

Revue des principales méthodes disponibles pour mesurer la biomasse microbienne et ses activités

par **B. NICOLARDOT, R. CHAUSSOD et G. CATROUX**

Laboratoire de Microbiologie des Sols

I.N.R.A.

BV 1540 - 21034 Dijon Cedex

SOMMAIRE

L'estimation de la biomasse microbienne est indispensable pour étudier les flux dans le sol de certains éléments (Carbone, Azote, Phosphore...). Les différentes approches possibles sont analysées : dénombrements directs et indirects, dosage de composés biologiques spécifiques, mesure d'activités enzymatiques, méthodes « physiologiques ». La plupart des techniques actuellement disponibles ne peuvent donner des valeurs absolues et des résultats fiables.

Cependant, il s'avère que la méthode de fumigation au chloroforme pourrait permettre des progrès décisifs, car elle permet l'accès direct au compartiment microbien du sol.

INTRODUCTION.

Les micro-organismes du sol jouent un rôle fondamental dans le cycle biogéochimique des éléments intéressant la production agricole. Hétérotrophes pour la plupart, ils interviennent au niveau du cycle du carbone dans les processus de minéralisation-humification de la matière organique. Leur importance est également déterminante dans le cycle de l'azote, où toutes les transformations importantes sont sous contrôle microbien, et dans les cycles du phosphore et du soufre où ils interviennent dans les passages entre formes plus ou moins assimilables par les végétaux. Enfin, ils constituent par eux-mêmes une part non négligeable de la matière organique du sol où sont immobilisés des éléments de grande importance agronomique. En moyenne, la biomasse microbienne renferme 2 à 4 % du carbone et 4 à 8 % de l'azote total d'un sol. On peut donc considérer la microflore des sols comme étant à la fois un **transformateur** et un **compartiment** traversé par des flux d'énergie et d'éléments minéraux.

L'estimation de la **taille** de ce compartiment (notion de **biomasse microbienne**) permet de chiffrer les quantités d'éléments stockés dans les micro-organismes et d'évaluer les variations de stock consécutives à des fluctuations de population sous l'influence des conditions de l'environnement ou de l'intervention humaine telle que travail du sol, apports de matières organiques ou de produits xénobiotiques. Pour ne prendre comme exemple que la diminution du taux de matière organique souvent observée à la suite d'une exploitation intensive des sols, il est intéressant de rechercher si cette diminution affecte aussi (ou surtout) le compartiment « actif » de la matière organique que représente la biomasse microbienne. De même, dans bien des cas, il est probable qu'un effet sur la biomasse microbienne sera observable de façon plus précoce et plus nette qu'une variation du taux de carbone organique total d'un sol.

Enfin, il est important de pouvoir décrire le fonctionnement des populations microbiennes dans le sol (rendement de croissance, taux de renouvellement, énergie de maintenance...), afin de modéliser les transformations du carbone et de l'azote dans le sol. Or, pour prétendre identifier les principaux paramètres, il faut être capable d'estimer la biomasse présente dans le sol à un instant donné. Il s'avère donc du plus haut intérêt, dans différents domaines de la Science du sol, de pouvoir disposer d'une méthode précise et fiable d'estimation de la biomasse microbienne et en particulier des quantités de carbone, azote et phosphore qui font partie de ce compartiment vivant des sols.

Pour cela, nous dressons ci-dessous une revue critique des méthodes envisageables pour mesurer la biomasse microbienne dans les sols et nous tentons de dégager celles qui permettent d'accéder le mieux à ce paramètre.

I. — DÉNOMBREMENTS.

Ces méthodes sont les plus anciennes, mais leurs bases solides et les perfectionnements techniques importants qu'elles ont connus font qu'elles sont toujours utilisées.

I.1. DENOMBREMENTS INDIRECTS.

Ces mesures s'appuient sur des cultures en milieu liquide ou en milieu solide après ensemencement avec des suspensions-dilutions de sol. Pour les cultures sur milieu solide, on détermine le nombre de germes du sol au départ grâce à la simple multiplication du nombre de colonies par la dilution correspondante, celle-ci étant choisie de façon à compter une centaine de colonies (POCHON et TARDIEUX, 1962). Dans le cas des cultures en milieu liquide, on recherche la dilution limite donnant lieu à une culture (appréciée par l'apparition d'un trouble) ; l'utilisation des tables de MAC CRADY (1918), basées sur une application de la loi de POISSON, donne le « nombre le plus probable » de germes présents dans l'échantillon de départ.

