



HAL
open science

Utilisation de l'incubation en anaérobiose pour mesurer l'azote de la biomasse microbienne par la méthode de fumigation au chloroforme

Bernard Nicolardot, Xavier Vekemans, Pierre Barret, Gérard Catroux

► **To cite this version:**

Bernard Nicolardot, Xavier Vekemans, Pierre Barret, Gérard Catroux. Utilisation de l'incubation en anaérobiose pour mesurer l'azote de la biomasse microbienne par la méthode de fumigation au chloroforme. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, 1990, 27 (3), pp.255-268. <hal-01864500>

HAL Id: hal-01864500

<https://institut-agro-dijon.hal.science/hal-01864500v1>

Submitted on 30 Aug 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Utilisation de l'incubation en anaérobiose pour mesurer l'azote de la biomasse microbienne par la méthode de fumigation au chloroforme

PAR

B. NICOLARDOT¹, X. VEKEMANS², P. BARRET¹ et G. CATROUX¹

¹ INRA, Laboratoire de Microbiologie des Sols,
17 rue Sully, BP 1540, 21034 Dijon Cedex, France.

² Université Libre de Bruxelles, Laboratoire d'écologie végétale et de génétique,
Jardin Massart, Chaussée de Wadre, 1160 Bruxelles, Belgique

Synopsis: Aerobic and anaerobic incubations were compared to measure N-microbial biomass using the fumigation-incubation method (CFIM). Mineralization kinetics of the easily mineralizable compartment of the biomass and mineralization rates of ¹⁵N labelled microorganisms were studied in different soils incubated in anaerobic conditions. An approach using anaerobic incubation is proposed to measure N-biomass by CFIM.

Keywords: Soil, N-microbial biomass, anaerobic incubation, kinetic study, mineralization rates.

INTRODUCTION

L'estimation de la taille de la biomasse microbienne du sol constitue une étape importante dans l'étude des cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote dans les sols. L'approche développée par JENKINSON et POWLSON (1976) a donné lieu à de nombreux travaux méthodologiques (JENKINSON, 1987) afin de minimiser autant que possible les artéfacts et augmenter la précision des techniques utilisées. Dans la méthode de référence, l'azote de la biomasse microbienne est déterminé au cours d'une incubation aérobie qui suit une fumigation du sol au chloroforme. Les principaux inconvénients de cette technique sont inhérents à l'incubation aérobie du sol; ce

Reçu le 9/5/1990.

Accepté le 18/5/1990.

sont en particulier les problèmes relatifs au choix des paramètres d'incubation (humidité...) ou l'estimation des quantités d'azote minéralisées qui sont biaisées par les processus d'immobilisation qui interviennent au cours de l'incubation (SHEN *et al.*, 1984; NICOLARDOT *et al.*, 1989).

L'incubation de sols en conditions anaérobies en remplacement de l'incubation aérobie présente un certain nombre d'avantages (KEENEY, 1982) :

– L'azote minéralisé s'accumule sous forme ammoniacale, il n'est donc pas nécessaire de doser les formes nitriques.

– Il n'est pas nécessaire d'ajuster l'humidité des sols à un optimum.

– Enfin, dans ces conditions, l'intensité des processus d'immobilisation est nettement plus faible qu'en aérobiose (BARTHOLOMEW, 1965).

L'incubation anaérobie du sol a de ce fait été largement employée comme test pour déterminer la disponibilité de l'azote du sol (KEENEY, 1982) et en particulier dans le cas de sols soumis à des conditions saturantes (HASEBE *et al.*, 1985). Mais ce type d'incubation a été également utilisé pour déterminer l'azote ou le carbone de la biomasse microbienne des sols de rizière (INUBUSHI *et al.*, 1984; INUBUSHI & WADA, 1988).

Au cours de ce travail, nous nous proposons d'étendre cette technique d'incubation à l'ensemble des sols cultivés. Aussi les objectifs seront-ils les suivants :

– détermination des cinétiques de minéralisation de l'azote après fumigation et proposition d'un mode de calcul de l'azote provenant de la biomasse microbienne;

– établissement d'une relation entre les quantités d'azote minéralisées après fumigation au cours d'incubations aérobie et anaérobie;

– calcul de la proportion d'azote microbien minéralisé en anaérobiose après fumigation du sol au moyen de matériaux microbiens marqués à l'azote 15.

I. – MATÉRIELS ET MÉTHODES

A) Sols

Les cinq sols étudiés dans les expériences 1 et 3 ont été prélevés dans le département de la Côte d'Or. Leurs analyses physico-chimiques sont données dans le tableau I. Les 20 sols utilisés pour l'expérience 2 constituent un échantillonnage de sols agricoles français, ils ont été prélevés en majorité dans la région Bourgogne. Leurs principales caractéristiques étaient comprises entre les valeurs suivantes : % Argile = 7,7 à 45,5; % CaCO_3 = 0 à 65; pH = 4,7 à 8,3; ‰ Carbone = 9,6 à 47,1; ‰ Azote organique = 0,96 à 6,28. Tous les sols ont été prélevés dans l'horizon de surface (0-20 cm), tamisés à 5 mm (maille carrée) et conservés frais à 10°C.

B) Mesure de l'azote de la biomasse microbienne des sols

L'azote de la biomasse microbienne des sols a été déterminé à l'aide de la méthode de fumigation incubation proposée par JENKINSON et POWLSON (1976). Les échantillons ont été fumigés selon le protocole décrit par CHAUSSOD *et al.* (1986). Les quantités d'azote présentes dans la biomasse microbienne ont été exprimées au moyen de la quantité flush-N qui

TAB. I. — Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés.

