

ACADÉMIE DE MONTPELLIER  
UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

## THÈSE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc

pour obtenir le grade de

DOCTEUR de 3<sup>ème</sup> Cycle  
en **Écologie Générale et Appliquée**  
Option : **Écologie Terrestre**

# EFFET RHIZOSPHERE SUR L'ACTIVITÉ MICROBIENNE VIS A VIS DU CARBONE ET DE L'AZOTE DANS UN SOL ENRICHIS EN DÉBRIS VÉGÉTAUX

*par*

Natalie GANDAIS - RIOLLET

soutenu le 16 Nov. 1984 , devant la Commission d'Examen

*Jury :*

M<sup>me</sup> N. PARIS-PIREYRE *Président*  
MM. F. GUCKERT  
P. LOSSAINT  
G. BILLES

ANNEE : 1984

NOM DE L'AUTEUR (Prénom) : Natalie GANDAIS-RIOLLET

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC (MONTPELLIER II)

RESUME :

Pendant 11 semaines, un sol méditerranéen, enrichi en litière végétale marquée au  $^{14}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ , est incubé en conditions contrôlées et en présence ou en absence d'une culture de blé. On a évalué la biodégradation de la litière, la minéralisation, l'incorporation dans la biomasse microbienne et l'humification du carbone et de l'azote de la litière du sol.

L'effet de la culture se divise en deux phases :

- de la germination à l'épiaison, elle provoque d'une part une augmentation de la biomasse microbienne et de la minéralisation des composés azotés et d'autre part une diminution de la minéralisation des composés carbonés de la litière. C'est l'effet rhizosphère dû aux exsudats racinaires.
- de l'épiaison à la maturité, la baisse de production des exsudats provoque une diminution de la biomasse microbienne qui se traduit par une minéralisation des composés azotés au bénéfice des plantes.

MOTS CLES :

Effet rhizosphère  
Biomasse microbienne  
 $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$

Biodégradation  
Minéralisation  
Humification

à Jean-Philippe,

à Romain.

## A V A N T   P R O P O S

Au terme de ce travail, qui est le résultat de trois années de recherches au Département d'Ecologie du Sol du Centre d'Etudes Phytosociologiques et Ecologiques Louis Emberger du CNRS à Montpellier, je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidé à le réaliser, et notamment :

- Monsieur LOSSAINT, Directeur de Recherche au CNRS, qui m'a accueillie au Département d'Ecologie du Sol.

- Monsieur BILLES, Chargé de Recherche au CNRS, qui m'a initiée aux mystères de la rhizosphère, et qui a dirigé mes travaux.

- Madame PARIS, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc,

et

- Monsieur GUCKERT, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et d'Industries Alimentaires de Nancy, qui ont accepté de juger ce travail.

- Monsieur BOTTNER, Maître de Recherche au CNRS, qui a bien voulu examiner mon manuscrit.

- Monsieur GUIRAUD, du CEA de Cadarache, qui m'a appris à déterminer l'enrichissement isotopique de l'azote.

J'exprimerai aussi ma profonde reconnaissance à Françoise LAFFONT et à Alain BLANCHARD qui m'ont apporté une aide technique appréciable et compétente, ainsi qu'à Marguerite BIENVENU, qui a dactylographié ce texte.

