

## Bulletin BSA/VBB n° 8 / Octobre 2004

|   |          |
|---|----------|
| <b>1. Rapport annuel du président .....</b>   | <b>1</b> |
| <b>2. Activités des groupes chargés de projets .....</b>  | <b>4</b> |
| 2.1. Information et sensibilisation .....   | 4        |
| 2.2. Microbiologie .....  | 4        |
| 2.3. Mycorhizes .....   | 5        |
| 2.4. Faune .....  | 5        |
| 2.5. Observation de longue durée (NABOKABO)5  |          |
| <b>3. Projets choisis du BSA.....</b>   | <b>6</b> |
| 3.1. Indicateurs de risque terrestres pour les régions des lacs de Baldegg, Greifen et Morat .....  | 6        |
| <b>4. Forum .....</b>   | <b>8</b> |
| 4.1. Secteur biologie du sol de l'Institut d'écologie terrestre.....  | 8        |
| 4.2. L'application de méthodes moléculaires à l'écologie microbienne: potentiel pour l'étude de la diversité bactérienne des sols et de la rhizosphère..... | 10       |
| 4.3. Evolution des paramètres biologiques des sols agricoles fribourgeois.....  | 16       |

---

### 1. Rapport annuel du président

*Guido Schmid*

*Amt für Umweltschutz, Fachstelle Bodenschutz, Saint Gall*

Souvenez-vous: en 1983, la protection des sols parvient de justesse à faire son entrée dans la législation helvétique (onze ans après l'adoption de la Charte des sols du Conseil de l'Europe, soit dit en passant). En 1986, les dispositions relatives à la protection des sols de la loi sur la protection de l'environnement sont concrétisées par l'ordonnance sur les polluants des sols. Pour la première fois, on dispose d'une définition de la fertilité : le sol est considéré comme fertile s'il présente, entre autres, une structure typique pour sa station et une capacité de décomposition intacte.

La pierre fondatrice du BSA était ainsi posée: En 1991, des représentantes et représentants des services de la protection des sols des cantons d'AG, BE, SG et SO fondent le «Groupe de travail biologie du sol», dont l'objectif est l'utilisation de méthodes biologiques dans le cadre de la protection des sols. En 1995, les stations de recherche FAL, FIBL et WSL de même que l'OFEFP rejoignent ce groupe de travail, qui donne naissance au BSA.

Aujourd'hui, après plus de 20 ans d'activités au total et bientôt 10 ans d'existence des groupes de travail du BSA, la protection du sol est entrée dans la force de l'âge. Une bonne occasion de faire le bilan et de nous interroger sur les acquis de ces dix années de biologie du sol.

Outre les échanges d'expériences entre les organes d'exécution et la recherche, de nombreux projets ont été lancés, soutenus ou mis en œuvre par les groupes de travail.

Voici un rappel des principaux projets:

- stratégie d'application «Biologie du sol et protection des sols»;
- instructions concernant le prélèvement d'échantillons et méthodes de référence (biomasse microbienne SIR, FEM, respiration microbienne, minéralisation de l'azote, activité déshydrogénase, potentiel infectieux des mycorhizes, populations de vers de terre);
- fourchettes de référence concernant les paramètres microbiologiques dans les terres assolées et les populations de vers de terre dans les prairies permanentes;
- paramètres de microbiologie et de physique des sols dans l'observation à long terme, première utilisation de paramètres microbiologiques au sein du NABO;
- stratégie «banque de données sur les paramètres microbiologiques»;

- expositions : vers de terre, «La nature au service des jardins», «Découvrir le sol»;
- outils pédagogiques: «Le sol, éditions CIP, 2001»;
- plate-forme de connaissances «KMSoil».

En fin de compte, tout cela représente un travail considérable accompli tant à l'intérieur qu'à l'extérieur des groupes de travail! S'il vous arrive, chère lectrice, cher lecteur, d'avoir le sentiment en lisant le bulletin BSA que la biologie du sol ne progresse que lentement, la liste démontre que beaucoup de choses ont été réalisées dans ce domaine. Que toutes celles et à tous ceux qui ont contribué à ces progrès soient cordialement remerciés. Ce bilan vient par ailleurs confirmer une autre réalité dont nous faisons quotidiennement l'expérience dans notre travail: la mise en œuvre demande du temps. Ou, pour l'exprimer avec le charme italien: «chi va piano va sano e lontano».

Depuis quelque temps, la plate-forme BSA sert de plus en plus souvent à des projets qui ne sont pas directement en rapport avec la biologie du sol. C'est aussi une occasion de réévaluer les objectifs de cette plate-forme. Dans quelle direction faudra-il orienter les travaux du BSA durant la prochaine décennie? Vous en apprendrez d'avantage à ce sujet dans le prochain bulletin.

**Groupes chargés de projets spécifiques rattachés au groupe de travail  
«Biologie du sol - application»**

**Octobre 2004**

| <b>Nom du groupe et thèmes abordés</b>  | <b>Membres</b>  | <b>Interlocuteur</b>   |
|---|---|--|
| <b>Information et sensibilisation</b>   |   |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Informer et sensibiliser le public aux questions se rapportant à la biologie du sol</li> <li>- Échanges d'expériences et de connaissances</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>R. Bono (BL)</li> <li>J. Burri (LU)</li> <li>C. Maurer-Troxler (BE)</li> <li>F. Okopnik (AG)</li> <li>B. Pokorni (NE)</li> <li>R. von Arx (OFEFP)</li> <li>G. von Rohr (SO)</li> <li>T. Wegelin (ZH)</li> </ul>                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>Dr. Roland von Arx</li> <li>OFEFP</li> <li>CH-3003 Berne</li> <li>Tél. 031 322 93 37</li> <li>roland.vonarx@buwal.admin.ch</li> </ul>   |
| <b>Microbiologie</b>  |   |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Élaborer et valider des stratégies de prélèvement d'échantillons (prairies, champs, forêts)</li> <li>- Choisir, standardiser et valider des méthodes</li> <li>- Documenter la variabilité dans le temps et dans l'espace</li> <li>- Mener des études pilotes sur la détermination d'atteintes concrètes</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>W. Heller (FAW)</li> <li>A. Fliessbach (FIBL)</li> <li>E. Laczko (Solvit)</li> <li>P. Mäder (FIBL)</li> <li>H.-R. Oberholzer (FAL)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Dr. Hans-Rudolf Oberholzer</li> <li>Agroscope FAL Reckenholz</li> <li>Reckenholzstrasse 191/211</li> <li>CH-8046 Zürich</li> <li>Tél. 01 377 72 97</li> <li>hansrudolf.oberholzer@fal.admin.ch</li> </ul> |
| <b>Mycorhizes</b>   |   |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Élaborer et valider des méthodes standard pour la description de l'état d'un sol sur le plan des mycorhizes</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>S. Egli (WSL)</li> <li>U. Galli (Grenchen)</li> <li>J. Jansa (ETH)</li> <li>C. Maurer-Troxler (BE)</li> <li>P. Mäder (FIBL)</li> <li>B. Senn (WSL)</li> <li>V. Wiemken (Uni BS)</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Dr. Simon Egli</li> <li>WSL</li> <li>Zürcherstrasse 111</li> <li>CH-8903 Birmensdorf</li> <li>Tél. 01 739 22 71</li> <li>simon.egli@wsl.ch</li> </ul>   |
| <b>Faune</b>  |   |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Évaluer et standardiser des méthodes de recensement des animaux du sol et les tester par des études de cas</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>S. Keller (FAL)</li> <li>C. Maurer-Troxler (BE)</li> <li>L. Pfiffner (FIBL)</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Dr. Claudia Maurer-Troxler</li> <li>Service de l'environnement et de l'agriculture, Rütli</li> <li>CH-3052 Zollikofen</li> <li>Tél. 031 910 53 33</li> <li>claudia.maurer@vol.be.ch</li> </ul>            |
| <b>Observation de longue durée</b>  |   |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coordonner des essais de biologie du sol dans le cadre du réseau cantonal d'observation des sols</li> <li>- Réaliser des essais pilotes d'observation de longue durée (en collaboration avec le projet FAL)</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>H. Brunner (FAL)</li> <li>J. Burri (LU)</li> <li>A. Fehlmann (SO)</li> <li>U. Gasser (ZH)</li> <li>C. Maurer-Troxler (BE)</li> <li>H.-R. Oberholzer (FAL)</li> <li>F. Okopnik (AG)</li> <li>G. Schmid (SG)</li> <li>P. Schwab (FAL)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Dr. Claudia Maurer-Troxler</li> <li>Service de l'environnement et de l'agriculture, Rütli</li> <li>CH-3052 Zollikofen</li> <li>Tél. 031 910 53 33</li> <li>claudia.maurer@vol.be.ch</li> </ul>            |

## 2. Activités des groupes chargés de projets

### 2.1. Groupe de projet «Information et sensibilisation»

Roland von Arx, OFEFP

En raison de retards dans la programmation et dans la résolution des problèmes de sécurité, la plate-forme électronique «KMSoil» n'a malheureusement pas pu être mise à la disposition des services cantonaux de protection des sols en 2003 comme prévu. Le but de cette plate-forme est d'encourager l'échange de connaissances entre les services cantonaux de la protection des sols et la Confédération.

