

# MESURE EN ROUTINE DE LA BIOMASSE MICROBIENNE DES SOLS PAR LA METHODE DE FUMIGATION AU CHLOROFORME

R. CHAUSSOD <sup>(1)</sup>, B. NICOLARDOT <sup>(1)</sup> et G. CATROUX <sup>(1)</sup>

## RESUME

*Pour la plupart des sols cultivés, la quantité de carbone présente dans la biomasse microbienne peut être déterminée en routine par la méthode de JENKINSON. La technique, faisant appel à une fumigation au chloroforme suivie d'une incubation en conditions standard est décrite de même que le dosage du CO<sub>2</sub> par colorimétrie en flux continu.*

*Les conditions de traitement et de stockage des échantillons de sol avant la mesure proprement dite sont discutées. Il est recommandé de les conserver à leur humidité de prélèvement en aérobiose et au frais (4 à 10°C) si la durée de stockage ne dépasse pas quelques semaines. Pour une durée supérieure, la congélation peut éventuellement être acceptée mais le séchage est à proscrire.*

## INTRODUCTION

Le besoin existe — et il est de plus en plus nettement exprimé — de mesurer de façon *quantitative* la biomasse microbienne des sols, parallèlement à une quantification des transformations effectuées par les micro-organismes (mesure des « activités potentielles »). Pour mesurer la biomasse microbienne, de nombreuses méthodes ont été proposées. Une étude critique des différentes techniques disponibles (NICOLARDOT et coll., 1982) nous a permis de montrer que la méthode de fumigation au chloroforme préconisée par JENKINSON et POWLSON (1976) s'avère plus intéressante.

Cette méthode, dont le domaine privilégié d'application est le laboratoire et pour laquelle des recherches d'ordre méthodologique restent à effectuer, devrait permettre de caractériser les sols et éventuellement d'étudier l'incidence de pratiques agronomiques. Mais une utilisation « en routine » pour acquérir des données de terrain nécessite une standardisation et si possible une simplification de la technique. C'est dans cette optique que nous présentons ici une synthèse de données de la littérature et de résultats expérimentaux concernant d'une part la détermination de la biomasse proprement dite (fumigation-incubations-dosages), d'autre part l'influence du traitement des échantillons avant mesure (prélèvement-conservation-stockage). Pour ce dernier point, il est important en effet d'éviter les traitements qui invalideraient les résultats de la mesure.

## I - MATERIEL ET METHODES

### ECHANTILLONS DE SOLS

Nous avons travaillé sur des échantillons remaniés prélevés dans l'horizon de surface (0-20 cm) de différents sols cultivés. Ces échantillons de sols — en fait des « terres »

(1) I.N.R.A. - Laboratoire de Microbiologie des Sols - BV 1540 - 21034 DIJON Cédex.

**Tableau I : Caractéristiques analytiques des échantillons de sols utilisés déterminations effectuées par le laboratoire d'analyses des sols de l'I.N.R.A. - Arras).**  
*Analytical characteristics of the studied soil samples.*

ECHANTILLON ANALYSES		1	2	3	4	5	6	
		DIJON	DIJON	SAULIEU	AUXONNE	BRESSEY	VEUVEY	
Granulométrie								
A	%	32,8	33,6	14,7	10,4	40,9	45,0	
LF	%	31,7	32,4	10,5	8,4	41,4	31,3	
LG	%	21,8	18,9	1,1	2,6	4,7	12,0	
SF	%	11,2	11,6	13,6	16,9	6,0	4,6	
SG	%	2,5	3,5	60,1	61,7	7,0	7,1	
CaCO <sub>3</sub> total		%	1,3	5,1	0	0	30,5	2,9
pH eau			7,8	8,0	6,0	7,6	7,9	7,9
pH KCl N			7,1	7,0	4,9	6,9	7,1	7,0
C "Anne"		%	11,8	14,4	11,8	10,0	47,3	38,1
N "Kjeldahl"		%	1,40	1,65	1,13	0,91	5,7	4,8
C.E.C. "Metson"		mEq/100g	20,8	19,0	8,6	8,3	30,0	23,2
H.E. à 1 000g <sup>+</sup>		%	25	25	14	10	37	35

pour les pédologues — ont été prélevés dans des champs labourés, exception faite de l'échantillon n° 2 prélevé sous prairie. Les sols d'où proviennent les matériaux de cette étude sont brièvement décrits ci-dessus (Tab. I).

Echantillons 1 et 2 : sol brun calcaire sur marne oligocène.

Echantillon n° 3 : sol brun acide sableux sur arène granitique du Morvan.

Echantillon n° 4 : sol sableux à hydromorphie de nappe des basses terrasses de la Saône.

Echantillon n° 5 : sol alluvial calcaire à hydromorphie de nappe sur graviers de la tille.

Echantillon n° 6 : sol alluvial argileux de la vallée de l'Ouche.

