
Techniques d'évaluation de l'écotoxicité des substances xénobiotiques vis à vis de la microflore des sols

G. Soulas

Les micro-organismes du sol et du sous-sol sont les principaux agents du recyclage des éléments nutritifs des végétaux cultivés et l'une de leurs caractéristiques principales est sans aucun doute la très grande variété des espèces microbiennes qui coexistent dans un milieu aussi complexe que le sol. Ceci permet à la microflore du sol d'exploiter à des fins nutritives et énergétiques tous les gisements carbonés présents sous des formes chimiques variées, sous différents états d'accessibilité biologique et dans des niches écologiques qui représentent des conditions environnementales très diversifiées. A l'adaptation pour ces différents milieux, parfois extrêmes, correspond une diversité physiologique et métabolique dont l'expression repose sur une information génétique d'une très grande richesse. Le sol représente par ailleurs le passage obligé dans l'acheminement de nombreuses molécules xénobiotiques dont certaines présentent une activité biologique. Il s'agit donc de polluants potentiels qui représentent une menace pour les micro-organismes dont le sol est l'habitat naturel. Il est important de se préoccuper de la protection d'un patrimoine biologique dont la diversité permet non seulement d'assurer une certaine permanence fonctionnelle dans un environnement changeant mais aussi de sauvegarder une capacité évolutive susceptible de

minimiser les conséquences négatives liées à l'apparition de nouveaux stress d'origine anthropique. La gestion des ressources biologiques des sols doit être considérée comme un élément essentiel de la durabilité des écosystèmes agricoles. Elle ne pourra être parfaitement maîtrisée que dans la mesure où l'on disposera à la fois d'indices biologiques pertinents et fiables et de référentiels d'interprétation garantissant une bonne sécurité de diagnostic. En retour, l'ubiquité de présence des micro-organismes dans les sols, en fait aussi des indicateurs biologiques potentiels de la pollution des sols.

On dispose actuellement de deux façons d'apprécier la réponse des micro-organismes du sol à la présence de composés xénobiotiques potentiellement toxiques. Jusqu'à un passé relativement récent, les essais visaient à satisfaire des exigences de pertinence par rapport à un critère de fertilité, de fiabilité des mesures et de facilité de réalisation en routine. Cette approche pragmatique a eu pour conséquence la sélection de tests ayant une grande signification pratique ainsi qu'une forte représentativité mais aussi une faible sensibilité en raison d'une forte redondance fonctionnelle microbienne. Les évolutions observées traduisent la résultante nette d'un ensemble de changements physiologiques et de

Guy Soulas,
INRA-CMSE,
Microbiologie
des sols,
17, rue Sully,
21034 Dijon
Cedex

réarrangements dans la composition spécifique des communautés microbiennes naturelles en réponse à de nouvelles contraintes écologiques. Les indices globaux obtenus conduisent à une sous-évaluation du risque. On a tenté d'y porter remède en recherchant de nouveaux indices, en relation avec la structure spécifique ou fonctionnelle des communautés microbiennes naturelles, qui soient des enregistrements plus sensibles de l'impact écotoxicologique des substances xénobiotiques. Ces approches ont fait l'objet de nombreux appels d'offre des ministères de l'Environnement et de l'Agriculture qui voient dans le développement de ces indices écotoxicologiques des instruments potentiels de réglementation et de contrôle.

Techniques d'évaluation de l'écotoxicité des substances xénobiotiques vis à vis de la microflore des sols.

■ Mesures globales

Taille des communautés microbiennes

Les techniques de dénombrement des communautés microbiennes des sols ont été pendant longtemps les seules pratiquement utilisées. Elles tendent à être abandonnées pour des raisons de précision de mesure et de trop grande sélectivité, les espèces cultivables recensées ne représentant qu'une très faible fraction de la communauté microbienne du sol. Dans le cadre qui nous intéresse, la dernière critique reste cependant toute relative car, à défaut de réelle représentativité, l'échantillon des bactéries cultivables pourrait donner une idée du type de réponse étendue à l'ensemble de la microflore du sol. Par ailleurs, la possibilité d'une identification des espèces isolées à l'aide de tests phénotypiques ou génétiques permet l'établissement de diagrammes de type «rang-fréquence» décrivant la structure des communautés concernées.

Ces techniques de dénombrement ont été plus récemment relayées par des techniques de mesure de la biomasse des sols telles que les méthodes biocidales dont le principe consiste à mesurer le carbone microbien minéralisé après exposition de la microflore du sol à un traitement biocide, en général des vapeurs de chloroforme (Jenkinson

& Powlson, 1976 ; Vance *et al.*, 1987) et les méthodes physiologiques qui reposent sur une mesure de la vitesse initiale de minéralisation de glucose apporté au sol (Anderson & Domsch, 1978). Ces approches se caractérisent par une grande simplicité de mise en œuvre et une relative fiabilité des mesures. Il s'agit d'outils appropriés à des analyses de routine. La représentativité des données tient au fait qu'elles concernent l'ensemble de la microflore. Il s'agit cependant de mesures nettes traduisant le résultat global d'un ensemble de processus de réajustement et de compensation liés à la redondance fonctionnelle de la microflore du sol. Le manque de résolution constitue le point faible de ces approches.