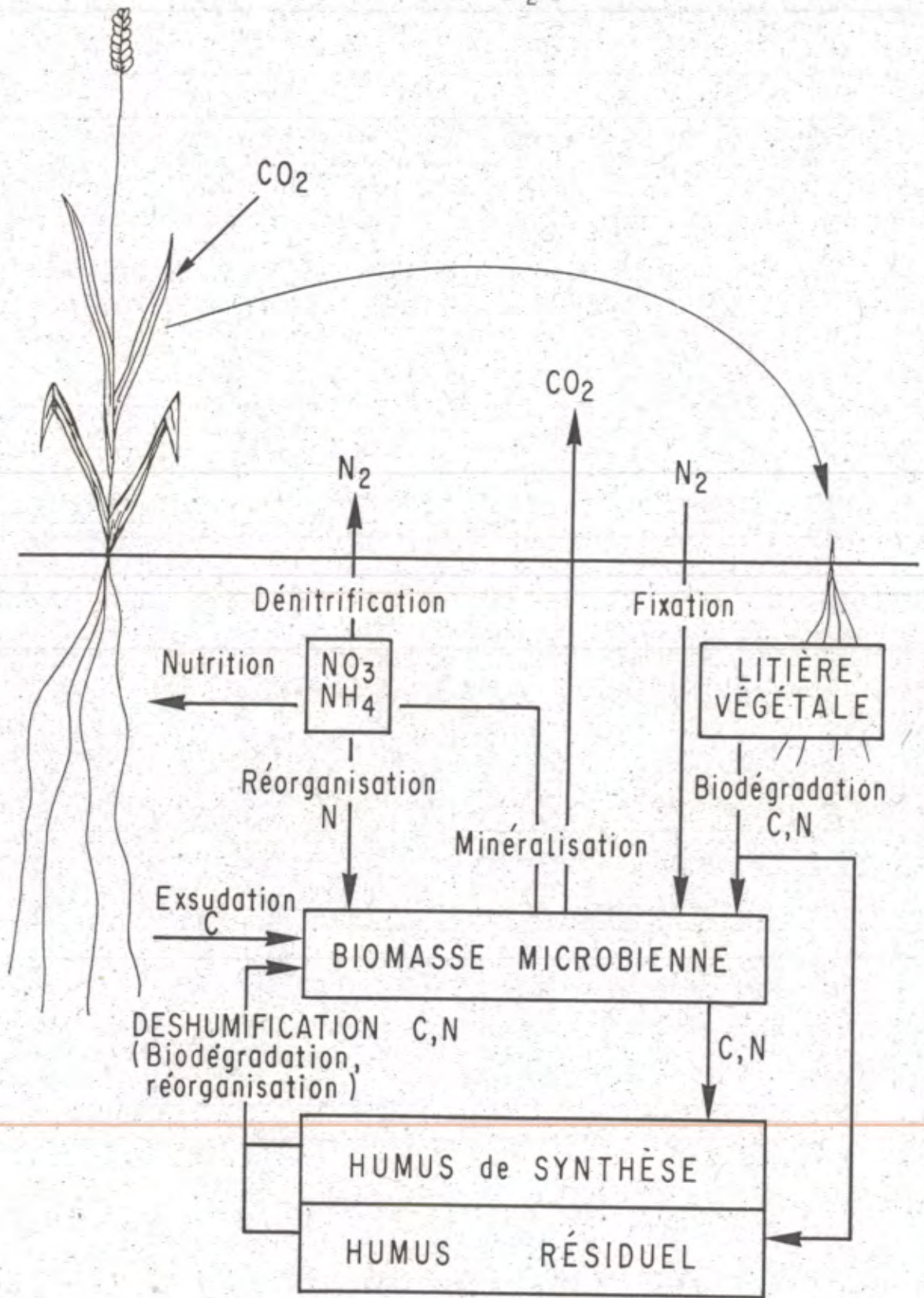


Figure 1 - Cycle du carbone et de l'azote dans un écosystème prairial.

## I N T R O D U C T I O N

Le sol d'une prairie est un milieu riche, dans lequel on retrouve les trois-quarts de l'énergie stockée par la photosynthèse (Mac Fadyen, in Dajoz, 1975), principalement sous forme de matériel végétal mort.

Le sol est aussi un milieu vivant, cette énergie ne s'accumule pas indéfiniment, elle est utilisée par la faune, mais surtout par la microflore du sol, qui transforme ce matériel mort d'une part en composés chimiques simples,  $\text{CO}_2$  et éléments minéraux qui serviront à la nutrition des végétaux, d'autre part en composés chimiques complexes, l'humus, qui constitue la réserve de matière organique du sol, et qui est un substrat pour la microflore.

La figure 1 établit les relations entre les différents compartiments du système sol-plante-atmosphère, pour deux des éléments chimiques les plus importants : le carbone et l'azote. Toutes les flèches, sauf celles qui partent des plantes, symbolisent des activités microbiennes.

L'activité de la flore microbienne du sol dépend des facteurs abiotiques du milieu, mais aussi de la présence ou de l'absence de couvert végétal : on a observé depuis longtemps qu'une culture peut avoir un effet protecteur sur la matière organique du sol. Goring et Clark (1948), faisant référence à Lyon *et al.* (1923) et à Prescott (1920) signalaient que la minéralisation de l'azoté à la fin d'une culture de maïs ou de blé est parfois globalement moins importante que dans un sol nu. Sparling *et al.* (1982) et Reid et Goss (1983) observent que la minéralisation du carbone d'une litière végétale enfouie depuis un an est beaucoup moins forte (- 70 %) quand le sol est planté de maïs ou de ray-grass que quand il est maintenu sans culture.

C'est dans la zone de contact entre les racines, les microorganismes et les particules de sol, la rhizosphère, qu'on doit chercher les mécanismes de l'effet-plante. Les racines non seulement puisent dans le sol les

substances nécessaires à la croissance des plantes, mais aussi libèrent certains produits qui peuvent stimuler ou inhiber divers groupes microbiens.

Ces produits sont libérés selon deux processus :

- la desquamation des cellules et des tissus morts,
- l'exsudation de substances solubles ou insolubles, composées de 90 % de polysaccharides, 6 à 10 % de protéines, et de sucres simples, vitamines et facteurs de croissance, excrétées à la partie apicale des racines.

L'ensemble de ces exsudats a l'allure macroscopique d'une goutte mucilagineuse appelée mucigel.

En 1965, Samsévitch estimait la production de mucigel de blé et de maïs équivalente à la production de matière sèche. Depuis, les estimations ont diminué, il s'agit selon Barber et Martin (1976) de 18 à 25 % de la matière sèche produite, dans le cas du blé et de l'orge.

L'examen microscopique montre autour des racines une prolifération microbienne, et Guckert et al. (1975) ont observé au microscope électronique la lyse des polysaccharides du mucigel par des bactéries. Le terme "effet rhizosphère", qui s'appliquait tout d'abord à cette prolifération microbienne, s'emploie aujourd'hui pour décrire l'ensemble des phénomènes liés à l'influence des racines sur l'activité microbienne, qu'il s'agisse de la fixation asymbiotique de l'azote (Balandreau et Hamad Fares, 1975), de la nitrification et de la dénitrification (Garcia, 1975 ; Woldendorp, 1975), de la solubilisation d'éléments minéraux (Tardieux, 1975), de la détoxification des sols (Rovira et Bowen, 1966), de la minéralisation et de l'humification des débris végétaux (Billès et Bottner, 1981), la liste n'est pas exhaustive.

L'exsudation et la rhizodéposition sont influencées par des facteurs d'ordre climatique, microbiens ou génétiques.

Martin (1977 a) observe qu'une température de 18°C est plus favorable à l'entrée dans le sol de carbone racinaire qu'une température de 10°C et que l'exsudation diminue quand l'humidité du sol augmente (Martin, 1977 b).

Les apports de carbone racinaire sont toujours beaucoup plus faibles en conditions stériles qu'en présence de microorganismes (Barber et Martin, 1976 ; Barber et Lynch, 1977 ; Beck et Gilmour, 1983 ; Rovira et Mc Dougall, 1967).