## TRAITEMENTS

Les terres sont utilisées soit à « l'état frais » dans les jours qui suivent le prélèvement et après tamisage à 5 mm, soit après différents prétraitements :

a) Stockage plus ou moins prolongé à l'état frais (c'est-à-dire à l'humidité du sol lors du prélèvement) et à différentes températures.

b) Séchage préalable à l'air ou sous courant d'air sec.

c) Congélation préalable, avec ou sans décongélation avant mesure.

## FUMIGATION

La fumigation est effectuée dans les conditions décrites par CHAUSSOD et NICOLARDOT (1982). A raison de quatre à six répétitions par traitement, les échantillons de 40 ou 50 g de terre, précisément pesés, sont placés dans une étuve à vide d'une capacité de 50 litres avec 150 ml de chloroforme lavé au moins quatre fois à l'eau distillée pour retirer l'éthanol qu'il convient. Une expérience, réalisée avec de l'éthanol marqué au <sup>14</sup>C, a montré que cette purification simplifiée est tout à fait satisfaisante. Ensuite, le vide est réalisé dans l'enceinte et les échantillons sont laissés une nuit (18 h) en présence de vapeurs de chloroforme. Ces vapeurs sont retirées par quatre ou cinq vides successifs (pompe à palettes) entrecoupées de rinçages à l'air.

## INCUBATION

Les pertes d'eau durant la fumigation sont compensées après pesée des échantillons sortant de l'étuve à vide et leur humidité est ajustée à une valeur adaptée aux terres étudiées (NICOLARDOT, 1983). Les échantillons sont alors placés dans des flacons hermétiques de 575 ml ou de 1 litre, avec un piège à CO<sub>2</sub> constitué par 10 ou 20 ml de soude 0,25 N (selon le type de sol). L'incubation dure au minimum deux semaines à 28°C, le CO<sub>2</sub> dégagé étant dosé après sept, quatorze jours et éventuellement vingt-huit jours.

 DOSAGE DU CO<sub>2</sub>

Le CO<sub>2</sub> piégé dans la soude est dosé par colorimétrie en flux continu à l'aide d'une méthode dérivée de celle préconisée par MORFAUX et al, 1972. Le diagramme des flux est représenté en figure 1. La soude des pièges à CO<sub>2</sub> est versée dans les godets, qui sont immédiatement couverts par un « parafilm »\* empêchant la contamination par le CO<sub>2</sub> atmosphérique. L'échantillon prélevé est traité par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N et le CO<sub>2</sub> passe en phase gazeuse, dans les bulles d'air de la segmentation du flux acide. Une aliquote du gaz prélevé au niveau d'un séparateur de phase est mise au contact d'un tampon carbonate-bicarbonate (dont la concentration est fonction de la gamme de mesure) coloré par la phénol-phtaléine. L'intensité de la décoloration, déterminée à 570 nm, est fonction de la concentration de CO<sub>2</sub>. Un « blanc » permet de tenir compte de la carbonatation initiale de la soude et du CO<sub>2</sub> piégé à partir de l'atmosphère du flacon d'incubation. Les résultats sont toujours exprimés en mg C/kg sol sec.

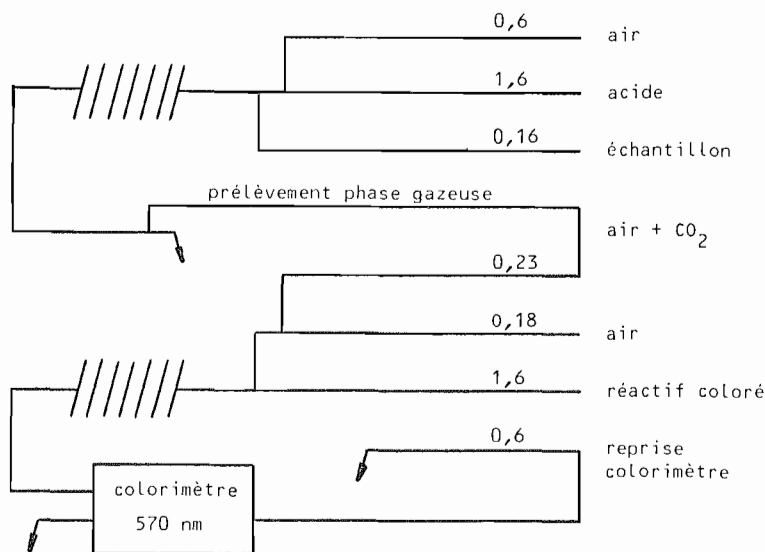


Figure 1 : Diagramme des flux pour dosage du C-CO<sub>2</sub> en flux continu (débits en ml/mm).  
Automatic method for the determination of C-CO<sub>2</sub> trapped in NaOH (flow rates in ml/mm).

## ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

Les dénombrements de germes ont été effectués par la méthode du Nombre le Plus Probable (Mac CRADY, 1918), à partir de suspensions-dilutions et culture en milieu liquide sur extrait de terre à raison de cinq tubes par dilution (POCHON et TARDIEUX, 1962). La mise en suspension initiale a été réalisée dans une solution de pyro-phosphate de sodium à 1 pour mille.

