

CARACTÉRISATION BIOLOGIQUE

d'échantillons de sols et applications agronomiques

Rémy Chaussod (*Microbiologie des sols, INRA-Dijon*)

et Rachida Nouaïm (*Cellule d'Application en Écologie, Université de Bourgogne*).

Les sols renferment de très nombreux êtres vivants (microflore, micro et mésofaune) dont l'activité est en lien plus ou moins direct avec leur "fonctionnement" en général et certaines de leurs propriétés agronomiques en particulier. Il est donc tout à fait légitime, surtout en Agriculture Biologique, de chercher à utiliser des mesures biologiques pour mieux connaître les sols et les gérer au mieux dans une perspective agronomique.

Quelles sont les mesures biologiques et biochimiques "opérationnelles", c'est à dire véritablement utilisables pour juger des effets des pratiques agricoles sur la qualité des sols et de l'environnement ? Ces mesures peuvent-elles être utilisées en Agriculture Biologique comme outil d'aide à la décision, pour évaluer les potentialités des sols ou aider à gérer la fertilisation ?

Il faut reconnaître qu'aujourd'hui encore très peu de grandeurs biologiques ou biochimiques sont à la fois mesurables aisément et "interprétables" en termes agronomiques. Nous présentons ici les principales méthodes de laboratoire, applicables à des échantillons de sols et susceptibles d'apporter des informations utiles sur certaines propriétés agronomiques des parcelles dont les échantillons sont issus. Cette démarche "analytique" est complémentaire de l'observation agro-pédologique de terrain ; elle ne s'y substitue pas. Elle peut également être complétée par la mise en œuvre d'autres indicateurs, comme la faune lombricienne.

Les questions posées

Il importe tout d'abord de bien définir l'objectif "agronomique", c'est à dire l'usage que l'on compte faire des résultats des mesures. Ensuite seulement on pourra choisir des méthodes sur lesquelles s'appuyer pour juger des propriétés biologiques des sols cultivés. En effet, de très nombreuses déterminations biologiques peuvent

être mises en œuvre, mais leur intérêt pratique dépend en premier lieu de leur pertinence par rapport à la question posée.

Pour l'agriculture biologique, on peut identifier les besoins suivants :

- s'assurer du bon fonctionnement biologique des sols.
- vérifier que les pratiques culturales appliquées sont bénéfiques.
- essayer de quantifier ces effets en termes de fertilité.

Ce dernier point est particulièrement important car il concerne les relations entre le "statut organique" du sol et son pouvoir alimentaire en azote.

Face à ces besoins, les indicateurs biologiques potentiellement utilisables peuvent être regroupés de la façon suivante :

Microflore :

- Approche globale : détermination de compartiments "actifs" de la M.O. : biomasse microbienne et "métabolites".
- Activité globale de la microflore : minéralisation du carbone (respiration) et de l'azote.
- Fonctions particulières d'intérêt agronomique (ex : nitrification, aptitudes métaboliques diverses, activités enzymatiques).
- Populations particulières, d'intérêt agronomique ou utilisables en tant que bio-indicateurs.

Mésofaune (verre de terre) :

- Abondance (nombre et masse par unité de surface) et structure des populations (ratio jeunes/adultes,

cocons).

- Diversité (nombre d'espèces différentes) et types écologiques (épigés, endogés, anéciques).
- Autres indicateurs

Dans ce qui suit, nous aborderons uniquement les méthodes "opérationnelles" concernant la microflore et ses activités.

Les méthodes utilisables, intérêt et limites.

Approche globale : détermination de compartiments "actifs" de la M.O.

Biomasse microbienne

La notion de biomasse microbienne recouvre l'ensemble des microorganismes du sol (bactéries, champignons, etc.). Elle a été définie expérimentalement. Il s'agit d'une méthode "biocidale", consistant à tuer les êtres vivants du sol à l'aide de vapeurs de chloroforme puis à mesurer la quantité de carbone (d'origine microbienne) qui est générée par ce traitement. La technique la plus utilisée est la fumigation-extraction. Elle est basée sur la détermination du carbone organique extractible dans un échantillon fumigé et dans un échantillon du même sol, non fumigé. Le supplément de carbone rendu extractible par la fumigation est directement proportionnel à la biomasse microbienne présente.