Le génotype de la plante n'influe pas toujours sur les quantités de

carbone libéré par les racines (Martin et Kemp, 1980, expérimentant sur 11 cultivars de blé) mais sur la composition de la population microbienne rhizosphérique (Neal et al., 1970 ; Atkinson et al., 1975).

Enfin, l'effet rhizosphère évolue au cours de la croissance des plantes. Rivière (1960) signale les densités microbiennes rhizosphériques les plus abondantes à la fin du tallage dans le cas du blé. Martin (1971) note un maximum de bactéries au moment de la floraison pour le blé, le trèfle et le ray-grass.

Billès et Bottner (1981) ont étudié l'effet d'une culture de blé sur la biodégradation des composés carbonés d'une litière de racines marquées au  $^{14}\text{C}$  et ont observé, par rapport au témoin non cultivé : avant l'épiaison, une minéralisation plus faible et une plus forte humification du  $^{14}\text{C}$ , et après l'épiaison, une plus forte minéralisation du  $^{14}\text{C}$  et une diminution des composés accumulés dans l'humus.

Il semble que la minéralisation de l'azote puisse être stimulée ou inhibée selon le stade phénologique des plantes (Goring et Clark, 1948).

Notre but est d'étudier, en fonction de la phénologie d'une graminée (le blé), et par conséquent de ses besoins nutritionnels en azote, l'effet rhizosphère sur l'activité microbienne vis-à-vis de la matière organique native d'un sol rouge méditerranéen et vis-à-vis d'une litière végétale fraîche, deux des sources de carbone et d'azote dont dispose la microflore.

Nous avons donc planté du blé dans des pots, dans un sol auquel nous avons incorporé une litière végétale fraîche : des pailles de blé. Ces pailles sont homogènement marquées au  $^{14}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ , afin de pouvoir retrouver les composés de cette litière dans les compartiments du système décrit à la figure 1.

L'effet rhizosphère sera étudié par comparaison avec les observations faites sur des pots témoins, non plantés.

L'activité microbienne sera évaluée par les mesures des produits de cette activité ( $\text{CO}_2$  et N minéral) et par les mesures de perte en substrat marqué. La biomasse microbienne sera mesurée par la méthode Jenkinson (Jenkinson et Powlson, 1976).

Les questions qui nous guideront sont les suivantes :

Pourquoi les plantes dépensent-elles de l'énergie en fournissant des exsudats à la microflore ?



Quels avantages ont-elles de favoriser le développement d'une microflore qui risque d'entrer en compétition avec elles pour la nutrition azotée ?

Et quel peut-être l'effet protecteur d'une culture sur la matière organique du sol, quand on sait qu'une partie des éléments minéraux assimilés par les plantes proviennent de la minéralisation de cette matière organique ?

Le chapitre I donne le détail des expérimentations. Dans le chapitre II sont exposés tous les résultats. Afin de consacrer le chapitre IV à l'effet rhizosphère, il était nécessaire d'interpréter les résultats obtenus dans les témoins (sol nu) dans un chapitre séparé, le III.

## C H A P I T R E I

### PROTOCOLE EXPERIMENTAL ET TECHNIQUES DE MESURES

---

Nous commencerons par décrire le sol et les conditions de culture après enfouissement d'une litière végétale marquée aux  $^{14}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ . Nous exposerons le calendrier des prélèvements, qui ont été effectués en fonction de la phénologie des plantes.

Puis nous décrirons les techniques qui nous ont permis de connaître les besoins nutritifs des plantes, l'activité de la microflore vis-à-vis de la litière ajoutée et l'incorporation des composés carbonés et azotés de cette litière dans la biomasse microbienne.

#### I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

##### A - CHOIX DU SOL

Nous avons utilisé un sol fersialitique lessivé, typique du climat méditerranéen, prélevé sous formation herbacée à Mauguio, (région de Montpellier). C'est un sol acide, très sableux, pauvre en argiles et exempt de carbonates. Il est relativement pauvre en matière organique. Bottner et al. (1984), qui ont étudié la biodégradation de matériel végétal dans des sols méditerranéens contrastés, ont montré que le type de sol n'a pas une influence prépondérante sur l'activité microbienne vis-à-vis d'une litière végétale ajoutée ; c'est pourquoi, dans un premier temps, nous limiterons l'expérimentation à un seul sol.

Les principales caractéristiques de ce sol sont présentées dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Caractères physico-chimiques du sol de Mauguio.

Granulométrie ‰					Matière organique ‰			pH eau
Argile	Limon fin	Limon grossier	Sable fin	Sable grossier	Carbone	Azote	C/N	
82	185	175	332	226	36	2,5	14,3	4,8

(Les analyses granulométriques ont été effectuées par le laboratoire d'analyses de sols de l'INRA à Arras).

B - CONDITIONS DE CULTURE

Des lots de 250 g de sol, tamisé à 2 mm et humidifié à 87 % de l'humidité équivalente, sont répartis dans des pots après incorporation de 1,5 g de litière végétale. Cette litière est constituée des parties aériennes, séchées et coupées en morceaux d'environ 1 cm, d'une culture de blé de printemps (variété Florence-Aurore), homogènement marquée aux  $^{14}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ , obtenue dans une chambre de marquage (Bottner, 1982) et prélevée avant sa maturité.

Tableau 2 : Composition de la litière végétale ajoutée en  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}$ .

Carbone			Azote			C/N
$^{12}\text{C} + ^{14}\text{C}$ (mg)	$^{14}\text{C}$ (DPM)	A.S. (DPM/mg)	$^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$ (mg)	$^{15}\text{N}$ (mg)	%E	
665	$105,35 \cdot 10^6$	$158 \cdot 10^3$	18,9	1,35	7,16 %	35

Ces valeurs correspondent à 1,5 g de paille, soit ce qu'on a ajouté dans chaque pot.  
 A.S. : Activité spécifique.  
 % E : Enrichissement.

