

BULLETIN MENSUEL  
DE LA  
**SOCIÉTÉ LINNÉENNE DE LYON**

FONDÉE EN 1822

RECONNUE D'UTILITÉ PUBLIQUE PAR DÉCRET DU 9 AOÛT 1937  
des SOCIÉTÉS BOTANIQUES DE LYON, D'ANTHROPOLOGIE ET DE BIOLOGIE DE LYON  
REUNIES  
et de leurs GROUPES REGIONAUX : ROANNE, VALENCE, etc.

**Siège social et Secrétariat général : 33, rue Bossuet, 69006 Lyon**

**TRESORERIE :**

## T A R I F 1 9 7 6

Abonnement France .....	45 F
Membre scolaire .....	22 F
Abonnement Etranger .....	50 F
Changement d'adresse, inscription ou réintégration en sus .....	7 F

N.B. — Les virements à notre C.C.P. **LYON 101-98** ou les chèques bancaires, doivent être rédigés au nom de la SOCIÉTÉ LINNÉENNE DE LYON.

**SOMMAIRE**

ROMAN E. et PICHOT J. — Diptères <i>Culicidae</i> de la faune Lyonnaise : Moustiques nouveaux, renseignements complémentaires sur certains déjà signalés .....	57
RAYNAUD P. — Synopsis morphologique des larves de <i>Carabus</i> Lin. (Coléoptères <i>Carabidae</i> ) connues à ce jour .....	61
EGHBALTALAB M., DEBAUD J.-C. et BRUCHET G. — Etude in vitro des activités pectinolytique et cellulolytique de <i>Fomes annosus</i> (Fr.) Cke et de <i>Rosellinia quercina</i> Hart .....	85
FAURE-RAYNAUD M. et GOURBIÈRE G. — Microflore des aiguilles de sapin <i>Abies alba</i> Mill. : Bactéries et levures .....	90

**PARTIE ADMINISTRATIVE****RAPPORT MORAL POUR L'ANNEE 1975**

Chers Collègues,

Conformément à nos statuts votre Président doit vous donner un compte rendu moral pour l'année qui se termine.

Ce résumé de notre activité va permettre aux 107 membres nouveaux de mieux se rendre compte des ressources de leur association.

A fin 1974 notre effectif était de 1559 membres, il est de 1478 à ce jour. Cette tendance déjà notée par nos prédécesseurs peut s'expliquer en partie par la mise en ordre de notre fichier.

Il serait intéressant de savoir si ces radiations correspondent à des lecteurs lointains ou s'il se dégage une forte proportion de résidents de notre région ?

Le fait que l'optimum d'activité des endoPG mesurée par viscosimétrie ne précède pas celui de la PME indique que celles-ci contrairement aux exoPG, agissent sur des substrats faiblement méthylés.

La souche de *Rosellinia quercina* nous a été fournie par la Station de Pathologie végétale de l'I.N.R.A. de Clermont-Ferrand et celle de *Fomes annosus* par Mme A. DAVID.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- COURTOIS J.-E. et BUI KHAC DIEP, 1967. — Recherches sur le dosage des cellulases et hémicellulases dans les préparations pharmaceutiques. IV. Emploi de l'hydroxyéthylcellulose comme substrat. Ann. Pharm. Fr. 25, n° 3, 181-196.
- DEMAIN A.-L. et PHAFF H.-J., 1957. — Recent advances in the enzymatic hydrolysis of pectic substances. Wallerstein Lab. comm., 20, 119-131.
- REESE E. T. et LEVINSON H. S., 1952. — A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms. Physiol. Plant., 5, 345-366.
- TOUZE A., 1964. — L'antracnose du Melon. Etude de quelques manifestations physiologiques. (Thèse, Toulouse, inédit), p. 30-33.
- WINSTEAD N. N. et WALKER J. C., 1954. — Production of vascular browning by metabolites from several pathogens. Phytopathology, 44, 153-158.

Université Claude-Bernard Lyon I,  
Laboratoire de Mycologie associé au C.N.R.S.,  
Bâtiment 405, 43, bd du 11-Novembre-1918, F - 69621 Villeurbanne.

