Bactéries du sable de Merzouga

Maxime Gommeaux

▶ **To cite this version:**

Maxime Gommeaux. Bactéries du sable de Merzouga. Géologie appliquée. Université de droit, d'économie et des sciences - Aix-Marseille III, 2005. Français. NNT : . tel-00261542

HAL Id: tel-00261542
https://theses.hal.science/tel-00261542

Submitted on 7 Mar 2008

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.

Université Aix-Marseille III **École Doctorale Sciences de l'environnement**

Bactéries du sable de Merzouga

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Paul Cézanne Aix-Marseille III

Spécialité : Géosciences de l'environnement

par

Maxime Gommeaux

Soutenue publiquement devant la commission d'examen
le 20 septembre 2005 au Cerege

Composition du jury

Christian Jeanthon	Rapporteur	Directeur de recherche, CNRS – Station marine de Roscoff
Pascal Philippot	Rapporteur	Directeur de recherches, CNRS – IPG Paris
Thierry Heulin	Examinateur	Directeur de Recherches, CNRS – LEMiR
François Guyot	Examinateur	Professeur, Université Paris-VII
Philippe Gillet	Examinateur	Professeur, École normale supérieure de Lyon
Jean-Yves Bottero	Examinateur	Directeur de recherche, CNRS – Cerege, Aix-en-Provence

Laboratoire d'écologie microbienne de la rhizosphère
CE Cadarache – 13115 St Paul-lez-Durance Cedex

À Marie-Christine et Jacques

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier Thierry, qui m'a permis de mener cette thèse dans son laboratoire avec la plus grande liberté d'action et de pensée.

Tout épisodiques qu'aient été nos rencontres, François, elles furent l'occasion des plus grandes avancées de ce travail. La reconnaissance que je te porte va bien au-delà de ta qualité de co-directeur de thèse, même pas déclaré à l'administration !

Je remercie vivement les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail, remplissant encore un peu plus des agendas déjà chargés.

Toutes les personnes dont les noms apparaissent clairsemés dans ce manuscript (une sorte de cache-cache ?) sont ici remerciées. Ce fut un plaisir que de travailler avec vous tous, à Cadarache, Lyon, Paris, Angers ou ailleurs. Que notre collaboration ait été éphémère ou plus durable, trouvez ici l'expression de toute ma gratitude.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du LEMiR et à féliciter tous ceux qui n'ont jamais perdu patience devant mes incessantes questions. Delphine et Camille, qui se sont relayées à me supporter dans leur bureau, ont notamment su rester d'une sérénité exemplaire.

Je remercie aussi les jeunes du mardi matin pour le délicieux bouillon de culture servi à cette réunion (à laquelle je ne suis pas un modèle d'assiduité), ainsi que toute l'équipe administrative du DEVM, d'une efficacité redoutable pour affronter les petites tracasseries non-scientifiques qui parsèment la thèse.

Je remercie enfin Marine ; sans toi tout ne serait pas vraiment pareil.

Table des matières

Introduction **9**

I Diversité minéralogique du site de Merzouga 19

1 Présentation du site de Merzouga **21**
1.1 Localisation 21
1.2 Climat 24
1.2.1 Données météo résumées 24
1.2.2 Désert ? 24
1.3 Contexte géologique de Merzouga 26

2 Caractérisations globales du sable **29**
2.1 Analyses pédologiques 29
2.2 Tri magnétique du sable 31
2.3 Granulométrie du sable 33
2.4 Composition chimique du sable 33
2.5 Diffraction des rayons X 35
2.6 Spectroscopie Mössbauer 35
2.7 Conclusion des analyses globales 41

3 Analyses grain-par-grain **43**
3.1 Observation de lames minces au MEB-EDX 43
3.2 Spectroscopie micro-Raman 45

II Diversité bactérienne dans le sable 51

4 Diversité des bactéries dans le sable **53**
4.1 Méthodes 53
4.2 Article 58
4.3 Statistiques écologiques 84

4.3.1 Outils : courbe de raréfaction, communautés théoriques et estimateur ACE 84
4.3.2 Modèle : construction des courbes de raréfaction 87
4.3.3 Résultats des simulations 89
4.3.4 Diversité bactérienne à Merzouga 89

5 Diversité grain-par-grain 95
5.1 Article 96
5.2 Comparaison des diversités par AFC 115

III Météorologie et culture en conditions désertiques simulées 119

6 121
6.1 Description météo 121
6.1.1 Variations annuelle et diurne de la température et de l'humidité 122
6.1.2 Variation corrélée de la température et de l'humidité . 122
6.2 Culture en conditions désertiques simulées 122
6.2.1 Choix des conditions et dispositif expérimental 122
6.2.2 Résultats 128
6.2.3 Interprétation et discussion 128

Conclusion générale 137

A Cycle cellulaire de *Ramlibacter* 139

Introduction

La réalisation, à l'échelle globale, de bilans de quantification des grands cycles biogéochimiques requiert une connaissance approfondie de tous les environnements dans lesquels la vie se développe. La recherche de vie dans les habitats terrestres extrêmes occupe aussi une place centrale dans les interrogations sur les origines de la vie et sur la possibilité de vie extra-terrestre. Dans les scénarios d'exobiologie, on considère que l'eau liquide est nécessaire à l'« habitabilité » des planètes et à la vie en général. Au cours des dernières décennies, la gamme connue d'environnements habités s'est très largement étendue, y compris à des environnements dépourvus d'eau liquide. Une des plus surprenantes découvertes a été celle, en 1977, des écosystèmes océaniques profonds associés aux sources hydrothermales, premier écosystème connu totalement basé sur la production primaire de bactéries chémosynthétiques (Prieur *et al.*, [70]). L'endroit le plus aride de la planète, le désert d'Atacama au Chili, est le seul environnement naturel probablement stérile à la surface de la Terre (Navarro-Gonzalez *et al.*, [65]). Marion *et al.*, [59], donnent les caractéristiques extrêmes des environnements dans lesquels la vie existe de façon certaine :

1. la gamme de température s'étend de 253 à 394 K(soit -20 à 121 °C) ;
2. la gamme de salinité, mesurée en termes d'activité de l'eau, va de 0,6 à 1 ;
3. le pH va de 0 à 13 ;
4. la pression (hydrostatique) va de 0 (vide poussé) à 1100 bar.

Les *extrêmophiles*, « organismes florissant dans des habitats où la température, le pH, la salinité ou la pression sont extrêmes » (Ciaramella *et al.*, [21]), sont regroupés en catégories selon le stress auquel ils sont adaptés :

- les *thermophiles* et *psychrophiles* sont respectivement adaptés aux hautes et basses températures, des plus chaudes sources hydrothermales (par exemple Deming, [23]) jusqu'au permafrost sibérien (Bakermans *et al.*, [7]) ;

- les *piézophiles* ou *barophiles* sont adaptés aux fortes pressions[1], comme celles des grands fonds océaniques (Margesin, [57]) ;
- les *acidophiles*, *alcali(no)philes* et *halophiles* sont adaptés à l'acidité, la basicité ou la forte salinité du milieu (comme les bassins hypersalins et anoxiques au fond de la mer Méditerranée, qui résultent de la dissolution de dépôts de sel du Miocène, van der Wielen *et al.*, [91]) ;
- les *aérophiles* résistent à un transport atmosphérique et sont fréquents dans les aérosols, y compris au-dessus des déserts (Lighthart et Shaffer, [53])...

Le développement des activités humaines élargit encore la gamme de conditions « extrêmes ». L'industrialisation et les pollutions associées, notamment chimique, organique et radiologique, créent des environnements artificiels qui sont aussi en quasi-totalité colonisés par des micro-organismes adaptés (voir par exemple Backman et Jansson, [4]). Même l'exploration spatiale a permis d'isoler des bactéries, contaminant les systèmes d'eau de la station spatiale internationale, tolérant la micro-gravité (Baker et Leff, [6]) ou capables, sur une courte durée, de survivre au vide (et donc à la dessication) et aux radiations UV intenses du milieu spatial (Saffary *et al.*, [78]). Cherchant à étayer l'hypothèse de la panspermie, des tests ballistiques sont menés, qui visent à reproduire le choc de la chute d'une météorite et à prouver que des spores portées par la météorite pourraient y survivre (Benardini *et al.*, [9]) !

Les organismes capables de vivre dans les environnements pollués, en dégradant les composés polluants, ont un intérêt évident même si les connaissances nécessaires à l'élaboration de procédés de dépollution efficaces sont très importantes (Lovley, [54]). Les utilisations technologiques des organismes extrêmophiles dépassent très largement la biorémédiation. De nombreuses protéines thermostables, maintenant indispensables en recherche et en industrie, ont été isolées à partir de bactéries du genre *Thermus*. Espérant reproduire le succès (planétaire) de la Taq, les chercheurs exploitent maintenant les données issus du séquençage intégral du génôme d'organismes extrêmophiles comme *Thermus thermophilus* (Henne *et al.*, [38]).

Par rapport aux environnements cités plus haut, il apparaît nécessaire de distinguer la faculté des organismes de survivre à l'application d'un stress (ponctuelle ou plus fréquente ou prolongée), de la faculté d'avoir une activité métabolique normale ou quasi-normale en présence de ce stress. Les déserts chauds se caractérisent par le caractère intermittent des

[1] Nous ne connaissons pas d'adjectif qualifiant les organismes résistant au vide.

extrêmes, de température et d'humidité. La condition extrême, la chaleur d'après-midi associée à une très forte dessication (activité de l'eau inférieure à 0,2, soit 20% d'humidité relative), ne permet aucune activité microbienne. Par contre, les organismes qui y survivent, à l'état dormant, profitent des périodes de conditions plus clémentes. Ces organismes sont qualifiés d'« anhydrobiotiques ». Antoni van Leeuwenhoek a décrit il y a plus de trois cents ans la reviviscence des « animalcules » (Rotifères), initialement séchés, lors de leur réhydratation.

Le cas le plus étudié actuellement est celui des croûtes microbiennes des déserts. Garcia-Pichel et Pringault, [32], ont étudié les bad-lands d'Espagne et ont montré que les cyanobactéries se déplacent activement verticalement en réponse à l'humidification ou à l'assèchement de la surface du sol. Ceci permet d'assurer au mieux la production primaire, photosynthétique, quand les conditions sont favorables, tout en évitant la sécheresse de couches les plus superficielles du sol quand l'eau disparaît. Bär *et al.*, [15], ont établi un modèle mathématique de la dormance. D'après leur étude, la dormance n'est potentiellement avantageuse que si la mortalité des bactéries dormantes est nettement inférieure à celle des bactéries non-dormantes. Ceci est réalisé dans le cas d'un stress intermittent appliqué au système, comme des événements de pluie brefs et intenses séparés par des périodes de sécheresse. Dans le cas d'un apport d'eau constant (même extrêmement faible), la dormance ne constitue pas un avantage. Toutefois, les perturbations de l'écosystème, comme le piétinement par le bétail, augmentent la mortalité des bactéries, qu'elles soient dormantes ou non. La dormance n'étant potentiellement avantageuse que si la mortalité des bactéries dormantes est nettement inférieure à celle des bactéries non-dormantes, l'avantage disparaît en cas de telles perturbations. Cable et Huxman, [17], ont mesuré la part des croûtes microbiennes dans la respiration du sol du désert de Sonora en fonction de l'intensité des pulses expérimentaux de précipitations. Lors des événements les plus intenses, les plantes et bactéries du sol contribuent à la quasi-totalité du flux de CO_2. Lors des événements de faible intensité, qui constituent l'essentiel des précipitations en Arizona, le « réveil » des organismes des croûtes participe à hauteur de 80% à la production de CO_2 par le sol. Les croûtes contribuent donc fréquemment à la production de l'écosystème.

Billi et Potts, [11], posent les questions fondamentales de l'étude des mécanismes de tolérance à la dessication. Quel est le contenu en eau d'une cellule anhydrobiotique ? Comment certaines espèces bactériennes font-elles face au déficit en eau alors que d'autres ne le peuvent pas ? Combien de temps les cellules desséchées restent-elles viables ? Deux processus entraînent un efflux de l'eau des cellules, le dessèchement par l'air et le stress hypertonique. Mais même chez les plus extrêmes des bactéries halophiles, la perte

d'eau reste très inférieure à celle des cellules anhydrobiotiques. Chez ces-dernières, le contenu résiduel est souvent moins de 0,1 g/g poids sec (et cette eau ne suffit même pas à maintenir une monocouche d'eau autour des macromolécules, rendant notamment impossible toute réaction enzymatique). On considère que les bactéries sensibles à la dessication sont celles qui meurent quand leur contenu en eau est réduit à 0,3 g/g poids sec. Les premiers stades du dessèchement entraînent un stress osmotique, dont les micro-organismes se prémunissent principalement par l'accumulation intracellulaire de solutés. Les solutés organiques accumulés, comme le tréhalose (un disaccharide), la proline (un acide aminé) et la glycine-bétaïne (carboxyméthyl-triméthyl-ammonium) sont dits « compatibles » car ils ne perturbent pas le fonctionnement des macromolécules et le métabolisme cellulaire (Kempf et Bremer, [48]). Une telle contrainte de « compatibilité » explique sans doute le fait que ces solutés sont les mêmes chez les bactéries, les archées et les eucaryotes. La cellule maintient une activité plus ou moins normale tant que l'accumulation des solutés évite des pertes d'eau trop importantes. Surviennent ensuite les dommages liés à la dessication. Les changements de conformation des protéines entraînent un mauvais fonctionnement des enzymes, des chaînes de transport d'électrons. Le stress oxydant peut alors entraîner des dommages chimiques aux molécules biologiques, notamment à l'ADN. Le manque d'eau perturbe aussi la structure des membranes, car les interactions électrostatiques et hydrophile-hydrophobe qui maintiennent normalement en place les lipides membranaires sont perturbées.

Inversement, certains organismes possèdent des systèmes qui minimisent les pertes d'eau. À la différence des *spores*, qui sont presque totalement deshydratées, les *kystes* ont une teneur en eau comparable à celle des cellules végétatives. Le processus d'enkystement inclut la formation d'une paroi cellulaire plus ou moins épaisse qui limite les échanges avec l'extérieur (Singleton et Sainsbury, [80]). Les kystes, dont *Azotobacter* est l'exemple le plus connu, sont généralement métaboliquement dormants et incapables de se diviser. Cette distinction renvoie à la différence entre les notions d'*évitement* (avoidance) et de *tolérance* (tolerance). L'*évitement* regroupe tous les processus qui maintiennent la cellule ou l'organisme en déséquilibre thermodynamique avec son milieu, par l'établissement de barrières physiques qui isolent l'individu ou par une exclusion constante du stress par une barrière chimique ou métabolique. La *tolérance* est la capacité pour l'organisme, à l'équilibre thermodynamique avec le stress, de ne pas en souffrir en prévenant, diminuant ou réparant les dommages causés par le stress. La résistance de certains organismes implique à la fois des mécanismes de tolérance et d'évitement (Sugiyama et Nikara, [84]), dont les contributions respectives sont délicates à estimer.

Les bactéries qu'il est possible de mettre en culture à partir du sable de Merzouga sont, par définition, résistantes aux stress de l'environnement désertique. Le but de cette thèse n'est pas de déterminer quels sont les mécanismes physiologiques de cette résistance mais d'estimer l'importance du substrat minéral pour la communauté bactérienne. En effet, en l'absence de phase liquide, la situation du sable est fondalement différente de celle d'un sol tempéré. Les bactéries sont en relation directe avec les particules minérales, ou avec les rares particules riches en matière organique. Dans les systèmes naturels (les poussières atmosphériques étudiées par Tong et Lighthart, [87]) ou artificiels (les réseaux de distribution d'eau étudiés par Wu *et al.*, [93]), les particules minérales protègent les bactéries associées des effets délétères des radiations solaires ou des UV utilisés pour la désinfection. De même, les associations avec les particules décrites par Lunsdorf *et al.*, [55], créent des micro-habitats aux conditions physico-chimiques différentes (et plus favorables) de celles du sol « moyen ». L'étude des interactions entre les bactéries et les minéraux dans les environnements arides possède donc un double intérêt. Outre les quantifications des activités métaboliques géochimiquement pertinentes, l'étude de la participation des minéraux aux mécanismes de résistance des bactéries aux stress de l'environnement prend dans les déserts tout son sens.

L'étude de la diversité d'une communauté bactérienne est nécessaire avant les études fonctionnelles ou physiologiques. La *diversité* d'une communauté repose sur trois points (Dunbar *et al.*, [24]). La *composition* est l'inventaire des types bactériens présents (au niveau taxonomique choisi), la *richesse* est le nombre de types et la *structure* est l'abondance relative des différents types. Les méthodes moléculaires basées sur les séquences d'ADNr-16S permettent de mieux appréhender chacun de ces trois points (Amann *et al.*, [3]) et de s'affranchir des lacunes des méthodes basées uniquement sur les cultures pures. Quelle que soit la complexité du système étudié, il est possible d'obtenir les séquences des bactéries majoritaires. Les méthodes d'hybridation *in situ* par des sondes oligonucléotides, basées sur les séquences des bactéries supposées majoritaires, permettent d'estimer leurs effectifs et donc de réaliser une estimation de la structure de la communauté. La structure peut être appréhendée de plus en plus précisément par l'emploi successif de sondes de spécificité croissante (approche *top-bottom*). Dans certains cas, ces méthodes d'hybridation permettent même d'obtenir des informations morphologiques ou physiologiques (comme le contenu cellulaire en ARN, qui renseigne sur le taux de croissance et l'activité des bactéries). Les approches basées sur la mise en culture des micro-organismes, malgré les limites évoquées plus haut, conservent un fort intérêt écologique. Garland *et al.*, [33], considèrent que les

bactéries « cultivables » sont celles qui sont capables de coloniser rapidement un milieu peu contraignant. La proportion de ces bactéries « opportunistes » dans la flore totale serait donc un bon indicateur de l'état, par rapport à la succession écologique, des communautés.

Malgré les avancées récentes permises par ces méthodes, la diversité absolue des bactéries est inconnue et souvent considérée comme hors de portée (Curtis *et al.*, [22], Cases et Lorenzo, [18]), et ce quelle que soit l'échelle ou l'environnement. Il est généralement impossible de réaliser un inventaire exhaustif des types bactériens présents, mais les méthodes statistiques utilisant des modèles de structure de communauté permettent d'extrapoler les abondances des types majoritaires pour estimer le nombre de taxa présents. Les études synthétisées par Torsvik *et al.*, [90], ont été menées dans des environnements très divers, autant « naturels » (tempérés comme les sols forestiers, sédiments marins ou extrêmes comme des bassins saumâtres saturés en sel) que perturbés par les activités humaines (sols agricoles, ou zones marines à forte pollution organique). En analysant l'hybridation des ADN extraits (et posant une définition de l'espèce bactérienne à 70% d'homologie), les estimations de la complexité génétique des communautés bactériennes étudiées vont de 7 à plus de 10000 équivalents-génômes par cm^3. Curtis *et al.*, [22], étudiant les relations entre la diversité locale et la diversité globale, émettent aussi l'hypothèse que la diversité bactérienne globale est constituée d'un nombre relativement faible de taxa ubiquitaires. Une estimation quelque peu précise de l'abondance des deux ou trois taxa majoritaires améliorerait significativement notre connaissance de la diversité globale. Elle fournirait aussi un test très intéressant de l'hypothèse log-normale de distribution des espèces bactériennes, qui constitue la base de la plupart des modélisations mathématiques en écologie microbienne. Découlant d'hypothèses robustes sur les mécanismes qui régulent la densité des espèces (Engen et Lande, [25]), le modèle log-normal est la meilleure approximation disponible pour la plupart des écosystèmes. Cette hypothèse semble toutefois mise en défaut dans certains environnements. Zhou *et al.*, [97], ont étudié différents sols et leurs horizons contenant différentes teneurs en eau et en matière organique. Un sol de surface, non saturé en eau et pauvre en carbone, a montré une communauté microbienne très uniforme, au sein de laquelle toutes les espèces étaient également abondantes. L'horizon inférieur du même sol, lui aussi pauvre en carbone mais saturé en eau, montrait une distribution spécifique plus classique, dominée par quelques taxa. On considère très généralement que la dominance est le résultat d'interactions compétitives. Zhou *et al.* proposent quatre facteurs susceptibles d'entraîner la répartition uniforme qu'ils ont observée. Une grande abondance de ressources réduit la compétition, permettant l'établissement d'une grande diversité. L'existence de la ressource sous

différentes formes peut entraîner une spécialisation des espèces, réduisant la compétition. La séparation spatiale des ressources peut résulter en une séparation physique des populations, évitant encore la compétition. Des conditions environnementales fluctuantes peuvent enfin entretenir une situation hors-équilibre avec des populations plus diverses. Zhou *et al.* proposent aussi un modèle mathématique permettant de tester l'influence de chacun de ces quatre paramètres sur la structure de la communauté bactérienne.

Les études de la diversité bactérienne dans les zones arides sont plus fréquemment menées dans des zones où un couvert végétal, même très clairsemé, existe, que dans des zones véritablement dépourvues de végétation. Elles comparent souvent les caractéristiques de la communauté microbienne du sol près ou loin des plantes. Kuske *et al.*, [52], ont comparé les rhizosphères de trois plantes du plateau aride du Colorado et les espaces sans végétation mais portant une croûte microbienne (à trois profondeurs différentes, de la surface du sol à 30 cm). Deux plantes étaient autochtones typiques et la troisième était une espèce invasive. La quantité d'ADN extraite des sols rhizosphériques, et donc la biomasse bactérienne, était supérieure à celle des espaces inter-plantes. Le concept d'« îlots de fertilité » correspond dans les environnements arides, où les nutriments sont peu abondants et répartis inégalement, à la plus nombreuse population microbienne dans la rhizosphère des plantes. Les microorganismes favorisent la croissance des plantes en fixant l'azote, limitant des pathogènes et favorisant la dissolution des minéraux. Mais la notion souvent admise d'« îlots de fertilité » était infirmée dans l'étude de Kuske *et al.* par des quantités de carbone organique du sol et un nombre de bactéries hétérotrophes cultivables partout similaires. Toutefois, les structures des quatre communautés bactériennes étaient notablement différentes. L'étude plus précise du groupe des *Acidobacteria*, très divers et connus dans de nombreux types de sols et environnements dans le monde entier, révélait des différences plus marquées encore. Le rôle fonctionnel de ces bactéries dans les sols n'est pas connu, mais cette étude a démontré que différents membres de cette division occupent différentes niches écologiques et seraient donc très intéressants à suivre dans la perspective de changements de type de couvert végétal liés aux modifications de l'environnement.

Aguilera *et al.*, [1], ont ajouté à ce type de comparaison entre le sol rhizosphérique et et le sol loin des plantes, une étude de la variabilité annuelle. Le désert côtier du Chili a connu une sécheresse de huit mois jusqu'à l'automne 1997 (en avril) et des pluies très intenses au printemps suivant (octobre 1997), quatre fois plus importantes que la moyenne saisonnière et liées au phénomène El Niño. Si les micro-organismes des deux types de sol étaient environ deux ordres de grandeur plus nombreux au printemps qu'en automne, les paramètres chimiques des sols (matière organique, azote, phos-

phore, potassium) ne connaissaient pas d'effet saisonnier. Bird *et al.*, [12], ont étudié des sols arides du Nouveau-Mexique, constitués de patches de végétation avec des espaces qui les séparent, mais n'ont pas observé de teneurs uniformes (rapportées par Kuske *et al.*) en matière organique dans le sol rhizosphérique et entre les plantes. Ils en ont déduit que la teneur en carbone, en t/ha est très variable, tant à l'échelle du patch de végétation qu'à l'échelle du paysage. Cette conclusion est en accord avec l'hypothèse des « îlots de fertilité ».

Dunbar *et al.*, [24], ont étudié la rhizosphère de pins pignons et les espaces entre les arbres sur deux sites dans une région aride boisée du nord de l'Arizona, soit quatre échantillons. Le champ de cendres vieux de 900 ans d'un volcan éteint constitue un des sites étudiés. L'autre est un sol sableux typique de la région. Les deux sites connaissent le même régime de précipitations, mais le sol cendreux est plus grossier et mieux drainé. De plus, sa couleur très sombre crée un environnement plus chaud que le sol sableux (sécheresse édaphique, Kuske *et al.*, [51]). Contrairement au sol sableux qui porte quelques herbes, les espaces entre les arbres ne portent pas de végétation sur le sol cendreux. Les auteurs ont comparé la diversité bactérienne par polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) de l'ADNr-16S et par séquençage du même gène, tant sur des isolats bactériens cultivés qu'après extraction de l'ADN du sol et clonage. Tous les paramètres analysés par les auteurs indiquent que les espaces entre les arbres sur le cratère volcanique recèlent une communauté nettement distincte des trois autres échantillons. Dans cet échantillon, les *Acidobactéries* étaient majoritaires chez les clones, qui comptaient aussi de nombreuses *Protéobactéries* et *Verrucomicrobiales*. Au total, sept divisions bactériennes étaient représentées (faibles nombres de bactéries gram-positives, de *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, *Nitrospira* et *Planctomycétales*). Parmi les isolats, seules trois divisions de bactéries étaient représentées. Les bactéries à gram positif (surtout les *Bacillus*, qui se développent très rapidement sur boîte) étaient majoritaires, les *Protéobactéries* et *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* étant minoritaires. Cette étude souvent citée constitue une référence en écologie microbienne des zones arides.

La thématique géomicrobiologique a démarré au LEMiR à la fin des années 1990. Le principal objet d'étude était à l'époque la météorite de Tataouine et les objets particuliers, de forme similaire à des bactéries, observés à la surface des fragments météoritiques qui ont séjourné plus de

soixante ans dans le sable après la chute (voir Gillet *et al.*, [35]). L'étude de l'altération des minéraux en milieux arides est motivée par le fait que de très nombreuses découvertes de météorites ont lieu dans les déserts, chauds ou froids. Ces découvertes ayant généralement lieu longtemps après la chute, l'altération terrestre est susceptible de brouiller le message chimique porté par les météorites.

Le programme Géomicrobiologie des milieux extrêmes (Geomex) du CNRS a élargi le cadre, géographique et scientifique, des études. Les déserts chauds sont un des environnements étudiés. De nombreux travaux sont en cours, qui visent à déterminer les modes de résistance des bactéries aux stress de l'environnement (notamment la dessication et les rayonnements solaires). La connaissance des conditions de vie des micro-organismes vise aussi à estimer la participation des déserts aux cycles géochimiques à la surface de la Terre. En effet, les déserts chauds représentent des surfaces considérables, il ne paraît pas possible de considérer que la somme des activités métaboliques des bactéries y est nulle.

Mon travail de thèse a commencé par un inventaire des espèces minérales constituant le sable et des espèces bactériennes présentes à la surface des grains. Nous avons ensuite cherché à déterminer comment ces espèces bactériennes se répartissent sur les différents grains, s'il existe une relation entre un type minéral et une ou plusieurs espèces. Ce travail descriptif a été mené dans le but d'ouvrir des pistes sur le fonctionnement de l'écosystème. Par la réalisation de cultures en conditions d'humidité contrôlée, nous avons enfin commencé à délimiter les conditions environnementales dans lesquelles l'activité bactérienne est possible.

Le plan de l'exposé suit cette démarche. La première partie décrit le site de Merzouga, d'un point de vue géologique (climatique succinct et minéralogique) et le sable que nous avons étudié. Viennent ensuite la description globale de la diversité bactérienne dans le sable et l'estimation de la relation entre les types minéralogiques de grains et les espèces de bactéries cultivables. La troisième partie rapporte l'analyse plus détaillée des conditions climatiques de la dune de Merzouga et les expériences que nous avons commencé à mener pour délimiter quelles conditions permettent une activité bactérienne.

Nous avons inséré en annexe un article traitant du cycle cellulaire de développement d'une bactérie-modèle isolée d'un sable tunisien. Nous pensons en effet que ce cycle particulier constitue un élément d'adaptation au milieu aride.

Première partie

Diversité minéralogique du site de Merzouga

Chapitre 1

Présentation du site de Merzouga

Résumé du chapitre

L'erg Chebbi est situé près du village de Merzouga, dans un large ensemble de vallées temporaires, l'oued Ziz. L'aridité due au climat est renforcée par la nature du « sol ». L'erg repose en discordance sur un très large affleurement de sédiments de l'ère primaire. Le désert à proprement parler est situé plus au sud et à l'est, en Algérie où l'on trouve les grands plateaux désertiques (roc et graviers, ou regs), les Hamadas.

1.1 Localisation

Le site que nous avons étudié, l'erg Chebbi, est un petit erg, ensemble de dunes de sable, situé à la terminaison orientale de la chaîne de montagnes de l'Anti-Atlas (qui porte de le nom de Jbel Sarhro), au sud du Haut-Atlas (voir la Figure 1.1). Il est situé dans la vallée d'une rivière endoréique qui porte plus au sud, en Algérie, le nom de Douara, et disparaît dans l'Hamada du Drâa. En amont de Merzouga, au pied du Haut-Atlas près d'Errachidia, la rivière est aménagée par deux barrages pour l'irrigation, dont le grand barrage Hassan-Addakhil (visible sur le bloc-diagramme de la Figure 1.6 p. 28). À la hauteur de Merzouga, plusieurs branches temporaires constituent l'Oued Ziz, qui coule essentiellement après les épisodes de précipitations. L'erg Chebbi, d'une longueur de 20 km (nord-sud) pour une largeur d'environ 7 km (est-ouest), abrite les plus hautes dunes du Maroc.

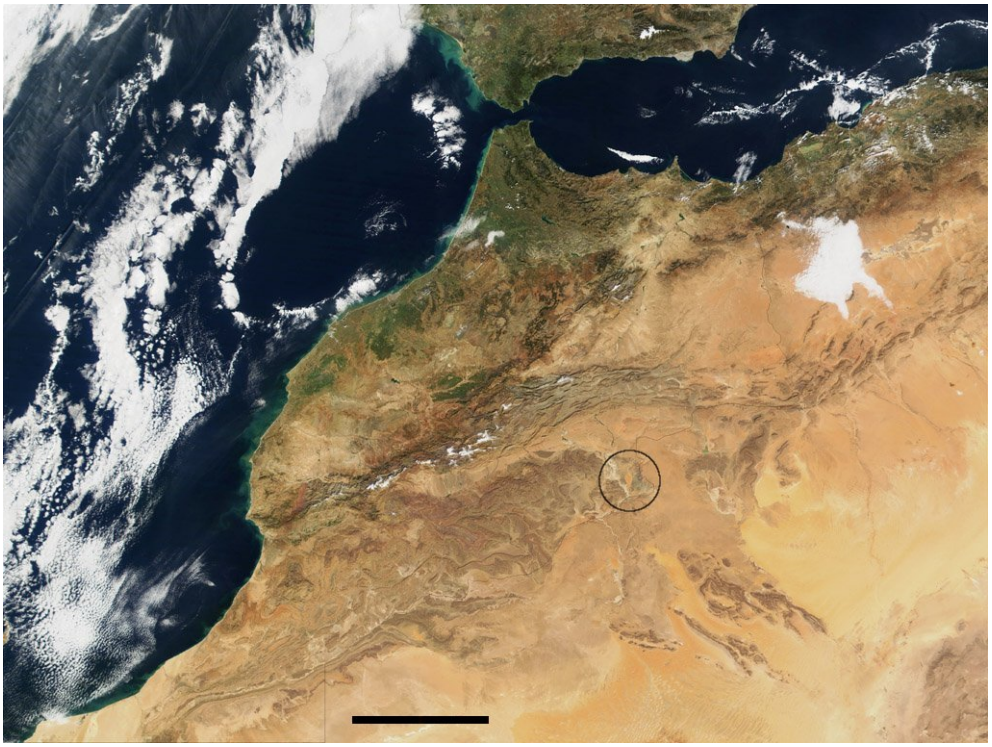


FIG. 1.1 – Vue satellitaire du Maroc, obtenue sur le site internet `visibleearth.nasa.gov`. Le cercle donne la localisation de l'erg Chebbi. Barre d'échelle : 200 km.

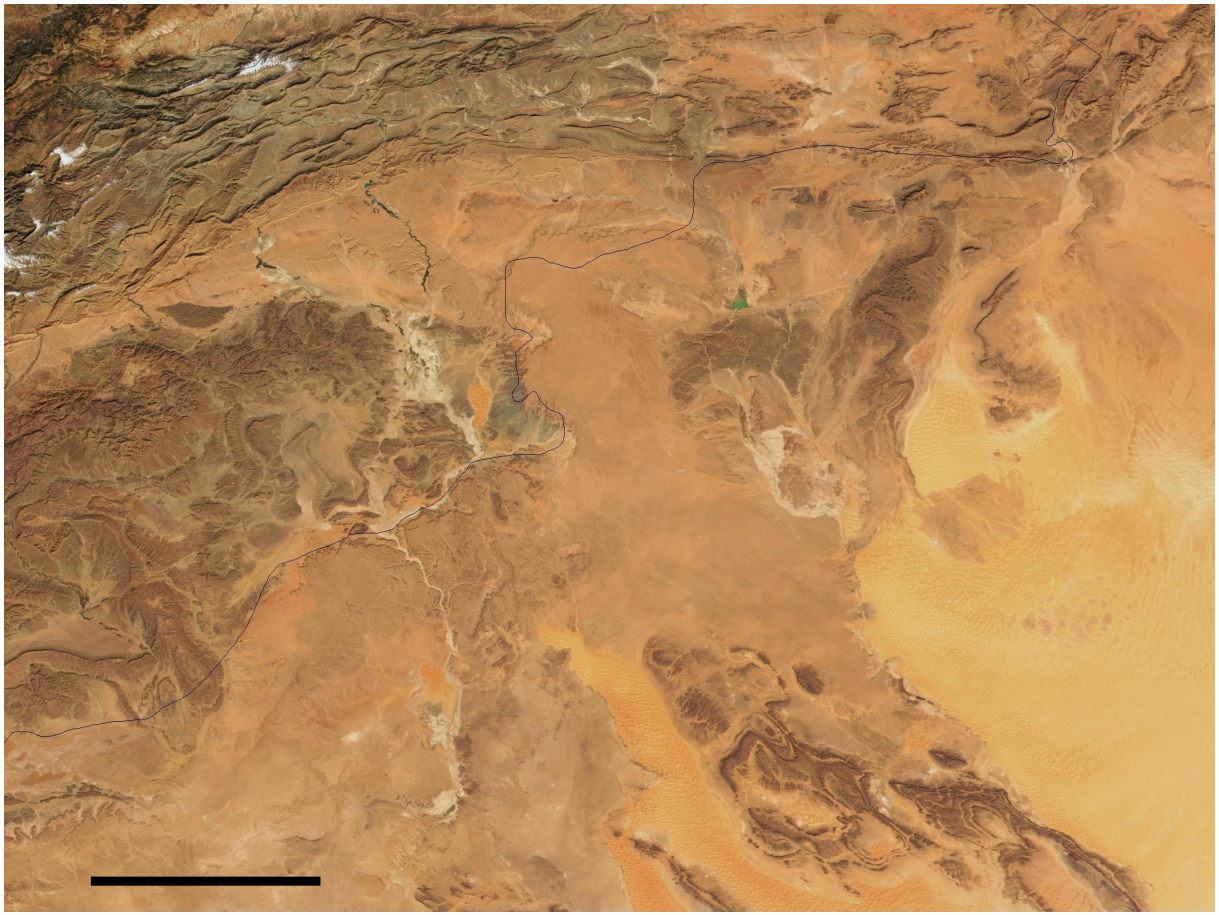


FIG. 1.2 – Aggrandissement de la zone de l'erg Chebbi. À l'est de Merzouga, en Algérie, l'Hamada du Guir, grand plateau désertique (reg). Encore plus à l'est, le Grand erg occidental. Au sud de l'image, qui apparaît rouge, l'Erg Er Raoui. Barre d'échelle : 100 km.

1.2 Climat

1.2.1 Données météo résumées

Nous avons obtenu l'enregistrement météorologique trihoraire pour la station d'Errachidia, la plus proche de Merzouga, pour l'année 2002. Les données ont été obtenues avec l'aide de Mlle Christel ICARD de MétéoFrance, en provenance de l'Office Météorologique National du Maroc. Les données sont résumées dans les diagrammes de la Figure 1.3. Elles seront discutées plus en détail dans la partie 6.1. Les températures extrêmes relevées sont de -0,6 °C le 8 janvier à 9h00 et 41,7 °C le 23 juillet vers 15h00 (voir Figure 1.3(b)). Les températures moyennes mensuelles vont de 3 °C en janvier à 25 °C en juillet pour les minimales et de 17 °C à 39 °C les mêmes mois pour les maximales (voir Figure 1.3(a)). La pluviométrie totale est de 191 mm, dont 60 mm reçus en avril, mois le plus pluvieux (voir Figure 1.3(c)). Cinq mois n'ont vu aucun jour « de pluie » (c'est-à-dire aucun jour avec plus de 2,5 mm de précipitations), janvier, juin, juillet, octobre et décembre. Le nombre total de jours de pluie en 2002 est de 16 (voir Figure 1.3(d)).

1.2.2 Désert ?

L'erg Chebbi est-il un désert selon les critères classiques ? Il existe de nombreuses définitions du désert. La quantité annuelle de précipitations est importante mais n'est pas un critère suffisant. Les pertes d'eau, principalement par évaporation, sont primordiales. Par exemple, la région d'Hillet Doleib, au Soudan, reçoit plus de 75 cm d'eau par an. Mais la pluie tombe surtout en été, quand les températures moyennes journalières sont de plus de 26 °C. L'aridité est équivalente à celle d'autres endroits d'Afrique du Nord qui reçoivent dix fois moins d'eau. À l'inverse, certains régions de l'ouest de l'Australie ne reçoivent que 25 cm d'eau. Mais les précipitations sont régulières au long de la saison la plus fraîche, et suffisent à la croissance de bonnes récoltes de blé (Miller [63], in Warner [92]). Miller, [63], a établi une définition du désert communément acceptée, qui tient compte de la température, qui influe sur l'évaporation. Un désert est une région où $P < T/5$, où P est la quantité annuelle de pluie, en pouces, et T la température annuelle moyenne, en degrés Fahrenheit. T est la moyenne des températures moyennes journalières, qui sont la moyenne des températures minimale et maximale relevées quotidiennement. La température moyenne annuelle à Merzouga est $T = 20,6$ °C $= 69$ °F. La quantité seuil de précipitations est donc $R_{inf} = 13,8" = 350$ mm. La région de Merzouga, qui n'a reçu en 2002 que 191 mm de pluie correspond bien à cette définition

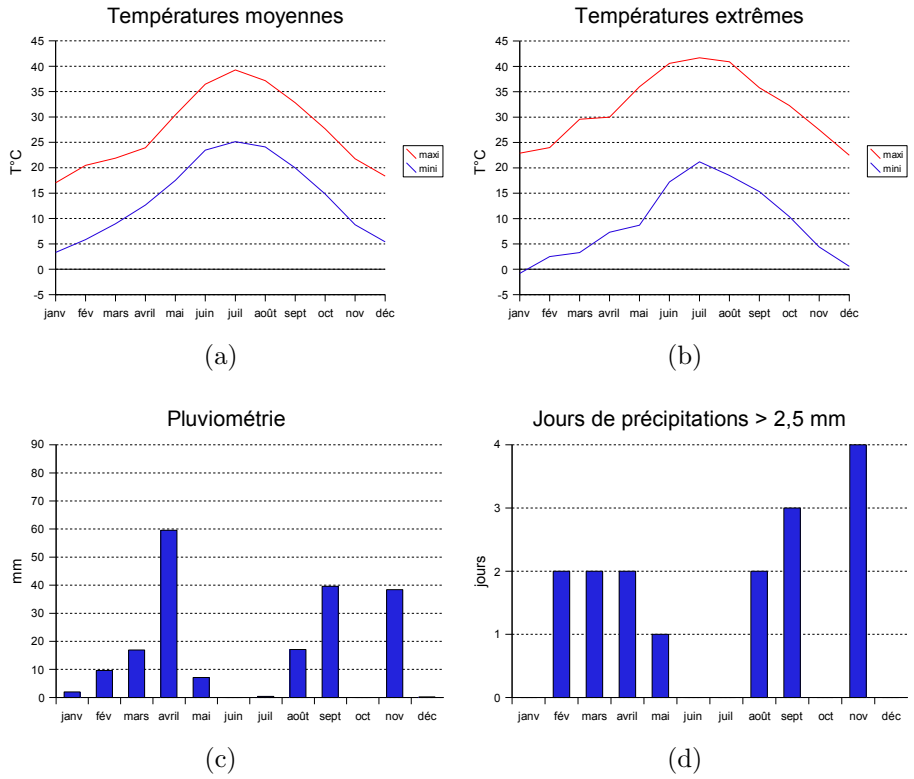


FIG. 1.3 – Résumé des données météorologiques de la station d'Errachidia, année 2002.

du désert. La région autour de l'erg compte une végétation clairsemée. L'absence de végétation sur l'erg résulte aussi de la nature du « sol », qui retient mal l'eau et est en permanence remobilisé par le vent. On parle de sécheresse édaphique.