Activité respiratoire des communautés microbiennes

Sans aucun doute, les mesures d'activité respiratoire ont été et restent la référence en matière d'estimation des impacts écotoxicologiques de substances xénobiotiques sur la microflore des sols. Il y a à cela des raisons théoriques, leur liaison directe avec la taille des communautés microbiennes et avec la dégradation de la matière organique des sols, et pratiques, la diversité et la simplicité des approches techniques dont il existe différentes variantes. Les plus simples consistent en des tests respiratoires à court ou moyen terme effectués à l'aide d'échantillons de sol non perturbés ou après stimulation nutritive de la microflore. La détermination de l'activité hétérotrophe (Wright & Hobbie, 1965) est plus sophistiquée ; elle consiste à mesurer la respiration microbienne en temps court après des stimulations nutritives croissantes. L'établissement d'une relation entre la vitesse de minéralisation d'un substrat et sa concentration permet d'atteindre des paramètres biocinétiques caractéristiques du fonctionnement physiologique des micro-organismes et susceptibles de varier en réponse à un stress chimique.

Les mesures d'activité respiratoire ont la faveur des instances réglementaires, notamment européennes, compte tenu de leur signification pratique en liaison avec la gestion du stock de la matière organique des sols. Elles allient simplicité technique, fiabilité et représentativité mais également, et pour des raisons identiques à celles que nous avons évoquées pour les mesures de biomasse, faible sensibilité. Il faut également

savoir qu'elles peuvent conduire à des résultats controversés et la plus grande précaution doit être prise dans leur interprétation. Il y a à cela plusieurs raisons. D'abord, il s'agit d'un indicateur non spécifique de la microflore puisque la macrofaune ainsi que les racines des plantes contribuent à la respiration globale. Surtout, l'absence d'effet voire même la stimulation de l'activité respiratoire peuvent être les manifestations secondaires liées à la disparition d'espèces sensibles dont le carbone peut être utilisé par des souches résistantes occupant une niche écologique partiellement désertée.

Autres fonctions microbiennes et activités enzymatiques

Le choix de groupes microbiens fonctionnels comme indicateurs se justifie plus par leur importance agronomique que par leur représentativité. Les exemples les plus couramment rencontrés concernent des groupes microbiens qui interviennent dans les différentes étapes du cycle de l'azote, notamment la nitrification. Les transformations microbiennes de l'azote combiné sont probablement l'un des indices les plus couramment utilisés pour aborder l'étude des effets de substances à activité biologique sur la microflore des sols. Ce choix est dicté d'abord par la sensibilité intrinsèque particulière des microorganismes autotrophes impliqués dans ces transformations, ensuite par la nécessité de préserver l'une des fonctions du sol dont l'importance agronomique est vitale et, enfin, en raison de la facilité qu'il y a à quantifier de façon simple, sensible, précise, reproductible et automatisable les différentes formes de l'azote dans le sol. Une analyse de détail des différentes étapes semblerait montrer qu'en raison d'une relative tolérance probablement liée à la diversité des espèces microbiennes impliquées (Edwards, 1989) l'étape d'ammonification serait moins sensible aux substances biocides que l'étape de nitrification dont Grossbard (1976) rapporte de nombreux exemples d'inhibition par les herbicides.

Les transformations biologiques qui se déroulent dans le sol étant sous le contrôle d'enzymes, il était naturel de rechercher dans l'activité de différents types d'enzymes des indices d'impact qui soient en même temps corrélés avec des processus microbiens. Compte tenu de leur rapidité, de leur simplicité et de leur reproductibilité, les tests enzymatiques ont connu un très large succès. Effectivement, certaines enzymes du

sol, telles les phosphatases et les uréases ont un lien apparent avec les cycles du phosphore et de l'azote. D'autres, telles les déshydrogénases qui interviennent dans les oxydations biologiques, devraient être corrélées avec l'activité respiratoire globale de la microflore des sols. En fait, ces corrélations n'apparaissent pas toujours de façon évidente, laissant planer quelques doutes sur la valeur des activités enzymatiques en tant qu'indices du fonctionnement biologique des sols. Il y a à cela plusieurs raisons. Les enzymes du sol peuvent avoir des origines diverses qui ne se limitent pas à la seule microflore : la macrofaune et la flore du sol en produisent également. Par ailleurs, certaines activités sont sous le contrôle de différentes enzymes dont les optima de fonctionnement ne se superposent pas. Enfin, ces enzymes existent souvent dans le sol à l'état adsorbé et sont donc relativement protégées vis à vis de stress chimiques. La tendance actuelle est de se concentrer sur quelques enzymes telles les déshydrogénases, intracellulaires et caractéristiques des cellules vivantes, ou encore un ensemble d'enzymes hydrolytiques globalement caractérisées par une activité hydrolytique de l'acétate de fluoresceïne (Dick, 1994).