### MICROFLORE DES AIGUILLES DE SAPIN *ABIES ALBA* MILL. : BACTÉRIES ET LEVURES

par M. FAURE-RAYNAUD et F. GOURBIÈRE.

Résumé. — Mise en évidence de bactéries et levures sur les aiguilles de sapin *Abies alba* Mill. Evolution lors de la sénescence des aiguilles — variations saisonnières. Importance des bactéries dans cette microflore.

#### INTRODUCTION.

De nombreux travaux ont été consacrés à la microflore, bactéries, levures et champignons de la surface des feuilles. Certains résultats, obtenus depuis 1955 date d'apparition du terme de « phyllosphère » (LAST 1955), sont cités et commentés par LAST et DEIGHTON dans un article relatif à la microflore des feuilles vivantes (1965). Des espèces végétales variées, pomme de terre (HOLLOMON 1967), concombre (LEBEN 1961), légumineuses diverses (DICKINSON 1967 - STOUT 1960), ont fait l'objet de ces études. Celles relatives aux conifères concernent essentiellement les microfunges. Ils ont été trouvés soit sur les feuilles de l'arbre : mélèze, épicéa, pin (BIRTI 1956) soit sur la litière (pin sylvestre) à la dégradation de laquelle ils participent (KENDRICK et BURGESS 1962). Les autres microorganismes, levures et bactéries, ont rarement été recherchés sur les conifères. Seuls *Larix decidua* (McBRIDE 1970) et *Pinus strobus* (LEBEN 1972) semblent avoir été étudiés dans ce but.

Nous avons tenté de mettre en évidence les microorganismes des feuilles du sapin *Abies alba* Mill. Les méthodes employées nous ont conduits à associer levures et bactéries. Les champignons ont fait l'objet d'une étude séparée (GOURBIÈRE 1974 a-b, 1975).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Le feuillage étudié provient de la sapinière du Grand-Bois, située dans le massif du Pilat (Loire) à une altitude d'environ 1100 m. Les caractéristiques de cette station ont été décrites par ANDRÉ (1973).

Les recherches ont été effectuées sur trois types d'aiguilles :

— aiguilles vertes prélevées sur les branches basses de l'arbre ; ce sont des aiguilles d'un ou deux ans. Compte tenu de la vie relativement longue des aiguilles du sapin (8 à 10 ans) il est probable que celles âgées de deux ans ne présentent pas encore de caractères sénescents ;

— aiguilles récemment tombées, recueillies dans des tamis sous les arbres donc protégées de tout contact avec le sol. Parmi celles-ci nous avons étudié séparément aiguilles brunes et aiguilles vertes qui représentent jusqu'à 40 % des aiguilles tombées.

Les prélèvements ont été faits de septembre 1971 à novembre 1972 et d'octobre 1973 à novembre 1974. Les aiguilles sont prélevées et transportées stérilement. Les microorganismes recherchés sont mis en évidence par la technique des suspensions-dilutions de POCHON et TARDIEUX (1962) adaptée à notre matériel. Les aiguilles (30 par échantillons) sont placées dans un tube contenant 10 ml d'eau distillée stérile et soumises, pendant 10 minutes, à une agitation énergique (Vortex Génie). Les dilutions préparées à partir de cette suspension sont ensemencées, à raison de trois boîtes par dilution (0,1 ml par boîte), sur le milieu de DIEM (1967) renfermant glucose, peptone et yeast extract<sup>1</sup>. Les comptages sont faits après une semaine d'incubation à 20° C. Le nombre des germes est calculé à partir de la dilution assurant une cinquantaine de colonies par boîte puis rapporté au gramme d'aiguilles sèches. A l'exclusion des colonies fongiques filamenteuses toutes les colonies ont été comptées. Les proportions levures/bactéries ont été ensuite établies par l'observation microscopique de toutes les colonies d'une boîte prise au hasard.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION.