1.3 Contexte géologique de Merzouga

D'après la carte géologique[1], la zone est constituée essentiellement de roches sédimentaires, dont les âges s'étendent de l'ère primaire pour le « socle » au quaternaire récent pour les termes les plus superficiels de la couverture, dont les dunes (voir Figure 1.4).

Le sous-sol de la vallée du Ziz est constitué pour l'essentiel de sédiments de l'ère primaire, du cambrien au carbonifère. La série primaire, plissée, comprend en majorité des dépôts terrigènes, sédimentés en domaine marin peu profond. Absents du cambrien (km), qui est gréseux, des niveaux carbonatés apparaissent épisodiquement vers le sommet de l'ordovicien (OS). Le dévonien, inférieur et moyen, voit une influence carbonatée plus marquée. L'ordovicien supérieur et le silurien sont des schistes, avec des niveaux carbonatés épisodiques. Le carbonifère constitue le substratum du village de Merzouga et de l'erg Chebbi. Le carbonifère inférieur est constitué de schistes argileux et d'argilites et le carbonifère supérieur d'une succession de poudingues, de grès et de pélites, et de roches biogéniques comme les calcaires récifaux. Le permien n'affleure pratiquement pas dans cette zone.

La série primaire repose en discordance sur un substratum précambrien constitué de séries volcano-sédimentaires et volcaniques. Affectée par de faibles déformations, elle a enregistré une tectonique synsédimentaire cassante (Montenat *et al.*, [64]). Des accidents actifs pendant la sédimentation ont été repris ultérieurement, lors des déformations hercyniennes, la structuration hercynienne de la zone restant faible. On remarque des plis de grande longueur d'onde, ainsi que le résultat du rejeu des failles synsédimentaires. Toute la série primaire est recoupée par des intrusions de dykes et de sills de dolérite et de diorite. Les événements volcaniques sont triasico-liasiques, datés à 181-187 Myr et liés à l'ouverture de l'océan Atlantique.

Discordant sur cette série primaire, on trouve les roches principalement calcaires du crétacé (cm) et du tertiaire. Leurs termes en sont continentaux, lacustres. Les affleurements sont très tabulaires, donnant notamment naissance au paysage des Hamadas (dont l'Hamada du Guir à 50km à l'est de Merzouga, visible sur la photo satellite Fig. 1.1). En prolongement de cette

[1] Carte géologique du Maroc.- 1 :1 000 000.- Ed. du Service géologique du Maroc [Rabat], 1985.- (Notes et mémoires du Service Géologique ; 260)

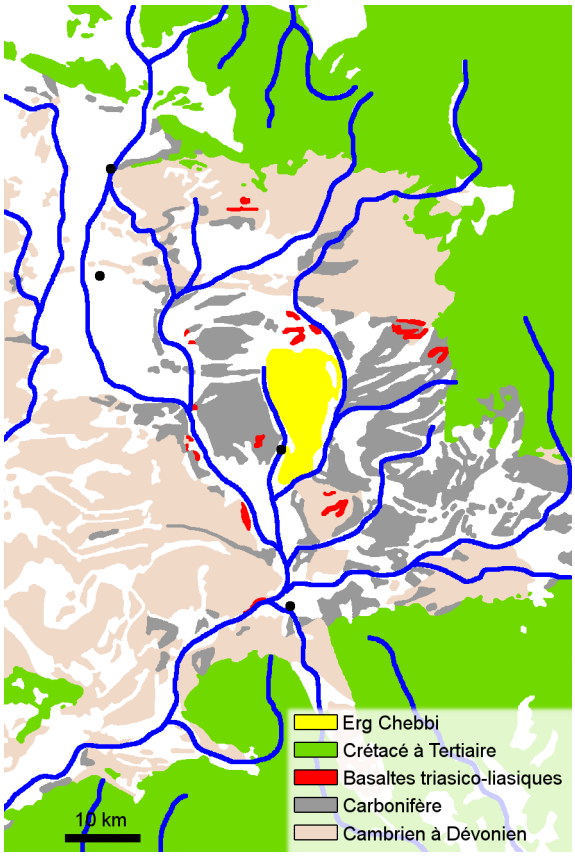


FIG. 1.4 – Carte géologique simplifiée de la région de Merzouga. Le village de Merzouga est situé au bord ouest de l'erg Chebbi, entouré d'affleurements de carbonates du Carbonifère.

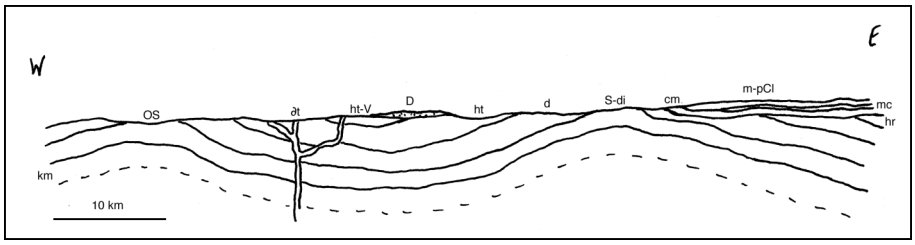


FIG. 1.5 – Coupe de la région de Merzouga (figurés : voir texte)

série, ou en discordance directement sur les terrains primaires, on trouve les sédiments quaternaires, notamment un pléistocène reposant discordant sur le viséen à proximité immédiate de Merzouga.

La Figure 1.5 synthétise ces observations sous la forme d'une coupe à main levée. La Figure 1.6 présente la structure de la région.

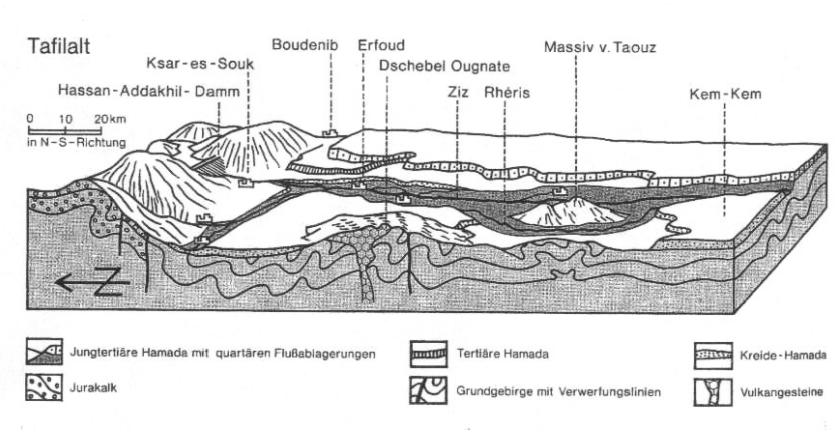


FIG. 1.6 – Bloc-diagramme donnant la structure géologique de la région (Jäger, [45]). Légende, première ligne : Hamada du tertiaire récent avec des dépôts fluviatiles quaternaires ; Hamada tertiaire ; Hamada crayeuse ; Deuxième ligne : Calcaire jurassique ; Socle affecté de failles ; Roches volcaniques. Le village de Merzouga et l'erg Chebbi sont situés environ à mi-chemin entre Errachidia et Taouz.

Chapitre 2

Caractérisations globales du sable

Résumé du chapitre

Nous appelons ici analyses « globales » les études qui rendent compte des caractéristiques moyennes du sable à l'échelle de quelques grammes, soit de quelques dizaines de milliers de grains. Le sable est difficilement comparable à un sol tempéré, car il ne contient presque pas de matière organique. Il est essentiellement constitué de grains de quartz (et, chimiquement, de silice), mais une fraction d'autres minéraux peut être mise en évidence et extraite par tri magnétique. Cette fraction est très enrichie en minéraux ferrifères, comprenant à la fois des minéraux primaires (même s'il est difficile de déterminer la nature de la roche-mère) et des minéraux secondaires, formés à la surface.

2.1 Analyses pédologiques

Malgré la nature quasiment exclusivement minérale du sable (et non pas organo-minérale), nous avons fait réaliser une analyse pédologique du sable. Celle-ci a été faite suivant les protocoles standards de l'INRA, en son laboratoire d'Arras. Les résultats sont donnés dans le tableau 2.1. Pour comparaison nous avons figuré les mêmes analyses réalisées sur un sol calcaire de Cadarache, anciennement cultivé mais laissé actuellement à l'abandon depuis le milieu des années 80 (Thèse T. Perrier, [68]).

La granulométrie est clairement celle d'un sable, la classe > 200 µm domine nettement. L'expression « pH du sable » signifie que l'on mesure le pH d'une solution à l'équilibre avec un échantillon du sable mis en suspension dans l'eau, dans le rapport sol/solution de 2,5 pour 1 (Baize, [5]). La valeur du

Analyse	**Méthode ou protocole**	**Merzouga**	**Cadarache**	
Granulométrie	5 fractions sans décarbonatation			
Argile (< 2 µm)		25	179	g/kg
Limon fin (2 à 20 µm)		3	180	g/kg
Limon grossier (20 à 50 µm)		7	253	g/kg
Sable fin (50 à 200 µm)		324	297	g/kg
Sable grossier (200 à 2000 µm)		641	91	g/kg
pH	à l'eau	9,1	8,4	
Calcaire total		54	258	g/kg
Phosphore (P2O5)	Méthode Olsen	0,003	0,002	g/kg
Capacité d'échange cationique	Méthode Metson	1,7	6,3	cmol+/kg
Calcium (CaO) échangeable	à l'acétate d'ammonium	6,35	-	g/kg
Sodium (Na2O) échangeable	à l'acétate d'ammonium	0,039	-	g/kg
Magnésium (MgO) échangeable	à l'acétate d'ammonium	0,10	-	g/kg
Potassium (K20) échangeable	à l'acétate d'ammonium	0,08	0,08	g/kg
Carbone et Azote	selon NF ISO 10694 et 13878			
Carbone organique		< 0,05	12,4	g/kg
Matières organiques		0,1	21,3	g/kg
Azote organique		< 0,02	1,04	g/kg
Rapport C organique sur N total		ND	12	
Conductivité totale	sur extrait 1/5 (m/V) à 25 °C	0,04	-	mS/cm
Fer (Fe)	Méthode Tamm en obscurité	0,015	-	g/100g
Fer (Fe)	Méthode Mehra-Jackson	0,190	-	g/100g

TAB. 2.1 – Résultats des analyses pédologiques du sable de Merzouga. Les résultats d'analyses sur un sol de Cadarache sont donnés pour comparaison.

pH mesurée qualifie le sable de très basique. Cette alcalinité ne correspond pas au quartz, qui constitue l'essentiel de la masse du sable, mais à des carbonates ou à des sels présents soit en grains soit à la surface des quartz. La situation est différente dans le cas du sol de Cadarache, où les calcaires, constituant la roche-mère sur laquelle le sol s'est développé (entre autres par l'action de la végétation), influent très nettement sur les caractéristiques du sol. À Merzouga, les caractéristiques du sol résultent plus de l'aridité que de la nature de la roche-mère.

La capacité d'échange cationique (CEC) désigne la quantité totale de cations qu'un sol peut retenir sur son complexe adsorbant, à un pH donné. L'adsorption est localisée à la surface des minéraux phylliteux (qui ont généralement une CEC de 10 à 100 cmol/kg) et des matières organiques (CEC très forte, 100 à 500 cmol/kg). La CEC est mesurée à pH 7 par ajout d'acétate d'ammonium normal. L'ammonium remplace les contre-ions des argiles. Après rinçage, Na^+ ajouté remplace à nouveau l'ammonium, qui est alors dosé dans la solution. La valeur de capacité d'échange cationique mesurée dans le sable de Merzouga est très faible, correspondant à la très faible teneur en argiles et en matière organique.

Le carbone et l'azote sont aux limites de sensibilité des méthodes utilisées, et il est impossible de calculer un rapport C/N. Le Fer, est mesuré par deux méthodes. La méthode de Tamm dose le fer « amorphe » ou crypto-cristallin, issu de l'altération des silicates ou des oxydes. La méthode Mehra-Jackson est plus drastique et analyse en plus les oxydes et oxyhydroxydes de fer, hérités ou néoformés.

Toutes ces caractéristiques confirment que le sable n'est pas un sol au sens strict, mais un environnement essentiellement minéral. Les particules qui sont généralement considérées comme l'unité physique (et, de plus en plus, microbiologique), les agrégats, en sont absentes. L'unité pertinente semble alors être le grain de sable. L'absence d'eau « macroscopique » et donc de solution du sol, renforce le caractère discontinu du milieu. À l'échelle micrométrique, l'environnement des microorganismes est donc directement lié à la nature des phases minérales.

2.2 Tri magnétique du sable

La nécessité du tri est apparue dès le début de l'étude. En effet, l'observation du sable à la loupe binoculaire, à faible grossissement, a montré que le quartz est la forme dominante. En proportions d'environ 1 %, on trouve aussi des oxydes de fer, opaques, et d'autres minéraux clairs. L'existence d'une forme très dominante est un frein à une caractérisation fine des phases

les moins abondantes.

Afin de pouvoir étudier plus avant ces phases minoritaires, nous avons donc opté pour un tri magnétique du sable. Les fractions triées serviront aussi à l'étude de la diversité des micro-organismes selon les phases, en mettant l'accent sur les oxydes de fer. D'autres méthodes de tri, comme celles utilisant la loi de Stokes ou la méthode des liqueurs denses ne sont pas applicables pour le traitement biologique auquel le sable est destiné. Elles induisent en effet un risque de décoller les cellules adhérant aux grains de sable, voire de les tuer. Une fois séparées, les différentes phases minéralogiques seront étudiées individuellement. Ainsi, la diversité microbienne associée à chaque fraction minérale pourra être décrite.

Le tri a donc été réalisé avec un trieur magnétique (Frantz Isodynamic modèle L1, voir Figure 2.1) au Laboratoire de géochimie des isotopes stables de l'Université Paris VII-IPGP avec l'aide de Pierre Agrinier. Cette technique a été appliquée avec succès au tri de minéraux constitutifs de roches, de minerais ou de sables non consolidés (McAndrew, [60]). En effet, tous les minéraux possèdent une certaine susceptibilité magnétique. Elle peut être très faible mais l'amélioration des instruments permet de la révéler chez des espèces qui ont été longtemps considérées comme amagnétiques. Le sable passe sur un plan vibrant. Ce plan est doublement incliné, dans le sens du flux (« pente avant », longitudinal slope) et latéralement (« pente latérale », transversal slope). Un champ magnétique appliqué sépare ce flux en deux selon que les grains sont plus ou moins déviés au cours de leur descente. En sortie, deux gouttières guident les grains vers deux godets récepteurs. Quels que soient les réglages, le séparateur divise un échantillon en deux fractions. Par dichotomies successives, on peut séparer les phases selon les propriétés des différents minéraux. La séparation la plus sensible est obtenue en utilisant le champ le plus fort possible, la pente avant la plus faible et la pente latérale la plus forte. Pour trier le sable de Merzouga, il a été procédé comme suit. Afin de séparer trois phases, deux passages dans le séparateur ont été effectués. Les paramètres de pente ont été conservés, seule l'intensité du champ magnétique appliqué a varié. Nous avons fixé pour toute l'expérience : pente avant 15°, pente latérale 4°.

L'intensité du champ magnétique a été fixée à 0.5 Am dans la bobine pour séparer de la masse les grains « très magnétiques » (réalisé deux fois pour maximiser le rendement), qui constituent la fraction TM. Un deuxième passage extrait les grains « faiblement magnétiques », avec une intensité appliquée de 1 Am (en conservant les paramètres de pente ; rendement maximal atteint en un passage). Les grains amagnétiques sont recueillis et constituent la troisième fraction, résiduelle. La vitesse du tri est de quelques dizaines de grammes par heure. Les masses des fractions recueillies en moyenne sont

données dans le Tableau 2.2.

Pour séparer les phases en vue d'études minéralogiques, il n'a pas été pris de dispositions spéciales de propreté « biologique ». Pour la préparation du matériel qui servirait de base aux études biologiques, le tri d'une deuxième série doit être réalisé en accordant une attention particulière à la propreté pour éviter au maximum les contaminations.

2.3 Granulométrie du sable

La détermination de la granulométrie du sable a été effectuée à l'IRSN avec l'aide de Thomas Perrier, sur un granulomètre laser Malvern. Cette technique repose sur l'analyse des tâches de diffraction du faisceau lorsqu'il traverse la chambre où le sable est maintenu en suspension (théorie de Fraunhofer). Les résultats sont donnés à la Figure 2.2 sous la forme d'une courbe granulométrique. Les 14 classes de diamètre équivalent supérieur à 200 µm totalisent 95,8 % du volume du sable. Le logiciel d'analyse calcule un paramètre de sphéricité des grains. Dans le cas du sable de Merzouga, les grains sont presque sphériques (voir aussi la forme des grains sur la Figure 3.1). Faisant cette approximation, il est possible d'estimer le nombre de grains de sable par gramme. Pour cela on détermine la masse volumique du sable (1670 kg/m^3, pores inclus) et sa porosité (37 %). La masse volumique de la fraction grains seuls est alors 2650 kg/m^3, très proche des valeurs admises pour le quartz. Les grains plus petits ne sont pas inclus dans ce calcul. En effet, leur importance massique est faible et le nombre de grains calculé ainsi serait vide de sens.

2.4 Composition chimique du sable

La caractérisation chimique a été réalisée au Cerege par ICP avec l'aide de Jean-Claude Germanique. Après fusion dans le borate de lithium, les échantillons sont ionisés en un plasma. La mesure des rayonnements émis (chaque longueur d'onde étant caractéristique d'une transition électronique, donc d'un élément) donne les abondances élémentaires dans l'échantillon. Ceci est réalisé après broyage des échantillons, qui facilite leur dissolution. On mesure aussi l'eau retenue dans la porosité (par la perte lors du chauffage à 110 °C) et la perte au feu (eau de structure, sulfures, carbonates...). Le Tableau 2.3 donne donc la composition élémentaire du sable total et de la phase « minéraux sombres » (=fraction très magnétique + fraction peu magnétique), converties en poids d'oxydes. Ces résultats indiquent que le tri,

FIG. 2.1 – Trieur magnétique Frantz. Le sable est introduit dans l'entonnoir, puis passe sur le plan vibrant (le vibreur est noir, dans le prolongement du plan incliné, à droite). Les deux électro-aimants créent le champ magnétique, d'intensité réglable. En bas du plan incliné, les deux godets récupèrent les fractions séparées. Les réglages d'inclinaison, qui déterminent l'efficacité de la séparation, sont faits par deux volants, dont l'un est visible à droite).

Fraction	Masse recueillie
Très magnétique TM	7,4 g
Peu magnétique PM	82,5 g
Résiduelle	910 g
Perte	$< 0,5$ g

TAB. 2.2 – Masse des différentes fractions du sable, pour 1 kg trié.

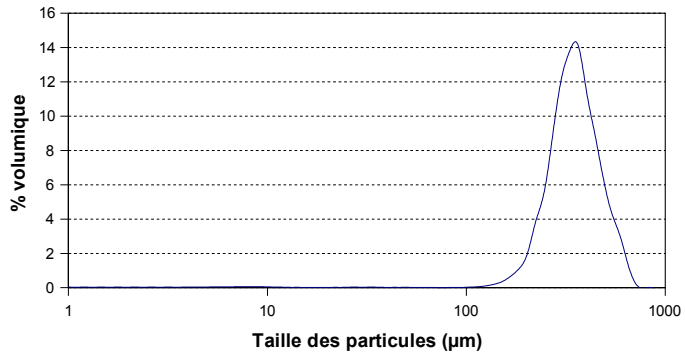


FIG. 2.2 – Courbe granulométrique du sable de Merzouga. La fraction supérieure à 200 µm représente 96 % du sable.

comme réalisé, ne permet pas de se débarrasser du quartz et d'obtenir une phase d'oxydes de fer purs. Cependant, l'enrichissement en fer de la phase « minéraux sombres » est très significatif ($\times$ 20).

2.5 Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X a été réalisée au Cerege avec l'aide de Daniel Borschneck. Le dispositif est présenté à la Figure 2.3. Les quatre fractions issues du tri magnétique ont été broyées à la main avec un mortier en agate. On obtient alors une granulométrie de l'ordre de 20 µm. Les poudres (environ 200 mg) ont été montées sur des supports en aluminium. Les données ont été acquises sur un diffractomètre Philips MPD-3710, à la longueur d'onde K_α du Cobalt ($\lambda = 1,79$ Å). L'acquisition a été faite pour 2θ allant de 3,5° à 78°, en comptant 5 s à chaque pas de 0,05° (soit un total d'environ 2 h). Après acquisition, les données ont été traitées par le logiciel X'Pert (Philips).

Les diffractogrammes sont donnés dans les Figures 2.4 à 2.7. Sur ces figures, l'échelle verticale a été réduite pour que les pics des minéraux peu abondants soient visibles. Dans les profils du sable total (ST) et de la fraction résiduelle, très appauvrie en éléments après extraction de TM et PM, les seuls minéraux identifiables de façon certaine sont le quartz, dont les pics dominent très nettement, et la calcite. S'y ajoute un feldspath, dont l'amplitude faible des pics ne permet pas de déterminer plus précisément la nature. Les spectres des fractions très magnétique et peu magnétique révèlent une plus grande diversité de minéraux.

Le sable est donc très nettement dominé par le quartz. Les minéraux autres sont peu abondants mais divers. Il n'est pas possible, avec les seuls résultats de diffraction, de préciser leurs abondances.

2.6 Spéciation du Fer en spectroscopie Mössbauer Fer-57

Cette étude a été réalisée à l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, avec l'aide d'Emmanuel Fritsch. Nous avons étudié la spéciation du fer en spectroscopie Mössbauer. La source de rayons γ utilisée est l'isotope 57 du fer. Cet isotope représente environ 1 % du fer total naturel. La spéciation de cet isotope est représentative du fer total (il n'existe pas de fractionnement isotopique naturel suffisant pour perturber la représentativité à l'échelle de l'étude). Les deux échantillons étudiés sont issus

Fraction	Minéraux sombres	Sable total
SiO_2	47,9	92,27
Al_2O_3	10,6	1,02
Fe_2O_3	25,29	1,22
MnO	1,42	0,04
CaO	1,7	0,35
MgO	2,25	0,16
Na_2O	1,06	0,03
K_2O	1,27	0,22
TiO_2	1,4	0,07
P_2O_5	0,88	0,02
H_2O(110 °C)	1,2	0,87
PF	4,52	3,69
Total	99,49	99,95

TAB. 2.3 – Composition (% masse) du sable de Merzouga et de la phase « minéraux sombres » (=fraction très magnétique + fraction peu magnétique).

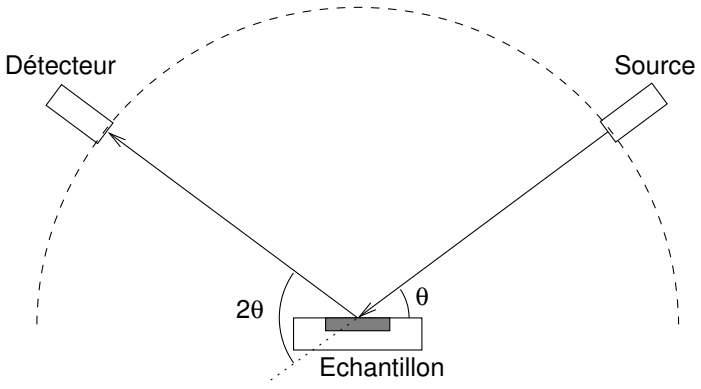


FIG. 2.3 – Dispositif utilisé pour la diffraction des rayons X. L'échantillon est éclairé par le faisceau sous l'incidence θ. Le détecteur, placé de façon symétrique à la source, mesure l'intensité des rayons X réémis, en fonction de θ.

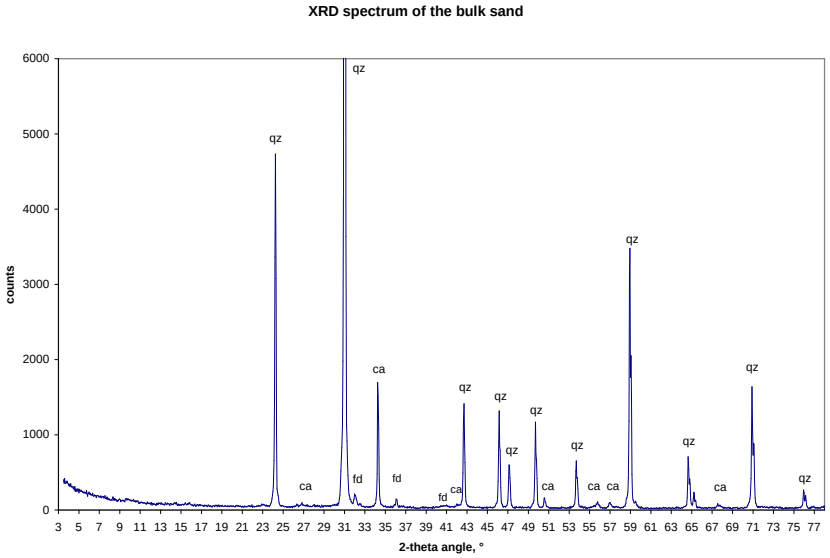


FIG. 2.4 – Diffractogramme du sable total. Le quartz (qz) et la calcite (ca) sont présents de façon indubitable. Les pics proches de 32° sont attribués à un feldspath (fd).

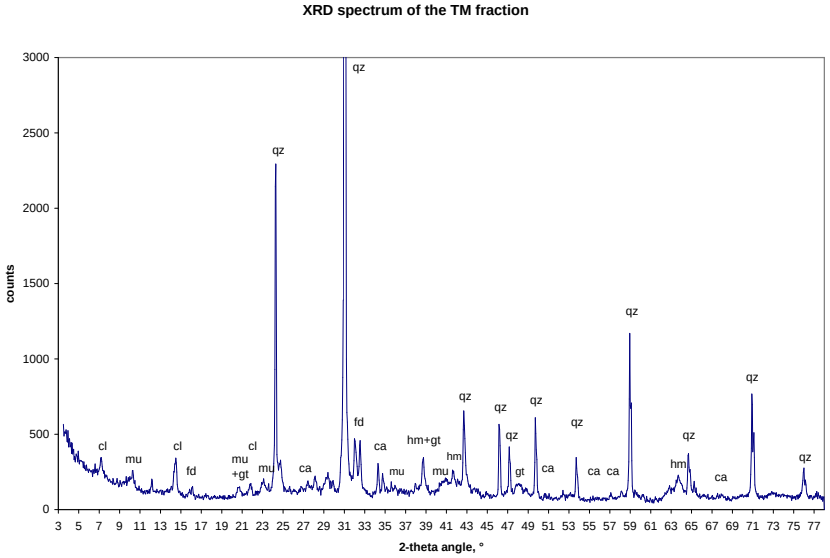


FIG. 2.5 – Diffractogramme de la fraction très magnétique TM. En plus du quartz, de la calcite et du feldspath, cette fraction contient des minéraux argileux (probablement une chlorite, cl), un mica (muscovite, mu), un pic attribué à la gœthite (gt) est présent vers 48° (les autres pics de la gœthite sont presque confondus avec un pic de la muscovite vers 21° un pic de l'hématite vers 38°).

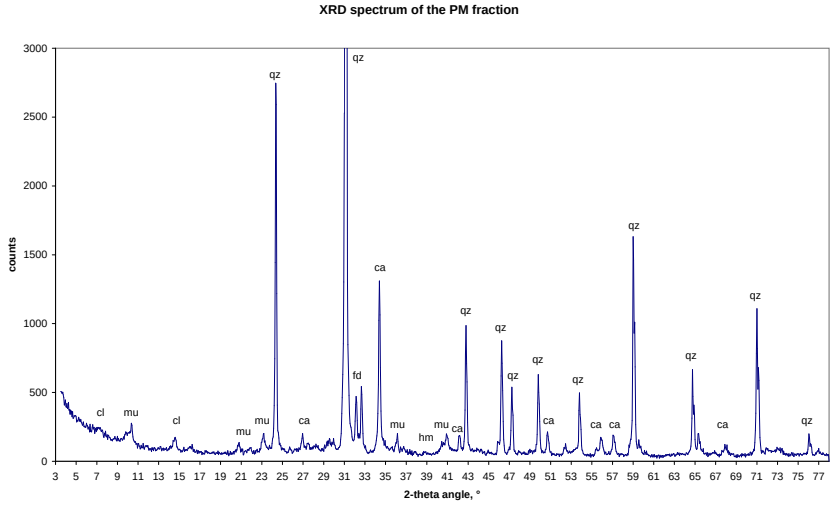


FIG. 2.6 – Diffractogramme de la fraction peu magnétique PM. Le quartz et la calcite sont dominants, celle-ci montrant des pics plus intenses que dans la fraction TM (abondance supérieure). La gœthite, visible sur le spectre TM, n'apparaît pas ici. Les autres minéraux sont les mêmes.

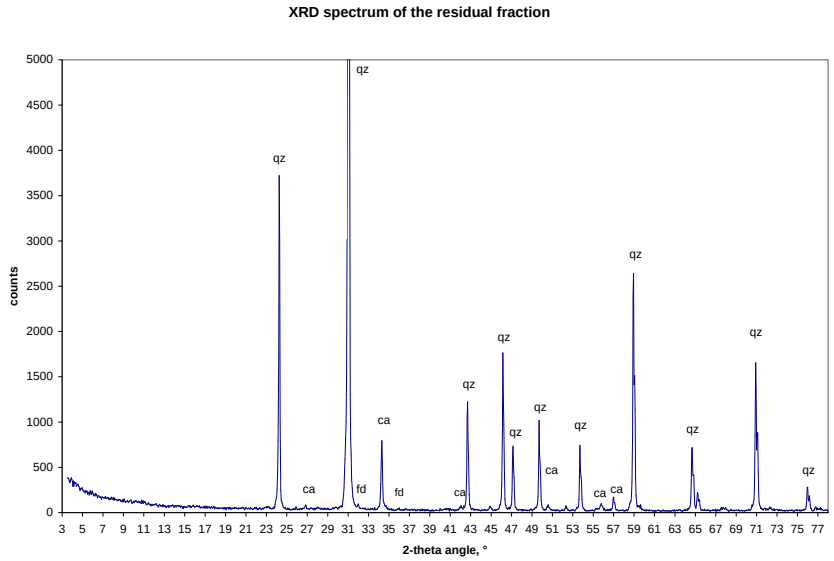


FIG. 2.7 – Diffractogramme de la fraction résiduelle. Seuls le quartz et la calcite sont identifiés. Les autres minéraux sont très appauvris voire absents.

TM 295K

		δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Hm kOe	W (mm/s)	Ec /kT	AR (%)	
C1	2	0,4	0,63		0,8		50,7	Fe(III)
C2	S	0,38	-0.210	518,7	0,41	29	31,9	Hm(wf)
C3	S	0,42	-0.287	371,9	0,45	4,6	11,7	Gt ?
C4	2	1,13	2,56		0,5		5,7	Fe(II)

28/03/03 (xj) ; Sources : Fmb_295.sam; Fer mar03.mcs (δ = -0.134, Vmax = 13.190)

PM 295K

		δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Hm kOe	W (mm/s)	Ec /kT	AR (%)	
C1	2	0,36	0,65		0,63		45,7	Fe(III)
C2	S	0,4	-0.190	525	0,43	23,8	15,8	Hm(wf)
C3	S	0,54	-0.086	353,4	0,45	1,6	20,5	Gt ?
C4	2	1,14	2,64		0,5		18	Fe(II)

26/06/03 (xj) ; Sources : Fmb_295.sam; Fer juin03.mcs (δ = -0.134, Vmax = 13.190)

TAB. 2.4 – Paramètres des composantes issues de la déconvolution des spectres Mössbauer des deux fractions du sable.

du tri magnétique du sable de Merzouga. L'échantillon TM (très magnétique) est extrait à champ faible et PM (peu magnétique) est extrait d'un deuxième passage du sable, à champ fort. Les résultats sont donnés sur la Figure 2.8. Les paramètres des composantes issues de la déconvolution des spectres sont données dans le tableau 2.4.

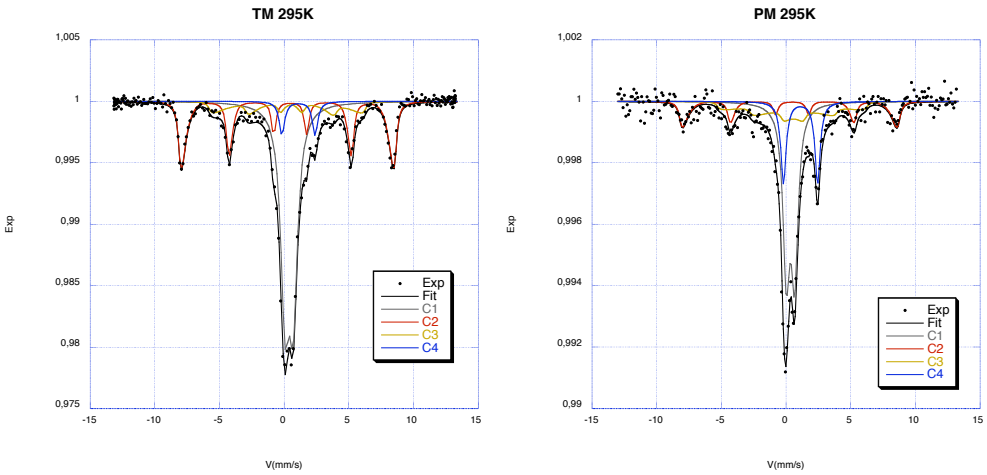
Le spectre de la fraction très magnétique TM est moins bruité et les signaux Mössbauer sont meilleurs que ceux de PM, car TM est plus riche en fer. Les spectres des deux fractions sont déconvolués avec quatre composantes, deux sextuplets et deux doublets. Les deux sextuplets sont :

- le sextuplet dont le champ est le plus élevé, C2 (Hm de 518 à 525 kOe), correspond à de l'hématite,
- le sextuplet de champ moins élevé, C3 (Hm de 353 à 372 kOe) est en phase de relaxation (Ec/kT très faible). Il correspond à de la gœthite de cristallinité élevée ou faiblement substituée, qui apparaît malgré l'acquisition des spectres à température ambiante (l'acquisition de spectres à température plus basse permettrait de confirmer cette hypothèse).

Les deux doublets sont :

- la phase C1, paramagnétique, correspond à une fraction de gœthite plus substituée ou de cristallinité inférieure à la phase C3,
- la phase C4 donne un doublet pour du fer II. Ce doublet est mieux résolu dans PM que TM.

La spectroscopie Mössbauer met donc en évidence des phases minérales



(a) Fraction très magnétique (b) Fraction peu magnétique

FIG. 2.8 – Spectre Mössbauer Fe^{57} des fractions très magnétique (TM) et peu magnétique (PM) du sable de Merzouga, acquis à température ambiante, et composantes issues de la déconvolution des spectres. C2 et C3 sont des sextuplets, C2 ayant un champ hyperfin fort (hématite) et C3 en phase de relaxation à champ plus faible (une partie de la gœthite). C1 et C4 sont des doublets. C1 correspond à du fer III paramagnétique (gœthite substituée ou mal cristallisée) et C4, qui est mieux résolu dans PM que dans TM, à du fer II

à fer II et à fer III. Deux phases à fer II ont été observées par ailleurs, en lame mince au MEB ou en spectroscopie Raman. L'ilménite a été observée au MEB, sous la forme d'un grain très riche en fer et titane (voir Figure 3.4 p. 46). La biotite a été analysée en inclusion dans quelques grains, au Raman. Les deux minéraux à fer III sont l'hématite et la gœthite. Les abondances relatives des quatre composés C1 à C4 sont données en pourcent. La phase C1 à fer III représente dans les deux cas près de la moitié du fer. Les phases TM et PM se distinguent par l'abondance relative des autres composantes. Par rapport au fer total, la proportion du fer II est supérieure dans la fraction PM à ce qu'elle est dans la fraction TM.

Nous faisons donc l'hypothèse que le minéraux ferrifères présents dans les phases « Très magnétique » et « Peu magnétique » sont les mêmes, mais en proportions variables dans les deux fractions issues du tri magnétique du sable. Toutefois, comme nous avons obtenu à l'issue du tri beaucoup plus de la fraction PM que de TM (masses obtenues données dans le tableau 2.2), nous avons utilisé PM chaque fois que c'était possible.

2.7 Conclusion des analyses globales

En dehors du quartz qui est la phase majoritaire du sable, le tri magnétique a permis d'obtenir une fraction enrichie en autres minéraux. La diffraction a mis en évidence d'autres silicates (feldspath, chlorite). La spectroscopie Mössbauer a permis de mieux caractériser les minéraux ferrifères, qui étaient apparus en DRX. Nous avons mis en évidence une composante de minéraux primaires (même si la roche-mère n'est pas déterminée). La composante à fer II inclut notamment l'ilménite. Ce minéral est peu abondant, il n'a pas été vu en diffraction (mais en lame mince au MEB, voir la Figure 3.4 p. 46). Les minéraux à fer III (hématite, gœthite) sont pour partie primaires et pour partie issus de l'altération et de l'oxydation de phases primaires.

Chapitre 3

Analyses grain-par-grain

Résumé du chapitre

Dans une étude sur les interactions entre les bactéries et les minéraux, l'échelle du grain de sable est plus pertinente que celle de l'échantillon de quelques grammes. Nous avons donc réalisé des analyses visant à réaliser l'inventaire des différents types de grains. Six catégories ont été définies selon la chimie de l'intérieur des grains (au MEB) et selon leur surface, analysée en spectroscopie micro-Raman. Ces catégories sont aussi celles de l'analyse grain-par-grain de la diversité bactérienne sur les différentes phases minérales (partie suivante).

