

Effet du mode de dispersion du sol sur la localisation de sa biomasse microbienne Cas d'un vertisol

Jean-Luc CHOTTE (1), Lucille JOCTEUR MONROZIER (2), Geneviève VILLEMIN (3) et François TOUTAIN (3)

1) Centre Orstom, BP 8006, 97259 Fort-de-France cedex, Martinique.

(2) URA CNRS 1450 « Écologie Microbienne des Sols », Université de Lyon-I, 69622 Villeurbanne cedex.

(3) UPR 6831 du CNRS associée à l'Université de Nancy-I, BP 5 54501 Vandœuvre-lès-Nancy cedex.

RÉSUMÉ

Dans le cadre d'un programme de recherche portant sur la dynamique de la matière organique dans les systèmes prairiaux tropicaux, une étude comparative est conduite afin de tester l'efficacité de deux méthodes de fractionnement physique du sol à énergie de dispersion distincte (méthode A < méthode B), dans l'étude et la caractérisation (C, N, biomasse microbienne, ¹⁵N immobilisé, morphologie) des habitats microbiens d'un sol à argile 2:1.

Par la méthode A, près de 30 % de la masse totale des micro-organismes et 20 % de la totalité de l'azote ¹⁵N immobilisé dans le sol sont localisés dans la fraction macroagrégée 250-2 000 µm. Ces agrégats sont constitués d'une matrice argileuse enrobant des débris organiques figurés et des particules sableuses. La majeure partie de l'azote ¹⁵N apporté (40 % de la quantité totale immobilisée) est immobilisée dans la fraction microagrégée 2-20 µm. Celle-ci contient 20 % de la masse totale des micro-organismes du sol. La fraction 0-2 µm isolée par la méthode A contient 40 % des organismes du sol et 10 % de la quantité totale d'azote ¹⁵N immobilisé.

La méthode B provoque l'éclatement des agrégats 250-2 000 µm, la disparition des micro-organismes et la diminution des quantités d'azote ¹⁵N immobilisé dans les fractions 250-2 000 µm et 2-20 µm. Cependant, les produits entraînés de ces fractions ne s'accumulent pas directement dans la fraction 0-2 µm. La nature des transferts et l'origine des composés organiques accumulés dans la fraction 0-2 µm, sous l'effet de la méthode B, sont envisagées à partir de deux hypothèses concernant l'homogénéité du marquage isotopique des produits organiques.

Cette étude conduite sur un sol à argile 2:1 montre que seule la méthode possédant l'énergie de dispersion la plus faible (méthode A), permet la prise en considération des habitats microbiens inclus dans les structures 250-2 000 µm et ceux de la fraction 2-20 µm.

MOTS CLÉS : Fractionnement physique – Immobilisation – Habitat microbien – MET – ¹⁵N – Vertisol.

ABSTRACT

EFFECT OF THE SOIL DISPERSION ON THE LOCATION OF THE MICROBIAL BIOMASS. EXAMPLE OF A VERTISOL

As a part of a research program about soil organic matter turnover, the microorganism habitats of a vertisol were studied. Aiming to set up a method to achieve microbial habitat fractionation, on the characteristics (C, N, microbial biomass, ¹⁵N immobilized, micromorphology) of the resulting fractions, we compared the effect of the soil disruption energy (method A < method B).

By method A, the size fraction 250-2 000 µm contained about 30% of the total soil biomass and 20% of ¹⁵N immobilized in the soil. This macroaggregated fraction was composed of organic residues and sand coated with a clay matrix colonized by numerous microorganisms. Most of the ¹⁵N was immobilized in the fraction 2-20 µm (40% of the ¹⁵N immobilized in the unfractionated soil), about 20% of the total soil biomass was located in this fraction. Microorganisms associated to clays dispersed by method A amounted to 40% of the

total biomass when ^{15}N immobilized in this fraction represented only 10% of the ^{15}N immobilized in the unfractionated soil.

Method B disrupted the macroaggregates 250-2 000 μm . Microorganisms and ^{15}N previously immobilized in 250-2 000 μm and 2-20 μm fractions were transferred to finest fractions. Increased disruptive energy induced the increase of the quantity of microorganisms and ^{15}N immobilized in the dispersed clay fraction. The origin of the components accumulated in this fraction was discussed.

As a conclusion, characterization of the microbial habitats of heavy smectitic clayey soil should save the fragile macroaggregated fraction 250-2 000 μm which was obtained by the low energy of dispersion used in method A.

KEY WORDS : Microbial habitats – ^{15}N immobilization – Physical fractionation – TEM – Vertisol.

INTRODUCTION

Le sol représente pour les organismes qui y vivent un milieu très complexe car très hétérogène. Il est constitué d'une phase solide dominante, formée de particules de tailles et de natures variables, d'une phase aqueuse et d'une phase gazeuse. La taille, la forme et l'arrangement de ces particules (simples ou complexes) et des vides associés définissent la structure du sol (BREWER, 1964). Ces particules existent isolées (particules simples) ou sous forme d'agrégats (particules complexes) et sont entourées d'une phase aqueuse qui est, à l'exception des milieux saturés, discontinue. Les micro-organismes qui survivent principalement grâce à ce film aqueux et aux substances dissoutes ou particulières ne se répartissent donc pas au hasard dans le sol.

Pour ELLIOTT et COLEMAN (1988), la distribution des organismes est essentiellement régie par la structure du sol. Ils proposent en effet un modèle dans lequel les organismes vivants sont répartis selon leur taille dans des pores de différents diamètres. HATTORI (1988) montre que les protozoaires (>97 %) et les champignons (90 %) sont préférentiellement localisés à la surface des agrégats, alors que les bactéries (90 %) sont situées à l'intérieur. GUPTA et GERMIDA (1988) indiquent que la biomasse fongique, l'activité respiratoire et les quantités d'enzymes contenus dans les microagrégats (<250 μm) sont inférieures à celles des macrostructures (>250 μm). SEIFERT (1964) indique que la nitrification est plus rapide dans des agrégats de petites tailles. ELLIOTT (1986) obtient des taux de minéralisation (C et N) plus élevés pour des agrégats de taille >300 μm que pour des agrégats compris entre 53 μm et 300 μm . ADU et OADES (1978) montrent qu'un substrat carboné apporté à un sol sablo-limoneux (argile = 18 %) est dégradé en premier par l'activité fongique, secondée ensuite par l'activité bactérienne, alors que dans le cas d'un sol argileux

(argile = 60 %) ce substrat est simultanément décomposé sous l'action des champignons et des bactéries. Ce résultat peut s'expliquer par la porosité distincte de ces deux sols, mais aussi par leur abondance différente en champignons et en bactéries. Il existe en effet une corrélation négative entre la teneur en argile et la biomasse fongique, alors que cette corrélation est positive avec la biomasse bactérienne (KACZMAREK et PEDZIWIŁK, 1988). Ces travaux montrent que le sol apparaît donc comme une mosaïque de sites hétérogènes abritant des populations différentes de micro-organismes et dont le métabolisme reflète les conditions physico-chimiques qui règnent au sein de leur habitat respectif. Ces habitats microbiens, constitués par l'association d'organismes vivants à différents stades de croissance et de particules à divers degrés d'altération, sont le lieu de « résidence » et d'activité des micro-organismes du sol. L'étude du fonctionnement microbiologique du sol et la caractérisation de ces habitats doivent donc combiner :

- des techniques de mesures de l'ensemble de la masse des organismes (bactéries, champignons, nématodes...);
- des techniques de détection des produits de leur activité (CO_2 dégagé, N immobilisé, polysaccharides excrétés...);
- des techniques de caractérisation des différents habitats microbiens, en particulier des techniques micromorphologiques.

Ces techniques doivent fournir, de plus, des résultats dont les interprétations peuvent être étendues à toutes les échelles, spatiales et temporelles, d'organisation du sol.

Les travaux les plus nombreux ont porté sur la caractérisation de la structure du sol et une étude critique de l'ensemble des méthodes utilisées dépasserait le cadre de cet article. Les principales méthodes reposent soit sur des mesures de porosité (DANIELSON et SUTHERLAND, 1986; GREVERS et

JONG, 1990 ; WU *et al.*, 1990), soit sur la quantification de différentes classes d'agrégats stables à l'eau ou dans divers liquides (HENIN *et al.*, 1969 ; BRUCKERT, 1979 ; KEMPER ET ROSENAU, 1986 ; ALBRECHT *et al.*, 1992). En ce qui concerne ces méthodes, les modalités de préparation des échantillons (séchage, mode d'humectation...) modifient profondément les caractéristiques des fractions isolées (ELLIOTT, 1986 ; OADES ET WATERS, 1991).