### *Importance quantitative de la microflore étudiée.*

Comparativement aux valeurs citées dans la littérature (LAST et DEIGHTON 1965, RUINEN 1956, LEBEN 1972) le nombre des microorganismes mis en évidence sur les aiguilles du sapin est faible. L'ensemble de résultats, consignés sur le tableau I, montre qu'à deux exceptions près (octobre et juillet) la microflore augmente lorsque l'on passe des aiguilles vivantes aux aiguilles vertes tombées puis aux aiguilles brunes. Si l'on considère les moyennes la microflore double d'une série à l'autre.

Pour chaque type de feuilles la microflore, maximale en automne, régresse très vite en hiver pour s'accroître au cours du printemps et de l'été. Les valeurs élevées d'avril 1974 doivent être considérées comme accidentelles. Dans leur ensemble ces résultats concordent avec ceux obtenus lors des prélèvements effectués en 1971 et en 1972.

---

1. Des essais préliminaires réalisés en lavant les aiguilles à l'eau physiologique additionnée ou non de tween 80 et en variant le milieu d'isolement (gélose nutritive, milieu à l'extrait de terre, à l'extrait de feuilles, milieu additionné de peptone ou de phytone) nous ont conduits à retenir cette technique comme permettant l'isolement du plus grand nombre de germes.

L'accroissement de la microflore lors de la sénescence des feuilles est un fait bien connu (DIEM 1967) lié à la brusque libération des composants solubles de la feuille (MANGENOT 1966). Les aiguilles vertes, tombées pour des raisons mécaniques : vent, pluie, insectes, se comportent comme des feuilles sénescentes. Ce fait a déjà été remarqué en ce qui concerne la microflore fongique (GOURBIÈRE 1974 b).

Date des prélèvements	Nombre de microorganismes trouvés sur les feuilles		
	Vertes vivantes	Vertes tombées	Brunes tombées
16 octobre 1973 . . . . .	213 000 g	170 000 g	620 000 g
19 novembre 1973 . . . . .	60 000	140 000	660 000
21 janvier 1974 . . . . .	25 000	55 000	70 000
25 février 1974 . . . . .	20 000	50 000	145 000
18 mars 1974 . . . . .	12 000	20 000	275 000
29 avril 1974 . . . . .	160 000	880 000	1 800 000
8 juillet 1974 . . . . .	135 000	130 000	500 000
19 septembre 1974 . . . . .	220 000	800 000	1 200 000
10 octobre 1974 . . . . .	200 000	400 000	1 400 000
14 novembre 1974 . . . . .	110 000	625 000	700 000
Moyennes . . . . .	115 500	327 000	737 000

TABLEAU I. Nombre de microorganismes (bactéries et levures), par rapport au poids sec des feuilles, mis en évidence sur les feuilles d'*Abies alba* Mill.: feuilles vertes vivantes, feuilles vertes tombées et feuilles brunes tombées.

L'augmentation du nombre des microorganismes sur les trois types de feuilles en été et en automne résulte probablement de l'amélioration des conditions climatiques (température).

*Composition de la microflore.*

La majorité des colonies obtenues à partir des eaux de lavage des feuilles est constituée par des levures. L'examen du tableau II montre que souvent les proportions des bactéries augmentent lorsque l'on passe des aiguilles vertes vivantes aux aiguilles vertes tombées puis aux aiguilles brunes. Cependant cette règle ne peut pas être considérée comme constante car quelques inversions ont été notées. L'augmentation du nombre des bactéries en valeur relative comme en valeur absolue s'accroît encore dans les aiguilles de la litière au sol. Quelques essais montrent que les feuilles de la couche de fermentation portent  $4 \cdot 10^6$  germes par gramme de feuilles (poids sec) dont 79 à 100 % sont des bactéries.

Les bactéries semblent disparaître complètement au début du printemps sur les trois types d'aiguilles. Cependant, si on laisse macérer ces aiguilles dans l'eau de lavage pendant 72 heures avant d'effectuer les ensemencements on constate la présence de bactéries. Leur nombre, au début de l'expérience était

Date des prélèvements	Feuilles vertes vivantes	Feuilles vertes tombées	Feuilles brunes tombées
	%	%	%
Octobre 1973 .....	11	12	21
Novembre 1973 .....	20	40	61
Janvier 1974 .....	5	70	44
Février 1974 .....	50	0	54
Mars 1974 .....	0	0	0
Avril 1974 .....	0	0	0
Juillet 1974 .....	4	16	31
Septembre 1974 .....	1	30	10
Octobre 1974 .....	18	42	50
Novembre 1974 .....	27	11	10
Moyennes .....	13,6	22,1	28,1

TABLEAU II. Pourcentage des bactéries par rapport à la microflore (bactéries et levures) isolée par lavage au cours des prélèvements 1973 et 1974.