Exemples d'application

Plusieurs exemples d'application ont montré l'intérêt potentiel de ces différentes approches. En utilisant une technique biocidale, une réduction significative de la biomasse d'un sol a été observée après application de vinclozoline, un fongicide à large spectre appliqué à la dose de 5 kg ha⁻¹ (Duah-Yentumi and Johnson, 1986). Par contre, 35 années de traitement avec du 2,4-D à des doses compatibles avec la pratique agricole n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet biologique négatif (Biederbeck *et al.*, 1987). Plus récemment, il a été démontré qu'un programme de traitement associant 2 herbicides (le dichlorprop et le glyphosate), deux préparations fongicides (procloraz et carbendazime ou captafol et triadimefon) et un insecticide (le pirimicarb) entraînait après chaque application une réduction de l'ordre de 10 à 15% de la biomasse déterminée par une technique physiologique (Schuster & Schröder, 1990). Une étude réalisée avec deux types de sol et 4 pesticides différents, le benomyl, l'isoproturon, la simazine et le dinoterbe a permis de montrer que tous conduisaient à une réduction de la biomasse estimée à la fois par des techniques biocidales et

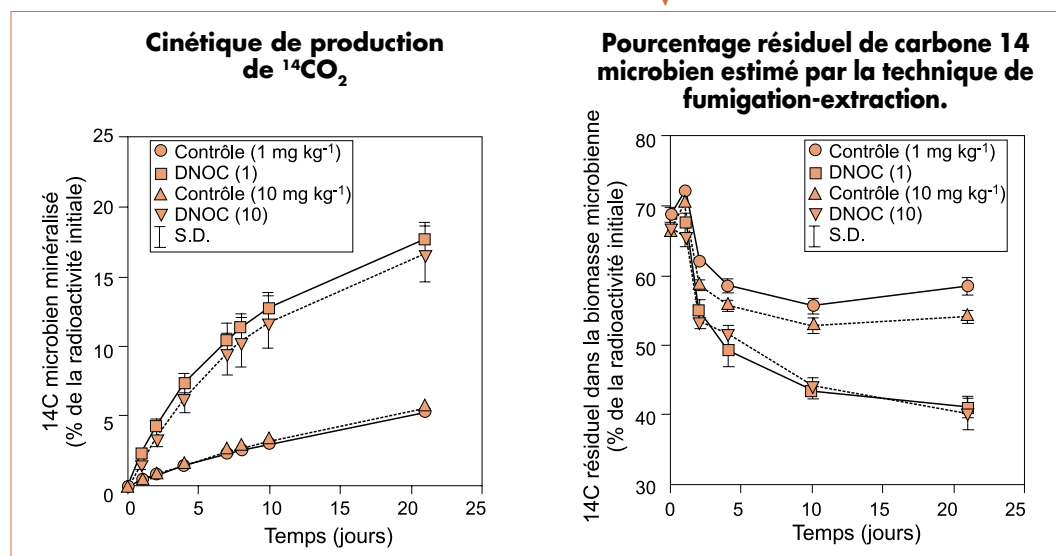
physiologiques, la baisse observée étant systématiquement significative avec le dinoterbe (Harden *et al.*, 1993). Les fongicides apparaissent parmi les produits les plus actifs. C'est le cas du captane, du thirame et du verdasan qui, à 5 mg kg⁻¹, contribuent à une réduction de la biomasse de 40%, le retour à la normale étant réalisé après 8 jours, tandis qu'à une dose 6 fois supérieure, l'effet est amplifié, plus persistant et se manifeste par un accroissement de la contribution des bactéries à la respiration totale (Anderson *et al.*, 1980). Une observation identique a été faite avec deux fongicides de la familles des inhibiteurs de la synthèse des stérols, l'époxyconazole et le triadimefon, qui entraînent une réduction de biomasse d'un sol de 5 et 12% par rapport au contrôle (Hart & Brookes, 1996). Enfin, une nette augmentation de sensibilité des techniques biocidale peut être obtenue après marquage *in situ* de la biomasse à l'aide d'un substrat marqué au carbone 14. Cette approche a permis de montrer qu'une contamination avec du DNOC avait pour conséquence d'augmenter le rapport carbone respiré/carbone incorporé dans la biomasse traduisant une moindre efficacité du métabolisme énergétique (Figure 1) (Rouard *et al.*, 1996). Cette technique permet d'atteindre facilement un paramètre physiologique important du fonctionnement de la microflore des sols, le quotient respi-