Sols	Granulométrie en %					Azote ‰	C/N	pH	CaCO ₃ %	CEC meq/100 g	HE 1000 g %
	A	LF	LG	SF	SG						
Bressey : sol humifère calcaire	40,9	41,4	4,7	6,0	7,0	5,25	8,9	7,9	29,1	30,0	36,9
Saulieu : sol sableux sur arène granitique	14,7	10,5	1,1	13,6	60,1	1,51	9,5	5,8	0	8,6	14,2
Dijon : sol brun calcaire	32,8	31,7	21,8	11,2	2,5	1,44	8,3	7,5	0,4	20,8	25,2
Chaux : sol calcaire superficiel	51,6	25,0	16,8	4,8	1,8	2,73	7,8	7,9	0,5	23,6	27,4
Auxonne : sol sableux à hydromorphie de nappe.	10,4	8,4	2,6	16,9	61,7	0,97	13,2	7,3	0,3	8,3	10,2

correspond à la différence des quantités d'ammonium produites dans le traitement fumigé entre 0-7 jours d'incubation à 28°C et 7-14 jours (NICOLARDOT & CHAUSSOD, 1986).

C) Expérience 1 : Comparaison des cinétiques de minéralisation de l'azote en conditions aérobie et anaérobie

Les cinq sols décrits dans le tableau I après avoir été fumigés au chloroforme, ont été incubés selon deux techniques (4 répétitions par traitement) :

– En condition aérobie, l'équivalent de 40 g de sol sec a été incubé dans des fioles plasma de 575 ml, l'humidité des sols étant maintenue proche de l'humidité équivalente. Les fioles ont été hermétiquement bouchées et incubées à 28°C. Le piégeage du CO₂ dégagé était assuré par 10 ml NaOH 0,25 M. Les pièges ont été périodiquement changés afin d'éviter la saturation de la soude et permettre le renouvellement de l'atmosphère de la fiole.

– En condition anaérobie, l'équivalent de 20 g de sol sec a été incubé dans des fioles plasma de 125 ml en présence de 75 ml d'eau permutée. Après avoir été soigneusement bouchées, les fioles ont été incubées à 28°C.

Les sols ont été incubés pendant 28 jours, les prélèvements ayant eu lieu à 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21 et 28 jours. A chaque date de prélèvement, des fioles correspondant aux traitements aérobie et anaérobie ont été sacrifiées pour permettre l'extraction de l'azote ammoniacal.

Pour le traitement aérobie, chaque échantillon de sol a été extrait par 200 ml de KCl 1 M alors que pour le traitement anaérobie, 25 ml KCl 4 M ont été ajoutés dans chaque fiole afin d'être dans les mêmes conditions d'extraction que pour les sols incubés en aérobie. Les fioles ont été ensuite agitées à 20°C pendant 1 heure, une aliquote de chaque extrait de sol était ensuite filtrée sur filtre Whatman n° 40 et stockée à -20°C avant analyse.

D) Expérience 2 : Relation entre quantités d'azote minéralisées en aérobie et en anaérobie

20 sols différents ont été fumigés au chloroforme puis incubés en aérobie et en anaérobie (4 répétitions par traitement).

En aérobie, l'équivalent de 50 g de sol sec a été incubé dans une fiole plasma de 575 ml en présence d'un piège à CO₂ (10 ml NaOH 0,25 M). L'humidité des sols a été maintenue proche de l'humidité équivalente et les pièges à CO₂ ont été renouvelés régulièrement.

En anaérobie, l'équivalent de 25 g de sol sec a été incubé en présence de 100 ml d'eau permutée dans une fiole à plasma de 125 ml hermétiquement bouchée.

Les échantillons de sol ont été incubés à 28°C pendant 14 jours, les prélèvements ayant été effectués à 0, 7 et 14 jours d'incubation. A chaque date de prélèvement, l'azote ammoniacal a été extrait par 200 ml K₂SO₄ 0,5 M pour les échantillons de sol incubés en aérobie, et par ajout direct de 8,71 g K₂SO₄ dans les fioles incubées en anaérobie afin d'obtenir une concentration finale en K₂SO₄ identique à l'extraction des échantillons incubés en condition aérobie.

L'azote minéral a été extrait par une agitation de 30 mn à 20°C, une aliquote de chaque extrait étant ensuite filtrée sur filtre Whatman n° 40 et stockée à -20°C.

E) Expérience 3 : Minéralisation de corps microbiens marqués à l'azote 15 en anaérobie

Les deux types de matériaux microbiens proviennent de cultures microbiennes d'*Aspergillus flavus* (NICOLARDOT *et al.*, 1986). Il s'agit des matériaux A (44,73 % C; 8,68 % N; C/N=5,2; % ¹⁵N en excès=14,8) et D (41,72% C; 3,28 % N; C/N=12,7; % ¹⁵N en excès=29,6).

