

# Effet du séchage d'échantillons d'un sol ferrugineux tropical sur la détermination de la biomasse microbienne

## Comparaison de deux méthodes biocidales de référence

J. Fardoux<sup>(1)</sup>, P. Fernandes<sup>(2)</sup>, A. Niane-Badiane<sup>(3)</sup> et J.-L. Chotte<sup>(1)</sup>

- (1) IRD, Laboratoire de Bio-Pédologie, Dakar, Sénégal  
(2) CIRAD-AMIS, équipe Soltrop, Montpellier, France  
(3) ISRA, Laboratoire de Pédologie, Bambay, Sénégal

Cette étude a bénéficié du soutien financier (1996-1999) de l'Action Incitative Interinstitutionnelle (AII) IRD - CIRAD - CNRS - INRA: " Biofonctionnements des sols tropicaux et gestion durable des terres ".

### RÉSUMÉ

La détermination de la biomasse microbienne (BM) est un outil indispensable à l'étude du fonctionnement microbiologique des sols. Les méthodes couramment utilisées imposent des mesures sur sol frais. Cette contrainte est souvent difficile à surmonter lors d'études de terrain.

Cette étude a pour objectif de préciser les effets d'un séchage préalable de l'échantillon suivi d'une réhumectation avant la mesure de biomasse microbienne par rapport à une mesure faite sur échantillon frais et d'apporter quelques commentaires comparatifs sur deux techniques biocidales d'évaluation de la biomasse microbienne d'un sol.

Les deux méthodes biocidales testées sont la méthode de fumigation extraction (FE) (Amato et Ladd, 1988) et la méthode de fumigation incubation (FI) (Jenkinson et Powlson, 1976), dans lesquelles les microorganismes sont tués sous l'action du chloroforme.

Pour simuler différentes étapes de la conservation des échantillons de sol, ces mesures ont été réalisées sur des échantillons de sol frais, puis séchés à l'air et enfin reconditionnés à l'humidité initiale et incubés 7 jours.

Les échantillons ont été pré-incubés durant 7 jours à différentes humidités : 5 % (H5), 100 % (H100) et 300 % (H300) de la capacité de rétention. Les mesures ont été réalisées sur un sol ferrugineux sableux, enrichi (traitement F) ou non (traitement T) par un apport de fumier de 20 g kg<sup>-1</sup> (équivalent à 30 t MS ha<sup>-1</sup>).

Sur sol frais, la BM du sol amendé en fumier est significativement supérieure à celle du sol seul mais l'effet du fumier est plus marqué quand la BM est mesurée par la FI. Quelque soit la méthode, la BM ne dépend pas du niveau d'humidité initiale à l'exception de H5 où la BM mesurée est quasiment nulle. Après séchage sans réhumectation, la BM est très faible, quelque soit la méthode et l'humidité du sol avant séchage. Si le sol est réhumecté et incubé, les résultats obtenus par les deux méthodes ne permettent pas de retrouver la BM du sol frais. Cependant, la FE permet de conserver les différences qui existaient entre les traitements avec et sans fumier, que l'on soit à H100 ou H300. Ce dernier procédé (séchage-réhumectation-incubation) ne permet donc pas d'estimer la BM réelle d'un sol frais même si la FE en préserve le caractère discriminant.

Le reconditionnement du sol après son séchage à l'air ne permet pas le développement des microorganismes à des seuils équivalents à ceux mesurés dans un sol frais. Il est donc essentiel, dans un objectif de détermination de la BM réelle, in situ, de conserver les sols

à l'état frais. Pour cela, nous recommandons la méthode de conservation testée, sur des sols tempérés, et préconisée par Chaussod et al. (1986). Elle consiste à maintenir les échantillons de sol à leur humidité d'origine et à des températures comprises entre 4 °C et 10 °C.

### Mots clés

Biomasse microbienne, micro-organismes, fumigation-extraction, fumigation-incubation.

### SUMMARY

#### EFFECT OF DRYING ON THE MICROBIAL BIOMASS OF A TROPICAL SANDY SOIL

Microbial mass estimate is an essential part in the study of soils microbiological functioning. Currently used methods imposed measures on wet soils. This constraint is sometimes difficult to fulfil on field experiments.

The aim of this present work is to compare the efficiency of two biocidal methods in measuring microbial biomass on wet soils and after conservation. In the two tested methods, micro organisms are killed by chloroform. In the fumigation-incubation procedure (FE) (Amato and Ladd, 1988), microbial biomass was estimated from amounts of ninhydrin-reactive nitrogen emitted by dead microorganisms. In the fumigation-incubation procedure (FI) (Jenkinson and Powelson, 1976), microorganisms killed by chloroform were mineralised by survival organisms. Microbial biomass is performed from quantities of CO<sub>2</sub> emitted.

To stimulate different stages in the conservation of soil samples, these measures were performed on wet soil samples, air-dried and then reconditioned at their initial water content and incubated for 7 days.

Measures were realised on manure-amended (treatment F) or unamended (treatment S) ferruginous sandy soil. Soil samples were incubated for 7 days with the following water contents: 5% (H5), 100% (H100) and 300% (H300) (figure 1).

The results obtained by the two methods are resumed in table 1 for FE procedure and table 2 for FI procedure.

