



Avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale «développement agricole et rural»



## Fiche technique : Quantification de la biomasse et de la diversité microbiennes via les PLFA

### 1- Rôle écologique de l'organisme visé

Les microorganismes du sol – bactéries, archées et champignons – sont des organismes invisibles qui dominent en nombre et en masse dans la plupart des écosystèmes du sol. Principalement hétérotrophes, ils prélèvent le carbone nécessaire à leur métabolisme par symbiose ou par absorption dans leur environnement. Leur intérêt dans le fonctionnement biologique du sol est de décomposer la matière organique et de mobiliser les éléments minéraux disponibles pour la plante. Leur rôle dans la cohésion des particules minérales du sol et dans la stabilité structurale est majeur. Véritables moteurs du fonctionnement biologique du sol, ils peuvent être appréhendés de différentes façons avec des approches de microscopie, de biochimie et/ou de biologie moléculaire. L'objectif de leur suivi est principalement d'être en mesure de **quantifier leur abondance, leur diversité et surtout leur activité**.

### 2- Principe de la méthode

Les **acides gras phospholipidiques (PLFA)** sont des constituants des **membranes cellulaires** des êtres vivants et ont une pertinence taxonomique, car ils sont spécifiques de groupes d'organismes (Zelles, 1999 ; White et al., 1997 ; Hill et al., 2002 ; Zogg et al., 1997 ; Ringelberg et al., 1997 ; Bardgett et al., 1996 ; Frostegard and Baath, 1996 ; Madan et al., 2002). Ils sont considérés comme des **biomarqueurs** car ils représentent une fraction constante de la biomasse vivante (Lechevalier, 1989 ; Zelles, 1999 ; Bailey et al., 2002). L'extraction et l'analyse des PLFA dans les sols est une technique de quantification de la biomasse microbienne vivante du sol (White et al., 1979). En effet, ils ne sont pas présents dans les lipides de stockage ou les cellules mortes. Des modifications des profils de PLFA extraits des sols traduisent des variations dans l'abondance des groupes microbiens. Les profils PLFA permettent une approche avec un minimum de biais et d'artéfacts. On peut distinguer par ces profils la biomasse bactérienne (Gram+ et Gram-, qui sont deux catégories de bactéries différenciables à leur couleur après coloration avec un même produit, dû à des composants membranaires différents), fongique et la part des actinomycètes. Les méthodes développées en ce moment servent de support à l'élaboration d'une norme (ISO TC 190 - Qualité des sols – TS-29843-2).

Les techniques de profilage phénotypique telles que l'analyse PLFA ne distinguent pas les espèces microbiennes entre elles (Singh et al., 2006a,b). Elles peuvent être utilisées pour déterminer les variations de l'abondance relative des champignons, des bactéries Gram-négatives et Gram-positives.

## 2.1. Nomenclature

Par souci de clarté dans la lecture des résultats, les différents PLFA sont caractérisés par la nomenclature de leurs acides gras correspondants (Steenwerth et al., 2003 ; Joergensen et al., 2005). Les acides gras sont notés sous la forme suivante : nombre de carbone : nombre de double liaison w position de la double liaison à partir du méthyle. Préfixes : i = ramification iso (méthyle positionné 1C avant la fonction acide), a = anté-iso (méthyle positionné sur le 2<sup>ème</sup> C avant la fonction acide), t ou c = configuration cis ou trans des doubles liaisons.

## 2.2. Type d'indicateur

Les PLFA représentatifs des bactéries Gram + sont principalement i16:0, i17:0, a17:0, 17:0, 18:0.

Les PLFA représentatifs des bactéries Gram - sont principalement 16:1w7c, 18:1w9c.

Les PLFA représentatifs du compartiment bactérien sont les Gram +, Gram - .

Les PLFA représentatifs du compartiment fongique sont 18:3w3c, 18:2w6c.

La concentration totale en PLFA (nmol de PLFA / g de sol sec) est décrite comme une mesure de la biomasse microbienne (Zelles et al., 1995).

Les PLFA peuvent être aussi utilisés pour suivre l'état physiologique des microorganismes des sols. En effet le ratio PLFA fongiques / bactériens évolue face à différents stress environnementaux tels que la gestion des sols et le pH du sol. Les bactéries changent la composition de leurs acides gras membranaires en réponse à un stress. Par exemple une augmentation du PLFA cy19 :0 a été décrit comme indicateur potentiel de famine microbienne ou d'un déficit d'oxygène ou encore de contamination métallique. Le PLFA cy19 :0 est formé via la trans-méthylation du PLFA 18 :1w7c. Cela permet aux bactéries de minimiser la perte de lipides membranaires et d'accentuer la fluidité de leurs membranes.

Une diminution du ratio PLFA saturé / mono insaturés indique un stress nutritif des bactéries Gram-.

## 3- Description des méthodes

### 3.1. Normes et/ou protocoles de référence

La méthodologie analytique est d'extraire tous les lipides du sol (lipides neutres, glycolipides et PLFA) puis de les séparer selon leur nature (Bligh et Dyer, 1959 ; Frostegard et al., 1993).