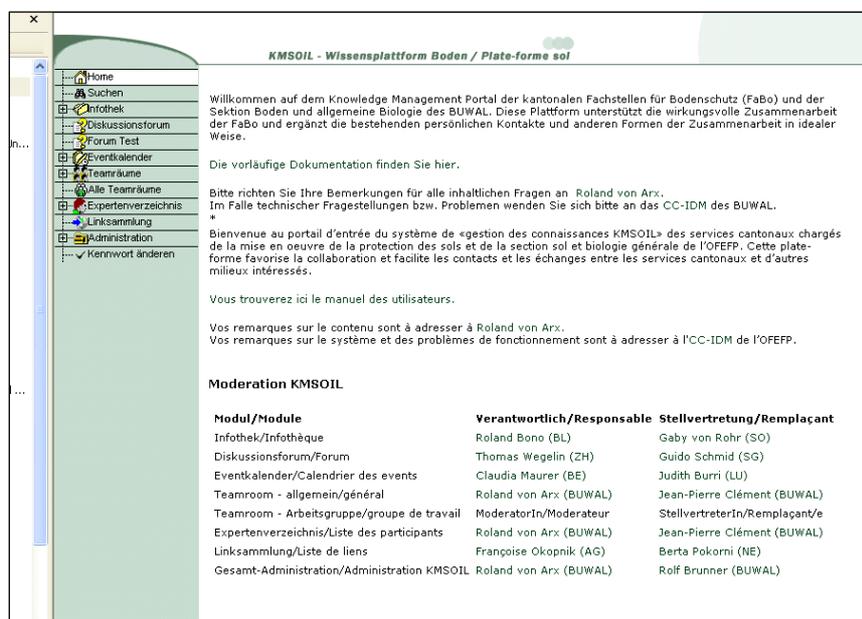


Figure 1: Aperçu du menu principal de la plate-forme du savoir sur le sol – KMSoil.

KMSoil se compose d'une infothèque (Fig. 1), d'une liste de spécialistes, d'un calendrier des manifestations, d'un forum de discussion, de team rooms (lieux d'échanges réservés aux groupes de travail), et de liens. La plate-forme est en service depuis le printemps 2004, et les services cantonaux peuvent désormais tester ce nouvel outil. Par la suite, d'autres services de protection des sols et instituts de recherche auront accès au KMSoil.

La phase pilote du projet de Patricia Fry «Von Bauern – für Bauern / des paysans – pour les paysans» s'est achevée en 2003. Les expériences de paysannes et de paysans seront vulgarisées à l'aide de vidéos, en mettant l'accent sur

la conservation et le rétablissement de la fertilité des sols. La mise en œuvre relève désormais des organisations agricoles et des services compétents. Le succès du projet dépend dans une large mesure du soutien du secteur agricole.

Après la version allemande, la Centrale des moyens d'enseignement agricole (LmZ) a remanié et édité, avec le soutien de l'OFEFP, la version française du manuel «Ecologie», destiné aux écoles d'agriculture. Editeur: LmZ, Zollikofen (fax: 031 911 49 52, e-mail: [lmz@pop.agri.ch](mailto:lmz@pop.agri.ch), <http://surf.agri.ch/lmz>).

De même, la nouvelle brochure sur le jardinage et l'écologie de la Fédération suisse des jardins familiaux ([www.familiengaertner.ch](http://www.familiengaertner.ch)) est désor-

mais aussi disponible en français sous le titre «Jardins familiaux en harmonie avec la nature». Cette brochure remplace l'ancien «Jardins conseils».

Le site internet [www.regenwurm.ch](http://www.regenwurm.ch) a été complété par des modules d'enseignement. Il connaît toujours un franc succès avec 50 à 80 consultations du site par jour.

Parallèlement aux diverses activités des services cantonaux de la protection des sols ([www.environment-suisse.ch/boden](http://www.environment-suisse.ch/boden)), les services

de l'environnement de la Suisse centrale (UR, SZ, NW, OW, LU, ZG) organisent pour la deuxième année, sous la direction des cantons de Lucerne et de Zoug, une série de manifestations consacrées au sol. Les actions grand public sont assurées par «ökomobil» (bureau de conseil en environnement, Lucerne).

### 2.2. Groupe de projet «Microbiologie»

Hans-Rudolf Oberholzer  
Agroscope FAL Reckenholz

Le groupe de travail a coordonné différents projets d'instituts de recherche dans le domaine de la biologie du sol. Il a également collaboré à une étude de faisabilité sur l'utilisation d'indicateurs environnementaux dans l'agriculture en Suisse. Par ailleurs, des

membres du groupe ont conseillé les cantons au sujet de l'application de méthodes de microbiologie dans le cadre de l'observation à long terme.

### **2.3. Groupe de projet «Mycorhizes»**

*Simon Egli, WSL Birmensdorf*

La méthode standard de détermination du potentiel de colonisation des sols agricoles par des mycorhizes a été remaniée et est désormais publiée dans sa nouvelle version comme méthode de référence des Stations fédérales de recherche agronomique. Elle a encore été simplifiée, notamment dans le but de réduire au minimum le temps de travail. Le gain de temps s'élève à 25%. Nous espérons que cette méthode sera davantage utilisée dans la pratique pour l'évaluation biologique des sols. Le groupe de projet se tient volontiers à disposition pour des aides méthodologiques.

### **2.4. Groupe de projet «Faune»**

*Claudia Maurer-Troxler*  
*Division Environnement et Agriculture, Berne*

Ce groupe n'a pas mené d'activité en 2004. Par manque de capacités, ce groupe est suspendu jusqu'à nouvel avis.

### **2.5. Groupe de projet «Observation de longue durée» (NABOKABO)**

*Françoise Okopnik*  
*Abteilung für Umwelt, Sektion Boden und Wasser, Aarau*  
*Peter Schwab*  
*direction du projet LAZBO, FB14.2 (NABO) FAL*

Outre des collaborateurs de la FAL, le groupe de projet «Observation de longue durée» du BSA réunit des représentantes et représentants des cantons d'AG, BE, GR, SG, SO et ZH. L'une de ses priorités est l'introduction de méthodes de biologie et de physique des sols dans le réseau cantonal KABO. Pour que les cantons réussissent à intégrer de nouvelles méthodes dans leur réseau d'observation, le NABO doit d'abord montrer la voie.

Ce n'est qu'au terme des essais pilotes et de la phase test que l'on pourra décider s'il est possible d'intégrer dans le programme de recherches du NABO des mesures de la variabilité temporelle de propriétés physiques et biologiques sur les sites de référence.

Un rapport sera établi en 2004 afin de présenter les résultats des trois années d'essais pilotes du LAZBO, d'évaluer les méthodes étudiées, et de tirer de premières conclusions concernant la stratégie d'observation à long terme. D'ici à 2006, ces premières expériences seront mises en pratique dans le cadre d'une stratégie modifiée. Elles seront testées et optimisées pour l'utilisation de routine au moyen de trois nouveaux relevés effectués sur les mêmes sites (phase test LAZBO). Des recommandations seront soumises à la FAL en 2007.

Dans le cadre d'un autre essai, la FAL va suivre jusqu'en 2006 deux paramètres de microbiologie du sol (respiration du sol, biomasse microbienne SIR) sur 60 sites sélectionnés du NABO, à raison de quatre échantillons. L'objectif est de déterminer la variabilité au sein du réseau de référence NABO et de valider un modèle de valeurs de référence existant.

Les cantons représentés dans le groupe de travail aspirent à mettre en valeur conjointement leurs informations du KABO dans certains cas. Un projet dans lequel des données ont été ainsi rassemblées a permis l'exploitation d'informations relatives à l'acidification des sols forestiers. C'est sur ce projet que l'accent a été mis en 2003.

### 3. Projets choisis du BSA

#### 3.1. Indicateurs de risque terrestres pour les régions des lacs de Baldegg, Greifen et Morat

Andreas Fliessbach

FiBL, Ackerstrasse, 5070 Frick

E-mail: andreas.fliessbach@fibl.ch

En règle générale, les statistiques sur les pesticides sont établies sur la base de chiffres de ventes ou d'indications fournies par les fabricants, et sont rarement très détaillées. La Société suisse des industries chimiques (SSIC) publie ainsi chaque année des statistiques sur les ventes et le chiffre d'affaire dans ce secteur en Suisse. Ces chiffres reflètent environ 90% du volume du marché, mais ils sont trop généraux pour fournir des indications sur les substances actives et les régions d'utilisation. D'une manière générale, les pesticides, outre leurs effets souhaités sur les adventices, les maladies fongiques, les insectes et autres organismes, ont également pour effet secondaire de polluer l'environnement. Ces effets secondaires dépendent de la quantité, de la toxicité et de la durée de résidence d'une substance dans l'environnement. Les propriétés des matières actives de pesticides sont sujettes à de fortes variations, raison pour laquelle l'évaluation de l'impact environnemental doit tenir compte de l'exposition, de la toxicité, de la disponibilité et de la biodégradabilité de chaque substance active dans le compartiment environnemental considéré. Les indicateurs de risque sont définis à partir de données connues sur les propriétés des substances actives et les domaines d'utilisation. D'où l'importance de disposer

d'informations très détaillées. Pour le calcul d'indicateurs de risques, il est donc plus intéressant de disposer de données sur l'utilisation plutôt que de chiffres de ventes au niveau national ou que de statistiques générales.