Cette méthode présente l'avantage d'être universelle (applicable à tous types de sols), pratiquement "normalisée" et relativement facile à

mettre en œuvre. Elle donne des résultats parfaitement reproductibles et avec une précision rarement atteinte en biologie. Grâce à cela, elle a détrôné les numérations de germes qui étaient autrefois utilisées. Toutefois, la mesure ne peut pas être appliquée sur n'importe quel échantillon ; plus exactement, pour être interprétable, la mesure doit porter sur un échantillon de sol "frais", prélevé de préférence en dehors de périodes de stress hydrique ou thermique. Ces contraintes s'appliquent en fait à toutes les mesures biologiques présentées ici ; elles sont détaillées plus loin. Enfin, l'interprétation des résultats n'est pas immédiate car plusieurs paramètres interviennent.

Métabolites (ou pool de M.O. labile)

Il est clair que la matière organique du sol ne forme pas un ensemble homogène : il s'agit au contraire d'un mélange de différents composés, plus ou moins complexes au plan biochimique et plus ou moins biodégradables au plan biologique. La majeure partie de la matière organique du sol est très stable et ne participe pratiquement pas aux cycles biogéochimiques. La fraction vivante (la biomasse microbienne) a un taux de renouvellement important mais ne représente qu'un faible pourcentage (1 à 3 %) de la matière organique totale. Entre la biomasse microbienne et l'humus très stable, on peut imaginer l'existence d'une fraction organique intermédiaire. De nombreux auteurs ont proposé de définir un pool de M.O. "active" ou M.O. "labile". Cette nécessité de séparer M.O. très stable et M.O. réactive apparaît de façon évidente lorsqu'on aborde la dynamique de la matière organique : les modèles mathématiques ne peuvent tourner que si on identifie une fraction réactive. Pour quantifier ce pool labi-

le, de nombreux auteurs ont fait appel à une extraction à l'eau chaude. Cette technique a été proposée pour évaluer la fourniture potentielle d'azote d'échantillons de sol. L'origine de la matière organique solubilisée par l'eau chaude sous pression équilibrante (autoclavage de 16 heures à 120 °C) est essentiellement microbienne et il existe, pour un type de sol donné, une relation entre la taille de ce compartiment et la taille de la biomasse microbienne. Enfin, tout récemment, il a été montré que les quantités de carbone soluble à l'eau chaude (16 heures à 80 °C) sont corrélées à la biomasse microbienne, à l'azote minéralisable en anaérobie et à la stabilité structurale d'une série de sols néo-zélandais. La taille de ces deux compartiments actifs de la matière organique (la biomasse microbienne et les métabolites)

reflète assez bien le "statut organique" du sol. Surtout, il a été montré que, pour un type de sol donné, il existe une corrélation intéressante entre la taille de ces compartiments et le potentiel de minéralisation de l'azote.

Activité globale de la microflore : minéralisation du carbone (respiration) et de l'azote.

La méthode la plus ancienne et la plus simple pour évaluer l'activité globale de la microflore consiste à mesurer la minéralisation du carbone et de l'azote en conditions contrôlées, proches de l'optimum biologique. Dans la pratique, les échantillons de sol sont incubés durant 28 jours à 28 °C et à une teneur en eau voisine de la capacité au champ.

Le $C-CO_2$ dégagé



pendant l'incubation est piégé dans un flacon contenant de la soude diluée ; il peut être dosé ensuite par différentes techniques. Le flux de C-CO₂ rapporté à l'unité de biomasse et à l'unité de temps est appelé "respiration spécifique". Cette grandeur a la dimension d'un taux de renouvellement (j⁻¹) et représente le taux de renouvellement apparent de la biomasse microbienne. Elle complète donc fort utilement la mesure de la biomasse microbienne.