Feuilles étudiées	Nbre d'isollements	Nbre cocci	Mobi- lité	Production pigment		Gram —		Gram +		spore
				soluble fluores.	insoluble	coc.	bac.	coc.	bac.	
Feuilles vertes, vivantes	100	22	77	26	43	2	68	20	10	7
Feuilles vertes, tombées	170	11	148	27	22	6	141	5	18	11
Feuilles brunes, tombées	190	4	167	56	14	0	170	4	16	9

TABLEAU III. Principaux caractères des bactéries isolées sur les trois types de feuilles: forme, coloration de Gram, production d'un pigment soluble fluorescent ou insoluble non fluorescent, mobilité, présence de spore.

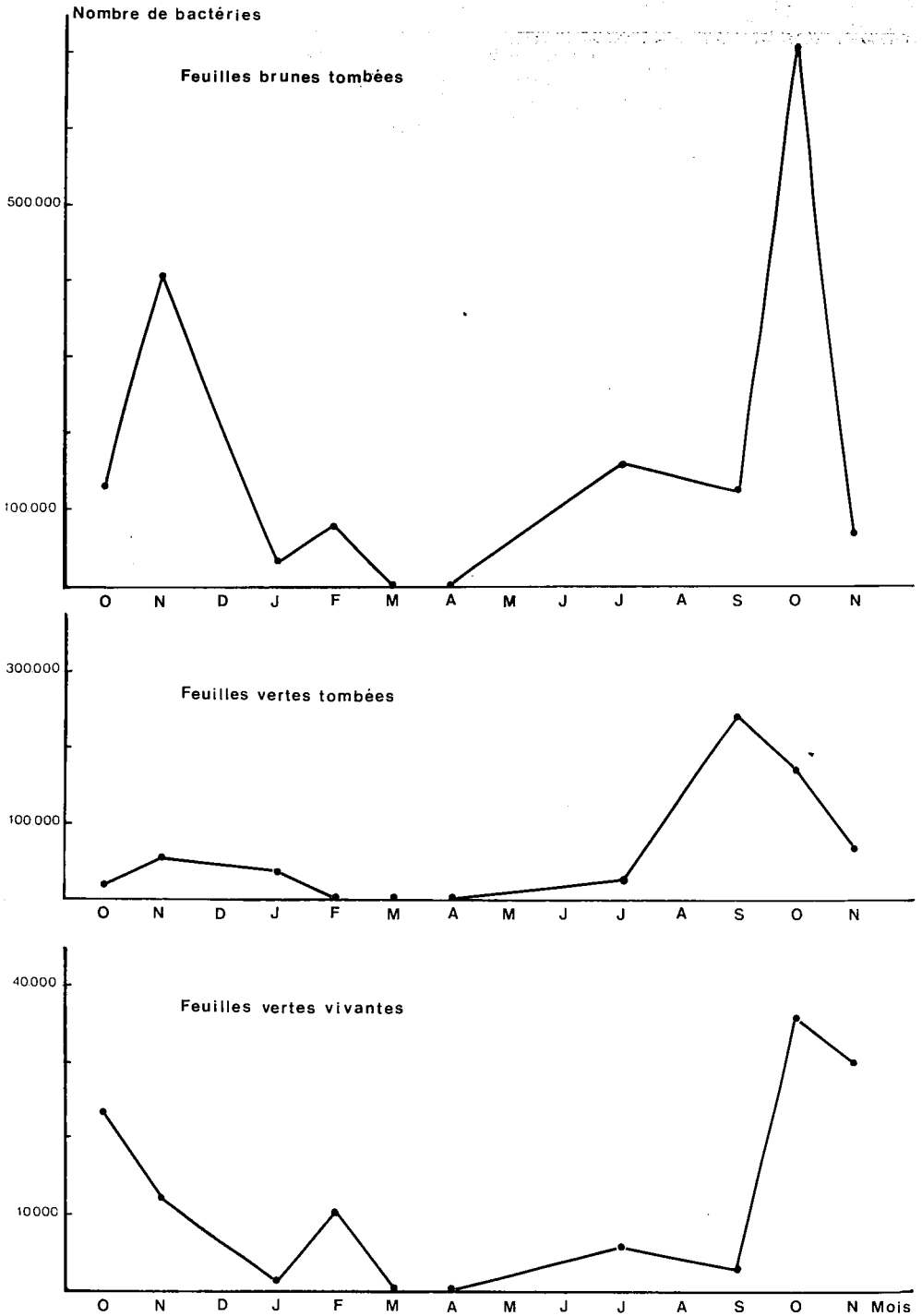


Fig. 1: Variation du nombre des bactéries mises en évidence sur les trois types de feuilles étudiées du sapin *Abies alba* Mill. au cours des prélèvements effectués en 1973 et 1974.

trop faible pour qu'elles soient décelables par la technique utilisée. Le pourcentage des bactéries augmente en automne. Ce maximum automnal s'observe plus nettement sur les courbes montrant les variations du nombre absolu des bactéries au cours de l'année (Fig. 1).

### *Bactéries.*

Au fur et à mesure de l'isolement des bactéries nous avons étudié un certain nombre de leurs caractères : forme, mobilité, présence de spores, coloration de Gram, pigmentation, production d'un pigment fluorescent, analyse des besoins nutritionnels par leur développement sur les milieux de LOCHHEAD modifiés (GOUNOT 1967). Les résultats obtenus sont groupés sur le tableau III.

Les germes isolés à partir des trois types d'aiguilles sont pour la plupart des formes bacillaires mobiles, Gram négatives. Les *Pseudomonas* dominent. Beaucoup produisent un pigment fluorescent diffusible. D'autres bactéries forment des colonies pigmentées en jaune ou orange ; compte tenu des autres caractères de ces souches on peut les rapprocher des genres *Xanthomonas* et *Flavobacterium*. Les bactéries Gram positives sont plus rares : quelques formes bacillaires sporulées du genre *Bacillus* et des cocci du genre *Micrococcus*. Occasionnellement d'autres cocci Gram négatif sont rencontrés.