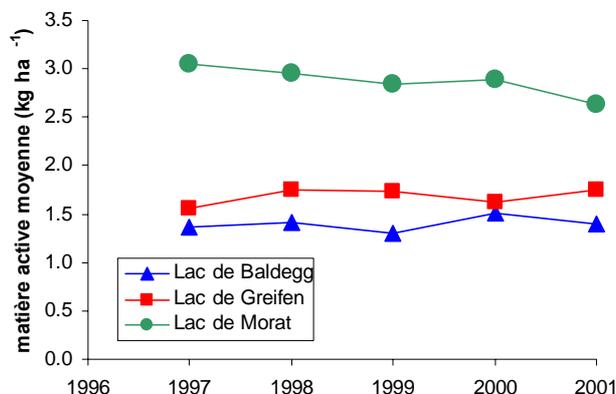


Figure 2: Quantité moyenne de pesticides utilisés par ha et par année dans les trois régions de lac.

A la demande de l'OFAG, le Service Romand de Vulgarisation Agricole à Lausanne (SRVA) et la Landwirtschaftliche Beratungszentrale de Lindau (LBL) ont mené de 1997 à 2001 une enquête auprès de paysans dans les régions des lacs de Baldegg, Greifen et Morat. Dix à 15 % des agriculteurs de chaque région ont été invités à remplir un calendrier des champs, en indiquant le plus précisément possible le type de pesticide et la quantité utilisée, les cultures traitées et les dates d'utilisation. Les calendriers ont ensuite été renvoyés aux deux services de vulgarisation. Cette procédure a permis de disposer de données sur 3 à 5 % de la surface agricole utile. Celles-ci ont été extrapolées à l'ensemble de la surface à l'aide de la banque de données AGIS de l'OFAG (Tab. 1; Fig. 2).

Tableau 1: Terres assolées et prairies permanentes dans les trois régions étudiées.

|                | Surface agricole utile (ha) | Prairies naturelles et artificielles (ha) | Terres assolées (ha) | Autres cultures (ha) | Terres assolées (%) |
|----------------|-----------------------------|---|----------------------|----------------------|---------------------|
| Lac de Baldegg | 8186                        | 5561                                      | 2550                 | 75                   | 31%                 |
| Lac de Greifen | 9908                        | 6942                                      | 2918                 | 49                   | 29%                 |
| Lac de Morat   | 41108                       | 16888                                     | 23182                | 1038                 | 56%                 |

## Indicateurs de risques

Les indicateurs de risques ont déjà été présentés dans un précédent bulletin (Wyss, 2002). Chaque indicateur établit un rapport entre exposition et toxicité. L'indicateur hollandais (NL) divise encore ces quotients par la surface totale traitée avec des pesticides et représente donc plutôt une mesure moyenne de la toxicité. Le modèle norvégien (NO) recourt à un système échelonné (score). A l'origine, tous les indicateurs ont été développés pour être utilisés à partir de chiffres de ventes nationaux.

Ni l'indicateur hollandais ni le norvégien n'ont révélé une évolution régulièrement parallèle à celle de la quantité moyenne de matière active. Seul le «Load-Index» danois (DK) a montré une relation avec la quantité de pesticides. L'indicateur hollandais a présenté une corrélation assez étroite avec les matières actives hautement toxiques, comme le loxynil, qui entre dans la composition de certains herbicides pour le blé d'hiver (Tab. 2).

Tableau 2: Coefficients de détermination ( $r^2$ ) pour les régressions linéaires entre indicateurs de risques terrestres de les Pays-Bas, Danemark et Norvège et intensité moyenne de protection phytosanitaire.

|                       | NL Indicateur<br>vers de terre | NL Indicateur<br>oiseaux | DK Indicateur<br>vers de terre | DK Indicateur<br>oiseaux | NO Indicateur |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------|
| Lac de Baldegg        | (-) 0.072                      | (-) 0.000                | 0.480                          | 0.004                    | 0.453         |
| Lac de Greifen        | (-) 0.003                      | (-) 0.005                | (-) 0.054                      | (-) 0.353                | (-) 0.239     |
| Lac de Morat          | 0.124                          | (-) 0.152                | 0.446                          | 0.003                    | 0.323         |
| Toutes les<br>régions | 0.039                          | 0.005                    | 0.319                          | (-) 0.145                | 0.041         |

Les indicateurs Néerlandais et Danois calculent des risques séparés pour les vers de terre et les oiseaux. L'indicateur Norvégien contient les toxicités pour les oiseaux, les vers de terre et les abeilles.

## Conclusions

Les données relatives à l'utilisation de pesticides dans les trois régions étudiées présentent de grandes différences au niveau de la distribution spatiale. Dans la région des lacs de Baldegg et de Greifen, on pratique surtout les grandes cultures et la production animale, c'est pourquoi on y trouve une forte proportion de prairies. Dans la région du lac de Morat, cette proportion est beaucoup plus faible, ce qui indique une exploitation plus intensive des surfaces (cultures sarclées et cultures maraîchères). Indépendamment des différences de grandeur, la meilleure qualité des données dans la région du lac de Morat semble aussi provenir du nombre plus élevé de points d'information, ce que confirme également la variabilité temporelle plus faible. On peut déduire de ces résultats que le recensement de données sur l'utilisation de pesticides est très sensible à la distribution temporelle et spatiale.

L'hypothèse selon laquelle une réduction des utilisations de pesticides se traduit par une diminution des risques n'a été étayée que dans quelques cas par les indicateurs danois et norvégiens. Mais on a aussi observé dans d'autres cas un indicateur à la hausse parallèlement à une diminution des quantités utilisées. Si cette tendance devait se confirmer, cela

signifierait que l'on recourt de plus en plus souvent à des pesticides hautement toxiques. Ces résultats doivent être considérés comme provisoires, car nous n'avons pas pu déterminer si la variabilité relevée reflète des différences effectives dans l'utilisation des pesticides, ou si elle résulte simplement de différences au niveau de l'intensité de l'échantillonnage. Pour pouvoir évaluer l'impact de mesures environnementales et agricoles, on doit disposer de données représentatives et fiables sur l'utilisation des pesticides. Il n'existe pas encore de comparaison entre indicateurs et effets concrètement mesurés qui pourrait servir de base pour évaluer l'exactitude et la plausibilité des indicateurs de risque. Dans ce domaine, la recherche présente encore des lacunes. Un projet, soutenu par la Communauté européenne et auquel est associée la Suisse (UE Programme de recherche: Wider Fields; UE n° 2002-501997-SSP-1), s'efforce de procéder à une vérification de ces indicateurs dans le cadre d'une harmonisation des indicateurs environnementaux de pesticides.

Wyss, G 2002 Indicateurs de risques concernant l'effet de produits phytosanitaires sur les systèmes terrestres. *Bulletin BSA/VBB* 6, 10-12.

## 4. Forum

Le groupe de travail BSA/VBB se situe à cheval entre la recherche en biologie du sol et l'application des dispositions légales. L'un de ses principaux objectifs est de mettre à la disposition des cantons des méthodes de biologie du sol utilisables dans le cadre de la mise en œuvre de l'OSol.

Dans ce domaine comme dans celui des sciences biologiques en général, tout évolue très rapidement. Pour se tenir au courant des dernières tendances dans la recherche fondamentale, le BSA/VBB invite des spécialistes universitaires à présenter leurs travaux. Les professeurs Josef Zeyer, de l'Institut d'écologie terrestre, et Michel Aragno de l'Université de Neuchâtel, ont ainsi pu exposer les grands axes de leurs recherches et quelques projets choisis au cours de deux séances.

### 4.1. Le Secteur biologie du sol de l'Institut d'écologie terrestre (<http://www.ito.umnw.ethz.ch/SoilBio/>)

Josef Zeyer  
 Institut für Terrestrische Ökologie,  
 Grabenstrasse 3, 8952 Schlieren  
 Email: josef.zeyer@env.eth.ch

#### Aperçu et organisation

L'Institut d'écologie terrestre (ITOE) de l'EPF à Schlieren se divise en quatre secteurs: physique du sol (direction: H. Flühler), chimie du sols (R. Kretzschmar), protection des sols (R. Schulin) et biologie du sol (J. Zeyer). A l'époque de sa création, qui remonte à plus de dix ans, le centre de l'EPFZ et le site de l'Hönggerberg n'avaient pratiquement pas de place disponible. C'est pourquoi l'on décida d'installer temporairement l'Institut dans l'ancien site de Wagi, près de la gare de Schlieren. Quelque 80 à 90 personnes y travaillent actuellement. L'institut reçoit des contributions fixes de l'EPFZ (postes de la Confédération et crédits ordinaires), mais doit aussi procéder parallèlement à des recherches de fonds intensives (financement de projets par le FN, l'EU, COST, l'industrie, l'OFEFP, les cantons, etc.). Les laboratoires de Schlieren sont bien équipés et permettent d'effectuer des recherches dans les domaines les plus divers. En revanche, les cours se déroulent généralement dans les auditoriums de l'EPFZ, car

l'Institut d'écologie terrestre ne dispose pas de locaux adéquats à Schlieren. En été 2005, il est prévu que l'ITOE et d'autres instituts s'installent à l'EPFZ dans les anciens locaux des départements *Chimie* et *Biologie*, qui ont été transférés il y a quelque temps à l'Hönggerberg.