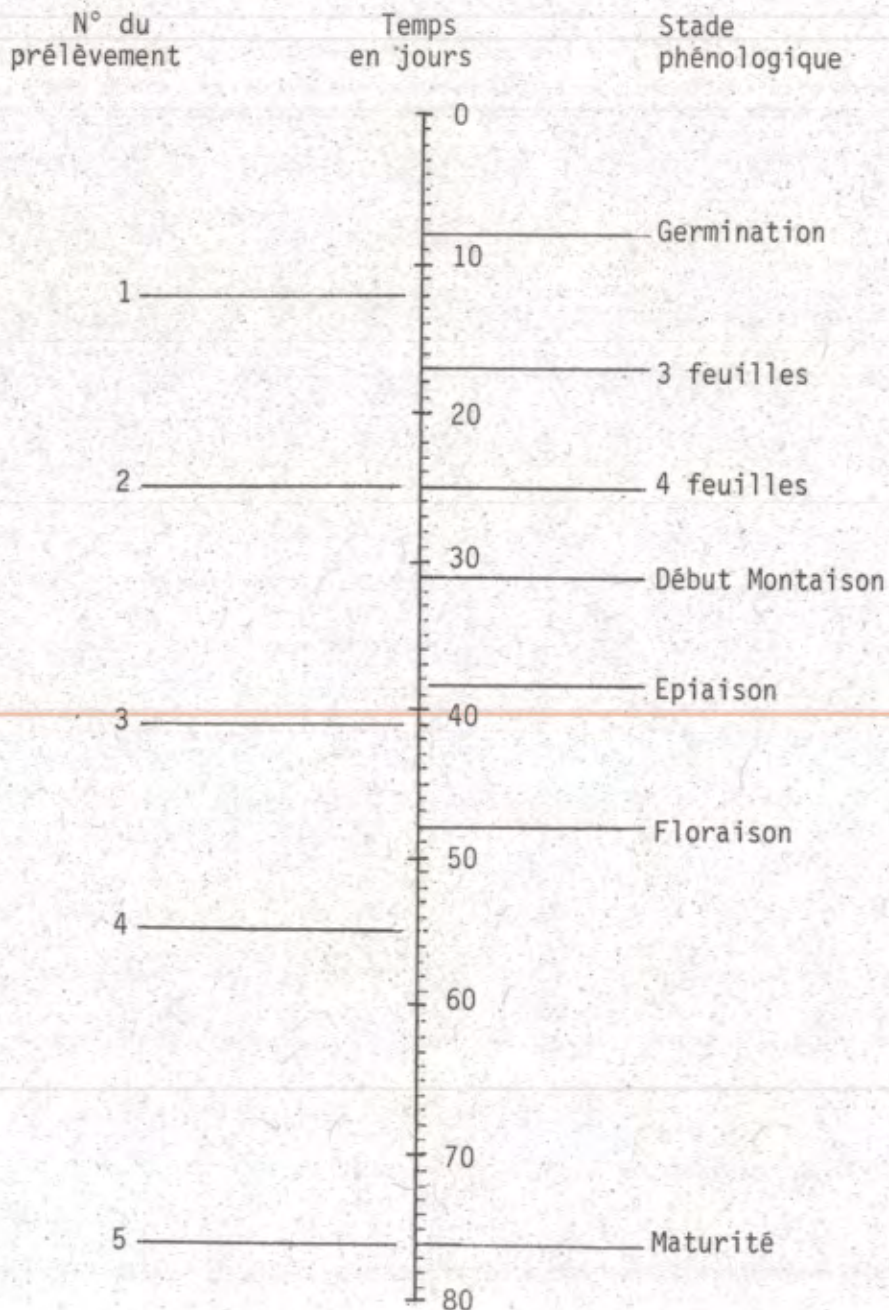
- Les pots, après une semaine d'incubation à 25°C, sont
- soit laissés sans culture,
  - soit plantés de trois grains de blé germé (variété Florence-Aurore).

Les pots sont ensuite placés dans une chambre de culture à 25°C, sous des lampes à vapeurs de sodium qui sont allumées seize heures par jour.

L'humidité du sol est réajustée tous les jours.

Le CO<sub>2</sub> qui se dégage du sol est évacué par aspiration afin d'éviter que le <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> minéralisé à partir de la litière soit photosynthétisé par les plantes.

### C - CALENDRIER DES PRÉLEVEMENTS



II - METHODES DE MESURES : Détail des opérations réalisées à chaque prélèvement

Chaque prélèvement concerne deux pots sans plantes et trois pots avec plantes, sauf le premier qui n'a été fait que sur deux pots sans plantes.

A - ANALYSES DES PLANTES

1 - Biomasse végétale

Les parties aériennes de blé sont coupées au collet, séparées en tiges, feuilles, épis, puis séchées et pesées.

De l'un des trois pots avec plantes, les racines sont extraites du sol. Elles sont soigneusement lavées et débarrassées des particules de sol, puis séchées et pesées.

Utilisation du rapport :  $\frac{\text{Poids des parties aériennes}}{\text{Poids des racines}}$  (PA/R)

Nous avons, lors d'une culture préliminaire de blé Florence-Aurore, mesuré le rapport PA/R tous les dix jours de la germination à la floraison. Chaque pot contenait 300 g de sol de Mauguio humide et deux pieds de blé. On a utilisé quatre pots par prélèvement. Les résultats sont présentés au tableau 3.

Tableau 3 : Rapports  $\frac{\text{Poids des parties aériennes}}{\text{Poids des racines}}$  d'une culture de blé réalisée en 1981.