On wet soil, (i) the microbial biomass measured on soil amended with manure was higher than the one determined on non-amended soil, and (ii) biomass measured by FI procedure in amended soil were higher than those obtained by the FE procedure. Except for H5, microbial biomass does not depend from moisture content. After soil reconditioning, biomass recorded are always lower than measures obtained on wet soils but presented the same difference between treatments with FE procedure, whatever soil moisture is at H100 or H300, contrarily to FI procedure. Reconditioning of soil after air-drying did not enable the development of microorganisms at the same rates measured on wet soil even if FE procedure is still discriminating. So, accurate estimates of soil microbial biomass require the conservation of soil samples at their field water content. Thus we recommend the tested method of conservation temperate soils perfected by Chaussod et Al. (1986). The soil should be carried to the laboratory kept wet and maintained at 4°C to 10°C.

### Key-words

Microbial biomass, microorganisms, fumigation-extraction, fumigation-incubation.

### RESUMEN

#### EFFECTO DE UNA DESECACIÓN DE MUESTRAS DE UN SUELO FERRUGINOSO TROPICAL SOBRE LA DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA MICROBIANA. Comparación de dos métodos biocidales de referencia

La determinación de la biomasa microbiana (BM) es un herramienta indispensable para el estudio del funcionamiento microbiológico de los suelos. Los métodos frecuentemente usados imponen medidas sobre un suelo fresco. Esta limitante es a menudo difícilmente superada durante los estudios de campo.

Este estudio tiene como objetivo precisar los efectos de una desecación previa de la muestra seguido de una rehumectación antes de la medida de la biomasa microbiana en relación a una medida realizada sobre muestra fresca y de llevar algunas sugerencias comparativas sobre dos técnicas biocidales de la biomasa microbiana de un suelo.

Los dos métodos biocidales que se evaluaron son el método de fumigación extracción (FE) (Amato at Ladd, 1988) y el método de fumigación incubación (FI) (Jenkinson y Powelson, 1976) en los cuales los microorganismos son eliminados con acción del cloroformo.

Para simular diferentes etapas de la conservación de las muestras de suelo, estas medidas fueron realizadas sobre muestras de suelo fresco, luego secadas al aire y al final condicionadas a la humedad inicial e incubadas 7 días.

Las muestras fueron pre-incubadas durante 7 días a diferentes humedades: 5% (H5), 100% (H100) y 300% (H300) de la capacidad de retención. Las medidas fueron realizadas sobre un suelo ferruginoso arenoso enriquecido (tratamiento F) o no (tratamiento T) con un aporte de estiércol de 20 g/kg (que equivale a 30t MS/ha).

Sobre suelo fresco, la BM del suelo enriquecido en estiércol es significativamente superior a la del suelo no enriquecido pero el efecto del estiércol es más marcado cuando la BM está medida por la FI. Cualquiera que sea el método, la BM no depende del nivel de humedad inicial excepto H5 donde la BM cuantificada es casi nula. Después del secamiento sin rehumectación, la BM es muy pequeña, cualquiera que sea el método y la humedad del suelo antes el secamiento. Si el suelo está rehumectado e incubado, los resultados obtenidos por los dos métodos no permiten obtener la BM del suelo fresco. Sin embargo, la FE permite conservar las diferencias que existe entre los tratamientos con o sin estiércol, que sea a H100 o H300. Este último método no permite estimar la BM real de un suelo fresco mismo si la FE preserva el carácter discriminante.

El acondicionamiento del suelo después de su secamiento al aire no permite el desarrollo de los microorganismos a niveles equivalentes a los medidos con suelo fresco. Lo esencial, si el objetivo es determinar de la BM real, in situ, es de conservar los suelos en estado fresco. Por eso, recomendamos el método de conservación evaluado, sobre suelos templados, y preconizado por Chaussod et al (1986), que consiste a mantener las muestras de suelo a su humedad inicial y las temperaturas entre 4 y 10°C.

### Palabras claves

Biomasa microbiana, microorganismos, fumigación extracción, fumigación incubación.

Les micro-organismes du sol jouent un rôle essentiel dans les processus de transformation de la matière organique des sols, notamment la minéralisation de l'azote indispensable au développement des plantes. Par conséquent, l'évaluation de cette biomasse microbienne est le point de départ d'un grand nombre de recherches, dont le projet interinstitutionnel INRA-IRD-CIRAD-ENS visant à l'étude du fonctionnement des sols tropicaux.

Les méthodes d'évaluation de la biomasse microbienne sont multiples (Nicolardot et Chaussod, 1982; Martens, 1995). Les plus couramment utilisées font intervenir un agent biocidal, le chloroforme, qui tue les micro-organismes présents dans le sol. Les deux méthodes que nous avons retenues sont la fumigation-extraction (Vance et al., 1987; Amato et Ladd, 1988) et la fumigation-incubation (Jenkinson et Powelson, 1976). Pour la fumigation-extraction (FE), après action du chloroforme, une extraction saline est effectuée sur les échantillons de sol et la biomasse microbienne est estimée à partir de la quantité de carbone ou d'azote solubilisé durant la fumigation. Dans le cas de la fumigation-incubation (FI), après action puis évacuation du chloroforme, les échantillons de sol sont mis en incubation. Les corps microbiens sont minéralisés par action des micro-organismes survivants ou inoculés et la biomasse microbienne est estimée à partir de la quantité de gaz carbonique dégagé.

Pour les études portant sur les aspects biologiques du sol, il est recommandé de travailler sur des échantillons de sol frais. Cependant, lors des campagnes de prélèvements sur le terrain, la conservation des échantillons jusqu'au laboratoire représente une contrainte majeure. En climat tropical, celle-ci

est encore plus difficile à surmonter. Parmi les méthodes de conservation, le maintien des sols frais à une température comprise entre 4 °C et 10 °C durant une courte période (2-3 semaines) est la meilleure (Chaussod et al., 1986).