Ces méthodes posent par hypothèse que chaque colonie ou chaque culture à la dilution-limite ne provient que d'un seul germe, et elles ne comptent que les germes capables de donner une colonie ou une culture sur les milieux utilisés. Ce sont là deux limitations sérieuses des dénombrements indirects qui ont suscité de nombreuses améliorations techniques. Ainsi la dispersion des micro-organismes est grandement favorisée par la mise en suspension-dilution du sol dans du pyrophosphate de sodium ou l'action des ultrasons (STEVENSON, 1958, BALKWILL et al., 1977). De même, on peut dans une certaine mesure prendre en compte des micro-organismes ayant des exigences trophiques différentes par l'utilisation de milieux plus ou moins riches (HATTORI, 1976) ou plus ou moins spécifiques (FOURNIER, 1980).

Malgré les perfectionnements dont elles ont bénéficié, les techniques de dénombrements directs sont peu précises et d'une reproductibilité imparfaite (DOMSCH et al., 1979) ; elles sous-estiment parfois largement le nombre de bactéries (PAUL et VAN VEEN, 1979) et sont partiellement inadaptées au recensement des champignons (PARKINSON, 1973, MANGENOT, 1982) pour lesquels on estime le nombre de « propagules viables » sans préjuger de leur nature : spore, fragment de mycélium plus ou moins important... Les résultats sont alors intraduisibles en termes de biomasse.

I.2. DENOMBREMENTS DIRECTS.

Ces techniques sont basées soit sur l'observation directe d'une suspension-dilution de sol au moyen de la microscopie optique, soit sur l'étude de coupes fines d'échantillons de sol (agrégats) en microscopie électronique.

En microscopie optique, la suspension-dilution de sol peut être directement observée après étalement sur lame, ou incorporée dans une solution gélosée (technique des films d'agar de JONES et MOLLISON, 1948) ou filtrée sur membrane ne retenant que les organismes filamenteux tels les champignons (SUNDMAN et al., 1978). Les préparations peuvent ensuite être observées soit de la façon classique avec utilisation de colorants, soit en contraste de phase, soit en épifluorescence avec des colorants vitaux (BABIUK

et al., 1970 ; ROSER, 1980). L'acridine orange, l'isothiocyanate de fluoresceïne, le bromure d'éthidium sont généralement utilisés pour la coloration des bactéries, le bleu d'aniline et le diacétate de fluoresceïne pour les champignons (SODERSTROM, 1979).

En microscopie électronique, les clichés sont réalisés à partir d'échantillons de sol non perturbés, ce qui permet à la fois de compter ou de mesurer les micro-organismes et de visualiser leur répartition spatiale (KILBERTUS, 1980).

Pour les mesures de biovolume, les micro-organismes du sol sont répartis en deux groupes : les bactéries, levures, spores et algues sont assimilées à des sphères dont on mesure le diamètre (classes de taille) ; les champignons et actinomycètes sont assimilés à des cylindres dont on détermine la longueur et le diamètre.

La précision sur le biovolume bactérien peut être améliorée en microscopie optique par l'incorporation dans les préparations d'une quantité déterminée de billes de polystyrène de diamètre connu (PETERSON et al., 1979). La mesure du nombre et de la taille des bactéries présentes dans le sol s'effectue alors par référence aux particules introduites.

La longueur des hyphes fongiques peut être mesurée à l'aide d'un curvimètre en projetant sur un plan l'image microscopique, ou estimée par la méthode des intersections (SODERSTROM, 1979). Dans ce dernier cas, en comptant le nombre d'intersections que font les hyphes avec un quadrillage préalablement établi de la préparation microscopique, on accède par un calcul statistique à la longueur totale des hyphes dans le champ observé.

Enfin, bien que n'ayant jamais, à notre connaissance, été utilisés dans ce but, les « analyseurs d'image » pourraient offrir des possibilités intéressantes : associant un microscope, une caméra vidéo et un discriminateur, ils pourraient dans certaines conditions expérimentales qui restent à définir, calculer automatiquement la surface occupée dans un champ microscopique par les micro-organismes.

Le biovolume est finalement converti en **biomasse** exprimée en mg de carbone microbien par gramme ou par kilogramme de sol. Le facteur de conversion moyen 0,11 généralement utilisé (PAUL et VORONEY, 1980) résulte du produit de la densité moyenne des micro-organismes (1,1) par leur teneur en matière sèche (20 %) et par leur teneur en carbone, égale à 50 % de la matière sèche. Mais ce coefficient de conversion est entaché d'une incertitude importante qui provient essentiellement de la teneur en matière sèche mal connue des micro-organismes « *in situ* » (PAUL et VAN VEEN, 1979).

En outre, les mesures de biomasse par observation directe sont longues et fastidieuses car les difficultés d'échantillonnage imposent de réaliser plusieurs préparations microscopiques par sol et d'observer de nombreux champs, et les résultats obtenus semblent parfois influencés par les techniques utilisées. Néanmoins, cette approche reste la base de comparaison et la référence pour d'autres méthodes d'estimation de la biomasse.