Les études concernant la distribution des micro-organismes dans le sol ont utilisé en grande majorité les méthodes citées plus haut. Les sites microbiologiques du sol ont été caractérisés soit à partir d'observations de lames minces de sols (KILBERTUS, 1980 ; FOSTER, 1986 ; TIPPKOTTER, 1990 ; POSTMA ET ALTEMULLER, 1990), soit à partir de techniques de fractionnement par centrifugation (HOPKINS *et al.*, 1991) ou par tamisage (AHMED ET OADES, 1984 ; KANAZAWA ET FILIP, 1986 ; GUPTA ET GERMIDA, 1988 ; JOCTEUR MONROZIER *et al.*, 1991).

L'étude présentée ici concerne la localisation des micro-organismes et leur activité. Pour ce faire nous avons mis en œuvre la chronoséquence analytique suivante :

1 - incubation pendant trois jours d'un échantillon de sol en présence de glucose et d'urée (^{15}N) afin de favoriser l'immobilisation microbienne ;

2 - séparation d'agrégats (<250 μm) et de macroagrégats (250-2 000 μm) de stabilités différentes, obtenus par une méthode « douce » (méthode A) ou « agressive » (méthode B) ;

3 - observations optiques et ultramicroscopiques (MET) des agrégats des différentes classes granulométriques obtenues, avec un accent particulier concernant la localisation des bactéries ;

4 - caractérisations chimiques (C, N) et isotopique (^{15}N) des différentes fractions granulométriques obtenues ;

5 - quantification par une méthode biocidale de la biomasse microbienne associée à chaque classe granulométrique et relations avec les quantités de ^{15}N immobilisé.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le sol

Le sol étudié est un vertisol (0-2 μm % = 47) (tabl. I) du sud-est de la Martinique (Sainte-Anne). La végétation est une prairie à pangola (*Digitaria decumbens*) depuis 10 ans. L'horizon 0-10 cm est prélevé à la bêche.

Incubation

Le sol est tamisé manuellement à 2 mm, après séchage à l'air, afin d'éliminer les débris végétaux grossiers. L'équivalent de 80 g de sol sec à 105 °C est placé dans 6 pots en PVC. L'incubation se fait en présence d'une solution contenant de l'urée (160 mg N/urée. kg⁻¹ sol) enrichie en ^{15}N (E % = 47) et du glucose (2,5 mg C.g⁻¹ sol) et se déroule à 28 °C \pm 1 °C durant trois jours. Le volume de la solution fertilisante est calculé afin d'ajuster l'humidité du sol à 100 % de la capacité au champ. Nous avons choisi d'apporter l'azote 15 sous forme d'urée en solution, car son hydrolyse très rapide (quelques heures) (NKRUMAH *et al.*, 1989) entraîne la libération immédiate d'ammonium qui représente la forme azotée préférentiellement utilisée par les micro-organismes (DOMMERMUES ET MANGENOT, 1970). Un apport conjoint de glucose, substrat carboné très facilement assimilable par les micro-organismes, est effectué permettant ainsi l'immobilisation rapide de l'azote de l'urée (LADD ET AMATO, 1977 ; NICOLARDOT, 1988). Une étude préalable a effectivement montré que, pour ce sol, l'immobilisation de l'azote de l'urée est maximale trois jours après son apport (résultats non publiés).

Fractionnement physique

Deux méthodes de fractionnement physique sont appliquées en fin d'incubation sur un échantillon moyen de sol obtenu par le mélange de trois pots. Les méthodes utilisées comportent une phase initiale de dispersion de l'échantillon et une phase de fractionnement granulométrique en milieu aqueux (fig. 1). Cette dernière étape, commune aux deux

TABLEAU I
Quelques caractéristiques analytiques de l'horizon 0-10 cm
Some analytical characteristics of the soil (0-10 cm layer)

Matière Organique		pH		Propriétés d'échange (mmol (+) / kg)							Analyse mécanique (en g / 100 g de sol total après destruction de la matière organique)					
C	N	C/N	H ₂ O	KCl	C.E.C.	Ca	Mg	K	Na	S	100 S/CEC	250-2000 μm	50-250 μm	20-50 μm	2-20 μm	0-2 μm
mg/g sol																
33,00	2,80	11,8	5,5	4,8	400	208	110	5	37	360	91	4	25	7	17	47

méthodes, permet d'obtenir les fractions 250-2 000 μm et 50-250 μm par tamisage dans l'eau, la fraction 20-50 μm par sédimentation et les fractions 2-20 μm et 0-2 μm par centrifugation en continu (rotor JCFZ sur centrifugeuse Beckman J21B). La fraction 0-2 μm est floculée par du CaCl_2 0,5 M et le surnageant (fraction soluble) n'est pas dosé. En revanche, l'étape de dispersion diffère selon la méthode :

- méthode A (faible énergie) : agitation (50 trs.mn⁻¹) durant 2 heures d'une suspension de sol (80 g sol dans 250 ml d'H₂O) après 16 heures de contact ;

- méthode B (forte énergie) : agitation (50 trs.mn⁻¹) en présence de 5 billes d'agate (diamètre = 1cm) durant 16 heures d'une suspension de sol (80 g sol dans 250 ml d'H₂O) (BRUCKERT, 1979). L'énergie développée dans ce cas est environ 2 fois celle nécessaire pour séparer deux micelles d'argile en milieu saturé par l'eau (JOCTEUR MONROZIER *et al.*, 1991).

Les résultats de la répartition pondérale des fractions granulométriques obtenus par les méthodes A et B sont comparés à ceux obtenus lors de l'analyse mécanique après destruction de la matière organique et dispersion totale des particules minérales élémentaires.

Observation

Les fractions grossières (>50 μm) sont observées à l'état humide à la loupe binoculaire (Wild M420). Pour les observations en microscopie électronique à transmission (MET), les échantillons humides sont fixés à l'aide d'une solution d'acide osmique à 1 % (VILLEMIN et TOUTAIN, 1987). L'échantillon est enrobé d'agar à 2 % après élimination de la solution fixatrice en excès par rinçages successifs, découpé en petits cubes, déshydraté par échange eau-acétone et ensuite imprégné de résine (de type epon). Les coupes ultraminesces sont contrastées à l'acétate d'uranyle puis au citrate de plomb. Les polysaccharides neutres sont mis en

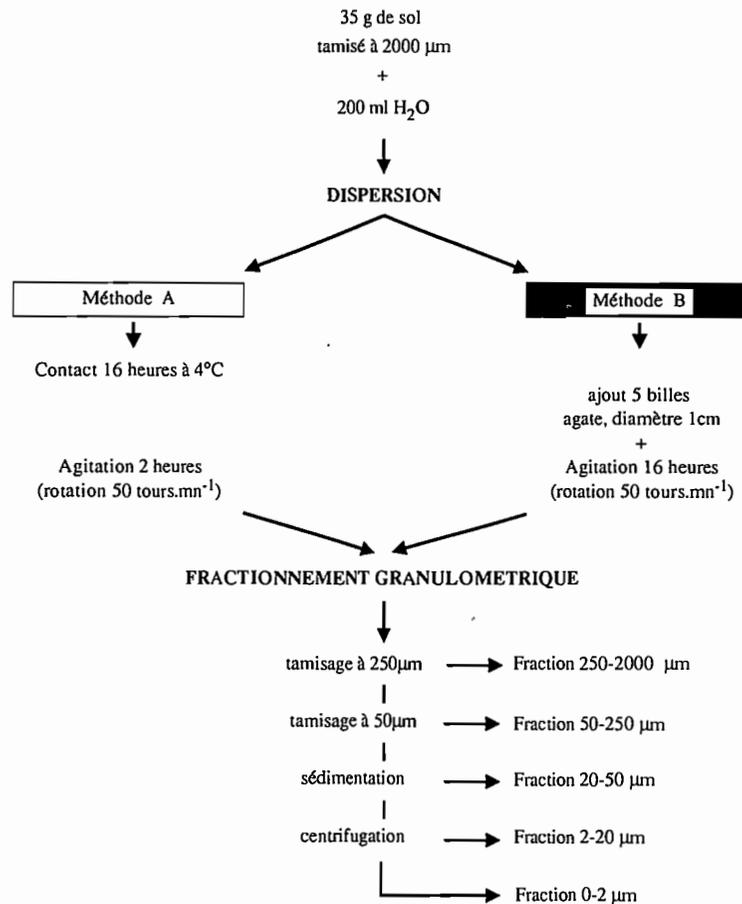


FIG. 1 – Schéma du protocole des fractionnements granulométriques.
Flow chart for size fractionation methods.