rotoire ou activité respiratoire spécifique, qCO₂ (Anderson & Domsch, 1993). Quant aux mesures d'activité hétérotrophe, elles permettent d'accéder aux paramètres biocinétiques V_m (vitesse maximale) et K_m (constante d'affinité) de la loi de vitesse michaélienne reliant la vitesse de minéralisation à la concentration en substrat (Rouard *et al.*, 1996). Enfin, pour ce qui concerne la nitrification, Edwards (1989) en a précisé les limites et montré que la sensibilité aux stress chimiques pouvait dépendre des étapes considérées.

■ Mesure de la diversité microbienne

Les différentes possibilités de transformations biochimiques et leur caractéristiques cinétiques qui, ensemble, contribuent à une meilleure exploitation des ressources nutritives présentes dans l'environnement sont essentielles à la stabilité et à la résilience des écosystèmes terrestres et, pour les agrosystèmes, au maintien de leur fertilité. Leur caractérisation peut donc contribuer à la définition d'indices dont la variation peut traduire des dysfonctionnements biologiques provoqués par des contraintes externes. Plus que par leur capacité à réduire globalement la taille des communautés microbiennes, les biocides sont susceptibles de modifier leur structure spécifique, d'altérer leur organisation fonctionnelle et de nuire à leur faculté d'adaptation.

Effet d'un traitement de sol avec un herbicide, le DNOC, sur le renouvellement du carbone de la biomasse microbienne après marquage *in situ* par apport de glucose marqué au carbone 14. ▼



Les différentes techniques destinées à caractériser la diversité microbienne des sols peuvent être regroupées en quatre types.

Etude de la diversité par établissement de profils d'espèces.

Basée sur la reconnaissance directe des espèces microbiennes, elle suppose un isolement préalable à partir du sol. Cette approche ne concerne donc que les espèces microbiennes cultivables. C'est une approche qui connaît un regain d'intérêt compte tenu des nouvelles possibilités d'identification des unités taxonomiques basée sur des critères phylogénétiques plus discriminants que les critères morphologiques et phénotypiques traditionnels. En dépit de la sélectivité des étapes de culture et d'une définition parfois imprécise des espèces procaryotes, c'est, comme indiqué précédemment, la seule approche qui permette de construire des diagrammes de type «rang-fréquence» et de calculer des indices synthétiques de diversité. Quelques études concernant les effets des pesticides sont rapportés dans la littérature. Ils vont d'une simple étude de relation de dominance entre microflore bactérienne et fongique (Jones *et al.*, 1992) à celle de la distribution de groupes bactériens cultivables sur des milieux plus ou moins sélectifs (Duah-Yentumi & Johnson, 1986 ; Atlas *et al.*, 1991). La littérature reste malgré tout relativement pauvre, ce qui s'explique aisément si l'on considère la charge expérimentale que représente une telle approche.

Etude de la diversité par ribotypage et établissement d'empreintes génétiques

Elles ont toutes pour base méthodologique un traçage des différents individus par le biais de leur ARN ribosomal de la sous-unité 16S (ARNr 16S) dont la relative conservation dans le monde vivant a servi de base à l'établissement des relations phylogénétiques. La collecte de l'ADN correspondant est réalisée par extraction directe à partir du sol et amplification spécifique au cours d'une étape de polymérisation en chaîne de l'ensemble des séquences codant pour les ARN ribosomaux. De taille identique, ces séquences diffèrent, d'une espèce microbienne à l'autre, par la succession des bases nucléiques. C'est la reconnaissance de ce polymorphisme structural qui permet l'établissement d'empreintes génétiques. Plusieurs techniques peuvent être envisagées. La technique du clonage-séquençage des amplifiats (Weller & Ward, 1989 ; Stackebrandt *et al.*, 1993 ; Schmidt *et al.*, 1991) reste relativement

longue et complexe. Plus récemment, Muyzer *et al.* (1993) ont proposé une technique d'électrophorèse en gel avec gradient de dénaturant (DGGE), basée sur une séparation des différentes séquences en fonction de leur propriété de dénaturation lorsqu'elles migrent dans un gradient de dénaturant. La dénaturation fait apparaître des structures branchées dont la migration dans le gel est stoppée. Cette technique a été appliquée avec succès à l'analyse directe de communautés naturelles de sols (Führ & Kubiak, 1995). Plus récemment, Avani-Aghajani *et al.* (1994) ont mis au point une autre approche consistant à marquer en position terminale avec un groupement fluorescent les gènes codant pour les ARNr 16S au cours de l'étape d'amplification. La digestion des amplifiats avec une endonucléase de restriction génère à partir de chacune des séquences individuelles un fragment terminal marqué de taille différente permettant, en théorie, d'identifier chaque bactérie dans un mélange. Une application en a été faite pour tester l'effet d'un herbicide, le DNOC, sur la microflore d'un sol (Rousseau *et al.*, en cours de publication).