II. — DOSAGE DE COMPOSÉS SPÉCIFIQUES DE LA MATIÈRE VIVANTE.

Le dosage dans des extraits de sol de composés biochimiques caractéristiques des cellules vivantes peut permettre une approche quantitative de la biomasse microbienne du sol. Il faut pour cela que le composé à doser soit spécifique des micro-organismes et que son extraction soit quantitative.

II.1. DOSAGE DE CONSTITUANTS DES PAROIS ET MEMBRANES.

Il s'agit essentiellement de l'acide muramique et des lipopolysaccharides pour les bactéries, des hexosamines pour les champignons. Le dosage de l'acide muramique a été effectué dans les sols et les sédiments marins (KING et WHITE, 1977) par colorimétrie après hydrolyse acide et purification chromatographique. Les résultats dépendent des proportions respectives des bactéries gram + ou gram -, ou de la présence de spores qui contiennent des quantités importantes d'acide muramique. De même le dosage des hexosamines par colorimétrie après hydrolyse et purification a été décrit par

FRANKLAND *et al.* (1978), qui ont travaillé sur des litières de feuilles ; mais il semble difficile pour l'instant d'extrapoler cette technique au sol dont la matière organique non vivante contient des quantités appréciables d'amino-sucres (5 à 10% de l'azote total d'un sol serait sous forme d'hexosamines selon BREMMER, 1965).

II.2. DOSAGE DES COMPOSES NUCLEIQUES.

Les mesures peuvent porter sur les bases nucléiques (CORTEZ, 1982) ou sur l'A.D.N. (TORSVIK et GOKSOYR, 1978). Les techniques de dosages de l'A.D.N. ont tout d'abord été utilisées sur des corps bactériens obtenus par centrifugation fractionnée d'une solution de sol (FAEGRI *et al.*, 1977). L'A.D.N. extrait après lyse des cellules est combiné avec l'acide 3,5-diaminobenzoïque ou avec la mithramycine, antibiotique qui réagit spécifiquement avec la guanine. Le dosage s'effectue ensuite par fluorescence à l'aide d'un spectrophotomètre. TORSVIK (1980) reconnaît toutefois la difficulté de séparer l'A.D.N. de certaines substances humiques.

En dosant non pas l'A.D.N. et/ou l'A.R.N. mais certaines bases nucléïques spécifiques comme la 5-méthyl-cytosine (spécifique des végétaux) il devrait être possible de préciser l'origine des acides nucléïques présents dans le sol (CORTEZ, 1982).

II.3. DOSAGE DE L'A.T.P.

L'Adénosine Tri-Phosphate présente la caractéristique de se trouver dans tous les tissus vivants et de disparaître rapidement, sous l'action d'A.T.P.-ase, après la mort des cellules. La teneur en A.T.P. d'un sol serait ainsi fonction de la masse des organismes vivants qui s'y trouvent.

De nombreuses méthodes ont été proposées pour doser l'A.T.P. dans le sol, leurs protocoles variant essentiellement dans les techniques d'extraction. L'acide trichloracétique (JENKINSON et OADES, 1979), l'acide sulfurique (EILAND, 1979), le bicarbonate de sodium associé au chloroforme (JENKINSON *et al.*, 1979) sont les extractants les plus utilisés. Le dosage *sensu stricto* s'effectue par action du complexe luciférine-luciférase : la transformation du substrat par l'enzyme est fonction de la quantité d'A.T.P. disponible et se traduit par un dégagement d'énergie lumineuse qui est mesurée à l'aide d'un photomètre à haute sensibilité.

Mais les organismes microbiens ne sont pas les seuls pris en compte par cette méthode et des quantités appréciables d'A.T.P. peuvent provenir des cellules végétales en voie de décomposition (DOMSCH *et al.*, 1979). Surtout, il semblerait que la teneur en A.T.P. des micro-organismes varie en fonction de leur type (AUSMUS, 1974), de leur âge et de leur état physiologique (PAUL et VAN VEEN, 1979). Enfin l'efficacité de l'extraction résulte d'une plus ou moins bonne adéquation entre l'extractant utilisé et le sol étudié. Les quantités d'A.T.P. extraites du sol pourraient être affectées par la disponibilité en phosphore ou la richesse en argile (PAUL et VAN VEEN, 1979 ; NANNIPIERI *et al.*, 1978).