\*Parafilm = marque déposée de l'American Can Company.

## II. RESULTATS ET DISCUSSIONS

### A) Incubation et calcul de la biomasse

Après fumigation, on cherche à enregistrer de façon la plus complète la minéralisation des corps microbiens. La température, l'humidité et la durée d'incubation doivent être choisies en conséquence. Se pose également le problème de la réinoculation des échantillons fumigés.

#### REINOCULATION

Le nombre de « propagules viables » après fumigation est encore très élevé ; les résultats obtenus pour l'échantillon n° 1 (tableau II) confirment ceux de SHIELDS et coll. (1974) et de LYNCH et PANTING (1980). De fait, la réinoculation a souvent peu d'influence sur le dégagement de CO<sub>2</sub> à partir des sols fumigés, et lorsque l'effet est significatif sur le « flush » il l'est aussi sur le coefficient K<sub>C</sub>, ce qui mène à une valeur de biomasse qui n'est pas statistiquement différente de celle obtenue sans réinoculation (CHAUSSOD, NICOLARDOT et CATROUX, résultats non publiés).

**Tableau II : Effet de la fumigation au chloroforme sur le nombre de germes par gramme de terre sèche dans le sol n° 1 prélevé en novembre 1980 (partie supérieure du tableau) et en décembre 1983 (partie inférieure).**

*Effect of the chloroform fumigation on the number of microorganisms in soil samples from soil n° 1 sampled on November 1980 (upper part of the table) and on December 1983 (lower part).*

	NOMBRE DE PROPAGULES VIABLES	
	avant fumigation	après fumigation
Flore "totale" sur échantillon frais	5,7 .10 <sup>8</sup>	7,9 .10 <sup>6</sup>
Flore "totale" sur échantillon séché à l'air	6,9 .10 <sup>7</sup>	1,3 .10 <sup>6</sup>
Flore "totale" sur échantillon frais	2,3 .10 <sup>7</sup>	2,3 .10 <sup>6</sup>
Flore "fongique" sur échantillon frais	1,5 .10 <sup>5</sup>	6,2 .10 <sup>3</sup>

#### HUMIDITE D'INCUBATION

L'humidité doit être choisie proche de l'optimum, c'est-à-dire aussi élevée que possible tout en restant compatible avec une parfaite aérobose. Cela nécessite d'établir préalablement la relation activité biologique/teneur en eau (NICOLARDOT, 1983) ou à défaut de se placer au voisinage de l'humidité équivalente déterminée entre pF3 (pour les terres argileuses) et pF1 (pour les terres sableuses).

#### TEMPERATURE D'INCUBATION

La température et la durée d'incubation sont deux facteurs indissociables. JENKINSON et POWLSON (1976) proposent d'incuber les échantillons de sols à 25 °C sur des périodes de dix jours. En fait, un pas-de-temps de sept jours s'avère plus pratique, ce qui nécessite d'augmenter la température pour compenser la réduction de la durée d'incubation. Nous avons adopté une température de 28 °C qui a l'avantage de permettre une détermination simultanée de l'azote « minéralisable » selon DROUINEAU et LEFEVRE (1949) dans les échantillons non fumigés.

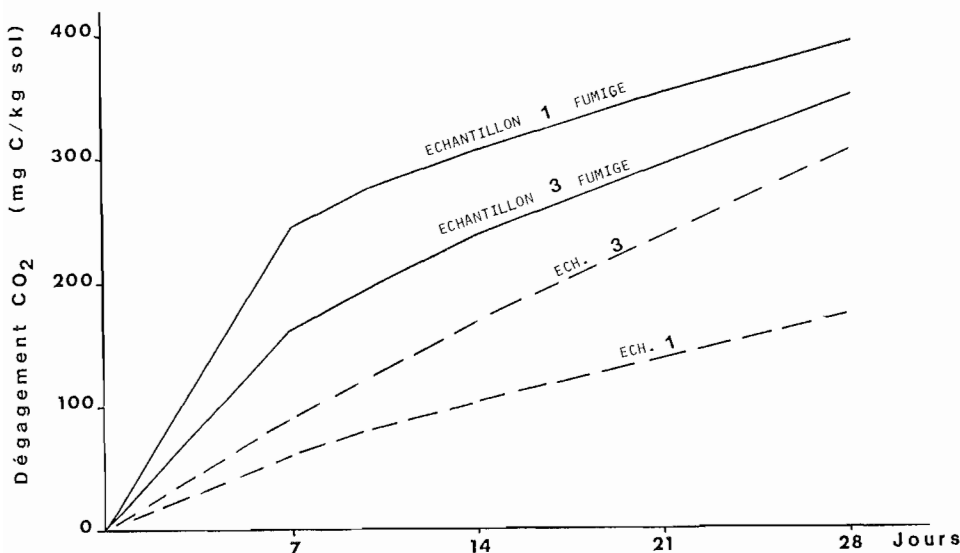


Figure 2 : Dégagement de C-CO<sub>2</sub> dans les échantillons de sols 1 et 2, fumigés ou non.  
C-CO<sub>2</sub> evolution from soil samples 1 and 3 fumigated or not.