Plus généralement, la multiplicité des séquences codantes (gènes fonctionnels) d'une communauté microbienne est probablement en relation avec un état de contrainte imposé par le milieu extérieur. Il est donc normal qu'on ait cherché à caractériser les communautés microbiennes par la richesse ou, ce qui revient au même, par l'hétérogénéité de leur contenu génomique. C'est Torsvik *et al.* (1990) qui, les premiers, ont proposé de prendre le nombre de génomes bactériens différents comme définition théorique de la diversité génétique d'une population ou communauté microbienne. Elle peut se déduire de la complexité de l'ADN extrait du mélange bactérien, cette propriété étant définie par le nombre total de paires nucléotidiques dans des séquences non répétées. Ainsi, les cinétiques de réassociation de fragments d'ADN homologue simple brin issus d'un mélange bactérien sont un bon moyen d'apprécier la redondance génétique, la réassociation se faisant d'autant plus rapidement que les séquences homologues sont en nombre plus important. Partant d'un mélange de 206 bactéries cultivables, les auteurs précédents ont montré que la valeur des paramètres cinétiques de la réassociation de l'ADN total correspondant était en accord avec l'existence de 20 génotypes

sans aucun recouvrement de séquence. Par comparaison, la valeur calculée à partir de l'ADN total extrait du sol était de 4000 génotypes différents soit une diversité 200 fois supérieure, apportant au passage un support chiffré à la sélectivité reconnue des techniques culturales.

La littérature donne d'autres exemples de techniques de caractérisation de l'ADN extrait de sols et dont l'usage peut être envisagé pour détecter des changements structuraux affectant la composition génétique des communautés naturelles. Parmi ces différentes techniques, citons une technique d'amplification avec amorces aléatoires (RAPD) dont l'usage en écologie moléculaire avait été recommandé par Hadrys *et al.* (1992). Récemment, Holben & Harris (1995) ont proposé une technique de fractionnement de l'ADN après liaison avec du bisbenzimidazole qui se fixe préférentiellement dans les régions riches en liaisons A-T. Cette fixation modifie la densité du complexe ADN-bisbenzimidazole permettant ainsi la séparation de l'ADN suivant le pourcentage G+C dans un gradient de CsCl. On obtient un profil d'abondance relative de l'ADN dans différentes fractions de %G+C différents. En fait, il est difficile de juger de l'apport réel de ces différentes techniques au travers des exemples trop peu nombreux qui sont donnés dans la littérature.

Les techniques de biologie moléculaire ont sans aucun doute contribué à l'élaboration d'instruments d'analyse extrêmement puissants permettant notamment d'avoir accès à des micro-organismes impossibles à atteindre par les techniques culturales classiques. Par ailleurs, si l'on excepte le clonage-séquençage, la charge expérimentale est relativement réduite et permet un plus grand nombre d'analyses. Enfin, l'utilisation de gènes autres que ceux codant pour les ARNr 16S permet d'envisager des études portant sur des groupes fonctionnels. Cependant, ces techniques ont aussi leurs limites, la plus sérieuse étant l'extraction de l'ADN du sol qui doit satisfaire deux exigences contradictoires, être suffisamment douce pour éviter une fragmentation excessive du produit mais avec le risque d'une extraction incomplète et peu productive, ou privilégier le rendement au détriment de la qualité physique. Compte tenu de ces contradictions on est actuellement dans l'ignorance à peu près complète de l'origine et de la représentativité du

matériel extrait. L'étape de PCR n'est pas non plus exempte de reproches. Elle se caractérise souvent par une sélectivité d'amplification qui privilégie certaines séquences d'un mélange (Reysenbach *et al.*, 1992) et introduit un biais dans l'image que l'on restitue de la structure d'une communauté microbienne. En outre, Silva & Batt (1995) ont montré que l'efficacité de l'amplification dépendait aussi de l'état physiologique des micro-organismes. Pour ces différentes raisons, les techniques de biologie moléculaire ne peuvent être envisagées comme substituts aux techniques conventionnelles. Elles permettent seulement d'aborder autrement et avec des groupes microbiens différemment structurés l'analyse des communautés microbiennes naturelles et de leur évolution en présence de stress notamment d'origine chimique.

