



Fiche technique : détermination de la biomasse fongique via le dosage de l'ergostérol

1- Rôle écologique de l'organisme visé

Les champignons (mycètes) sont des organismes eucaryotes qui dominent en nombre et en masse dans la plupart des écosystèmes du sol. Hétérotrophes, ils prélèvent le carbone nécessaire à leur métabolisme par **symbiose** ou par **absorption** dans leur environnement. Leur croissance filamenteuse leur permet de constituer de vastes réseaux au sein des sols et de transporter ainsi les composés carbonés, les nutriments et l'information sur de longues distances. Ils sont habituellement subdivisés en quatre groupes selon leur mode de nutrition: les champignons **saprophytes** (décomposeurs de matière organique (MO) morte), les champignons **commensaux** (utilisant la MO vivante), **symbiotiques** (mycorhizes ou mutualistes) ou **parasitaires**. Le cortège enzymatique spécifique des champignons (laccases, lignine peroxydases, cellulases,...) en font les décomposeurs majoritaires de la matière organique complexe présente dans les sols dont certains polluants organiques aromatiques (hydrocarbures). Les produits de dégradation sont minéralisés, i.e. biodisponibles pour la nutrition des plantes ou transformés en composés humiques.

Présente principalement dans les membranes (cytoplasme également), la molécule d'**ergostérol** joue un rôle essentiel pour les cellules fongiques. C'est la molécule cible de bon nombre d'antifongiques.

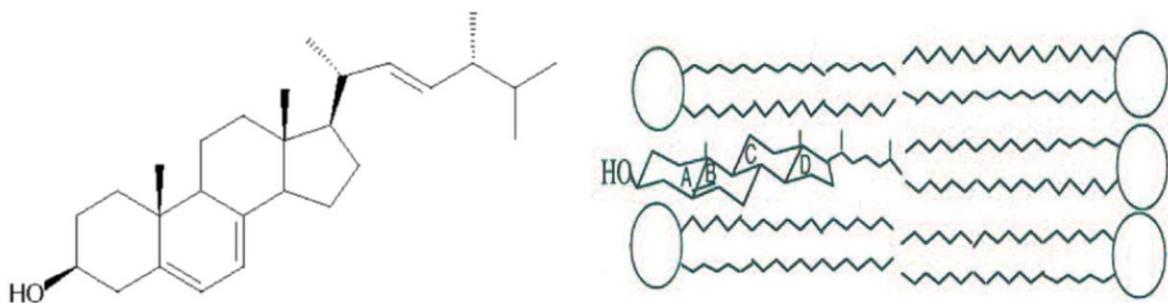


Figure 1 : Structure de l'ergostérol (ergosta-5,7,22-trien-3B-ol) ; sa taille relative à celle des phospholipides et leur disposition dans une membrane.

Il existe deux types d'ergostérol, l'ergostérol libre présent dans la membrane fongique et l'ergostérol lié présent dans le cytoplasme. En fonction du type d'extraction, la quantification de l'ergostérol total est possible.

Type d'indicateur

L'ergostérol est un composé spécifique de la membrane fongique (Montgomery et al., 2000). Sa présence est considérée comme un marqueur de la biomasse fongique vivante et une bonne estimation de l'activité métabolique des champignons dans le sol (Mille-Lindblom et al., 2004), bien que certains champignons en soient dépourvus (Zhao et al., 2005).

La biomasse moléculaire fongique varie selon différents types d'influence :

- Les impacts anthropiques liés au travail du sol ou à la présence de polluants qui engendrent une réponse de la biomasse fongique totale.
- Le type et l'âge du peuplement végétal qui agit qualitativement et quantitativement sur la communauté fongique d'un milieu donné

2- Description des méthodes pour le dosage de l'ergostérol

2.1. Normes et/ou protocoles de référence

Aucune norme ni protocole de référence ne sont disponibles aujourd'hui pour ce marqueur dans le sol. Cependant, considéré comme un bon marqueur d'une présence fongique, sa quantification est normalisée en alimentation animale (NF V18-112).

2.2. Plan et méthode d'échantillonnage

En matière d'échantillonnage dans le sol, la norme NF X31-100 fait référence. L'horizon 0-15 cm est habituellement utilisé. En sol agricole limoneux l'indicateur est sensible jusqu'à 30 cm. La stratégie d'échantillonnage et la représentativité de l'échantillon dépendent de la question agronomique et/ou environnementale posée et de l'échelle de travail. Toutefois, un minimum de 30 g de sol est nécessaire à l'extraction.

2.3. Stockage et prétraitement des échantillons

Le stockage est déconseillé, l'idéal étant de travailler sur sol frais. A minima effectuer l'extraction si une congélation est nécessaire.

2. 6. Paramètres mesurés

Les biomasses moléculaires fongiques mesurées sont exprimées en μg d'ergostérol par g de sol sec. La mesure de l'humidité de l'échantillon à la pesée est indispensable.

- Ergostérol libre : Marqueur reflétant la biomasse fongique en cours de dégradation.
- Ergostérol lié : Marqueur reflétant la biomasse fongique viable.
- Ergostérol total : Marqueur du potentiel mycorhizogène du sol.

2. 5. Description simplifiée des méthodes de mesure

L'ergostérol libre est obtenu par simple percolation dans un solvant polaire. La lyse des cellules est assurée par perturbation physique (abrasion par des débris de verre de l'ordre du micron). L'extraction pour quantifier l'ergostérol total met en jeu une réaction de saponification assistée par micro-ondes ; plus agressive, nous admettons obtenir la totalité de l'ergostérol présent dans l'échantillon. Les extraits sont ensuite séparés et détectés par HPLC/DAD (Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à un Détecteur à barrettes de Diodes) puis quantifiés par ajouts dosés.