Parallèlement, l'azote minéral présent dans l'échantillon de sol est déterminé avant et après l'incubation. La quantité d'azote qui est minéralisée durant l'incubation de 28 jours à 28 °C est appelée "azote minéralisable" et correspond approximativement à ce qui serait libéré au champ durant une saison de végétation.

Ces déterminations très simples, voire rustiques, s'avèrent très utiles pour "caractériser" des échantillons de sol. Elles prennent tout leur intérêt lorsqu'il s'agit de comparer des traitements différents sur un même type de sol. En effet, même s'il est délicat d'extrapoler au champ les observations de laboratoire (c'est à dire de transformer des mg N/kg en unités/ha, le classement des échantillons de sol (en valeur relative) sera respecté. On peut alors effectuer ces déterminations sur un grand nombre de parcelles et "caler" les résultats sur quelques parcelles de référence.

Fonctions particulières d'intérêt agronomique

(ex : nitrification, aptitudes métaboliques diverses, activités enzymatiques).

Nitrification

Les germes nitrifiants sont réputés sensibles à divers contaminants (pesticides, "métaux lourds") ; il peut donc être utile de s'assurer que cette fonction importante du cycle de l'azote est bien active. Un test mesurant en temps court la vitesse d'oxydation de l'ammonium en nitrites est utilisable en routine pour cela.

Dégradation de la cellulose

Ce test est parfois utilisé pour s'assurer qu'une pollution n'a pas d'effets décelables sur cette activité agro-

nomiquement importante. Il a peu d'intérêt dans la pratique courante.

Aptitudes métaboliques

Les plaques Biolog[®] mises au point initialement pour la taxonomie bactérienne sont désormais utilisées pour des évaluations environnementales. Il s'agit de plaques formées de 96 puits et contenant 95 substrats différents et un indicateur red-ox (INT-formazan). L'inoculation de ces puits à l'aide d'une suspension-dilution de sol se traduit par l'apparition en quelques jours d'une coloration dans les puits ayant donné lieu à une croissance microbienne (consommation d'oxygène). En fait, cette méthode souffre de divers biais et n'est au mieux utilisable que pour comparer deux traitements contrastés d'un même sol.

Sur un principe comparable, des plaques API-zym permettent d'évaluer la présence/absence d'une série d'activités enzymatiques à partir d'une suspension de sol.

Activités enzymatiques

Les déterminations quantitatives de nombreuses activités enzymatiques sont possibles sur des échantillons de sol. La présence et l'activité d'êtres vivants dans le sol se traduit par la synthèse d'enzymes de toutes sortes, localisées à l'intérieur des cellules (intracellulaires) ou extra-cellulaires, adsorbées sur les parois des microbes ou sur les minéraux argileux, ou encore formant des co-polymères avec des substances humiques.

Ces mesures, relativement simples et généralement peu coûteuses, sont utilisées depuis un demi-siècle pour évaluer la "fertilité" des sols.

Les activités les plus couramment mesurées sont les suivantes :

- Oxydo-réductases : il s'agit d'enzymes de type "respiratoire", dont le plus courant est la déshydrogénase. Cette mesure est parfois incluse dans des tests écotoxicologiques pour une estimation rapide de l'activité globale du sol ; toutefois les résultats sont assez variables en fonction des conditions opératoires.

- L'activité catalase a été parfois aussi déterminée sur des échantillons de sol ; la mesure consiste à enregistrer la formation d'oxygène gazeux lors de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). Mais des réactions abiotiques sont fréquentes et peuvent sérieusement biaiser les résultats (activité physico-chimique des oxydes de manganèse).

- Les polyphénol-oxydases interviennent dans les processus d'humification à travers la dégradation de la lignine. Cette famille d'enzymes comprend les lactases.

- Hydrolases : la plupart des enzymes du sol appartiennent à ce groupe et les activités correspondantes correspondent fréquemment à des transformations d'intérêt agronomique. Les cellulases sont en lien avec la dégradation des résidus de récolte, de nature essentiellement ligno-cellulosique.