### Structure et domaines de recherche du secteur biologie du sol

Les recherches du secteur biologie du sol se concentrent sur l'étude des processus. Les cycles de substances dans le sol pilotés par une catalyse biologique revêtent une importance décisive pour l'être humain et son environnement. Ces processus sont notamment responsables de la transformation permanente de substances naturelles (comme les composés du carbone et de l'azote) et anthropiques (par ex. engrais minéraux, pesticides, déchets), transformation qui contribue à la conservation de la qualité des sols et de l'air. Le secteur met l'accent d'une part sur l'analyse qualitative et quantitative de ces processus, d'autre part sur la caractérisation des «catalyseurs», autrement dit des communautés microbiennes. Ces recherches sont menées aussi bien en laboratoire qu'en plein champ. Ces activités se répartissent grossièrement en trois domaines:

*Processus microbiens au niveau du sous-sol:* ce groupe de recherche s'attache principalement à la quantification *in situ* de processus dans des sols en place (notamment l'oxydation de gaz à effet de serre comme le méthane) et dans des formations aquifères contaminées (notamment la biodégradation de fuites d'huile de chauffage dans des conditions anaérobies). Ces recherches doivent tenir compte du fait que de très nombreux processus microbiens sont liés à des processus géochimiques.

*Ecologie moléculaire:* ce secteur développe ou optimise des méthodes moléculaires destinées à analyser des structures et des fonctions microbiennes dans le sol. Ces méthodes se basent essentiellement sur des analyses d'ADN et/ou d'ARN et utilisent des détections par PCR (*Polymerase Chain Reaction*), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) et sondes génétiques.

*Interactions biologiques:* ce groupe se consacre à l'étude de réseaux dans le sol (par ex. chaîne alimentaire). La plupart des transformations dans le sol interviennent dans le cadre de

réseaux et ne peuvent être comprises que si l'on étudie aussi les processus qui les accompagnent. Par exemple, des bactéries peuvent se développer sur certains polluants organiques, mais servir ensuite de nourriture à des protozoaires.

Les trois groupes de recherche travaillent en étroite collaboration, de manière à exploiter toutes les synergies potentielles. Ainsi, les processus de biodégradation dans des formations aquifères contaminées sont quantifiés in situ à l'aide de méthodes chimiques et géochimiques, et les communautés microbiennes responsables de la biodégradation sont caractérisées parallèlement au moyen de méthodes moléculaires. Par ailleurs, le secteur biologie du sol a besoin de coopérer avec d'autres laboratoires en Suisse et à l'étranger. Les études isotopiques sont menées en collaboration avec l'Institut Paul Scherrer à Villigen et l'Institut de géologie de l'EPFZ. Dans le domaine de l'écologie moléculaire, le secteur collabore avec le MPI à Brême, le GSF à Munich et le GBF à Brunswick.

### Projets de recherche choisis

#### a) Biodégradation microbienne d'huiles minérales dans des formations aquifères

Si des huiles minérales parviennent dans une formation aquifère lors d'un accident, elles sont lentement minéralisées sous l'effet des microorganismes présents naturellement. Ce processus est lié à la décomposition d'oxydants, et ces sites présentent souvent des conditions sulfato-réductrices et méthanogènes. A Studen, dans le canton de Berne, une formation aquifère contaminée fait actuellement l'objet d'études portant sur la vitesse des processus de minéralisation et donc d'auto-épuration, sur les populations microbiennes responsables de la biodégradation, et sur les processus géothermiques parallèles aux processus microbiologiques. Dans les régions à forte densité de constructions (Fig. 3), la biodégradation microbienne intrinsèque représente souvent la seule possibilité d'assainissement.

Kleikemper, J, Schroth, MH, Sigler, WV, Schmucki, M, Bernasconi, S, Zeyer, J 2002. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1516-1523

#### Pollution par des huiles minérales à la suite d'un accident à Studen, BE

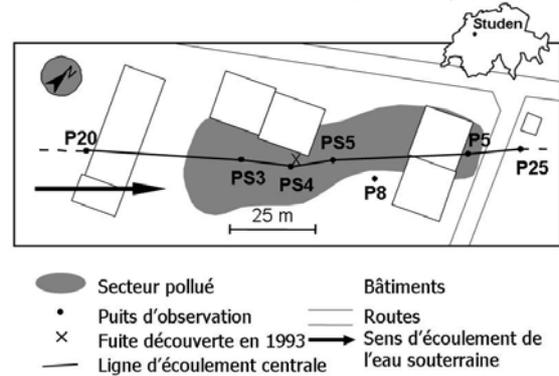


Figure 3: Zone de recherche de Studen (Berne).

#### b) Succession microbienne dans les marges proglaciaires

La marge proglaciaire des glaciers en recul est rapidement colonisée par des pionniers (microorganismes, plantes). Après une cinquantaine d'années, un processus de formation du sol y est déjà clairement visible. C'est donc un terrain d'expérimentation idéal pour l'étude de la succession microbienne et des principaux processus métaboliques (altération des roches, fixation de l'azote, échanges au niveau de la rhizosphère, etc.). Nous assurons ainsi un suivi qualitatif et quantitatif des processus de formation du sol dans la marge proglaciaire du Dammagletscher au Göschenalp.

Sigler, VW, Crivii, S, Zeyer, J 2002. Bacterial succession in glacial forefield soils characterized by community structure, activity and opportunistic growth dynamics. *Microb Ecol* **44**, 306-316

#### c) Influence de l'entreposage sur la qualité biologique des sols

La biodégradabilité des herbicides doit être testée par les fabricants dans différents types de sol. Les échantillons de sol prélevés à cet effet sur le terrain doivent inévitablement être transportés et stockés au laboratoire, souvent pour une assez longue période. Des essais menés en collaboration avec Syngenta SA étudient l'impact de l'entreposage sur la qualité biologique et donc la capacité de biodégradation des sols.

Pesaro, M, Widmer, F, Nicollier, G, Zeyer, J 2003. Effects of freeze-thaw stress during soil storage on microbial communities and methidathion degradation. *Soil Biol Biochem* **35**, 1049-1061

## d) Quantification de la fixation de l'azote à l'aide de méthodes moléculaires

Le recours à des méthodes de biologie moléculaire permet une détermination de plus en plus détaillée des populations fixatrices d'azote dans le sol. On dispose également de méthodes fiables pour déterminer l'intensité de la fixation de l'azote dans le sol. Ce qui manque encore, c'est une corrélation directe entre la structure des populations et l'intensité de la fixation d'azote. C'est à ce niveau qu'intervient ce projet de recherche, qui s'efforce de mettre en évidence le rapport entre structures et fonctions au moyen d'une quantification des mRNA et de la nitrogénase dans le sol.

Bürgmann, H, Widmer, F, Sigler, WV, Zeyer, J 2003. mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1928-1935

## 4.2. L'application de méthodes moléculaires à l'écologie microbienne: potentiel pour l'étude de la diversité bactérienne des sols et de la rhizosphère

Michel Aragno  
Laboratoire de Microbiologie, Institut de Botanique, Université de Neuchâtel,  
2000 Neuchâtel  
Email: [michel.aragno@unine.ch](mailto:michel.aragno@unine.ch)

### Introduction

La connaissance de la diversité bactérienne dans les milieux naturels est longtemps restée bien en arrière de celle des autres groupes vivants. On pense généralement qu'une large majorité des espèces de bactéries n'ont pas été décrites à ce jour. Cet état de fait résulte de plusieurs facteurs: les progrès de la biologie cellulaire et moléculaire bactérienne fondamentale, durant les années 1960 et 70, ont été basés essentiellement sur l'étude d'une seule espèce, *Escherichia coli*. En outre, des méthodes modernes et fiables manquaient à l'écologie et à la taxonomie bactériennes. En fait, les méthodes classiques, faisant appel à la culture des bactéries, sont frappées d'un grave biais: dans un sol "moyen", les comptage de cellules au microscope, après coloration des cellules vivantes (DAPI, orange d'acridine) donnent des valeurs en moyenne cent fois plus élevées que les comptages réalisés par une approche cultu-

rale (MPN sur milieux liquides ou comptage de colonies sur gélose nutritive); en d'autres termes, 99% des cellules bactériennes du sol échappent ainsi à l'investigation !