Compte tenu des vitesses de minéralisation des corps microbiens on peut considérer que la plus grande partie du carbone minéralisable est dégagée sous forme de CO<sub>2</sub> en sept jours à 28°C (CHAUSSOD et NICOLARDOT, 1982). Néanmoins, les échantillons de sols acides présentent parfois une cinétique plus amortie (figure 2) et nécessitent davantage de précautions lors de l'appréciation du « flush », de la correction à effectuer, du coefficient  $K_C$  à utiliser (CHAUSSOD et al., 1985).

Dans le CO<sub>2</sub> total dégagé lors de l'incubation, une partie provient de la matière organique ou microbienne, ce qui impose d'effectuer une correction pour ne prendre en compte dans le « flush » que le carbone microbien. Différentes corrections ont été proposées : JENKINSON et POWLSON (1976) estiment le carbone d'origine non microbienne par la quantité de CO<sub>2</sub> dégagée dans l'échantillon non fumigé entre dix et vingt jours, considérant qu'entre zéro et dix jours le témoin aussi est perturbé. SPARLING (1981), négligeant cette perturbation, retire la quantité de CO<sub>2</sub> dégagée entre zéro et dix jours dans le témoin. CHAUSSOD et NICOLARDOT (1982) évaluent le CO<sub>2</sub> non microbien dans les échantillons fumigés, mais après le flush, soit entre sept et quatorze jours. ROSS et TATE (1984) montrent que la valeur obtenue pour la biomasse peut être sérieusement affectée par le mode de correction retenu. Aucune correction n'est totalement satisfaisante, celle que nous avons suggérée étant au plan microbiologique la moins critiquable et est particulièrement utile lorsque la pente de respiration dans l'échantillon fumigé est différente de celle du témoin (cas de l'échantillon n° 3, figure 2). Mais dans le cas des tourbes ou des sols très acides la méthode de JENKINSON est parfois inopérante, le dégagement de CO<sub>2</sub> dans le témoin étant supérieur à celui enregistré dans l'échantillon fumigé (SPARLING et al., 1981).

Hormis ces cas particuliers, la biomasse est calculée en divisant le flush ( $F_{0-7} - F_{7-14}$ ) par un coefficient de proportionnalité ( $K_C$ ) qui représente la fraction minéralisable en CO<sub>2</sub> du carbone de la biomasse. Le  $K_C$  est alors soit arbitrairement considéré comme constant et égal à 0,45 (JENKINSON and LADD, 1981), soit évalué en tenant compte du type de sol (NICOLARDOT et coll., 1984). Bien entendu, les valeurs de  $K_C$  dépendent de la température d'incubation et du pas-de-temps choisi. L'incertitude sur la valeur de la biomasse dépend en premier lieu du coefficient  $K_C$ .

## B) Influence des prétraitements sur la mesure de biomasse

D'après les données de la littérature, le tamisage des échantillons de sol n'est théoriquement pas indispensable (ROSS et al., 1980), mais il améliore la reproductivité en homogénéisant l'échantillon, et favorise la pénétration du chloroforme dans les terres argileuses très humides (JENKINSON et POWLSON, 1980). Il est donc recommandable d'effectuer un tamisage à la maille de 5 mm, en forçant le moins possible la terre à travers le tamis pour éviter les perturbations mécaniques de type broyage qui peuvent tuer une partie de la microflore (POWLSON, 1980) ou rendre plus disponible de la matière organique non vivante (SORENSEN, 1979).

Si la mesure de biomasse ne peut être effectuée rapidement après le prélèvement, il faut envisager une méthode de conservation-stockage. Nous avons donc étudié l'influence de différents traitements et de la durée du stockage sur le dégagement de CO<sub>2</sub> après fumigation ainsi que dans les échantillons non fumigés.

### 1. Stockage des échantillons humides à température contrôlée :

La méthode la plus naturelle de conservation d'un échantillon biologique tel qu'une terre est le stockage à « l'état frais », c'est-à-dire à son humidité de prélèvement, dans des conditions où il évolue peu. Nous avons donc étudié l'influence, sur la mesure de biomasse microbienne, du stockage des terres humides en envisageant d'une part l'effet de la température (de 4 à 28°C), d'autre part l'effet du type de sol, à température constante de 8°C.

L'effet de la température de stockage a été étudié sur la terre n° 1. Le tableau III rapporte les valeurs de C-CO<sub>2</sub> dégagées dans les traitements fumigés et non fumigés après un mois et trois mois de stockage entre 4 et 28°C.