évidence par la réaction de Thiery (THIERY, 1967). Les observations sont faites au MET modèle Zeiss EM 952 réglé à 60 kv.

Analyses du sol total et des fractions granulométriques

Les fractions granulométriques étant lavées au KCl 1M afin d'éliminer l'azote minéral, et l'azote ammoniacal rétrogradé étant négligeable (résultats non publiés), l'azote total dosé dans ces fractions est sous forme organique.

- C et N total: une aliquote du sol total et des fractions granulométriques est séchée à l'étuve à 80 °C, homogénéisée, finement broyée à 200 µm puis analysée après combustion dans un analyseur CNS Na 1500 (Carlo Erba).

- analyses isotopiques ¹⁵N : la détermination de l'abondance isotopique est faite, comme pour l'analyse élémentaire, sur un échantillon finement broyé contenant au moins 40 µg d'azote. La prise d'essai est introduite dans un analyseur C, N (Carlo Erba Na 1500) couplé à un spectromètre de masse isotopique (Finnigan, VG). Le gaz de référence N₂ à 99,998 % est calibré par rapport à l'azote de l'air (abondance isotopique = 0,3663 %). Toutes les déterminations sont effectuées par le Service Central d'Analyses (S.C.A.) du CNRS (Solaize, France).

Mesure de la biomasse microbienne

La biomasse microbienne du sol total et des fractions est obtenue par la méthode de fumigation-extraction (AMATO et LADD, 1988). Dans cette méthode, les échantillons (sol total ou fractions de 0,1 g à 5,0 g selon leur richesse en azote total) amenés à l'humidité équivalente (environ 30 % du poids

sec) sont placés dans un dessiccateur à vide saturé en vapeur de chloroforme (100 à 150 ml de CHCl₃ débarrassé des traces d'alcool par passages successifs du solvant sur une colonne d'alumine activée 4 heures à 130 °C). L'humidité des échantillons est maintenue constante durant les 10 jours de l'incubation par la présence de papier filtre imbibé d'eau. Le dessiccateur, une fois purgé de son air ambiant, est fermé hermétiquement puis placé en chambre chaude à 28 ± 1 °C. Les micro-organismes sont tués par les vapeurs de chloroforme et les produits de leur lyse sont extraits en fin d'incubation par une solution de KCl 2M. Les fonctions α-aminées et l'ammonium libérés lors de la protéolyse des micro-organismes tués sont dosés par colorimétrie à la ninhydrine (MOORE et STEIN, 1954). La biomasse est exprimée en C-biomasse égale à : 21 X [(N α-aminé dosé après 10 jours d'incubation sous atmosphère saturée en chloroforme)-(N α-aminé dosé avant la fumigation)] .

Le calcul de la masse des micro-organismes ne se fait pas en référence à un échantillon témoin comme dans la majeure partie des méthodes biocidales (JENKINSON et POWLSON, 1976 ; CHAUSSOD et NICOLARDOT, 1982). Cette méthode a donc l'avantage d'éviter les problèmes liés au choix de l'échantillon de référence.

RÉSULTATS

Répartition pondérale des fractions granulométriques

Les bilans pondéraux des fractionnements granulométriques (méthode A et méthode B) sont de 100 %.

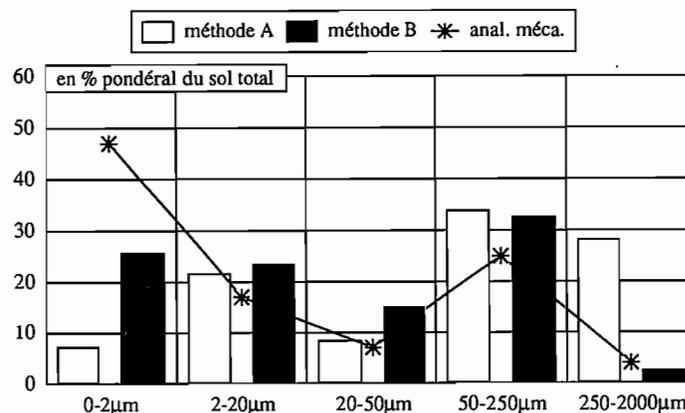


FIG. 2 – Répartition pondérale des fractions granulométriques isolées par les méthodes A et B, en comparaison avec l'analyse mécanique (résultats exprimés en % du poids du sol total).

Distribution of the soil fractions separated by A or B methods, compared with particle size distribution obtained by mechanical analysis (results expressed as % of soil total weight).

La répartition pondérale des fractions granulométriques est fortement modifiée par la méthode de dispersion utilisée (fig. 2). Avec l'accroissement de l'énergie appliquée (méthode B) on note une forte diminution du poids de la fraction 250-2 000 μm , une forte augmentation de la fraction 0-2 μm et une augmentation relativement faible des fractions de taille comprise entre 2 et 250 μm . Avec la méthode A, la fraction 250-2 000 μm est environ 6 fois plus importante que les particules sableuses 250-2 000 μm obtenues par l'analyse mécanique (respectivement 27 % et 4 % du poids du sol total). Avec la méthode B, on retrouve pour cette même fraction des poids identiques à ceux obtenus par l'analyse mécanique. Il y a donc eu une destruction presque complète des agrégats de taille 250-2 000 μm .

L'accroissement de l'énergie de dispersion provoque l'augmentation de la quantité d'argiles dispersées sans toutefois conduire à la dispersion totale des particules argileuses du sol. En effet, les fractions 0-2 μm isolées par les méthodes A et B ne représentent respectivement que 15 % et 55 % des argiles granulométriques du sol obtenues par l'analyse mécanique. Une fraction importante des argiles (45 % pour la méthode B) reste donc agrégée dans les fractions de taille comprise entre 2 et 200 μm , en dépit de l'accroissement de l'énergie de dispersion du sol.

Planche 1 : méthode A.

Method A

Photo a : fraction > 250 μm observée à la loupe binoculaire. Cette fraction est formée de sables grossiers libres (S) et de macroagrégats (MA). On distingue nettement dans ces macroagrégats la présence de grands restes de tissus végétaux (RT).

Fraction > 250 μm observed through the binocular magnifier.

This fraction is composed of free coarse sands (S) and of macroaggregates (MA). In these macroaggregates, one can clearly distinguish considerable residues of plant tissues.

Photo b : détails d'un macroagrégat > 250 μm observé au MET (coloration acétate d'uranyle et citrate de plomb). Les grands restes tissulaires (RT) sont emprisonnés dans un plasma argileux (A). Les bactéries (B) colonisent le plasma argileux et les restes tissulaires (RT).

Macroaggregate > 250 μm observed through TEM (uranyl acetate and lead citrate coloration). The considerable tissue residues are trapped in a clayey plasma (A). The clayey plasma and organic residues are colonized by bacteria (B).

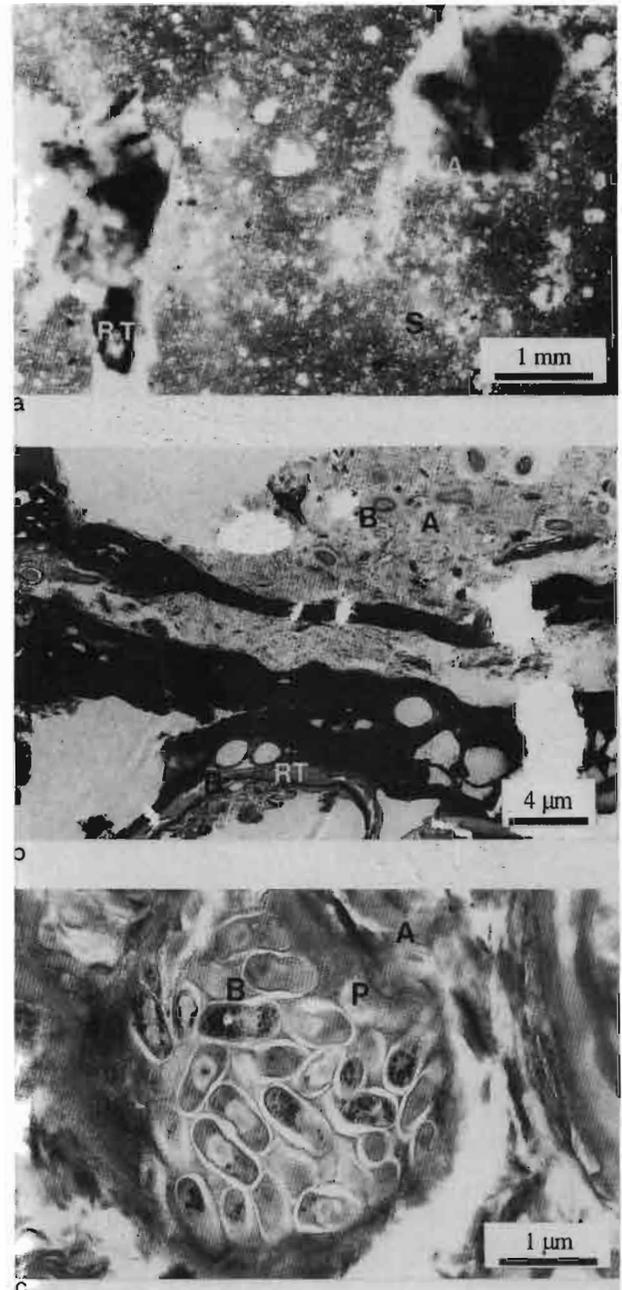
Photo c : détails d'une colonie bactérienne (B) observée au MET (réaction de Thiery). Les argiles (A) sont étroitement associées aux polysaccharides bactériens (P).

