to grow and dissolve phosphate become translucent. This phenomenon can easily be detected in our device.

We conducted this test using a dozen different soils and showed that the majority of drops that became translucent had been strongly acidified. This sheds light on phosphate solubilization mechanisms of wild soil microorganisms.

KEYWORDS

Soil microbes, millifluidics, phosphate solubilisation, agriculture, segmented flow