Il fallait donc trouver des méthodes évitant le biais de la cultivabilité. On peut évaluer indirectement la biomasse par le dosage d'ATP (Maire, 1984; 1987) ou par fumigation au chloroforme (Voroney et Paul, 1984). L'analyse des acides gras des phospholipides (PLFA), si elle permet une évaluation de la biomasse, fournit des indications supplémentaires: certains acides gras sont propres à certains groupes taxonomiques et peuvent permettre de les identifier. La diversité des PLFA dans un échantillon peut aussi nous fournir une image de la diversité des organismes présents (Laczko, 1994). Mais l'impulsion la plus considérable à l'étude de la diversité microbienne dans les milieux naturels, particulièrement dans les sols, a été apportée par l'application de méthodes de biologie moléculaire. Mentionnons l'utilisation de sondes d'ADN (p. ex. l'hybridation in situ par des sondes fluorescentes, FISH, Amann et al., 1995) et surtout les méthodes basées sur l'amplification spécifique de segments d'ADN par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Ces dernières ont contribué, depuis une dizaine d'années, à faire de l'écologie microbienne, autrefois science quelque peu "ringarde", une des disciplines majeures de la biologie moderne.

## L'approche moléculaire des communautés microbiennes par PCR

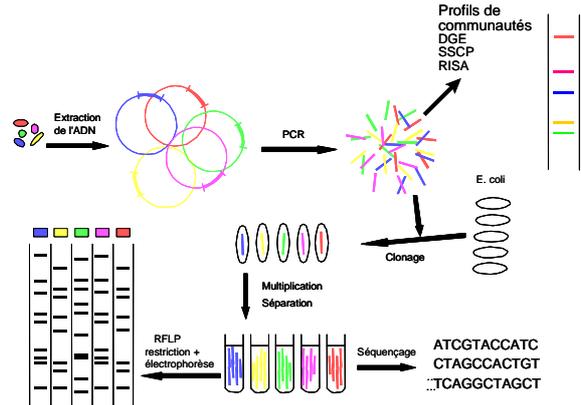


Figure 4: Caractérisation moléculaire de communautés bactériennes.

Un schéma de base (Fig. 4) nous permettra d'exposer le principe des méthodes dérivées de la PCR. Partant d'un échantillon d'un milieu naturel (par exemple un sol) habité par une communauté mixte de bactéries, on extrait l'ADN présent dans les cellules, et on le purifie.

On effectue ensuite par PCR l'amplification d'un segment spécifique de cet ADN, choisi selon les besoins, au moyen de deux amorces, courts oligonucléotides d'ADN dont les séquences sont homologues à celles des extrémités du segment à amplifier. Le produit de cette amplification est donc un mélange de segments représentatifs de tout ou partie de la communauté initiale. On peut choisir des amorces amplifiant un segment d'un gène «universel» (p. ex. un gène ribosomique), dans des régions où les séquences sont identiques chez toutes les bactéries: on amplifiera ainsi les segments homologues chez toutes les bactéries présentes. Le mélange des ADN amplifiés fournit ainsi une image de la communauté bactérienne de l'échantillon dans son ensemble.

### Choix des séquences à amplifier

Les gènes ribosomiques étant les marqueurs phylogénétiques les plus étudiés, les produits d'une telle PCR pourront être utilisés pour établir la diversité et l'identité phylogénétique des bactéries de la communauté. Les différentes régions des gènes ribosomiques présentent des degrés différents de conservatisme. On peut y trouver des segments dont les séquences sont identiques chez tous les êtres vivants, ou chez toutes les Bactéries, ou seulement chez un groupe particulier (par exemple les (Protéobactéries), voire chez un seul genre (ex: *Pseudomonas*). On peut ainsi choisir des séquences d'amorces spécifiques à un groupe particulier de bactéries (séquences-signatures): on n'amplifiera alors que les segments homologues de ce groupe.

Les séquences les plus variables sont toutefois celles situées entre les gènes ribosomiques. Ces derniers sont séparés par des intergènes, segments non codants et par conséquent peu ou pas soumis à une pression évolutive. Des mutations auront par conséquent une probabilité plus élevée d'y être maintenues au cours de l'évolution. Ces intergènes sont donc a priori des indicateurs phylogénétiques beaucoup plus fins, permettant un identification à un niveau infra-spécifique.

On peut aussi amplifier des segments d'autres gènes, comme ceux codant pour des fonctions particulières: il sera ainsi possible de cibler l'identité fonctionnelle des organismes dans l'échantillon.

### Description des communautés microbiennes: profils électrophorétiques et clonage-séquençage

A partir du mélange de segments produits par la PCR, plusieurs méthodes permettent d'établir une séparation dans un gel d'électrophorèse, sur lequel les différentes bandes correspondent aux différentes populations préalablement amplifiées (Fig. 5). Nous renvoyons le lecteur à la littérature spécialisée ou à un ouvrage de base tel que Gobat et al. (2003, 2004) pour un exposé plus détaillé de ces méthodes, qui toutes fournissent des profils décrivant la diversité et la structure des communautés étudiées. Ces profils peuvent ensuite être numérisés et comparés par des méthodes statistiques (Fromin et al., 2002). Des indices de diversité (Hamelin et al., *subm.*) peuvent être attribués à chaque profil.

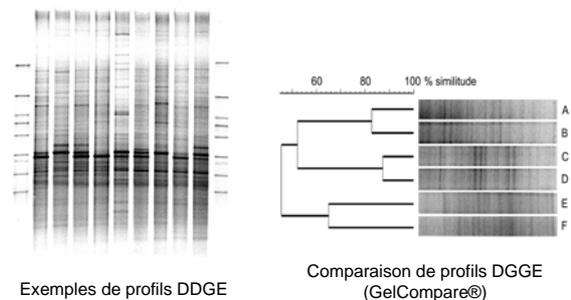


Figure 5: Exemples de profils de communautés.

A partir du produit de la PCR, ou de bandes découpées dans un profil électrophorétique, on peut réaliser un clonage, qui consiste à insérer un segment d'ADN dans un plasmide, petite unité génomique transférable que l'on introduit ensuite dans une cellule d'*Escherichia coli*. Chaque cellule porte alors un exemplaire de l'un au hasard des segments amplifiés par PCR. Une collection de clones fournit ainsi, à son tour, une image de la communauté initiale. Les clones ainsi «isolés» pourront être caractérisés, par exemple par des profils de restriction (RFLP) et/ou par séquençage. En comparant les séquences obtenues avec celles figurant dans les bases de données (celles concernant les gènes ribosomiques sont particulièrement riches), on peut évaluer la position phylogénétique de chacun des organismes dont l'ADN a été amplifié et cloné.

### Vers une approche des fonctionnalités: la RT-PCR

L'amplification d'un gène codant pour une fonction particulière nous informe sur la

présence d'organismes porteurs de ce gène. Cela ne signifie pas nécessairement que ces organismes sont actifs, là et quand l'échantillon a été prélevé. Une opération supplémentaire, la transcription inverse (en anglais "reverse transcription", RT), permet d'introduire une dimension plus fonctionnelle dans les études moléculaires. Elle consiste à synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) à un ARN. Une enzyme présente dans des virus à ARN, la transcriptase inverse, est utilisée dans ce but. On peut ensuite effectuer une amplification par PCR de tout ou partie de l'ADNc. Cette technique est désignée par "RT-PCR".

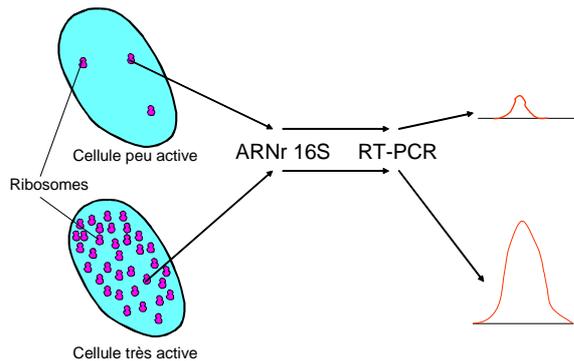


Figure 6: RT-PCR de l'ARN ribosomique: pondération par l'activité cellulaire.

On peut effectuer une RT-PCR sur les ARN ribosomiques, suivie d'une séparation électrophorétique des produits. La différence par rapport aux profils obtenus à partir de l'ADN (Fig. 6) tient à ce que la teneur en ribosomes des cellules dépend fortement de leur activité. Ainsi, à densité égale, une population très active fournira une bande beaucoup plus intense par RT-PCR qu'une population peu active (Fig. 7). Il est ainsi possible de repérer les populations les plus actives de la communauté.

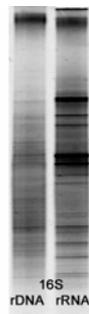


Figure 7: Comparaison de profils de communautés (segment V3 du gène de l'ARN 16S. A gauche: PCR à partir de l'ADN total d'un échantillon; à droite: RT-PCR à partir de l'ARN total du même échantillon.

Pour qu'une activité enzymatique soit présente, il faut que le gène correspondant soit induit.

Sous l'effet d'un signal moléculaire, l'ARN messenger du gène en question est synthétisé (transcription du gène) (Fig. 8). On peut dès lors, après extraction des ARN d'un échantillon, tenter d'amplifier un ARN messenger donnée par RT-PCR. Si cette amplification réussit, c'est que le gène a été transcrit. Ceci est une bonne indication, mais pas encore une preuve, que l'activité a été induite.