Cette étude a pour objectif de préciser les effets d'un séchage préalable de l'échantillon suivi d'une réhumectation avant la mesure de biomasse microbienne par rapport à une mesure faite sur échantillon frais en apportant quelques commentaires comparatifs sur les deux principales techniques d'évaluation de la biomasse microbienne d'un sol, et également, de rechercher une relation entre la mesure de biomasse microbienne sur échantillon frais et la même mesure faite sur échantillon séché à l'air puis réhumecté. Dans le cas où une telle relation existerait, nous pourrions alors nous affranchir des problèmes liés à la conservation des échantillons (température et humidité) entre le prélèvement et l'analyse.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Le sol

Nous avons travaillé sur un sol ferrugineux sableux du Sénégal. Il est issu de l'horizon 0-10 cm d'une parcelle expérimentale de l'École Nationale Supérieure d'Agronomie de la ville de Thiès (située à 70 km à l'est de Dakar), localisée au centre du Sénégal, dans le Bassin Arachidier situé entre 13°4 et 15° de latitude nord. Dans le Nord Bassin Arachidier, en zone sub-sahélienne, l'hivernage débute mi-juillet (deuxième décennie) pour s'achever en octobre et totalise 400 à 500 mm

**Tableau 1** - Principales caractéristiques physico-chimiques du sol étudié.**Table 1** - Main physical and chemical characteristics of the studied soil.

Teneur en C g C kg <sup>-1</sup>	Granulométrie (%)					pH	
	0-2 µm	2-20 µm	20-50 µm	50-200 µm	200-2000 µm	KCl	eau
2,4	3,4	0,9	3,1	54,1	38,5	7,45	7,55

**Tableau 2** - Appellations des traitements.**Table 2** - Treatments' designation.

Niveaux d'humectation	Sans apport de fumier	Avec apport de fumier
H5	S 5	F 5
H100	S 100	F 100
H300	S 300	F 300

sur une durée d'environ 90 jours, présentant ainsi une alternance marquée entre une longue saison sèche (9 mois) et une courte saison des pluies (3 mois). Cette parcelle a reçu depuis plus de dix ans une culture maraîchère continue sans recevoir aucune matière fertilisante. Le prélèvement a été réalisé en décembre 1996 (saison sèche) et le sol tamisé à 2 mm après séchage à l'air (tableau 1).

## Les traitements et taux de réhumectation

### Apport ou non de fumier

Afin d'intégrer les principales conditions expérimentales de terrain (cas où un agriculteur peut effectuer un apport de fumier sur le mode de la gestion par taches), nous avons choisi de faire les mesures sur le sol seul (S) et sur le sol amendé (F) dans lequel nous apportons l'équivalent de 30 tMS ha<sup>-1</sup> de fumier de bovins finement broyé soit 20 g kg<sup>-1</sup> (30,1 % C, 1,98 % N). Ceci nous permet de travailler sur deux séries d'échantillons bien différenciés.

### Humidités

Les taux de réhumectation retenus sont :

- H5 : 5 % de la capacité au champ (sol sec à l'air).
- H100 : 100 % de la capacité au champ (50 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> de sol).
- H300 : 300 % de la capacité au champ (150 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> de sol) (tableau 2).

La capacité au champ (CC) du sol utilisé est de 5 %. Elle a été évaluée par la méthode de Feodoroff et Betremieux (1964).

### La pré-incubation

Le prélèvement du sol a été réalisé en saison sèche durant laquelle l'activité microbienne est très réduite. Nous avons procédé à une pré-incubation de 7 J (pour tous les traitements

désignés dans le tableau 2) de manière à mettre le sol dans les conditions définies plus haut et à laisser le temps aux micro-organismes de reprendre leur activité telle qu'elle est en saison humide (de juillet à octobre). Le sol dans lequel nous avons fait ou non un apport de fumier est donc humecté puis mis à l'étuve à 30 °C durant une semaine en conditions d'humidité contrôlées. Les pots sont préparés de telle sorte que l'épaisseur de sol soit proche de 10 cm (horizon de prélèvement). Les orifices d'aération des pots sont obstrués par un disque de papier filtre sans cendres.

### Les mesures de biomasse microbienne (figure 1) : traitements B1, B2 et B3

Au terme de la pré-incubation de 7 J, chaque échantillon de sol est fractionné en trois lots sur lesquels on mesure la BM-C par les deux méthodes choisies :

- directement sur le sol frais (traitement B1),
- sur le sol après séchage à l'air (traitement B2),
- enfin sur le sol séché puis réhumecté à son humidité initiale et incubé à nouveau pendant 7 J (traitement B3).

Ces mesures sont répétées 5 fois.

### Les méthodes de mesures de la biomasse microbienne utilisées

La biomasse microbienne est estimée par les deux méthodes biocidales suivantes :