Finalement, ces mesures sont difficilement traduisibles en terme de biomasse car le rapport A.T.P./Carbone des cellules varie largement selon les auteurs. Par exemple, OADES et JENKINSON (1979) trouvent un rapport de 1/120 en travaillant sur 11 sols alors que DOMSCH *et al.* (1979) calculent un rapport de 1/500 dans des expériences effectuées avec 6 sols.

Pour notre part, après avoir essayé cette méthode, nous avons estimé que la mesure de l'A.T.P. donnait des résultats satisfaisants pour des cultures pures en milieu liquide, mais que son application à des sols — surtout très différents les uns des autres — posait des problèmes difficiles à résoudre. Cette voie reste intéressante pour étudier au laboratoire les variations en temps court qui suivent un apport de substrat dans un sol donné, mais elle s'avère d'un emploi très délicat.

III. — MESURES D'ACTIVITÉS.

Bien que le lien entre l'activité des micro-organismes et leur masse ne soit pas évident, cet aspect de la question doit pourtant être abordé, car, même si les résultats obtenus ne sont pas utilisables en valeur absolue, on a souvent attaché de

l'importance à leurs variations pour comparer différents sols entre eux ou pour suivre les fluctuations saisonnières.

Il peut s'agir soit des activités enzymatiques soit des activités plus globales comme la respiration du sol, voire même des tests en temps court qui ont plus ou moins l'ambition de quantifier l'état biologique d'un sol.

III.1. ACTIVITES ENZYMATIQUES.

De très nombreux travaux ont été effectués dans ce domaine ; la plupart portent sur des hydrolases (amylase, saccharase, protéase, uréase) ou sur des oxydoréductases (catalase, peroxydase, déshydrogénase, glucose-oxydase). En 1965, DURAND publiait une revue critique de ces travaux qui mettait en évidence l'intérêt mais aussi les limites de telles études. Malgré d'importants perfectionnements techniques de nombreuses limitations subsistent : si l'on peut s'affranchir partiellement des interférences avec les constituants organiques et minéraux du sol par des extractions adaptées (NANNIPIERI *et al.*, 1980), les activités enzymatiques mesurées dans des conditions très artificielles ne donnent que des valeurs potentielles qui peuvent varier selon les conditions expérimentales (par ex. les phosphatases du sol sont sensibles à la présence de phosphore minéral d'après NANNIPIERI *et al.*, 1978). De plus l'activité enzymatique d'un sol n'est pas le fait exclusif des enzymes microbiennes, elle peut être due aussi à l'action d'enzymes libres d'origine et de durée de vie dans le sol indéterminées.

L'activité biologique d'un sol ne peut donc s'apprécier à travers l'étude d'une seule enzyme (FAUVEL et ROUQUEROL, 1970), et si l'on a préconisé d'en envisager plusieurs simultanément, l'interprétation n'est pas facilitée lorsque leurs variations sont contradictoires (CORTEZ *et al.*, 1972).

Il n'est donc pas étonnant que de nombreux auteurs aient éprouvé des difficultés à relier biomasse microbienne et activités enzymatiques, même dans des conditions expérimentales favorables (LADD et PAUL, 1973 ; NANNIPIERI *et al.*, 1979).

Une méthode de mesure plus globale de l'activité enzymatique microbienne a été proposée par SCHNURER et ROSSWALL, 1982. En partant de la constatation que le F.D.A. (3', 6'-diacétylfluorescéine) est hydrolysé dans les micro-organismes en fluorescéine, ces auteurs ont proposé de mettre le sol en présence d'une solution de F.D.A. puis de mesurer par colorimétrie à 490 nm la fluorescence produite après agitation pendant 1 h à 24 °C. La quantité de fluorescéine produite reflète assez bien l'activité enzymatique globale des micro-organismes du sol car de nombreuses enzymes sont responsables de l'hydrolyse (protéases, lipases, estérases). Tous les champignons, la plupart des bactéries, quelques protozoaires et algues hydrolysent le F.D.A. Cette méthode, qui se prête aisément à des déterminations en séries, s'avère prometteuse comme indice d'activité globale des sols.

III.2. RESPIRATION DU SOL.

On a souvent utilisé la respiration globale du sol comme un indice d'activité microbienne. Le CO₂ dégagé est aussi sous la dépendance de la disponibilité du carbone organique. Aussi DOMMERGUES (1960) a-t-il proposé l'utilisation d'un « coefficient de minéralisation du carbone » dans lequel la respiration d'un échantillon de sol en conditions standard (7 jours à 30 °C) est exprimée en pourcentage de la quantité de carbone total présente dans le sol. Même affinés de cette façon, les « tests-respiration » ne sont que qualitatifs car il ne semble pas possible d'établir une relation quantitative entre biomasse microbienne et respiration.

III.3. TESTS DE CONSOMMATION DE SUBSTRAT EN TEMPS COURT.