Details of a bacterial colony (B) observed through TEM (Thiery's reaction). Clays (A) are closely associated to bacterial polysaccharides (P).

Caractéristiques morphologiques des fractions granulométriques

Nous avons essentiellement observé les fractions 250-2 000 μm et 0-2 μm obtenues par les deux méthodes A et B.

La fraction 250-2 000 μm isolée par la méthode A est principalement formée de particules complexes et de quelques sables libres (planche 1, photo a). Ces particules sont constituées de débris organiques figurés plus ou moins humifiés et dont



la taille varie de 500 μm à 2 000 μm (racines, résidus de parties aériennes...), et de sables agglomérés au sein d'une matrice limono-argileuse (observations MET). De plus, on distingue très nettement des colonies bactériennes localisées sur, et dans, les résidus organiques, et à la surface des argiles (planche 1, photo b). Dans ce dernier cas, il y a formation de microagrégats argilo-bactériens, les polysaccharides sécrétés par ces micro-organismes, et révélés par la réaction de Thiery (THIERY, 1967), formant une enveloppe organique sur laquelle s'adsorbent les particules argileuses (planche 1, photo c). Cette association smectites polysaccharides bactériens, rencontrée dans ces particules complexes et isolée par la méthode A, pourrait assurer leur cohésion. Ces macroagrégats (> 250 μm), dans lesquels on trouve à la fois la source de carbone (résidus organiques), l'agent de transformation de la matière organique (micro-organismes) et un des compartiments de stockage de la matière organique (argiles), représentent un des habitats essentiels pour les micro-organismes du sol.

La fraction 250-2 000 μm isolée par la méthode B est caractérisée par l'absence de particules complexes. Elle est formée de débris végétaux et de sables libres (planche 2, photo a). Au microscope électronique à transmission, les résidus organiques figurés apparaissent exempts de particules minérales argileuses (planche 2, photo b).

La fraction 0-2 μm , observée au microscope électronique à transmission, est formée, quelle que

soit la méthode de fractionnement granulométrique utilisée (A ou B), de particules argileuses, soit dispersées, soit adsorbées sur des amas organiques de nature polysaccharidique (planche 2, photo c). Des observations identiques ont été faites par FELLER *et al.* (1991) pour un sol ferrallitique argileux cultivé en canne à sucre. Il ne semble pas y avoir d'effet significatif de la méthode de fractionnement sur les caractères ultra-structuraux de cette fraction 0-2 μm .

Planche 2 : méthode B
Method B

Photo a : fraction > 250 μm observée à la loupe binoculaire. Cette fraction est formée de sables grossiers (S) et des restes tissulaires (RT) totalement dispersés.

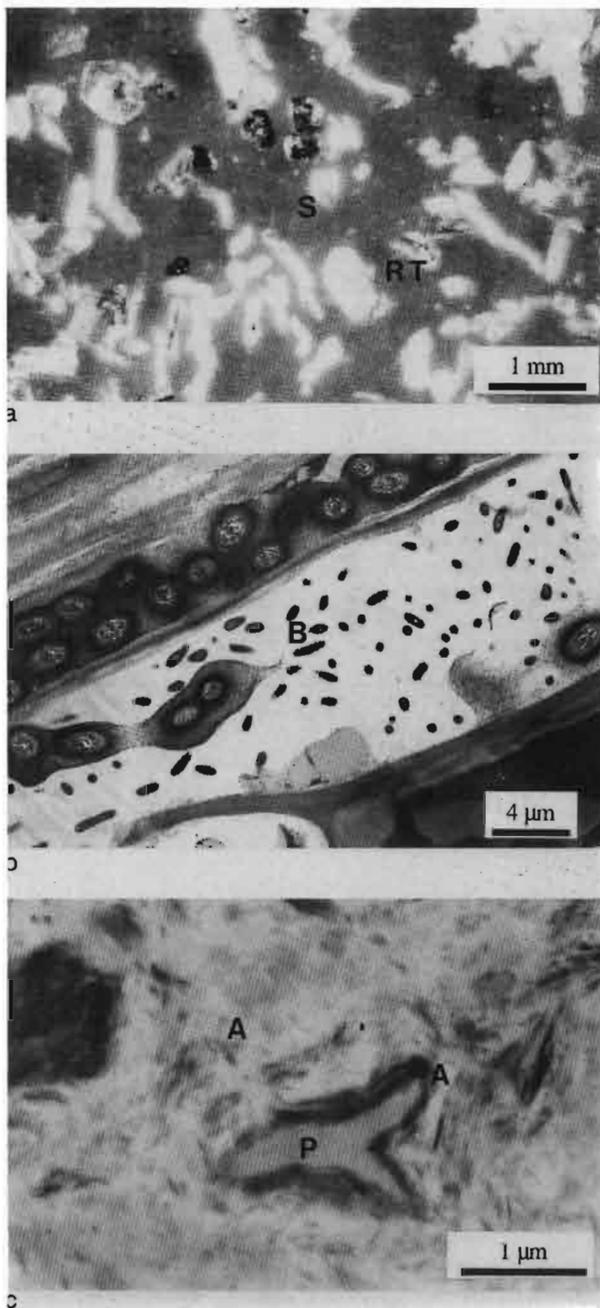
Fraction > 250 μm observed through the binocular magnifier. This fraction is composed of coarse sands (S) and dispersed organic residues.

Photo b : détails d'un reste tissulaire (RT) observé au MET (coloration acétate d'uranyle et citrate de plomb). Les tissus végétaux, exempts de plasma argileux, sont colonisés par de très nombreuses bactéries (B).

Details of organic residue observed through TEM (uranyl acetate and lead citrate coloration). Plant tissues without any clayey plasma are colonized by very numerous bacteria (B).

Photo c : fraction 0-2 μm observée au MET (réaction de Thiery). Cette fraction est constituée d'argiles dispersées (A) ou agrégées autour d'amas polysaccharidiques (P)

Fraction 0-2 μm observed through TEM (Thiery's reaction). This fraction is composed of dispersed (A) or clays aggregated by polysaccharides.



Répartitions du carbone et de l'azote organiques dans les fractions granulométriques (tabl. II)

Les sommes des quantités de carbone (C) et d'azote (N) contenues dans chacune des fractions granulométriques (mg C .g⁻¹ sol) isolées par la méthode A ou par la méthode B sont respectivement égales, pour le carbone, à 94 % et 100 % du carbone du sol total, pour l'azote, à 100 % et à 97 % de l'azote du sol total.

La répartition de l'azote (fig. 3b) dans les différentes fractions granulométriques isolées par une méthode donnée est analogue à celle du carbone organique (fig. 3a). Pour la méthode A, les répartitions du carbone et de l'azote sont les suivantes :

Carbone : fraction 250-2 000 µm > fraction 50-250 µm > fraction 2-20 µm > fraction 0-2 µm > fraction 20-50 µm.

Azote : fraction 250-2 000 µm > fraction 2-20 µm ≥ fraction 50-250 µm > fraction 0-2 µm > fraction 20-50 µm.

Pour la méthode B, on obtient le classement suivant :

Carbone : fraction 50-250 µm > fraction 2-20 µm > fraction 0-2 µm > fraction 250-2 000 µm > fraction 20-50 µm.