Temps	10 jours	20 jours	30 jours	40 jours
stade phénologique	Trois feuilles	Tallage	fin Montaison	Floraison
PA/R	1.02 1.03 1.03 0.99	1.03 1.06 1.13 1.18	1.6 (1 épi ) 2.1 (2 épis) 2.0 (2 épis) 1.9 (2 épis)	3.0 (2 épis) 2.9 (2 épis) 3.3 (3 épis) 3.5 (3 épis)

La reproductibilité des résultats aux deux premiers prélèvements est remarquable. Les écarts qu'on observe aux prélèvements suivants semblent liés au fait que tous les pots n'ont pas fourni le même nombre d'épis.

Nous considérons que le rapport PA/R est constant entre les différents pots d'un même prélèvement et nous calculerons la biomasse racinaire des deux autres pots à partir du rapport PA/R du pot dont on a extrait les racines.

## 2 - Carbone et azote des plantes

On dose le contenu en carbone, azote,  $^{14}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  des feuilles, tiges, épis et racines. (Tous les dosages sont effectués en double pour chaque pot).

### a) Dosage de C et $^{14}\text{C}$

Le carbone est dosé au Carmograph par combustion sèche. Le  $\text{CO}_2$  issu de la combustion est piégé dans du méthyl-cello-solve et la radioactivité est comptée par scintillation liquide (Bottner et Warembourg, 1976).

### b) Dosage de N total

L'azote organique des plantes est réduit sous forme d'ion ammonium selon la méthode Kjeldhal. L'ammonium est dosé par colorimétrie (méthode Berthelot). Les échantillons sont ensuite distillés en présence de lessive de soude, l'ammonium est recueilli dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (N/20) en vue de la détermination isotopique.

### c) Dosage de $^{15}\text{N}$

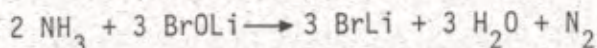
Nous avons utilisé la méthode de détermination isotopique de l'azote par spectrométrie optique (Guiraud et Fardeau, 1980), que nous résumerons ici.

## . Préparation des échantillons

La méthode est dérivée de celle de Rittemberg (1948).

L'ammonium recueilli après distillation sous forme  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en milieu acide est concentré sur une plaque chauffante dans des godets.

Ces godets sont adaptés sur une rampe à vide et soumis à un vide de  $10^{-6}$  torr. Sous vide, quelques gouttes d'hypobromite de lithium versées sur le sulfate d'ammonium réduisent l'ammonium en azote moléculaire ( $N_2$ ) :



L'eau et BrOLi en excès sont immobilisés par un piège à azote liquide. On introduit l'azote moléculaire dans des ampoules de verre, préalablement vidées à  $10^{-6}$  torr, jusqu'à une pression de 1 torr. Puis ces ampoules (2 par échantillon) sont scellées au chalumeau.

#### . Principe de la spectrométrie optique

La présence d'atomes de masse 15 dans une molécule d'azote gazeux excitée par un champ électrique à haute fréquence provoque un déplacement des bandes du spectre d'émission : ainsi la longueur d'onde de la bande principale émise dans l'ultra-violet se situe à 297,7 nm pour les molécules  $^{14}N \ ^{14}N$  (de masse 28), à 298,3 nm pour les molécules  $^{14}N \ ^{15}N$  (de masse 29) et à 298,9 nm pour les molécules  $^{15}N \ ^{15}N$  (de masse 30). L'utilisation d'un détecteur photoélectrique et d'un enregistreur permet de mesurer l'intensité de ces différentes bandes. On calcule ensuite la teneur en  $^{15}N$ .

. Calcul de l'abondance isotopique  $A = \frac{^{15}N}{^{14}N + ^{15}N} 100$

Les ampoules contenant l'azote moléculaire sont introduites dans le spectromètre optique (SOPRA GS1). On lit trois pics sur l'enregistreur, proportionnels aux quantités de molécules  $^{14}N \ ^{14}N$ ,  $^{14}N \ ^{15}N$  et  $^{15}N \ ^{15}N$ . (Hypothèse : le gaz est en équilibre isotopique, c'est-à-dire que les atomes  $^{14}N$  et  $^{15}N$  se combinent au hasard).

Si p et q sont les quantités d'atomes  $^{14}N$  et  $^{15}N$  présents dans le mélange, on obtient les quantités  $p^2$  de  $^{14}N \ ^{14}N$ , 2 pq de  $^{14}N \ ^{15}N$  et  $q^2$  de  $^{15}N \ ^{15}N$ .

La lecture des pics permet de calculer :

$$R = \frac{^{14}N \ ^{15}N}{^{14}N \ ^{14}N} = \frac{2 pq}{p^2} = \frac{2q}{p}$$

On peut alors calculer A :

$$A = \frac{^{15}N}{^{14}N + ^{15}N} 100 = \frac{q}{p + q} 100 = \frac{\frac{q}{p}}{1 + \frac{q}{p}} 100 = \frac{\frac{R}{2}}{1 + \frac{R}{2}} 100 = \frac{100 R}{2 + R}$$

A est l'abondance isotopique mesurée par spectrométrie optique. L'établissement de courbes étalon avec des échantillons déterminés au spectromètre de masse permet de calculer A', l'abondance isotopique réelle de l'échantillon.

On calcule ensuite E, l'enrichissement isotopique :  $E = A' - A_0$ ,  $A_0$  étant l'abondance isotopique naturelle de l'azote ( $A_0 = 0,3663 \%$ ).

#### Précision de la méthode

Pour un enrichissement supérieur à 0,3 % nous obtenons une précision de l'ordre de 1 %.

Pour un enrichissement compris entre 0,1 et 0,3 %, la précision de la méthode est de l'ordre de 3 %.