Après addition d'un substrat facilement assimilable par la plupart des micro-organismes (généralement le glucose), on mesure la vitesse de métabolisation du carbone apporté. Dans le « test-glucose » de MOUREAUX (1957), c'est la proportion de glucose utilisée après une incubation de 24 h à 30 °C qui sert d'indice de l'activité biologique des sols. Des composés carbonés marqués au ¹⁴C, tel l'acide glutamique, ont également été utilisés pour mesurer l'activité biologique des sols grâce à des tests

radio-respirométriques (MAYAUDON, 1971). Plus récemment, ANDERSON et DOMSCH (1978) ont proposé de mesurer les vitesses initiales de métabolisation du glucose. Pour chaque sol, après avoir préalablement déterminé le niveau de saturation en glucose, on enregistre la cinétique de dégagement de CO₂ sur les premières heures. La vitesse maximale de minéralisation du carbone est supposée être proportionnelle à la biomasse microbienne présente dans le sol au moment de l'apport et est supposée rester constante tant que la biomasse n'a pas augmenté (non croissance). En fait, le calcul de la biomasse par cette technique repose sur des résultats obtenus par une autre méthode « physiologique » : les auteurs ont déterminé par régression linéaire sur 12 sols une équivalence biomasse-respiration du glucose (1 ml de CO₂ produit par heure correspond à 40 mg de carbone-biomasse). Cette approche est donc indirecte et elle est implicitement basée sur le postulat qu'à biomasse égale les microflores de différents sols ont la même « activité ».

Or un apport massif de substrat ne favorise qu'une partie de la microflore et l'aptitude de différents sols à minéraliser le glucose peut être affectée par les proportions relatives des différents micro-organismes autant que par leur biomasse totale.

Les parts respectives des respirations fongiques et bactériennes ont d'ailleurs été recherchées par ANDERSON et DOMSCH (1975) grâce à l'utilisation simultanée de glucose et d'inhibiteurs spécifiques (streptomycine et actidione). Mais là encore le passage d'une mesure de respiration à une mesure de biomasse reste délicat car le rapport respiration bactérienne/respiration fongique est probablement différent du rapport biomasse bactérienne/biomasse fongique (CLARK, 1967).

IV. — MÉTHODES BIOCIDALES*.

Il est possible de tuer la plupart des micro-organismes du sol par action de rayonnements ou de produits chimiques. Cette biomasse morte peut servir de substrat aux survivants ou aux germes apportés par réensemencement qui produisent, au cours de la minéralisation, une quantité de CO₂ fonction de l'importance de la biomasse tuée.

La technique la plus couramment utilisée a été proposée par JENKINSON (1966, 1976). Elle consiste à tuer les micro-organismes par des vapeurs de chloroforme puis à incuber l'échantillon traité après l'avoir réensemencé. Par rapport au sol témoin, le traitement fumigé montre une phase de minéralisation très rapide (« flush » en anglais) de carbone et d'éléments minéraux (N,P,S,...). En ce qui concerne le carbone, par exemple, le « flush » de gaz carbonique produit lors de l'incubation est proportionnel à la biomasse à un coefficient Kc près :

$$\text{C-biomasse} = \frac{\text{Flush C-CO}_2}{\text{Kc}}$$

Pour mesurer la biomasse, il faut donc d'une part enregistrer le « flush » de décomposition des corps microbiens, d'autre part déterminer la valeur du coefficient Kc.

Le « flush » de minéralisation du carbone microbien dure de 5 à 10 jours selon le type de sol et la température d'incubation. Mais le CO₂ total dégagé provient également pour une part de la minéralisation de la matière organique non vivante et il convient d'effectuer une correction pour en tenir compte (JENKINSON et POWLSON, 1976 ; CHAUSSOD et NICOLARDOT, 1982).

Le coefficient Kc a été calculé après incorporation de quantités connues de micro-organismes dans le sol. JENKINSON (1976) proposait une valeur de 0,5 alors que ANDERSON et DOMSCH (1978) calculent un coefficient moyen de 0,41 sur une trentaine de micro-organismes marqués au ¹⁴C. NICOLARDOT *et al.* (1983) ont cependant montré que la valeur Kc varie sensiblement selon les types de sol entre 0,3 et 0,5 pour un micro-organisme donné.

De façon analogue, on doit pouvoir accéder aux compartiments azote, phosphore et soufre de la biomasse en mesurant l'accroissement de la concentration de ces éléments dans le sol après fumigation. Des techniques ont déjà été mises au point pour le phosphore (BROOKES *et al.*, 1982 ; HEDLEY et STEWART, 1982) et le soufre (SAGGAR

* Nous empruntons ce terme à BOTTNER (1982).

et al., 1981). Dans le cas de l'azote, NICOLARDOT et al. (1983) montrent avec des champignons marqués au ^{15}N que le coefficient K_n varie selon le rapport C/N des micro-organismes.