Les apports de corps microbiens dans les cinq sols (tableau I) ont été réalisés sur la base de $500 \text{ mg C. kg}^{-1}$ sol sec soit 10 mg de carbone microbien pour 20 g de sol (4 répétitions par traitement). L'apport a été effectué sous forme de poudre lyophilisée, les mélanges sol-corps microbiens étant effectués échantillon par échantillon. Les échantillons ont été ensuite fumigés puis incubés en anaérobiose comme il a été décrit pour l'expérience n° 1. Les échantillons ont été incubés à 28°C pendant 14 jours, les prélèvements ayant eu lieu à 0, 7 et 14 jours. Les conditions d'extraction sont identiques à celles décrites pour les sols incubés en anaérobiose dans l'expérience n° 1. Les extraits de sol ont ensuite servi à déterminer les quantités d'azote ammoniacal produites et les excès isotopiques correspondants.

F) Analyses

— L'ammonium a été dosé par colorimétrie en flux continu selon une adaptation de la méthode proposée par CROOKE et SIMPSON (1971).

— Les excès isotopiques de l'ammonium ont été déterminés après distillation préalable des extraits de sol en milieu alcalin et par entraînement de vapeur (KEENEY & NELSON, 1982). Les excès isotopiques ont été ensuite mesurés par spectrométrie d'émission (GUIRAUD, 1984) avec un appareil GS01 (SOPRA, 68 rue Pierre Joigneaux, F 92270 Bois-Colombes).

— Les ajustements non-linéaires ont été réalisés avec le programme UWHAUS du logiciel Amance (BACHACOU *et al.*, 1981).

II. — RÉSULTATS

A) Comparaison des cinétiques de minéralisation de l'azote en conditions aérobie et anaérobie

L'évolution des quantités d'azote ammoniacal dans les sols fumigés au chloroforme et incubés en aérobie ou en anaérobiose est présentée dans les figures 1 a et 1 b. Pour chaque date t , il s'agit en réalité de la différence des quantités d'ammonium présentes dans le sol à la date t et la date $t=0$, cette dernière correspondant à l'état du sol juste avant fumigation. Pour les cinq sols étudiés, la teneur en ammonium à $t=0$ était inférieure à 2 mg N/kg sol sec. Ces cinétiques de minéralisation ont été ajustées à un modèle à deux compartiments (NICOLARDOT & CHAUSSOD, 1986) ($y = b \cdot (1 - e^{-k_b t}) + c \cdot t$) dont l'un facilement minéralisable (b) se minéralise selon une cinétique d'ordre 1 avec une vitesse de minéralisation k_b et l'autre difficilement minéralisable, se décompose selon une cinétique d'ordre zéro avec une constante de vitesse de minéralisation c .

Les résultats des paramètres des cinétiques sont présentés dans le tableau II.

— Les coefficients d'ajustement (r^2) sont en général très bons ($r^2 > 0,98$).

— Les valeurs du paramètre b (taille du compartiment facilement minéralisable) sont systématiquement supérieures dans les sols incubés en anaérobiose; en moyenne, pour quatre des sols étudiés, les valeurs de b obtenues en anaérobiose sont 1,4 fois plus fortes que les valeurs de b obtenues en aérobie.

— Par ailleurs, excepté pour le sol Auxonne, les valeurs des vitesses de minéralisation k_b sont du même ordre de grandeur que le sol ait été incubé en aérobie ou en anaérobiose. Ainsi, les vitesses de minéralisation obtenues dans le cadre de ce travail sont comprises entre $0,3$ et $1,2 \text{ j}^{-1}$.

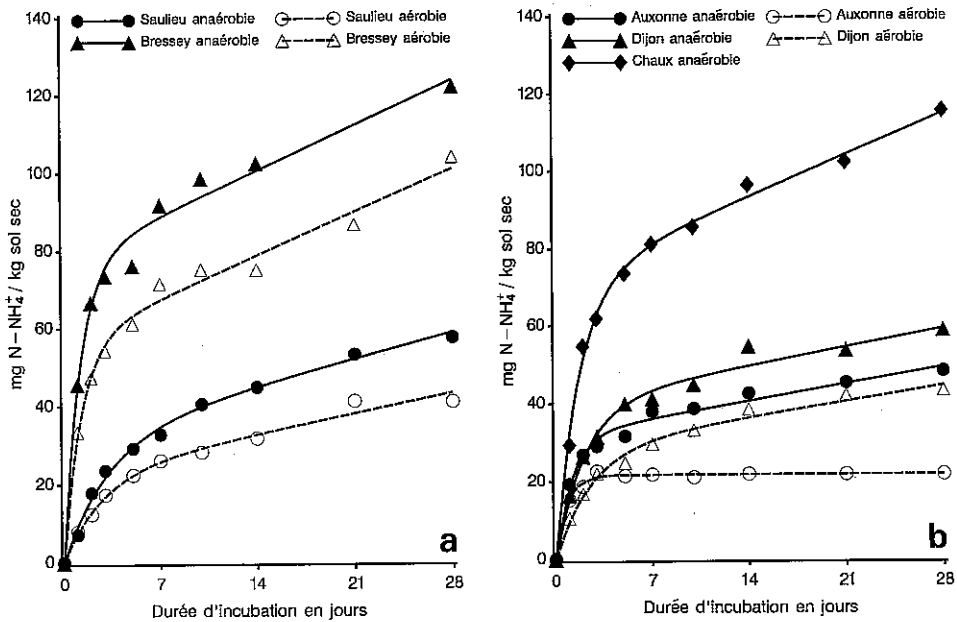


FIG. 1. — (a) Évolution des quantités d'azote ammoniacal dans les sols Bressey et Saulieu fumigés et incubés en aérobie et en anaérobie (points expérimentaux et courbes modélisées; coefficients de variations inférieurs à 5%). (b) Évolution des quantités d'azote ammoniacal dans les sols Auxonne, Dijon et Chaux fumigés et incubés en aérobie et anaérobie (points expérimentaux et courbes modélisées; coefficients de variation inférieurs à 5%).