Azote : fraction 50-250 µm ≈ fraction 2-20 µm ≈ fraction 0-2 µm > fraction 20-50 µm > fraction 250-2 000 µm.

TABLEAU II
Caractéristiques (C, N, C/N et ¹⁵N) des fractions granulométriques isolées par les méthodes A et B
C, N, C/N ratio and ¹⁵N organic contents of the particle size fractions separated by A or B methods

	Carbone				Azote				¹⁵ N				C/N			
	mg/g fraction		mg/g sol		mg/g fraction		mg/g sol		E%		µg/g fraction		µg/g sol		A	B
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
F 250-2000 µm	44,10	169,90	12,48	4,42	3,20	6,00	0,906	0,156	1,42	0,80	45,44	48,00	12,90	1,20	14	28
F 50-250 µm	23,40	30,50	7,93	9,97	2,00	2,30	0,678	0,752	1,59	1,16	31,80	26,68	10,80	8,70	12	13
F 20-50 µm	19,80	16,20	1,68	2,45	1,80	1,70	0,153	0,257	1,49	1,25	26,82	21,25	2,30	3,20	11	10
F 2-20 µm	30,20	36,80	6,58	8,68	3,40	3,10	0,741	0,732	3,18	1,83	108,12	56,73	23,60	13,40	9	12
F 0-2 µm	35,80	30,00	2,61	7,77	3,70	3,00	0,270	0,777	1,96	3,16	72,52	94,80	5,30	24,50	10	10

Légende

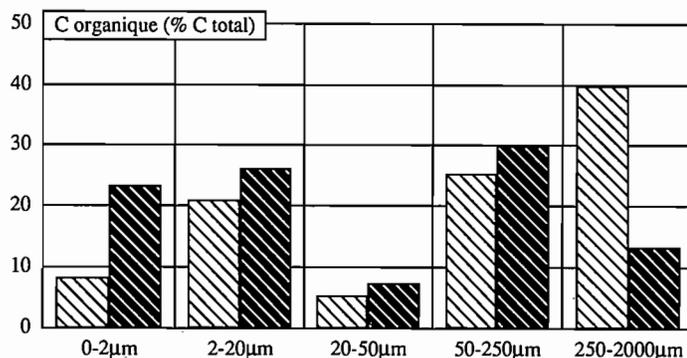
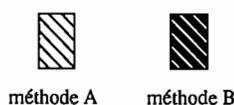


FIG. 3.a – Répartition du carbone organique (% du C organique du sol total) dans les différentes fractions granulométriques isolées par les méthodes A et B.

Carbon content (% of soil total organic carbon) of the different size fractions separated by A or B methods.

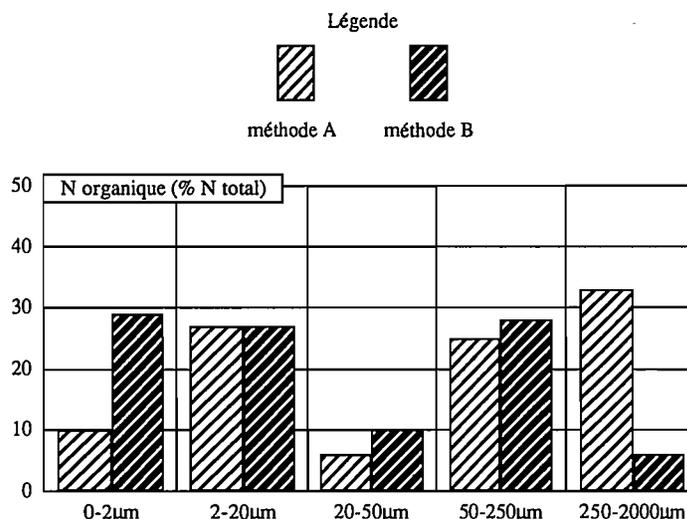


FIG. 3.b – Répartition de l'azote organique (% N organique du sol total) dans les différentes fractions granulométriques isolées par les méthodes A et B.
Organic nitrogen content (% of soil total organic nitrogen) of the different size fractions separated by A or B methods.

La comparaison des méthodes A et B (fig. 3a et 3b) montre que l'augmentation de l'énergie de dispersion provoque un transfert de carbone et d'azote essentiellement des fractions 250-2 000 µm vers les fractions 0-2 µm : la fraction 250-2 000 µm perd environ 60 % de son carbone organique, et 80 % de son azote organique. Les quantités de carbone et d'azote organiques de la fraction 0-2 µm sont respectivement multipliées par 2,5 et 3 sous l'effet de l'accroissement de l'énergie de dispersion.

Rapports C/N des fractions

À l'exception de la fraction 250-2 000 µm, les valeurs des rapports C/N des fractions obtenues par les méthodes A et B diffèrent peu (tabl. II). Par contre, la valeur élevée (C/N = 28) pour la fraction 250-2 000 µm isolée par la méthode B indique que cette fraction est constituée de débris végétaux, alors que la valeur plus basse (C/N = 14), pour la même fraction obtenue par la méthode A, indique que cette fraction est constituée d'un mélange de composés organiques à C/N faible (<11) et à C/N élevé (C/N ≥28). Cette constatation est en accord avec les caractéristiques macro- et ultramicromorphologiques des fractions (cf. 3b) et la valeur calculée du rapport C/N (C/N calculé = 11) des produits organiques dispersés de la fraction 250-2 000 µm par l'accroissement de l'énergie (tabl. IV).

Répartition de l'azote 15 immobilisé dans les fractions granulométriques

Après les trois jours d'incubation, 18 % de l'azote 15 apporté par l'urée sont sous forme d'azote minéral et 68 % sont immobilisés dans le sol. Les pertes estimées sont donc de 4 %.

Les bilans ¹⁵N du fractionnement granulométrique sont respectivement égaux à 88 % et à 85 % de ¹⁵N organique du sol total non fractionné. L'origine des pertes (12 % et 15 %) n'a pu être déterminée : pertes par dénitrification lors du fractionnement et/ou addition des erreurs relatives des dosages chimiques et isotopiques de l'azote sur les différentes fractions. L'interprétation des résultats tiendra compte de ce déficit en azote 15, et les résultats isotopiques ¹⁵N seront exprimés en % de la somme des fractions.

La méthode de dispersion a un effet significatif sur la répartition de l'azote 15 récemment immobilisé dans les différentes fractions granulométriques (fig. 4). Par la méthode A, la majeure partie de l'azote marqué, apporté sous forme d'urée, est immobilisée dans les fractions 250-2 000 µm (24 %), 50-250 µm (20 %) et 2-20 µm (43 %). Il faut noter que les agrégats > 50 µm, isolés par la méthode A, contiennent près de la moitié de l'azote immobilisé dans le sol (24 % + 20 % = 44 %). La fraction 2-20 µm obtenue par cette méthode est la plus enrichie en azote 15 (E % = 3,20) (tabl. II).

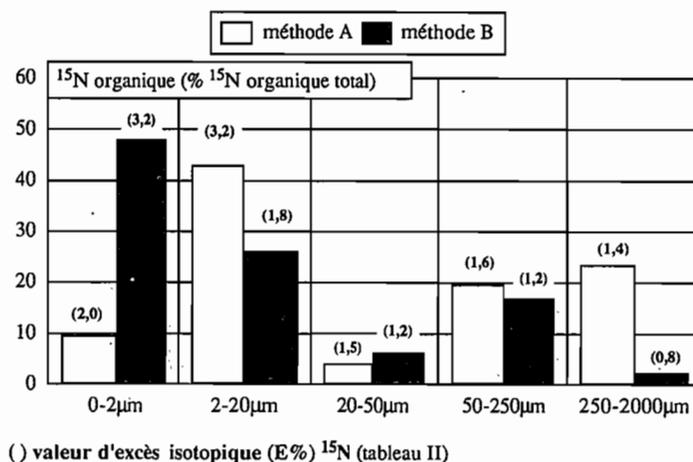


FIG. 4 – Immobilisation de ¹⁵N-urée dans les différentes fractions granulométriques isolées par les méthodes A et B (résultats exprimés en % de ¹⁵N organique total).

¹⁵N urea immobilized in the different size fractions separated by A or B methods (results expressed as % of total organic ¹⁵N).

Par la méthode B, l'azote immobilisé est retrouvé préférentiellement dans les fractions 50-250 μm, 2-20 μm et surtout dans la fraction 0-2 μm (respectivement 17 %, 26 % et 48 %) (fig. 4). La fraction 0-2 μm est la fraction la plus enrichie en azote 15 (E % = 3,18) (tabl. II).