Etude de la diversité par établissement d'empreintes chimiques

Parmi les autres molécules «signature» qui peuvent être utilisées pour déterminer la composition d'une communauté microbienne, les acides gras des phospholipides (PLFA) offrent certains avantages : on les trouve dans les membranes de toutes les cellules vivantes (Zelles *et al.*, 1992). Ils disparaissent relativement rapidement dans les cellules mortes et chaque espèce microbienne en possède un ensemble de composition caractéristique. Plus de 8000 souches bactériennes peuvent ainsi être différenciées par leur profil PLFA (Tunlid & White, 1990). L'analyse de la composition en acides gras des phospholipides est donc un instrument important de classification taxonomique et phylogénétique des micro-organismes. La composition en acides gras des communautés microbiennes est donc liée à leur structure. Haack *et al.*, (1994) ont confirmé la validité de cette approche en montrant que différents mélanges de bactéries du sol pouvaient être distingués sur la base de leurs profils en acides gras. Enfin, Frostegård *et al.* (1992) en ont donné des exemples d'application destinés à étudier les changements qui affectent la structure de communautés microbiennes du sol contaminées avec des métaux lourds. La principale faiblesse de cette approche technique est l'impossibilité de relier les modifications de profils observées à des changements dans la répartition fréquentielle de groupes microbiens concernés.

Etude de la diversité par établissement d'empreintes métaboliques

Le nombre des différents substrats carbonés que la communauté microbienne d'un sol a la possibilité d'utiliser comme sources de carbone et d'énergie est directement en liaison avec le nombre des espèces présentes et actives. Le profil d'utilisation de ces substrats carbonés représente donc une empreinte métabolique qui peut servir de base comparative pour la classification des communautés microbiennes issues de sols différents, mais aussi pour déceler des dérives liées à des pollutions (Wünsche *et al.* (1995). Les plaques de microtitration de type Biolog® (Garland & Mills, 1991) qui permettent de réaliser simultanément des tests de consommation pour 95 substrats carbonés différents sont un support technique intéressant pour ce type d'approche. Dans le domaine de l'écotoxicologie, Wünsche *et al.* (1995) ont mis en évidence des modifications importantes dans les profils métaboliques de communautés microbiennes de sols contaminés avec des hydrocarbures. Une application en a été faite récemment pour l'étude de l'effet d'un herbicide, le DNOC, sur la microflore d'un sol (Lors *et al.*, en cours de publication) (Figure 2). Malgré tout, un certain nombre de critiques peuvent être formulées. La première concerne le caractère sélectif de la procédure lié à un mode de détection qui dépend d'une étape culturale sur un milieu de culture dont la richesse en carbone excède largement celle qui prévaut dans le sol. Il est donc probable que les

bactéries à stratégie de croissance de type «r» trouvent des conditions qui renforcent leur activité. Par ailleurs, les espèces rares dont certaines peuvent être des acteurs importants dans le fonctionnement général des écosystèmes sont probablement sous estimées.

Par ailleurs, quelle que soit la technique adoptée, la pertinence de l'interprétation des résultats sera fonction de l'amplitude des fluctuations auxquelles les différents indices d'impact écotoxicologique sont naturellement soumis. De ce point de vue, la sensibilité des indices plus analytiques pourrait apparaître illusoire dans un contexte de variabilité spatio-temporelle importante.

Conclusion

Leur immersion dans le sol expose directement les micro-organismes aux pollutions d'origine agricole et industrielle dont le sol est souvent la cible ultime. Ces organismes constituent donc à la fois des sondes potentielles utilisables dans le cadre d'une surveillance de la qualité chimique des sols mais également des indicateurs d'une dérive biologique qui pourrait, à terme, nuire au fonctionnement des agrosystèmes. La littérature existante montre que le problème de l'impact d'un polluant peut être abordé à différents niveaux d'investigation allant de la souche isolée à la communauté microbienne, utilisant des indices biologiques de natures différentes, structuraux ou

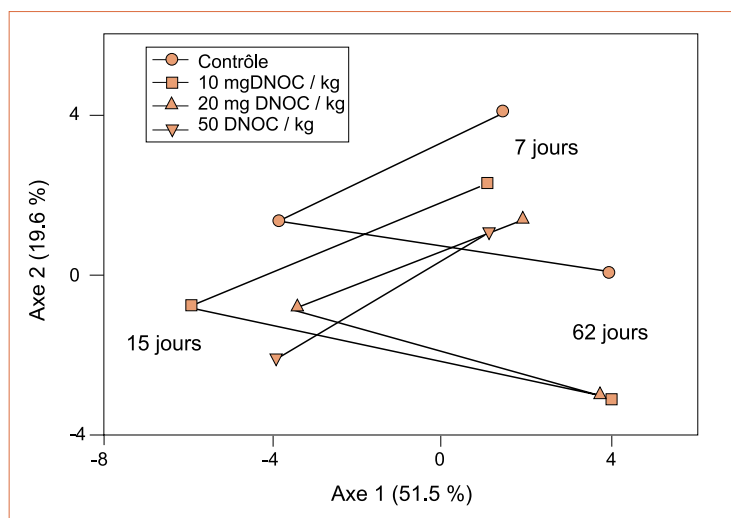


Figure 2.- Analyse en composantes principales montrant l'effet d'un traitement de sol avec un herbicide, le DNOC, sur les profils d'utilisation de différents substrats carbonés par la microflore d'un sol. Les points figurés représentent les trajectoires évolutives relatives aux différents traitements de sol après 7, 15 et 62 jours dans le plan principal expliquant plus de 70% de la variation observée.