3.1 Inventaire des types de grains sur lames minces au MEB-EDX

Les lames minces ont été réalisées par inclusion du sable dans la résine epoxy, puis polissage avec de la poudre de carbure de silicium jusqu'à une épaisseur de 30 µm (Figure 3.1). L'observation de lames minces permet une caractérisation de l'intérieur des grains, mais pas de leur surface. Les cartes de répartition d'éléments ont été coloriées suivant le code couleur indiqué sur la Figure 3.2.

Il est possible de distinguer au MEB trois types principaux de grains. Les grains de quartz sont représentés notamment sur la Figure 3.3(b). Les grains d'autres silicates sont riches, en plus du silicium, en aluminium et en cations alcalins (plus le fer). Deux grains de ce type sont visibles sur les bords de la Figure 3.6. Leur nature n'est pas déterminée plus précisément. Enfin, les grains de carbonates sont de deux types. La Figure 3.3(b) montre un agrégat de calcite qui englobe des petits quartz. La Figure 3.6 montre un grain de

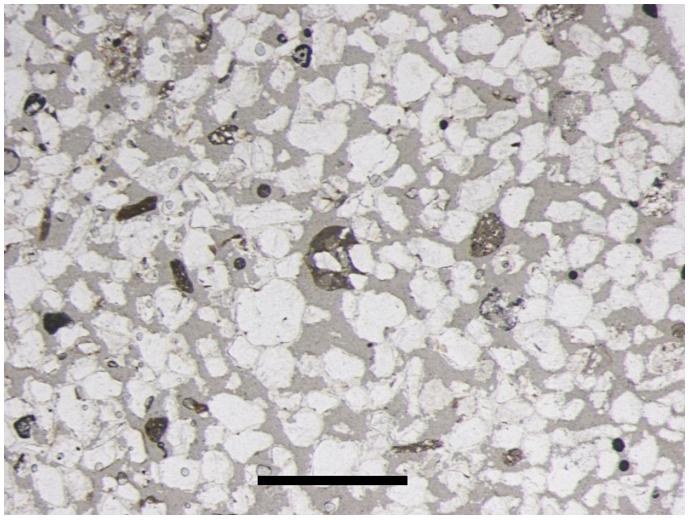


FIG. 3.1 – Lame ST. Le sable total contient essentiellement des grains de quartz, transparents en lame mince, de diamètre et d'angularité variables (la résine dans laquelle les grains sont inclus apparaît grisée suite à la carbonation pour l'observation au MEB). À leur périphérie sont parfois visibles des petits minéraux sombres en placages. Barre d'échelle 1 mm

FIG. 3.2 – Code des couleurs utilisé pour colorier les cartes d'éléments chimiques acquises à la sonde EDX.

calcite cristalline.

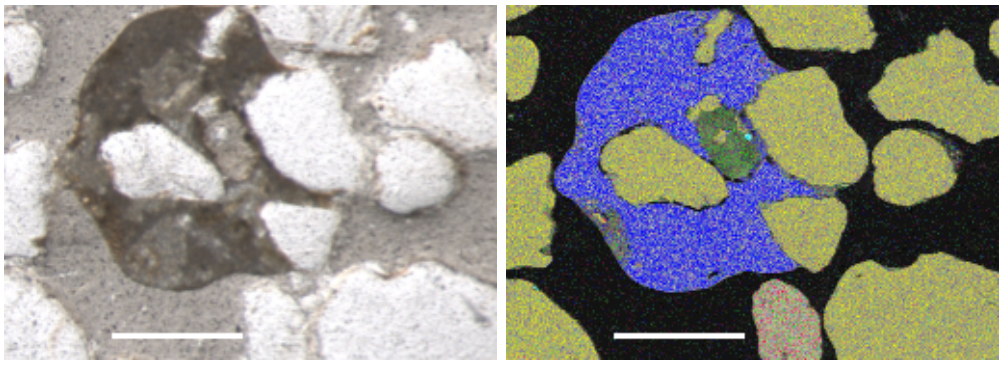
La fraction Peu Magnétique PM a été choisie pour l'étude de la diversité des bactéries sur les différentes phases minérales. Il importait donc d'avoir une estimation des abondances des différents types de grains. En étudiant à la sonde EDX la répartition des éléments chimiques une plage suffisamment large de lame mince, il est possible d'avoir une vision globale des abondances des différents types de grains de sable dans la fraction PM. La Figure 3.7 présente une telle plage.

Nous avons dénombré 265 grains. La majorité (153) sont essentiellement quartziques, sans qu'il ne soit possible d'exclure la possibilité de placages de petits minéraux à leur surface. Les silicates autres (avec Al, Na, K) et les carbonates (Ca et Mg) viennent ensuite, avec respectivement 65 et 35 grains. Enfin, 12 grains riches en fer ont été observés (silicates ferro-magnésiens ou oxydes en grains).

3.2 Classification des grains de sable par micro-spectroscopie Raman

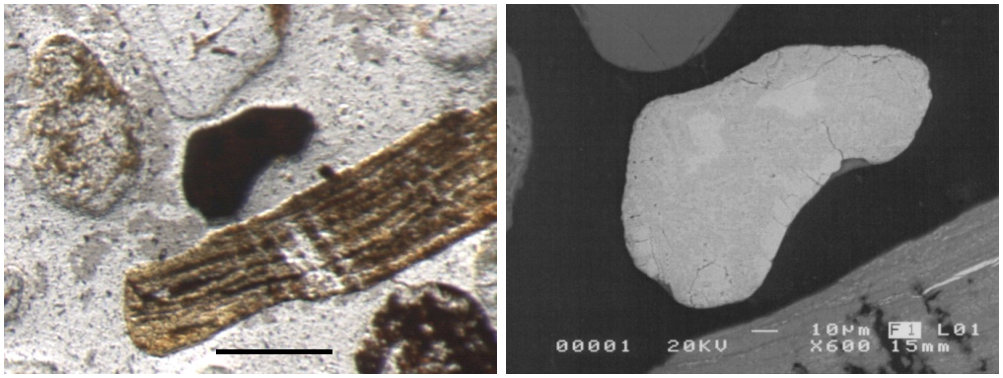
La classification des grains de sable en spectroscopie micro-Raman est décrite dans l'article inséré au Chapitre 5.1. Le principe de la spectroscopie micro-Raman est donné à la Figure 3.8 et le dispositif expérimental est présenté à la Figure 3.9. Les spectres sont discutés dans l'article. Chaque grain de sable a été analysé en trois points différents, trois spectres ont été acquis. Les positions des pics ont été notées (Figure 3.10 et Figure 3.11).

Un grain de « quartz peu plaqué » est défini par la prédominance du quartz et de son pic majeur à 464 cm^{-1} sur les trois spectres acquis sur le grain. La catégorie « carbonate » est définie par la dominance du pic de la calcite à 1087 cm^{-1} sur au moins un des trois spectres. Les spectres des grains classés comme « autre silicate » montrent des pics de silicates autres que le quartz (surtout feldspaths, quelques micas), auxquels nous avons adjoint des oxydes (notamment l'anatase présent en placage à la surface des grains). La catégorie « quartz plaqué d'hématite » est définie par la présence des pics majeurs de l'hématite à 411 et 299 cm^{-1} comme pics majeurs sur au moins l'un des trois spectres. Un grain « couvert de matière organique » est défini par un pic large vers 1300 cm^{-1} (et un pic à 1600 cm^{-1} sur les spectres à fenêtre élargie), semblable au spectre du graphite. Les spectres des « grains inconnus » montrent des pics pour lesquels nous n'avons pas trouvé de correspondant dans la base de données de référence.



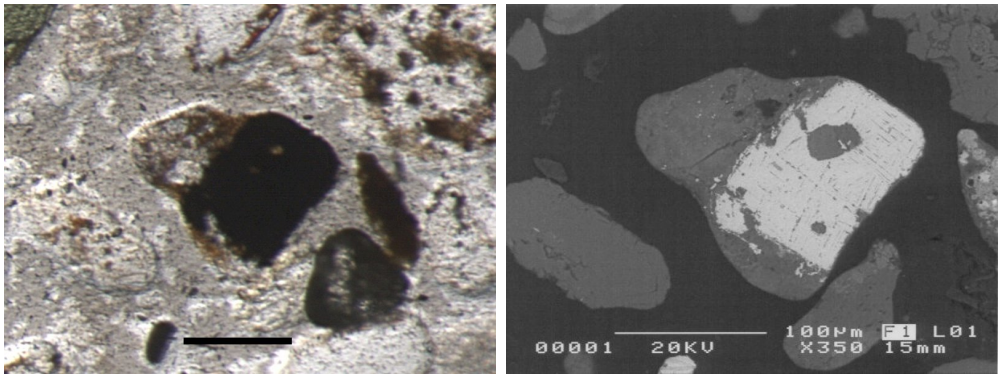
(a) En optique (b) Au MEB

FIG. 3.3 – Agrandissement de la figure 3.1, centre de l'image. On observe un grain composite formé de petits quartz dans une matrice carbonatée (avec un petit grain d'oxyde de titane). Barre d'échelle 200 µm



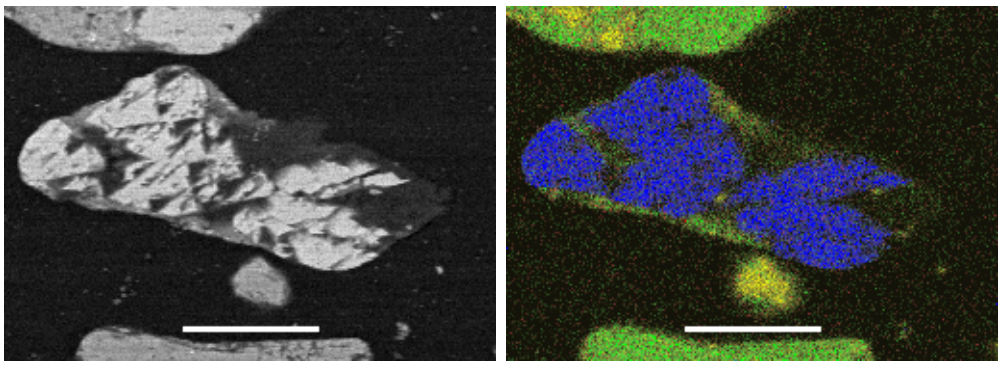
(a) En optique (b) Au MEB (BSE)

FIG. 3.4 – Grain d'ilménite, oxyde mixte de fer II et de titane. En optique, ce grain se distingue par son opacité, il ne laisse que très faiblement passer la lumière (teinte très brune). Au MEB il apparaît plus brillant que les grains de quartz, en électrons secondaires (non figuré ici) et plus encore en électrons rétro-diffusés (back-scattered electrons, BSE). Ce grain est un des témoins d'une phase ferrifère primaire (héritée de la roche-mère du sable), mais ne donne pas d'informations déterminantes quant à la nature de cette roche-mère car l'ilménite est assez fréquente dans des roches variées. Barre d'échelle sur l'image optique 100 µm



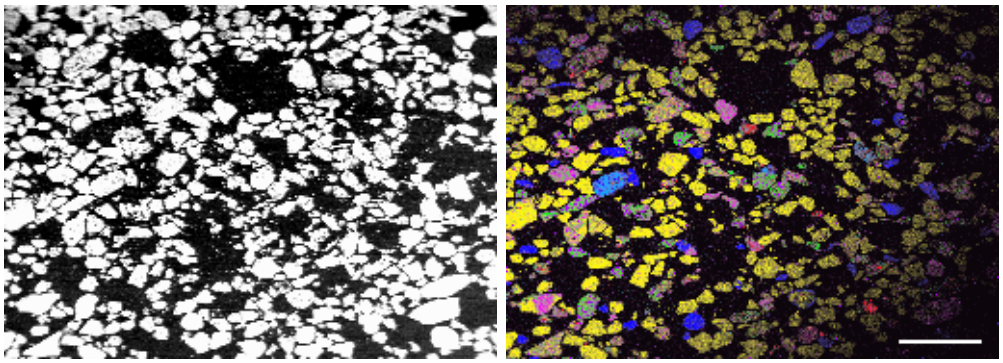
(a) En optique (b) Au MEB (BSE)

FIG. 3.5 – Grain composite d'oxyde de fer et de quartz. Comme le grain d'ilménite présenté plus haut, ce grain se distingue des quartz par son opacité en optique et sa très forte brillance au MEB. Barre d'échelle : 100 µm



(a) Observation en électrons secondaires (b) Carte d'éléments chimiques

FIG. 3.6 – Grain polycristallin de calcite. Barre d'échelle : 100 µm.



(a) Électrons secondaires (b) Carte d'éléments chimiques

FIG. 3.7 – Estimation à faible grossissement (×20) des proportions des types de grains. Le comptage a été réalisé sur la partie centre-ouest de la lame, où l'intensité des rayons X analysés est homogène. Barre d'échelle : 1 mm.

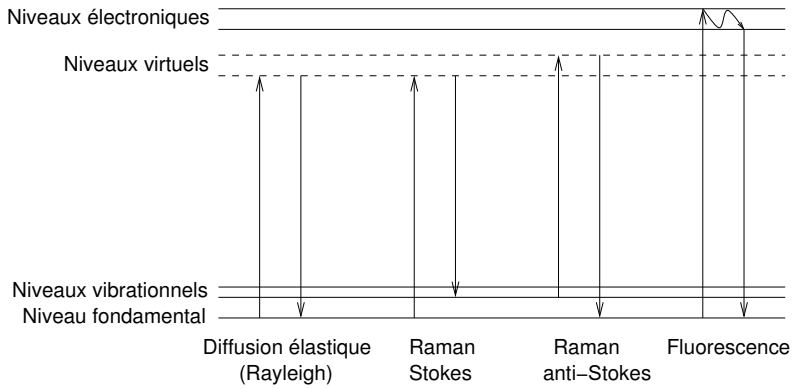


FIG. 3.8 – Principe de la spectroscopie Raman. Les photons de la lumière incidente sont pour l'essentiel diffusés sans perte ni gain d'énergie (diffusion élastique de Rayleigh). Par interaction avec les vibrations des molécules de l'échantillon, une faible proportion (10^{-7}) des photons sont diffusés avec une énergie légèrement supérieure (Raman anti-Stokes) ou inférieure (Raman Stokes) aux photons incidents.

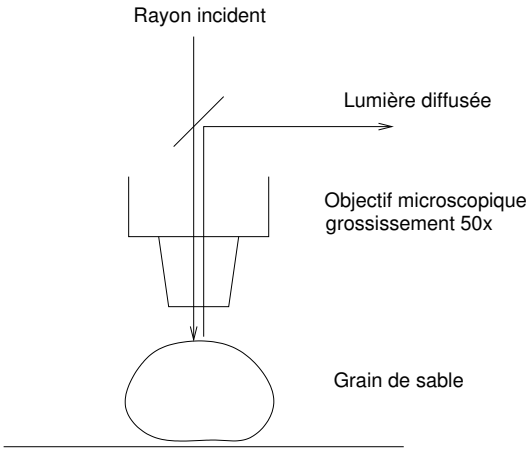


FIG. 3.9 – Dispositif de spectroscopie micro-Raman. L'échantillon, le grain de sable, est éclairé par le laser ($\lambda = 533$ nm), à travers l'objectif du microscope. L'objectif recueille une partie de la lumière diffusée, qui est analysée. Le grossissement utilisé permet la focalisation du laser sur une zone d'environ 5 µm × 5 µm. Nous avons caractérisé chaque grain de sable en au moins trois points, choisis pour rendre compte des hétérogénéités visuelles de la surface des grains.

	Minéraux vus	Catégorie		Positions des pics					
gf001	Qz	**Qz peu plaqué (1)**	1	465	1159				
			2	465	354				
			3	467	1161				
gf036	Carbonate	**Carbonate (2)**	1	1086					
			2	1086					
			3	1086	714				
gf045	Qz + K-Fd	**Silicate ou autre (3)**	1	514	475	455	1129	226	292
			2	464	514	285			
			3	514	464	474	285		
gf017	Qz + TiOx	**Silicate ou autre (3)**	1	638	519	398			
			2	466					
			3	640	515	398			
gf016	Qz + oxyde	**Qz + Hématite (4)**	1	410	299	608	660		
			2	464	264				
			3	464					
gf023	Qz + organique	**X+organique (5)**	1	1300					
			2	466					
			3	466	702	510			
gf014	Oxyde ou sulfure	**Inconnu (6)**	1	600					
			2	400					
			3	410	466				

FIG. 3.10 – Pics caractéristiques définissant les 6 catégories de grains de sable telles qu'indiquées dans le projet d'article. Les pics sont listés par ordre décroissant d'amplitude.

Quartz	128	206	264	354	390	450	**464**	697	796	808	1069
Hématite	**226**	245	**292**	299	**411**	497	612				
Anatase	**143**	197	395	517	**638**						
Calcite	156	**282**	713	**1087**							
Graphite	**1350**	**1580**									
Orthoclase	158	281	455	475	**514**	751	810	996	1100	1129	
Biotite	**263**	**705**									

En gras les pics majeurs

FIG. 3.11 – Minéraux de référence utilisés pour la classification des grains de sable, et dont les spectres sont disponibles dans la base de données de l'ENS-Lyon (`http://www.ens-lyon.fr/LST/Raman`).

Conclusion

Nous considérons que la spectroscopie micro-Raman sur grains est la méthode la plus adaptée à la caractérisation minéralogique des grains en vue de l'étude grain-par-grain de la diversité bactérienne, qui sera présentée plus loin.

Deuxième partie

Diversité bactérienne dans le sable

Chapitre 4

Diversité des bactéries cultivées et non-cultivées dans le sable « total »

Résumé du chapitre

Nous avons estimé la taille et diversité de la communauté bactérienne du le sable de Merzouga. Nous avons réalisé un dénombrement des bactéries cultivables sur un milieu de culture peu sélectif et des bactéries totales en réalisant un marquage fluorescent directement à la surface des grains de sable. La diversité bactérienne a été estimée par séquençage du gène ADNr-16S qui est un marqueur de diversité. Nous avons testé un estimateur statistique qui donne la diversité totale dans l'échantillon, puis l'avons appliqué aux séquences de Merzouga. La diversité totale ainsi estimée a été comparée à des valeurs trouvées dans la littérature. Notre conclusion est que la très faible biomasse dans le sable ne se traduit pas par une réduction de la diversité, de nombreuses espèces sont présentes dans le sable. Toutefois, chacune de ces espèces est représentée par un très faible nombre de cellules par gramme de sable. Le stress global subi par le grain de sable en surface des dunes ne se traduit donc pas par une diminution de la diversité (nombre d'espèces) mais par l'effectif moyen au sein de ces espèces.

4.1 Méthodes des description des communautés bactériennes

Les méthodes présentées ici sont celles utilisées dans le travail correspondant aux deux articles.

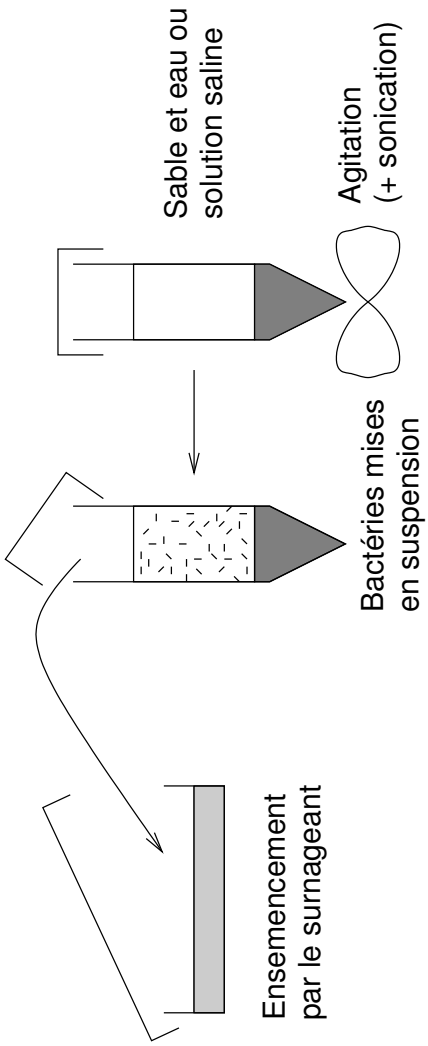


FIG. 4.1 – Dénombrement et isolement de bactéries cultivables par suspension-dilution. Le sable est agité dans de l'eau ou dans une solution saline, avec éventuellement un traitement par ultrasons. On obtient une suspension de bactéries, dont on étale sur un milieu nutritif une dilution appropriée. Après incubation, le nombre de colonies qui se développent indique la biomasse cultivable dans le sable. Les colonies sont ensuite restriées pour vérifier leur pureté et prêtes à être caractérisées.

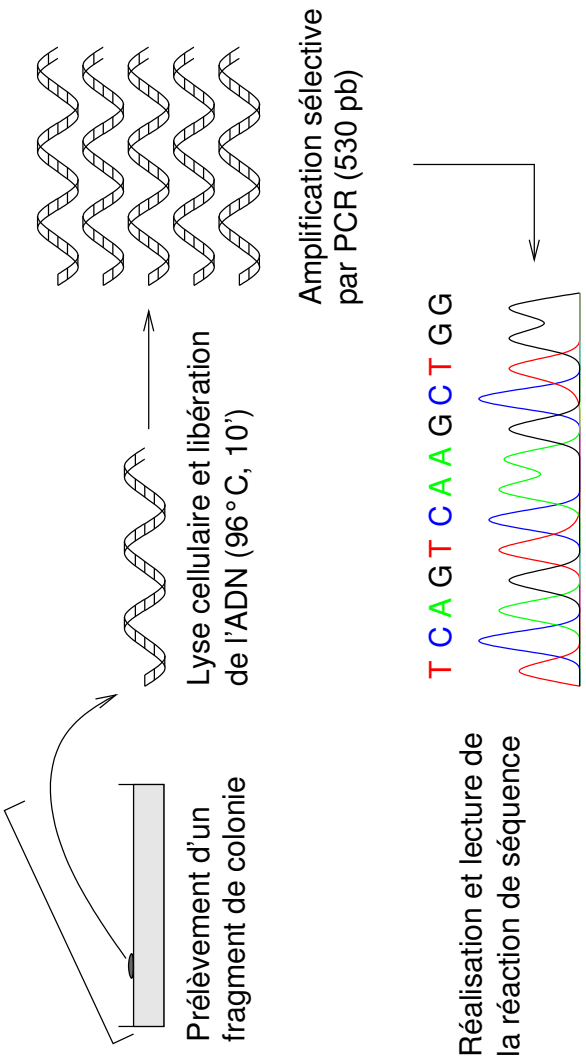


FIG. 4.2 – Caractérisation des souches bactériennes par séquençage de l'ADNr-16S. Un fragment de colonie pure sert de matrice à la réaction de PCR. La solution concentrée d'ADN obtenue est utilisée pour la réaction de séquence.

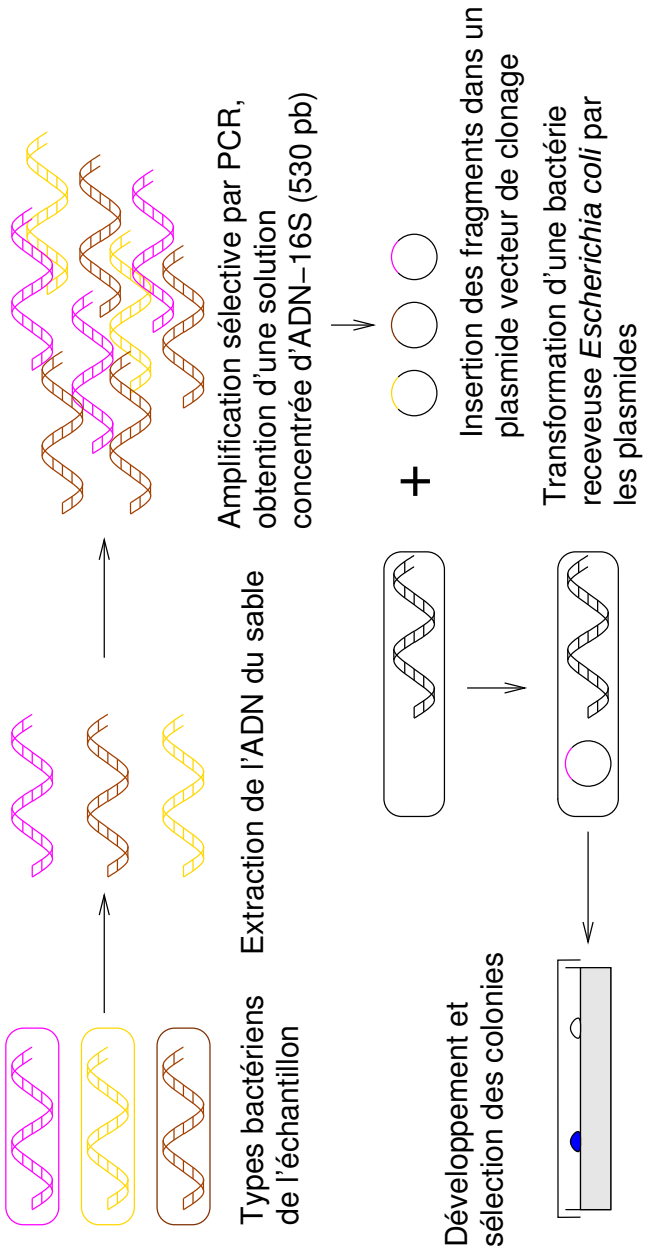


FIG. 4.3 – Description de la diversité bactérienne sans culture par clonage-séquençage. L'ADN extrait du sable est amplifié par PCR. La solution obtenue contient toutes les copies des ADNr-16S de tous les types bactériens présents dans l'échantillon initial. L'étape de clonage permet d'insérer ces fragments dans un vecteur, qui lui-même sert à transformer la bactérie *Escherichia coli*. Les colonies « transformantes » d'*E. coli* sont sélectionnées puis le fragment d'ADNr-16S qu'elles ont reçu est amplifié et séquencé.

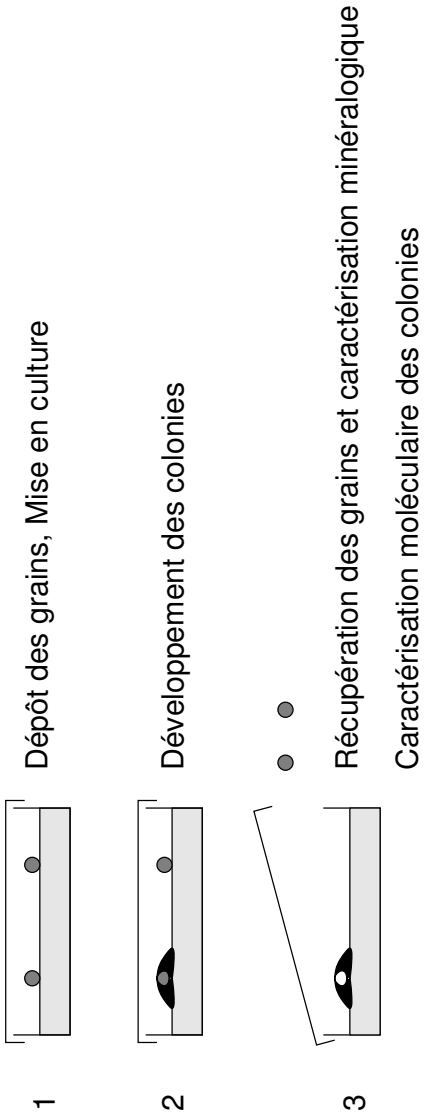


FIG. 4.4 – Culture grain-par-grain des bactéries du sable. Les grains sont déposés individuellement, directement sur le milieu nutritif gélosé. Après développement des colonies, les grains sont récupérés, nettoyés et caractérisés au spectroscope Raman. Les colonies sont caractérisées par séquençage de l'ADNr-16S.

4.2 Article

Soumis au journal *Environmental Microbiology*, juillet 2005.

Culture and molecular assessments of bacterial diversity within the dunes of a sandy arid soil in southeast Morocco

Maxime Gommeaux[1*], Mohamed Barakat[1*], Richard Christen[2], François Chevenet[3] and Thierry Heulin[1]

[1] CEA/Cadarache, DSV-DEVM, Laboratoire d'Écologie Microbienne de la Rhizosphère UMR 6191 CNRS-CEA-Univ. Méditerranée, IFR 112 PMSE, F-13108 Saint-Paul-Lez-Durance, France

[2] Laboratoire de Biologie Virtuelle. UMR 6543 CNRS – Université de Nice Sophia Antipolis, Centre de Biochimie, Parc Valrose, F-06108 Nice cedex2, France

[3] IRD - BP 64501 UMR IRD/CNRS 9926, 911, Av. Agropolis – F-34394 Montpellier cedex 5, France

* contributed equally to this work

Author for correspondence: Thierry Heulin. Tel: +33 4 42 25 70 88. Fax: +33 4 42 25 66 48. e-mail: thierry.heulin@cea.fr

Keywords: Arid soil, sand dunes, culturability, culture diversity, molecular diversity, 16S rDNA.

Abstract

Bacterial communities in a quartzose sandy soil from southern Morocco were analyzed by culture and culture-independent methods. Bacterial isolates were directly isolated from soil using 0.1x tryptic soy agar medium. Thirty-five isolates corresponding to different morphotypes observed on plates were characterized by 16S rRNA gene sequencing. Molecular diversity was also examined by analyzing eighty-nine 16S rRNA gene sequences amplified from DNA extracted from soil. Culturability of soil bacteria estimated by comparing total viable bacteria using Syto 9 plus propidium iodide staining and plate counting was 2.0%. Three bacterial divisions dominated the culture-independent method: *Proteobacteria*, *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* and *Firmicutes*, and these groups only were retrieved in cultures. *Firmicutes* were the most abundant in both methods with preponderance of *Actinobacteria* in cultures and *Bacilla* in the clone library. By extracting relevant keywords from the EMBL entries closely related to Merzouga sequences, we performed the first environmental annotation of a sequence data-set.

Introduction

Hot and dry deserts such as Sahara are characterized by very strong thermal contrasts and little available water. Within such dry lands, living organisms have to contend primarily with extremes of temperature and low humidity (aridity of the atmosphere and very rare rainwater). One of the major consequences is thought to be a reduction of the biological diversity, but some organisms, bacteria in particular, can develop survival strategies adapted to such environmental stress (Hecker and Volker, 2001; Bar *et al*., 2002; Rocha *et al*., 2002). A first step necessary to our understanding of life in extreme environments such as dry lands is a description and characterization of microbial communities inhabiting these ecosystems. Analyses of microbial diversity have been carried out in vegetated arid soils and desert crusts (Kuske *et al*., 1997; Dunbar *et al.,* 1999; Garcia-Pichel et al. 2001 and Kuske *et al.,* 2002) but to our knowledge there is no recent study of the microbial communities in a desert soil devoid of any vegetation and rhizosphere effect.

Comparisons of microbial cultures and total viable bacteria present in soil demonstrated that bacterial culturability is limited to less than 10% (Amann *et al.*, 1995; McCaig *et al*., 2001). Therefore, molecular methods are required to successfully characterize environmental microbial communities. A popular approach relies on phylogenetic analyses of small-subunit rRNA gene (16S rDNA) sequences for biodiversity description of soil samples (Kuske *et al*., 1997; Furlong *et al.,* 2002; Holmes *et al.,* 2000; Torsvik and Ovreas, 2002). Culture-based methods, however, remain very useful for studying microbial diversity and in some cases allow to describe bacterial communities different from populations obtained with culture-independent methods (McCaig *et al.,* 2001; Smit *et al.,* 2001). Available isolate collections are also very precious for physiological and genetic studies such as bacterial–mineral interactions or resistance mechanisms.

In this work, using cultivation as well as culture-independent methods, we present an overview of the bacterial diversity in an arid soil forming sand dunes southeast of Morocco, nearby the village of Merzouga.

Results and discussion

Enumeration of culturable bacteria

The *Bac*Light bacterial viability staining system was used to estimate the number of cells on the surface of sand grains and the proportion of cells with an intact cytoplasmic membrane. A total of 160 grains of sand was stained and then examined by fluorescence microscopy. The number of Syto9 fluorescence spots was 5.2 ± 0.5 per upper hemisphere. The number of microbial cells was $2.1\times 10^5 \pm 2\times 10^4$ cells per g of soil. Green-only fluorescent cells ("alive" cells with membrane integrity) represented 84 % of the counted cells (Fig. 1). The remaining cells showed additional red fluorescence which is an indication of propidium iodide penetration due to damaged cytoplasmic membranes ("dead" cells). Fluorescence spots were seen either as individuals or groups of cells on the mineral (Fig. 1).

From non-sonicated samples, the number of microbial cells cultured on TSA 1/10 medium, was $2.6 \pm 0.5\times 10^3$ CFU per g of soil. After additional treatment with ultrasonic waves, the number of cultured bacteria increased to $3.5 \pm 0.6\times 10^3$ CFU per g of soil, which represented a 35% increase in retrieval. The fact that sonication increased culturable bacteria counts had already been reported in the literature (Janssen *et al*., 2002), leading to the interpretation that some bacteria are firmly attached to sand particles.

The low total density of bacteria in comparison to conventional soils might be explained by three factors: a severe selection of microorganisms able to develop survival strategies such as dormancy and versatility regarding the severe stressful conditions in this desertic environment (Bar *et al*., 2002; Rocha *et al*., 2002), the total absence of vegetation that increases selection, since a positive effect of the rhizosphere on the diversity and density of bacteria has been demonstrated (Dunbar *et al.,* 1999; Smit *et al*., 2001; Johansen & Binnerup, 2002) and finally the nutritional paucity of this sandy soil. The bacterial density of the Merzouga site is equivalent to another extreme environment found in a saline mud volcano (Yakimov *et al.*, 2002).

A culturability of 2.0% was determined as percentage of cultured bacteria in comparison to total bacterial fluorescence count. This figure is comparable to previous studies that

estimated microbial culturability to be lower than 10 % (Amann *et al.*, 1995; McCaig *et al*., 2001). This last study also demonstrated an increasing culturability for an Australian soil until 10 weeks of cultivation. This represents considerably longer incubation time than we used in the present study.

Taxonomic position of isolates

The phylogenetic diversity was evaluated by sequencing the 16S rRNA gene. A total of 35 isolates representing each morphotype observed on TSA 1/10 plates was selected (Table 1). Their sequences were distributed in three bacterial divisions: *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB). The majority of isolates (80%) belonged to *Firmicutes*. Among them, the order *Actinomycetales* and particularly the genera *Arthrobacter, Kocuria/Micromonospora* and *Blastococcus* were a majority. They represented 71% of *Firmicutes* related isolates (Fig. 2). The remaining *Firmicutes* isolates were grouped within the class of *Bacilli* and were related to *Bacillus* and *Planococcus*.

The group *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* was the second well-represented division (five isolates representing 14% of the total).

Two isolates were *Proteobacteria*, one isolate related to *Zoogloea* (*β-Proteobacteria*, Table 1) and one isolate showed a sequence similarity of 96% to a denitrifying species, *Bosea thiooxidans* (*α-Proteobacteria*, EMBL accession number AF508112), reducing nitrate in presence of molecular oxygen.

Similar results had been obtained in a study of the diversity of rhizosphere and interspace communities of two arid soils (Dunbar *et al*., 1999). The *Firmicutes* had been one of the best characterized bacterial groups and were well represented in culture collections (Hugenholtz *et al.*, 1998). Previous studies had demonstrated the presence of *Arthrobacter* and *Bacillus* species in bulk soils (Dunbar *et al*., 1999; Smalla *et al*., 2001) and under stressful conditions (Boylen, 1973; Zevenhuizen, 1992; Romanovskaia *et al.,* 2000).

Phylogeny of clone library for uncultured bacteria

To evaluate molecular diversity, we sequenced a random selection of 89 clones from the

16S rDNA library. A phylogenetic analysis showed that most of these sequences were distributed in six bacterial divisions: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *CFB*, Green-Non-Sulfur (GNS) bacteria, *Acidobacteria* and *Planctomycetes* (Table 1), but four sequences showed not enough similarity to any already known sequences to be attributed. The *Firmicutes* division was the most abundant representing 57% of cloned sequences; *Bacillus* and *Actinobacteria* amounted respectively to 67 and 18% of these sequences, many of them not closely related to any cultured bacteria (Fig. 2). These proportions highlight an inversion of *Bacillus* and *Actinobacteria* abundance ratios between bacterial isolates and 16S-rDNA-containing clones.

Proteobacteria with 25% of sequences were the second most abundant phylum (Table 1). *α-Proteobacteria* represented 32% and were distributed in four groups: *Caulobacter*, *Rhodobacter*, *Bradyrhizobium* and *Sphingomonadaceae* (Fig.2). *β-Proteobacteria* represented 50% of total *Proteobacteria*. One sequence was attributed to the *γ-Proteobacteria*, and one sequence to the *δ-Proteobacteria*. Two *Proteobacteria* sequences were too distant to be attributed more precisely.

Four clones were grouped within the Green Non-Sulfur (GNS) bacterial division (4%) and five other clones within the CFB division (8%). One sequence belonged to *Planctomycetes.* GNS-related sequences showed a low percentage similarity (< 92%) to any known sequence and therefore possibly represent a new bacterial genus.

Surprisingly, only one clone related to *Acidobacteria* was characterized in our clone library, presenting 95% of similarity to clone C008 (GenBank accession number AF128738) from an Australian arid soil library (Dunbar *et al*., 1999). This low figure is inconsistent with findings of previous studies in which this bacterial group was more represented (Dunbar *et al.*, 1999; McCaig *et al*., 1999; Smit *et al*., 2001; Furlong *et al.,* 2002). Furthermore, our sampling depth (0 to 5 cm) is within the range where heterotrophic bacteria and extractable DNA are reported to be most abundant in temperate soils (Kuske *et al*., 2002). This might be explained by the relentless aeolian migration, which is another important factor that continuously modifies the landscape surface and structure of the sand dunes (Bristow, 2000)

and consequently the bacterial populations of surface layers.

Taking into account both cultures and clone library, *Firmicutes* was the overall most abundant division. Cloned sequences of this division have been identified in a wide range of habitats, suggesting their large distribution in the environment (Hugenholtz *et al.*, 1998). Furthermore, mechanisms of resistance to desiccation have been described among *Firmicutes*, including sporulation (Kroos and Maddock, 2003). The division *Proteobacteria* was also well represented. The fact that we have isolated representatives of this group indicates that live bacteria are present in the sand, though we have no clue about their being active or not. This demonstrates that some members of the *Proteobacteria* group are resistant to desiccation, albeit through yet-undescribed mechanisms (Ramos *et al*., 2001).