Ces genres bactériens ont aussi été remarqués sur la phyllosphère du mélèze (McBRIDE 1970) et sur celle d'autres végétaux non résineux (LAST et DEIGHTON 1965).

Les bactéries isolées au cours de ces recherches ont été trouvées sur les feuilles vertes et sur les feuilles brunes. Aucune d'elles ne s'est révélée spécifique d'un type de feuille. On peut noter cependant que les cocci ont été décelés surtout sur les feuilles vertes et au cours de l'automne. Les *Pseudomonas* fluorescents sont répartis uniformément sur les feuilles vertes et brunes, à deux périodes de l'année : septembre-octobre et mars-avril. Enfin les formes pigmentées sont plus nombreuses sur les feuilles en place que sur les autres.

### *Levures.*

Les levures isolées ont été déterminées par le Centraal Bureau Voor Schimmelculture de Baarn.

Les levures le plus fréquemment rencontrées sur les aiguilles vertes et brunes sont essentiellement des *Aureobasidium* sps associés à *Sporobolomyces pararoseus* Olson et Hammer, *Torulopsis fujisanensis* Soneda, *Torulopsis auriculariae* Nakase, *Candida foliarum* Ruinen et *Hansenula canandensis* Wickerham.

### CONCLUSION.

De l'ensemble de ces résultats il ressort que les bactéries ne semblent représenter qu'une partie mineure de la microflore des aiguilles du sapin dont les levures et les microfunges constituent l'essentiel. Cette population bactérienne, déjà faible, disparaît presque complètement au cours de l'hiver aussi bien sur les aiguilles vivantes que sur les aiguilles tombantes.

Plusieurs facteurs peuvent gêner la fixation et le développement des bactéries, parmi ceux-ci : le caractère hydrophobe de la surface de la feuille, la présence possible de substances foliaires inhibitrices à l'égard des bactéries.