— Enfin, les constantes de minéralisation du compartiment difficilement minéralisable (c) sont relativement proches entre traitements à l'intérieur d'un même sol, excepté pour le sol Auxonne où les cinétiques de minéralisation en aérobie ont été ajustées à un modèle à un seul compartiment ($c=0$). Le calcul du « flush-N », en effectuant la différence entre les quantités d'azote minéralisées dans le sol fumigé entre 0-7 jours et 7-14 jours est une estimation relativement bonne du paramètre b aussi bien dans les sols incubés en aérobie qu'en anaérobie. Ainsi, les coefficients de corrélation entre le paramètre b et les valeurs de flush-N pour les sols incubés en conditions aérobie ou anaérobie sont respectivement de 0,99 et 0,97.

B) Relation entre les quantités d'azote minéralisées en aérobie et en anaérobie

Les mesures de flush-N effectuées sur 20 sols selon les deux modes d'incubation montre que les valeurs obtenues en anaérobie

$$(\text{moyenne} = 51,1 \pm 23,3 \text{ mg N} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ sol sec})$$

sont supérieures à celles obtenues en aérobie

$$(\text{moyenne} = 37,9 \pm 18,8 \text{ mg N} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ sol sec}).$$

TAB. II. — Valeurs des paramètres cinétiques de la minéralisation de l'azote dans les sols fumigés et valeurs de Flush-N calculées par la différence ($F_{0.7} - F_{7.4}$).

Sols	Traitements	r^2	b (mg N.Kg ⁻¹)	K_p (j ⁻¹)	C (mg N.Kg ⁻¹ .j ⁻¹)	Flush-N (mg N.Kg ⁻¹)
Bressey	Aérobiose	0,992	56,5 (2,7)	0,77 (0,11)	1,58 (0,16)	68,0
	Anaérobiose	0,989	77,3 (3,7)	0,80 (0,12)	1,65 (0,24)	81,1
Saulieu	Aérobiose	0,989	22,6 (2,5)	0,35 (0,07)	0,74 (0,13)	20,5
	Anaérobiose	0,995	31,6 (2,8)	0,31 (0,05)	0,98 (0,13)	20,8
Dijon	Aérobiose	0,991	28,2 (2,2)	0,38 (0,06)	0,59 (0,11)	20,8
	Anaérobiose	0,989	39,9 (2,7)	0,47 (0,07)	0,69 (0,14)	27,9
Chaux	Aérobiose	—	—	—	—	—
	Anaérobiose	0,997	71,4 (2,5)	0,55 (0,05)	1,54 (0,14)	66,0
Auxonne	Aérobiose	0,991	21,7 (0,3)	1,19 (0,10)	0	16,8
	Anaérobiose	0,988	31,8 (1,5)	0,80 (0,12)	0,63 (0,09)	33,4

Nota : — : signifie « absence de mesure ». Entre parenthèses : écart-type associé.

Il existe une très bonne corrélation entre les 2 séries de mesure ($r=0,879$). Il est ainsi possible d'établir une relation (fig. 2) entre les résultats des deux méthodes

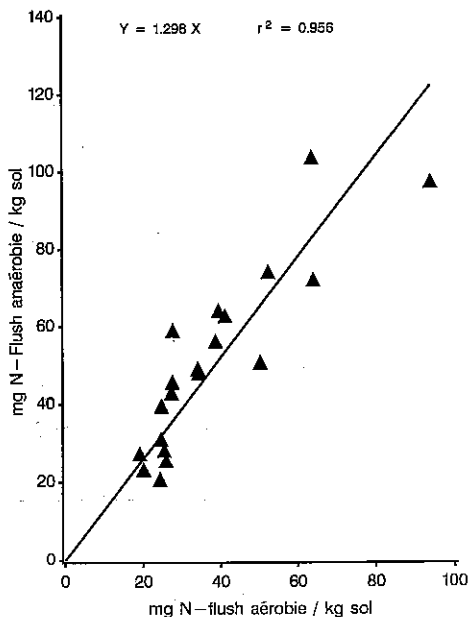


FIG. 2. — Relations entre les quantités Flush-N obtenues à partir d'incubations aérobie et anaérobie.

qui est une relation linéaire passant par l'origine

$$(\text{Flush-N anaérobie} = 1,29 \cdot \text{Flush-N aérobie}, r^2 = 0,956).$$

C) Minéralisation de corps microbiens marqués à l'azote 15 en anaérobiose

Les valeurs des coefficients de minéralisation $\left(\frac{{}^{15}\text{N minéral à la date } t}{{}^{15}\text{N organique apporté}} \times 100 \right)$ calculés à 7 et 14 jours des deux types de matériaux apportés sont présentés dans le tableau III. Plus de 90 % de l'azote minéralisé au cours de l'incubation est minéralisé durant la 1^{re} semaine. Les chiffres calculés à 14 jours qui sont parfois égaux ou inférieurs à ceux obtenus à 7 jours ne sont, compte tenu des erreurs expérimentales, statistiquement pas différents des coefficients de minéralisation à 7 jours. Par ailleurs, les différences sont beaucoup plus marquées entre types de matériels qu'entre sols. Ainsi à 7 jours, pour le matériel A (C/N=5,2), le coefficient de minéralisation est en moyenne de 0,540 ($\pm 0,04$) et pour le matériel D (C/N=12,7) de 0,294 ($\pm 0,04$).