Although we identified similar major groups using cultivation and cloning, the two methods identified different communities with only two isolates presenting sequences identical to cloned sequences. This result is probably explained by the fact that the clone library did not saturate biodiversity. When sequences were clustered by similarity, our 124 sequences formed 101 groups at a similarity level of 98%. A rarefaction analysis was used to evaluate if our sampling was sufficient to estimate diversity of the site. The rarefaction curve (Fig. 3) did not reach a plateau, indicating that our clone library did not saturate the bacterial diversity of Merzouga site and that more sequences would have revealed further biodiversity. The abundance-based coverage estimator (ACE) estimator was calculated (Fig. 4). It indicates that at the level of 98% of sequence similarity, the total number of bacterial groups in the soil can be estimated at about 750 OTU in 50 g sample, with lower and upper estimates of 400 and 1400 OTU. Bacterial diversity appears not to be limited by the low number of bacteria present in this soil ($2.1\ 10^5$ cells per g of soil, representing $3.5\ 10^3$ CFU per g of soil in the culture conditions we used). Most sequences has less than 98% similarity with any already known sequence, suggesting that most of these bacteria represent new bacterial species. The recovery of sequences probably belonging to undescribed species is a common feature of cultivation-independent estimation of bacterial diversity. Methods based on the

reassociation of community DNA have been developed to estimate the amount of information present, in equivalent million base-pair (Torsvik *et al*., 1998). By inferring the relationship between the amount of genomic information and the taxonomic richness, one can derive an estimation of the number of species present in the sample (but not of which species are). This has been applied to estimate the magnitude of prokaryotic diversity in different natural and anthropized environments (Torsvik *et al*., 2002). The estimated complexity spans over several orders of magnitude, ranging from 7 (in salt-saturated ponds) to 11 400 (in undisturbed marine sediments) genomes, species being probably three times as numerous. Thus, the very low biomass in Merzouga sand is not correlated with a reduction in bacterial diversity. However, the fluorescence-estimated number of cells is two (for the salt pond) to five (for the marine sediment) orders of magnitude higher than for Merzouga. Using this figures, we estimated the frequencies of the taxa as the number of cells per taxon and per cm^3 of sand. The frequencies are dramatically lower in Merzouga sand (160 cells/taxon/cm^3) than in the environments studied by Torsvik *et al*. (10^5 to 10^7 cells/taxon/cm^3).

We finally extracted EMBL entries for 968 sequences that have a similarity of 96 % or higher with a Merzouga sequence. Merzouga sequences classified as *Actinobacteria*, *Bacillus*, α- and β-*Proteobacteria* only have close relatives in EMBL. The overall proportion of Merzouga sequences that has at least one relative in EMBL is 42 % (52 out of 124). This figure is higher for isolates (60 %) than for clones (35 %). Nevertheless, the average number of relatives per Merzouga sequence is similar for isolates (4.8) and clones (4.1). We subsequently performed lexical analysis of the entries: significant words were extracted from 775 entries, providing information about the environments from which these sequences had been sampled. Soil is the most frequently represented environment. 48 Merzouga sequences have a relative from soil and the total number of soil relatives is 494. The aquatic environment comes second (242 entries). This includes mostly sea-water (115 entries) and freshwater (95 entries, including 20 groundwater entries). Polluted environments come third, probably owing to many intensive studies on pollution and bioremediation, and arid

environments fourth. This ranking of most represented environments has been reported by Floyd *et al.* (2005), who analyzed the descriptions accompanying the isolates of the American type culture collection to perform a geographical and environmental classification..

Similar data-mining was used to annotate the phylogenetic trees. We analyzed EMBL entries of the two nearest neighbors. This assigned ecological traits to 145 of the 180 EMBL sequences that were the closest neighbors. Soil is the most frequently represented environment, with 77 reference sequences (labeled ⑨ on the trees). Among the soil sequences, 8 were from arid samples (labeled ⑨❶) and 25 were from humid samples (labeled ⑨❷). This bias towards "humid" sequences is highest in the *Bacillus* group, which includes only one "arid" reference sequence and 11 "humid" reference sequences. This contrasts with the fact that *Bacillus* was the first genus in which the resistance mechanism of sporulation was described. The second and third most important sources of neighbor sequences are fresh- and salt-water, environments that have little in common with the Merzouga sand. This is further evidence that genetically related bacteria can thrive in really different niches. The alternative hypothesis is that even in a low complexity ecological niche, sub-communities of bacteria colonize specific substrates. Starting with this hypothesis, we are currently carrying more detailed analysis of the different minerals phases forming the Merzouga sand, such as quartz and magnetic iron-bearing fractions, and of the bacterial diversity on those phases. This may lead to infer relationships between bacterial communities and mineral alteration in the Merzouga arid environment.

Experimental procedures

Field site and samples collection

Soil samples were taken from non-vegetated sand dunes in Merzouga, southeast of Morocco (31°13'48.1''N / 3°58'15.7''W). The climate is very d ry, with an average of less than eight rainy days per year. The annual rainfall is about 85 mm. From May till August, the region experiences a particularly dry summer. The temperatures are then often higher than 40°C in the day, nights being cold. As determined from thin-section observations under a polarizing microscope, the composition of the sand is mostly quartzose (90% in weight), consisting of wind-transported 300 μm grains. Calcium- and iron-carbonates (calcite and siderite) constitute approximately 8 % of the sand, derivated from the bedrock underlying the dunes. A minority of iron-oxide grains (1%) are of unknown origin. Soil samples were taken horizontally at depth of 0 to 5 cm. The collected samples (between 50 and 250 g) were placed in sterile plastic tubes and conserved at room temperature before transport and laboratory analysis.

Total bacteria counts

Soil samples (0.5 g) were suspended in 1.0 ml of sterilized distilled water, and 3 µl of dye mixture (Syto 9 and propidium iodide v/v) of the LIVE/DEAD *Bac*Light bacterial viability kit (Molecular Probes) was added. The dye Syto 9 is membrane-permeant and can penetrate any cell (making it green-fluorescent under blue excitation), whereas propidium iodide (red-fluorescent under green excitation) only penetrates cells with damaged membrane. The sand samples were stained for 20 min in the dark. After mounting in CoverWell imaging chambers (Schleier and Schluell), sand grains were examined with confocal laser scanning microscope (CLSM). Permutation of the excitation and emission filters let us sort the bacteria in two categories. Only the upper hemisphere of the sand grains is accessible but we assume that bacteria are evenly distributed and that the total figure is twice the counted number. This per-grain count was converted into per-gram number by estimating the number of sand grains per gram using laser granulometre (Mastersizer long bed, Malvern Instruments).

Bacterial culture collection

Duplicate soil samples (5 g) were homogenized in a sterile mortar with 10 ml of sterile distilled water for 3 min and a fraction (1 ml) serially diluted to 10^{-3}. We checked that using distilled water doesn't reduce the number of colonies retrieved compared to extraction in saline solution. The supernatant of the same samples was removed and 5 ml of sterile water added. The samples were dispersed by sonication using a Vibra Cell ultrasonic homogenizer (Bioblock Scientific) for 10 s and serially diluted to 10^{-2}. Dilutions were spread on 10-fold-diluted tryptic soy broth agar (TSA, Difco Laboratories). After incubations at 30 ℃ for 3 to 15 days, plates with 20 to 50 colonies were analyzed. A representative of each morphotype was selected and cloned by streaking on the same medium. One colony of each isolate was suspended in 1 ml of sterilized water and stored at –20 ℃ until used for molecular analysis.

PCR amplification of 16S rDNA

Bacterial 16S rDNA genes were amplified from cultured isolates using the "universal" primers: fD1 (5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-3'; *Escherichia coli* bases 8 to 27) and S17 (5'-GTT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTT-3'; *E. coli* bases 1509 to 1492). Bacterial cell lysis was carried out by heating at 95 ℃ for 15 min in the reaction mixture and then adding 1 U of Goldstar polymerase (Eurogentec). PCR reaction was performed in a final volume of 50 µl and contained 5 µl Goldstar buffer, 1.25 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 1.5 mM $MgCl_2$ and 500 pmol of each primer. PCR was conducted with MWG Biotech thermal cycler as follows: 4 min of denaturation at 94 ℃, followed by 35 cycles of 40 s at 94 ℃, 1 min of annealing at 55 ℃ and 1 min of extension at 72℃ an d then final extension at 72 ℃ for 3 min.

PCR amplicons were electrophoresed on 1 % agarose (Eurogentec) in 0.75X Tris-acetate-EDTA and stained with ethidium bromide. DNA was purified with Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen).

DNA extraction from soil

Total DNA was extracted from soil samples as described by Porteous *et al.* (1997), with the following modifications. Approximately 50 g of soil was ground in a mortar with 50 ml of SDS lysis buffer (0.25 M NaCl, 0.1 M disodium EDTA [pH 8.0] and 2 % [wt/vol] sodium dodecyl sulfate). The samples were then placed in 50-ml plastic tubes and incubated for 1 h at 68°C. Samples were mixed well at 15-min intervals during the incubation. This procedure is repeated 2-fold and nucleic acid precipitated from the supernatant (12.5 ml of 5 M potassium acetate and 41 ml of 40 % {wt/vol} polyethylene glycol 8000). Precipitated samples were suspended in 500 µl of distilled water. The extracted DNA was purified with Tris-saturated phenol followed by extraction with chloroform-isoamyl alcohol (24:1). The aqueous phase was collected and purified using Qiagen column (as instructed by the manufacturer).

Clones library

The total bacterial diversity library was generated by amplification from the total DNA extract of the 16S rDNA genes as described above using a different sets of primers: fD1, S17, S6 (5'-GTA-TTA-CCG-CGG-CTG-CTG-3'; *E. coli* bases 534 to 518), rD1 (5'-AGG-GAG-GTG-ATC-CAG-CC-3'; *E. coli* bases 1540 to 1524), FGPS6 (5'-GGA-GAG-TTA-GAT-CTT-GGC-TCA-G-3') and FGPS1509' (5'-AAG-GAG-GGG-ATC-CAG-CCG-CA-3') (Nesme *et al.*, 1995). Clones library was generated from 16S rDNA sequences amplified from extracted DNA. The PCR amplicons were ligated into the pGEM-T Easy vector (Promega) according to the manufacturer instructions. Ligation mixtures were transformed into *E. coli* DH5α competent cells and white colonies containing inserts were selected and picked on Luria Broth (LB) agar containing 50 µg.ml^{-1} of ampicillin. After growth each clone was suspended in 1 ml of sterilized water and stored at –20°C. 16S rDNA clones were amplified using the primers SP6 (5'-ATT-TAG-GTG-ACA-CTA-TAG-AAT-AC-3') and T7 (5'-GTA-ATA-CGA-CTC-ACT-ATA-GGG-C-3').

DNA sequencing and analysis

Purified 16S rDNA templates from isolates and clones were directly sequenced using ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems). The primer for sequencing reactions was S6 and sequencing was done on ABI PRISM 310 sequencer (Applied Biosystems).

Each sequence was blasted against the EMBL database in order to retrieve the 5 most similar public sequences. All of these sequences were then carefully aligned (final step being a visual check). For each phylogenetic analysis, distances were calculated using the Kimura-2-parameters models and dnadist from the latest release of Phylip (Felsenstein, 2004), and domains that were present in each sequence of the dataset. Trees were computed using BIONJ (Gascuel, 1997) and plotted with TreeDyn (Chevenet in preparation) and used for taxonomic assignation of the new sequences. For the figures shown, only the 2 most similar sequences from public databases were retained. For final confirmation of the taxonomic analyses, long sequences (more than 1000 nucleotides long) were used to derive a robust phylogeny allowing assessing the quality of the phylogeny derived from the shorter domain.

Sequences clustering was done using DOTUR (Schloss and Haldelsman, 2005) on the previous distance matrix (clone sequences only); a rarefaction curve and the abundance-based coverage estimator (ACE) were estimated using a 98 % similarity threshold.

Nucleotide sequence accession numbers

The 16S rRNA genes sequences determined in this study were deposited in Genbank under accession numbers DQ113773-DQ113896.

Acknowledgments

This work was partly supported by grants from the Programme interdépartemental Géomicrobiologie des Environnements Extrêmes (CNRS, Paris).

References

Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-69.

Bar, M., Von Hardenberg, J., Meron, E., and Provenzale, A.(2002) Modelling the survival of bacteria in dry lands: the advantage of being dormant. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **269**(1494): 937-42.

Boylen, C.W. (1973) Survival of *Arthrobacter crystallopoietes* during prolonged periods of extreme desiccation. *J Bacteriol* **113**(1): 33-7

Bristow, C.S., Bailey, S.D., Lancaster, N. (2000) The sedimentary structure of linear sand dunes. *Nature* **406**: 56-9.

Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A., and Kuske, C.R. (1999) Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1662-9.

Felsenstein, J. (2004) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. *Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.*

Floyd, M.M., Tang, J., Kane, M. and Emerson, D. (2005) Captured diversity in a culture collection: case study of the geographic and habitat distributions of environmental isolates held at the american type culture collection. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2813-23.

Furlong, M.A., Singleton, D.R., Coleman, D.C., and Whitman, W.B. (2002) Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1265-79.

Garcia-Pichel, F., Lopez-Cortes, A., and Nubel, U. (2001) Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado plateau. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1902-10.

Gascuel, O. (1997) BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* **14**:685-95.

Hecker, M., and Volker, U. (2001) General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* **44**: 35-91.

Holmes, A.J., Bowyer, J., Holley, M.P., O'Donoghue, M., Montgomery, M., and Gillings, M.R. (2000) Diverse, yet-to-be-cultured members of the *Rubrobacter* subdivision of the *Actinobacteria* are widespread in Australian arid soils. *FEMS Microbiol Ecol* **33**, 111-120

Hugenholtz, P., Goebel, B.M., and Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**: 4765-74.

Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M., and Sait, M. (2002) Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2391-6.

Johansen, J.E., and Binnerup, S.J. (2002) Contribution of *Cytophaga*-like bacteria to the potential of turnover of carbon, nitrogen, and phosphorus by bacteria in the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Microb Ecol* **43**: 298-306.

Kroos, L., and Maddock, J.R. (2003) Prokaryotic Development: Emerging insights. *J Bacteriol* **185**(4):1128-1146.

Kuske, C.R., Ticknor, L.O., Miller, M.E., Dunbar, J.M., Davis, J.A., Barns, S.M., and Belnap, J. (2002) Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl Environ Microbiol* **68**: 854-63.

McCaig, A.E., Glover, L.A., and Prosser, J.I. (1999) Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1721-30.

McCaig, A.E., Grayston, S.J., Prosser, J.I., and Glover, L.A. (2001) Impact of cultivation on characterization of species composition of soil bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* **35**: 37-48.

Nesme, X., Vaneechoutte, M., Orso, S., Hoste, B., and Swings, J. (1995) Diversity and genetic relatedness within genera *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rRNA gene. *Syst Appl Microbiol* **18**: 127-135.

Porteous, L.A., Seidler, R.J., and Watrud, L.S. (1997) An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Mol Ecol* **6**: 787-791.

Ramos, J.L., Gallegos, M-T, Marqués, S., Ramos-González, M-I, Espinosa-Urgel, M., and Segura, A. (2001) Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Curr Opin Microbiol* **4**:166-171

Raup, D.M. (1975) Taxonomic diversity estimation using rarefaction. *Paleobiology* 1: 333-342

Rocha, E.P., Matic, I., and Taddei, F. (2002) Over-representation of repeats in stress response genes: a strategy to increase versatility under stressful conditions? *Nucleic Acids Res* **30**: 1886-94.

Romanovskaia, V.A., Rokitko, P.V., and Malashenko, I.R. (2000) Unique properties of highly radioresistant bacteria. *Mikrobiol Z* **62**: 40-63.

Schloss, P.D. and Handelsman, J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* **71**:1501-1506.

Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H., and Berg, G. (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4742-51.

Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S., and Wernars, K. (2001) Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2284-91.

Torsvik, V., and Ovreas, L. (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **5**: 240-5.

Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.-A. and Ovreas, L. (1998) Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural an perturbed environments. *Journal of Biotechnology* **64**: 53-62

Torsvik, V., Ovreas, L. and Thingstad, T.F (2002) Prokaryotic Diversity-Magnitude, Dynamics, and controlling Factors. *Science* **296**: 1064-66

Yakimov, M.M., Giuliano, L., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N. (2002) Microbial community of a saline mud volcano at San Biagio-Belpasso, Mt. Etna (Italy). *Environ Microbiol* **4**: 249-56.

Zevenhuizen, L.P. (1992) Levels of trehalose and glycogen in *Arthrobacter globiformis* under conditions of nutrient starvation and osmotic stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* **61**: 61-8.

Table 1. Phylogenetic distribution of 16S rDNA isolates and clones of samples from Merzouga desert

Phylogenetic groups	**Isolates**		**Clones**	
	Number	% of total	Number	% of total
Firmicutes				
Actinobateria	20	57	17	19
Low G+C=Bacillus	8	23	34	38
GNS			4	4
Planctomycetes			1	1
Proteobacteria				
β-	1	3	12	13
γ-			2	2
α-	1	3	7	8
δ-			1	1
CFB	5	14	5	6
Clostri			1	1
Acidobacteria			1	1
Unclassified bacteria			4	4
Total	35	100	89	100

Table 2. Summary of the lexical analysis of the informations available for the public sequences most similar to Merzouga sequences.

For each Merzouga sequence, public sequences with more than 96% similarities were retrieved and the EMBL entries analyzed for presence of specific keywords describing the origins of isolations: i.e. soil versus marine or fresh water, from a desertic environment and finally if the sampling site could be considered as polluted (waste, heavy metals, contaminations with chemicals…). "# Seq" number of Merzouga isolates or clone sequences affiliated to taxonomic group, "# >0 N" number of sequences that have at least one close relative in EMBL database, "# neigh" total number of EMBL close neighbors, "# annot" number of EMBL entries containing environmental annotation

	# Seq	# >0 N	# neigh	# annot	soil	aquatic	pollution	arid
Actino								
isolates	20	15	338	271	180	70	74	47
clones	17	4	368	265	207	68	84	42
Bacillus								
isolates	8	5	95	79	35	46	7	24
clones	34	16	214	190	134	76	14	13
GNS								
isolates	0							
clones	4	0	-	-	-	-	-	-
Plancto								
isolates	0							
clones	1	0	-	-	-	-	-	-
beta								
isolates	1	0	-	-	-	-	-	-
clones	11	8	256	223	104	69	58	13
gamma								
isolates	0							
clones	1	0	-	-	-	-	-	-
alpha								
isolates	1	1	8	7	7	0	0	4
clones	7	3	130	91	49	27	38	7
delta								
isolates	0							
clones	1	0	-	-	-	-	-	-
proteo ND								
isolates	0							
clones	2	0	-	-	-	-	-	-
CFB								
isolates	5	0	-	-	-	-	-	-
clones	5	0	-	-	-	-	-	-
Clostri								
isolates	0							
clones	1	0	-	-	-	-	-	-
Acido								
isolates	0							
clones	1	0	-	-	-	-	-	-
Unclassif								
isolates	0							
clones	4	0	-	-	-	-	-	-
Total	124	52	968	775	494	242	194	91

Figure 1. Observation of Syto9-labelled bacteria on the grain surface

Composite image of Syto fluorescence spots superimposed on the white-light image

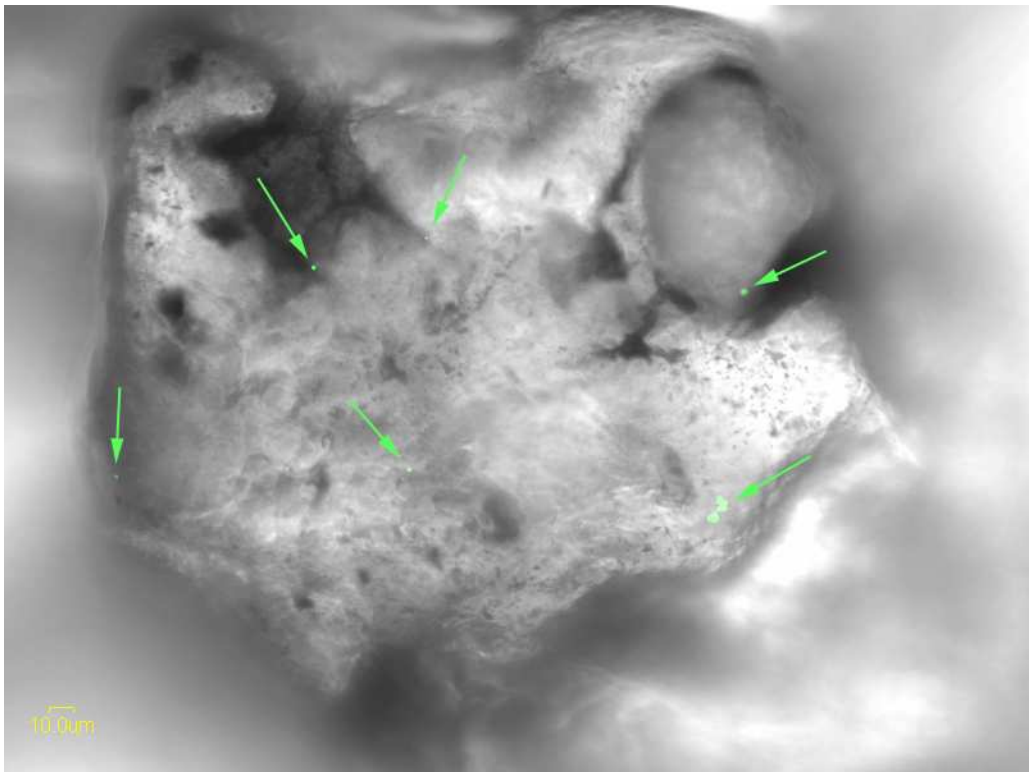
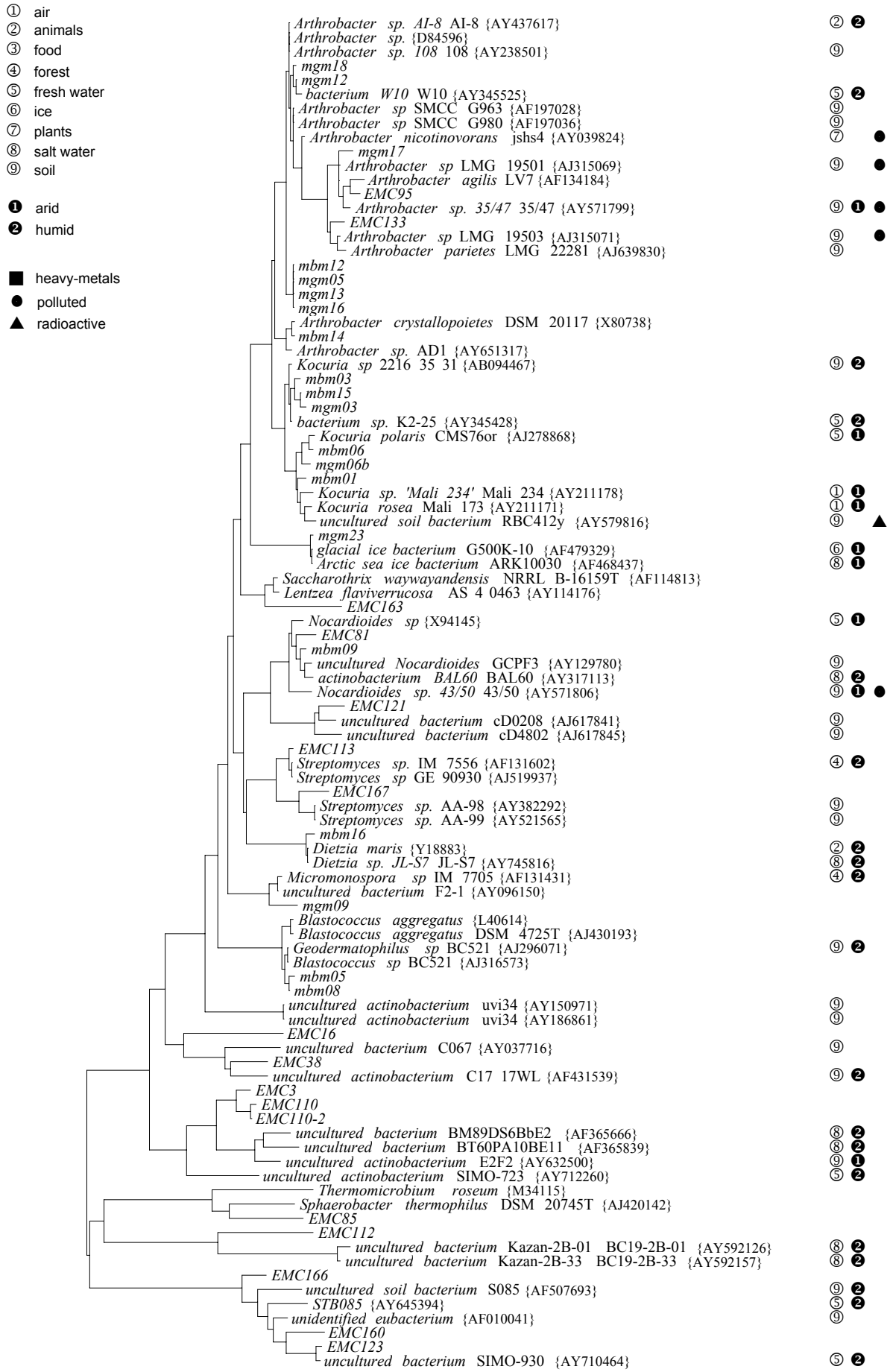
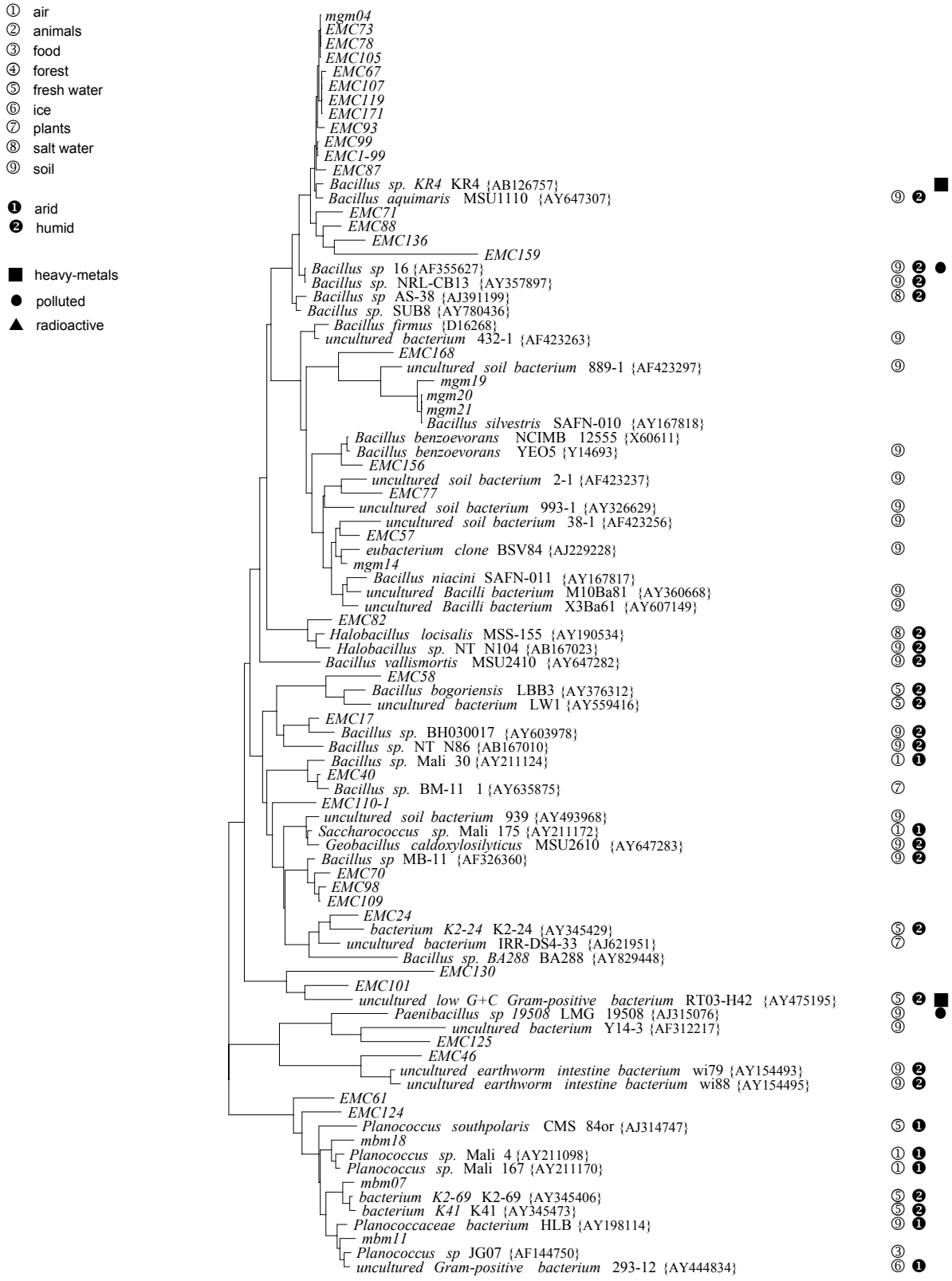


Figure 2. Unrooted neighbor-joining trees of partial16S rRNA gene sequences (A: Actinobacteria, B: Bacilla, C: others). For each Merzouga sequence, the two most similar sequences deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ database are shown (accession numbers in brackets). Additional information concerning the locations and conditions in which these sequences had been obtained is indicated on the right of the tree (see text for more details).


① air
② animals
③ food
④ forest
⑤ fresh water
⑥ ice
⑦ plants
⑧ salt water
⑨ soil
❶ arid
❷ humid
■ heavy-metals
● polluted
▲ radioactive
Arthrobacter sp. AI-8 AI-8 {AY437617}
Arthrobacter sp. {D84596}
Arthrobacter sp. 108 108 {AY238501}
mgm18
mgm12
bacterium W10 W10 {AY345525}
Arthrobacter sp SMCC G963 {AF197028}
Arthrobacter sp SMCC G980 {AF197036}
Arthrobacter nicotinovorans jshs4 {AY039824}
mgm17
Arthrobacter sp LMG 19501 {AJ315069}
Arthrobacter agilis LV7 {AF134184}
EMC95
Arthrobacter sp. 35/47 35/47 {AY571799}
EMC133
Arthrobacter sp LMG 19503 {AJ315071}
Arthrobacter parietes LMG 22281 {AJ639830}
mbm12
mgm05
mgm13
mgm16
Arthrobacter crystallopoietes DSM 20117 {X80738}
mbm14
Arthrobacter sp. AD1 {AY651317}
Kocuria sp 2216 35 31 {AB094467}
mbm03
mbm15
mgm03
bacterium sp. K2-25 {AY345428}
Kocuria polaris CMS76or {AJ278868}
mbm06
mgm06b
mbm01
Kocuria sp. 'Mali 234' Mali 234 {AY211178}
Kocuria rosea Mali 173 {AY211171}
uncultured soil bacterium RBC412y {AY579816}
mgm23
glacial ice bacterium G500K-10 {AF479329}
Arctic sea ice bacterium ARK10030 {AF468437}
Saccharothrix waywayandensis NRRL B-16159T {AF114813}
Lentzea flaviverrucosa AS 4 0463 {AY114176}
EMC163
Nocardioides sp {X94145}
EMC81
mbm09
uncultured Nocardioides GCPF3 {AY129780}
actinobacterium BAL60 BAL60 {AY317113}
Nocardioides sp. 43/50 43/50 {AY571806}
EMC121
uncultured bacterium cD0208 {AJ617841}
uncultured bacterium cD4802 {AJ617845}
EMC113
Streptomyces sp. IM 7556 {AF131602}
Streptomyces sp GE 90930 {AJ519937}
EMC167
Streptomyces sp. AA-98 {AY382292}
Streptomyces sp. AA-99 {AY521565}
mbm16
Dietzia maris {Y18883}
Dietzia sp. JL-S7 JL-S7 {AY745816}
Micromonospora sp IM 7705 {AF131431}
uncultured bacterium F2-1 {AY096150}
mgm09
Blastococcus aggregatus {L40614}
Blastococcus aggregatus DSM 4725T {AJ430193}
Geodermatophilus sp BC521 {AJ296071}
Blastococcus sp BC521 {AJ316573}
mbm05
mbm08
uncultured actinobacterium uvi34 {AY150971}
uncultured actinobacterium uvi34 {AY186861}
EMC16
uncultured bacterium C067 {AY037716}
EMC38
uncultured actinobacterium C17 17WL {AF431539}
EMC3
EMC110
EMC110-2
uncultured bacterium BM89DS6BbE2 {AF365666}
uncultured bacterium BT60PA10BE11 {AF365839}
uncultured actinobacterium E2F2 {AY632500}
uncultured actinobacterium SIMO-723 {AY712260}
Thermomicrobium roseum {M34115}
Sphaerobacter thermophilus DSM 20745T {AJ420142}
EMC85
EMC112
uncultured bacterium Kazan-2B-01 BC19-2B-01 {AY592126}
uncultured bacterium Kazan-2B-33 BC19-2B-33 {AY592157}
EMC166
uncultured soil bacterium S085 {AF507693}
STB085 {AY645394}
unidentified eubacterium {AF010041}
EMC160
EMC123
uncultured bacterium SIMO-930 {AY710464}


① air
② animals
③ food
④ forest
⑤ fresh water
⑥ ice
⑦ plants
⑧ salt water
⑨ soil
❶ arid
❷ humid
■ heavy-metals
● polluted
▲ radioactive
mgm04
EMC73
EMC78
EMC105
EMC67
EMC107
EMC119
EMC171
EMC93
EMC99
EMC1-99
EMC87
Bacillus sp. KR4 KR4 {AB126757}
Bacillus aquimaris MSU1110 {AY647307}
EMC71
EMC88
EMC136
EMC159
Bacillus sp 16 {AF355627}
Bacillus sp. NRL-CB13 {AY357897}
Bacillus sp AS-38 {AJ391199}
Bacillus sp. SUB8 {AY780436}
Bacillus firmus {D16268}
uncultured bacterium 432-1 {AF423263}
EMC168
uncultured soil bacterium 889-1 {AF423297}
mgm19
mgm20
mgm21
Bacillus silvestris SAFN-010 {AY167818}
Bacillus benzoevorans NCIMB 12555 {X60611}
Bacillus benzoevorans YEO5 {Y14693}
EMC156
uncultured soil bacterium 2-1 {AF423237}
EMC77
uncultured soil bacterium 993-1 {AY326629}
uncultured soil bacterium 38-1 {AF423256}
EMC57
eubacterium clone BSV84 {AJ229228}
mgm14
Bacillus niacini SAFN-011 {AY167817}
uncultured Bacilli bacterium M10Ba81 {AY360668}
uncultured Bacilli bacterium X3Ba61 {AY607149}
EMC82
Halobacillus locisalis MSS-155 {AY190534}
Halobacillus sp. NT N104 {AB167023}
Bacillus vallismortis MSU2410 {AY647282}
EMC58
Bacillus bogoriensis LBB3 {AY376312}
uncultured bacterium LW1 {AY559416}
EMC17
Bacillus sp. BH030017 {AY603978}
Bacillus sp. NT N86 {AB167010}
Bacillus sp. Mali 30 {AY211124}
EMC40
Bacillus sp. BM-11 1 {AY635875}
EMC110-1
uncultured soil bacterium 939 {AY493968}
Saccharococcus sp. Mali 175 {AY211172}
Geobacillus caldoxylosilyticus MSU2610 {AY647283}
Bacillus sp MB-11 {AF326360}
EMC70
EMC98
EMC109
EMC24
bacterium K2-24 K2-24 {AY345429}
uncultured bacterium IRR-DS4-33 {AJ621951}
Bacillus sp. BA288 BA288 {AY829448}
EMC130
EMC101
uncultured low G+C Gram-positive bacterium RT03-H42 {AY475195}
Paenibacillus sp 19508 LMG 19508 {AJ315076}
uncultured bacterium Y14-3 {AF312217}
EMC125
EMC46
uncultured earthworm intestine bacterium wi79 {AY154493}
uncultured earthworm intestine bacterium wi88 {AY154495}
EMC61
EMC124
Planococcus southpolaris CMS 84or {AJ314747}
mbm18
Planococcus sp. Mali 4 {AY211098}
Planococcus sp. Mali 167 {AY211170}
mbm07
bacterium K2-69 K2-69 {AY345406}
bacterium K41 K41 {AY345473}
Planococcaceae bacterium HLB {AY198114}
mbm11
Planococcus sp JG07 {AF144750}
uncultured Gram-positive bacterium 293-12 {AY444834}

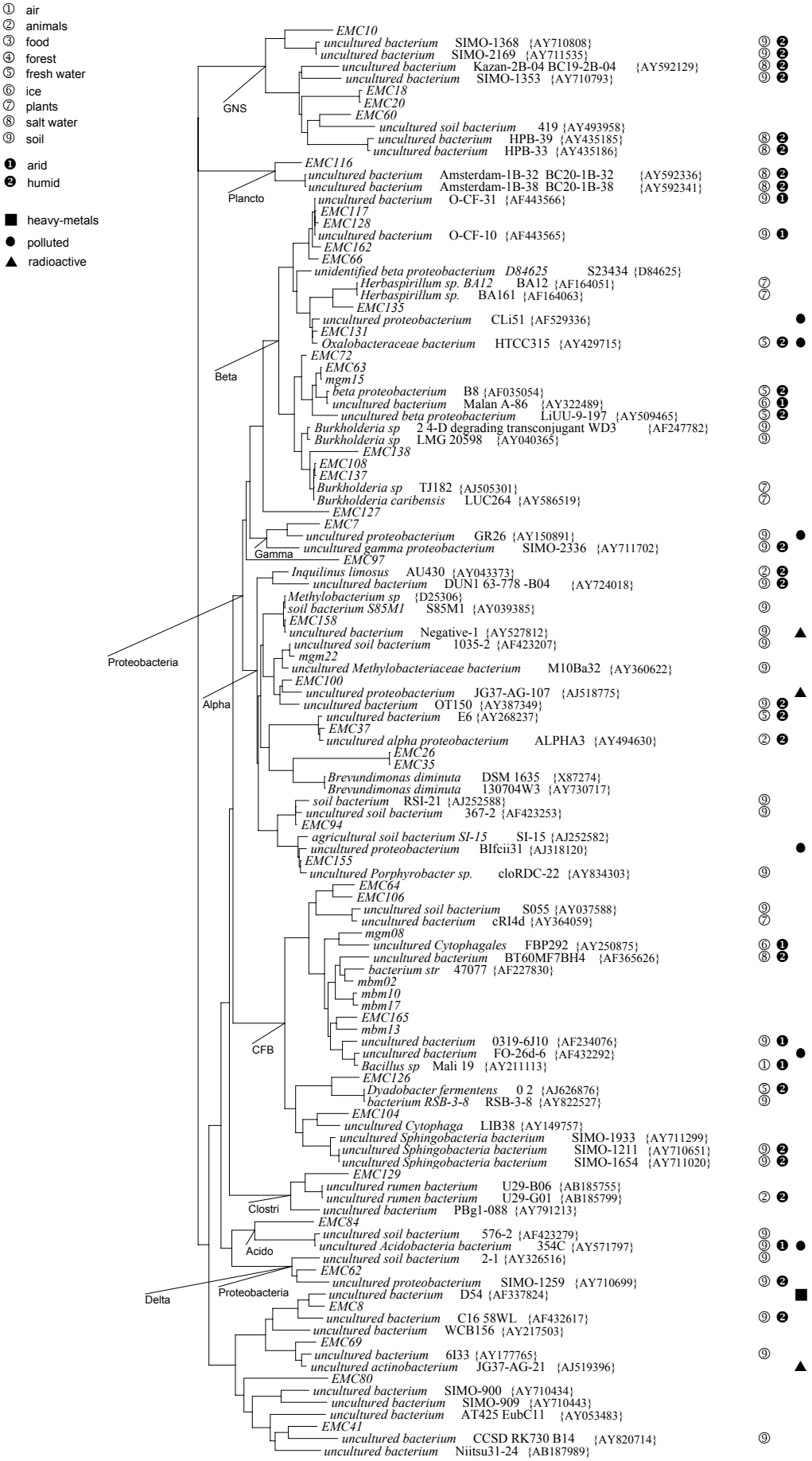
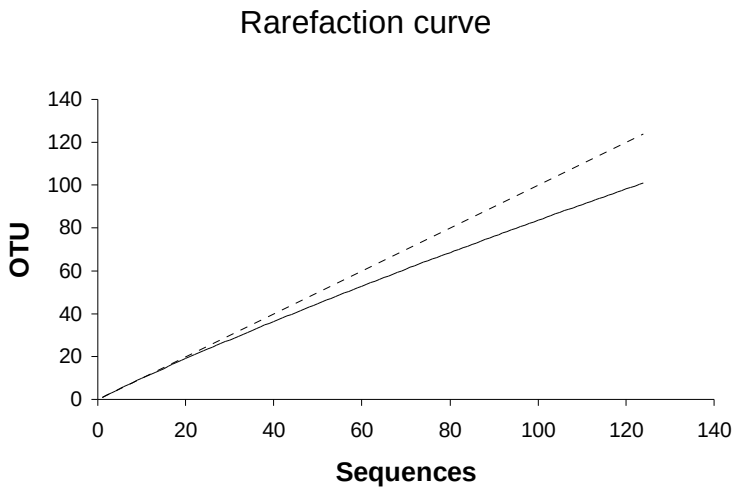