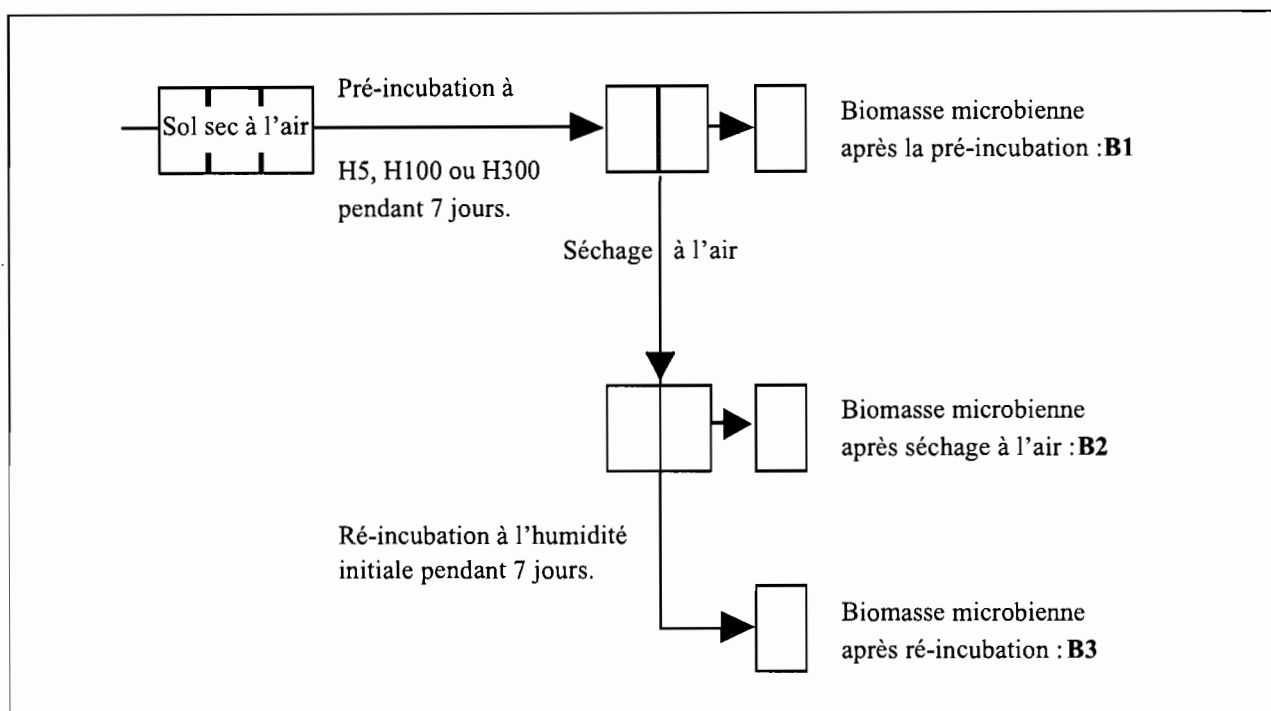
#### La méthode de fumigation-extraction FE (Amato et Ladd, 1988)

Cette méthode repose sur le dosage de l'azote alpha-aminé des parois microbiennes. Cet azote est libéré par protéolyse des corps microbiens tués sous l'action de vapeurs de chloroforme pendant 10 J (échantillons de sol humides de 20 g pour chacun des traitements). La quantité de carbone présent dans la biomasse microbienne est calculée en multipliant le gain d'azote alpha-aminé libéré lors de l'incubation par le facteur 21 (Amato et Ladd, 1988). Les résultats sont exprimés en µg C g<sup>-1</sup> sol (BM-C ou C microbien).

$$BM-C = (N \alpha\text{-aminé sol fumigé} - N \alpha\text{-aminé sol non fumigé}) * 21$$

#### La méthode de fumigation-incubation FI (Jenkinson et Powlson, 1976)

Dans cette méthode, la biomasse microbienne est estimée

**Figure 1** - Schéma des différentes étapes de mesure de la biomasse microbienne.**Figure 1** - Diagram of the different steps of microbial biomass measures.

à partir de la quantité de  $\text{CO}_2$  minéralisé lors d'une incubation de 20 jours conduite après exposition du sol à des vapeurs de chloroforme pendant 16 heures (échantillons de sol humides de 50 g pour chacun des traitements). La biomasse est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{BM-C} = [F(0-10) - F(10-20)] / Kc$$

avec :

F(0-10) : flush de minéralisation entre 0 et 10 jours,

F(10-20) : flush de minéralisation entre 10 et 20 jours,

Kc : facteur de proportionnalité entre le flush et la biomasse, égal à 0,41 (Nicolardot et al, 1984).

### L'analyse statistique

Les comparaisons des résultats ont été réalisées avec le test de Fisher (PLSD  $p < 5\%$ ).

## RÉSULTATS (tableaux 2 et 3)

### Effet du niveau d'humectation sur sol frais

Nous remarquons tout d'abord que pour les traitements S5 et F5, le niveau de BM-C reste faible en comparaison à la BM-C sur sol frais humide (H100 et H300). Le traitement avec ou

sans apport de fumier sur les échantillons secs n'a pas d'influence sur la mesure de la biomasse par la méthode FE excepté pour le traitement F5 séché pour lequel le niveau de biomasse est multiplié par 2 par rapport au traitement S5 séché et pour le traitement F5 séché réhumecté, 4 fois inférieur au S5. Par ailleurs, les BM-C mesurées sur échantillons secs par la méthode FI sur l'ensemble des résultats de S5 ou F5 (tous procédés confondus : frais, séchés secs ou séchés réhumectés) sont pratiquement nulles (comprises entre 0 et  $40 \text{ mg C kg}^{-1}$  sol) et ne présentent pas de différences significatives, ce qui ne permet ni d'estimer la BM-C d'un sol, ni de distinguer de différences entre les traitements. En effet, la FI repose sur le principe d'une consommation des cadavres des micro-organismes tués par la fumigation par la très faible fraction de micro-organismes survivants. Semblable activité biologique ne peut se dérouler normalement en milieu sec. Ces résultats rejoignent ceux obtenus avec la méthode FE (valeurs comprises entre 6 et  $71 \text{ mg C kg}^{-1}$  sol pour S5 et F5 tous procédés confondus) mais dans le cas présent les niveaux de biomasse détectée sont encore plus faibles.