### B - ETUDE DE LA MINERALISATION DE LA LITIERE AJOUTEE

#### 1 - Analyse du $^{14}\text{CO}_2$ atmosphérique

Le  $\text{CO}_2$  qui se dégage du sol est aspiré et évacué, sauf pour trois pots avec plantes et deux pots sans plantes, desquels le  $\text{CO}_2$  est capturé dans des pièges contenant 50 ml de soude normale. Tous les deux jours, on prélève deux fois 2 ml de soude dans chaque piège, qu'on mélange à 10 ml de liquide scintillant, pour déterminer au scintillateur la radioactivité du  $\text{CO}_2$  piégé. Puis on renouvelle entièrement la soude des pièges.

#### 2 - Dosages d'azote minéral

L'azote minéral échangeable ( $\text{NH}_4$  et  $\text{NO}_3$ ) est extrait selon la méthode Richardson et dose par titrimétrie après distillation (méthode Bremner).

Après titration, les distillats sont acidifiés et concentrés en vue de la détermination isotopique.

L'azote minéral est dosé une fois par pot et par prélèvement, sur 50 g de terre humide.

Précision de la méthode :

1 à 5 % pour 1 à 5 mg N/100 g terre sèche

5 à 10 % pour 0,5 à 1 mg N/100 g terre sèche

10 à 20 % pour 0,1 à 0,5 mg N/100 g terre sèche.



## C - ETUDE DE LA BIODEGRADATION DE LA LITIERE AJOUTEE

A chaque prélèvement, les débris végétaux des échantillons utilisés pour les dosages d'azote minéral (50 g de terre humide pour chaque pot) sont recueillis par tamisage à 0,5 mm. Parmi ces débris se trouvent les fragments de paille marquée ajoutés au début de l'incubation et non encore biodégradés. Ces débris sont séchés, pesés, et on a analysé leur contenu en C,  $^{14}\text{C}$ , N et  $^{15}\text{N}$ , selon les techniques décrites précédemment.

## D - ANALYSES DE LA BIOMASSE MICROBIENNE

Nous avons utilisé la technique de mesure de biomasse microbienne par fumigation mise au point par Jenkinson et Powlson en 1976.

### 1 - Principe

Il s'agit d'une technique de stérilisation partielle. L'agent stérilisant est le chloroforme, qui n'agit pas sur la matière organique native du sol (selon Jenkinson, 1966, Powlson et Jenkinson, 1976, Anderson et Domsch 1978). Après avoir exposé un échantillon de sol aux vapeurs de chloroforme, on le réensemence par une petite quantité de sol frais. Les microorganismes tués par le traitement constituent un apport de substrat, que ceux qui ont survécu au traitement, ainsi que ceux provenant du réensemencement, consomment : ceci se traduit par un fort dégagement de  $\text{CO}_2$ , que l'on mesure. Le surcroît de  $\text{CO}_2$  dégagé pendant dix jours par l'échantillon fumigé (par rapport à un témoin) est proportionnel à la biomasse microbienne qui se trouvait dans le sol avant le traitement.

Si B est le poids du carbone de la biomasse microbienne avant fumigation et F le poids de carbone dégagé sous forme  $\text{CO}_2$  par l'échantillon fumigé en excès par rapport au témoin,  $K_c = \frac{F}{B}$  est la proportion du carbone de la biomasse microbienne minéralisé sous forme  $\text{CO}_2$  pendant l'incubation qui suit la fumigation (Jenkinson, 1966).

La valeur de  $K_c$  a été estimée à 0,3 (Jenkinson, 1966), 0,5 (Jenkinson, 1976), 0,41 (Anderson et Domsch, 1978) et 0,45 (Jenkinson et Powlson, 1980). Nous utiliserons arbitrairement la valeur  $K_c = 0,5$ .

## 2 - Choix de la méthode

Outre la connaissance quantitative du carbone microbien dans un sol, le flush de minéralisation qui suit une fumigation peut nous renseigner sur l'origine du carbone, mais aussi de l'azote de la biomasse microbienne, ainsi que l'ont montré de nombreux travaux et à condition de prendre certaines précautions.

### a) Incorporation de carbone d'origine végétale dans la biomasse microbienne

Amato et Ladd (1980), Ladd et al. (1981), Mneimne (1981), Cerri et Jenkinson (1981) ont soumis des litières végétales variées (pailles de blé, feuilles de luzerne, ray-grass) marquées au  $^{14}\text{C}$ , à la décomposition dans différents sols et sous de multiples conditions. Puis ils ont évalué, d'après le  $^{14}\text{CO}_2$  dégagé à la suite d'une fumigation, l'incorporation du carbone de ces litières dans la biomasse microbienne.

Kassim et al. (1981) étendent ces travaux à une grande variété de substrats carbonés.

### b) Mise au point méthodologique

Ce type d'approche fournit des renseignements sur la vitesse d'incorporation d'un substrat dans le compartiment microbien et nous avons l'intention de l'utiliser. Mais le travail que nous avons entrepris concerne la microflore rhizosphérique du blé, et nous avons voulu nous assurer dans un travail préalable (Gandais, 1981) que la présence de racines fraîches dans le sol ne perturbe pas les mesures de biomasse microbienne par la méthode Jenkinson, que ces racines, facilement biodégradables, ne provoquent pas un dégagement accru de  $\text{CO}_2$  à la suite d'une fumigation (tableau 4).

Ayant appliqué la méthode Jenkinson sur du sol de Mauguio, contenant ou non des racines fraîches de blé (marquées au  $^{14}\text{C}$  et incorporées juste avant la fumigation) nous avons observé :

- que la présence des racines ne perturbe pas les mesures de carbone microbien : nous avons mesuré après dix jours d'incubation, la même biomasse microbienne dans le sol avec et dans le sol sans racines et le même dégagement de  $\text{CO}_2$  provenant de la biodégradation des racines dans le sol témoin et dans le sol fumigé. Des résultats équivalents sont exposés par Lynch et Panting (1980) ;

Tableau 4 : Comparaison de la biomasse microbienne (BM) mesurée dans un sol nu et dans un sol amendé en racines fraîches (S+R), par la méthode Jenkinson.