TAB. III. — Valeur du coefficient de minéralisation des matériaux microbiens A et D calculé après 7 et 14 jours d'incubation.

Matériel microbien	Date (jours)	Sols				
		Bressey	Saulieu	Dijon	Chaux	Auxonne
A	7	0,527 (0,033)	0,515 (0,094)	0,497 (0,011)	0,571 (0,015)	0,589 (0,001)
	14	0,530 (0,012)	0,570 (0,019)	0,496 (0,015)	0,557 (0,075)	0,546 (0,020)
D	7	0,349 (0,016)	0,258 (0,018)	0,241 (0,025)	0,317 (0,023)	0,308 (0,011)
	14	0,341 (0,024)	0,214 (0,020)	0,269 (0,032)	0,345 (0,033)	0,228 (0,041)

Nota : entre parenthèses écart-type.

III. — DISCUSSION — CONCLUSION

L'étude cinétique menée sur des sols fumigés incubés en anaérobiose montre que les cinétiques de minéralisation sont à rapprocher de celles obtenues pour des sols incubés en aérobie (NICOLARDOT & CHAUSSOD, 1986). En particulier, le modèle décrivant ces cinétiques de minéralisation (CHAUSSOD & NICOLARDOT, 1982) où le compartiment minéralisable de la biomasse microbienne se décompose selon une cinétique d'ordre 1 et le compartiment difficilement minéralisable et la matière organique du sol se minéralisent selon une cinétique d'ordre zéro, semble bien s'appliquer dans ces conditions d'incubation. La comparaison des paramètres cinétiques obtenus dans l'un et l'autre cas permet de formuler plusieurs remarques :

— Les valeurs de vitesses de minéralisation (k_b) du compartiment minéralisable calculées dans les mêmes sols incubés selon les deux modes sont comparables. Les études comparatives effectuées dans des systèmes aérobie et anaérobie montrent que l'anaérobiose a tendance à ralentir la décomposition des matières organiques (PATRICK, 1982). C'est le cas en particulier de la décomposition de résidus complexes tels que les résidus végétaux (ACHARYA, 1935; KARIM, 1948; IRISIMAH & KEENEY, 1973) où certaines dégradations (cellulolyse) sont des processus essentiellement aérobies. En réalité, dans les sols fumigés au chloroforme, la plus grande partie du compartiment facilement minéralisable correspond à des composés cytoplasmiques (NICOLARDOT, 1986) qui sont rapidement minéralisés aussi bien en aérobie qu'en anaérobiose.

— Les quantités minéralisées sous forme ammoniacale et en particulier la taille du compartiment facilement minéralisable (b) sont plus élevées en anaérobiose. Plusieurs hypothèses explicatives peuvent être émises :

- Cette minéralisation nette plus importante peut être attribuée à une intensité de l'immobilisation plus faible en anaérobiose (BARTHOLOMEW, 1965). En anaérobiose, le métabolisme énergétique est ralenti, ce qui conduit à une moindre synthèse de biomasse et donc à une moindre utilisation de produits azotés (PATRICK, 1982). En définitive, le rapport C/N des substrats disponibles qui sépare l'immobilisation nette et la minéralisation nette en anaérobiose est nettement augmenté par rapport aux conditions aérobies (THOMPSON, 1984), ce qui pourrait expliquer dans une large mesure les résultats trouvés ici.

- En conditions anaérobies, l'azote nitrique disparaît rapidement en majeure partie par dénitrification, mais une partie peut être transformée en ammonium selon des processus dissimilatifs (BROADBENT, 1970; STANFORD, 1982; FAZZOLARI *et al.*, 1990).

- Enfin, dans les conditions des expérimentations réalisées ici (sol sous une couche d'eau) les composés microbiens libérés par la fumigation du sol rapidement solubilisés, sont probablement plus accessibles aux microorganismes par rapport à un sol en aérobiose où la mobilité des substrats et leur diffusion est moindre.

L'étude menée sur 20 sols confirme le fait qu'en conditions anaérobies les quantités d'azote libérées après fumigation sont plus importantes. La très bonne relation entre les quantités minéralisées en aérobiose et en anaérobiose s'explique par le fait que c'est le même compartiment qui est soumis à minéralisation après fumigation du sol. Dans d'autres conditions, WARING et BREMNER (1964) et CHAUSSOD *et al.* (1981) avaient également mis en évidence une très bonne relation entre les quantités d'azote libérées au cours d'incubations aérobies et anaérobies utilisées pour estimer l'azote minéralisable du sol ou de résidus organiques, mais alors l'azote provenait de la minéralisation de composés organiques divers plus ou moins identifiés.

L'ensemble des résultats permet de penser que l'incubation du sol en anaérobiose après fumigation peut être utilisée pour estimer l'azote de la biomasse microbienne. INUBUSHI et WADA (1988) ont ainsi utilisé cette technique pour quantifier la biomasse des sols de rizière. La méthode de fumigation au chloroforme proposée par JENKINSON et POWLSON (1976) suppose le calcul de deux grandeurs :

- Flush-N, la quantité d'azote minéralisée après fumigation et qui provient de la biomasse microbienne;
- Kn, le coefficient de minéralisation de la biomasse microbienne.