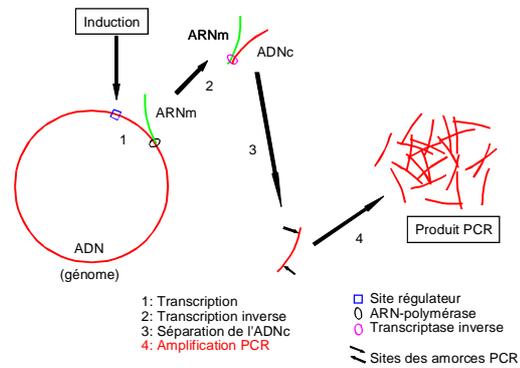


Figure 8: Principe de la RT-PCR.

### Les approches moléculaires reflètent-elles parfaitement les communautés microbiennes?

En comparaison des approches culturales, les approches moléculaires permettent d'éviter le "biais" majeur de la cultivabilité. Elles nous fournissent des informations sur la structure des communautés et la position phylogénétique des "99%" de cellules non cultivables (ou que l'on ne sait pas cultiver!) présentes dans l'échantillon. Mais ces informations sont fragmentaires. Les développements récents permettent d'approcher les fonctions des organismes, sans passer par leur culture. Mais il n'est pas (encore?) possible de lier les gènes fonctionnels amplifiés à l'identité phylogénétique des organismes qui les portent.

Les méthodes moléculaires sont soumises à d'autres biais qu'il faut aussi prendre en compte. Le premier point est celui de l'échantillonnage. Un échantillon de petite taille est généralement suffisant pour une analyse PCR. Mais il sera plus fortement influencé par la micro-hétérogénéité du sol étudié qu'un échantillon plus volumineux. En revanche, un échantillon volumineux ne rendra pas compte de la structure fine des communautés à l'échelle des agrégats ou des microgradients du sol et de la rhizosphère. (Morris et al., 2002)

L'extraction et la purification de l'ADN d'un échantillon est une phase critique de l'analyse. Il faut pour cela "casser" les cellules bactériennes: certaines sont plus résistantes que d'autres, aussi le succès de l'extraction peut-il dépendre du type d'organisme: l'ADN d'un organisme très "coriace" ne sera ainsi que partiellement extrait, tandis que celui d'un organisme fragile pourrait être endommagé par le processus d'extraction. De même, on ne peut être certain que les ADN de tous les groupes de bactéries soient amplifiés avec la même efficacité. La PCR classique ne permet pas d'évaluer avec précision la quantité initiale du gène amplifié. Des méthodes de PCR quantitative permettent cependant une meilleure estimation.

Les profils de communautés sont d'autant mieux séparés que la taille des segments analysés est petite. En revanche, l'information que l'on peut tirer du séquençage de courts segments est insuffisante pour une analyse phylogénétique précise.

Enfin, les profils de communautés ne permettent de mettre en évidence que les populations dominantes, représentant au moins 0.1 à 1% de la communauté totale. L'étude de groupes particuliers, au moyen d'amorces sélectives, permet toutefois d'atteindre des populations plus réduites, appartenant au groupe considéré. Ainsi, des populations de *Pseudomonas* qui n'auraient pas été détectées dans un profil "universel" le seraient dans un profil restreint aux (-)Protéobactéries, si elles représentent au moins 0.1-1 % des seules (-)Protéobactéries.

### Quelques exemples d'études rendues possibles par les méthodes moléculaires

#### a) Effet de la proximité de la racine sur la diversité bactérienne

Les racines vivantes des plantes sécrètent dans le sol une quantité de matière organique comparable à celle qu'elles accumulent dans leur biomasse. On a longtemps pensé que cette "manne" avait pour effet d'augmenter la diversité des bactéries au voisinage de la racine, dans la rhizosphère. Il n'en est rien. Dans une étude portant sur la diversité bactérienne dans la rhizosphère de l'ivraie (*Lolium perenne*) et du Trèfle blanc (*Trifolium perenne*), on a observé, en étudiant la communauté bactérienne totale par clonage, que la diversité diminuait significativement entre le sol distant, le sol rhizosphérique et la racine elle-même (surface de la racine

- le rhizoplan, et habitat endophytique - l'endorhizosphère) (Fig. 9, Marilley et al, 1997). La caractérisation des clones par séquençage a montré en outre que certains groupes étaient particulièrement favorisés par la proximité racinaire, alors que d'autres étaient présents essentiellement dans le sol distant (Fig. 10, Marilley et al, 1998).

Indice de Shannon-Weaver (H')

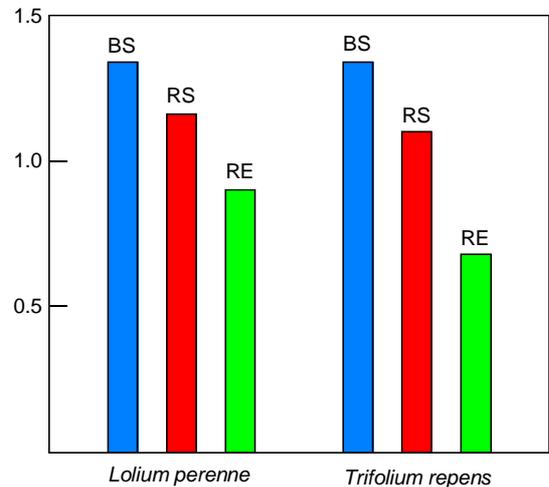


Figure 9: Diminution de la diversité des communautés bactériennes avec la proximité de la racine. (BS: sol distant; RS: sol de la rhizosphère; RE: racines lavées, endophytes).

% de la communauté bactérienne

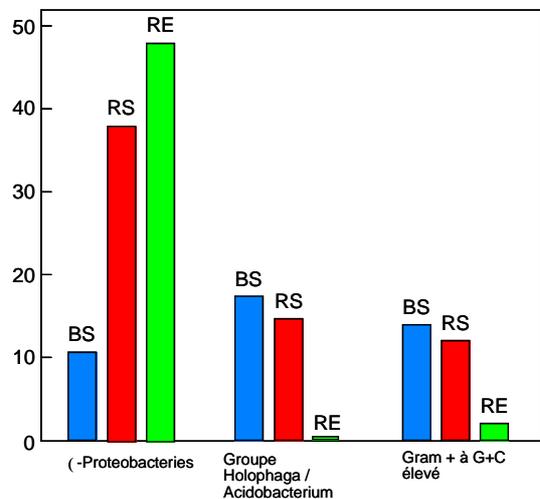


Figure 10: Distribution des groupes bactériens en fonction de la proximité racinaire. (BS: sol distant; RS: sol de la rhizosphère; RE: racines lavées, endophytes).

#### b) Mise en évidence de populations fixatrices d'azote

Les conditions pouvant régner dans la rhizosphère (faible concentration d'oxygène, abondance de nutriments énergétiques, concentra-

tion souvent faible d'azote disponible) favorisent l'activité des bactéries fixatrices d'azote. Toutefois, l'importance de cette fixation associative a été souvent mise en doute, surtout dans les agro-écosystèmes. *Molinia coerulea*, une Graminée abondante dans des régions sub-marécageuses, montre un développement abondant dans des sols extrêmement pauvres en azote, comme ceux de la rive sud du lac de Neuchâtel. On peut donc suspecter que la fixation associative joue un rôle important dans sa nutrition azotée. Une analyse des communautés fixatrices d'azote, basée sur une amplification par PCR du gène (*nifH*) codant pour la dinitrogénase-réductase, une enzyme du complexe fixateur d'azote de toutes les bactéries fixatrices, a effectivement démontré la présence de telles bactéries dans l'environnement racinaire de cette plante (Hamelin et al., 2002). La majorité des clones isolés appartiennent à un groupe de séquences très voisines. Toutefois, ce groupe ne correspond jusqu'ici à aucun organisme fixateur connu et cultivé. Il aurait donc échappé à une étude basée sur l'isolement des bactéries. Ce groupe est présent et abondant, aussi bien dans le sol non adhérent que dans le sol adhérent aux racines et dans la racine elle-même. En revanche, l'amplification, par RT-PCR, des ARN messagers du gène *nifH* n'a fourni un produit qu'à partir des tissus racinaires. Il semble donc bien que l'induction de la fixation d'azote nécessite un contact étroit avec la racine, le sol servant uniquement de réservoir pour les organismes fixateurs, qui n'y sont pas actifs.

**c) Effet du stade évolutif de la racine sur la communauté bactérienne**

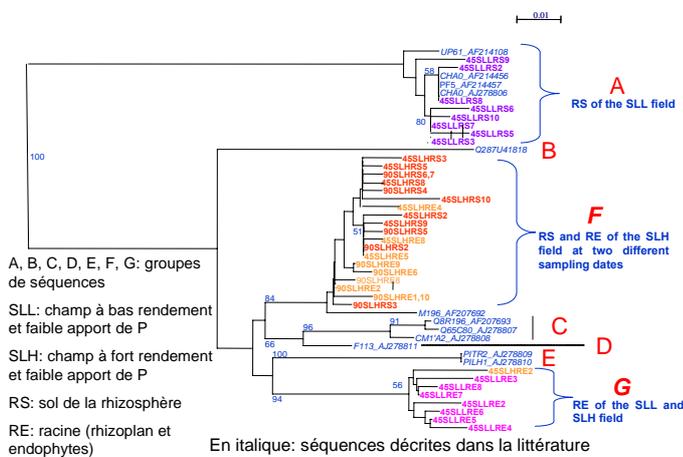


Figure 11: polymorphisme des séquences *phlD* de l'AND environmental DNA: cultures de blé, à Bhavanipur (Utar Pradesh, Inde).