fonctionnels, qualitatifs ou quantitatifs. Aucune des différentes techniques rapportées ne peut prétendre, à elle seule, fournir une réponse globale permettant de juger de la signification écologique réelle des effets observés. C'est, au contraire, de la multiplicité des cibles et des approches que l'on peut espérer avoir une vision plus réaliste de la dérive écologique. Par ailleurs,

les fluctuations spatio-temporelles normales qui affectent la composition et le fonctionnement des communautés microbiennes naturelles doivent être prises comme base de jugement de la signification des effets observés en présence d'une substance potentiellement polluante. Seule cette comparaison peut permettre de garantir la pertinence d'un indice écotoxicologique. ■

Résumé

Les micro-organismes du sol sont les principaux agents du recyclage des éléments dans le sol et, plus généralement, de la fertilité des sols agricoles. Ces derniers sont aussi la voie de passage obligée de nombreuses molécules xénobiotiques dont certaines représentent une menace en raison de leur impact écotoxicologique. Les micro-organismes du sol sont donc parmi les premiers organismes exposés. Deux voies sont actuellement possibles pour évaluer les effets secondaires des substances xénobiotiques sur la microflore des sols. Pendant longtemps, ce sont les caractéristiques de taille et d'activité de la microflore, les plus en rapport avec le fonctionnement biologique des sols, qui ont été considérées comme les meilleurs indices des impacts écotoxicologiques. Elles sont actuellement critiquées car les adaptations physiologiques et structurales qui accompagnent la réponse microbienne à la présence de polluants tendent à minimiser les variations de niveaux de biomasse et d'activité qui de ce fait apparaissent comme des descripteurs d'effets peu sensibles. Les descripteurs de diversité considérés à différents niveaux, spécifique, métabolique et génétique ont la propriété de restituer les modifications structurales qui affectent les communautés microbiennes naturelles soumises à des stress chimiques. Elles restent soumises à des limitations méthodologiques et techniques qui en limitent pour le moment l'intérêt.

Abstract

Because soil micro-organisms are mainly responsible for nutrient cycling they play a major role in plant nutrition and soil fertility. Soil is also the ultimate receptacle of a number of xenobiotic compounds and their degradation products which represent a potential threat due to their ecotoxicological impact. Soil micro-organisms are directly exposed. A desirable evolution towards sustainable agriculture requires taking into account these potentially damaging consequences. There are currently two main ways of monitoring side-effects of xenobiotic compounds on the soil microflora. For decades, size and activity descriptors of soil microbial communities were used. They have been criticised on the ground that they are the net outcome of complex physiological and structural rearrangements of the soil microflora and, for that reason, lack the necessary sensitivity. Recent progress in analysis of microbial diversity at the species, metabolic, physiological, and genetic levels offers new promising alternatives. Yet, some limitations in acquisition and interpretation of data are presented and discussed.