① air
② animals
③ food
④ forest
⑤ fresh water
⑥ ice
⑦ plants
⑧ salt water
⑨ soil
❶ arid
❷ humid
■ heavy-metals
● polluted
▲ radioactive
Proteobacteria
Alpha
Beta
Gamma
Delta
Proteobacteria
GNS
Plancto
CFB
Acido
Clostri
EMC10
uncultured bacterium SIMO-1368 {AY710808}
uncultured bacterium SIMO-2169 {AY711535}
uncultured bacterium Kazan-2B-04 BC19-2B-04 {AY592129}
uncultured bacterium SIMO-1353 {AY710793}
EMC18
EMC20
EMC60
uncultured soil bacterium 419 {AY493958}
uncultured bacterium HPB-39 {AY435185}
uncultured bacterium HPB-33 {AY435186}
EMC116
uncultured bacterium Amsterdam-1B-32 BC20-1B-32 {AY592336}
uncultured bacterium Amsterdam-1B-38 BC20-1B-38 {AY592341}
uncultured bacterium O-CF-31 {AF443566}
EMC117
EMC128
uncultured bacterium O-CF-10 {AF443565}
EMC162
EMC66
unidentified beta proteobacterium D84625 S23434 {D84625}
Herbaspirillum sp. BA12 BA12 {AF164051}
Herbaspirillum sp. BA161 {AF164063}
EMC135
uncultured proteobacterium CLi51 {AF529336}
EMC131
Oxalobacteraceae bacterium HTCC315 {AY429715}
EMC72
EMC63
mgm15
beta proteobacterium B8 {AF035054}
uncultured bacterium Malan A-86 {AY322489}
uncultured beta proteobacterium LiUU-9-197 {AY509465}
Burkholderia sp 2 4-D degrading transconjugant WD3 {AF247782}
Burkholderia sp LMG 20598 {AY040365}
EMC138
EMC108
EMC137
Burkholderia sp TJ182 {AJ505301}
Burkholderia caribensis LUC264 {AY586519}
EMC127
EMC7
uncultured proteobacterium GR26 {AY150891}
uncultured gamma proteobacterium SIMO-2336 {AY711702}
EMC97
Inquilinus limosus AU430 {AY043373}
uncultured bacterium DUN1 63-778 -B04 {AY724018}
Methylobacterium sp {D25306}
soil bacterium S85M1 S85M1 {AY039385}
EMC158
uncultured bacterium Negative-1 {AY527812}
uncultured soil bacterium 1035-2 {AF423207}
mgm22
uncultured Methylobacteriaceae bacterium M10Ba32 {AY360622}
EMC100
uncultured proteobacterium JG37-AG-107 {AJ518775}
uncultured bacterium OT150 {AY387349}
uncultured bacterium E6 {AY268237}
EMC37
uncultured alpha proteobacterium ALPHA3 {AY494630}
EMC26
EMC35
Brevundimonas diminuta DSM 1635 {X87274}
Brevundimonas diminuta 130704W3 {AY730717}
soil bacterium RSI-21 {AJ252588}
uncultured soil bacterium 367-2 {AF423253}
EMC94
agricultural soil bacterium SI-15 SI-15 {AJ252582}
uncultured proteobacterium BIfcii31 {AJ318120}
EMC155
uncultured Porphyrobacter sp. cloRDC-22 {AY834303}
EMC64
EMC106
uncultured soil bacterium S055 {AY037588}
uncultured bacterium cRI4d {AY364059}
mgm08
uncultured Cytophagales FBP292 {AY250875}
uncultured bacterium BT60MF7BH4 {AF365626}
bacterium str 47077 {AF227830}
mbm02
mbm10
mbm17
EMC165
mbm13
uncultured bacterium 0319-6J10 {AF234076}
uncultured bacterium FO-26d-6 {AF432292}
Bacillus sp Mali 19 {AY211113}
EMC126
Dyadobacter fermentens 0 2 {AJ626876}
bacterium RSB-3-8 RSB-3-8 {AY822527}
EMC104
uncultured Cytophaga LIB38 {AY149757}
uncultured Sphingobacteria bacterium SIMO-1933 {AY711299}
uncultured Sphingobacteria bacterium SIMO-1211 {AY710651}
uncultured Sphingobacteria bacterium SIMO-1654 {AY711020}
EMC129
uncultured rumen bacterium U29-B06 {AB185755}
uncultured rumen bacterium U29-G01 {AB185799}
uncultured bacterium PBg1-088 {AY791213}
EMC84
uncultured soil bacterium 576-2 {AF423279}
uncultured Acidobacteria bacterium 354C {AY571797}
uncultured soil bacterium 2-1 {AY326516}
EMC62
uncultured proteobacterium SIMO-1259 {AY710699}
uncultured bacterium D54 {AF337824}
EMC8
uncultured bacterium C16 58WL {AF432617}
uncultured bacterium WCB156 {AY217503}
EMC69
uncultured bacterium 6I33 {AY177765}
uncultured actinobacterium JG37-AG-21 {AJ519396}
EMC80
uncultured bacterium SIMO-900 {AY710434}
uncultured bacterium SIMO-909 {AY710443}
uncultured bacterium AT425 EubC11 {AY053483}
EMC41
uncultured bacterium CCSD RK730 B14 {AY820714}
uncultured bacterium Niitsu31-24 {AB187989}

Figure 3. Rarefaction curve for Merzouga data set

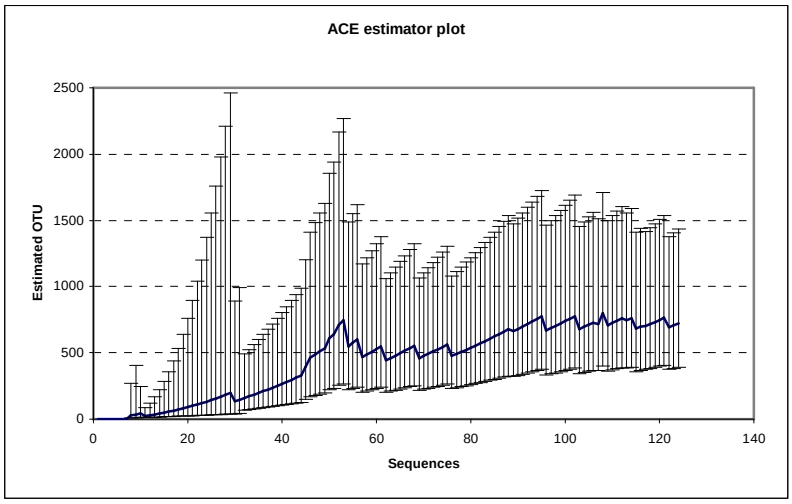
The number of OTU is given at the similarity threshold of 98%. The dashed line has a slope value of 1, corresponding to an infinite observed diversity. Though the curve for Merzouga data set is below this line, no plateau is observed. Saturation is not reached.



5

Figure 4. ACE estimator for total specific richness in Merzouga sand

The expected total number of OTU is about 750. The confidence interval is 400-1400.



4.3 Statistiques écologiques

Le travail présenté ici est un complément sur les estimateurs statistiques utilisés dans l'article. L'estimateur ACE a été conçu pour résoudre le problème du sous-échantillonnage en écologie, et obtenir à partir d'un prélèvement nécessairement partiel une estimation du nombre total d'espèces présentes dans l'échantillon. C'est au vu de ces résultats que nous avons décidé d'appliquer l'estimateur à notre banque de séquences obtenues du sable de Merzouga.

Introduction

L'étude des communautés microbiennes a été longtemps uniquement basée sur des techniques d'isolement et de mise en culture. Aujourd'hui, les méthodes qui reposent sur l'identification moléculaire peuvent, au moins en théorie, révéler des bactéries qui ne poussent pas dans des conditions standard de laboratoire. La diversité potentiellement accessible en est très sensiblement élargie. Dans un échantillon naturel, la richesse spécifique est néanmoins souvent telle qu'il n'est pas possible de l'apprécier de manière exhaustive. En séquençant de plus en plus de clones, de nouveaux groupes continuent d'apparaître. Les groupes « dominants » sont toutefois revus plus fréquemment. Il n'est pour l'instant pas possible d'atteindre la « saturation » de la diversité. Les comparaisons de la richesse spécifique de différents échantillons, qui demandent une estimation du nombre total de groupes distincts présents, sont très difficiles (Hughes *et al.*, [42]). Nous étudions ici un estimateur statistique, conçu pour fournir une approximation du nombre total d'espèces présentes dans une communauté dont on a étudié un échantillon. Nous le testons sur des modèles de communautés, dont le nombre d'espèces est fixé par avance. Ainsi, il est possible de mesurer la performance de l'estimateur statistique, selon qu'il s'approche plus ou moins de la richesse spécifique fixée.

4.3.1 Outils : courbe de raréfaction, communautés théoriques et estimateur ACE

Courbe de raréfaction

Les résultats d'une expérience d'échantillonnage et positionnement phylogénétique peuvent être résumés sous la forme d'une courbe de raréfaction, (Tipper, [86]). La courbe de raréfaction donne le nombre de groupes distincts observés en fonction du nombre de clones séquencés. Un exemple très simplifié de courbe de raréfaction est donné à la figure 4.5.

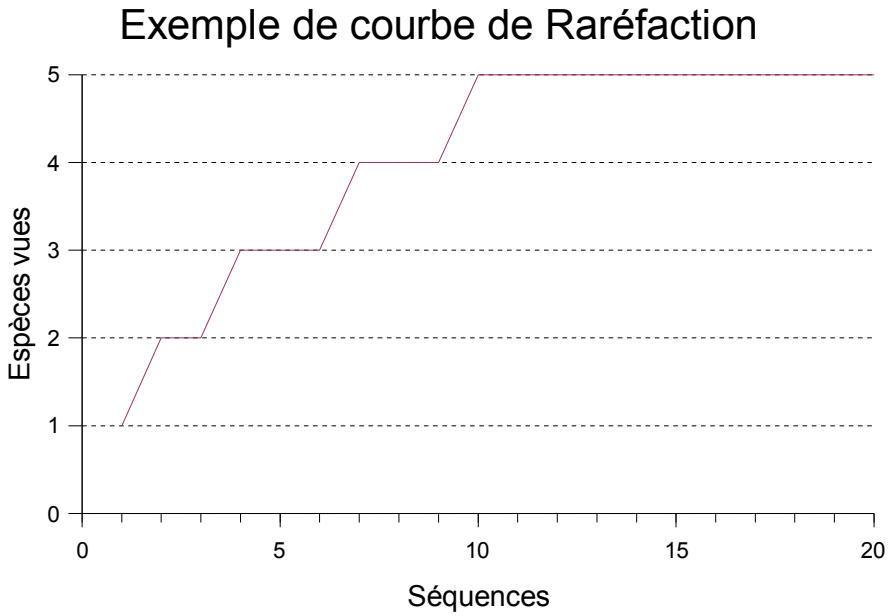


FIG. 4.5 – Exemple de courbe de raréfaction. 20 spécimens ont été analysés, et révèlent cinq espèces. Le plateau observé à partir de 10 séquences montre que le nombre total d'espèces de la communauté est de 5. On parle de « saturation » de la diversité.

Le premier spécimen étant nécessairement nouveau, la courbe part du point de coordonnées (1 ;1). Les spécimens suivants sont soit d'un groupe déjà échantillonné soit d'un groupe nouveau. Dans le premier cas, la courbe présente un plateau car le nombre de groupes distincts reste le même. Dans le second cas, elle montre une augmentation (de pente 1). Afin de lisser cet effet d'escalier, il convient de réaliser un grand nombre de permutations et d'en calculer la moyenne (Raup, [74]).

Structure des communautés théoriques

À l'aide d'une simulation informatique, nous avons étudié quatre structures théoriques de communauté. Ces structures sont représentées dans la figure 4.6.

Dans notre simulation, chaque communauté a le même nombre total d'espèces (100 chacune).

- Dans la communauté « uniforme », toutes les espèces ont la même fréquence.
- Dans la communauté « monodominée », 99 espèces ont la même fréquence et une espèce possède une fréquence vingt fois supérieure.
- La distribution des abondances des espèces dans la communauté « arithmétique » décroît régulièrement de 100 pour l'espèce majoritaire à 1 pour l'espèce la moins fréquente.
- Dans la communauté « exponentielle », les abondances maximale et minimale sont les mêmes (100 au maximum, 1 au minimum), mais la fréquence décroît d'espèce en espèce d'un facteur $f = \exp\left(\frac{-\ln 100}{99}\right)$ à chaque pas. Ainsi, la communauté est nettement dominée par un petit nombre d'espèces et compte des espèces très minoritaires.

Présentation de l'estimateur ACE

L'estimateur ACE (abundance-based coverage estimator) ne permet pas de préciser quelles sont les espèces présentes dans l'échantillon étudié mais en estime le nombre (la richesse spécifique). Le calcul corrige le nombre d'espèces observées en fonction du nombre d'espèces rares et d'espèces abondantes (Schloss et Handelsman, [79], Chao, [19] et [20]). En effet, un grand nombre d'espèces rares indique que l'on est loin d'avoir échantillonné toutes les espèces présentes. À l'inverse, si la plupart des espèces sont échantillonnées de nombreuses fois, on est proche d'avoir une vision exhaustive. Pour le calcul de l'estimateur ACE, on définit

$$N_{\text{rare}} = \sum_{i=1}^{10} i \; n_i$$

où n_i est le nombre d'espèces représentées par i individus. On définit aussi

$$C_{\mathrm{ACE}} = 1 - \frac{n_1}{N_{\mathrm{rare}}}$$

et

$$\gamma^2_{\mathrm{ACE}} = \max\left[\frac{S_{\mathrm{rare}}}{C_{\mathrm{ACE}}}\ \frac{\sum_{i=1}^{10} i\ (i-1)n_i}{N_{\mathrm{rare}}(N_{\mathrm{rare}}-1)} - 1,\ 0\right]$$

où S_{rare} est le nombre d'espèces comptant au plus 10 individus. L'estimateur ACE est alors défini par

$$S_{\mathrm{ACE}} = S_{\mathrm{abond}} + \frac{S_{\mathrm{rare}}}{C_{\mathrm{ACE}}} + \frac{n_1}{C_{\mathrm{ACE}}}\ \gamma^2_{\mathrm{ACE}}$$

où S_{abond} est le nombre d'espèces vues plus de dix fois.

4.3.2 Modèle : construction des courbes de raréfaction

Communauté uniforme

On fixe n le nombre d'espèces présentes dans la communauté, toutes avec la même fréquence. Chaque tirage est un nombre entier pseudo-aléatoire entre 1 et n. Ce nombre donne directement le rang de l'espèce révélée.

Communauté uniforme monodominée

On fixe n le nombre d'espèces présentes dans la communauté. $n-1$ espèces sont équiprobables, l'espèce dominante ayant la fréquence f. On réalise le tirage d'un nombre i pseudo-aléatoire entre 1 et $n+f-1$. Si $1 \leq i \leq n-1$, alors l'espèce i est révélée. Si $i \geq n$, alors l'espèce n est révélée.

Communauté arithmétique

Étant donné n le nombre d'espèces, la communauté théorique compte $S = \frac{n(n+1)}{2}$ individus équiprobables. Ces individus sont classés par rang d'espèce croissant. Le tableau donnant l'espèce des individus est $[1, 2, 2, 3, 3, 3, \cdots]$. Chaque espèce i est représentée par les individus $\frac{i(i-1)}{2}$ à $\frac{i(i+1)}{2}$. On réalise un tirage aléatoire d'un entier s entre 1 et S. On cherche pour cet individu le rang i d'espèce tel que

$$\sum_{p=1}^{i-1} p \leq s \leq \sum_{p=1}^{i} p.$$

On résout pour cela l'équation

$$s = \frac{i(i+1)}{2}.$$

Le polynôme du second degré en i est $i^2 + i - 2s = 0$. Son discriminant est $\Delta = 1 + 8s$, toujours strictement positif. Le polynôme admet donc deux racines réelles. On considère la racine positive

$$r = \frac{-1 + \sqrt{1 + 8s}}{2}.$$

L'arrondi de r à l'entier supérieur donne i.

Communauté exponentielle

Les n espèces qui composent la communauté exponentielle ont des abondances décroissantes de n à 1. Elles constituent les termes d'une suite géométrique de raison

$$f = \exp \frac{-\ln n}{n-1}.$$

La somme des termes de cette série est

$$S = \sum_{i=0}^{n-1} f^i = \frac{1 - f^n}{1 - f}.$$

On définit aussi

$$S_\infty = \sum_{i=0}^{\infty} f^i = \frac{1}{1 - f}.$$

Un tirage consiste en un nombre aléatoire N pris entre 0 et S. On cherche n le rang d'espèce correspondant, tel que

$$\sum_{i=0}^{n-2} f^i < s \leq \sum_{i=0}^{n-1} f^i.$$

On définit d le complément de s à S_∞, $d = S_\infty - s$. On a alors

$$d_{\min} \leq d < d_{\max}, \text{ avec } d_{\min} = \frac{f^n}{1 - f},\ d_{\max} = \frac{f^{n-1}}{1 - f}.$$

En résolvant cette inégalité on obtient

$$n_{\min} = \frac{\ln(d(1 - f))}{\ln f}.$$

4.3.3 Résultats des simulations

Courbes de raréfaction des communautés théoriques

La figure 4.7 donne le résultat des quatre simulations et les quatre courbes de raréfaction des communautés étudiées. Les 100 premières séquences réalisées pour chaque communauté ne révèlent au mieux que les deux tiers des 100 espèces présentes (communauté uniforme), et au pire moins de la moitié (communauté exponentielle). Pour révéler toutes les espèces présentes, il faut réaliser un très grand nombre de séquences, même dans le cas de la communauté uniforme. Ceci est d'autant plus vrai que la répartition des fréquences des différentes espèces composant la communauté est moins homogène.

Estimateur ACE

Ce calcul a été réalisé pour chacune des communautés théoriques afin de tester la robustesse de l'estimateur. La figure 4.8 en présente les résultats.

Les quatre courbes de raréfaction de la figure 4.7(a) ont montré qu'il faut caractériser un très grand nombre d'individus ou de séquences pour avoir une vue exhaustive de la diversité des espèces présentes dans l'échantillon, particulièrement dans le cas de la communauté « exponentielle ». La convergence de l'estimateur ACE vers le nombre réel de groupes phylogénétiques est plus rapide. Ainsi, la réalisation d'un nombre limité de séquences permet d'estimer le nombre total d'espèces présentes.

4.3.4 Diversité bactérienne à Merzouga

Richesse observée

La diversité bactérienne observée à Merzouga est décrite dans l'article [36]. Nous avons obtenu 124 séquences, que nous avons groupées en 101 groupes correspondant à des espèces (Figure 3 de l'article, p. 75). La plupart des espèces n'ont été vues qu'une fois, la plus abondante est figurée par dix séquences. Nous avons de plus révélé six « doublons » et un « tétron » (espèce vue quatre fois).

Richesse estimée

L'estimateur ACE a été calculé pour le cas réel de Merzouga à partir des courbes de raréfaction établies par permutation. Nous avons utilisé le logiciel DOTUR, dont l'argument d'entrée est la matrice de distances calculée pour les séquences.

Conclusion

L'observation, dans le cas réel, d'une séquence représentée dix fois, alors que les doublons sont rares, laisse penser qu'une espèce est très bien représentée dans le sable de Merzouga (communauté « monodominée »). Pour la communauté théorique « monodominée », l'estimateur ACE converge rapidement vers la valeur de richesse spécifique réelle (voir la Figure 4 de l'article, p. 76). La stabilisation de l'estimateur dans le cas du sable de Merzouga nous permet de donner un nombre approximatif total d'espèces bactériennes présentes. La communauté comporte ainsi environ 750 espèces, dont nous avons donc échantillonné par l'expérience de clonage-séquençage environ 13 %.

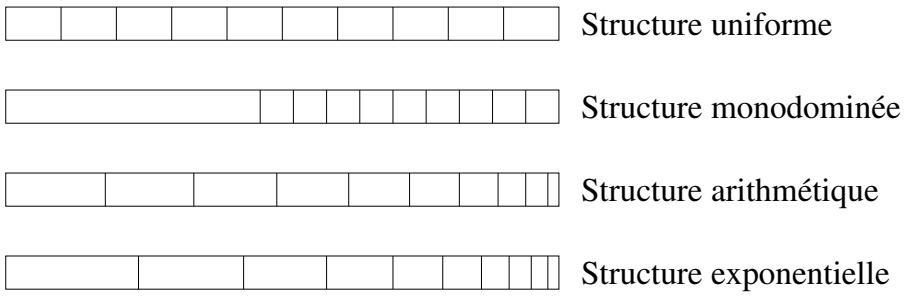
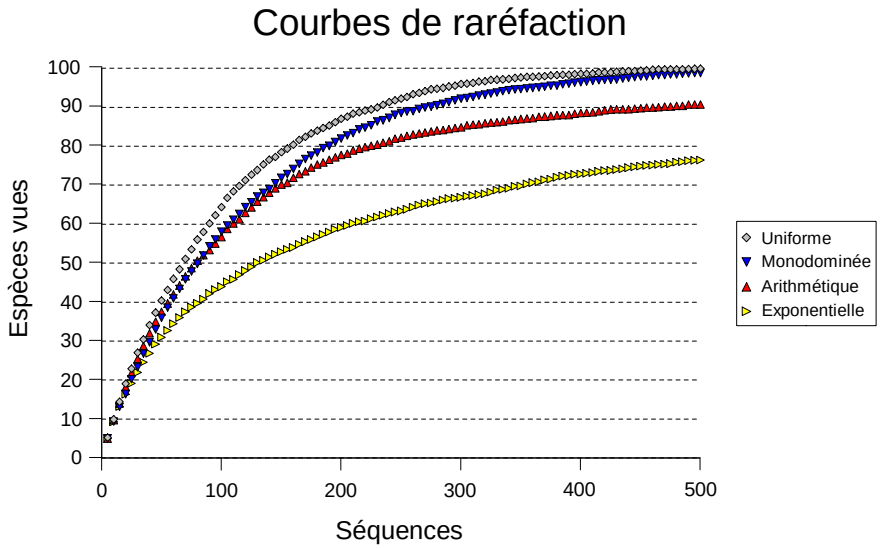


FIG. 4.6 – Structure des quatre communautés théoriques, simplifiées à 10 espèces. Le grand rectangle représente la communauté et les rectangles élémentaires représentent les espèces composant la communauté. Les espèces de la communauté uniforme ont toutes la même fréquence. Une espèce a une fréquence supérieure aux autres dans la communauté monodominée. Les communautés arithmétique et exponentielle comptent des espèces majoritaires et minoritaires. La différence entre les espèces majoritaires et minoritaires est la plus forte dans la communauté exponentielle.



(a) Courbes

Séquences	Espèces vues : C. Uniforme	C. monodominée	C. Arithmétique	C. Exponentielle
100	64	58	56	44
200	87	82	77	59
300	96	92	84	67
400	98	96	88	73
500	100	98	90	76

(b) Tableau récapitulatif

FIG. 4.7 – Courbes de raréfaction des quatre communautés théoriques, comptant chacune 100 espèces. Le nombre de séquences qu'il est nécessaire de réaliser pour échantillonner 90 espèces va de 230 pour la communauté uniforme à 270 pour la communauté monodominée à 455 pour la communauté arithmétique. Pour la communauté exponentielle, un quart des espèces restent non-échantillonnées après 500 séquences.

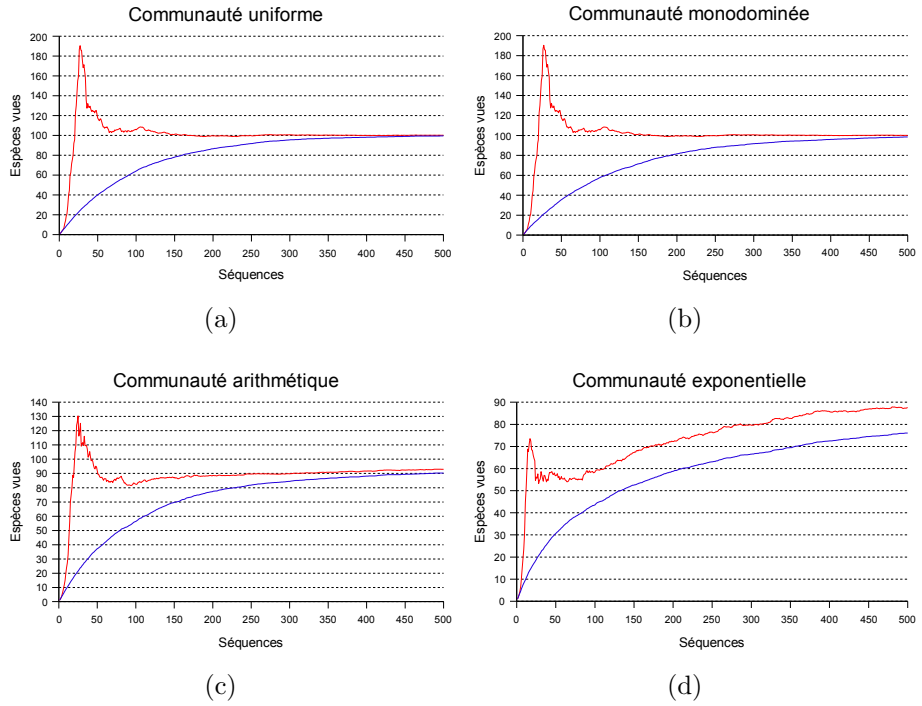


FIG. 4.8 – Test de l'estimateur ACE pour les quatre communautés théoriques. Toutes les communautés comptent 100 espèces. La courbe de raréfaction est en bleu et l'estimateur ACE en rouge. Pour un petit nombre de séquences (env. 30), le nombre d'espèces est surestimé. Si on réalise plus de séquences, l'estimation s'affine. La convergence de l'estimateur ACE vers la valeur de richesse spécifique réelle est la plus rapide dans le cas des communautés uniforme et monodominée.

Chapitre 5

Analyse grain-par-grain de la diversité bactérienne

L'étude de la répartition des espèces bactériennes sur les grains de sable de différente nature minéralogique est rapportée dans le projet d'article inséré ci-après. Cet article été préparé en vue de sa soumission à l'automne 2005 au journal *Geobiology*. Un numéro spécial sur les interactions entre les bactéries et les minéraux devait rassembler des contributions présentées au congrès 2005 de l'European Geosciences Union (Vienne, avril 2005), au cours de la session Biogeosciences. Le projet de numéro spécial ayant été très récemment abandonné, cet article sera soumis au journal *Geobiology* ou au journal *Biogeosciences* de l'EGU.

Résumé de l'article

Nous avons étudié en parallèle la diversité minéralogique des grains du sable de Merzouga et la diversité spécifique des bactéries qui vivent à leur surface. Nous avons réalisé une caractérisation individuelle des grains de sable par une technique d'analyse locale, la spectroscopie micro-Raman. Six catégories de grains ont été définies, selon la chimie de l'intérieur des grains mais aussi selon la nature de phases minérales de petite taille présentes en placages à la surface des grains. Nous n'avons pas déterminé la source des grains de sable, mais mis en évidence une fraction de grains riches en matière organique. Ces grains proviennent sans doute de zones moins arides, où les sols sont plus riches en matière organique, ou constituent des débris de croûtes microbiennes.

Afin d'estimer la répartition des espèces bactériennes sur le différents grains, nous avons réalisé des cultures bactériennes à partir de grains de

sable pris individuellement, sur un milieu nutritif gélosé. Cette expérience est possible car la biomasse bactérienne dans le sable est très faible. Après incubation et développement des colonies, nous avons récupéré les grains de sable, les avons nettoyés puis caractérisés comme indiqué plus haut. Les colonies de bactéries ont été identifiées par séquençage de l'ADNr 16S. Le nombre de colonies obtenues a été comparé à un dénombrement des bactéries par marquage fluorescent directement à la surface des grains de sable. Le pourcentage de cultivabilité ainsi estimé est très supérieur aux valeurs trouvées dans la littérature ainsi qu'à notre première estimation réalisée par suspension-étalement de plusieurs milliers de grains (50 g). Nous avons comparé les diversités bactériennes sur chaque classe minéralogique avec le résultat de l'estimation de la diversité par suspension-étalement. Les groupes bactériens omniprésents sont probablement particulièrement bien adaptés à l'environnement aride de Merzouga (notamment *Arthrobacter*). Les bactéries révélées par l'expérience de culture grain-par-grain mais pas par la méthode de suspension-étalement sont de bons candidats pour des bactéries fortement liées aux phases minérales (*Chelatococcus* et *Saccharothrix*). Inversement, les groupes non-révélés par la culture grain-par-grain sont peut-être liés à la fraction fine du sable (*Kocuria* et le groupe Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides). Enfin, nous avons mis en évidence une abondance différentielle de deux genres bactériens sur les phases minérales. *Arthrobacter* est trouvé plus fréquemment sur les phases non-quartz et *Chelatococcus* est plus fréquent sur les grains de quartz (pur ou plaqué d'hématite) que sur les autres phases. Les raisons de cette répartition différentielle sont probablement à chercher dans les propriétés de surface des différentes phases minérales.

5.1 Article

Assessing the differences in bacterial diversity between mineral phases forming Merzouga (Morocco) desert sand grains

M. Gommeaux (1), G. Montagnac (2), T. Heulin (1) and F. Guyot (3)

(1) LEMiR, DEVM-DSV, UMR 6191 CNRS-CEA-Université de la Méditerranée, CEA Cadarache, F-13108 Saint-Paul-lèz-Durance
(2) Laboratoire des Sciences de la Terre, UMR 5570 CNRS-ENS Lyon, 46 allée d'Italie, F-69364 Lyon
(3) Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés and Institut de Physique du Globe de Paris, 140 rue de Lourmel, F-75015 Paris

Abstract

Sand grains from the arid dunes of Merzouga, Morocco, were individually characterized both by microbiological and mineralogical techniques. A grain-wise cultivation was conducted, enabled by the extremely low biomass in the sand. On average, one colony per sand-grain was obtained and identified by 16S rDNA sequencing. This grain-wise experiment led to a sevenfold increase in the estimated bacterial culturability ratio, compared to whole sand suspension-plating. We confirmed that the genus *Arthrobacter* is well adapted to arid soils. Among the isolates retrieved, the genera *Chelatococcus* and *Saccharothrix* are candidates for bacteria strongly adhering to the mineral surfaces and thus difficult to recover by suspension-plating. The specific richness is measured to be similar on the different mineralogical families. The details of the repartition of the isolate taxa on the six mineralogical categories are discussed (pure quartz, carbonate, other silicates, hematite-plated or organic-matter plated quartz and unknown minerals). They hint that the genus *Arthrobacter* has a preference towards non-quartz grains and the genus *Chelatococcus* has a preference towards pure or hematite-plated quartz grains and other silicates.

Introduction

More and more evidence is rapidly accumulating that micro-organisms, and especially bacteria, are involved in the formation and alteration of various minerals. A well-known example of biomediated precipitation is that of carbonates (e.g. Lopez-Garcia *et al.*, 2005). The term weathering is also an indication that the alteration of rocks and minerals results from a variety of factors, with particular importance of water and the rain, but also of rock-colonizing living organisms. In temperate soils, aggregates are the smallest physical unit. They are composed of mineral and organic grains bound more or less strongly by polymeric substances or clay minerals (e.g. Ranjard and Richaume, 2001). In a soil, aggregates with different physico-chemical properties exist, which are difficult to separate without destabilizing them (Bossuyt *et al.*, 2001). However, in arid environments, soils seldom develop to the same extent as under wet climates. Fragmented but mostly unweathered rock, with low organic content, is more frequent. In sands, the grain appears to be the smallest physical unit, not bound to other grains. The work on which we report here is an investigation on the relationship between bacteria and minerals in an arid environment. We studied the repartition of bacteria on the different mineral phases that form the sand of the Merzouga dunes in Morocco. The description of bacterial abundance and diversity in this sand has been described earlier (study submitted for publication, Gommeaux *et al.*, 2005). The very low number of bacteria per gram of sand permitted us to conduct the first grain-wise cultivation of bacteria to our knowledge. We characterized the mineralogy of the same grains after the step of cultivation. This enabled us to investigate correlation with bacterial taxonomic groups and mineral phases.

Materials and methods

Mineralogical methods for inventory of the Merzouga sand

- Magnetic sorting, granulometry and XRD

From visual inspection, it is obvious that the Merzouga sand is mostly formed of well-sorted quartz grains. A minor fraction of dark grains exists. The sand was sorted using Frantz Isodynamic magnetic sorter. The highly magnetic fraction was extracted at low magnetic field (by setting 0.35 A m^{-1} in the bobin), yielding 7.4 g/kg of sorted sand. The moderately magnetic fraction was extracted at high field (1.5 A m^{-1}), yielding 82.5 g/kg of sorted sand. We selected that fraction for microbiological studies, in order to maximize the mineralogical diversity. The total sand and the moderately magnetic fraction of the sand were analysed by laser granulometry in order to estimate the average number of grains per gram of sand. We used a Malvern Mastersizer (Malvern Instruments). X-ray diffraction (XRD) was conducted on the total sand, on the highly and moderately magnetic and ont the residual mostly quartzose fractions, after grinding in an agate

mortar. The spectra were acquired on a Philips MPD 3710 diffractometre, at the Kα line of Cobalt (λ=1.79 nm). Five seconds of acquisition at each of the 0.05° step from 3.5 to 78° made the total duration of one acquisition approximately two hours. The spectra were treated using the software X'Pert (Philips).

- SEM on thin sections

Thin sections of the sand were prepared by including the sand in resin and polishing with silicon carbide powder to a thickness of 30 µm. The thin sections were coated with carbon. Observations were made on a Jeol 6301 scanning electron microscope (SEM) with field-emission gun. The acceleration tension was 20 kV and the working distance 15 mm. An EDX detector allowed to study the repartition of chosen elements. We analyzed the repartition of Si, Ca, Mg, Al, Fe, K, Na, at low magnification.

- Micro-Raman analysis of grains and category definition

The sand grains were analysed after mounting on glass slide for handling convenience. No treatment was conducted, except the ultrasonic cleaning of the grains mentioned below. Spectra were acquired on a Jobin-Yvon LabRam spectroscope with an excitating laser line at 633 nm and a grating with 600 grooves per millimetre. The optical equipment used included 50x microscope objective from Olympus. At this magnification the zone analyzed was estimated to be close to 5 µm in diameter. Three 10 s acquisitions were generally sufficient for obtaining good spectra, using a window ranging from 200 to 1400 cm^{-1}. On each sand grain, three or more spectra were acquired, at positions chosen so as to sample the visual heterogeneities of the grain surface. Peak positions were noted and compared to a reference database for mineral identification (database at http://www.ens-lyon.fr/LST/Raman). Each of the three spectra on a grain yielded a major and sometimes several minor phases.

Methods for microbiological inventory

- Enumeration of the total number of bacteria

A series of 54 sand grains was characterized by using fluorescent staining. The Syto9 dye (Molecular Probes) was used, following the manufacturer's instructions. The grains were observed under optical microscope at low magnification. The epifluorescence system included a burner and a pair of filters corresponding to the excitation and emission wavelength of the Syto9 (480 nm excitation and 500 nm emission). Only the upper half of the grain is accessible with such technique. However, we made the hypothesis that the number of fluorescence spots on the dark side of the grain is the same as on the light side.

- Grain-wise cultivation

A second series of grains was analyzed as follows. The grain-wise cultivation was conducted on TSA/10 solid medium (Difco). To maximize mineralogical diversity and reduce the proportion of

quartz-only grains, grains were taken from the magnetically enriched fraction of the sand. 132 individual grains were rewetted in Eppendorf tubes with 30 µl of water. The water, possibly including detached bacteria, and the grain were deposited on agar Petri dishes on three different spots. Firstly the grain was taken from the tube together with 10 µl of supernatant. Then the remaining water was deposited as 10 µl drops on two different spots. The dishes were covered and incubated in the dark at 30 °C until colony development. We assumed that the vapor-saturated air in the plate allowed for a film of water, including the nutritive solutes, to form on the whole surface of the grains. After colonies formed, the grains were removed, cleaned by ultrasonic treatment and characterized under Raman spectroscope as described above.

- Taxonomic affiliation of isolates by 16S-rDNA amplification and sequencing

For PCR amplification of the 16S-rRNA gene, fragments of grain-grown colonies were taken and suspended in water. Cells were lysed by ten minutes incubation at 98 °C. Cell debris were removed by centrifugation. The supernatant (1 µl) served as a matrix for PCR. The reaction mix was prepared for a final volume of 30 µl. The reaction mix comprised 16.2 µl of ultrapure water, 3 µl of 10x buffer, 1.2 µl of dNTP mix at 10 mM each, 3 µl of each fD1 (5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-3'; *Escherichia coli* bases 8 to 27) and S17 (5'-GTT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTT-3'; *E. coli* bases 1509 to 1492) primers at 10 µM, 2.4 µl of $MgCl_2$ at 25 mM, 0.2 µL of Hot GoldStar polymerase at 5 u/µl, and 1 µl of cell lysate matrix. PCR was conducted with Biometra T1 thermal cycler on the following steps: 10 min at 95 °C for polymerase activation and initial DNA denaturation, followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s of annealing at 55 °C and 1.5 min of extension at 72 °C and then final extension at 72 °C for 2 min. The success of PCR was checked by ethidium-bromide gel electrophoresis of the PCR products, which were subsequently purified using QiaQuick columns (Qiagen) and served as template for sequencing. The sequencing kit Big Dye (Applied BioSystems) was used following the manufacturer's instructions, with the primer S6 (5'-GTA-TTA-CCG-CGG-CTG-CTG-3'; *E. coli* bases 534 to 518). Sequencing was done on an AbiPrism 310 automatic sequencer (Applied BioSystems).

Interpretation of the taxonomic data

- Alignment of the sequences

The sequences were aligned pairwise and the scores were computed by ClustalW at the web server of the European Bioinformatics Institute of EMBL using the standard parameters (http://www.ebi.ac.uk/clustalw).

- OTU definition

After re-formatting the results of ClustalW to create a distance matrix, the DOTUR software (Schloss and Handelsman, 2005) was used to define operational taxonomic units (OTU). We used

the standard mode of furthest neighbor sequence assignment. DOTUR computes OTU at similarity threshold values ranging from 0 through 100% and the user decides which cutoff value is most relevant. The OTU were named after the taxonomic information in the genbank descriptions of the blast closest neighbors.