Pour chaque méthode, il est intéressant de noter que la BM-C sur un sol frais humide (H100 ou H300) n'est pas sensible au niveau d'humectation, que le sol ait fait ou non l'objet d'un fort amendement organique. Par contre, l'apport de fumier sur sol frais humide accroît très significativement la BM-C par

**Tableau 3** - Biomasses microbiennes (en mg C kg<sup>-1</sup> sol) mesurées sur des échantillons de sol soumis à trois modes de conservation du sol (moyenne et écart de la moyenne ETM) obtenues par la méthode de Fumigation-Extraction.

**Table 3** - Microbial biomass (in mg C kg<sup>-1</sup> soil) measured on soil samples submitted to three methods of conservation of soil (mean and ETM) obtained by the Fumigation-Extraction method.

FE B3	Sol frais B1		Sol séché sec B2		Sol séché réhumecté	
	Sols	BM-C mg C kg <sup>-1</sup> sol	ETM	BM-C mg C kg <sup>-1</sup> sol	ETM	BM-C mg C kg <sup>-1</sup> sol
S5	59	13	27	11	51	10
F5	71	8	53	12	13	6
S1	127	14	46	3	48	16
F1	329	44	39	7	130	53
S3	130	14	69	10	108	25

**Tableau 4** - Biomasses microbiennes (en mg C kg<sup>-1</sup> sol) mesurées sur des échantillons de sol soumis à trois modes de conservation du sol (moyenne et écart de la moyenne ETM) obtenues par la méthode de Fumigation-Incubation.

**Table 4** - Microbial biomass (in mg C kg<sup>-1</sup> soil) measured on soil samples submitted to three methods of conservation of soil (mean and ETM) obtained by the Fumigation-Incubation method.

FI	Sol frais B1		Sol séché sec B2		Sol séché réhumecté B3	
	Sols	BM-C mg C kg <sup>-1</sup> sol	ETM	BM-C mg C kg <sup>-1</sup> sol	ETM	BM-C mg C kg <sup>-1</sup> sol
S5	1	1	20	18	24	20
F5	0	0	20	27	40	12
S1	140	51	0	0	82	35
F1	404	20	8	13	377	75
S3	109	79	9	13	389	34
F3	393	64	0	0	408	42

des facteurs de 2,6 pour H100 (respectivement 127 et 329 mg C kg<sup>-1</sup> sol pour S100 et F100) et 2,2 pour H300 (respectivement 130 et 292 mg C kg<sup>-1</sup> sol pour S300 et F300) dans le cas d'une mesure de BM-C par FE et respectivement de 2,9 et 3,6 pour H100 et H300 dans le cas d'une mesure par FI (respectivement 140 et 404 mg C kg<sup>-1</sup> sol pour S100 et F100; 109 et 393 mg C kg<sup>-1</sup> sol pour S300 et F300). Cette augmentation est probablement due à une consommation, au cours de la pré-incubation de 7 jours, de la matière organique facilement minéralisable apportée par le fumier induisant une prolifération microbienne.

Par ailleurs, nous remarquons que les niveaux de BM-C mesurés sur le sol frais humide non amendé (en moyenne 128.5 et 124.5 mgC kg<sup>-1</sup> sol respectivement pour FE et FI à H100 et H300) sont du même ordre de grandeur que ceux relevés dans cette même région par Badiane et al. (1999) et

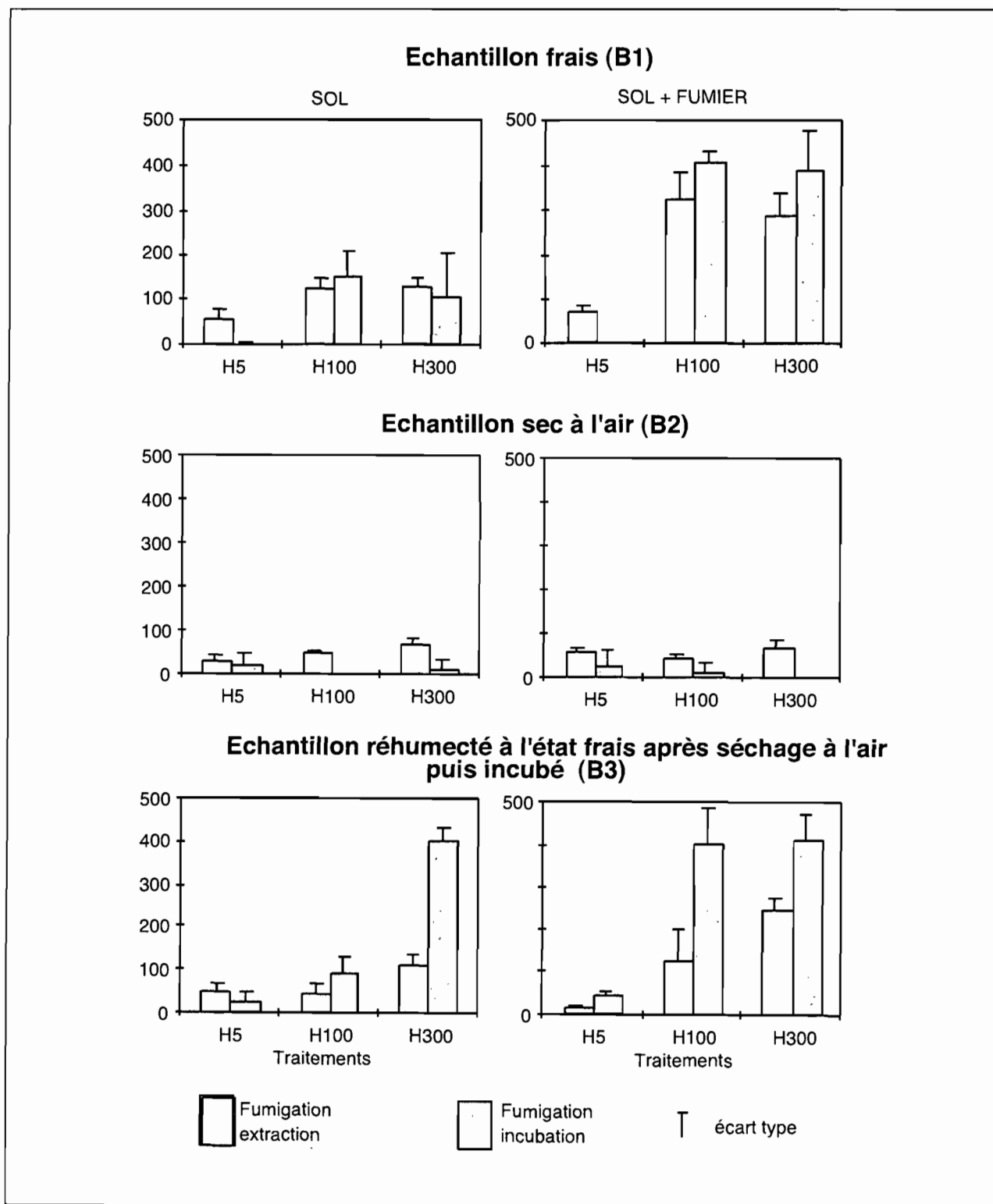
que le rapport C microbien sur C du sol (respectivement 5.35 et 5.19 % pour FE et FI) se situe bien dans l'intervalle défini par ces mêmes auteurs pour ces sols soit entre 4 et 10 %.