	Temps d'incubation (jours)					
	1	3	6	8	10	13
SF (mg C.CO <sub>2</sub> )	6,2	14,4	20,4	24,6	27,2	30,6
ST (mg C.CO <sub>2</sub> )	1	4,3	8,5	11,4	13,9	16,9
BM (S) = $\frac{SF - ST}{0,5}$	10,4	20,2	23,8	26,4	26,6	27,4
(S+R)F (mg C.CO <sub>2</sub> )	10,8	20,3	32,6	40,1	45,4	50,9
(S+R)T (mg C.CO <sub>2</sub> )	1,4	9,4	19,7	27,6	32,3	37,8
BM (S+R) = $\frac{(S+R)F - (S+R)T}{0,5}$	18,8	21,8	25,8	25	26,2	26,2

T : témoin

F : fumigé

Les valeurs indiquées sont les moyennes de cinq répétitions. Les écarts à la moyenne n'excèdent pas 10 %.

Les valeurs obtenues pour la biomasse microbienne au bout de 10 jours d'incubation comparées par le test de Student, ne sont pas significativement différentes.

- par des analyses de  $\text{CO}_2$  toutes les deux heures pendant les deux jours qui suivent la fumigation, que ces racines fraîches modifient néanmoins la dynamique de la minéralisation du carbone dans les sols fumigés : il y a un priming effect, ou minéralisation accélérée de la matière organique native du sol, qu'on observe à partir de la douzième heure suivant la fumigation, et qui est due à la stimulation de la croissance microbienne par le substrat "Racines fraîches", facilement biodégradable. Ce priming effect ne perturbe pas le dosage du carbone microbien, car dans les sols témoins (avec et sans racines) et dans le sol fumigé sans racines, la même quantité de matière organique native du sol est minéralisée, mais cette minéralisation est plus lente, répartie régulièrement pendant les dix jours de l'incubation.

c) Incorporation d'azote d'origine végétale dans la biomasse microbienne

. Flush d'ammonium

Parallèlement au flush de  $\text{CO}_2$ , on observe, à la suite d'une fumigation, un flush d' $\text{NH}_4$ . (figure 2).

De même que le  $\text{CO}_2$  en excès provient de la minéralisation des cadavres microbiens, on considère que cet ammonium correspond à une fraction de l'azote qui était incorporé dans la biomasse microbienne au moment de la fumigation. Notons que cette accumulation d'ammonium est d'autant plus importante que les nitrificateurs, très sensibles, sont complètement détruits par le chloroforme.

. Mesure de l'azote microbien

De nombreux auteurs ont voulu calculer, d'après ce flush d'ammonium, un  $K_n$ , ou coefficient de minéralisation de l'azote microbien, correspondant au  $K_c$  de Jenkinson (Ayanaba et al., 1976, Ross et al., 1980, Amato et Ladd, 1980). Mais Nicolardot (1983) qui a mesuré le  $K_n$  de corps microbiens dans plusieurs sols, observe que celui-ci, à l'encontre du  $K_c$ , varie sensiblement en fonction du type de sol et du C/N des corps microbiens.

. Origine de l'azote microbien

Si on ne peut pas quantifier l'azote microbien avec la méthode Jenkinson, on peut cependant, dans les travaux sur la biodégradation de litières végétales enrichies en  $^{15}\text{N}$ , estimer la proportion d'azote végétal

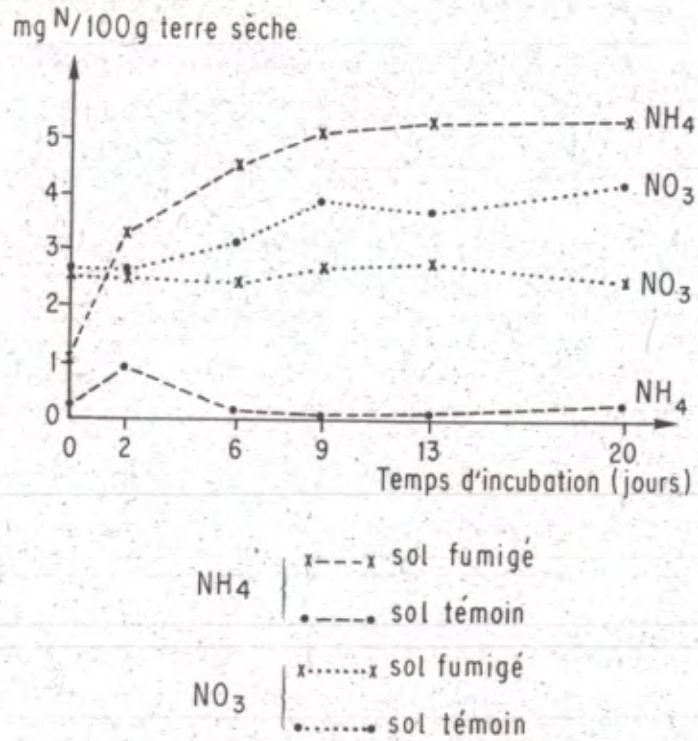


Figure 2 - Minéralisation de l'azote dans le sol de Mauguio après fumig.