La biomasse microbienne est ensuite calculée avec la relation suivante :

$$\text{Biomasse-N} = \text{Flush-N}/\text{Kn}.$$

L'estimation par une méthode de calcul simplifiée du compartiment minéralisable de la biomasse microbienne (compartiment *b* ou encore « Flush-N ») peut être effectué à l'aide de l'approche proposée par NICOLARDOT et CHAUSSOD (1986). La quantité « Flush-N » est ainsi obtenue par différence entre les quantités d'azote minéralisées dans le traitement fumigé entre 0-7 jours et celles produites entre 7-14 jours. Les quantités ainsi calculées donnent une bonne estimation du compartiment *b* avec lequel elles sont très bien corrélées.

De leur côté, INUBUSHI *et al.* (1985) considèrent qu'un délai d'incubation de 28 jours à 30°C après fumigation semble nécessaire pour calculer avec précision le flush de minéralisation.

L'étude de la minéralisation de matériaux microbiens de rapports C/N différents (5,2 et 12,7) permet de calculer le coefficient de minéralisation (coefficient Kn). La variabilité de celui-ci est essentiellement liée au type de matériel microbien. Ainsi, à 7 jours les valeurs de ce coefficient pour les matériaux de C/N 5,2 et 12,7 sont respectivement 0,54 ($\pm 0,04$) et 0,29 ($\pm 0,04$). Dans un précédent travail (NICOLARDOT *et al.*, 1986), pour les mêmes matériaux microbiens mais incubés en conditions aérobies, les valeurs du coefficient de minéralisation étaient respectivement de 0,45 ($\pm 0,03$) et 0,26 ($\pm 0,07$). Cette variabilité est à rapprocher des résultats

obtenus par AZAM *et al.* (1988) (0,19-0,42) ou INUBUSHI et WATANABE (1987) (0,43), ces auteurs ayant utilisé un marquage *in situ*. Par contre, les valeurs calculées par SMITH *et al.* (1989) en utilisant des microorganismes marqués à l'azote 15 sont relativement faibles aussi bien pour des sols incubés en aérobiose (0,01-0,3) qu'en anaérobiose (0,04-0,13).

En réalité, il serait nécessaire pour évaluer correctement ce coefficient K_n , d'estimer la réorganisation liée à chaque type de matériel microbien selon une approche déjà utilisée pour le calcul de K_n dans des sols incubés en aérobiose (NICOLARDOT *et al.*, 1989).

Néanmoins, il peut être tenté de proposer une formulation pour le calcul de l'azote de la biomasse microbienne selon deux modes d'approche :

— Le premier consiste à considérer la valeur moyenne du C/N de la biomasse microbienne, voisine de 6,7 (SHEN *et al.*, 1984) et la relation liant le rapport C/N des matériaux microbiens et la valeur du coefficient K_n . Avec toutes les précautions qui s'imposent, l'interpolation linéaire entre les deux valeurs de K_n calculées pour les matériaux de C/N 5,2 et 12,7 permet d'obtenir 0,49 pour une valeur de C/N égale à 6,7. La formulation ainsi obtenue est donc la suivante :

$$\text{Biomasse-N} = \text{Flush-N anaérobic}/0,49.$$

— L'autre mode utilise la relation liant les valeurs de flush-N obtenues en aérobiose et en anaérobiose (Flush-N anaérobic = 1,29. Flush-N aérobie) et la formulation obtenue au cours d'un précédent travail portant sur la méthode de fumigation au chloroforme suivie d'une incubation aérobie (Biomasse-N = Flush-N aérobie/0,37) (NICOLARDOT *et al.*, 1989). La formulation obtenue,

$$\text{Biomasse-N} = \text{Flush-N anaérobic}/0,48$$

est en fait très voisine de la précédente approche même si la détermination des principaux paramètres (K_n , estimation de la réorganisation) pris en compte dans cette formule a été effectuée pour des sols incubés en aérobiose.

En définitive, l'estimation de la taille de la biomasse microbienne à l'aide de la méthode de fumigation au chloroforme suivie d'une incubation anaérobie présente, par rapport à une incubation aérobie, un certain nombre d'avantages :

— L'humidité du sol de départ n'a pas d'influence sur le déroulement de l'incubation et la mesure de biomasse.

— L'intensité des processus de réorganisation étant moindre, les valeurs de flush-N obtenues sont probablement proches des valeurs brutes de minéralisation de l'azote de la biomasse.

— La mise en place des incubations est d'une grande simplicité.

De la même façon que la méthode de fumigation au chloroforme suivie d'une incubation aérobie, la technique proposée ne nécessite que le dosage des formes ammoniacales de l'azote, le seul traitement fumigé étant nécessaire pour calculer la valeur flush-N. L'azote contenu dans la biomasse microbienne peut alors être calculé avec la formule suivante :

$$\text{Biomasse-Azote} = \frac{\text{NH}_4 \text{ Sol Fumigé}_{(0-7 \text{ jours})} - \text{NH}_4 \text{ Sol Fumigé}_{(7-14 \text{ jours})}}{K_n}$$

avec pour valeur de K_n , déterminée dans nos conditions expérimentales, 0,49.