L'accroissement de l'énergie de dispersion provoque une redistribution des quantités d'azote 15 immobilisées dans les fractions 250-2 000 μm, 2-20 μm et 0-2 μm. Les modifications constatées concernent à la fois les quantités d'azote 15 immobilisées dans ces fractions et leur enrichissement isotopique (E %).

Sous l'effet de l'accroissement de l'énergie de dispersion, la fraction 250-2 000 μm perd 90 % de l'azote 15 organique et son excès isotopique diminue fortement (respectivement 1,42 % et 0,80 %). Les débris organiques libérés après la destruction des agrégats par la méthode B sont donc moins enrichis en azote 15 que les agrégats isolés par la méthode A. La fraction 2-20 μm perd environ la moitié des quantités d'azote 15 immobilisé et l'excès isotopique baisse fortement aussi (3,18 % et 1,83 %). Dans le même temps, la quantité d'azote 15 immobilisé dans la fraction 0-2 μm est multipliée par 5 et son excès isotopique augmente (respectivement égal à 1,96 % et 3,16 %) (tabl. II).

Ces résultats indiquent que l'augmentation de l'énergie de dispersion provoque des transferts entre les fractions 250-2 000 μm et 2-20 μm d'une part et 0-2 μm d'autre part. Pour les deux méthodes A et B, plus de 50 % de l'azote 15 immobilisé sont associés aux fractions < 50 μm.

Répartition des micro-organismes dans les fractions granulométriques

La masse totale des micro-organismes du sol non fractionné est égale à 1 400 μg C. g⁻¹ sol, soit 4 % du carbone organique du sol. Les bilans en C-biomasse du fractionnement granulométrique sont respectivement égaux à 107 % et à 90 % pour les méthodes A et B. Ces bilans indiquent que la masse des micro-organismes de la fraction soluble, qui n'a pas été dosée, peut être considérée comme nulle. Les résultats présentés ci-dessous seront exprimés en % de la quantité totale obtenue par la somme de chacune des fractions et non par rapport au sol non fractionné.

La distribution des micro-organismes dans les différentes fractions granulométriques est très fortement influencée par l'énergie de dispersion (fig. 5). Avec la méthode A, les micro-organismes sont répartis essentiellement dans les fractions 250-2 000 μm, 2-20 μm et 0-2 μm (respectivement 27 %, 21 % et 38 % de la biomasse microbienne totale). Les micro-organismes présents dans les agrégats > 50 μm, isolés par la méthode A, représentent 38 % des micro-organismes totaux (27 % et 11 % respectivement dans la fraction 250-2 000 μm et 50-250 μm). Avec la méthode B, environ 60 % des micro-organismes sont isolés dans la fraction 0-2 μm et seulement 24 % dans les fractions > 50 μm (2 et 22 % dans les fractions 250-2 000 μm et 50-250 μm respectivement).

L'accroissement de l'énergie de dispersion provoque la diminution de la masse microbienne

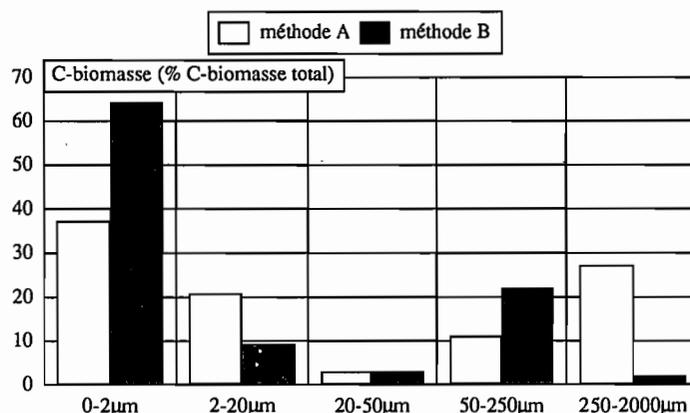


FIG. 5 – Distribution de la biomasse microbienne (C-biomasse) dans les fractions granulométriques isolées par les méthodes A et B (résultats exprimés en % du C-biomasse du sol total).
Biomass-C located within the different size fractions separated by A or B methods (results expressed as % of total C-biomass).

(µg C-biomasse. g⁻¹ sol) associée aux fractions 250-2 000 µm et 2-20 µm et l’augmentation de celle associée aux fractions 50-250 µm et 0-2 µm (tabl. III).

À l’exception de la fraction 50-250 µm, les fractions isolées par la méthode A sont toutes plus riches en micro-organismes (µg C-biomasse . g⁻¹ fraction) que les fractions obtenues par la méthode B. De la même façon, le carbone microbien représente une proportion plus importante du carbone organique (C-biomasse en % C organique fraction) pour les fractions isolées par la méthode A que pour celles obtenues par la méthode B (tabl. III). Cependant, il faut souligner que, quelle que soit la

méthode appliquée, la contribution du carbone microbien au carbone organique (C-biomasse en % C organique fraction) est particulièrement importante dans la fraction 0-2 µm : 10,4 % (méthode B) et 21,3 % (méthode A) à comparer à 4,8 %, valeur maximale pour les fractions > 2 µm.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Afin d’étudier la localisation des micro-organismes et la répartition de l’azote immobilisé par ces micro-organismes dans un sol argileux, nous avons conduit une incubation en conditions contrôlées. L’immobilisation de l’azote, stimulée par l’apport

TABLEAU III
 Concentration du C-biomasse dans les différentes fractions granulométriques isolées par les méthodes A et B
Concentration of microbial biomass C within the different particle size fractions separated by A or B methods

	C - biomasse					
	µg/g fraction		µg/g sol		% C organique de la fraction	
	méthode A	méthode B	méthode A	méthode B	méthode A	méthode B
F 250-2000 µm	1444	750	409	19	3,30	0,40
F 50-250 µm	490	851	166	280	2,10	2,80
F 20-50 µm	575	215	49	32	2,90	1,30
F 2-20 µm	1446	500	315	118	4,80	1,40
F 0-2 µm	7625	3133	560	812	21,30	10,40

d'un substrat carboné facilement assimilable, est suivie grâce à l'utilisation de l'urée ^{15}N . Les résultats obtenus, ainsi que les conclusions tirées de cette étude, sont entièrement liés aux modes opératoires. En effet, l'activité « immobilisatrice » des micro-organismes est mesurée suite à l'apport d'urée et de glucose en solution. Un apport sous forme de débris organiques figurés aurait probablement privilégié l'activité fongique et favorisé l'immobilisation de l'azote dans les fractions riches en débris organiques. De plus, l'humidité du sol est constante tout au long de la période d'incubation, ce qui favorise le développement des micro-organismes dans l'ensemble de l'échantillon. Des cycles humectation-dessiccation auraient peut-être favorisé l'activité des micro-organismes situés dans les pores les plus fins. Ces quelques points étant signalés nous centrerons notre discussion sur l'effet du mode de dispersion sur les différents habitats microbiens.

En effet, la comparaison des deux méthodes utilisées souligne la sensibilité différente des fractions granulométriques à l'augmentation de l'énergie de dispersion (méthode B > méthode A). Les principales modifications discutées concernent principalement les fractions 250-2 000 μm , 2-20 μm et 0-2 μm .

Les macroagrégats de taille 250-2 000 μm isolés par fractionnement granulométrique après une agitation ménagée de l'échantillon dans l'eau (méthode A) sont pondéralement très importants (près d'un tiers du poids du sol total). Ces macrostructures (planche 1), constituées de débris organiques figurés enrobés dans une matrice organominérale, abritent environ un tiers de la masse totale des micro-organismes du sol, colonisant à la fois la matrice minérale et les fragments organiques, et un quart de l'azote ^{15}N immobilisé dans le sol. Ces agrégats constituent donc un des sites de résidence et d'activité des micro-organismes du sol (KANAZAWA et FILIP, 1986 ; GUPTA et GERMIDA, 1988).

L'agitation plus énergique de l'échantillon de sol en présence de billes d'agate (méthode B) conduit à la destruction de ces agrégats. La matrice minérale et les micro-organismes associés sont redistribués dans les autres fractions, la quantité d'azote immobilisée dans cette classe granulométrique est très fortement réduite. L'éclatement des agrégats et la dispersion des argiles entraînent la libération de débris organiques peu décomposés devenus les seuls sites d'accueil pour les micro-organismes (planche 2, photo b).