Une autre approche consiste à marquer la biomasse microbienne *in situ* en apportant au sol du glucose ^{14}C (BOTNER, 1976) ou une matière organique d'origine végétale marquée ^{14}C et ^{15}N (LADD et al., 1981 ; MNEIMNE, 1981). Cette voie présente l'avantage d'une relative simplicité et les micro-organismes produits ont des caractéristiques vraisemblablement assez proches de celles des micro-organismes préexistants. Par contre, on ne connaît pas la proportion de la biomasse qui est marquée ni la proportion du traceur qui est entrée dans la biomasse. Par exemple, la partie du glucose apporté qui n'est pas minéralisée lors de l'incubation n'est pas entièrement incorporée dans la biomasse : une fraction peut rester sous forme de matière organique non vivante de nature indéterminée (métabolites, etc.). Il s'en suit une certaine difficulté à estimer de cette façon la valeur des coefficients K_c ou K_n (VORONEY et PAUL, 1983).

Réciproquement l'apport de micro-organismes marqués préalablement cultivés en milieu liquide autorise une mesure précise de K_c ou K_n . Mais ces conditions sont plus artificielles (composition et environnement différents de ceux de la biomasse native).

Une réserve a été formulée sur la validité de la méthode en ce qui concerne les sols acides. JENKINSON et LADD (1981) avancent qu'elle n'est pas applicable aux sols dont le pH est inférieur à 4,5 ; pourtant CERRI et JENKINSON (1981) trouvent un flush normal et une biomasse plausible dans un sol à pH 3,6. Pour les sols calcaires, il faudrait également vérifier qu'une perturbation de l'équilibre des carbonates n'entraîne pas d'erreur trop importante sur la mesure du « flush ».

Mais dans le cas général, pour les sols cultivés, les résultats obtenus sont très fiables et la précision obtenue est tout à fait satisfaisante. Il est possible de vérifier la plupart des hypothèses sur lesquelles repose cette méthode (JENKINSON et LADD, 1981) qui présente avant tout l'intérêt d'accéder directement au compartiment microbien des éléments importants au plan agronomique. Par contre, elle exige un temps relativement long (2 à 3 semaines) pour obtenir le résultat et est le plus souvent inadaptée à des mesures de variations en temps court.

DISCUSSION - CONCLUSION.

A l'évidence, les différentes approches présentées ici ne sont pas directement comparables. Elles possèdent toutes leurs avantages et leurs inconvénients, leur spécificité ou leur domaine privilégié d'application en fonction du but poursuivi. Les travaux comparant plusieurs méthodes sur différents sols (KACZMAREK et al., 1976 ; DOMSCH et al., 1979 ; ROSS et al., 1980 ; SPARLING et al., 1981...) mettent parfaitement en évidence les difficultés rencontrées. Ces difficultés sont de deux types : d'une part les résultats obtenus par des techniques différentes sont rarement concordants, d'autre part le passage d'une mesure — quelle qu'elle soit — à un résultat exprimé en **biomasse** paraît souvent aléatoire.

En ce qui concerne les numérations par exemple, les dénombrements par suspensions-dilutions donnent des valeurs considérablement plus faibles que les observations directes. Seules ces dernières sont à peu près cohérentes avec les mesures d'A.T.P., encore que PAUL et JOHNSON (1977) aient trouvé des variations de teneur en A.T.P. sans lien avec des changements de populations microbiennes. La conversion A.T.P./biomasse est d'ailleurs très controversée : OADES et JENKINSON (1979) pensent que l'on peut mesurer une biomasse par un dosage d'A.T.P. et proposent un facteur de conversion, mais de nombreux auteurs sont plus réservés à ce sujet et considèrent les dosages d'A.T.P. davantage comme des mesures d'activité.

La traduction en termes de biomasse d'autres activités (respiration du glucose, hydrolyse du F.D.A., activités enzymatiques...) est encore plus hasardeuse.

En fait, les différentes méthodes d'études peuvent être réunies en deux groupes :

— les unes permettent l'accès plus ou moins direct à une biomasse pondérale : observations microscopiques, méthodes bioclales ;

— les autres mesurent les activités de tout ou partie de la microflore. Elles sont souvent difficiles à interpréter et ne donnent généralement pas de résultats traduisibles en termes de « biomasse ».