Results

- Granulometry and XRD

The results of the laser granulometry analysis for the total sand and moderately magnetic fraction of the sand are shown in Figure 1. The shapes of the curves are similar. However, the distribution of size for the moderately magnetic fraction of the sand is shifted towards coarser grains than the total sand. Grains bigger than 200 µm in diametre account for over 96% of the volume of the total sand and for 98% of the moderately magnetic fraction. This fraction corresponds to the grains that we analyzed both by Raman and the microbiological techniques. Besides, approximately 1% of the sand volume are grains less than 10 µm. However, it is not possible to state whether those are a fine fraction of the sand or the result of resuspension of platings that were loosely attached to the surface of bigger grains. We converted the volume of each of the 14 size-classes above 200 µm into a number of grains by assuming a spherical shape. The number of grains in a gram of sand was estimated using the sand specific gravity 2650 kg/m^3, and the sum of the 14 estimated grain numbers is 21000 ± 3000 grains/g for the total sand and 18000 ± 2500 grains/g for the moderately magnetic fraction. The XRD spectrum of the total sand revealed no other minerals than quartz and calcite. The spectrum of the moderately magnetic fraction showed more diverse minerals, including feldspar and iron oxides (Figure 2).

- SEM and Raman characterization of sand grains

Three categories were defined after SEM observations, according to the composition of the bulk of the grains. Grains showing only Si were assumed to be quartz grains (labeled 1 on Figure 3). Grains showing only Ca and some Mg are carbonates (labeled 2 on Figure 3). Grains containing Al and Na or K in addition to Si are other silicates, mostly feldspars and micas (labeled 3 on Figure 3). The Raman investigation confirmed the three SEM-defined categories. The typical spectra for the categories of grains are shown in Figure 4. A pure quartz grain was defined by the predominance of quartz and its major peak at 464 cm^{-1} on all three spectra acquired on the grain. A carbonate grain was defined by the dominance of the peak of calcite at 1087 cm^{-1} on at least one of the three spectra. This category includes quartz grains plated with carbonate as well as pure carbonate grains. The spectra of "other grains" showed peaks characteristic of silicates other than quartz (mostly feldspars and some micas), to which we added oxides (mostly anatase). Three more categories were defined according to the Raman spectra of the grains. An hematite-plated quartz

grain was defined by the peaks of hematite at 411 and 299 cm^{-1} occuring as dominant peaks on at least one spectrum. An organic-matter plated quartz grain was defined by a broad peak spanning from 1300 to 1350 cm^{-1} similar to graphite and by an additional peak from 1580 to 1600 cm^{-1} when using the broader spectral window. The possible confusion of that band at 1300 cm^{-1} with a band of Hematite was avoided by checking the absence of the hematite peaks at lower shift values. The spectra of grains of unknown nature showed peaks to which we found no equivalent in the reference database. The respective numbers of grains of those six categories are 23, 19, 44, 9, 16 and 9.

- Enumeration of cells on the surface of grains and grain-wise cultivation

A series of 54 grains was stained with Syto9 and counted. The number of fluorescence spots per grain is 4.3 ± 0.65 spot/grain. The corresponding number of bacteria is 155000 ± 23000 bact/g. The grain-wise cultivation of an additional series of 132 grains yielded 163 colonies. The number of colonies retrieved per grain are shown on Figure 5. Seventy-three grains grew one colony. Similar numbers of grains yielded no or two colonies. Eleven grains grew more than two colonies. The proportion of grains yielding no, one or two colonies are comparable in the different classes of grains. This shows that the culturable biomass present on the surface of the different kinds of grains is the same. Connecting to the 18000 sand grains per gram, this number of colonies corresponds to 22000 culturable bacteria per gram of sand. Failure to purify the morphotypes, amplify or sequence the 16S-rDNA reduced the final number of sequences to 92 (from 73 grains). Furthermore, 12 grains were not recovered after cultivation. Seven lost grains had yielded good sequences and the corresponding 14 sequences are orphans. Thus the final figures are 78 sequences from 66 mineralogically characterized grains.

- OTU definition

We decided to consider OTU at the similarity threshold of 95 %. This threshold is between the value generally accepted for species (97 %, Stackebrandt and Goebel, 1994) and genera (93 %, Ivanova *et al.*, 1996). Thus, OTU defined at this level contain bacteria that are not necessarily of the same species but are most likely to be of the same genera. The data-set thus included113 sequences (Table 1), 78 from the grain-wise cultivation described above, to which we added 35 sequences of strains isolated as reported in Gommeaux *et al.*, 2005 ("the global isolate diversity"). At the threshold of 95 % of similarity, the number of OTU is 48, of which 27 OTU contain a single sequence. Thirty-three OTU are represented either in one of the six mineral groups of grains or in the global isolate diversity. Fifteen OTU observed from the global isolate diversity are not found in the grain-wise analysis. Five OTU are represented both in the grain-wise cultivation and in the global isolate diversity. The numbers of OTU obtained from the different mineralogical classes and from the global isolate diversity are summarized in Figure 6.

Discussion

The mineralogical study revealed a diversity of grain characteristics. There is not a unique rock whose alteration can yield such a diversity of grains. The sand has been transported by the wind. In the case of aerosols, geochemical analyses can be applied to trace the source of wind-blown deposits (Aleon *et al*., 2002). The case of the Merzouga sand is made more complicated by the fact that the winds blow from no preferential direction. Grain surface features could help but were not studied in detail here (Newsome and Ladd, 1999). The probable wind-blown origin of the sand lets us assume that the organic-rich grains are from zones where soils contain more biomass and a higher content in organic matter. Coexistence of crust-bearing zones and patches of bare sand have been described in natural environments as well as zones disturbed by human activity (Zaady *et al.*, 2000). The Merzouga sampling site is unvegetated and devoid of microbial crust, but we do not exclude that nearby crusted zones exist. The organic-rich grains may be debris of crusts, in which sand grains are bound together by filamentous organisms and their excreted molecules.

The bacterial culturability ratio that we estimated with our grain-wise technique (14%) is seven times as high as previously estimated for the same sand by a classical suspension plating technique (Gommeaux *et al.*, 2005, submitted). According to that first estimation, most grains should have not yielded a colony. The 2.0% initially estimated was in the range commonly reported in studies of environmental bacterial communities, but this second estimated 14% is out of the range. On a conceptual stand-point, this highlights the pitfalls of the notion of culturability, that is highly dependent on the protocols followed. Although they have the potential to develop in the growth conditions of the experiment, a vast majority of the culturable bacteria are firmly attached to the grain surfaces and are recovered neither by suspension nor by sonication. Separating the bacteria from the grain is difficult; introducing the grain into the culture medium, liquid or solid, is necessary for recovering the maximum number of culturable bacteria. Consequently, this technique of grain-wise cultivation cannot be immediately applied to other less extreme soils with higher biomass. In rich soils, even a small particle may contain several types of bacteria that should be difficult to isolate using the method that we used here. In the present study, the grain-wise method of cultivation was eventually validated by the recovery of only one colony per sand-grain, which is a consequence of the extremely low biomass in the desert sand.

The different mineralogical classes of sand grains that we defined yielded similar number of colonies (Figure 5). This suggests that the number of culturable bacteria per grain is the same between the classes. We assume that the total microbial biomass, including unculturable bacteria, is also the same on the different mineralogical classes. In other words, the bacterial sub-communities on the different classes of grains have the same size. Furthermore, there is a linear

relationship between the number of sequences obtained from a class of grains and the corresponding number of OTU (Figure 6). This linear relationship lets us infer that the grain sub-communities also have the same specific richness (same number of taxa), although the taxa are not necessarily the same. The comparison of the occurrences of the OTU in the grain-wise experiment and in the bulk sand is a way to address the relationship between the culturability ratio and the diversity accessible through cultivation.

Two bacterial groups appear in most mineralogical classes as well as in the global isolate diversity. Those OTU, Actino-Arthrobacter 2 (13 isolates) and Alpha-Chelatococcus 1 (12 isolates), are thus assumed to be particularly well adapted to the arid environment. The isolation of *Arthrobacter*-related strains from arid soils has already been reported in the litterature (e.g. Dobrovolskaya *et al.*, 1996). Little is known of the ecology of the genus *Chelatococcus*, but the high number of strains isolated (18 out of 78 grain-wise strains) suggests that it is frequent in the Merzouga sand. Taken together, the two genera *Arthrobacter* and *Chelatococcus* account for 36% of the grain-wise isolates. Two other groups, each comprising five isolates, were observed from the global isolate diversity and absent from the grain-wise analysis (Table 1). The absence in the grain-wise analysis of the genus *Kocuria* (two OTU) and the phylum Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (four OTU), which are observed at significant levels in the global isolate diversity, leads to two possible interpretations. The first hypothesis is that the grain-wise cultivation, taking only grains bigger than 200 µm, does not recover the bacteria that are preferentially attached to fine particles. Although the fine fraction is only 2 % of the sand, it may also include unattached bacterial forms (e.g. spores of genera such as *Bacillus*), that are easily recovered by suspension but not by the grain-wise cultivation technique. An alternative explanation, that should be kept in mind when considering the details of OTU occurrence, is that the grain-wise bacterial inventory is not exhaustive.

The OTU that are frequently observed among the grain-wise cultured strains but which are absent or nearly-absent from the global isolate diversity are good candidates for bacteria firmly attached to the minerals, potentially interacting strongly. Eleven isolates, classified in the OTU Actino-Saccharothrix 1 to 3, have no closely related isolate in the global isolate diversity. The three OTU classified as Alpha-Chelatococcus 1 to 3 group 18 sequences, only one of them having been obtained from the global isolate diversity. Thus, the two genera *Chelatococcus* and *Saccharothrix*, respectively belonging to alpha-Proteobacteria and Actinobacteria, are good candidates for bacteria adhering strongly to minerals surfaces.

The OTU are not evenly distributed on the different mineralogical classes of sand grains. The details of their repartition can be used to infer preferential attachment of some taxa to specific mineral surfaces. We discussed above the frequent occurrence of the OTU Actino-Arthrobacter 2,

that is only absent from the organic-matter rich grains. However, only one representative of this group was isolated from pure quartz grains, although this mineralogical class yielded the second highest number of isolates. We interpret this as a preference of the genus *Arthrobacter* towards non-quartz phases (10 isolates). Conversely, we hypothesize that the genus *Chelatococcus* has a preference towards sand grains of quartz (pure or plated with hematite) and other silicates. Eight of the nineteen isolates from pure or hematite-plated quartz grains belong to the three *Chelatococcus* OTU, which is higher than the global proportion of this genus over the total number of isolates. Contrarily, only one out of the thirteen isolates retrieved from carbonate grains belongs to this genus. At this stage, it not possible to infer what the reasons are for those mineralogical preferences. We may think of positive or negative chemotaxis and of surface properties. Further investigations would require to cultivate the selected strains in the presence of the mineral phases, conducting both kinetic analysis of the development of the bacteria and of the surface chemistry of the minerals.

Acknowledgements

M.G. thanks Mohamed Barakat for help with the exploitation of DOTUR output files, Thomas Perrier who performed the granulometry analysis, Estelle Marcon for help with the incubations and Daniel Borschneck who performed the XRD analysis, Pr Baslé and the whole team of the Angers laboratory for SEM analysis. This work was supported by the GEOMEX program grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

References

Aleon, J.; Chaussidon, M.; Marty, B.; Schutz, L. & Jaenicke, R. (2002), 'Oxygen isotopes in single micrometer-sized quartz grains: tracing the source of Saharan dust over long-distance atmospheric transport', *Geochimica et Cosmochimica Acta* **66**, 3351-3365.

Bossuyt, H.; Denef, K.; Six, J.; Frey, S.D.; Merckx, R. & Paustian, K. (2001), 'Influence of microbial populations and residue quality on aggregate stability', *Applied Soil Ecology* **16**(3), 195-208.

Dobrovolskaya, T.G.; Chernov, I.Y. & Zenova, G.M. (1996), 'Vertical structure of bacterial complexes in the Negev Desert (Israel)', *Microbiology* **65**, 251-255.

Gommeaux, M.; Barakat, M.; Christen, R.; Chevenet, F. & Heulin, T. (submitted july 2005) 'Culture and molecular assessments of bacterial diversity within the dunes of a sandy arid soil in southeast Morocco', Submitted to *Environmental Microbiology.*

Ivanova, E.P.; Flavier, S. & Christen, R. (2004), 'Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria: emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Moritellaceae fam. nov., Ferrimonadaceae fam. nov., Idiomarinaceae fam. nov. and Psychromonadaceae fam. nov', *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(Pt 5), 1773-88.

Newsome, D. & Ladd, P. (1999), 'The use of quartz grain microtextures in the study of the origin of sand terrains in Western Australia', *Catena* **35**, 1-17.

Ranjard, L. & Richaume, A. (2001), 'Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil', *Research in Microbiology* **152**, 707-716.

Schloss, P.D. & Handelsman, J. (2005), 'Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness.', *Appl Environ Microbiol* **71**(3), 1501-1506.

Stackebrandt, E. & Goebel, B. (1994), '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**(4), 846-849.

Zaady, E.; Kuhn, U.; Wilske, B.; Sandoval-Soto, L. & Kesselmeier, J. (2000), 'Patterns of CO2 exchange in biological soil crusts of successional age', *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 959-966.

Table 1. Occurrence of the OTU on the different mineralogical classes of sand grains and comparison to the bulk diversity determined in an earlier study. Abbreviations are: qrtz: pure quartz, carb: carbonates, othr: other silicates and oxides, hema: hematite-plated quartz, orga: organic-matter plated grains, unkw: unknown nature, div2: global isolate diversity.

#	OTU name after Blast neighbors	qrtz	carb	othr	hema	orga	unkw	div2	Total
1	Actino-Amycolatopsis		2	1					3
2	Actino-Arthrobacter 1							1	1
3	Actino-Arthrobacter 2 (globiformis)	1	2	4	1		3	2	13
4	Actino-bacterium Ellin/Blastococcus	1		1	1				3
5	Actino-Blastococcus/Geodermatophilus							2	2
6	Actino-Cellumonas/Cellulosimicrobium		1	1					2
7	Actino-Dietzia							1	1
8	Actino-Glacial/Arctic							1	1
9	Actino-Kocuria 1							1	1
10	Actino-Kocuria 2							5	5
11	Actino-Micromonospora							1	1
12	Actino-Nocardia	1							1
13	Actino-Nocardioides 1							1	1
14	Actino-Nocardioides 2			1					1
15	Actino-Saccharothrix 1	1	2	2			2		7
16	Actino-Saccharothrix 2	1							1
17	Actino-Saccharothrix 3			2		1			3
18	Actino-Streptomyces 1						1		1
19	Actino-Streptomyces 2			1					1
20	Alpha-Porphyrobacter/Novosphingobium		1			1			2
21	Alpha-Sinorhizobium		1						1
22	Alpha-unc Alpha			2					2
23	Alpha-Chelatococcus 1	4	1	5		1		1	12
24	Alpha-Chelatococcus 2				1				1
25	Alpha-Chelatococcus 3	2		2	1				5
26	Bacillus-Bacillus 1			1				1	2
27	Bacillus-Bacillus 2			1			1	5	7
28	Bacillus-Bacillus 3			1					1
29	Bacillus-Bacillus 4			1					1
30	Bacillus-Bacillus 5			1					1
31	Bacillus-Bacillus 6 (psychrotolerans)		1			1			2
32	Bacillus-Bacillus 7 (aquimaris)	1						1	2
33	Bacillus-Bacillus 8 (macroides)	1							1
34	Bacillus-Bacillus 9 (silvestris)							3	3
35	Bacillus-Paenibacillus					1			1
36	Bacillus-Planococcus							3	3
37	Bacillus-Saccharococcus					1			1
38	Beta-proteo							1	1
39	Beta-unc bact clone	1	1	2					4
40	CFB-? 1							1	1
41	CFB-? 2							2	2
42	CFB-? 3							1	1
43	CFB-unc Cytophagales							1	1
44	Glacial ice bacterium	1				1			2
45	unc bacterium 1			1					1
46	unc bacterium 2		1						1
47	unc bacterium 3			1					1
48	uncultured eubacterium			1					1
	Sequences	15	13	32	4	7	7	35	113
	OTU	11	10	20	4	7	4	20	48

Figure 1. Granulometric curve for the total sand and the moderately magnetic fraction. Both the total sand and the moderately magnetic fraction are well sorted. The curve for the moderately magnetic fraction is shifted towards slightly coarser grain sizes.

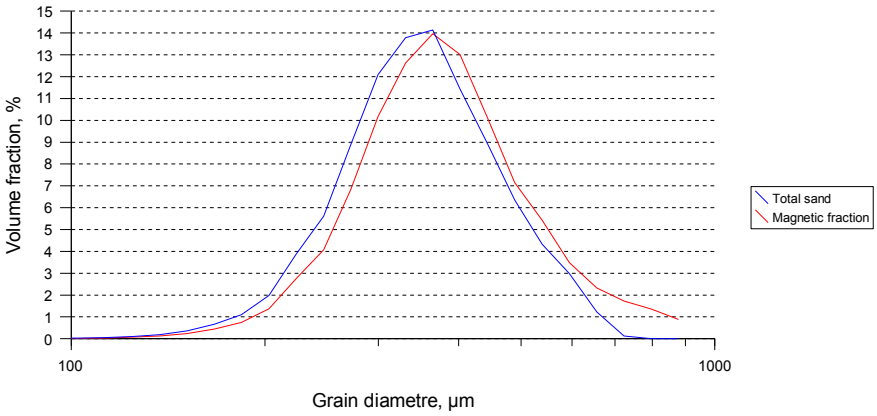


Figure 2. X-ray diffraction pattern of the moderately magnetic fraction of the sand.

The major peaks are quartz (qz) and calcite (ca). A feldspar (fd) is also present. Peaks labeled mu are indicative of a mica, probably muscovite. Three peaks between 7 and 15° indicate clay minerals, probably chlorite (cl). A weak peak at 39° indicates the presence of hematite (hm) or goethite. The vertical axis was reduced to ease the vizualisation of smaller peaks (maximum count 19000 for the major peak of quartz).

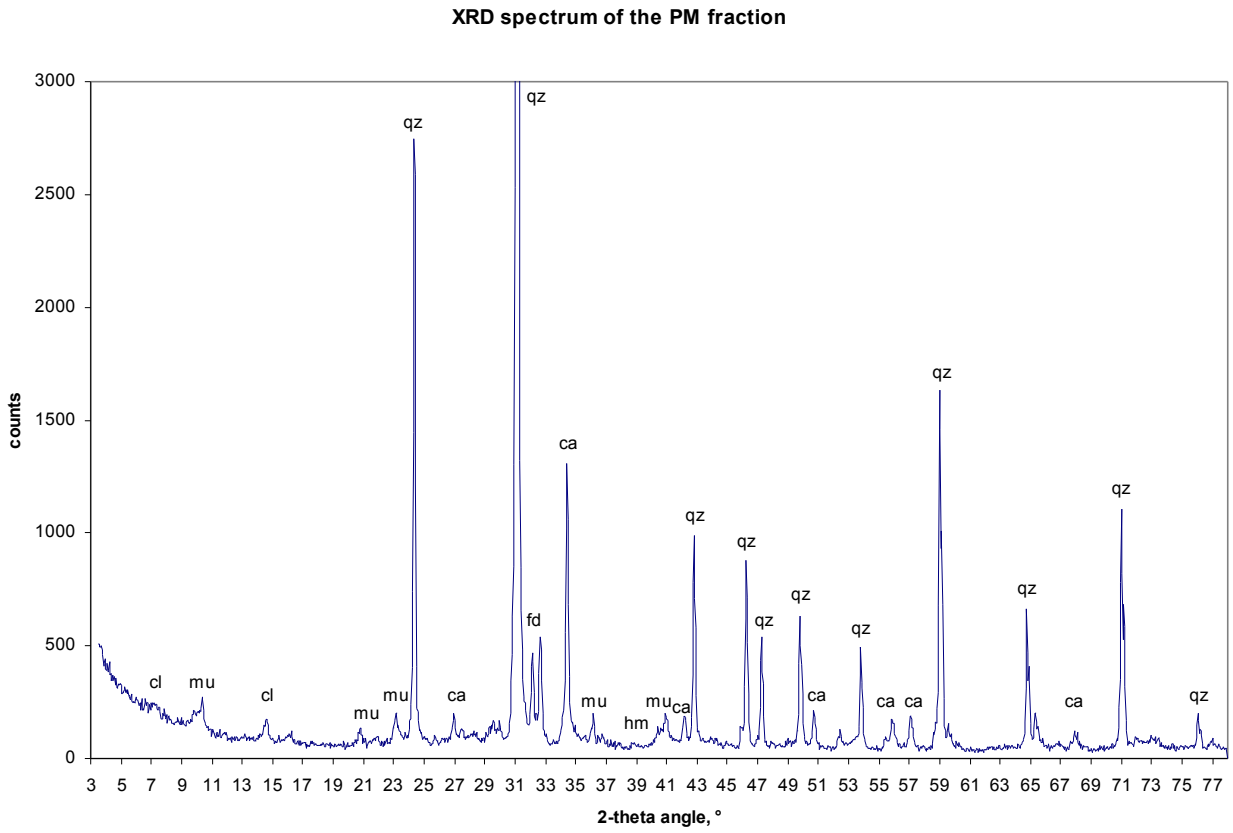


Figure 3. SEM observation of a thin section of Merzouga sand.

The colours superimposed correspond to EDS mapping of selected elements. At least three types of grains are distinguished (quartz grains as 1, carbonate as 2, silicate as 3), according to the chemistry of the bulk of the grains.

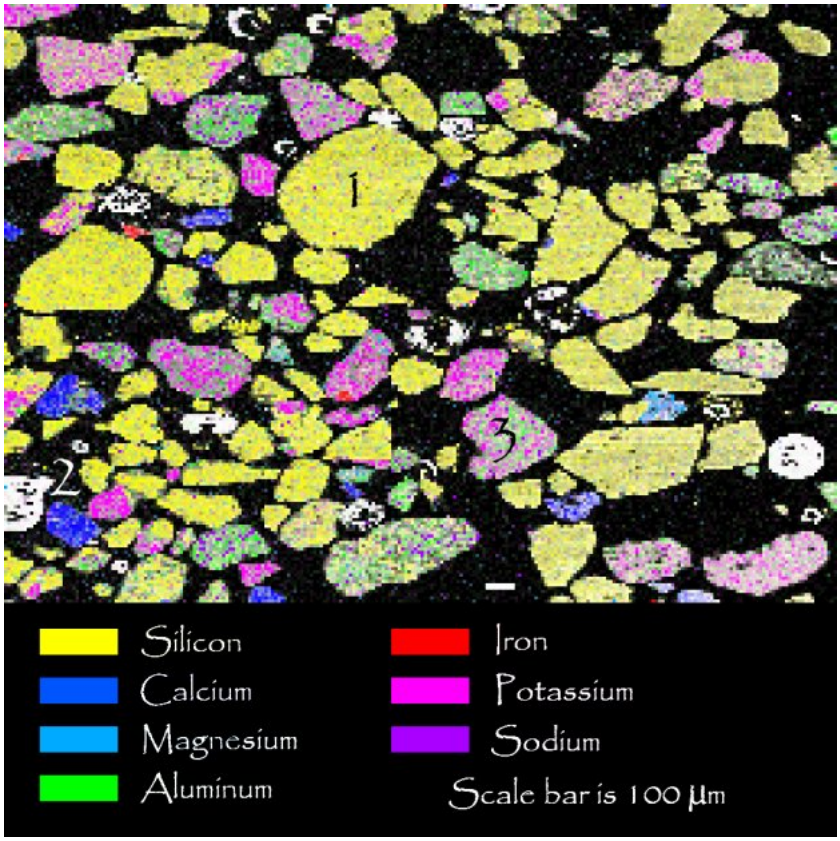
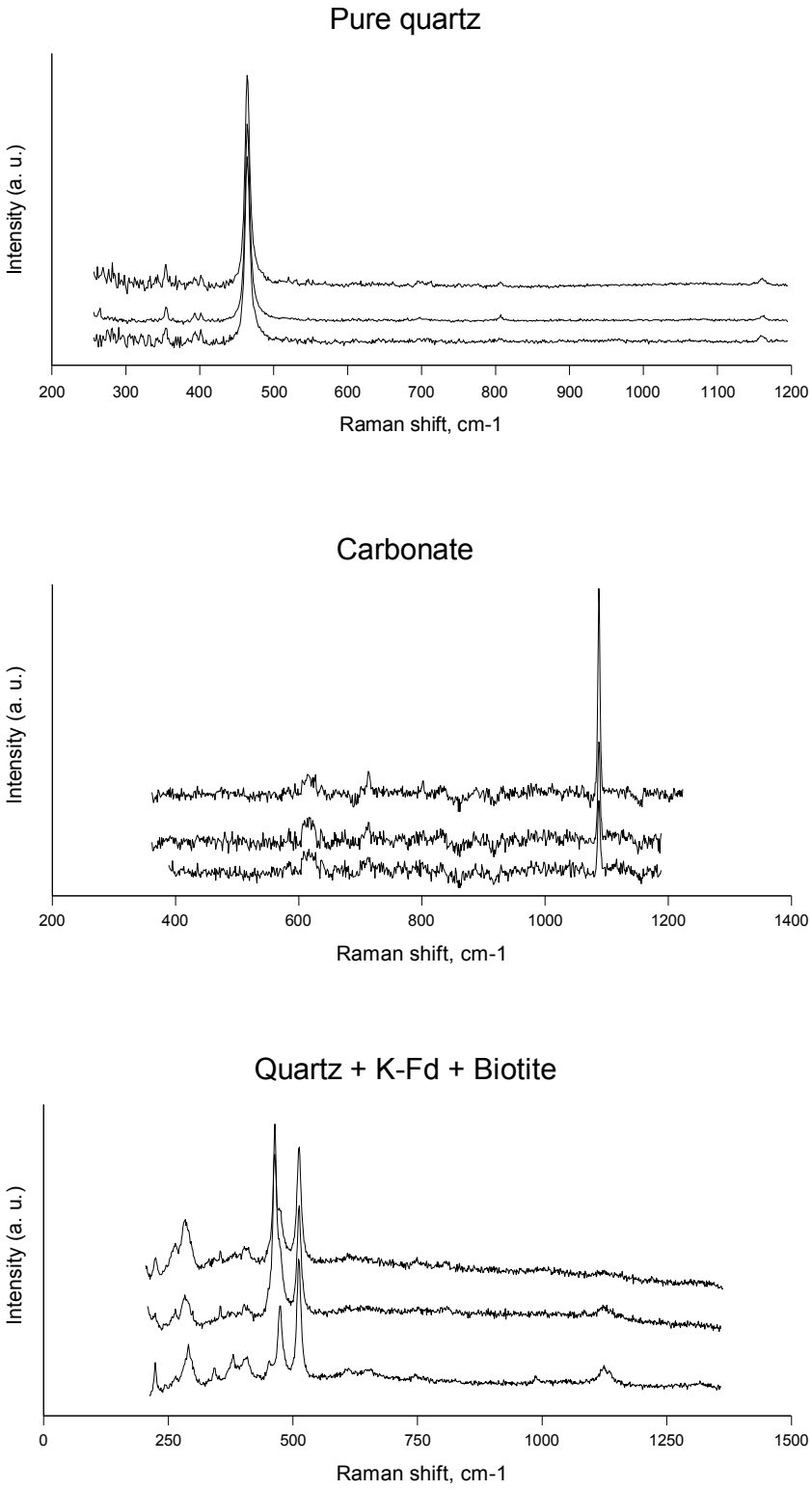
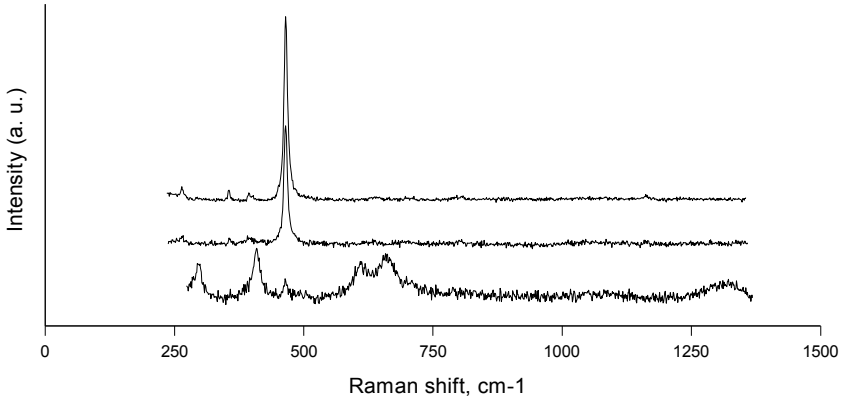


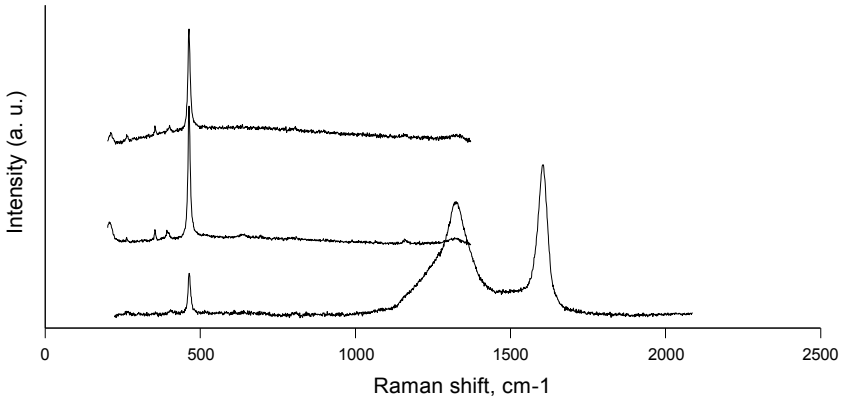
Figure 4. Typical Raman spectra defining the mineralogical classes of sand grains.
Each set comprises three spectra acquired on the same grain. The positions of the peaks were noted and compared to a reference spectra database. The minerals identified define the mineralogical groups. Baseline subtraction was performed.



Hematite-plated quartz



Organic-matter plated quartz



Undetermined mineralogical nature

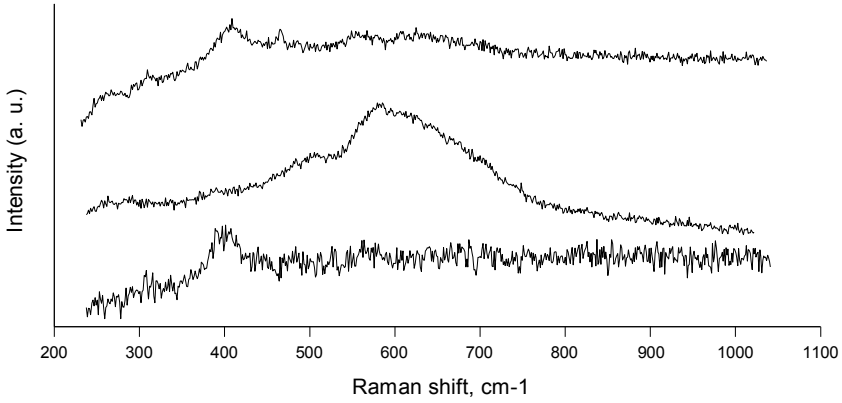


Figure 5. Number of colonies obtained in the grain-wise cultivation.

The number of grains is 132 and the total number of colonies is 163. The majority of the grains (73) yielded only one colony. Grains growing no or two colonies appeared in similar numbers (23 and 25). Eleven grains grew three or more colonies. The details of the number of colonies obtained from grains of the different mineralogical classes show no pattern. The classes yield similar numbers of colonies.

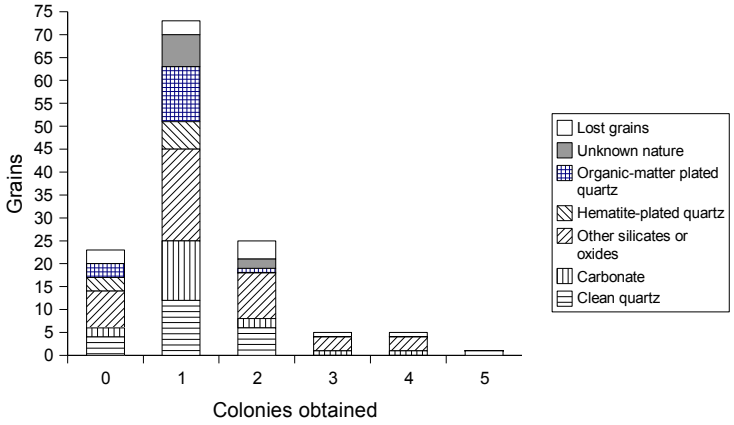
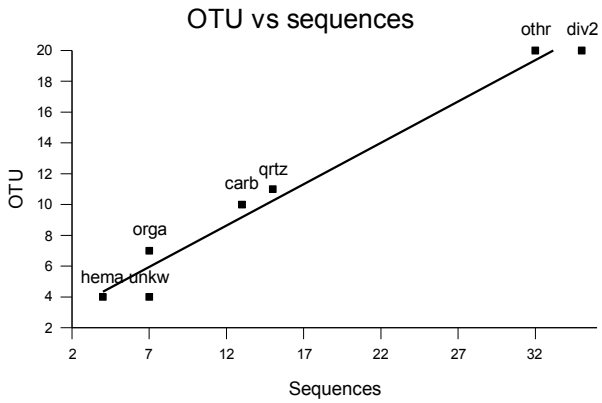


Figure 6. Plot of the number of OTU compared to the number of sequences obtained for each group of grains.

The linear relationship indicates that the number of OTU obtained from the different mineralogical classes of sand grains depends on the number of sequences, and thus of the number of isolates. Since the numbers of isolates for the different classes are similar (Figure 5), we conclude that the numbers of bacterial species (the specific richnesses) are also similar.



5.2 Complément sur la comparaison de la diversité bactérienne des différentes phases minérales

Nous avons utilisé une méthode statistique, l'analyse factorielle de correspondance (AFC, ou « correspondence analysis »), pour comparer la diversité bactérienne portée par les six phases minérales constitutives du sable de Merzouga. Cette méthode est notamment utilisée pour interpréter et comparer les profils de communautés bactériennes, tels qu'obtenus par des méthodes de *fingerprinting* comme l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE, Fromin *et al.*, [29]). Elle vise à révéler quelles sont les caractéristiques les plus discriminantes, qui expliquent au mieux la similarité ou la différence, au sein d'un ensemble d'échantillons dont de nombreuses caractéristiques sont connues.

Nous avons refait le calcul de définition d'OTU avec le logiciel DOTUR, comme expliqué dans l'article, en ne considérant que les 78 séquences obtenues par l'expérience de culture grain-par-grain. Ces séquences ont été groupées en 32 OTU. Ces OTU correspondent presqu'exactement à celles présentées dans l'article, dont nous avons ici repris la numérotation. Une seule OTU est différente, elle regroupe les OTU 3 et 27 de l'article.

La représentation mathématique des résultats de l'expérience de culture grain-par-grain assimile les phases minérales caractérisées au spectroscope Raman à des vecteurs dans un espace à n dimensions. Ces n composantes sont les abondances de chacune des OTU que nous avons définies par séquençage. Nous avons donc six vecteurs à $n = 32$ composantes, formant une matrice. Le logiciel ADE-4 (Thioulouse *et al.*, [85] et `http` ://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/ADE-4.html) a été utilisé pour l'extraction des composantes principales. Nous avons ensuite représenté dans l'espace des composantes principales les six classes minéralogiques ainsi que les 32 OTU. Les résultats sont donnés à la Figure 5.1.

Nous avons discuté dans l'article la comparaison entre la diversité globale des isolats, estimée par suspension-étalement du sable, et la diversité obtenue de l'expérience de culture grain-par-grain. L'analyse factorielle de correspondance permet de préciser les comparaisons au sein de la diversité grain-par-grain, entre les différentes phases minérales. Il faut cependant garder à l'esprit un inconvénient de cette méthode, qui est que les poids attribués aux différentes OTU rendent mal compte de leurs abondances (voir par exemple les OTU 35 et 37 qui tirent le point « orga » alors qu'elles

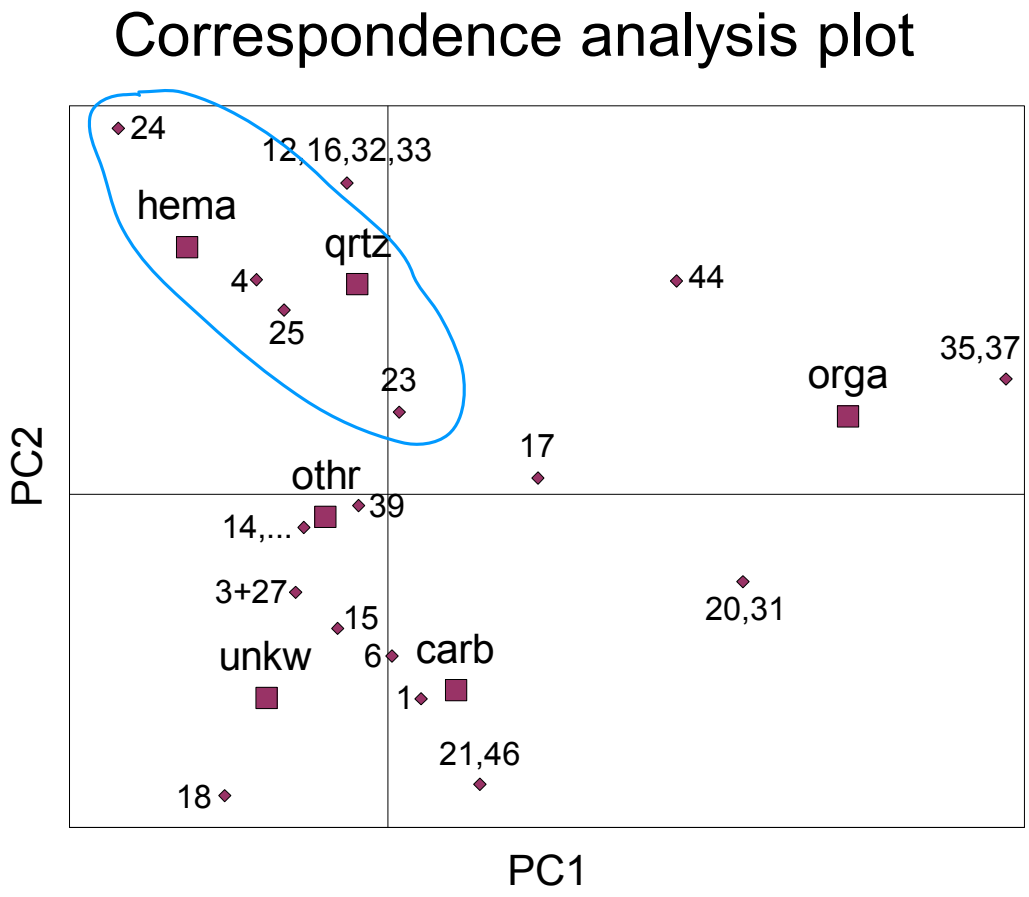


FIG. 5.1 – Résultats de l'analyse factorielle de correspondance. Les carrés représentent les six classes minéralogiques de grains de sable et les diamants représentent les 32 OTU (portant les mêmes numéros que dans l'article). « 14,... » représente les OTU 14, 19, 22, 26, 28, 29, 30, 45, 47 et 48. La zone entourée montre la présence plus fréquente du genre *Chelatococcus* (OTU 23, 24 et 25) sur les grains de quartz, pur ou plaqué d'hématite.

ne comptent que deux individus.