**Tableau III : Dégagement de C-CO<sub>2</sub> dans l'échantillon de sol n° 1 incubé à 28°C après fumigation ou non, en fonction de la température et de la durée de stockage. Résultats exprimés en mgC/kg sol. Moyennes de 4 répétitions. C.V. ≤ 5%.**

$$\text{Biomasse} = \frac{F_{0-7} - F_{7-14}}{0,41}$$

**Respiration Spécifique = respiration en mgC-CO<sub>2</sub> par jour (entre 14 et 28 jours) et par unité de C-biomasse.**

*C-CO<sub>2</sub> evolution at 28°C in the soil sample n° 1, fumigated or not, according to the storage length and temperature. Results expressed in mgC/kg soil. Means of 4 replicates. S.D. ≤ 5%.*

*Specific respiration = C-CO<sub>2</sub> respiration per day and per unit of C-biomass.*

TRAITEMENT	ECHANTILLON FUMIGÉ			ECHANTILLON TEMOIN			BIOMASSE MICROBIENNE	RESPIRATION SPÉCIFIQUE	
	F <sub>0-7</sub>	F <sub>7-14</sub>	F <sub>14-28</sub>	T <sub>0-7</sub>	T <sub>7-14</sub>	T <sub>14-28</sub>			
Mesure au moment du prélèvement (to) = Nov. 1982	242,3	73	113,8	101,7	64,8	112,2	413	19 · 10 <sup>-3</sup>	
Après stockage 1 mois	4°C	252,2	72,5	ND	97,1	60,2	95,3	438	16 · 10 <sup>-3</sup>
	10°C	246,2	69,3	ND	95,7	56,7	94,8	431	16 · 10 <sup>-3</sup>
	20°C	253,6	75,4	ND	89,3	55,9	95,5	435	16 · 10 <sup>-3</sup>
	à 28°C	226,4	71,6	ND	69,1	54,3	90,6	378	17 · 10 <sup>-3</sup>
Après stockage 3 mois	4°C	238,1	76,1	125,8	ND	ND	ND	395	/
	10°C	232,5	77,9	131,4	ND	ND	ND	377	/
	20°C	215,9	72,6	119,1	77,0	53,6	93,1	350	19 · 10 <sup>-3</sup>
	à 28°C	220,7	78,5	113,8	ND	ND	ND	347	/

MESURE DE LA BIOMASSE MICROBIENNE

Après un mois à 4, 10 ou 20° C, la faible augmentation (4 à 6 %) de la biomasse par rapport à la valeur initiale, n'est pas statistiquement significative. Mais la respiration des échantillons non fumigés a baissé et la respiration spécifique (CO<sub>2</sub> dégagé dans le témoin en phase stationnaire, soit ici entre quatorze et vingt-huit jours, exprimé en mg C-CO<sub>2</sub> par mg C-biomasse et par jour) diminue sensiblement. Cet indice, déjà utilisé par BOTTNER et coll. (1984) représente une donnée biologique importante pour caractériser un échantillon de sol.

Après trois mois, dans nos conditions expérimentales, la décroissance de la biomasse par rapport au départ n'est que de 7 % à 4° C. La diminution est d'autant plus importante que la température est élevée et elle atteint 18 % à 20 et 28° C.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux rapportés par TATE et JENKINSON (1982) qui ont suivi l'évolution de la biomasse et de la teneur en ATP d'un échantillon conservé sept jours à 10 ou 25° C. Ces auteurs observent une augmentation de la teneur en ATP (qui peut être due au réchauffement de la terre prélevée à 5,5° C) et une augmentation apparente de la biomasse qui s'explique essentiellement par la diminution de la respiration dans le traitement non fumigé utilisé pour la correction du « flush ». Pour notre part, nous avons souvent observé une augmentation de la biomasse lors des premières semaines de stockage, suivie d'une diminution plus ou moins marquée selon le type de sol.

L'influence du type de sol sur l'évolution de la biomasse au cours du stockage a été étudié sur les échantillons 1, 3, 4, 5 et 6. Le tableau IV rapporte les valeurs de C-CO<sub>2</sub> dégagé dans les traitements fumigés et non fumigés, d'une part dans les jours qui ont suivi le prélèvement, d'autre part après cinq mois ou dix mois de stockage à 8° C.

**Tableau IV : Influence d'une conservation préalable de plusieurs mois à 8° C sur le dégagement de C-CO<sub>2</sub> de cinq échantillons de sols fumigés ou non (temps 0 = mars 1983). Moyenne de quatre répétitions. C.V. < 5 %.**

*Effect of previous storage of several months at 8° C on evolved C-CO<sub>2</sub> during incubation at 28° C of 5 soil samples fumigated or not. Means of 4 replicates. S.D. < 5 %.*