### Effet des procédés de conservation des échantillons de sol

Quelle que soit la méthode envisagée (FE ou FI), on constate que le procédé B2 (sol séché sec) conduit à des BM-C nettement inférieures à celles obtenues sur sol frais humide (procédé B1) et correspondent aux niveaux de BM-C atteints sur sol sec (H5), soit une quasi-absence de biomasse, d'avantage marquée pour la FI. Il en va de même pour H5 dans le cas des sols réhumectés (procédé B3). Il apparaît donc qu'une détermination de la biomasse microbienne sur un sol séché sec ne peut se substituer au même dosage sur sol frais. C'est la raison pour laquelle, dans la suite de nos observations, nous

**Figure 2** - Effet de la conservation du sol sur la biomasse microbienne totale estimée par Fumigation-Extraction et Fumigation-Incubation. Cas d'un sol enrichi ou non par du fumier et incubés à 5 % (H5), 100 % (H100) et 300 % (H300) de la capacité de rétention.

**Figure 2** - Effect of soil conservation on total microbial biomass estimated by Fumigation-Extraction and Fumigation-Incubation methods. Case of soil amended or not by manure and incubated at 5 % (H5), 100 % (H100) et 300 % (H300) of soil retention capacity.



ne tiendrons pas compte du traitement sol séché sec (procédé B2). Il en sera de même pour le niveau d'humidité H5.

Sur sol séché réhumecté (procédé B3), la BM-C mesurée par FE est inférieure à celle mesurée sur sol frais. Cependant, l'augmentation de biomasse induite par l'apport de fumier est pratiquement inchangée (respectivement 2,7 à H100 et 2,3 à H300). De plus, la BM-C obtenue sur sol réhumecté à H100 et H300 représente une part constante de la BM-C mesurée sur sol frais. A H100, la biomasse retrouvée correspond à 37,8 % de la BM-C du sol frais pour S100 et 39,5 % pour F100 soit un taux de recouvrement moyen de 38,65 %. A H300, cette sous-estimation de la BM-C due au procédé séchage-réhumectation est nettement plus faible puisque l'on retrouve 83 % et 84,9 % de la BM-C respectivement pour S300 et F300, soit un taux de recouvrement moyen de 83,95 %. Il est donc intéressant de constater que même si ce procédé de séchage-réhumectation à H300 ne permet de retrouver que 83,95 % de la BM-C initiale sur ce type de sol, la détermination de la BM-C par la méthode de fumigation-extraction permet de différencier les traitements (avec ou sans fumier).

Dans le cas de la méthode FI, le séchage du sol frais suivi d'une ré-incubation au niveau d'humidité initial (B3) n'affecte pas la quantification de la BM-C dans le cas des sols enrichis en matière organique (F100 et F300). Cependant, ce traitement conduit à des résultats significativement différents dans le cas des sols non fertilisés (S100 et S300). En effet, dans ces derniers, l'évolution n'est pas la même selon que l'on se situe à H100 ou H300 (respectivement -41,5 % et +257 %).

### Comparaison des deux méthodes de détermination de la BM-C

#### Sur sol frais (B1) (figure 2)

Pour les traitements H100 et H300 sans apport de fumier, les valeurs de biomasse trouvées sont équivalentes pour la FE (respectivement 127 et 130  $\mu\text{g C. g}^{-1}$  de sol) et la FI (140 et 109  $\mu\text{g C. g}^{-1}$  de sol). Ce phénomène n'est pas vérifié pour le traitement H5 puisque la FE détecte 59  $\mu\text{g C g}^{-1}$  de sol alors que la FI ne trouve que 1  $\mu\text{g C. g}^{-1}$  de sol.