Bibliographie

- Anderson, J. P. E. & Domsch, K. H., 1978, A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10, 215-221.
- Anderson, T. H. & Domsch, K. H., 1985, Maintenance carbon requirements of actively-metabolizing microbial populations under in situ conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 197-203.
- Anderson, T. H. & Domsch, K. H., 1993, The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 393-395.
- Atlas, R.M., Horowitz, A., Krichevsky, M. & Bej, A.K., 1991, Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microb. Ecol.*, 22, 249-256.
- Avaniss-Aghajani, E., Jones, K., Chapman, D. & Brunk, C., 1994. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences, *BioTechniques*, 17, 144-149.
- Bååth, E., Frostegård, A. & Fritze, H., 1992. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition, *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4026-4031.
- Biederbeck, V. O., Campbell, C. A. & Smith, A. E., 1987, Effects of long-term 2,4-D field applications on soil biochemical processes, *J. Environ. Qual.*, 16, 257-262.
- Dick, R. P., 1994, Soil Enzyme activities as indicators of soil quality. In «*Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*», Chap. 7, pp 107-124, Doran, J. W., Coleman, D. C., Bezdicek D. F. & Stewart B. A. eds, SSSA special publication n° 35, American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA
- Duah-Yentumi, S. & Johnson, D. B., 1986, Changes in soil microflora in response to repeated applications of some pesticides. *Soil Biol. Biochem.*, 18, 629-635.
- Edwards, C. A., 1989. Impact of herbicides on soil ecosystems. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 8, 221-248.
- Fournier, J. C., Froncek B., Gamouh A. & Collu T., 1992, Comparison of three methods to test the side-effects of pesticides on soil microbial biomass. In «*Proceedings of the International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology*», pp 18-23, Anderson J. P. E., Arnold D. J., Lewis F., Torstensson L. eds, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Frostegård Å., Tunlid A. & Bååth, E., 1992, Changes in soil phospholipid fatty acid patterns due to different environmental disturbance. In «*Proceedings of the International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology*», pp 24-29, Anderson J. P. E., Arnold D. J., Lewis F., Torstensson L. eds, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Führ, A. & Kubiak, R., 1995, Darstellung der Mikrobiellen im Boden mit Hilfe der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) von 16S rDNA PCR-Produkten, *Mitteilungen der Dt. Bodenkdl. Gesellschaft*, 75, 83-86.
- Garland, J. L. & Mills, A. L., 1991, Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2351-2359.
- Grosbard, E., 1976, Effects on the soil microflora, In «*Herbicides, Physiology, Biochemistry, Ecology*», Vol. 2, Chap. 4, pp 99-147, Audud L. J. ed, Academic press, London
- Haack, S. K., Garchow, H., Klug, M.J. & Forney, L. J., 1995, Analysis of factors affecting the accuracy, reproductibility and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1458-1468.
- Hadrys, H., Balick, M. & Schierwater, B., 1992, Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology, *Mol. Ecol.*, 1, 55-63.

- Harden, T., Joergensen, R. G., Meyer, B. & Wolters, V., 1993, Soil biomass estimated by fumigation-extraction and substrate-induced respiration in two pesticide-treated soils, *Soil Biol. Biochem.*, 25, 679-683.
- Hart, M. R. & Brookes, P. C., 1996, Effect of two ergosterol inhibiting fungicides on soil ergosterol and microbial biomass, *Soil Biol. Biochem.*, 28, 885-892.
- Holben, W. E. & Harris, D., 1995, DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples, *Mol. Ecol.*, 4, 627-631.
- 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.
- Muyzer, G., Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G., 1993, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700.
- Reysenbach, A. L., Giver, L. J., Wickman, G. S. & Pace, N. R., Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3417-3418.
- Rouard, N., Dictor, M. C., Chaussod, R. & Soulas, G., 1996. Side-effects of herbicides on the size and activity of the soil microflora : DNOC as a test case, *Eur. J Soil Sci.*, 47, 557-566.
- Schmidt, T. M., Delong, E. F. & Pace, N. R., 1991, Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing, *J. Bacteriol.* 173, 4371-4378.
- Schuster E. & Shröder D., 1990, Side-effects of sequentially and simultaneously applied pesticides on no-target soil microorganisms : laboratory experiments, *Soil Biol. Biochem.*, 22, 375-383.
- Silva, M. C. & Batt, C. A., 1995, Effect of cellular physiology on PCR amplification efficiency, *Mol. Ecol.*, 4, 11-16.
- Stackebrandt, E. Liesack, W. & Goebel, B. M., 1993, Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical australian environment as determined by 16S rDNA analysis, *Genetic diversity of natural microbial community*, 7, 232-236.
- Torsvick, V., Goksøyr, J. & Daae, F. L., 1990, High diversity in DNA of soil bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 782-787.
- Tunlid, A. & White, D., 1992, Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. In *Soil Biochemistry*, Vol. 7, pp 229-262, Stotzky G. and Bollag J. M. Edts, Marcel Dekker, N. Y.
- Vance, E.D., Brookes, P.C. & Jenkinson, D.S., 1987, An extraction method for measuring soil microbial biomass, *Soil Biol. Biochem.*, 19, 703-707.
- Wainwright M., 1978, A review of the effects of pesticides on microbial activity in soils, *J. Soil Sci.* 29, 287-298.
- Weller, R. & Ward, D. M., 1989, Selective recovery of 16S rRNA sequences from natural microbial communities in the form of cDNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1818-1822.
- Wright, R.T. & Hobbie, J.E., 1965. The uptake of organic solutes in lake water. *Limn. Oceanogr.*, 10, 22-28.
- Wünsche, L., Brüggeman, L. & Babel, W., 1995, Determination of substrate utilization pattern of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17, 295-306.
- Xueqing, Xia, Bollinger, J. & Ogram, A. 1995, Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D, *Mol. Ecol.*, 4, 17-28.
- Zelles, L., Bai, Q. Y., Beck, T. & Beese, F., 1992, Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils, *Soil Biol. Biochem.*, 24, 317-323.