SOL N°	DUREE CONSERVATION	ECHANTILLON FUMIGE			ECHANTILLON TEMOIN			BIOMASSE MICROBIENNE	RESPIRATION SPECIFIQUE	Kc ESTIME
		F <sub>0-7</sub>	F <sub>7-14</sub>	F <sub>14-28</sub>	T <sub>0-7</sub>	T <sub>7-14</sub>	T <sub>14-28</sub>			
1	temps 0	227,5	74,4	110,3	78,1	59,4	95	373	18 . 10 <sup>-3</sup>	0,41
	5 mois	228,6	74	114,6	87	60,6	97,3	377	18 . 10 <sup>-3</sup>	id.
3	temps 0	166,3	66,9	113,4	92,5	76,9	136,9	276	35 . 10 <sup>-3</sup>	0,36
	10 mois	109,9	64,7	95,1	53,2	52,9	99,6	126	56 . 10 <sup>-3</sup>	id.
4	temps 0	109,7	50,6	67,8	76,9	69,4	105,3	141	53 . 10 <sup>-3</sup>	0,42
	10 mois	73,8	43,3	68,8	38,9	43,6	82	73	80 . 10 <sup>-3</sup>	id.
5	temps 0	457,5	145,6	201,3	221,6	138,1	209,4	800	19 . 10 <sup>-3</sup>	0,39
	10 mois	392,6	129,2	197,7	164,4	105,2	172,2	675	18 . 10 <sup>-3</sup>	id.
6	temps 0	655	143,1	250,6	191,6	133,1	252,5	1 219	15 . 10 <sup>-3</sup>	0,42
	10 mois	547,6	162,6	236,5	136,7	102,4	182,4	917	14 . 10 <sup>-3</sup>	id.

Le niveau de biomasse des échantillons de sols sableux n°s 3 et 4 chute d'environ 50 % en dix mois. On remarque également que ce sont les échantillons qui présentent les plus fortes respirations spécifiques. Pour les autres, la diminution de la biomasse est nettement plus faible : elle est même insensible pour l'échantillon n° 1. Leur respiration spécifique est deux à trois fois plus faible que celle des échantillons de sols sableux, et reste très stable au cours du stockage.

Finalement, pour une courte durée de stockage, ce mode de conservation à l'avantage de peu modifier les flux de carbone dans les échantillons de sols étudiés. Mais la durée de stockage doit être d'autant plus limitée que la température est élevée et que le matériau est de texture grossière. En pratique nous avons choisi de conserver nos terres humides à 8°C, température à laquelle elles peuvent pour la plupart être conservées deux à trois mois sans évolution notable, pour peu qu'elles ne se dessèchent pas. En effet, pour des durées de stockage supérieures, le séchage peut induire d'autres perturbations.

## 2. Séchage et congélation

On peut aussi envisager de conserver les échantillons sur des durées plus importantes après avoir stoppé leur activité biologique par diminution de leur température (congélation) ou de leur humidité (séchage).

Le séchage à l'air (tableau V) peut altérer profondément les cinétiques de respiration des échantillons de sols, qu'ils soient fumigés ou non. Pour ces derniers, en plus d'un effet létal sur les micro-organismes (tableau II), il semble que le séchage rende disponible de la matière organique qui n'était pas minéralisable dans la terre humide. Il est possible que des composés carbonés d'origine microbienne ou végétale, protégés de la bio-dégradation par des colloïdes minéraux, soient rendus accessibles (POWLSON, 1975 ; SORENSEN, 1979).

**Tableau V : Effets du séchage à l'air et de la congélation sur le dégagement de C-CO<sub>2</sub> dans les échantillons de sols 1 et 2, fumigés ou non. Moyennes de quatre répétitions. C.V. < 5 %.**

*Effects of air drying and freezing on evolved C-CO<sub>2</sub> from soil samples n° 1 and 2, fumigated or not. Means of 4 replicates. S.D. < 5 %.*

SOL N°	TRAITEMENT	ECHANTILLON FUMIGÉ			ECHANTILLON TÉMOIN			BIOMASSE MICROBIENNE	RESPIRATION SPECIFIQUE
		F <sub>0-7</sub>	F <sub>7-14</sub>	F <sub>14-28</sub>	T <sub>0-7</sub>	T <sub>7-14</sub>	T <sub>14-28</sub>		
1	"frais" temps 0	242,3	73	113,8	101,7	64,8	112,2	413	19 · 10 <sup>-3</sup>
1	séché à l'air	194,3	77	120,2	147,7	63,5	105,2	286	26 · 10 <sup>-3</sup>
	congelé	247,9	69,9	124,2	108,7	63,1	107,2	434	18 · 10 <sup>-3</sup>
2	"frais" temps 0	359,4	159,6	198,9	184,5	131,8	195,9	487	29 · 10 <sup>-3</sup>
2	séché à l'air	310	163,3	168,5	317,5	168,3	237,5	358	47 · 10 <sup>-3</sup>

Dans les échantillons fumigés, le séchage par lui-même ne modifie que faiblement le dégagement de CO<sub>2</sub>, lorsqu'il y a peu de résidus végétaux, et lorsque la fumigation et l'incubation ont lieu juste après ce traitement. La mesure est davantage perturbée lorsqu'une période de stockage suit le séchage. Surtout, nous avons observé que la perturbation varie selon le type de sol, l'humidité résiduelle, et la vitesse de séchage : la courbe de respiration de la terre séchée et fumigée peut se trouver au-dessous ou nettement au-dessus de la courbe de la terre fumigée à l'état frais.