Les mesures d'activité peuvent avoir une utilité dans des cas particuliers (étude d'une transformation spécifique par exemple) ou complément qualitatif à des mesures de biomasse. Mais une préoccupation essentielle de la Science du Sol reste la détermination de la masse des micro-organismes présents dans un sol donné à un instant donné. A cet égard, la mesure de biomasse par fumigation au chloroforme possède des caractéristiques très intéressantes au plan de la fiabilité et de la précision. De plus cette méthode s'avère parfaitement adaptée aux recherches sur les cycles biogéochimiques des éléments car elle peut être associée à l'utilisation de traceurs isotopiques.

SUMMARY

REVIEW OF THE MAIN AVAILABLE METHODE FOR ESTIMATING OF THE MICROBIAL BIOMASS AND ITS ACTIVITIES

In different fields of Soil Science the need for an accurate and reliable method for the microbial biomass estimation is real. As a matter of fact, the soil microflora is a living, therefore active, compartment of the organic matter, and this compartment includes elements of great agronomical importance (C,N,P...).

The authors make a critical review of the main methods available for the microbial biomass estimation.

The measurements by direct observation after staining are often considered as references but are too long and tedious.

The counting methods (M.P.N.) give a number of viable propagules which generally cannot be expressed in terms of biomass.

The quantitative analysis of the compounds specific of living matter raises also the question of the extraction and purification and of the yield coefficient between the dosed compound (ex: A.T.P.) and the biomass.

The measurements of enzymatic activities do not give an estimation of the mass of microorganisms, although more global tests as short-term glucose respiration or FDA hydrolysis could be correlated with biomass.

The chloroform fumigation method proved to be the most convenient to give a relatively simple, precise and reliable access to the soil microbial biomass compartment. It is well suited to the study of the biogeochemical cycles of the elements as it can be combined with the use of isotopic tracers.