Nous avons conclu dans l'article que le genre *Arthrobacter* est bien adapté à l'environnement aride car il est présent sur la plupart des phases minérales, mais montrant une préférence pour les phases non-quartz. Ceci est confirmé par la position de son point représentatif sur la Figure 5.1 (indiqué 3+27), près du centre du nuage de points mais à l'opposé du point représentatif du quartz. Inversement, le genre *Chelatococcus* se trouve plus fréquemment sur les grains de quartz que sur les autres minéraux. Ceci se traduit sur le diagramme d'AFC par la position des trois points représentatifs des trois OTU de ce genre (23, 24 et 25) près des points représentatifs du quartz pur et des grains de quartz plaqués d'hématite.

Troisième partie

Météorologie et culture en conditions désertiques simulées

Chapitre 6

Météorologie et culture en conditions désertiques simulées

Résumé du chapitre

Nous avons analysé les données météorologiques détaillées, disponibles pour la région de Merzouga, pour mieux connaître les contraintes climatologiques à l'activité microbienne. En effet, la possibilité de mettre en culture des bactéries à partir du sable indique seulement que le sable porte une communauté non-morte. Ceci ne renseigne pas sur l'intensité d'une éventuelle activité métabolique. Nous avons adopté dans nos expériences une définition très restrictive de « l'activité », qui est « le développement rapide de bactéries cultivables sur TSA/10 ». L'environnement désertique étant de plus limité par la très faible teneur en matière organique, nous avons réalisé des cultures enrichies par l'ajout d'une très faible quantité de milieu nutritif. Ainsi, nous avons estimé la durée maximale potentielle d'activité des bactéries. L'estimation de l'activité réelle des bactéries demanderait des analyses complémentaires.

6.1 Description météo

Nous présentons ici le jeu de données de la station météorologique d'Errachidia, obtenu pour l'année 2002 (voir partie 1.2.1), avec l'aide de Christel Icard. Pour notre utilisation « académique », les données standard trihoraires ont été obtenues moyennant le paiement des seuls frais de reproduction, suivant la résolution 40 de l'Organisation météorologique mondiale.

6.1.1 Variations annuelle et diurne de la température et de l'humidité

Les variations de la température et de l'humidité sont présentées dans les Figures 6.1 à 6.6.

6.1.2 Variation corrélée de la température et de l'humidité

Les valeurs de température et humidité pour toute l'année 2002 ont été reportées sur la Figure 6.7. La comparaison entre le nuage de points et des courbes de même teneur en vapeur d'eau indiquent qu'il n'y a pas d'échange d'humidité. En effet, la variation d'humidité relative de l'air est surtout liée à la variation de température. Quand un air s'échauffe, la quantité d'humidité qu'il peut contenir (la pression de vapeur saturante) augmente. La teneur en vapeur d'eau reste la même, mais son humidité relative diminue. Inversement, l'humidité relative augmente quand la température diminue. Si la baisse de température est suffisante pour que l'humidité relative atteigne 100 %, la rosée peut se former. Seulement alors, il y a un échange d'eau entre l'air et la surface qui reçoit la rosée.

6.2 Culture de bactéries du sable en conditions désertiques simulées

6.2.1 Choix des conditions et dispositif expérimental

Nous avons décidé de réaliser une incubation du sable à cinq niveaux d'humidité. L'humidité du sable a été fixée en incubant le sable dans des chambres fermées dans lesquelles l'humidité relative de l'air était fixée. Nous avons utilisé l'équilibration avec des solutions salines saturées, qu'il est possible de choisir en fonction de l'humidité voulue.

Notre expérience a été réalisée à température ambiante du laboratoire, qui variait entre 18 et 22 °C. Nous n'avons pas contrôlé la température, mais le faible volume du dispositif permettrait de placer l'ensemble du système dans une enceinte thermostatée. Nous avons réalisé deux systèmes, l'un avec deux chambres en série (voir Figure 6.9), l'autre avec trois. Chaque chambre contenant le sable a été « isolée » par deux filtres d'un diamètre de pores d'1 µm, pour éviter le passage de bactéries d'une chambre à l'autre, mais surtout de la solution saline à la chambre contenant le sable. Nous avons initialement introduit 100 g de sable, et réalisé des prélèvements quotidiens (les jours

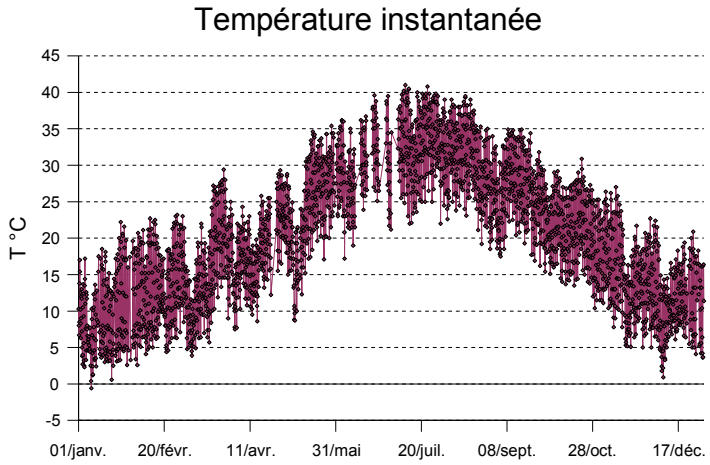


FIG. 6.1 – Relevé de température pour toute l'année 2002. Les données sont celles résumées sur la Figure 1.3 p. 25. L'évolution des températures est assez régulière, du minimum en janvier au maximum en juillet. On note pas de points extrêmes se démarquant nettement de la tendance.

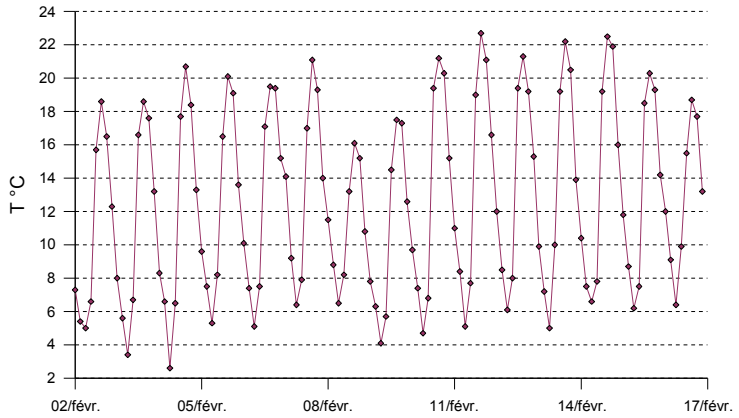


FIG. 6.2 – Températures relevées en février. La température suit une variation jour-nuit très similaire d'un jour à l'autre. La température la plus basse est très généralement relevée à 6 heures du matin et voisine de 5 °C. La température la plus élevée est généralement relevée à 15 heures et voisine de 20 °C, soit une amplitude jour-nuit de 15 °C.

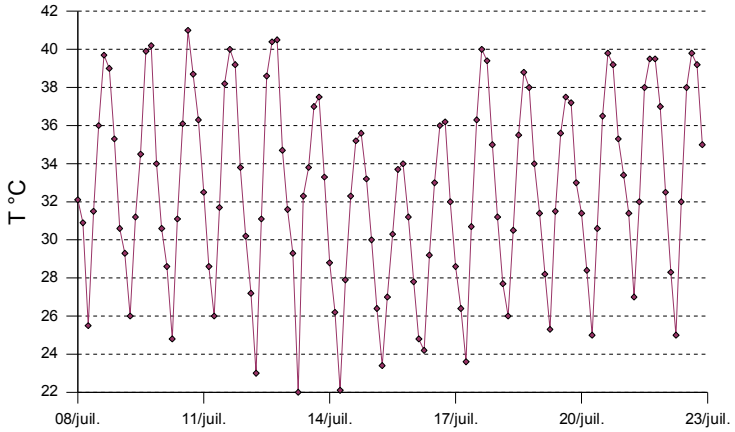


FIG. 6.3 – Températures relevées en juillet. La température minimale est généralement relevée à 6 heures (environ 24 °C) et la maximale à 15 heures ou 18 heures (environ 38 °C). L'amplitude jour-nuit est semblable à celle observée en février, 15 °C. Cependant, la variation nocturne est plus rapide, il y a toujours un écart important entre les mesures relevées à 6 heures et à 9 heures.

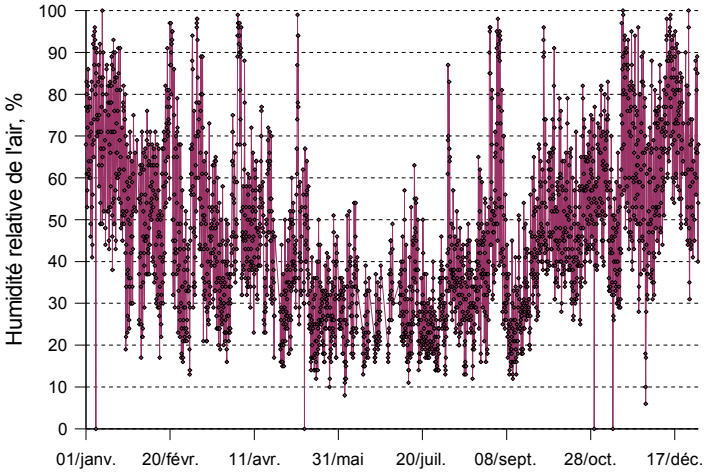


FIG. 6.4 – Valeurs d'humidité de l'air relevées toute l'année 2002. La variation est opposée à l'évolution annuelle des températures. Elle est aussi beaucoup moins régulière. Les relevés indiquant zéro résultent d'une panne instrumentale. Les valeurs isolées de forte humidité correspondent aux épisodes de pluie.

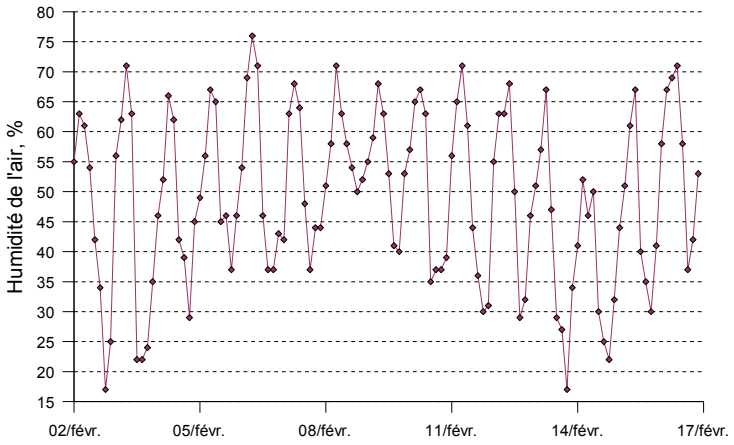


FIG. 6.5 – Humidité de l'air relevée en février. On retrouve la variation en sens opposé de celui de la température. L'amplitude nycthémérale est très variable d'un jour à l'autre, allant de 30 à 50 % entre l'après-midi et le petit matin.

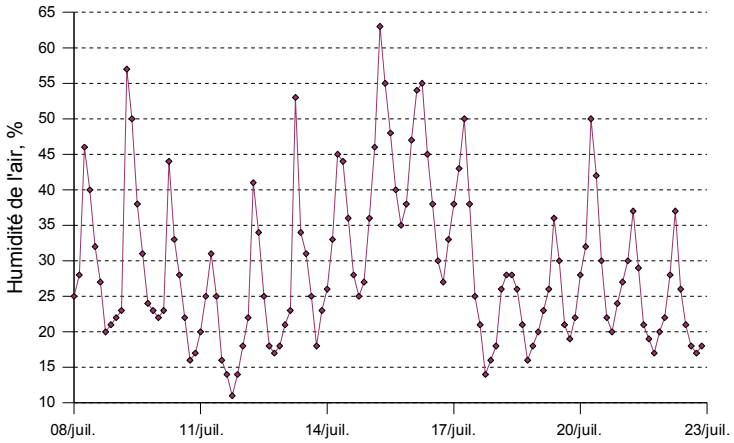


FIG. 6.6 – Humidité de l'air relevée en juillet. L'alternance jour-nuit est très marquée. La variation matinale, autour du maximum qui a lieu à l'heure de lever du soleil, est très rapide (relevé de 6 heures). La variation d'après-midi est plus lente, les trois points correspondant aux relevés de 15 heures, 18 heures et 21 heures sont généralement proches.

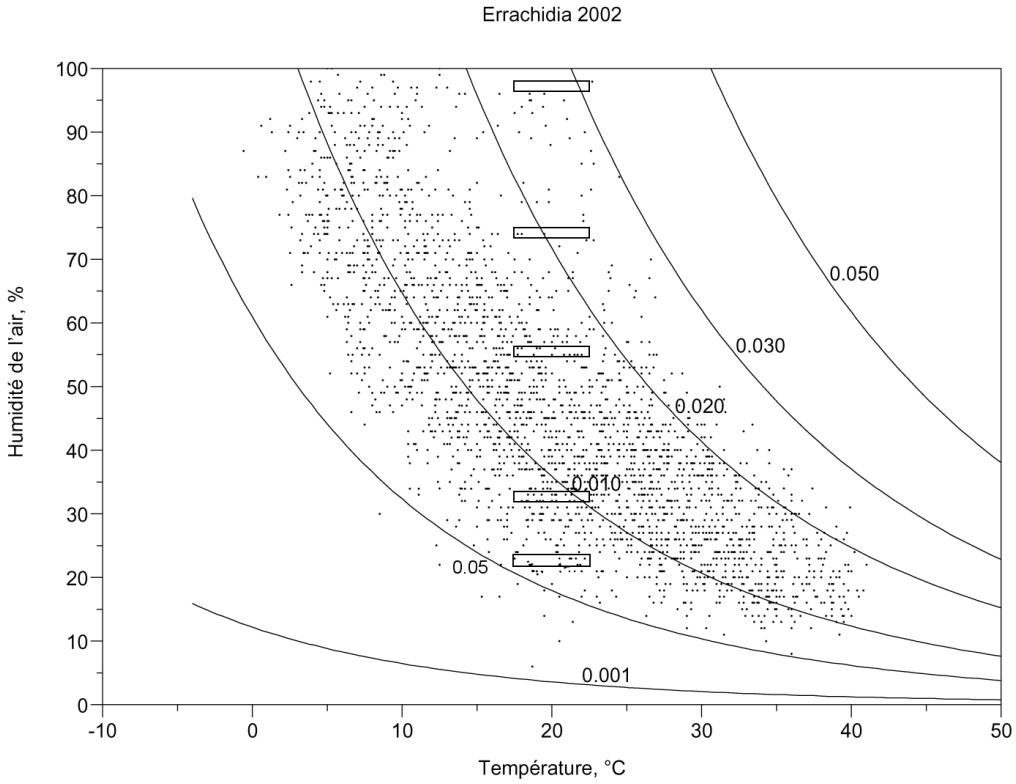


FIG. 6.7 – Humidité et température. Les points représentent les couples température-humidité relevés toutes les trois heures. Les courbes sont des isolignes de pression de vapeur d'eau dans l'air, en atmosphère. Le nuage de points est situé entre deux courbes. Ceci indique que la variation d'humidité relative dans l'air au cours des cycles jour-nuit est une conséquence de la variation de la température, plutôt que d'un réel échange d'humidité. Les rectangles figurent les conditions utilisées dans notre expérience (température ambiante, cinq niveaux d'humidité).

Solutions salines saturées	Humidité relative en pourcentage pour température en °C									
	5	10	15	20	25	30	35	40	50	60
Acide Phosphorique H_3PO_4	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-
Hydroxyde de potassium KOH	14	13	10	9	8	7	6	6	6	-
Chlorure de Lithium LiCl	14	14	13	12	12	12	12	11	11	10
Acétate de potassium KCH_3CO_2	-	21	21	22	22	22	21	20	-	-
Chlorure de magnésium $MgCl_2$	35	34	34	33	33	33	32	32	31	30
Carbonate de potassium K_2CO_3	-	47	44	44	43	43	43	42	-	36
Nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2,6H_2O$	58	57	56	55	53	52	50	49	46	43
Bromure de sodium NaBr	64	62	61	59	58	56	55	53	51	50
Bichromate de sodium $Na_2Cr_2O_7,2H_2O$	-	73	69	65	62	59	55	53	47	42
Nitrate d'ammonium NH_4NO_3	-	73	69	65	62	59	55	53	47	42
Nitrate de sodium $NaNO_2$	-	-	-	66	65	63	62	62	59	59
Iodure de Potassium KI	73	72	71	70	69	68	67	66	65	63
Chlorure de sodium NaCl	76	76	76	76	75	75	75	75	76	76
Sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$	82	82	81	81	80	80	80	79	79	-
Chlorure de potassium KCl	88	88	87	86	85	85	84	82	81	80
Sulfate de Zinc $ZnSO_4,7H_2O$	-	-	-	90	-	-	-	-	-	-
Nitrate de potassium KNO_3	96	95	94	93	92	91	89	88	85	82
Sulfate de potassium K_2SO_4	98	98	97	97	97	96	96	96	96	96

FIG. 6.8 – Exemples de solutions salines utilisables en fonction de l'humidité souhaitée (Restagno, [75]). Les variations de température peuvent changer significativement l'humidité de l'air. Nous avons retenu les solutions dont l'humidité relative varie peu dans la gamme de température de l'expérience (Acétate de potassium, Chlorure de magnésium, Nitrate de magnésium, Chlorure de sodium et Sulfate de potassium). L'utilisation de ces mêmes solutions dans une expérience qui reproduirait l'importante différence de température entre le jour et la nuit serait plus problématique.

ouvrables) de 5 g. Afin de lever la carence en matière organique du sable, pour isoler les effets de la disponibilité de l'eau sur les micro-organismes, nous avons ajouté une faible quantité de matière organique. Comme les expériences de description de la diversité ont montré que le milieu nutritif TSB convient à une part non négligeable des bactéries, nous avons choisi d'apporter ce substrat. Pour minimiser l'apport d'eau, nous avons introduit le milieu non dilué (au lieu de dilué au $10^{\text{ème}}$ comme dans l'article). Nous avons fixé le taux de matière organique apportée à 0,1 mg par gramme de sable. Ainsi, le volume de milieu nutritif liquide TSB ajouté était de 333 µl/100 g de sable. Nous avons vérifié que la modification de l'humidité du sable qui résulte de cet apport disparaît dès une heure de pompage dans le système.

L'estimation du nombre de bactéries cultivables a été réalisée après suspension du sable dans de l'eau, étalement de la dilution appropriée sur milieu nutritif gélosé TSA/10. Trois boîtes de chaque dilution ont été ensemencées à chaque prélèvement. La durée d'incubation nécessaire au développement de colonies pour le comptage a été de trois à sept jours (jusqu'à obtention du nombre maximum de colonies).

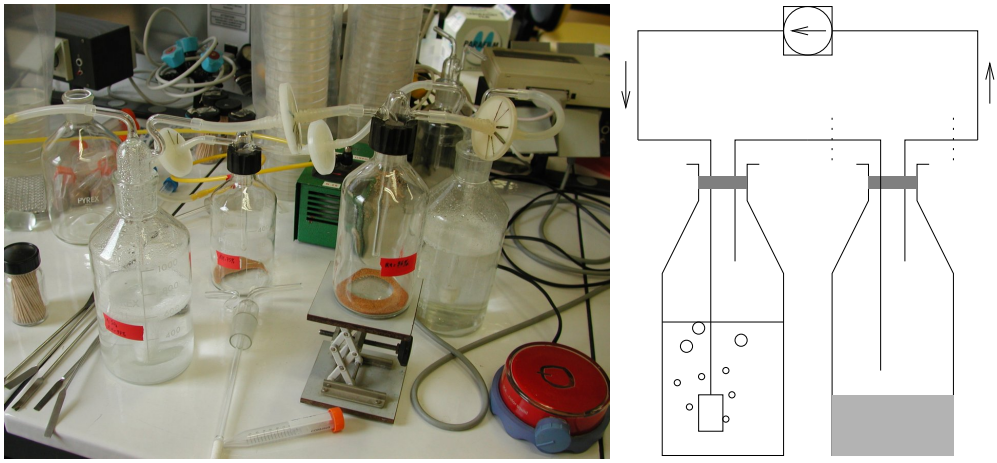
6.2.2 Résultats

L'évolution des comptages de bactéries cultivables est donnée à la Figure 6.10. Le nombre initial de bactéries cultivables dans le sable de Merzouga est de 4200 b./g. Le nombre de bactéries cultivables augment très sensiblement dans la chambre où l'humidité est la plus forte, 97 %. Le maximum de développement bactérien est atteint en 14 jours, avec une multiplication par 8400 des effectifs initiaux (soit $3,8 \cdot 10^7$ b./g). Les quatre niveaux inférieurs d'humidité relative en montrent pas d'évolution nette.

6.2.3 Interprétation et discussion

Limites de l'approche

La fluctuation des estimations de la taille de la communauté cultivable est liée aux limitations inhérentes à la méthode. Les bactéries sont fermement attachées aux grains de sable. La mise en suspension par agitation n'est pas suffisante pour obtenir une estimation très fiable et reproductive. Nous étions parvenus à cette conclusion après l'expérience de culture grain-par-grain relatée dans l'article (inséré dans la partie 5.1). Nous avons adopté une définition très stricte de « l'activité bactérienne ». Tous les biais inhérents à la notion de cultivabilité s'appliquent ici (voir l'article grain-par-grain). Un éventuel développement de bactéries non-cultivables sur TSA/10 ne peut par



(a) (b)

FIG. 6.9 – Dispositif d'incubation du sable en conditions d'humidité contrôlée. Le degré d'humidité est fixé par la solution saline saturée dans laquelle l'air est bullé (pompe verte visible au fond). Puis l'air passe dans la chambre contenant le sable et les bactéries. Le dispositif présenté ici comprend deux chambres en série (97 % d'humidité en K_2SO_4 saturé et 75 % en NaCl saturé). L'ensemble du système est à température ambiante.

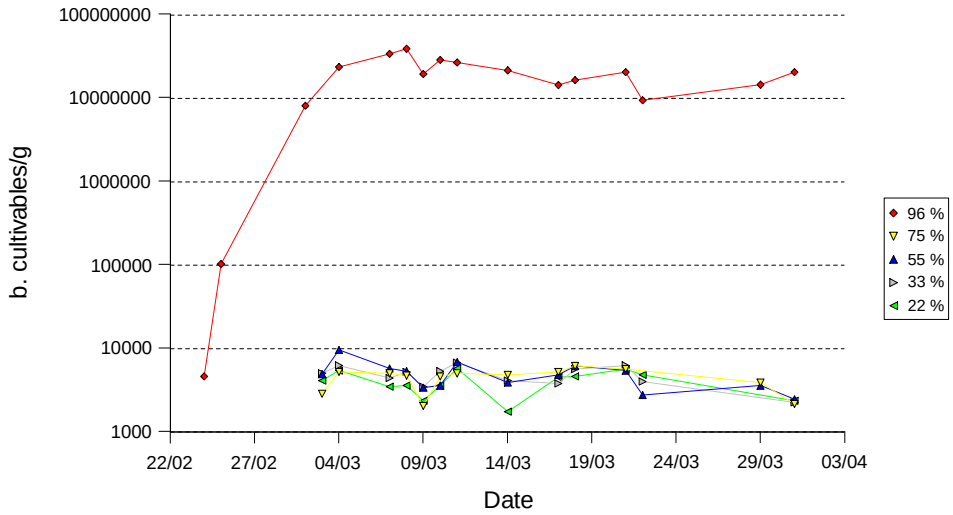


FIG. 6.10 – Résultats de l'expérience d'incubation du sable en conditions d'humidité contrôlée. Le nombre de bactéries cultivables aux quatre niveaux inférieurs d'humidité ne varie pas significativement. Le nombre de bactéries à 97 % augmente de presque 4 ordres de grandeur (×8400).

définition pas être révélé par notre approche.

Les contrôles qu'il semble nécessaire d'introduire pour valider ces résultats incluent notamment un suivi par marquage in situ, semblable à celui par lequel nous avons estimé le nombre total de bactéries dans l'article [36]. Il faudrait de plus vérifier qu'aucun sel ne passe de la solution saturée à la chambre contenant le sable sous la forme d'aérosol.

Comme les prélèvements imposent d'ouvrir les chambres, il conviendrait que le changement rapide de l'humidité relative lors de l'ouverture n'a pas d'incidence sur le développement des bactéries. Enfin, la différence « écologique » entre 97 % et 75 % étant importante, il semble nécessaire de réaliser le même type d'expériences en distinguant des niveaux plus fins d'humidité.

Extension des résultats : la rosée

Les données météorologiques que nous avons obtenues incluent le point de rosée calculé. Le point de rosée est la température théorique à laquelle il faudrait refroidir l'air (qui est caractérisé à la température réelle par une certaine humidité relative), pour qu'il y ait condensation de la vapeur d'eau qu'il contient. Pour le dépôt de rosée, c'est la surface du sol qui doit franchir le point de rosée. Ceci est possible quand le refroidissement radiatif nocturne du sol est important. La Figure 6.11 donne les résultats d'un calcul réalisé par Qin *et al.*, [71], de modélisation de l'écart de température entre le sable (nu ou couvert de croûte microbienne) et l'air. Au soleil d'après-midi, la surface du sable atteint une température extrême, jusqu'à 20 °C plus élevée que celle de l'air. Par contre, lors de nuits suffisamment claires, la surface du sable est sensiblement plus fraîche que l'air. Dans le désert du Négev, ce phénomène, associé à une humidité de l'air assez importante liée à la proximité de la mer, permet jusqu'à 250 nuits de rosée par an.

Nous avons vu sur la Figure 6.4 p. 124 que les valeurs d'humidité relative de l'air supérieures ou égales à 97 % sont rares, alors qu'elles constituent dans notre expérience la seule condition où un développement bactérien rapide a été observé. Ceci laisserait penser que l'activité bactérienne n'est possible que quelques heures par an. Cependant, la Figure 6.12 indique que l'écart entre la température de l'air et le point de rosée est faible au cours de la plupart des nuits de novembre, décembre et janvier. Il serait très intéressant de savoir si l'écart de température entre le sol et l'air calculé par Qin *et al.*, [71], est transposable au cas de Merzouga. L'estimation de la durée potentielle d'activité bactérienne en serait très sensiblement augmentée.

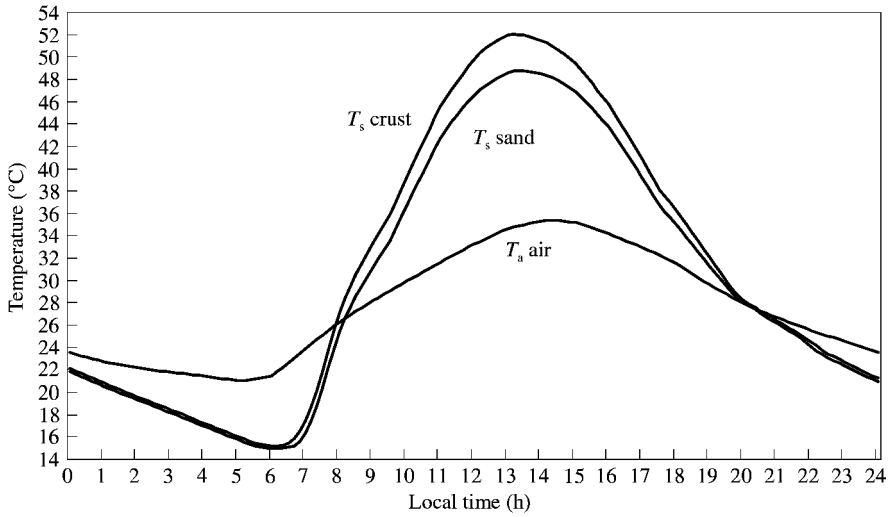


FIG. 6.11 – Modélisation des températures de l'air, du sable nu et de la croûte microbienne en été dans le désert du Négev, Israël (Qin *et al.*, [71]). En pleine journée, la température du sable est jusqu'à 15 à 18 °C supérieure à celle de l'air. La surface du sable est alors extrêmement sèche. À l'opposé, en fin de nuit, le sable est environ 7 °C plus frais que l'air. Ainsi, le dépôt de rosée est possible dans une fenêtre de conditions plus large que ne le laisse penser la simple analyse des données de température et d'humidité de l'air.

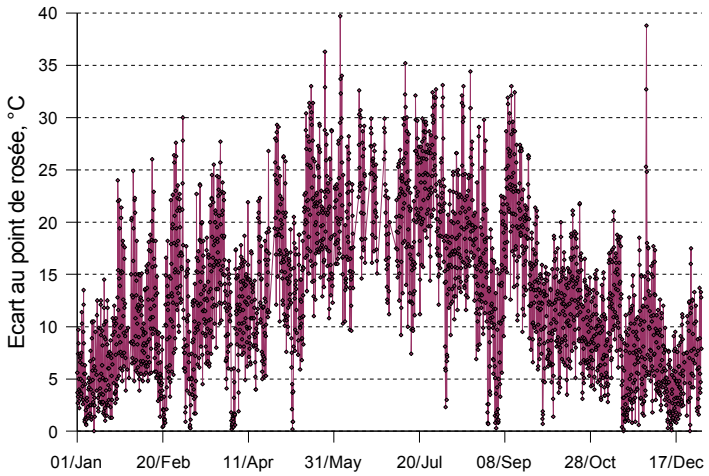


FIG. 6.12 – Ecart entre la température instantanée de l'air et le point de rosée. L'écart entre la température instantanée réelle de l'air et le point de rosée est variable au cours de l'année. Il est de quelques degrés au cours de la plupart des nuits d'hiver, d'environ 10 °C au cours de journées d'hiver et fréquemment supérieur à 30 °C au cours des après-midi d'été. Si l'écart entre la température du sol et de l'air estimé par Qin *et al.*, [71], s'applique au site de Merzouga, alors les conditions de nuit d'hiver sont compatibles avec un dépôt de rosée et donc avec une activité bactérienne. Hormis les épisodes de pluie, les journées d'hiver et la quasi-totalité de la période estivale sont « sèches » et ne permettent pas l'activité bactérienne.

Conclusion du chapitre

L'expérience de culture en conditions d'humidité contrôlée, telle que nous l'avons menée, pose une définition très réductrice de l'activité bactérienne. Il est incontestable qu'une partie de l'activité bactérienne ne se traduit pas par une augmentation du nombre de bactéries cultivables. Il serait souhaitable de compléter cette approche par culture par des études basées sur des mesures plus directes du métabolisme bactérien, comme le suivi de la respiration par la mesure du CO_2. Des cinq conditions testées, seule l'humidité maximale a permis un développement rapide des bactéries. Toutefois, ce développement a été possible en l'absence d'eau liquide « macroscopique ». Toutefois, une estimation plus fine de la fréquence de la rosée semble nécessaire pour contraindre la durée maximale potentielle d'activité bactérienne à l'échelle d'une année.

Conclusion générale

Le site de Merzouga a initialement été choisi pour sa double simplicité supposée. L'idée était que la diversité minéralogique et la diversité microbienne seraient faibles, faisant de l'erg Chebbi un objet de choix pour l'étude des interactions entre les bactéries et les minéraux dans les environnements arides. Cette idée a été en grande partie infirmée. Si le sable est très nettement dominé par le quartz, l'étude minéralogique détaillée grain-par-grain a révélé une certaine diversité de phases minérales. De même, si la biomasse est faible, la diversité bactérienne est importante. Nous avons révélé à la fois des taxa connus pour leur capacité à produire des formes de résistance, et des groupes vivant dans le sable, donc tolérants, quoique par des mécanismes encore inconnus.

L'étude grain-par-grain de la communauté bactérienne cultivable a montré tout son intérêt en nous permettant d'obtenir sept fois plus d'isolats que nous l'avions estimé. La comparaison des résultats des deux estimations de la diversité bactérienne, globale et grain-par-grain, est délicate. Il n'y a pas de relation simple entre le taux de cultivabilité et la diversité bactérienne accessible par culture. L'étude grain-par-grain a mis en évidence une population de grains riches en matière organique, alors que les dosages de matière organique dans le sable ont échoué. Cette fraction de grains est peut-être relique de zones moins arides voisines ou plus lointaines, car le vent transporte le sable sur de longues distances.

Nous ne connaissons pas l'activité métabolique réelle des bactéries dans le sable. Dans la très large gamme de température et d'humidité que connaît le désert au cours d'une journée, et plus encore d'une année, nous avons commencé à estimer quelles sont les conditions permissives pour l'activité bactérienne. Notre approche expérimentale a levé la carence en matière organique pour mieux cerner l'effet de la disponibilité de l'eau. Dans les conditions réelles, ces deux facteurs limitants s'exercent de façon conjointe.

Il nous paraît aussi indispensable de préciser quelle est la variation de la température et de l'humidité sous la surface du sable. La surface voit le stress le plus intense quand le soleil d'après-midi fait monter sa température à des valeurs extrêmes, mais c'est aussi la partie de la dune qui peut recevoir la rosée quand celle-ci se dépose. Inversement, dès quelques centimètres de profondeur, les écarts de température sont amortis, ce qui peut constituer un élément favorable à la vie bactérienne, mais le sable ne voit pas la rosée (même la pluie ne pénètre que rarement).

La question de la source d'énergie sur laquelle la vie bactérienne est basée reste entière. La photosynthèse, qui constitue la production primaire des croûtes microbiennes est-elle possible sur le site de Merzouga ? Les bactéries tirent-elles de l'énergie de l'oxydation du fer II contenu dans les minéraux primaires ? Les bactéries sont-elles saprophytes, vivant des apports éoliens de particules organiques ? La communauté bactérienne est-elle stable dans le temps ? Est-elle relique d'une époque moins aride (seules les espèces les plus résistances n'étant pas encore éteintes) ou participe-t-elle au contraire à un phénomène de pédogénèse, qui limitera à terme les effets de la sécheresse édaphique ?

Annexe A

Cycle cellulaire d'une bactérie isolée d'un sol aride de Tunisie

Le document inséré ici est un article accepté pour parution dans la revue Research in Microbiology. Nous avons inséré les épreuves corrigées. L'article traite d'une bactérie étudiée au LEMiR, *Ramlibacter tataouinensis* TTB310. Cette bactérie a été isolée du sable de Tataouine, Tunisie, dans le cadre de l'étude de l'altération des minéraux en milieu aride et de l'implication des micro-organismes dans cette altération. Ainsi, cette étude ne fait pas partie du projet de thèse au sens strict. Toutefois, la quantité de travail apportée à cette publication justifie à nos yeux son insertion dans cette thèse.

Résumé de l'article

La bactérie *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 possède un cycle de développement très particulier, impliquant deux formes très différentes. La première possède toutes les caractéristiques structurales d'un kyste, notamment une épaisse paroi cellulaire. Elle a la forme d'une sphère, d'un diamètre moyen de 850 nm et n'est pas mobile. La seconde forme est un bâtonnet, d'environ 3 µm de long et 220 nm de diamètre, dépourvu de l'épaisse paroi du kyste et qui se déplace (probablement par *gliding*). Le volume du bâtonnet est environ un tiers de celui du kyste. Toutefois, les deux formes ont la même surface membranaire, coexistent en toutes circonstances, quoiqu'en proportions variables selon l'âge des cultures, et la transition entre les deux formes a été montrée en microscopie dans les deux sens. Nous faisons donc l'hypothèse que toutes deux font partie intégrante du cycle de développement de la bactérie. Cette situation diffère de la production de spores chez des espèces comme *Bacillus subtilis*. Ce cycle particulier est vraisemblablement en relation avec le caractère incertain de l'environnement aride de Tataouine. La

forme possédant des structures de protection contre la dessication, le kyste, assure dans notre hypothèse le maintien de l'espèce, tandis que la forme mobile mais moins résistante, le bâtonnet, remplit une fonction de colonisation et dissémination. Le kyste de *Ramlibacter* serait ainsi une forme d'évitement du stress hydrique plutôt que de tolérance.

ARTICLE IN PRESS

S0923-2508(05)00144-0/FLA AID:2339 Vol.●●●(●●●)
RESMIC:m5 v 1.46 Prn:2/09/2005; 11:03

resmic2339

[DTD5] P.1 (1-5)
by:CG p. 1

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT®

ELSEVIER

Research in Microbiology ●●● (●●●●) ●●●–●●●

Research in Microbiology

www.elsevier.com/locate/resmic

A morphological transition in the pleomorphic bacterium *Ramlibacter tataouinensis* TTB310

Maxime Gommeaux [a], Mohamed Barakat [a], Maurice Lesourd [b], Jean Thiéry [a], Thierry Heulin [a,*]

[a] *Laboratoire d'Écologie Microbienne de la Rhizosphère, CEA Cadarache, DSV-DEVM, UMR 6191 CNRS-CEA-Université Aix-Marseille 2, 13108 Saint-Paul-lez-Durance Cedex, France*

[b] *CNRS and Service Commun de Microscopie Électronique, Faculté de médecine, Rue Haute de Reculée, 49045 Angers Cedex, France*

Received 2 February 2005; accepted 12 May 2005

Abstract

We provide microscopic evidence that motile rod-shaped forms of *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 are formed from dividing cyst-like cells. Careful estimation of the size of the two morphotypes was conducted using optical and transmission electron microscopy (TEM). The cyst-like cell was shown to be a sphere with a diameter $D_c = 850$ nm. The rod-shaped form was a round-ended cylinder with length $L_r = 2.91$ μm and diameter $D_r = 239$ nm. The membrane area of the two morphotypes was the same. However, the formation of rods from cysts involved loss of two-thirds of the cell volume. TEM showed that, prior to division and transition into rods, cysts contained condensed cytoplasmic material. These results suggest that the morphological transition occurs by pure reshaping of cells.
© 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: *Ramlibacter* morphotypes; Microscopy; Size estimation

1. Introduction

Recent years have witnessed a growing interest in the search for small forms of prokaryotic life. Nanometer-sized bacteria have been isolated from a diversity of natural as well as anthropic environments [3], even from within the human body [6]. In parallel with the search for small living organisms, authors are investigating the minimum cellular apparatus for metabolic and genetic activities, determining the theoretical minimal size of a cell [7]. This casts light on the need to distinguish dormancy or starvation forms from truly metabolically active cells. In this article we focus on *Ramlibacter tataouinensis* TTB310, which has been isolated from Tunisian arid soil, in the context of multidisciplinary studies on meteorite weathering under arid conditions [1,4]. Heulin et al. have established that this pleomorphic strain can exist in a cyst-like and a rod-shaped form [5]. Benzerara et al. [2] have studied the colonization of the meteorite-forming mineral orthopyroxene and the resulting modifications in orthopyroxene chemistry and crystal structure. They investigated links existing between the process of mineral colonization and the life cycle of the bacteria. They showed that, when cultured on agar plates, rods are frequent at the margins of colonies but seldom occur at their centers. The rods are able to reach mineral crystals spread on the surface of the agar plates by gliding. After they attach to the grain surface, they differentiate into non-motile cysts. These divide into more cysts, and the resulting layer of cells can influence the rate at which chemical elements from the pyroxene are leached.

To gain more insight into how rods develop from cyst-like cells, we describe here a new investigation of microscopic images of TTB310 cultures. A set of time-lapse images shows reciprocal transition, from cyst-like to rod-shaped forms. Complementarity of transmission electron and optical images yields robust estimation of the size parameters of both morphotypes. Finally, we propose a mechanism for the morphological transition of *R. tataouinensis* TTB310.