RÉSUMÉ

L'incubation aérobie et anaérobie de sols a été comparée pour déterminer l'azote de la biomasse microbienne à l'aide de la méthode de fumigation au chloroforme. L'étude de la minéralisation de l'azote dans les sols fumigés, conduite à 28°C pendant 28 jours, a permis d'ajuster les cinétiques de minéralisation à un modèle à deux compartiments ($y = b \cdot (1 - e^{-k_b t}) + c \cdot t$) où b et k_b représentent respectivement le compartiment minéralisable de la biomasse microbienne et son coefficient de vitesse de minéralisation.

L'estimation du paramètre k_b dans des sols incubés en aérobie et anaérobie a donné des valeurs relativement comparables comprises entre 0,3 et 1,2 j^{-1} . Le calcul du paramètre b a montré que les valeurs obtenues étaient systématiquement supérieures dans les sols incubés en anaérobie.

Une seconde étude conduite sur 20 sols a permis de confirmer ces observations et de déterminer la relation suivante :

$$\text{Flush-N anaérobie} = 1,29 \cdot \text{Flush-N aérobie.}$$

Une troisième expérience a eu pour but de déterminer les coefficients de minéralisation de matériaux microbiens de différents rapports C/N (5,2 et 12,7) dans différents sols. Les valeurs moyennes des coefficients de minéralisation, calculées à 7 jours, ont été respectivement pour le matériel à C/N 5,2 et 12,7 de 0,54 et 0,29.

L'ensemble de ces résultats a permis de proposer une formule de calcul de l'azote de la biomasse en utilisant une incubation anaérobie après fumigation du sol au chloroforme :

$$\text{Biomasse-Azote} = \frac{\text{NH}_4 \text{ Sol Fumigé}_{(0-7 \text{ jours})} - \text{NH}_4 \text{ Sol Fumigé}_{(7-14 \text{ jours})}}{0,49}$$

SUMMARY

Using anaerobic incubation to measure the microbial biomass nitrogen by the chloroform fumigation method

The aerobic and anaerobic incubation of soils were compared to measure the nitrogen present in microbial biomass with the chloroform fumigation incubation method.

The study of nitrogen mineralization in fumigated soils, performed at 28°C during 28 days, allowed to adjust the mineralization kinetics to a two compartments model ($y = b \cdot (1 - e^{-k_b t}) + c \cdot t$) where b and k_b are respectively the easily mineralizable compartment of the microbial biomass and its mineralization rate constant.

The estimation of the k_b parameter in fumigated soils incubated in aerobiosis or anaerobiosis gave relatively comparable values lying between 0.3 to 1.2 day^{-1} .

The calculation of the parameter b showed that the values were systematically higher in soils incubated in anaerobiosis.

A second experiment on 20 soils allowed to confirm these observations and to obtain the relationship:

$$\text{Anaerobic N-Flush} = 1.29 \cdot \text{aerobic N-Flush.}$$

The aim of a third experiment was to determine the mineralization rates of microbial materials with different C : N ratios (5.2 and 12.7) in different soils. Mean values of minerali-

zation rates calculated at 7 days were respectively 0.54 and 0.29 for the materials with 5.2 and 12.7 C:N ratios. These results allowed to propose a formula to calculate microbial nitrogen using chloroform fumigation and anaerobic incubation of the soil:

$$\text{N-biomass} = \frac{\text{NH}_4 \text{ Fumigated soil}_{(0-7 \text{ jours})} - \text{NH}_4 \text{ Fumigated soil}_{(7-14 \text{ jours})}}{0,49}$$

BIBLIOGRAPHIE

- ACHARYA (C. N.), 1935. — CXL Studies on the anaerobic decomposition of plant materials. III. Comparison of the course of decomposition of rice straw under anaerobic, aerobic and partially aerobic conditions. *Biochem. J.*, **29**: 1116-1120.
- AZAM (F.), MULVANEY (R. L.) & STEVENSON (F. J.), 1988. — Determination of *in situ* Kn by the chloroform fumigation-incubation method and mineralization of biomass N under anaerobic conditions. *Plant Soil*, **111**: 87-93.
- BACHACOU (J.), MASSON (J. P.) & MILLIER (C.), 1981. — *Manuel de la programmation statistique Amance* 81. CNRF-INRA Ed., 516 p.
- BARTHOLOMEW (W. V.), 1965. — Mineralization and immobilization of nitrogen in the decomposition of plant and animal residues. In: *Soil Nitrogen*, BARTHOLOMEW (W. V.), CLARK (F. E.) Eds., *Agronomy*, ASA, SSSA Publ., Madison, Wisconsin (USA), **10**: 285-305.
- BROADBENT (F. E.) & NAKASHIMA (T.), 1970. — Nitrogen immobilization in flooded soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **34**: 218-221.
- CHAUSSOD (R.), GERMON (J. C.) & CATROUX (G.), 1981. — Essai de détermination au laboratoire de l'aptitude à la minéralisation d'azote des boues résiduaires urbaines. *C. R. Acad. Agri. Fr.*, **67**: 762-771.
- CHAUSSOD (R.), NICOLARDOT (B.) & CATROUX (G.), 1986. — Mesure en routine de la biomasse microbienne des sols par la méthode de fumigation au chloroforme. *Sci. Sol*: 201-211.
- CHAUSSOD (R.) & NICOLARDOT (B.), 1982. — Mesure de la biomasse microbienne dans les sols cultivés. I. Approche cinétique et estimation simplifiée du carbone facilement minéralisable. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, **19**: 501-512.
- CROOKE (W. M.) & SIMPSON (W. E.), 1971. — Determination of ammonium in Kjeldahl digests of crops by an automated procedure. *J. Sci. Food Agric.*, **22**: 9-10.
- FAZZOLARI (E.), MARIOTTI (A.) & GERMON (J. C.), 1990. — Dissimilatory ammonium production vs denitrification *in vitro* and in inoculated agricultural soil samples. *Can. J. Microbiol.*, **36**: 786-793.
- GUIRAUD (G.), 1984. — *Contribution du marquage isotopique à l'évaluation des transferts d'azote entre les compartiments organiques et minéraux dans les systèmes Sol-Plante*. Thèse d'État, Paris-VI, 335 p.
- HASEBE (A.), KANAZAWA (S.) & TAKAI (Y.), 1985. — Microbial biomass in paddy soil. II. "Microbial biomass carbon" Measured by Jenkinson's Fumigation Method. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **31**: 349-359.
- INUBUSHI (K.), WADA (H.) & TAKAI (Y.), 1984. — Determination of microbial biomass-nitrogen in submerged soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **30**: 455-459.
- INUBUSHI (K.), WADA (H.) & TAKAI (Y.), 1985. — Factors influencing the determination of microbial biomass-nitrogen in submerged soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **31**: 481-485.
- INUBUSHI (K.) & WATANABE (I.), 1987. — Microbial biomass nitrogen in anaerobic soil as affected by N-immobilization and N₂-fixation. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **33**: 213-224.
- INUBUSHI (K.) & WADA (H.), 1988. — Mineralization of carbon and nitrogen in chloroform fumigated paddy soil under submerged conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **34**: 287-291.