- Les activités phosphatase (phosphatase acide, phosphatase alcaline, phosphodiesterases) séparent l'ion orthophosphate d'une molécule organique. La synthèse de l'enzyme est inhibée par l'ion orthophosphate ; l'activité est donc dépendante de la concentration en ions PO₄⁻ dans le sol. Un apport d'engrais phosphatés par exemple entraînera une diminution de cette activité, indépendamment de l'abondance et des autres activités des populations microbiennes présentes.

Deux inconvénients majeurs affectent les mesures d'activités enzymatiques :

- D'une part, elles sont souvent pratiquées dans des conditions "standard" (notamment de pH) qui ne sont pas forcément celles régnant *in situ*.
- D'autre part leur spécificité très étroite rend difficile l'interprétation des mesures et leur utilisation pratique ; lorsque plusieurs activités enzymatiques différentes sont utilisées pour comparer deux échantillons de sol

différents, il est souvent difficile de conclure. A cet égard, la méthode consistant à mesurer l'hydrolyse du F.D.A. présente l'avantage de concerner plusieurs groupes d'enzymes différentes, le diacétate de fluorescéine étant en effet hydrolysé par des lipases, des protéases, etc.

Enfin, rappelons qu'historiquement les mesures d'activité enzymatiques se pratiquaient sur des échantillons de sol séchés à l'air. Mais le séchage et les modalités de conservation des échantillons entre prélèvement au champ et mesure au laboratoire peuvent affecter les résultats.

Au total, malgré la grande diversité des déterminations enzymatiques possibles, il s'avère difficile de traduire ces mesures en termes de fertilité.

Populations particulières, d'intérêt agronomique ou utilisables en tant que bio-indicateurs.

Les classiques numérations de germes "totaux" par la méthode du nombre le plus probable (NPP, ou MPN en anglais), à l'aide de

suspensions-dilutions de sol et ensemencement de tubes ou boîtes de Pétri, ne sont plus utilisées. De même, les déterminations de "groupes physiologiques" par les méthodes MPN ont été abandonnées au profit de mesures plus performantes évoquées plus loin.

En revanche, les méthodes MPN sont toujours pratiquées pour évaluer l'abondance de micro-organismes particuliers, comme les fixateurs libres ou symbiotiques de l'azote. Les populations de *Rhizobium* capables de noduler telle ou telle légumineuse peuvent être dénombrées de cette façon. L'efficacité et la diversité de ces populations peuvent être appréciées par d'autres méthodes.

Les mycorhizes, et plus particulièrement les populations de champignons endo-mycorhiziens, peuvent également donner lieu à des déterminations quantitatives et qualitatives. L'abondance est mesurée soit par des méthodes de type MPN (détermination du nombre de propagules infectieuses, à travers le statut mycorhizien d'une plante-test après

dilutions du sol étudié dans du sol stérilisé), soit par le dénombrement de spores caractéristiques. Dans la pratique, la simple observation du statut mycorhizé ou non des racines des plantes mycotrophes (pratiquement toutes les plantes cultivées, à l'exception des crucifères et des chénopodiacées) peut suffire.

L'interprétation des résultats

Les caractéristiques biologiques des sols dépendent de trois facteurs qui sont, par ordre décroissant d'importance : la nature du sol (type pédologique), le système de culture, les pratiques culturales.