* Corresponding author.
E-mail address: thierry.heulin@cea.fr (T. Heulin).

0923-2508/$ – see front matter © 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.resmic.2005.05.010

2. Materials and methods

2.1. Cultivation

Cultivation experiments with *R. tataouinensis* TTB310 were conducted both on solid and liquid nutritive medium at 30 °C. The strain was grown in liquid medium for all size measurements. Plates of agar solid medium were prepared for time-lapse imaging of the transition from cyst-like to rod-shaped forms. In both cases, tenfold-diluted tryptic soy broth (Difco Laboratory, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) was used as growth medium. The agar concentration used for the plates was 15 g l^{-1}. The flasks containing liquid cultures were agitated at 150 rpm for eight days.

2.2. Time-lapse imaging of cells on agar plates

Time-lapse acquisition was conducted after 6–8 days of incubation of the plates and sufficient colony development. A small piece of agar supporting one colony was cut and mounted on a glass slide. CoverWell imaging chambers (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) were used to cover the sample, allowing it to remain wet for the duration of imaging (diameter 20 mm and depth 2.5 mm). The thickness of the agar cube was adjusted so that the colony lay just under the coverslip. Observations of the margin of the colony were made using a BX50 Olympus microscope equipped with a differential interference contrast (DIC) device and a 100x oil immersion objective (UPlanApo, Olympus). An F-View CCD camera (Olympus, Tokyo, Japan) and analySIS software (Soft Imaging System, Münster, Germany) were used for image acquisition.

2.3. Image acquisition and measurements of cell size parameters

For transmission electron microscopy (TEM), bacterial cells were harvested from liquid culture from the third day of cultivation. Cells were then fixed in 2.5% glutaraldehyde and postfixed with osmium tetroxide in sodium cacodylate buffer. Dehydration was performed in ethanol and inclusion in epoxy resin. Ultrathin sections were made using a Reichert ultramicrotome. Electron micrographs were obtained with a Jeol (Tokyo, Japan) 100CX transmission electron microscope (acceleration voltage 80 kV, magnification 15–20 k) and photographs were taken on Kodak emulsion 4489. Images were then digitized for measurements. Such ultrathin sections allow for the estimation of cyst-like cells and rod-shaped form diameters. However, since rods are virtually impossible to cut throughout their length, this technique is not suitable for rod-length measurement. Instead, images used for rod-length measurement were obtained from day-to-day monitoring of a culture in liquid medium. Only images from cultures in which the rods were the dominant form (>80% in the first four days) were used. Slides were prepared with cells that were concentrated by centrifugation in an Eppendorf (Hamburg, Germany) table centrifuge (4 min at 13 200 rpm). Volumes of 5 µl were deposited on the glass slides and covered by cover slides. The slides were observed in confocal laser scanning mode (CLSM) with the optical microscope described above and Olympus Fluoview software.

All measurements were made on digital images using the ImageJ program (which is available from the NIH-homepage http://rsb.info.nih.gov/ij/).

2.4. Geometric description of the two morphotypes

The cyst-like cell is a sphere described by its radius R_c or diameter D_c. The volume V_c and cell surface area S_c of the cyst are

$$V_c = \frac{4}{3}\pi R_c^3 = \pi \frac{D_c^3}{6} \quad \text{and} \quad S_c = 4\pi R_c^2 = \pi D_c^2.$$

The rod, of total length L_r, can be considered as a cylinder with diameter D_r (or radius R_r) and length $L_r - D_r$, with rounded ends that are half-spheres with diameter D_r. The cylinder-part outer surface is $S_{cyl} = \pi D_r(L_r - D_r)$ and its volume is $V_{cyl} = \frac{\pi}{4} D_r^2(L_r - D_r)$. The two half-spheres have a surface area $S_{sph} = \pi D_r^2$ and a volume $V_{sph} = \pi D_r^3/6$. Thus, the rod has a cell surface area S_r and a volume V_r

$$S_r = \pi D_r L_r \quad \text{and} \quad V_r = \frac{\pi}{2} D_r^2 \left(\frac{L_r}{2} - \frac{D_r}{6} \right).$$

2.5. Statistical treatment of cell measurements

The probability that the cutting plane intercepts the half-spheres at the ends of a rod is low, because rods are much longer than broader. Thus, most cross-sections through a rod-shaped form yield an ellipse whose small axis is the diameter of the rod (or a circle if perpendicular). Non-elliptic patterns were disregarded. The length of the rod-shaped form is measured in a similar, straightforward manner. In contrast, cyst-like cell measurements must be corrected.

2.5.1. Accounting for cyst-like cell cutting bias

The apparent diameter of a cell on a microscopic section is biased by the fact that the cutting plane does not usually intercept the spheres along the greatest possible circles. Cutting will yield a variety of apparent diameters according to whether the cutting-plane is close to the "equator" or to the "pole" of the sphere. In the present model, the distance x from the center of the sphere to the cutting plane was taken at random, and uniformly distributed between the equatorial plane ($x = 0$) and the pole ($x = R_0$). The probability density was thus

$$\begin{cases} p_x(x) = 1/R_0 & \text{for } x \in [0, R_0], \\ p_x(x) = 0 & \text{elsewhere.} \end{cases}$$

Pythagoras' theorem gives the observed radius $y = \sqrt{R_0^2 - x^2}$. The probability density for y is given by

$$p_y(y) = p_x(x)\left(\frac{\partial y}{\partial x}\right)^{-1},$$

where

$$\left(\frac{\partial y}{\partial x}\right) = \frac{x}{\sqrt{R_0^2 - x^2}} = \frac{x}{y},$$

thus

$$\left(\frac{\partial y}{\partial x}\right)^{-1} = \frac{y}{x}.$$

So,

$$p_y(y) = \frac{1}{R_0}\frac{y}{x} = \frac{1}{R_0}\frac{y}{\sqrt{R_0^2 - y^2}}$$

for $y \in [0, R_0]$ and $p_y(y) = 0$ elsewhere.

The average observed radius is thus

$$\bar{y} = \int_0^{R_0} y p_y(y)\,\mathrm{d}y$$

$$= \left[\frac{1}{2R_0}\left(R_0^2 \arcsin\frac{y}{R_0} - y\sqrt{R_0^2 - y^2}\right)\right]_0^{R_0} \quad \text{(in radian)},$$

$$\bar{y} = \frac{\pi R_0}{4} \approx 0.78 R_0.$$

We used this relationship the other way around, deriving R_0 from a measurement of $\bar{y}$. The real cell radius was approximately 27% higher than the observed mean.

2.5.2. Making up for cyst-like cell small measurements

A further problem was that the mean size may be overestimated because small forms, since they are difficult to distinguish from cross-sectioned rods, are excluded. The more low values excluded, the more the average is overstated. This overstatement depends on the k ratio of R_{cut}, the minimal radius enabling the certainty that the cell is a cyst-like form, to the real radius of the cells R_0. Theoretical derivation, the details of which are not shown here, states that the c factor by which the average is overstated depends on k as

$$c = \frac{1}{\pi}\left(\frac{\pi + 2k\sqrt{1-k^2} - 2\arcsin k}{\sqrt{1-k^2}}\right) \quad (k \text{ in radian}).$$

3. Results

3.1. Rod formation from cysts

Time-lapse images of cells on the surface of agar plate were obtained every minute over a 3-h period. From the whole view-field, an area was selected and color was added using image processing software for visual ease.

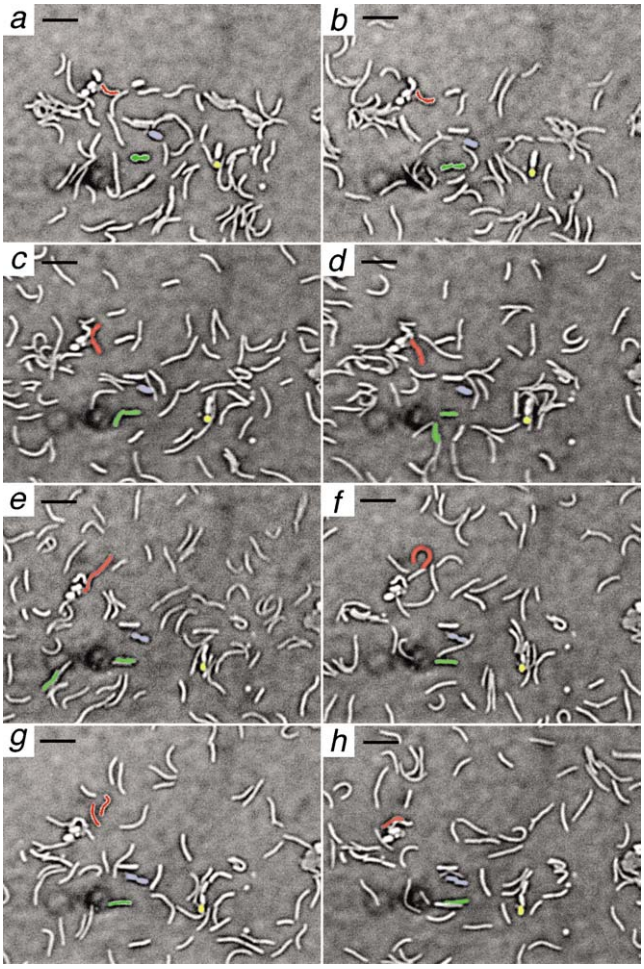


Fig. 1. Time-lapse imaging of rod formation from dividing cyst; images were taken after (a) 12, (b) 49, (c) 73, (d) 76, (e) 96, (f) 108, (g) 112 and (h) 121 min; scale bar is 5 µm.

Eight images were selected and are presented in Fig. 1. The unabridged film is available at the Institute's website (http://www-dsv.cea.fr/geomicrobiology/tataouine).

The cell tagged in yellow on image (a) had a typical cyst-like form. By the end of the sequence (images (g) and (h)), it was seen to elongate. No motion of the cyst-like cell was observed.

The cell tagged in blue on image (a) was an elongated cyst. Image (e) shows the division septum. Images (f)–(h) show the two daughter-cysts that evolved to rods. The rods remained attached and at the same position on the agar plate.

The cells tagged in green on image (a) were daughter-cysts, seen shortly after division. Image (b) shows them evolving to rods that separated between images (c) and (d). One daughter-rod remained at the same position while the other eventually left the view-field (between images (e) and (f)).

The cells tagged in red on image (a) are shown before the morphological transition from cyst-like cell to rod-shaped form was completed. They remained at the same position on image (b), but were subsequently seen to glide, yet were

still attached until they separated between images (f) and (h). This proved that gliding ability was acquired shortly after the morphological transition from cyst-like cell to rod-shaped form.

The durations of the different steps were estimated from the unabridged film. The elongation of a spherical cyst-like cell was estimated to last approximately 2 h. Septation and division were assumed to be rapid, lasting less than a few minutes. Rod formation from daughter-cysts lasted approximately 50 min. Daughter-rods stuck together for variable times before separation.

3.2. Sizes of the two morphotypes

Considering the rod-shaped forms, the average diameter was estimated from $n_r = 323$ measurements on TEM images. The average length was estimated from 378 measurements on CLSM images. They were

$D_r = 239$ nm with $\sigma_D = 42$ nm

and

$L_r = 2.91$ µm with $\sigma_L = 0.62$ µm.

For cyst-like cells, the observed average for $n_c = 186$ measured cells was $\bar{y} = 352$ nm which led to $R_0 = 448$ nm and $D_0 = 897$ nm with the cutting correction (see Section 2.5.1). Since the smallest measured cell had a diameter $D_{cut} = 343$ nm, we had to use c $(k = 343/897) = 1.055$. This meant that the average diameter was overstated by approximately 5.5% (see Section 2.5.2). Thus the corrected diameter of the cyst-like cells was

$$D_0^{corr} = \frac{D_0}{1.055} = 850 \text{ nm with } \sigma_D = 169 \text{ nm}.$$

3.3. Comparison of the surface areas of the two morphotypes

The surface and volume of the cyst-like morphotype were estimated from the mean value for the diameter given above

$S_c = 2.28$ µm^2 with $\sigma_S = 0.93$ µm^2

and

$V_c = 0.343$ µm^3 with $\sigma_V = 0.207$ µm^3.

Since they were obtained from independent measurement series, the values for rod-shaped morphotype length and diameter were randomly pair-wise-associated. Repetition yielded several sets of n_r pairs, with very constant means

$S_r = 2.20$ µm^2 with $\sigma_S = 0.65$ µm^2

and

$V_r = 0.131$ µm^3 with $\sigma_V = 0.057$ µm^3.

The cyst-like cell had an almost 3-fold larger cell volume than the rod-shaped form. The observed slight difference between the surface area of the two morphotypes was within the standard deviation. The hypothesis that the surface areas of the two morphotypes were the same cannot be rejected.

3.4. TEM investigation of the cyst-to-rod transition

The three cyst-like cells in Fig. 2 show a clear zone varying in size. By assuming that the clear zone was nearly spherical and by estimating the ratio of its diameter D_{light} to cyst-like cell diameter D_c, it was possible to derive the volume ratio of the condensed-cytoplasm zone

$$\frac{V_{dense}}{V_c} = 1 - \frac{V_{light}}{V_c} = 1 - \left(\frac{D_{light}}{D_c}\right)^3.$$

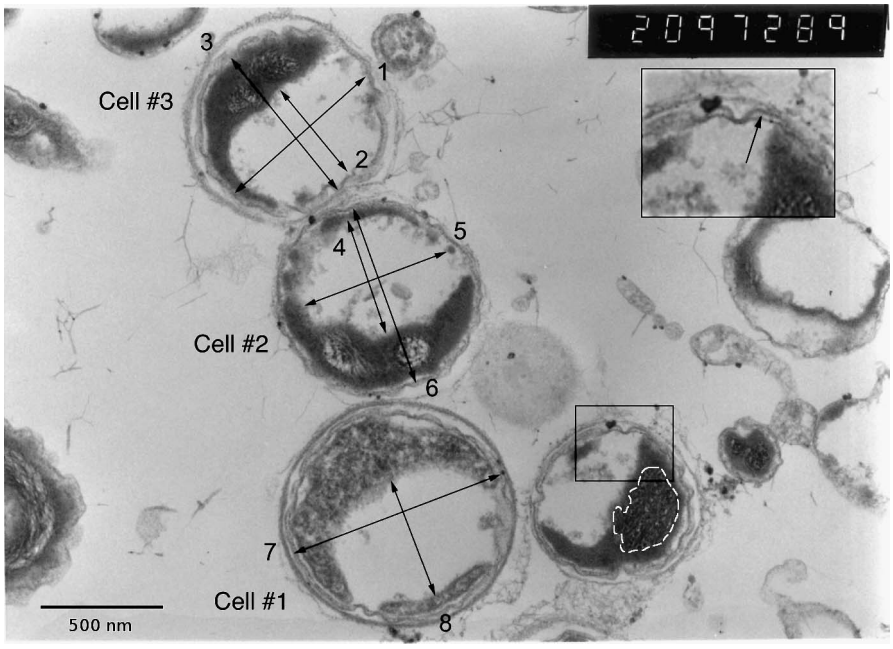


Fig. 2. Cyst-like cell differentiation patterns seen in TEM. The condensed zone includes a filamentous pattern, marked by a dashed line, that resembles a chromosome. The arrow on the close-up indicates the periplasmic space.

The cyst-like cell #1 had $V_{\text{dense}}/V_{\text{c}} = 1 - (600/950)^3 = 0.75$, while the dense zone was quite light-colored (measurements 7 and 8). Cell #2 yields $V_{\text{dense}}/V_{\text{c}} = 1 - (550/800)^3 = 0.68$ (measurements 4–6) and cell #3 showed $V_{\text{dense}}/V_{\text{c}} = 1 - (625/725)^3 = 0.36$ (measurements 1–3). Both cells #2 and #3 showed a filamentous pattern that strongly resembled a condensed bacterial chromosome.

4. Discussion: transition by reshaping and volume reduction

Benzerara et al. [2] demonstrated the formation of cyst-like cell colonies on mineral surfaces from "scout" rods. The time-lapse imaging presented here shows a reverse morphological transition, through formation of two rod-shaped forms following the division of a cyst-like cell. Furthermore, the estimation of cell size parameters indicates that the two morphotypes have the same cell surface area. Our assumption is that the two forms derive from one another by pure reshaping. No net creation or destruction of membranes occurs. No invagination pattern has been observed. This case is very different from the well-described mechanism of endospore formation by species such as the *Bacillus* group.

A first attempt to investigate the transition of *R. tataouinensis* led to the observation of the differentiation of daughter cyst-like cells. Micrographs such as Fig. 2 reveal a non-homogeneous inner structure for cyst-like cells. Cytoplasmic material appears to have been condensed into peripheral areas of the cell. The dark tone of the condensed zone varies conversely. We make the assumption that cyst-like cell differentiation creates a spherical inner zone with a very clear cytoplasm. As indicated by the close-up in Fig. 2, the clear zone does not result from periplasmic space dilatation. At the opposite pole of the sphere, a cytoplasm with condensed elements appears. Our final hypothesis is that the volume of the dense area corresponds to the volume of the rod that is created after reshaping. A significant part of the cell volume is lost during the morphological transition, probably through water expulsion.

R. tataouinensis exhibits some life cycle similarities with *Caulobacter crescentus*, in which only the cyst is able to divide [9]. Each cell cycle results in two identical cells which immediately begin another round of cell division or differentiate into rods. *C. crescentus* rods cannot divide or initiate DNA replication until after differentiation into a new cyst cell. In addition to differences in morphology, the two progeny cells present in the *R. tataouinensis* life cycle have been shown to differ in motility. Cell division and cell cycle control involve numerous genes identified in model systems such as *Escherichia coli*, *C. crescentus* and *Bacillus subtilis* [8]. The annotation of the *R. tataouinensis* genome, which is in progress, should provide valuable information on the mechanisms by which coordination of cell division with cell differentiation is achieved, as well as chromosome partitioning.

Acknowledgements

Maxime Clusel and Arjan de Groot are thanked, the former for comforting discussions and the latter for his comments on the manuscript. We thank Philippe Ortet for making the film available on the web. This work was supported by the GEOMEX program grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

References

[1] J.A. Barrat, P. Gillet, C. Lecuyer, S.M. Sheppard, M. Lesourd, Formation of carbonates in the Tatahouine meteorite, Science 280 (1998) 412–414.
[2] K. Benzerara, M. Barakat, N. Menguy, F. Guyot, G. De Luca, C. Audrain, T. Heulin, Experimental colonization and alteration of orthopyroxene by the pleomorphic bacteria *Ramlibacter tataouinensis*, Geomicrobiol. J. 21 (2004) 341–349.
[3] R.L. Folk, Nannobacteria and the precipitation of carbonate in unusual environments, Sediment. Geol. 126 (1999) 47–55.
[4] P. Gillet, J.A. Barrat, T. Heulin, W. Achouak, M. Lesourd, F. Guyot, K. Benzerara, Bacteria in the Tatahouine meteorite: Nanometric-scale life in rocks, Earth Planet. Sci. Lett. 175 (2000) 161–167.
[5] T. Heulin, M. Barakat, R. Christen, M. Lesourd, L. Sutra, G. De Luca, W. Achouak, *Ramlibacter tataouinensis* gen. nov., sp. nov., and *Ramlibacter henchirensis* sp. nov., cyst-producing bacteria isolated from subdesert soil in Tunisia, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53 (2003) 589–594.
[6] E.O. Kajander, N. Ciftcioglu, Nanobacteria: An alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 8274–8279.
[7] A.L. Koch, What size should a bacterium be? A question of scale, Annu. Rev. Microbiol. 50 (1996) 317–348.
[8] W. Margolin, Themes and variations in prokaryotic cell division, FEMS Microbiol. Rev. 24 (2000) 531–548.
[9] G.T. Marczynski, L. Shapiro, Control of chromosome replication in *Caulobacter crescentus*, Annu. Rev. Microbiol. 56 (2002) 625–656.

Bibliographie

[1] L. E. Aguilera, J. R. Gutierrez, and P. L. Meserve. Variation in soil micro-organisms and nutrients underneath and outside the canopy of adesmia bedwellii (papilionaceae) shrubs in arid coastal chile following drought and above average rainfall. *Journal of Arid Environments*, 42(1) :61–70, 1999.

[2] J. Aleon, M. Chaussidon, B. Marty, L. Schutz, and R. Jaenicke. Oxygen isotopes in single micrometer-sized quartz grains : tracing the source of Saharan dust over long-distance atmospheric transport. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66 :3351–3365, 2002.

[3] R. I. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1) :143–169, 1995.

[4] A. Backman and J. K. Jansson. Degradation of 4-chlorophenol at low temperature and during extreme temperature fluctuations by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Microb Ecol*, 48(2) :246–53, 2004.

[5] D. Baize. *Guide des analyses courantes en pédologie*. INRA, 1988.

[6] P. W. Baker and L. G. Leff. Intraspecific differences in bacterial responses to modelled reduced gravity. *J Appl Microbiol*, 98(5) :1239–46, 2005.

[7] C. Bakermans, A. I. Tsapin, V. Souza-Egipsy, D. A. Gilichinsky, and K. H. Nealson. Reproduction and metabolism at -10 degrees C of bacteria isolated from Siberian permafrost. *Environmental Microbiology*, 5(4) :321–326, 2003.

[8] J. A. Barrat, P. Gillet, C. Lecuyer, S. M. F. Sheppard, and M. Lesourd. Formation of carbonates in the Tatahouine meteorite. *Science*, 280(5362) :412–414, 1998.

[9] J. N. Benardini, J. Sawyer, K. Venkateswaran, and W. L. Nicholson. Spore uv and acceleration resistance of endolithic bacillus pumilus and bacillus subtilis isolates obtained from sonoran desert basalt : implications for lithopanspermia. *Astrobiology*, 3(4) :709–17, 2003.

[10] K. Benzerara, M. Barakat, N. Menguy, F. Guyot, G. De Luca, C. Audrain, and T. Heulin. Experimental colonization and alteration of orthopyroxene by the pleomorphic bacteria *Ramlibacter tataouinensis*. *Geomicrobiology Journal*, 21(5) :341–349, 2004.

[11] D. Billi and M. Potts. Life and death of dried prokaryotes. *Res Microbiol*, 153(1) :7–12, 2002.

[12] S. B. Bird, J. E. Herrick, M. M. Wander, and S. F. Wright. Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in semi-arid rangeland. *Environmental Pollution*, 116(3) :445–455, 2002.

[13] H. Bossuyt, K. Denef, J. Six, S. D. Frey, R. Merckx, and K. Paustian. Influence of microbial populations and residue quality on aggregate stability. *Applied Soil Ecology*, 16(3) :195–208, 2001.

[14] C. W. Boylen. Survival of *Arthrobacter crystallopoietes* during prolonged periods of extreme desiccation. *J Bacteriol*, 113(1) :33–7, 1973.

[15] M. Bär, J. von Hardenberg, E. Meron, and A. Provenzale. Modelling the survival of bacteria in drylands : the advantage of being dormant. *Proc Biol Sci*, 269(1494) :937–42, 2002.

[16] C. Bristow, S. Bailey, and N. Lancaster. The sedimentary structure of linear sand dunes. *Nature*, 406(6791) :56–9, 2000.

[17] J. M. Cable and T. E. Huxman. Precipitation pulse size effects on sonoran desert soil microbial crusts. *Oecologia*, 141(2) :317–24, 2004.

[18] I. Cases and V. de Lorenzo. The grammar of (micro)biological diversity. *Environmental Microbiology*, 4 :623–627, 2002.

[19] A. Chao and S. M. Lee. Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American Statistical Association*, 87 :210–217, 1992.

[20] A. Chao, M. C. Ma, and M. C. K. Yang. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika*, 80 :193–201, 1993.

[21] M. Ciaramella, F. M. Pisani, and M. Rossi. Molecular biology of extremophiles : recent progress on the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4) :85–97, 2002.

[22] T. P. Curtis, W. T. Sloan, and J. W. Scannell. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99 :10494–10499, 2002.

[23] J. W. Deming and J. A. Baross. Deep-sea smokers : windows to a subsurface biosphere ? *Geochim Cosmochim Acta*, 57(14) :3219–30, 1993.

[24] J. Dunbar, S. Takala, S. M. Barns, J. A. Davis, and C. R. Kuske. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4) :1662–1669, 1999.

[25] S. Engen and R. Lande. Population dynamic models generating the lognormal species abundance distribution. *Math Biosci*, 132(2) :169–83, 1996.

[26] J. Felsenstein. Phylip (phylogeny inference package) version 3.6. Technical report, Departement of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, 2004. Distributed by the author.

[27] M. M. Floyd, J. Tang, M. Kane, and D. Emerson. Captured diversity in a culture collection : case study of the geographic and habitat distributions of environmental isolates held at the american type culture collection. *Appl Environ Microbiol*, 71(6) :2813–23, 2005.

[28] R. Folk. Nannobacteria and the precipitation of carbonate in unusual environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 126 :47–55, 1999.

[29] N. Fromin, J. Hamelin, S. Tarnawski, D. Roesti, K. Jourdain-Miserez, N. Forestier, S. Teyssier-Cuvelle, F. Gillet, M. Aragno, and P. Rossi. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (dge) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol*, 4(11) :634–43, 2002.

[30] M. A. Furlong, D. R. Singleton, D. C. Coleman, and W. B. Whitman. Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Appl Environ Microbiol*, 68(3) :1265–79, 2002.

[31] F. Garcia-Pichel, A. Lopez-Cortes, and U. Nubel. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado plateau. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4) :1902–1910, 2001.

[32] F. Garcia-Pichel and O. Pringault. Microbiology - Cyanobacteria track water in desert soils. *Nature*, 413(6854) :380–381, 2001.

[33] J. L. Garland, K. L. Cook, J. L. Adams, and L. Kerkhof. Culturability as an indicator of succession in microbial communities. *Microb Ecol*, 42(2) :150–8, 2001.

[34] O. Gascuel. BIONJ : an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol*, 14(7) :685–95, 1997.

[35] P. Gillet, J. A. Barrat, T. Heulin, W. Achouak, M. Lesourd, F. Guyot, and K. Benzerara. Bacteria in the Tatahouine meteorite : nanometric-scale life in rocks. *Earth Planet Sci Lett*, 175(3-4) :161–7, 2000.

[36] M. Gommeaux, M. Barakat, R. Christen, F. Chevenet, and T. Heulin. Culture and molecular assessments of bacterial diversity within the dunes of a sandy arid soil in southeast Morocco. *Submitted to Environmental Microbiology*, 2005.

[37] M. Hecker and U. Völker. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol*, 44 :35–91, 2001.

[38] A. Henne, H. Bruggemann, C. Raasch, A. Wiezer, T. Hartsch, H. Liesegang, A. Johann, T. Lienard, O. Gohl, R. Martinez-Arias, C. Jacobi, V. Starkuviene, S. Schlenczeck, S. Dencker, R. Huber, H. P. Klenk, W. Kramer, R. Merkl, G. Gottschalk, and H. J. Fritz. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat Biotechnol*, 22(5) :547–53, 2004.

[39] T. Heulin, M. Barakat, R. Christen, M. Lesourd, L. Sutra, G. De Luca, and W. Achouak. *Ramlibacter tataouinensis* gen. nov., sp. nov., and *Ramlibacter henchirensis* sp. nov., cyst-producing bacteria isolated from subdesert soil in Tunisia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53(Pt 2) :589–94, 2003.

[40] A. J. Holmes, J. Bowyer, M. P. Holley, M. O'Donoghue, M. Montgomery, and M. R. Gillings. Diverse, yet-to-be-cultured members of the Rubrobacter subdivision of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils. *Fems Microbiology Ecology*, 33(2) :111–120, 2000.

[41] P. Hugenholtz, B. M. Goebel, and N. R. Pace. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180(18) :4765–4774, 1998.

[42] J. B. Hughes, J. J. Hellmann, T. H. Ricketts, and B. J. M. Bohannan. Counting the uncountable : Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10) :4399–4406, 2001.

[43] E. P. Ivanova, S. Flavier, and R. Christen. Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria : emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Moritellaceae fam. nov., Ferrimonadaceae fam. nov., Idiomarinaceae fam. nov. and Psychromonadaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(Pt 5) :1773–88, 2004.

[44] P. H. Janssen, P. S. Yates, B. E. Grinton, P. M. Taylor, and M. Sait. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl Environ Microbiol*, 68(5) :2391–6, 2002.

[45] H. Jäger. Das Tafilalet. *Geographische Rundschau*, 8 :339–341, 1976.

[46] J. E. Johansen and S. J. Binnerup. Contribution of cytophaga-like bacteria to the potential of turnover of carbon, nitrogen, and phosphorus by bacteria in the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Microb Ecol*, 43(3) :298–306, 2002.

[47] E. O. Kajander and N. Ciftcioglu. Nanobacteria : an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(14) :8274–9, 1998.

[48] B. Kempf and E. Bremer. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol*, 170(5) :319–30, 1998.

[49] A. L. Koch. What size should a bacterium be ? a question of scale. *Annu Rev Microbiol*, 50 :317–48, 1996.

[50] L. Kroos and J. R. Maddock. Prokaryotic development : emerging insights. *Journal of Bacteriology*, 185 :1128–1146, 2003.

[51] C. R. Kuske, S. M. Barns, and J. D. Busch. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern united states that are present in many geographic regions. *Appl Environ Microbiol*, 63(9) :3614–21, 1997.

[52] C. R. Kuske, L. O. Ticknor, M. E. Miller, J. M. Dunbar, J. A. Davis, S. M. Barns, and J. Belnap. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl Environ Microbiol*, 68(4) :1854–63, 2002.

[53] B. Lighthart and B. T. Shaffer. Bacterial flux from chaparral into the atmosphere in midsummer at a high desert location. *Atmospheric Environment*, 28(7) :1267–1274, 1994.

[54] D. R. Lovley. Cleaning up with genomics : applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Microbiol*, 1(1) :35–44, 2003.

[55] H. Lunsdorf, R. W. Erb, W. R. Abraham, and K. N. Timmis. 'Clay hutches' : a novel interaction between bacteria and clay minerals. *Environ Microbiol*, 2(2) :161–8, 2000.

[56] G. T. Marczynski and L. Shapiro. Control of chromosome replication in *Caulobacter crescentus*. *Annu Rev Microbiol*, 56 :625–56, 2002.

[57] R. Margesin and Y. Nogi. Psychropiezophilic microorganisms. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 50(4) :429–36, 2004.

[58] W. Margolin. Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev*, 24(4) :531–48, 2000.

[59] G. M. Marion, C. H. Fritsen, H. Eicken, and M. C. Payne. The search for life on Europa : limiting environmental factors, potential habitats, and Earth analogues. *Astrobiology*, 3(4) :785–811, 2003.

[60] J. McAndrew. Calibration of a Frantz isodynamic separator and its application to mineral separation. *Proc. Australas. Min. Metall.*, 181(59-73), 1957.

[61] A. E. McCaig, L. A. Glover, and J. I. Prosser. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl Environ Microbiol*, 65(4) :1721–30, 1999.

[62] A. E. McCaig, L. A. Glover, and J. I. Prosser. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Appl Environ Microbiol*, 67(10) :4554–9, 2001.

[63] A. A. Miller. *Climatology.* Methuen, London, 1961.

[64] C. Montenat, L. Baidder, P. Barrier, A. Hilali, H. Lachkem, and J. Mennig. Contrôle tectonique de l'édification des monticules biosédimentaires dévoniens du hmar Lakhdad d'Erfoud (Anti-Atlas oriental, Maroc). *C. R. Acad. Sci. Paris, Série IIa*, 323 :297–304, 1996.

[65] R. Navarro-Gonzalez, F. A. Rainey, P. Molina, D. R. Bagaley, B. J. Hollen, J. de la Rosa, A. M. Small, R. C. Quinn, F. J. Grunthaner, L. Caceres, B. Gomez-Silva, and C. P. McKay. Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life. *Science*, 302(5647) :1018–1021, 2003.

[66] X. Nesme, M. Vaneechoutte, S. Orso, B. Hoste, and J. Swings. Diversity and genetic relatedness within genera *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rRNA gene. *Syst Appl Microbiol*, 18 :127–135, 1995.

[67] D. Newsome and P. Ladd. The use of quartz grain microtextures in the study of the origin of sand terrains in Western Australia. *Catena*, 35 :1–17, 1999.

[68] T. Perrier. *Etude théorique et expérimentale du comportement biogéochimique de l'Américium-241 en conditions rhizosphériques simplifiées.* PhD thesis, Université Henri Poincaré Nancy I, 2004.

[69] L. A. Porteous, R. J. Seidler, and L. S. Watrud. An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Molecular Ecology*, 6(8) :787–791, 1997.

[70] D. Prieur, G. Erauso, and C. Jeanthon. Hyperthermophilic life at deep-sea hydrothermal vents. *Planet Space Sci*, 43(1-2) :115–22, 1995.

[71] Z. Qin, P. Berliner, and A. Karnieli. Micrometeorological modeling to understand the thermal anomaly in the sand dunes across the israel-egypt border. *Journal of Arid Environments*, 51(2) :281, 2002.

[72] J. L. Ramos, M.-T. Gallegos, S. Marques, M.-I. Ramos-Gonzalez, M. Espinosa-Urgel, and A. Segura. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology*, 4 :166–171, 2001.

[73] L. Ranjard and A. Richaume. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, 152 :707–716, 2001.

[74] D. M. Raup. Taxonomic diversity estimation using rarefaction. *Paleobiology*, 1 :333–342, 1975.

[75] F. Restagno. *Interactions entre contacts solides et cinétique de la condensation capillaire. Aspects macroscopiques et aspects microscopiques.* PhD thesis, École normale supérieure de Lyon, 2000.

[76] E. P. C. Rocha, I. Matic, and F. Taddei. Over-representation of repeats in stress response genes : a strategy to increase versatility under stressful conditions ? *Nucleic Acids Res*, 30(9) :1886–94, 2002.

[77] V. A. Romanovskaia, P. V. Rokitko, and I. R. Malashenko. [Unique properties of highly radioresistant bacteria]. *Mikrobiol Z*, 62(1) :40–63, 2000.

[78] R. Saffary, R. Nandakumar, D. Spencer, F. T. Robb, J. M. Davila, M. Swartz, L. Ofman, R. J. Thomas, and J. DiRuggiero. Microbial survival of space vacuum and extreme ultraviolet irradiation : strain isolation and analysis during a rocket flight. *FEMS Microbiology Letters*, 215 :163–168, 2002.

[79] P. D. Schloss and J. Handelsman. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol*, 71(3) :1501–6, 2005.

[80] P. Singleton and D. Sainsbury. *Dictionary of microbiology and molecular biology.* Wiley, 1994.

[81] K. Smalla, G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer, and G. Berg. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis : plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol*, 67(10) :4742–51, 2001.

[82] E. Smit, P. Leeflang, S. Gommans, J. van den Broek, S. van Mil, and K. Wernars. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl Environ Microbiol*, 67(5) :2284–91, 2001.

[83] E. Stackebrandt and B. Goebel. 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(4) :846–849, 1994.

[84] S. Sugiyama and C. Nikara. Differential contribution of avoidance and tolerance to dehydration resistance in populations of perennial rye grass, *Lolium perenne* L. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55 :33–37, 2004.

[85] J. Thioulouse, D. Chessel, S. Dolédec, and J. Olivier. ADE-4 : a multivariate analysis and graphical display software. *Stat. Comp.*, 7 :75–83, 1997.

[86] J. C. Tipper. Rarefaction and rarefiction - the use and abuse of a method in paleoecology. *Paleobiology*, 5(4) :423–434, 1979.

[87] Y. Tong and B. Lighthart. Effect of simulated solar radiation on mixed outdoor atmospheric bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 26 :311–316, 1998.

[88] V. Torsvik, F. L. Daae, R.-A. Sandaa, and L. Øvreås. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64 :53–62, 1998.

[89] V. Torsvik and L. Øvreås. Microbial diversity and function in soil : from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5 :240–245, 2002.

[90] V. Torsvik, L. Øvreås, and T. F. Thingstad. Prokaryotic diversity–magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296(5570) :1064–6, 2002.

[91] P. van der Wielen, H. Bolhuis, S. Borin, D. Daffonchio, C. Corselli, L. Giuliano, G. D'Auria, G. de Lange, A. Huebner, S. P. Varnavas, J. Thomson, C. Tamburini, D. Marty, T. J. McGenity, K. N. Timmis, and B. S. Party. The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science*, 307(5706) :121–3, 2005.

[92] T. T. Warner. *Desert Meteorology*. Cambridge University Press, 2004.

[93] Y. Wu, T. Clevenger, and B. Deng. Impacts of goethite particles on UV disinfection of drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 :4140–4143, 2005.

[94] M. M. Yakimov, L. Giuliano, E. Crisafi, T. N. Chernikova, K. N. Timmis, and P. N. Golyshin. Microbial community of a saline mud volcano at San Biagio-Belpasso, Mt. Etna (Italy). *Environ Microbiol*, 4(5) :249–56, 2002.

[95] E. Zaady, U. Kuhn, B. Wilske, L. Sandoval-Soto, and J. Kesselmeier. Patterns of CO2 exchange in biological soil crusts of successional age. *Soil Biology and Biochemistry*, 32 :959–966, 2000.

[96] L. P. Zevenhuizen. Levels of trehalose and glycogen in *Arthrobacter globiformis* under conditions of nutrient starvation and osmotic stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 61(1) :61–8, 1992.

[97] J. Zhou, B. Xia, D. S. Treves, L. Y. Wu, T. L. Marsh, R. V. O'Neill, A. V. Palumbo, and J. M. Tiedje. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl Environ Microbiol*, 68(1) :326–34, 2002.

Résumé

Ce travail a été réalisé au sein d'un vaste programme d'étude géomicrobiologique des déserts chauds (faisant partie du programme Géomicrobiologie des milieux extrêmes, Geomex, du CNRS). Nous avons étudié le sable des dunes de Merzouga, Maroc, et la communauté de bactéries qui vit à la surface des grains de sable. Nous avons décrit la diversité bactérienne à l'échelle d'un échantillon de sable, par séquençage de l'ADNr 16S. Nous avons considéré les bactéries cultivables et la diversité totale par extraction d'ADN du sable. La faible biomasse, liée aux stress de l'environnement désertique, ne se traduit pas par une réduction de la diversité bactérienne (environ 750 taxons sont présents), mais par une très faible fréquence de chacun des taxons, mesurée en individus par taxon et par gramme de sable.

Nous avons réalisé une caractérisation fine des grains qui constituent le sable et défini six catégories de grains, selon les phases qui constituent la masse du grain mais aussi les placages (notamment d'oxydes de fer et de matière organique) à la surface des grains. Une approche originale de culture grain-par-grain a permis d'étudier la diversité bactérienne sur chacune des phases minérales. Cette approche a permis d'augmenter très sensiblement le taux de mise en culture (nombre de bactéries cultivables par rapport au nombre total estimé de cellules), et de révéler une diversité différente de la diversité globale initialement décrite. Nous avons mis en évidence des groupes bactériens adhérant particulièrement fermement aux minéraux.

Enfin, nous avons commencé à réaliser une estimation des conditions requises pour l'activité bactérienne. Pour cela nous avons incubé le sable dans des chambres où l'humidité relative de l'air était contrôlée. Les différents niveaux d'humidité relative de l'air ont été définis à partir d'enregistrements météorologiques détaillés de la région de Merzouga. La première conclusion à laquelle nous sommes parvenus est que seule l'humidité correspondant aux fins de nuits d'hiver permet un développement bactérien rapide.