2.6. Estimation du temps d'analyse

Six heures sont nécessaires par série de 36 échantillons depuis la réalisation des extraits jusqu'à l'analyse des résultats d'analyse.

3- Interprétation des résultats

3.1 Nécessité d'un référentiel global, faisant appel à une base de données

Le programme « Bioindicateurs de la qualité des sols 2 » constitue le premier référentiel sur cet indicateur. La base de données de l'Unité Aghyle capitalise les données de cet indicateur notamment sur les sols haut-normands.

3.2. Informations complémentaires nécessaires

Les conditions climatiques et saisonnières ont une influence prépondérante sur ce biomarqueur. Il est préférable de réaliser les prélèvements au printemps à distance d'une période de gel ou à l'automne à distance d'une période de sécheresse. Le contexte physicochimique est à prendre en compte notamment la teneur en matière organique, le pH, la texture du sol. L'utilisation et l'occupation du sol ainsi que le type de travail du sol pour les parcelles agricoles et/ou le chargement pour les prairies peuvent avoir une forte influence.

3.3. Exemple de réponse du marqueur en travail du sol. (Site de Thil – Programme ADEME)

L'objectif du site expérimental de Thil est de comparer l'effet de 4 techniques de travail du sol en Agriculture Biologique.

Mis en place en 2005, les labours se caractérisent par un retournement de la couche de sol travaillée :
ThLT (Labour Traditionnel 30 cm),
ThLA (Labour Agronomique 18 cm),

Le travail du sol réduit à l'inverse se traduit par un non-retournement :

ThTR (Travail du sol réduit 15 cm avec un outil à dent),
ThTS (Travail superficiel à 7 cm avec un outil à dent).

Sur le site de Thil, les différences significatives s'observent en fonction de l'intensité du travail du sol. Les quantités faibles sont mesurées dans la parcelle subissant un labour traditionnel. Le labour agronomique et le travail réduit présentent des situations intermédiaires; le travail superficiel offre les quantités d'ergostérol les plus importantes. Logiquement, moins les sols sont travaillés plus les communautés fongiques sont abondantes sur l'horizon étudié.

Cependant le marqueur « ergostérol libre » ne permet pas de distinguer l'intensité du travail du sol même si une tendance est observée. D'où l'importance du choix du marqueur et de sa sensibilité. En effet, ce marqueur répond préférentiellement à un **stress immédiat** et à une dégradation des cellules fongiques. Les quantités de biomasse fongique estimées par « l'ergostérol total » sont représentatives ici de la conduite du travail du sol, elles peuvent refléter ainsi le comportement de la **communauté fongique** sur un plus long terme.

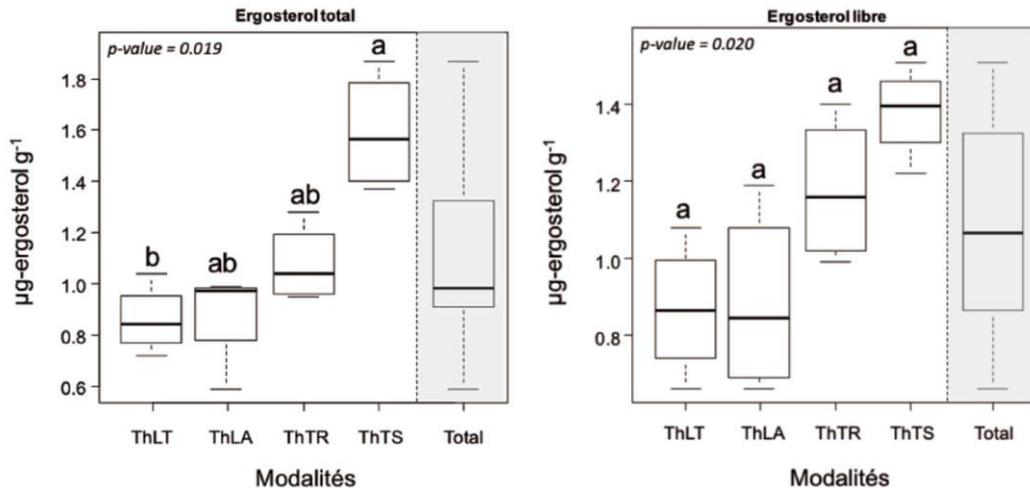


Figure 2 : Biomasse fongique mesurée par l'ergostérol total et l'ergostérol libre sur le site de Thil. Des lettres distinctes indiquent une différence significative au seuil $p < 0,05$

4- Intérêts et limites de l'indicateur

4.1. Les points forts

Le marqueur « ergostérol » intègre **tous les facteurs** modulant la biomasse fongique des sols. Il apporte des informations sur **la dynamique des communautés** fongiques. Enfin il peut permettre de **qualifier l'effet** de pratiques agricoles, de polluants organiques ou métalliques (tout étant égal par ailleurs).

4.2. Limites de l'outil

Il n'existe pas de **référentiel** sur la biomasse fongique dans les sols estimée par cet indicateur au niveau international.

L'évolution de la biomasse fongique est en général **multifactorielle**.

La quantité d'ergostérol diffère selon les espèces fongiques.

5- Références

Mille-Lindblom, C., von Wachenfeldt, E., Tranvik, L.J. (2004) Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods* 59, 253-262.

Montgomery, H.J., Monreal, C.M., Young, J.C., Seifert, K.A. (2000) Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1207-1217

Zhao, X. R., Q. Lin, et P. C. Brookes (2005) Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? *Soil Biology and Biochemistry* 37 (2): 311-17. doi:10.1016/j.soilbio.2004.07.041.