Les champignons (filamenteux ou levuriformes) plus aptes à coloniser les aiguilles pourraient en outre exercer un effet inhibiteur ou antagoniste. Nous nous efforçons de préciser les facteurs qui semblent faire de la feuille vivante du sapin un milieu défavorable au développement des bactéries.

*Remerciements.*

Ce travail a été exécuté avec la collaboration technique de Madame Nadine GREMAUX-GUILLAUMAUD.

Université Claude-Bernard, Lyon I,  
Laboratoire d'Ecophysiologie microbienne,  
Bâtiment 405, Département de Biologie Végétale,  
43, boulevard du 11-Novembre-1918, 69621 Villeurbanne.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDRÉ J., 1973. — Contribution à l'étude écologique d'une sapinière du massif du Pilat: apport au sol d'éléments minéraux et de matière organique avec analyse particulière de composés polyphénoliques. Thèse Doctorat de spécialité, Lyon, 119 pages.
- BIRTI M., 1956. — Ricerche sulla presenza di germi fungini non patogeni su foglie di coniferi alpine. Atti. Mem. Acad. Patav. Sci. Lett. Arti., 69 (2): 137-154.
- DICKINSON C. H., 1967. — Fungal colonisation of pisum leaves. Can. J. Bot., 45: 915-927.
- DIEM H. G., 1967. — Microorganismes de la surface des feuilles. I. — Observations préliminaires de la population microbienne de l'orge. Bull. E. N. Sup. Agron. de Nancy, 9: 102-108.
- GOUNOT A.-M., 1967. — La microflore des limons argileux souterrains: son activité productrice dans la biocoenose cavernicole. Thèse Sc., Ann. Spéléologie, 22: 23-243.
- GOURBIÈRE F., 1974 a. — Les champignons microscopiques liés aux aiguilles de sapin (*Abies alba* Mill.), 1. Premiers résultats. Bull. Soc. Mycol. Fr., 90 (2): 89-96.
- GOURBIÈRE F., 1974 b. — Les champignons microscopiques liés aux aiguilles de sapin (*Abies alba* Mill.), 2. Variations saisonnières de la microflore des aiguilles tombantes. Bull. Soc. Mycol. Fr., 90 (4): 325-333.
- GOURBIÈRE F., 1975. — Les champignons microscopiques liés aux aiguilles de sapin (*Abies alba* Mill.), 3. Microflore des aiguilles vivantes. Bull. Soc. Mycol. Fr., 91 (3): 429-441.
- HOLLOMON D. W., 1967. — Observation on the phylloplane flora of potatoes. Eur. Potato J., 10: 53-61.
- KENDRICK W. B. and BURGESS A., 1962. — Biological aspect of the decay of *Pinus sylvestris* leaf litter. Nova Hedwigia, 4: 313-342.
- LAST F. T., 1955. — Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. Trans. Brit. Mycol. Soc., 38: 221-239.
- LAST F. T. and DEIGHTON F. C., 1965. — The non parasitic microflora on the surfaces of living leaves. Trans. Brit. Mycol. Soc., 48 (1): 83-99.
- LEBEN C., 1961. — Microorganisms on cucumber seedlings. Phytopathology, 51: 553-557.
- LEBEN C., 1972. — Microorganisms associated with plant buds. J. Gen. Microbiol., 71: 327-331.
- MANGENOT F., 1966. — Interactions nutritionnelles au niveau de la feuille. Rapport général. Ann. Inst. Pasteur, 111: 329-341.
- MCBRIDE R. P., 1970. — The phyllosphere of european Larch (*Larix decidua* Mill.). Thèse Sc., Edinbourg, 210 pages.
- POCHON A. et TARDIEUX P., 1962. — Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Ed. La Tourelle, Saint-Mandé (France), 111 pages.
- RUINEN J., 1956. — Occurrence of *Beijerinckia* species in the phyllosphere. Nature, 177 (4501): 220-221.
- STOUT J. D., 1960. — Bacteria of soil and pasture leaves at Claudelands Showgrounds. N. Z. Jl. Agric. Res., 3: 413-430.