Type de sol

Les caractéristiques physico-chimiques influencent fortement les propriétés biologiques des sols. Des relations étroites ont d'ailleurs été mises en évidence entre les caractéristiques physico-chimiques et biologiques, et ceci aussi bien pour la microflore que pour la faune, par exemple les populations de nématodes. Ce

Effets de 20 années de gestion différenciées des résidus de récolte (enfouis ou exportés) dans un sol limoneux des Landes sous monoculture de maïs

(INRA-Bordeaux & INRA-Dijon) :

Traitement	Biomasse microbienne en mg C/kg sol	Biomasse microbienne en % du C total
Tiges enlevées	66	0,64
Tiges restituées	78	0,70

Effets de 20 années de gestion différenciée des résidus de récolte (pailles brûlées/pailles enfouies) dans un sol argilo-calcaire superficiel

(INRA-Chateauroux & INRA-Dijon) :

Traitement	Biomasse microbienne en mg C/kg sol	Biomasse microbienne en % du C total
Pailles brûlées	357	2,66
Pailles enfouies	454	2,87

rappel est important car, quels que soient les paramètres biologiques mesurés, les résultats devront être analysés en tenant compte de cette source de variation. En d'autres termes, des différences liées aux pratiques culturales ne peuvent être mises en évidence de façon simple, sur un dispositif agronomique, que si les autres caractéristiques des parcelles sont rigoureusement identiques.

Plus généralement, la mise en œuvre des mesures biologiques doit s'accompagner de la détermination des principales caractéristiques des échantillons de sol correspondants : analyse granulométrique (dont teneur en argile), pH, C.E.C., teneur en matière organique, etc.

Ceci est indispensable même pour des échantillons de sol *a priori* semblables : les sols ne sont jamais parfaitement homogènes et la variabilité spatiale naturelle de certaines caractéristiques peut se traduire de façon significative sur des paramètres biologiques.

Systèmes de culture

La quasi-totalité des micro-organismes du sol sont hétérotrophes, c'est à dire qu'ils utilisent des matières organiques comme substrats énergétiques. Plus les entrées de carbone organique seront importantes, à l'échelle de la parcelle, plus les populations microbiennes (et leurs activités) seront importantes. Ainsi, il est naturel de trouver une plus grande abondance de microbes sous prairie permanente (où les rhizodépôts apportent toute l'année des substrats énergétiques) que sous des cultures annuelles n'occupant le sol que quelques mois. Ainsi, Loiseau *et al.* (1994) ont montré qu'après 20 années de cultures différentes sur un même sol, la biomasse microbienne variait du simple au double selon la rotation appliquée. Les valeurs les plus élevées sont bien entendu observées sous prairie permanente, mais l'introduction d'une prairie temporaire assure déjà un niveau d'activité biologique bien supérieur à ce qui est observé sous cultures annuelles.

Pratiques culturales

Alors que le type de sol et le système de culture peuvent être considérés comme des données "fixes", les pratiques culturales peuvent être modulées par l'agriculteur. Des déterminations biologiques peuvent éventuellement contribuer au choix de ces pratiques. On peut souhaiter vérifier les effets d'un apport de matières organiques ou d'un itinéraire technique tel que le travail plus ou moins intensif du sol, ou la comparaison de fertilisation minérale/organique par exemple ; on peut enfin s'intéresser aux effets négatifs de produits potentiellement toxiques tels que les pesticides (en période de reconversion) ou le cuivre (encore très utilisé en agriculture biologique).

Dans le cas général, on cherche à s'assurer que les pratiques culturales n'altèrent pas les propriétés des sols (normalement, on cherche plutôt à les améliorer). Le problème peut alors se réduire à trouver et utiliser des indicateurs suffisamment fiables et sensibles pour mettre en évidence des modifications, somme toutes minimales, de propriétés. Le plus utile, au plan agronomique, consiste à évaluer le potentiel de fourniture d'azote en relation avec le "statut organique" du sol. Sous réserve de bien maîtriser les effets du type de sol et du système de culture, il est possible d'envisager d'utiliser des mesures biologiques (comme la détermination de la biomasse microbienne et des métabolites) pour apprécier un potentiel de fourniture d'azote.

Dans le cas particulier des "pollutions", ou lorsque l'on suspecte divers produits toxiques ou "à activité biologique" d'avoir des effets secondaires néfastes sur la biocénose des sols, il faut savoir que les effets biologiques sont le plus souvent très limités. Pour le biologiste le problème se limite alors à constater qu'il n'y a pas d'effet mesurable, compte tenu des performances des méthodes utilisées.