Les PLFA subissent ensuite une trans-méthylation afin d'obtenir les esters méthyliques (FAME = Fatty Acid Methyl Ester) correspondants, de façon à ce qu'ils soient facilement analysables par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).

L'analyseur de masse en mode sélection d'ions (SIM) est plus spécifique que le détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) souvent utilisé (Frostegard et al., 1993 ; Baath et al., 2003 ; Ruess et al., 2002).

### 3.2. 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 15 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.

### **3.3. Stockage et pré-traitement des échantillons**

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

### **3.4. Description simplifiée des méthodes de mesure**

L'échantillon de sol frais est lyophilisé pendant 24H, puis le sol sec lyophilisé est extrait par un mélange de solvant monophasique à base de chloroforme, méthanol, tampon citrate. L'échantillon est ensuite agité sous ultrasons puis centrifugé. La phase contenant les lipides est évaporée à sec sous flux d'azote à chaud. Les cartouches d'extraction SPE sont conditionnées successivement avec du méthanol, de l'acétone et du chloroforme. Les lipides neutres et les glycolipides sont élués successivement par du chloroforme et de l'acétone. La fraction contenant les phospholipides est éluee avec du méthanol puis évaporée sous flux d'azote et stockée à -18°C.

La trans-méthylation s'effectue *in situ* dans l'injecteur de la GC/MS. Un standard interne 19 :0 est ajouté avant injection.

### **3.5. Paramètres mesurés**

Gram-/Totaux  
Gram+/Totaux  
Fongique/Total  
Bactéries/Total  
Fongiques/Bactéries  
Saturés/mono insaturé  
Iso / anté-iso

## **4- Interprétation des résultats**

### **4.1. 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.

### **4.2. 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.

### **4.3. Exemple de réponse du marqueur en travail du sol. (Site d'Yvetot – Programme ADEME)**

Les PLFA totaux ont montré une réponse très marquée en changement de pratique (retournement de prairie). Le ratio Gram+/totaux est très élevé dans les contextes de grande culture. Les ratios Gram-/totaux et Bactéries/totaux sont plus élevés en prairie permanente. Les ratios fongiques /totaux et fongiques/bactéries sont importants en sols pauvres (pH et MO faibles) et faible en sols stressés (fort chargement en prairie ou prairie retournée).

## 5- Intérêts et limites de l'indicateur

### 5.1. Les points forts

L'empreinte digitale que procure cette analyse est intéressante en suivi de la qualité des sols notamment dans les dynamiques de changement de pratiques culturales (Aschi et al., 2017). Elle apporte des informations sur la dynamique des communautés microbiennes.

### 5.2. Limites de l'outil

Il n'existe pas de référentiel sur les PLFA dans les sols bien que son analyse soit maintenant normalisée. L'évolution de la biomasse microbienne est en général multifactorielle.