Dans le cas d'un apport de fumier, la FE permet de détecter 71  $\mu\text{g C g}^{-1}$  de sol sur sol sec (H5) alors que la seconde méthode ne détecte rien. Ce résultat rapproché de celui obtenu sur sol sans apport de fumier montre que la FI n'est pas adaptée à la mesure de la BM-C sur sol sec ou séché à l'air. Pour des sols incubés à des humidités plus élevées, les résultats obtenus par la FE sont significativement inférieurs à ceux de la FI (-18,5 et -25,7 % pour F100 et F300 respectivement).

#### Sur sol séché réhumecté (B3)

Si, dans le cas des sols sans apport de fumier, les sols sont réhumectés à H100 et H300, on constate que les résultats obtenus sont différents selon la méthode employée. En effet, si

la FE conduit systématiquement à une sous-estimation de la BM-C mesurée sur sol frais (baisse significative de -62,2 % à H100 et -17 % à H300), d'où la perte de la donnée «biomasse microbienne réelle in situ», on constate toutefois qu'elle permet de conserver l'information «impact d'un traitement sur la biomasse microbienne» puisque les proportions sol seul/sol+fumier ne sont pas modifiées par ce procédé. A l'inverse, la FI conduit à des résultats qui ne peuvent être reliés avec la BM-C obtenue sur sol frais puisqu'ils sont tantôt très supérieurs (H300) tantôt nettement inférieurs (H100) à la BM-C mesurée en B1.

Dans le cas des sols bénéficiant d'un apport de fumier et réhumectés à H100 et H300, les BM-C obtenues par la FE évoluent de la même manière que celles mesurées sur sol seul c'est-à-dire que bien que significativement différentes de la BM-C obtenue sur sol frais, à une humidité donnée, la sous-estimation est la même que pour le sol seul, ce qui permet tout de même de mettre en évidence des traitements différents. Dans le cas de la FI, on constate que dans ce sol fortement enrichi en matière organique minéralisable, la BM-C mesurée n'est pas différente de celle déterminée sur sol frais.

## CONCLUSION

Pour les sols frais, la comparaison des deux principales méthodes de mesure de la biomasse microbienne indique que, à l'exception du sol non amendé incubé à 100 % et 300 % de la capacité de rétention, les résultats obtenus par ces deux méthodes sont significativement différents. Dans le cas des sols (amendé ou pas) incubés à 5 % de la capacité de rétention, la méthode de fumigation-extraction est plus sensible que celle de fumigation-incubation qui dans nos conditions expérimentales ne nous a pas permis de détecter les micro-organismes présents. Cette méthode n'est pas adaptée à des sols secs car l'absence d'eau est défavorable à l'action minéralisatrice des micro-organismes survivants dont le rôle est de consommer les cadavres microbiens. Pour les sols enrichis par un apport récent de fumier, la BM-C estimée à partir du  $\text{CO}_2$  minéralisé pour les traitements H100 et H300 est significativement supérieure à celle enregistrée par la méthode de fumigation-extraction. La validité de cette méthode appliquée à des sols récemment enrichis par un apport de carbone exogène a souvent été remise en question (Jenkinson et Powlson, 1976; Martens, 1985), certains auteurs préférant la méthode de fumigation-extraction (Ocio et Brookes, 1990). La présence de carbone facilement minéralisable dans le fumier pourrait en partie expliquer les résultats que nous avons obtenus.

La méthode de conservation testée, composée d'une étape de séchage à l'air suivie d'un reconditionnement du sol à son état d'humidité initial puis d'une incubation, n'est pas adaptée à l'étude de la BM-C. En effet, quelle que soit la méthode uti-



lisée, estimation à partir de l'azote alpha-aminé (méthode de fumigation-extraction) ou à partir du CO<sub>2</sub> minéralisé (fumigation-incubation), les différences entre les mesures avant et après conservation varient à la fois selon l'humidité initiale du sol et la présence ou non de matière organique fraîche.

Toutefois, il semble que ce procédé, associé à la méthode de fumigation-extraction et testé sur un large éventail de sols à différentes humidités, serait susceptible, au vu des premiers résultats obtenus dans cette étude, de conduire à l'établissement d'une relation stable avec la BM-C sur sol frais. Cependant, notre étude ne permet pas de confirmer l'existence de cette relation pour d'autres types de sols.

Nous recommandons donc, pour le transport des échantillons de sol entre les sites expérimentaux et le laboratoire, la méthode de conservation testée sur des sols tempérés et préconisée par Chaussod et al. (1986). Elle consiste à maintenir les échantillons de sol à leur humidité d'origine et surtout à des températures comprises entre 4 °C et 10 °C, durant une période n'excédant pas 2 à 3 semaines. Dans ces conditions, la biomasse microbienne mesurée n'est pas significativement différente de celle du sol frais.