- ISIRIMAH (N. O.) & KEENEY (D. R.), 1973. — Nitrogen transformations in aerobic and waterlogged histosols. *Soil Sci.*, **115**: 123-129.
- JENKINSON (D. S.) & POWLSON (D. S.), 1976. — The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, **8**: 209-213.
- JENKINSON (D. S.), 1988. — The determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil. In: *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems*, WILSON (J. R.) Ed., C.A.B. International, Wallingford (UK), 368-386.
- KARIM (A.), 1948. — Microbiological decomposition of water hyacinth. *Soil Sci.*, **66**: 401-406.
- KEENEY (D. R.) & NELSON (D. W.), 1982. — Nitrogen-Inorganic Forms. In: *Methods of Soil Analysis, Part 2*, PAGE (A. L.), MILLER (R. H.), KEENEY (D. R.) Eds., *Agronomy*, ASA Publ., Madison, Wisconsin (USA), **9**: 643-698.
- KEENEY (D. R.), 1982. — Nitrogen-Availability Indices. In: *Methods of Soil Analysis, Part 2*, PAGE (A. L.), MILLER (R. H.), KEENEY (D. R.) Eds., *Agronomy*, ASA Publ., Madison, Wisconsin (USA), **9**: 711-734.
- NICOLARDOT (B.), 1986. — Étude comparée de la minéralisation de différentes fractions cellulaires d'*Aspergillus flavus* dans un sol fumigé ou non au chloroforme. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **303**: 489-494.
- NICOLARDOT (B.) & CHAUSSOD (R.), 1986. — Mesure de la biomasse microbienne dans les sols cultivés. III. Approche cinétique et estimation simplifiée de l'azote facilement minéralisable. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, **23**: 233-247.
- NICOLARDOT (B.), GUIRAUD (G.), CHAUSSOD (R.) & CATROUX (G.), 1986. — Minéralisation dans le sol de matériaux microbiens marqués au carbone 14 et à l'azote 15 : Quantification de l'azote de la biomasse microbienne. *Soil Biol. Biochem.*, **18**: 263-273.
- NICOLARDOT (B.), GUIRAUD (G.), PERROT (C.), COUTON (Y.) & CATROUX (G.), 1989. — Prise en compte de la réorganisation d'azote lors de l'estimation de l'azote de la biomasse microbienne avec la méthode de fumigation au chloroforme. *Soil Biol. Biochem.*, **21**: 995-1002.
- PATRICK (W. H.), 1982. — Nitrogen Transformations in submerged soils. In: *Nitrogen in Agricultural Soils*, STEVENSON (F. J.) Ed., *Agronomy*, ASA Publ., Madison, Wisconsin (USA), **22**: 449-465.
- SHEN (S. M.), PRUDEN (G.) & JENKINSON (D. S.), 1984. — Mineralization and immobilization of nitrogen in fumigated soil and the measurement of microbial biomass nitrogen. *Soil Biol. Biochem.*, **16**: 437-444.
- SMITH (J. L.), NORTON (J. M.) & PAUL (E. A.), 1989. — Decomposition of ¹⁴C- and ¹⁵N-labelled organisms in soil under anaerobic conditions. *Plant Soil*, **116**: 115-118.
- STANFORD (G.), 1982. — Assessment of soil nitrogen availability. In: *Nitrogen in Agricultural Soil*, STENVENSON (F. J.) Ed., *Agronomy*, ASA Publ., Madison, Wisconsin (USA), **22**: 651-688.
- THOMPSON (J. P.), 1984. — Residue decomposition and nitrogen mineralization in a black earth under aerobic and waterlogged conditions. *Rev. Rural Sci.*, **5**: 205-217.
- WARING (S. A.) & BREMNER (J. M.), 1964. — Ammonium production in soil under waterlogged conditions as an index of nitrogen availability. *Nature*, **201**: 951-952.