Un séchage rapide à température modérée, comme par exemple l'application d'un courant d'air sec pendant deux heures à 28° C, bien que présentant un intérêt certain par rapport au séchage à l'air classique, ne permet pas de s'affranchir suffisamment des perturbations liées à ce traitement. BOTTNER (1985) montre que le séchage d'un échantillon de sol rouge méditerranéen pendant vingt-quatre heures à 40° C détruit un tiers à un quart de la biomasse microbienne ; l'effet du séchage sur le dégagement de CO<sub>2</sub> est beaucoup plus net dans le traitement « témoin » que dans le traitement fumigé mais cet effet inclut aussi bien une action directe sur la microflore qu'une action indirecte sur la disponibilité de la matière organique non microbienne. JAGER et BURNS (1975), étudiant la minéralisation du carbone dans un échantillon



humide ou séché à 30° ou 85° puis réhumecté, montrent que les effets sur la biomasse microbienne comme sur la matière organique non vivante augmentent avec la température.

La congélation présenterait moins d'inconvénient. Ce traitement en lui-même n'altère pas la minéralisation de la matière organique de l'échantillon n° 1 après fumigation et après cinq mois de stockage à — 18°C la valeur obtenue pour la biomasse est presque identique à celle mesurée initialement (tableau V). Pour d'autres échantillons de sols ou selon les modalités de congélation-décongélation, l'effet de ce traitement peut-être plus marqué mais il l'est toujours moins qu'un séchage, qu'elles qu'en soient les modalités. La durée du stockage après congélation intervient également sur la respiration (JENKINSON et POWLSON, 1976). Mais ROSS et coll. (1980) ont montré qu'un stockage de un ou deux mois après congélation ne modifiait généralement pas la biomasse des quatre échantillons de sols qu'ils ont étudiés et que sur de telles durées la congélation et le simple stockage à 4° C sont équivalents.

## CONCLUSION

Le séchage à l'air, rejeté par ROSS (1970) pour la mesure d'activité deshydrogénasique, doit l'être aussi pour les mesures de biomasse microbienne. Ce traitement modifie profondément la minéralisation de la matière organique non vivante et altère de façon incontrôlable le carbone microbien.

La congélation, qui affecte moins la minéralisation du carbone que le séchage (SOU-LIDES et ALLISON, 1961), peut être acceptée pour des stockages de quelques mois. Sur une durée plus courte, la meilleure solution est tout simplement un stockage de la terre humide à faible température (4 à 10° C) et en conditions parfaitement aérobies.

Pour la mesure de biomasse proprement dite, une incubation à 28° C permet d'utiliser, pour de très nombreux échantillons de sols, un pas-de-temps de sept jours. La quantité de C-CO<sub>2</sub> dégagée dans l'échantillon fumigé entre zéro et sept jours est alors corrigée, pour tenir compte du C-CO<sub>2</sub> d'origine non microbienne, en soustrayant la quantité de C-CO<sub>2</sub> dégagée entre sept et quatorze jours **dans le même traitement**. Cette correction est moins affectée par un stress éventuel (hydrique ou thermique), surtout s'il a été de courte durée, qu'un calcul faisant intervenir une quantité de CO<sub>2</sub> enregistrée dans le traitement témoin. Ce dernier reste néanmoins très utile, pour mesurer les flux de CO<sub>2</sub> à travers la biomasse en conditions standard. On définit ainsi une « respiration basale » en mg C-CO. J<sup>-1</sup> . kg sol<sup>-1</sup> et une « respiration spécifique » en mg C-CO<sub>2</sub>.mg C-biomasse<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, qui sont des paramètres caractéristiques du fonctionnement microbiologique des échantillons de sols.

En outre, la respiration du traitement témoin représente un contrôle indispensable de la réalité du « flush », car il est important de souligner que la méthode de JENKINSON n'est pas universelle : elle est actuellement inapplicable aux échantillons de sols très acides ou tourbeux. De même, tout traitement susceptible d'affecter la respiration (présence de matière organique facilement décomposable, traitements pesticides, etc.) peut avoir une incidence sur le résultat de la mesure de biomasse microbienne.

Reçu pour publication : octobre 1985  
 Accepté pour publication : janvier 1986

### ROUTINE MEASUREMENT OF SOIL MICROBIAL BIOMASS BY THE CHLOROFORM FUMIGATION METHOD

*For most cultivated soils, the amount of carbon in the microbial biomass can be routinely determined by the chloroform — fumigation — incubation method proposed by JENKINSON. This technique, and the measurement of C-CO<sub>2</sub> continuous flow colorimetry (fig. 1) are both described.*

*The conditions for soil treatment and storage before actual measurements were made are discussed. It was noted that during storage the biomass decreased more or less depending upon the temperature and the soil type (tables III & IV) : the microbial*

biomass of sandy soil samples decreased by 50 % after 10 months of storage at 8° C ; the decrease was only 15-25 % for soil samples containing 40 % clay. It was concluded that moist soils can be stored aerobically at temperatures between 4 and 10° C for periods of up to several weeks. For longer storage periods, freezing is acceptable ; however air drying is not recommended because of direct effects on microorganisms (table II) and indirect effects on organic carbon availability (table V).