## BIBLIOGRAPHIE

- Amato M. et Ladd J. N., 1988 - Essay for microbial biomass based on ninhydrin - reactive nitrogen in extracts of fumigated soils. *Soil Biol. and Biochem.* 20, pp. 107-114.
- Badiane A., Ganry F. et Jacquin F., 1999 - Les variations au champ de la biomasse microbienne d'un sol cultivé: conséquences sur la réserve organique mobilisable (cas d'un sol ferrugineux tropical au Sénégal). *Comptes-Rendus de l'Académie d'Agriculture de France (328)*: 45-50.
- Chaussod R., Nicolardot B. et Catroux G., 1986 - Mesure en routine de la biomasse microbienne des sols par la méthode de fumigation au chloroforme. *Science du Sol*, 2, pp. 201-211.
- Feodoroff A. et Betremieux R., 1964 - Une méthode de laboratoire pour la détermination de la capacité au champ. C.R. du VII<sup>ème</sup> Congrès International de Science du Sol, Bucarest, II, pp. 387-396.
- Jenkinson D.S. et Powlson D.S., 1976 - The effects of biocidal treatment on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 8, pp. 209-213.
- Martens R., 1995 - Current methods for measuring microbial biomass C in soil: potentials and limitations. *Biol. Fertil. Soils*, 19, pp. 87-99.
- Nicolardot B. et Chaussod R., 1982 - Revue des principales méthodes disponibles pour mesurer la biomasse microbienne et ses activités. *Science du sol, Bulletin de l'AFES*, 4, pp. 253-262.
- Nicolardot B., Chaussod R. et Catroux G., 1984 - Décomposition des corps microbiens dans les sols fumigés au chloroforme: effets du type de sol et des microorganismes. *Soil Biol. Biochem.*, 5, pp. 453-458.
- Ocio J.A. et Brookes P.C., 1990 - An evaluation of methods for measuring the microbial biomass in soils following recent additions of wheat straw and the characterization of the biomass that develops. *Soil Biol. Biochem.*, (22) 5, pp. 685-694.
- Vance E.D., Brookes P.C. et Jenkinson D.S., 1987 - An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.*, 6, pp. 703-707.

## Comparaison de deux méthodes pour l'évaluation de la biomasse microbienne totale d'un sol

### Effet du mode de conservation des échantillons

La détermination de la **biomasse microbienne (BM)** des sols est un outil indispensable dans la connaissance du fonctionnement biologique des sols et leur évolution. Cependant, les différentes méthodes couramment utilisées imposent un travail sur sol frais, contrairement supportable en milieu tropical.

Cette étude a pour double objectif d'apporter quelques commentaires comparatifs sur les deux principales techniques d'évaluation de BM faisant intervenir le même **agent biocidal**: le chloroforme, et également de préciser les effets d'un séchage préalable de l'échantillon suivi d'une réhumectation avant la mesure de biomasse microbienne par rapport à une mesure faite sur échantillon frais, la finalité étant de trouver une relation entre la mesure de biomasse microbienne sur échantillon frais et la même mesure faite sur échantillon séché à l'air puis réhumecté. Dans le cas où une telle relation existerait, nous pourrions alors nous affranchir des problèmes liés à la conservation des échantillons (température et humidité) entre le prélèvement et l'analyse.

#### La méthode Fumigation - Extraction : FE (selon Amato et Ladd, 1988)

Les micro-organismes sont tués par des vapeurs de chloroforme. L'azote alpha-aminé des parois microbiennes est libéré par protéolyse durant 10 jours d'incubation, il est extrait par une solution de KCl 2 m puis dosé.

**La BM est donc évaluée à partir de l'azote alpha-aminé libéré.**

#### La méthode Fumigation - Incubation : FI (selon Jenkinson et Powlson, 1976)

Les micro-organismes sont tués par des vapeurs de chloroforme. Après élimination de ce dernier, les échantillons sont incubés durant 20 jours. Les cellules mortes sont minéralisées sous l'action des micro-organismes survivants, provoquant un dégagement de CO<sub>2</sub> qui est piégé dans une solution de soude 0,1 m puis dosé.

**La BM est donc évaluée à partir du CO<sub>2</sub> dégagé**

Les mesures ont été réalisées sur un sol ferrugineux sableux, enrichi (traitement F) ou non (traitement T) par un apport de fumier de 20 g MS kg<sup>-1</sup>. Nous avons fixé trois niveaux initiaux d'humectation: H5, H100 et H300, correspondant respectivement à 5, 100 et 300 % de la capacité de rétention du sol testé.

- Les échantillons ont subi une **pré - incubation** d'une semaine à 30 °C, à l'issue de laquelle la première série de mesure de BM a eu lieu. La comparaison des résultats montre que pour H5, la méthode FE est plus sensible que la méthode FI. Les biomasses mesurées par FI dans les sols amendés (pour H100 et H 300) sont supérieures à celles obtenues par FE.

- Les échantillons ont ensuite été **séchés à l'air** puis nous avons procédé à la deuxième série de mesures de BM. Les teneurs en BM, estimées par les deux méthodes (FE et FI), chutent quels que soient les traitements. Dans nos conditions expérimentales, la méthode FI est peu sensible. Les biomasses mesurées sont inférieures à celles dosées par FE.

- Les échantillons ont enfin été **réhumectés à leurs taux initiaux** et incubés de nouveau une semaine avant de passer à la troisième série de mesure de BM. Pour H100 et H300, amendés ou non (T ou F), les résultats de la méthode FI sont supérieurs à ceux de FE.

Quelle que soit la méthode utilisée pour évaluer la biomasse microbienne, les différences entre les mesures avant et après conservation varient à la fois selon l'humidité initiale du sol et la présence ou non de matière organique fraîche. La méthode de conservation testée ne permet pas de retrouver des niveaux de biomasse microbienne équivalents à ceux du sol frais. Les échantillons doivent donc être transportés au laboratoire à l'état frais. Pour cela, nous recommandons la méthode de conservation testée sur des sols tempérés et préconisée par Chaussod et al. (1986). Elle consiste à maintenir les échantillons de sol à leur humidité d'origine et surtout à des températures comprises entre 4 °C et 10 °C, durant une période n'excédant pas 2 à 3 semaines.