Il apparaît donc très clairement que l'étude des sites microbiens d'un sol à argile 2:1 doit pouvoir prendre en considération les agrégats de taille 250-2 000 μm et que cela n'est possible qu'en appliquant au sol une méthode de fractionnement ayant une faible énergie de dispersion (la méthode A dans notre cas).

Cependant, l'accroissement de l'énergie de dispersion du sol modifie aussi les caractéristiques d'agrégats de plus petites tailles et tout particulièrement celles de la fraction 2-20 μm . Cette fraction, obtenue par la méthode A, abrite 20 % des micro-organismes totaux du sol et contient plus de 40 % de l'azote ^{15}N immobilisé dans le sol. Ils représentent donc un autre site important pour les micro-organismes du sol (JOCTEUR MONROZIER *et al.*, 1991 ; GUEZ, 1990) et un lieu privilégié de stockage de l'azote (LADD et AMATO, 1977).

L'agitation du sol en présence de billes provoque la diminution des micro-organismes et de l'azote immobilisé dans cette fraction. L'hypothèse selon laquelle les micro-organismes, situés à la surface des agrégats 2-20 μm , ayant utilisé bien plus efficacement l'urée ^{15}N que leurs homologues internes, sont entraînés dans la fraction 0-2 μm par l'augmentation de l'énergie de dispersion, paraît vraisemblable.

Les micro-organismes associés aux argiles dispersées par agitation dans l'eau (méthode A) représentent près de 40 % de la masse totale des micro-organismes. Le carbone de ces organismes correspond à 20 % du carbone organique total de cette fraction. Cette proportion est la plus importante de toutes les fractions. Par contre, moins de 10 % de l'azote ^{15}N immobilisé dans le sol sont localisés dans cette fraction qui contient par ailleurs 8 % du carbone et de l'azote du sol. L'immobilisation de l'azote de l'urée dans les argiles aisément dispersables se produit dans la même proportion que celle de l'azote total, mais différemment de la distribution de la biomasse microbienne. Les micro-organismes de ce compartiment sont plus faiblement marqués que ceux associés à la fraction 2-20 μm en raison soit d'une synthèse de biomasse ^{15}N plus faible, soit d'une utilisation d'azote non marquée plus importante. Cette deuxième hypothèse est d'autant plus vraisemblable que, par la méthode B, la surface de la fraction 2-20 μm est décapée et que les micro-organismes qui s'y étaient développés iront alimenter la fraction 0-2 μm , laissant sur place une

biomasse microbienne plus interne avec un excès isotopique faible (1,83 %).

Une agitation plus énergique (méthode B) provoque une augmentation de la biomasse microbienne et d'azote 15 immobilisés dans cette fraction 0-2 µm. Le carbone des micro-organismes représente encore 10 % du carbone total de la fraction.

L'accroissement de l'énergie de dispersion du sol modifie profondément la distribution en taille des sites abritant les micro-organismes et leurs métabolites (¹⁵N immobilisé). Pour établir la nature des produits organiques dispersés et /ou érodés à partir des fractions 250-2 000 µm et 2-20 µm et celle des produits accumulés dans la fraction 0-2 µm (tabl. IV), il nous faut envisager deux hypothèses concernant l'homogénéité du marquage isotopique ¹⁵N des constituants organiques :

1^{re} hypothèse : le marquage isotopique ¹⁵N des constituants organiques est homogène, celui des produits dispersés l'est aussi.

Dans ce cas, les constituants dispersés de la fraction 250-2 000 µm, dont la valeur de l'excès isotopique ¹⁵N est égale à 1,56 %, ne correspondent pas aux produits accumulés dans la fraction 0-2 µm, la valeur de l'excès isotopique de ces produits étant très nettement supérieure (3,79 %) (tabl. III). Ces produits proviendraient donc de la fraction 2-20 µm possédant une valeur d'excès isotopique ¹⁵N suffisamment élevée (3,20 %). Dans ce cas, si la quantité d'azote 15 qui s'accumule dans la fraction 0-2 µm (19,2 µg¹⁵N.g⁻¹ sol) provient de la fraction 2-20 µm, on s'aperçoit que l'accroissement de l'énergie de dispersion (méthode B) provoquerait la disparition de 80 % des microagrégats (19,2 /

23,6 chiffres correspondant respectivement à la quantité d'azote 15 contenu dans la fraction 2-20 µm isolée après agitation dans l'eau et à la quantité d'azote 15 accumulé dans la fraction 0-2 µm). Ces produits organiques, dispersés de la fraction 2-20 µm, sont remplacés par ceux dispersés de la fraction 250-2 000 µm. Les variations pondérales de carbone et d'azote de la fraction 2-20 µm sont donc apparemment nulles.

Selon cette première hypothèse, les macroagrégats > 250 µm seraient constitués d'agrégats plus petits (2-20 µm) libérés par l'augmentation de l'énergie de dispersion. Ces microagrégats (2-20 µm) remplaceraient ceux isolés par agitation dans l'eau et détruits par l'augmentation de l'énergie de dispersion.

2^e hypothèse : le marquage isotopique ¹⁵N des constituants organiques et produits dispersés n'est pas homogène.

Il existerait dans la fraction 250-2 000 µm des constituants organiques dont la valeur de l'excès isotopique ¹⁵N est égale à 3,79 %. À partir de l'équation (i),

$$QN = Q^{15}N / E \% \quad (i) \text{ (d'après GUIRAUD, 1984)}$$

on peut calculer la quantité d'azote total (QN) d'un échantillon connaissant son excès isotopique (E %) et sa quantité d'azote 15 (Q¹⁵N). Dans notre cas, E % = 3,79 % et Q¹⁵N = 11,7 µg ¹⁵N.g⁻¹ sol, la quantité d'azote total serait donc égale à 1,16 / 0,0379 soit 308 µg N.g⁻¹ sol. Cette quantité représenterait 40 % (308 / 750) des produits originaires de la fraction 250-2 000 µm et dispersés par l'augmentation de l'énergie. Les 60 % restant seraient formés de produits organiques non marqués. Ce-

TABLEAU IV
Variations des teneurs C, N, ¹⁵N et C-biomasse des fractions 250-2 000 µm, 2-20 µm et 0,2 µm sous l'effet de l'accroissement de l'énergie de dispersion (méthode B - méthode A)
Variations of C, N, ¹⁵N and biomass-C contents of particle size fractions 250-2 000 µm, 2-20 µm and 0,2 µm due to increasing of the energy of the fractionation method (method B - method A)

Fraction (µm)	Poids g/g sol	C		N		C/N	¹⁵ N		C-biomasse		
		mg/g frac.	mg/g sol	mg/g frac.	µg/g sol		E%	µg/g sol	µg/g frac.	µg/g sol	en % C frac.
250-2000	-0,257	31,40	-8,06	2,90	-750	11	1,56	-11,7	1518	-390	4,8
2-20	0 imp	-2,10	imp	-9	imp	imp	imp	-10,2	imp	-197	imp
0-2	0,186	27,70	5,16	2,70	507	10	3,79	19,2	1355	252	4,9

les chiffres négatifs (-) indiquent une diminution, et les chiffres positifs une augmentation.
imp : calcul impossible.

pendant, la quantité d'azote ^{15}N apporté par ces composés marqués originaires de la fraction 250-2 000 μm est inférieure à celle accumulée dans la fraction 0-2 μm (respectivement 1,16 et 1,93 $\mu\text{g}^{15}\text{N} \cdot \text{g}^{-1} \text{sol}$). Les produits dispersés de la fraction 2-20 μm participeraient donc aussi à l'enrichissement en azote ^{15}N de la fraction 0-2 μm . Leur départ est compensé par l'arrivée des produits peu marqués et originaires de la fraction 250-2 000 μm . Ceci pourrait expliquer la valeur plus faible de l'excès isotopique ^{15}N de la fraction 2-20 μm isolée par la méthode B, comparée à celle mesurée dans cette fraction obtenue par la méthode A (respectivement 3,20 % et 1,80 %).

Selon cette seconde hypothèse, la méthode B provoquerait la destruction totale des macroagrégats constitués de composés organiques fortement marqués (40 %) et de composés organiques peu marqués (60 %). Les produits fortement marqués

seraient associés à des argiles et s'accumuleraient dans la fraction 0-2 μm sous l'effet de la méthode B. Les composés organiques peu marqués (débris végétaux figurés...) seraient associés à des microagrégats et isolés dans la fraction 2-20 μm . Selon cette hypothèse, la méthode B altérerait légèrement les microagrégats (2-20 μm) obtenus après agitation dans l'eau.