## BIBLIOGRAPHIE

- BOTTNER P., MNEIMNE Z. et BILLES G., 1984. — Réponse de la biomasse microbienne à l'adjonction au sol de matériel végétal marqué au <sup>14</sup>C. Rôle des racines vivantes. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 329-337.
- BOTTNER P., 1985. — Response of microbial biomass to alternate moist and dry conditions in a soil incubated with <sup>14</sup>C and <sup>15</sup>N-labelled plant material. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 329-337.
- CHAUSSOD R. et 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.
- CHAUSSOD R., NICOLARDOT B., SOULAS G. et JOANNES H., 1986. — Mesure de la biomasse microbienne dans les sols cultivés. II) Cinétiques de minéralisation de matière organique microbienne marquée au carbone 14. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, (soumis pour publication).
- DROUINEAU G. et LEFEVRE G., 1949. — Première contribution à l'étude de l'azote minéralisable dans les sols. *Ann. Agron.*, 19, 518-536.
- JAGER G. and BURNS E.H., 1975. — Effect of repeated drying at different temperatures on soil organic matter decomposition and characteristics, and on the soil microflora. *Soil. Biol. Biochem.*, 7, 153-159.
- JENKINSON D.S. and POWLSON D.S., 1976. — The effect of biocidal treatments on metabolism in soil. V) A method for measuring soil biomass. *Soil. Biol. Biochem.*, 8, 209-213.
- JENKINSON D.S. and POWLSON D.S., 1980. — Measurement of microbial biomass in intact soil cores and in sieved soil. *Soil. Biol. Biochem.*, 12, 579-581.
- JENKINSON D.S. and LADD J.N., 1981. — Microbial Biomass in soil: measurement and turnover. *Soil Biochem.*, 5, 415-471. Paul and Ladd, Ed. M. Dekker N.Y.
- LYNCH J.M. and PANTING L.M., 1980. — Cultivation and the soil biomass. *Soil. Biol. Biochem.*, 12, 29-33.
- Mac CRADY M.H., 1918. — Tables for rapid interpretation of fermentation tube results. *Public Health J.*, 9, 201-220.
- MORFAUX J.N., SARRIS J. et CATROUX G., 1972. — Relation entre la DCO et le carbone organique des eaux résiduaires. Intérêt d'une méthode automatique de détermination simultanée de ces paramètres. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 11, 9 p.
- NICOLARDOT B., CHAUSSOD R. et CATROUX G., 1982. — Revue des principales méthodes disponibles pour mesurer la biomasse microbienne et ses activités. *Science du Sol*, 4, 253-261.
- NICOLARDOT B., 1983. — Influence de l'humidité sur la minéralisation du carbone et de l'azote dans quatre sols cultivés. *Bull. Sci. Bourg.*, 36, 21-28.
- NICOLARDOT B., CHAUSSOD R. et CATROUX G., 1984. — Décomposition de corps microbiens dans des sols fumigés au chloroforme : effet du type de sol et de microorganisme. *Soil. Biol. Biochem.*, 16, 453-458.
- POCHON J. et TARDIEUX P., 1962. — Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Coll. « Techniques de base », éd. La Tourelle, 112 p.
- POWLSON D.S., 1975. — Effects of biocidal treatments on soil organisms. *In Soil Microbiology — a critical review*. N. Walker, Ed. Butterworths (London), 193-224.
- POWLSON D.S., 1980. — The effects of grinding on microbial and non — microbial organic matter in soil. *J. Soil. Sci.*, 31, 77-85.
- ROSS D.J., 1970. — Effects of storage on dehydrogenase activities of soils. *Soil. Biol. Biochem.*, 2, 55-61.

- ROSS D.J., TATE K.R., CAIRNS A. and PANSIER E.A., 1980. — Microbial Biomass estimations in soils from tussock grasslands by three biochemical procedures. *Soil Biol. Biochem.*, 12, 375-383.
- SHIELDS J.A., PAUL E.A. and LOWE W.E., 1974. — Factors influencing the stability of Labelled microbial materials in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 6, 31-37.
- SORENSEN L.H., 1979. — Decomposition of straw in soil after stepwise repeated additions. *Soil. Biol. Biochem.*, 11, 23-29.
- SOULIDES D.A. and ALLISON F.E., 1961. — Effect of drying and freezing soils on carbon dioxide production, available mineral nutrients, aggregation and bacterial population. *Soil Sci.*, 91, 291-298.
- SPARLING G.P., 1981. — Microcalorimetry and other methods to assess biomass and activity in soil. *Soil. Biol. Biochem.*, 13, 93-98.
- TATE K.R. and JENKINSON D.S., 1982. — Adenosine Triphosphate (ATP) and microbial biomass in soil: effects of storage at different temperatures and at different