Les activités de la racine évoluent au cours de son développement et, par conséquent, le long de son axe. La racine jeune, dans sa zone d'élongation, présente un maximum de sécrétion de composés organiques solubles, alors que les parties plus âgées montrent une autolyse des tissus corticaux. Un cas particulièrement marqué d'évolution racinaire est illustré par les racines protéoïdes produites par certains groupes de plantes non mycorhiziennes dans des sols carencés en phosphate. C'est le cas du Lupin blanc, *Lupinus albus*, dont certaines racines développent une profusion de radicules qui, au stade mature, sécrètent des concentrations jusqu'à mille fois la normale de citrate et de protons, favorisant ainsi tout à la fois, par acidification et par complexation du fer, la solubilisation du phosphate présent. Cette forte activité sécrétrice ne dure que quelques jours. Au voisinage de ces racines, les communautés bactériennes présentent une évolution concomitante. En particulier, le stade mature exerce un effet distinctement sélectif sur ces communautés, effet qui s'estompe lors du vieillissement de ces structures. (Fig. 11; Weisskopf et al., subm.)

**d) Effet des pratiques culturales sur la présence de populations spécifiques**

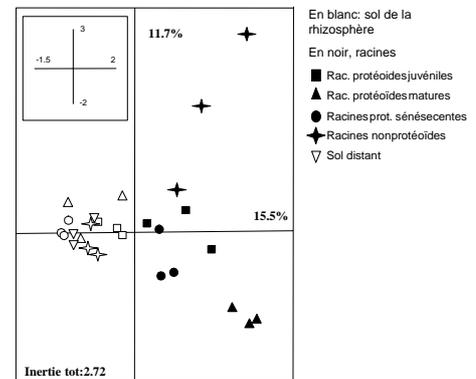


Figure 12: Effet du type de racine et du stade de maturation des racines protéoïdes sur la structure communautés bactériennes du sol et de la racine chez *Lupinus albus* Analyse factorielle des correspondances. D'après Weisskopf et al. (in press).

Certaines bactéries de la rhizosphère ont pour effet de protéger la plante contre des champignons pathogènes des racines. Certaines d'entre elles produisent des substances inhibant la croissance de ces parasites, comme le 2,4 diacétylphloroglucinol (DAPG). La synthèse de

ce composé implique une série d'enzymes codées par les gènes "phI", dont le gène *phID* qui est souvent utilisé pour détecter la présence de cette activité. Plusieurs "familles" de séquences du gène *phID* ont été décrites chez différentes bactéries, la plupart appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescents. Dans une étude portant sur les communautés de bactéries dans des cultures de blé dans la plaine du Gange, en Inde, nous avons recherché la présence d'organismes producteurs de DAPG en amplifiant par PCR, à partir de l'ADN extrait du sol et des racines, le gène *phID*. Nous avons ainsi pu montrer la présence de différentes "familles" de *phID* en fonction des qualités du sol (haut ou faible rendement) des pratiques culturales (apport élevé ou faible d'engrais) et de la proximité racinaire (Fig. 12, Shani, Imfeld et Roesti, comm. pers.).

### Perspectives pour la pédologie biologique

L'irruption des méthodes moléculaires en écologie microbienne du sol, depuis une dizaine d'années, permet d'introduire maintenant un nouveau paradigme en pédologie biologique. Jusqu'ici, la recherche fondamentale s'est surtout concentrée, au travers de quelques cas ponctuels, sur le développement de méthodes de plus en plus fiables et performantes. Tout en gardant l'oeil ouvert sur de futurs développements méthodologiques, il est peut-être temps maintenant d'introduire ces approches dans la pratique de la description et de la comparaison des sols. Pour cela, les techniques d'obtention de profils de communautés, couplées à des outils statistiques sophistiqués et à l'utilisation d'indices de diversité, devraient fournir un puissant instrument de caractérisation, complémentaire aux descriptions pédologiques classiques, à l'analyse des constituants organiques et inorganiques des sols et aux études sur la végétation et la faune du sol (Gobat et al., 2003, 2004). L'acquisition récente de fenêtres "fonctionnelles" dans les approches moléculaires permet maintenant d'envisager l'application de ces méthodes dans l'étude des processus biologiques édaphiques. L'acquisition de l'outil moléculaire en pédologie biologique ne va pas se substituer aux méthodes traditionnelles. Elle va les compléter vers le haut. Pour cela, il sera nécessaire d'établir des bases de données suffisamment riches pour intégrer les données de l'écologie moléculaire dans la description des

sols. Tout cela a un coût, il ne faut pas le cacher: les méthodes moléculaires sont relativement chères. Il faut donc espérer que la politique de soutien à la recherche ne favorise pas que la recherche de pointe, certes indispensable, mais qui ne serait qu'une fuite en avant si on ne subventionnait pas de même une recherche "horizontale", telle que l'observation de l'environnement, qui mette en oeuvre et, en fin de compte, justifie la première.

- Amann, RI, Ludwig, W, Schleifer, K-H 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169
- Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti, D, Jourdain-Miserez, K, Forestier, N, Teyssier-Cuvelle, S, Gillet, F, Aragno, M, Rossi, P 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol*, **4**, 634-643.
- Gobat, J.-M, Aragno, M, Matthey, W 2003. Le Sol Vivant, 2<sup>e</sup> éd. 568 pp. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
- Gobat, J.-M, Aragno, M, Matthey, W 2004. The Living Soil. 550 pp. Science Publishers Inc. New-York, Delhi.
- Hamelin, J, Fromin, N, Tarnawski, S, Teyssier-Cuvelle, S, Aragno, M 2002. *NifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligotrophic perennial grass. *Environ Microbiol*. **8**: 477-481
- Hamelin J, Poly F, Besson O, Fall S, Brauman A, Tarnawski S, Aragno M, Fromin N. (submitted) From microbial community barcode to genetic heterogeneity indices. *Molecular Ecology*
- Laczko, E 1994. Neue Ansätze zur Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften in Böden: die Phospholipidfett säuren-Analyse und ihre Anwendung. *Bull Bodenkundl Ges Schweiz* **18**: 23-28
- Maire, N 1984. Extraction de l'adénosine triphosphate dans les sols: une nouvelle méthode de calcul des pertes en ATP. *Soil Biol Biochem* **16**: 361-366
- Maire, N 1987. Evaluation de la vie microbienne dans les sols par un système d'analyses biochimiques standardisé. *Soil Biol Biochem* **19**: 491-500
- Marilley, L, Vogt, G, and Aragno, M 1997. Diversité bactérienne en fonction de la proximité aux racines de deux plantes de prairie par analyse de profils de restriction d'une bibliothèque de gènes rADN 16S. *Bull Soc Suisse Pédologie* **21**:59-64.
- Marilley, L, Vogt, G, Blanc, M., Aragno, M 1998. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR analysis of 16s rDNA. *Plant Soil* **198**: 219-224
- Morris, CE, Bardin, M, Berge, O, Frey-Klett, P, Fromin, N, Girardin, H, Guinebrière, MH, Lebaron, Ph, Thiéry, JM, Trousselier, M 2002. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 592 - 616
- Voroney, RP, Paul, EA 1984. Determination of Kc and Kn *in situ* for calibration of the chloroform fumigation-incubation method. *Soil Biol Biochem* **16**: 9-14

Weisskopf, L, Fromin, N, Tomasi, N, Aragno, M, Martinoia, E (submitted) Secretion activity of white lupin's cluster roots influences bacterial abundance,

### 4.3. Evolution des paramètres biologiques des sols agricoles fribourgeois

*N. Rossier et J. Dessurault,  
Institut agricole de l'Etat de Fribourg,  
Grangeneuve, 1725 Posieux*

Le réseau fribourgeois d'observation des sols (FRIBO) a pour principal objectif de récolter des informations d'ordre pédologique, agricole et environnemental sur les sols agricoles du canton de Fribourg, par le biais d'analyses physico-chimiques et biologiques. Ces données permettent de suivre l'évolution à long terme de la fertilité des sols du canton et de mettre en évidence les modifications naturelles ou anthropiques. Le réseau comporte au total 250 sites de 100 m<sup>2</sup> distribués sur une grille de 2 x 2 km dans tout le canton. Chaque site est échantillonné une fois tous les 5 ans, période qui représente un cycle d'analyses. La mise en valeur des résultats biologiques obtenus au cours des 15 dernières années (3 cycles d'analyses) sur les sols fribourgeois est exposée dans le présent rapport. L'état biologique des sols a été étudié avec les mesures de la biomasse ATP et de l'activité respiratoire des sols, à partir desquelles différents paramètres ont été calculés (minéralisation du carbone organique, réactivité biologique, rapport CO<sub>2</sub>/ATP).