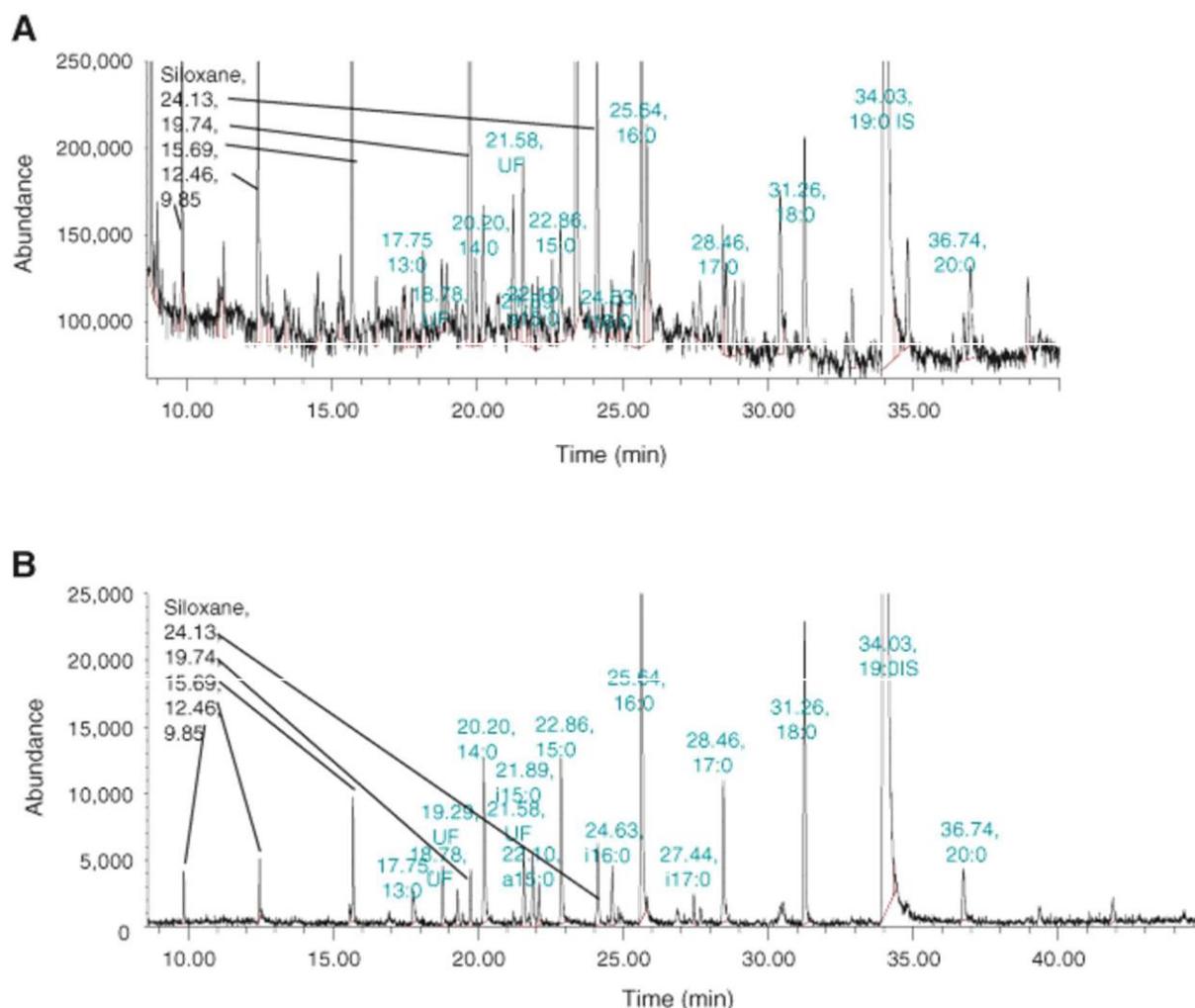


Figure 1 : Exemple de chromatogramme représentatif d'une séparation de PLFA sous forme de FAMES.

## 6- Références :

Aschi A., Aubert M., Riah-Anglet W., Néliu S., Dubois C., Akpa-Vinceslas M., Trinsoutrot-Gattin I., "Introduction of Faba bean in crop rotation: Impacts on soil chemical and biological characteristics", Applied Soil Ecology, 120 (2017) 219–228.

Baath E. et al., Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques, Soil Biology & Biochemistry 35 (2003) 955–963

**Bailey V.L. et al.**, "Relationships between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation– extraction, substrate-induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis", *Soil Biology & Biochemistry*, 34 (2002) 1385–1389.

**Bardgett R.D., Hobbs P.J., Frostegard A.** "Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland", (1996) *Biology and fertility of soil* 22 (1996) 261-264.

**Bligh E. G., Dyer W. J.**, "Canadian Journal of Biochemistry and Physiology" 37 (1959) 911-917.

**Frostegard A., Baath E.**, "The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil" *Biology and fertility of soil*, 22 (1996) 59-65.

**Frostegård et al.**, "Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals", *Applied and Environmental Microbiology* 59, (1993)

**ISO/TS 29843-2:2011** - Qualité du sol -- Détermination de la diversité microbienne du sol -- Méthode par analyse des acides gras phospholipidiques (PLFA) en utilisant la méthode d'extraction des PLFA

**Joergensen R. G., Potthoff M.**, "Microbial performance after long-term permanent mixing of a grassland soil", *Soil Biology & Biochemistry* 37 (2005) 1249-1258.

**Madan, R., C. Pankhurst, B. Hawke and S. Smith.** "Use of fatty acids for identification of AM fungi and estimation of the biomass of AM spores in soil", *Soil Biology & Biochemistry*. 34 (2005) 125-128.

**Ringelberg D.B., Stair J.O, Almeida J., Norby R.J, O'Neill E.G, White D.C.** "Consequences of rising atmospheric carbon dioxide levels for the belowground microbiota associated with white oak", *Journal of Environmental Quality* 26 (1997) 495-503.

**Ruess L., et al.**, "Fatty acids of fungi and nematodes – possible biomarkers in the soil food chain", *Soil Biology & Biochemistry* 34 (2002) 745-756.

**Singh BK, Nazaries L, Munro S, Anderson IC & Campbell CD** " Use of multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community", *Appl Environ Microbiol*, 72 (2006) 7278–7285.

**Singh BK, Reid E, Ord B, Potts J & Milard P** "Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods", *Eur J Soil Sci*, 57 (2006b) 72–82.

**Steenwerth K L, Jackson L E, Caldero´ n F J, Stromberg M R, Scow K M** "Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California", *Soil Biology & Biochemistry*, 35 (2003) 489-500.

**White DC, Davis WM, Nickels JS, King JD & Bobbie RJ** , "Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate", *Oecologia* 40 (1979) 51–62.

**White D.C., Macnaughton S.J.** "Chemical and molecular approaches for rapid assessment of the biological status of soils", *Biological Indicators of Soil Health* (1997) 371-396.

**Zelles L**, "Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities", *Chemosphere* 35 (1997) 275-294.

**Zogg G. P., Zak D.R., Ringelberg D. B., MacDonald N. W., Pregitzer K. S., White D. C.** "Microbial immobilization and the retention of anthropogenic nitrate in a northern hardwood forest", *Soil Sci. Society of America* 61 (1997) 475-481.