Il est très difficile de privilégier une des deux hypothèses. Mais il faut remarquer que quelle que soit l'origine et la nature de cette fraction argileuse dispersée par l'accroissement de l'énergie de dispersion, celle-ci est très différente de celle obtenue par simple agitation dans l'eau (méthode A). Elle est plus enrichie en azote ^{15}N mais le carbone des micro-organismes est proportionnellement moins abondant.

Manuscrit accepté par le Comité de rédaction le 5 avril 1993.

BIBLIOGRAPHIE

- ADU (J.K.), OADES (J.M.), 1978. – Physical factors influencing decomposition of organic materials in soil aggregates. *Soil Biol. Biochem.*, 10 : 109-115.
- AHMED (M.), OADES (J.M.), 1984. – Distribution of organic matter and adenosine triphosphate after fractionation of soils by physical procedures. *Soil Biol. Biochem.*, 16 : 465-470.
- ALBRECHT (A.), RANGON (L.), BARRET (P.), 1992. – Effets de la matière organique sur la stabilité structurale et la détachabilité d'un vertisol et d'un ferrisol (Martinique). *Cah. Orstom, sér. Pédol.*, vol. XXVII, n° 1 : 121-133.
- AMATO (M.), LADD (J.M.), 1988. – Assay for microbial biomass based on ninhydrin reactive nitrogen in extracts of fumigated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 20 (1) : 107-114.
- BREWER (R.), 1964. – *Fabric and mineral analysis of soils*. New York, London, Sydney, John Wiley and Sons Ed., Inc. : 470 pages.
- BRUCKERT (S.), 1979. – « Analyse de complexes organominéraux des sols » in D. DUCHAUFOR et B. SOUCHIER (eds.), 1979 : 187-209.
- CHAUSSOD (R.), NICOLARDOT (B.), 1982. – Mesure de la biomasse microbienne dans les sols cultivés. I. Approche cinétique et estimation simplifiée du carbone facilement minéralisable. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 19 : 501-512.
- DANIELSON (R.E.), SUTHERLAND (P.L.), 1986. – « Porosity » in A. KLUTE (ed.), 1986 : 443-461.
- DOMMERMUES (Y.), MANGENOT (F.), 1970. – *Écologie microbienne du sol*. Paris, Masson, 796 pages.
- DOUGLAS (L.A.) (ed.), 1990. – *Proc. of the VIIIth Int. Working Meeting of Soil Micromorphology*, Amsterdam, Elsevier.
- DUCHAUFOR (D.), SOUCHIER (B.) (eds.), 1979. – *Pédologie : 2. Constituants et Propriétés du sol*. Paris, Masson.
- ELLIOTT (E.T.), 1986. – Aggregate structure and carbon, nitrogen, and phosphorus in native and cultivated soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50 (3) : 627-633.
- ELLIOTT (E.T.), COLEMAN (D.C.), 1988. – Let the soil work for us. *Ecol. Bull.*, 39 : 23-32.
- FEDOROFF (N.), BRESSON (L.M.), COURTY (M.A.) (eds.), 1987. – *Micromorphologie des sols*, Plaisir, Afes.
- FELLER (C.), FRANÇOIS (C.), VILLEMEN (G.), PORTAL (J.M.), TOUTAIN (F.), MOREL (J.L.), 1991. – Nature des matières organiques associées aux fractions argileuses d'un sol ferrallitique. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 312, Série II : 1491-1497.
- FOSTER (R.), 1986. – The ultrastructure of the rhizosphere and rhizopshere. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24 : 211-234.
- GUEZ (P.), 1990. – *Distribution des micro-organismes dans deux types de sols. Influence de leur localisation sur leurs contacts avec un herbicide (l'atrazine)*. Mémoire D.E.A. Univ. Claude-Bernard Lyon-I, 39 pages.
- GUIRAUD (G.), 1984. – *Contribution du marquage isotopique à l'évaluation des transferts d'azote entre les compartiments organiques et minéraux dans les systèmes sol-plante*. Thèse de Doctorat d'État, Univ. Paris-VI, 335 pages.

- GUPTA (V.V.S.R.), GERMIDA (J.J.), 1988. – Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation. *Soil Biol. Biochem.*, 20 (6) : 777-786.
- GREVERS (M.C.J.), JONG (E. de), 1990. – The characterization of soil macroporosity of a clay soil under ten grasses using image analysis. *Can. J. Soil Sci.*, 70 : 93-103.
- HATTORI (T.), 1988. – Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. *Rep. Inst. Agr. Res. Tohoku Univ.*, 37 : 23-36.
- HENIN (S.), GRAS (R.), MONNIER (G.), 1969. – *Le profil cultural. L'état physique du sol et ses conséquences agronomiques*. Paris, Masson, 320 pages.
- HOPKINS (D.W.), MACNAUGHTON (S.J.), O'DONNELL (A.G.), 1991. – A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil. *Soil Biol. Biochem.*, 23 (3) : 217-225.
- JENKINSON (D.S.), POWLSON (D.S.), 1976. – The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 8 : 209-213.
- JENKINSON (D.S.), SMITH (K.A.) (eds.), 1988. – *Nitrogen efficiency in Agricultural soils*, London, Elsevier Applied Science.
- JOCTEUR MONROZIER (L.), LADD (J.N.), FITZPATRICK (R.W.), FOSTER (R.C.), RAUPACH (M.), 1991. – Components and microbial biomass content of size fractions in soils of contrasting aggregation. *Geoderma*, 49 : 1-10.
- KACZMAREK (W.), PEDZIWIŁK (Z.), 1988. – Mycolotic activity and the development of microflora in soils of different mechanical structure. *Soil Biol. Biochem.*, 20 (2) : 129-136.
- KANAZAWA (S.), FILIP (Z.), 1986. – Distribution of microorganisms, total biomass, and enzyme activities in different particles of brown soil. *Microb. Ecol.*, 12 : 205-215.
- KEMPER (W.D.), ROSENAU (R.C.), 1986. – « Aggregate stability and size distribution » in A. KLUTE (ed.), 1986 : 425-442.
- KILBERTUS (G.), 1980. – Étude des microhabitats contenus dans les agrégats du sol. Leur relation avec la biomasse bactérienne et la taille des procaryotes présents. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 17 (4) : 543-557.
- KLUTE (A.) (ed.), 1986. – *Methods of soil Analysis*, Part. 1. 2nd edition, Agronomy 9, Madison, American Society of Agronomy, Soil Science Society of America.
- LADD (J.M.), AMATO (M.), 1977. – Studies of nitrogen immobilization and mineralization in calcareous soils. I. Distribution of immobilized nitrogen amongst soil fractions of different particle size and density. *Soil Biol. Biochem.*, 9 : 309-318.
- MOORE (S.), STEIN (W.H.), 1954. – A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 211 : 907-913.
- NICOLARDOT (B.), 1988. – « Behaviour of newly immobilized nitrogen in three agricultural soils after addition of organic carbon substrates » in D.S. JENKINSON and K.A. SMITH (eds.) : 340-353.
- NKRUMAH (M.), GRIFFITH (S.M.), AHMAD (N.), 1989. – Lysimeter and field studies on ¹⁵N in tropical soil. II. Transformation of (NH₂)₂ CO¹⁵N in a tropical loam in lysimeter and field plots. *Plant and Soil*, 114 : 13-18.
- OADES (J.M.), WATERS (A.G.), 1991. – Aggregate hierarchy in soils. *Aust. J. Soil Res.*, 19 : 815-828.
- POSTMA (J.), ALTEMULLER (H.J.), 1990. – Bacteria in thin soil sections stained with the fluorescent brightener calcofluor white M2R. *Soil Biol. Biochem.*, 22 (1) : 89-96.
- SEIFERT (J.), 1964. – Influence of the size of soil structural aggregate on the degree of nitrification. *Folia microbiol.*, 9 : 365-377.
- THIERY (J.P.), 1967. – Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie*, 6 : 987-1017.
- TIPPKOTTER (R.), 1990. – « Staining of soil microorganisms and related materials with fluorochromes » in L.A. DOUGLAS (ed.), 1990, Amsterdam, Elsevier : 605-609.
- VILLEMEN (G.), TOUTAIN (F.), 1987. – « Méthode de fixation d'échantillons organominéraux de sols pour la microscopie électronique à transmission ». In N. FEDOROFF, L.M. BRESSON et M.A. COURTY (eds.), 1987 : 43-47.
- WU (L.), VOMOCIL (J.A.), CILDS (S.W.), 1990. – Pore size, particle size, aggregates size, and water retention. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54 : 952-956.