Les 250 sites FRIBO ont été regroupés selon deux critères, de façon à augmenter la validité des interprétations statistiques. Selon la logique agronomique, l'utilisation des sols (terres assolées, prairies permanentes et alpages) a été choisie comme premier critère de classification. Ce dernier permet d'observer l'influence du mode cultural sur les différents paramètres biologiques étudiés. Une analyse statistique des

données (analyse factorielle) a permis de déterminer la capacité d'échange cationique (CEC) (classes de CEC 1 à 5 selon la richesse du complexe argilo-humique des sols) comme deuxième critère de classification. Ce paramètre chimique se réfère à la quantité totale de cations qui peut être retenue sur le complexe argilo-humique. Ce dernier est formé de particules d'argile et d'humus liées étroitement. Il explique en grande partie le comportement du système sol.

L'analyse des résultats biologiques du FRIBO s'est tout d'abord faite par le biais d'une étude de corrélation pour l'ensemble des paramètres mesurés. Cette étude a montré que les paramètres biologiques sont fortement liés à la CEC, à la teneur en humus, au contenu en argile, au type de sol, de même qu'à quelques oligo-éléments. De plus, l'utilisation du sol, le pourcentage de couverture prairiale dans la rotation et l'altitude influencent de façon notable les paramètres biologiques des terres fribourgeoises.

L'étude des statistiques descriptives sous forme de box plots et la comparaison des moyennes (test du LSD) pour chacun des paramètres biologique étudiés a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les utilisations de sol pour l'ensemble des mesures biologiques (tableau ci-dessous). Ces dernières augmentent entre les terres assolées, les prairies permanentes et les alpages respectivement, excepté pour le paramètre de la réactivité biologique, qui est influencé par le contenu en calcium des sols.

Tableau 3: Moyenne sur 3 cycles pour les paramètres biologiques selon l'utilisation du sol.

| Parameter   | Utilisation du sol |                         |         |
|---|--------------------|-------------------------|---------|
|   | Terres Assolées    | Prairies<br>Permanentés | Alpages |
| <b>Biomasse ATP [ng/g]*</b>   | 1140               | 2264                    | 3292    |
| <b>Activité respiratoire [<math>\mu\text{g CO}_2/\text{g/h}</math>]*</b>        | 4.3                | 8.5                     | 12.7    |
| <b>Minéralisation du carbone organique [<math>\mu\text{g MO/g/15j}</math>]*</b> | 703                | 1616                    | 2928    |
| <b>Réactivité biologique [%]*</b>   | 110                | 91                      | 64      |
| <b>Rapport CO<sub>2</sub>/ATP*</b>  | 4.7                | 5.7                     | 7.4     |

\* Différences significatives selon le test du LSD

De même, plus la CEC est élevée, plus la biomasse ATP, l'activité respiratoire et la minéralisation du carbone organique sont élevées (Tableau ci-dessous). Ces résultats sont tout à fait logiques en regard des corrélations obtenues.

Ces observations concordent avec le gradient nord-sud observé pour le canton de Fribourg (Julien et al., 2002) entre les terres assolées, les prairies permanentes et les alpages, dans le sens duquel les teneurs en humus, en argile et la CEC s'accroissent. Etant donné l'étroite corrélation entre ces paramètres et les valeurs biologiques, ces dernières augmentent donc aussi suivant ce gradient.

Tableau 4: Moyenne sur 3 cycles pour les paramètres biologiques selon les classes de CEC.

| Parameter   | Classes de CEC (meq/100g) |                      |                      |                      |                   |
|---|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
|   | Classe 1 (< 12.0)         | Classe 2 (12.0-15.9) | Classe 3 (16.0-20.9) | Classe 4 (21.0-25.9) | Classe 5 (≥ 26.0) |
| <b>Biomasse ATP[ng/g]*</b>                                | 752                       | 1162                 | 1706                 | 2436                 | 3500              |
| <b>Activité respiratoire [µg CO<sub>2</sub>/g/h]*</b>     | 3                         | 4.6                  | 7.2                  | 9.7                  | 11.5              |
| <b>Minéralisation du carbone organique [µg MO/g/15j]*</b> | 493                       | 766                  | 1213                 | 1941                 | 2682              |
| <b>Réactivité biologique [%]*</b>                         | 115                       | 105                  | 107                  | 82                   | 77                |
| <b>Rapport CO<sub>2</sub>/ATP*</b>                        | 4.9                       | 4.9                  | 5.4                  | 6.3                  | 6.0               |

\* Différences significatives selon le test du LSD

L'évolution des propriétés biologiques des sols fribourgeois est demeurée stable au cours des 15 premières années d'étude. Toutefois cette stabilité intègre une diversité de qualités biologiques.

Afin de pouvoir interpréter les valeurs analysées, des barèmes de classification ont été établis grâce à l'importante banque de données recueillies pour le FRIBO. Ces barèmes sont fondés sur une base statistique, pour chaque paramètre biologique d'intérêt (biomasse ATP, activité respiratoire, minéralisation du carbone organique et rapport CO<sub>2</sub>/ATP). Les deux classes d'échantillons formées dans le but de l'analyse des résultats (utilisation du sol et CEC) ont été utilisées pour l'obtention d'un barème précis. Les résultats classifiés ont été soumis à une statistique descriptive selon les critères de classifications suivants : percentiles 10 et 90% et quartiles 25 et 75%. Grâce aux barèmes établis, les sites FRIBO ont été classifiés selon leur richesse pour les propriétés biologiques étudiées.

Selon les barèmes édités, entre 15 et 25% des sites FRIBO présentent une déficience pour un ou plusieurs paramètres biologiques. Dans les terres assolées, la teneur faible en humus et l'insuffisance de la couverture prairiale expliquent principalement les valeurs biologiques pauvres et médiocres obtenues. L'implan-

tation d'une prairie temporaire à plus ou moins long terme s'avère le meilleur conseil à prodiguer en permettant de maintenir et d'améliorer autant les paramètres physiques, chimiques que biologiques des sols. Pour les prairies permanentes, des problèmes d'acidité, de salinité, et d'apports excessifs de matière organique ont été relevés. Dans ces cas, le chaulage ou encore la meilleure gestion des apports d'engrais de ferme s'avèrent des solutions envisageables. Finalement, pour les sites pauvres à médiocres situés en alpage des problèmes de compaction, de sols lourds et d'acidité élevée ont été relevés. Une gestion efficace du drainage et le chaulage semblent être deux conseils d'amélioration à envisager. Toutefois, l'action corrective s'avère difficile et souvent non souhaitée, en regard de la préservation de ces sites naturels et de leur biodiversité.

Ce rapport a permis de soutenir l'évidence du rôle primordial de l'aspect « vie du sol » dans le maintien d'une terre fertile et en bonne santé. Malgré un système d'échantillonnage qui implique des prélèvements espacés dans le temps et sans répétition, les variations des résultats obtenues entre les cycles d'échantillonnages sont palliées par le grand nombre d'échantillons et l'interprétation statistique des résultats. Considérant l'évolution stable des paramètres biologiques dans le temps et la

bonne discrimination de ces derniers selon l'utilisation du sol et ses propriétés physico-chimiques, nous pouvons affirmer que cette méthode biologique est bien adaptée à l'observation des sols à long terme.

Rossier, N, Dessureault, J, 2004: Evolution des paramètres biologiques des sol agricoles fribourgeois. *Revue Suisse Agric* **36** (2): 77-82.

### **Impressum Bulletin BSA/VBB n° 8/2004**

#### *Editeur*

Groupe de travail «Biologie du sol – application» (BSA)

Le groupe de travail BSA a été fondé en 1995 à l'initiative des services cantonaux de la protection des sols et de l'Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage (OFEFP). Il traite essentiellement d'aspects de la biologie du sol en rapport avec la protection des sols et la conservation de leur fertilité dans le cadre de l'application de l'ordonnance sur les atteintes portées aux sols (OSol).

#### *Président depuis 2003*

Guido Schmid  
Amt für Umweltschutz  
Lämmlibrunnenstrasse 54  
CH – 9001 Saint Gall  
Tel. 071 229 24 10  
E-Mail: guido.schmid@sg.ch

#### *Secrétariat et commandes*

Dr. Paul Mäder  
Institut de recherche de l'agriculture biologique (FiBL)  
Ackerstrasse  
Case postale  
CH – 5070 Frick  
Tel. 062 865 72 32  
Fax 062 865 72 73  
E-Mail: paul.maeder@fibl.ch

Le bulletin est également disponible sur Internet:  
Français:

[http://www.environnement-suisse.ch/buwal/fr/fachgebiete/fg\\_boden/info/biologiesols](http://www.environnement-suisse.ch/buwal/fr/fachgebiete/fg_boden/info/biologiesols)

Allemand:

[http://www.umwelt-schweiz.ch/buwal/de/fachgebiete/fg\\_boden/info/biologiesols](http://www.umwelt-schweiz.ch/buwal/de/fachgebiete/fg_boden/info/biologiesols)