Outre la caractérisation à un instant "t" d'échantillons de sol, les mesures biologiques peuvent être

utiles pour évaluer les effets de divers traitements. Ceci revient soit à comparer des parcelles différentes, soit à suivre dans le temps l'évolution de certains paramètres sur une même parcelle. Dans le premier cas, il s'agit d'une comparaison synchronique : à une date donnée, par exemple, on compare un "témoin" et un "traité". Il est fondamental de s'assurer que les deux parcelles sont rigoureusement comparables et que d'éventuelles différences ne sont dues qu'à l'effet du traitement. Dans le second cas, il s'agit d'une comparaison diachronique. Dans ce cas, il faut être certain que les variations naturelles (saisonniers ou inter-annuelles) ne sont pas la cause des modifications observées. On peut déduire de ces remarques que l'approche la plus fiable est de s'assurer qu'il n'y a aucune différence entre les parcelles avant l'application du traitement, puis à les étudier ensemble après différentes durées. Ceci revient à mettre en œuvre une étude diachronique permettant des comparaisons synchroniques fiables. On voit donc que l'appréciation au champ des effets de pratiques culturales différenciées exige des moyens finalement assez lourds.

Contraintes d'utilisation des mesures biologiques

Comme toutes les déterminations portant sur des échantillons de sol, les mesures biologiques supposent l'obtention d'un échantillon "représentatif". Les contraintes d'échantillonnage sont les mêmes que pour l'analyse de terre classique. En revanche, les déterminations biologiques s'appliquent obligatoirement à des échantillons de sol "frais". Il convient donc de considérer l'échantillon de sol comme un être vivant, avec toutes les contraintes que cela suppose, en matière de transport et de stockage. Après le prélèvement, l'échantillon de sol doit être entouré de soins afin que les mesures biologiques qui seront réalisées au laboratoire soient aussi proches que possible de l'état *in situ*. Pratiquement, les mesures doivent être effectuées dans les 48 à 72 heures

qui suivent le prélèvement, les échantillons de sols devant être conservés au frais (environ 4 °C) et en aérobiose si un délai supplémentaire s'avère nécessaire. Ces contraintes sont du même ordre (et plutôt moins lourdes) que lors de la détermination des reliquats d'azote en sortie d'hiver.

Une question qui mérite attention concerne la profondeur de prélève-

ment. Dans le cas général de la production agricole, il suffit d'échantillonner dans l'horizon de surface (0-20 cm), où l'activité biologique est maximale (elle y représente au moins les 3/4 de l'activité totale du profil). Dans certains cas particulier, il peut être pertinent de regarder en profondeur.

Conclusion

Il existe une grande diversité de mesures biologiques possibles techniquement. Mais en fait assez peu sont utilisables dans la pratique. En effet, pour être véritablement utiles, les déterminations biologiques doivent être pertinentes, fiables, posséder un rapport signal/bruit satisfaisant (suffisamment sensibles mais pas trop), et bien sûr d'un coût modéré. Il faut aussi que les grandeurs mesurées soient interprétables.

Quelques méthodes simples existent, qui peuvent être utilisées en complément des analyses de terre

classiques. L'ensemble formé par la détermination de la biomasse microbienne, des métabolites et des activités globales de minéralisation du carbone et de l'azote représente actuellement le meilleur rapport performances/coût. Cet ensemble de mesures cohérentes entre elles est particulièrement adapté à la caractérisation du "statut organique" du sol et à ses conséquences en termes de fourniture d'azote.

Des recherches se poursuivent pour définir et mettre au point d'autres mesures biologiques capables de compléter les déterminations ci-dessus, ainsi que pour établir des référentiels tenant compte du "type de sol" et des principaux systèmes de culture.

En tout état de cause, il serait illusoire d'attendre monts et merveilles de ces approches. A ce jour, il n'existe pas de test simple, "bord de champ", rapide, pas cher, et expliquant tout ! ■



photo : Gilles LURETTE