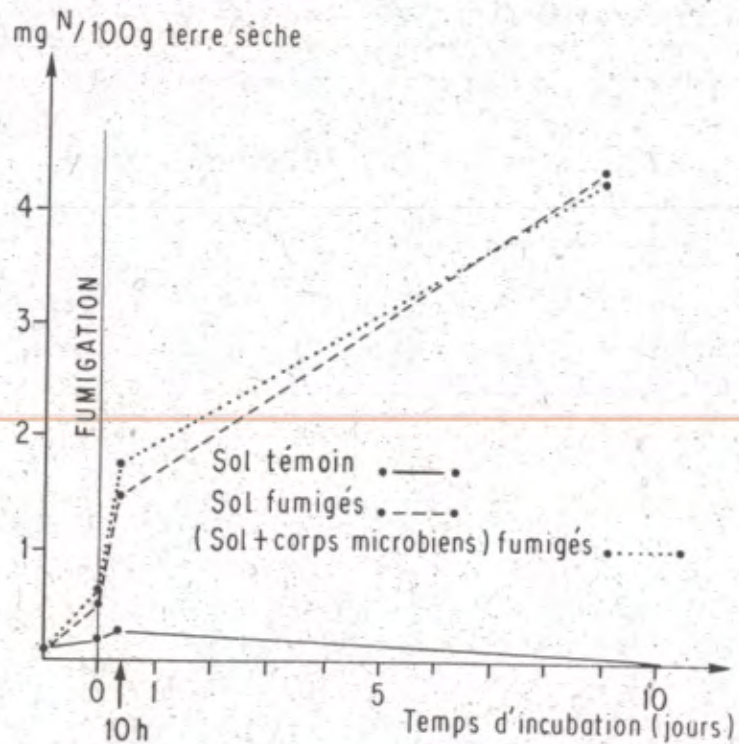


Figure 3 - Production d'ammonium pendant et après fumigation d'un sol enrichi ou non en corps microbiens.

incorporé par la microflore, par l'analyse de l'enrichissement isotopique de l'ammonium produit à la suite d'une fumigation : Amato et Ladd (1980), Mneimne (1981), Marumoto et al. (1982) ont fait de telles estimations.

. Mise au point méthodologique

Pour appliquer ces mesures à l'étude de l'effet d'une culture de blé sur le flux d'azote dans la biomasse microbienne, il nous faut tenir compte des modifications dues à la présence des racines fraîches de blé.

Etant donné le priming effect provoqué par ces racines vis-à-vis du carbone du sol, nous avons craint qu'au bout de dix jours, l'ammonium accumulé provienne non seulement des corps microbiens, mais aussi des racines et de la matière organique native du sol. (On ne peut pas, dans le cas de l'ammonium, mesurer une différence par rapport au témoin, puisque dans le témoin, l'azote minéral est réorganisé).

Par contre si la production d'ammonium est suffisante pour être dosée dix heures après la fumigation (c'est-à-dire avant l'apparition du priming effect), nous pensons que les mesures d'enrichissement de cet ammonium fournissent des valeurs beaucoup plus proches de l'enrichissement en  $^{15}\text{N}$  de la biomasse microbienne.

Nous avons donc réalisé un autre travail préliminaire, toujours avec le même sol, qui nous a montré (figure 3) :

- que dix heures après fumigation, une quantité mesurable d'ammonium a été produite ;
- qu'on peut même, au bout de dix heures, déceler un supplément significatif d'ammonium dans les échantillons ayant reçu un apport de corps microbiens avant fumigation, alors qu'au bout de dix jours, la différence n'est plus significative.

d) Conclusions

. La présence de substrats tels que des racines fraîches ou de la paille ne modifient pas les mesures de carbone et de  $^{14}\text{C}$  microbiens par la méthode de Jenkinson, bien que la dynamique de minéralisation de la matière organique native du sol soit perturbée.

. Pour mesurer l'enrichissement isotopique de l'azote de la microflore, nous extrairons l'ammonium produit au bout de dix heures d'incubation après fumigation, avant que le priming effect n'ait pu se développer.

### 3 - Description des analyses de biomasse microbienne

Ces analyses concernent, pour un prélèvement, les deux pots sans plantes et les deux pots qui ont conservé leurs racines. Dans ces derniers les racines sont coupées en morceaux d'environ 1 cm, et on les répartit homogènement dans le sol, afin de mesurer la microflore rhizosphérique.

#### a) Fumigation

Des coupelles contenant des échantillons de 30 g de sol sont placées dans un dessiccateur dont le fond contient un peu d'eau. Durant 30 mn, on applique le vide (à la trompe à eau) dans le dessiccateur, puis on y introduit 100 ml de chloroforme. Après avoir rétabli la pression atmosphérique, on place le dessiccateur à 28°C dans l'obscurité. 24 h plus tard, on sort le sol, on rince le dessiccateur pour éliminer le chloroforme, on replace le sol dans le dessiccateur et on lui applique successivement huit vides de 3 à 4 mn, pour ôter le chloroforme restant dans le sol. On réensemence les échantillons par une pincée de sol frais.

Le même traitement, sans apport de chloroforme, est appliqué aux témoins.

#### b) Respirométrie

Chaque échantillon de sol est placé dans un béccher, au fond d'un bocal étanche d'un litre. 20 ml d'eau au fond du bocal maintiennent l'air et le sol humides. Le CO<sub>2</sub> est absorbé dans 20 ml de soude N/4, contenue dans un flacon placé à côté du béccher de sol. Les bocalux sont placés pendant dix jours dans une pièce sombre à 28°C. La soude est renouvelée une fois pendant l'incubation.

La soude non carbonatée est barytée, puis la baryte est titrée par HCl N/8.

La respirométrie est pratiquée sur deux échantillons fumigés et deux échantillons témoins par pot.

#### c) Dosage de l'ammonium des échantillons fumigés

Nous avons déjà évoqué la technique employée, qui est utilisée en double pour chaque pot, après dix heures et dix jours d'incubation.