Bibliographie

- ANDERSON J.-P.-E., DOMSCH K.-H. (1975). — *Can. J. Microbiol.*, **21**, 314-322.
- ANDERSON J.-P.-E., DOMSCH K.-H. (1978). — *Soil Biol. Biochem.*, **10**, 207-213 et 215-221.
- AUSMUS B.-S., WITKAMP M. (1974). — *Oak Ridge National Lab. Report*, 176 p.
- BABIUK L.-A., PAUL E.-A. (1970). — *Can. J. Microbiol.*, **16**, 57-62.
- BALKWILL D.-L., RUCINSKY T.-E., CASIDA L.-E. (1977). — *Antonie van Leeuwenhoek*, **43**, 73-87.
- BOTTNER P., LOSSAINT P., CORTEZ J. (1976). — *In Soil Organic Matter Studies, Symposium IAEA-FAO, Braunschweig*, 263-273.
- BOTTNER P. (1982). — *In C.R. Groupe Matière Organique, Bonnevaux*, 4 p.
- BREMMER J.-M. (1965). — *In Methods of Soil Analysis, Agronomy*, n° 9, 1149-1255.
- BROOKES P.-C., POWLSON D.-S., JENKINSON D.-S. (1982). — *Soil Biol. Biochem.*, **14**, 319-329.
- CERRI C.-C., JENKINSON D.-S. (1981). — *J. Soil Sci.*, **32**, 619-626.
- CHAUSSOD R., NICOLARDOT B. (1982). — *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, **19**, 501-512.
- CLARK R.-E. (1967). — *In Soil Biology, Acad. Press*, 15-49.
- CORTEZ J., LOSSAINT P., BILLES G. (1972). — *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, **9**, 1-19.
- CORTEZ J. (1982). — *In C.R. Groupe Matière Organique, Bonnevaux*, 7 p.
- DOMMERS G. Y. (1960). — *Agron. Trop.*, **15**, 61-72.
- DOMSCH K.-H., BECK T., ANDERSON J.-P.-E., SODERSTROM B., PARKINSON D., TROLLENIER G. (1979). — *Z. Pflanzener Bodenkd.*, **142**, 520-533.
- DURAND G. (1965). — *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, **2**, 141-205.
- EILAND F. (1979). — *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 31-35.
- FAEGRI A., TORSVIK U.-L., GOKSOYR J. (1977). — *Soil Biol. Biochem.*, **9**, 105-112.
- FAUVEL B., ROCQUEROL T. (1970). — *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, **7**, 393-406.
- FOURNIER J.-C. (1980). — *Chemosphere*, **9**, 169-174.
- FRANKLAND J.-C., LINDLEY D.-K., SWIFT M.-J. (1978). — *Soil Biol. Biochem.*, **10**, 323-333.
- HATTORI T. (1976). — *Rep. Inst. Agr. Res. Tohoku Univ.*, **27**, 23-30.
- HEDLEY M.-J., STEWART J.-W.-B. (1982). — *Soil Biol. Biochem.*, **14**, 377-385.
- JENKINSON D.-S. (1966). — *J. Soil Sci.*, **17**, 280-302.
- JENKINSON D.-S. (1976). — *Soil Biol. Biochem.*, **8**, 203-208.
- JENKINSON D.-S., POWLSON D.-S. (1976). — *Soil Biol. Biochem.*, **8**, 209-213.
- JENKINSON D.-S., OADES J.-M. (1979). — *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 193-199.
- JENKINSON D.-S., DAVIDSON S.-A., POWLSON D.-S. (1979). — *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 521-528.
- JENKINSON D.-S., LADD J.-N. (1981). — *In Soil Biochemistry*, vol. 5, M. Dekker, 415-471.
- JONES P.-C.-T., MOLLISON J.-E. (1948). — *J. Gen. Microbiol.*, **2**, 54-69.
- KACZMAREK W., KASZUBIA K. H., PEDZIWIŁK Z. (1976). — *Ekol. Polska*, **24**, 399-406.
- KILBERTUS G. (1980). — *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, **17**, 543-557.
- KING J.-D., WHITE D.-C. (1977). — *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 777-783.
- LADD J.-N., PAUL E.-A. (1973). — *Soil Biol. Biochem.*, **5**, 825-840.
- LADD J.-N., OADES J.-M., AMATO M. (1981). — *Soil Biol. Biochem.*, **13**, 119-126.
- Mac CRADY M.-H. (1918). — *Public Health J.*, **9**, 201-220.
- MANGENOT F. (1982). — *In C.R. Groupe Matière Organique, Bonnevaux*, 7 p.
- MAYAUDON J. (1971). — *In Soil Biochemistry*, vol. 2, M. Dekker, 202-256.
- MNEIMNE Z. (1981). — *Thèse Univ., Montpellier*, 61 p.
- MOUREAUX C. (1957). — *Mem. Inst. Sci., Madagascar D*, **8**, 225-241.
- NANNIPIERI P., JOHNSON R.-L., PAUL E.-A. (1978). — *Soil Biol. Biochem.*, **10**, 223-229.
- NANNIPIERI P., PEDRAZZINI F., ARCARA P.-G., PIOVANELLI C. (1979). — *Soil Sci.*, **127**, 26-34.
- NANNIPIERI P., CECCANTI B., CERVELLI S., MATARESE E. (1980). — *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **44**, 1011-1016.
- NICOLARDOT B., CHAUSSOD R., CATROUX G. (1983). — *Soil Biol. Biochem.* (proposé pour publication).
- NICOLARDOT B., GUIRAUD G., CHAUSSOD R. (1983). — *C.R. Acad. Sci., Paris* (proposé pour publication).
- OADES J.-M., JENKINSON D.-S. (1979). — *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 201-204.
- PARKINSON D. (1973). — *Bull. Ecol. Res. Comm.*, **17**, 29-36.
- PAUL E.-A., JOHNSON R.-L. (1977). — *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 263-269.
- PAUL E.-A., VAN VEEN J.-A. (1979). — *In Modelling nitrogen from farm wastes. Appl. Sci. publishers*, 75-132.
- PAUL E.-A., VORONEY R.-P. (1980). — *In Contemporary Microbial Ecology, Acad. Press*, 215-237.
- PETERSON H.-L., FREDERICK L.-R. (1979). — *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 77-83.
- POCHON J., TARDIEUX P. (1962). — *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*, éd. La Tourelle, 112 p.
- ROSER D.-J. (1980). — *Soil Biol. Biochem.*, **12**, 329-338.
- ROSS D.-J., TATE K.R., CAIRNS A., PANSIER E.-A. (1980). — *Soil Biol. Biochem.*, **12**, 375-383.
- SAGGAR S., BETTANY J.-R., STEWART J.-W.-B. (1981). — *Soil Biol. Biochem.*, **13**, 493-498.
- SCHNURER J., ROSSWALL T. (1982). — *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1256-1261.
- SODERSTROM B.-E. (1979). — *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 147-148.
- SPARLING G.-P., ORD B.-G., VAUGHAN D. (1981). — *Soil Biol. Biochem.*, **13**, 99-104.
- STEVENSON I.-L. (1958). — *Plant Soil*, **10**, 1-8.
- SUNDMAN V., SIVELA S. (1978). — *Soil Biol. Biochem.*, **10**, 399-401.
- TORSVIK V.-L., GOKSOYR J. (1978). — *Soil Biol. Biochem.*, **10**, 7-12.
- TORSVIK V.-L. (1980). — *Soil Biol. Biochem.*, **12**, 15-21.
- VORONEY R.-P., PAUL E.-V. (1983). — *Soil Biol. Biochem.* (in press).

ur

Walden