



Etourneau Laetitia - letourneau@labexcell.com
Nicolato Tommaso - tnicolato@labexcell.com
Renouf Vincent - vrenouf@labexcell.com

NOUVEAUTÉ EXCELL

Les analyses d'activité et de quantité de microorganismes dans les sols viticoles.

Depuis les ouvrages de référence de Winogradsky (1949) et de Pochon et de Barjac (1958), la microbiologie des sols n'a jamais été autant plébiscitée que ces dernières années. De nombreux travaux de recherche y sont consacrés et les publications sur le sujet se multiplient. Les approches sont aussi disparates que le système étudié est complexe. Certaines techniques employées peuvent être relativement ubuesques (la fameuse technique du slip en coton...) ou infiniment sophistiquées (approche métagénomique...) parfois même aux dépens de certains axiomes agronomiques (représentativité du prélèvement, profondeur de prélèvement...) ou analytique (délai entre le prélèvement et l'analyse, négligence de certains effets environnementaux (température, humidité...)).

Lorsque nous avons lancé des réflexions à ce sujet au laboratoire EXCELL notre principale ambition était de proposer un dispositif analytique global, pratique et pragmatique. Dans l'immensité de la diversité des moisissures, bactéries et autres levures présentes sur et dans les sols, deux composés communs à toutes ces cellules sont représentatifs premièrement de leur présence, deuxièmement de leur activité. Ces deux grandeurs sont respectivement la quantité totale d'ADN et la quantité d'ATP. Ces deux biomolécules sont universelles à tout organisme vivant.

En éliminant les organismes visibles à l'œil (un microorganisme est par définition un organisme vivant invisible à l'œil nu) et en dosant l'ADN et l'ATP, il est ainsi possible d'évaluer la quantité totale de microorganismes (toute cellule microbienne dispose d'ADN hormis certains virus) et leur niveau d'activité (l'ATP est la molécule responsable de l'énergie cellulaire ; sa quantité totale est donc représentative de la vitalité globale du consortium microbien présent). Le tableau page 2 synthétise les avantages de ces deux approches complémentaires par rapport à d'autres techniques possibles.

*Synthèse des différentes approches analytiques possibles pour caractériser la vie microbienne d'un sol viticole et avantages des deux techniques retenues au laboratoire EXCELL
L'analyse de l'ATP (vitalité) et de l'ADN (charge microbienne totale)*

Technique possible pour analyser la vie microbienne dans un sol viticole	Avantages/inconvénients
Technique du slip en coton	Pas de référentiel Effets possibles de phénomènes abiotiques (acidolyse, phénomènes oxydatifs...) et certainement pas que microbiens (interventions possibles d'insectes, de collemboles...)
Cytométrie	Bruit de fond variable lié au comptage de phénomènes non microbiens
Microscopie	Influence des étapes de préparations des échantillons. Difficulté de mises en œuvre des techniques de colorations habituellement pertinentes en microscopie
Analyses d'activités enzymatiques	Analyses ciblées donc prises en compte d'une partie seulement du consortium microbiologique
Mesures de respiration induite par substrats	Idem que les analyses d'activités enzymatiques
Approches métagénomiques	Analyses là aussi très orientées et pouvant cibler des phénomènes potentiellement très rares, les isolant également les uns des autres sans vision d'ensemble. En l'état actuel des connaissances ; les données obtenues sont relativement difficiles à interpréter
Test de vitalité biologique EXCELL : mesure de l'ATP	ATP est une molécule universelle à toute cellule vivante. La quantité d'ATP par cellule représente l'énergie cellulaire et donc son activité. Son dosage est facile et précis.
Estimation de la charge microbienne totale : mesure de l'ADN microbien total	L'ADN est aussi une molécule universelle à toute cellule vivante. Sa quantité est fixe selon un type de cellule et un stade cellulaire. Sa méthode de mesure de quantification dans les sols et normalisée ce qui assure de pouvoir bien comparer et interpréter les données.

Le ratio ATP/ADN doit potentiellement également fournir des informations intéressantes. Un sol qui présente des quantités notables d'ADN mais de relatives faibles valeurs d'ATP pourrait questionner sur son fonctionnement : pourquoi les germes sont présents mais ne sont-ils pas actifs ? Présence de composés toxiques ? Carence en nutriments, en tel ou tel élément minéral ? Excès d'eau ?

Après avoir établi et optimiser les modes opératoires analytiques, nous avons donc cumulé de nombreuses mesures depuis trois ans afin de constituer des bases de données robustes permettant d'interpréter ces données et les confronter à certaines données complémentaires. Cet article détaille ces travaux en évoquant les grands principes de ces analyses puis en présentant quelques exemples concrets de résultats obtenus laissant entrevoir un potentiel fort à ces analyses comme outils de diagnostics mais également comme outils décisionnels pour guider vers les pratiques agronomiques les plus adaptées.

Matériels et méthodes

Les prélèvements de terre sont réalisés à l'aide de matériels de prélèvement classiques (tarière, petites pelles, plantoir à main...) préalablement nettoyés. Les prélèvements se font sous la litière végétale à 20/30 centimètres de profondeur. Au laboratoire toutes les éléments biologiques visibles à l'œil nu (végétaux, insectes, vers de terre...) sont éliminés. L'humidité de la terre est alors mesurée puis la terre est mise en solution selon des conditions définies et l'ATP et l'ADN sont mesurés avec des dispositifs spécifiquement dédiés. Les dosages de cuivre dans les sols évoqués également dans les résultats présentés dans cet article sont réalisés à partir de protocoles normés (cuivre total : norme ISO 11466 ; cuivre échangeable NF X31-120).

Résultats

Le tableau ci-dessous présente une synthèse des données cumulées ces 3 dernières années lors des mesures d'ATP dans les sols. La mesure de l'ATP s'exprime en RLU (grâce à une enzyme, la luciférase (enzyme présente dans les lucioles), la quantité d'ATP est transformée en intensité lumineuse. Les valeurs enregistrées dépendent bien sûr du mode opératoire utilisé et de l'appareil de mesure. Nous utilisons fréquemment cette technique lors de nos audits d'hygiène dans les caves. Pour les analyses de sol le contexte est évidemment totalement différent (y compris le mode opératoire analytique). Nous avons notamment pris le parti de transcrire la mesure de RLU en quantité d'ATP par gramme de matière sèche (sol). Les milliers de données cumulées (tableau 2 et figure 1) ces deux dernières nous permettent d'estimer qu'en deçà de 50 RLU le sol étudié est « très pauvre » en vitalité biologique ; qu'entre 50 et 100 RLU la vitalité biologique est « faible », entre 100 et 200 elle peut être considérée comme « moyenne », entre 200 et 400 RLU la vitalité biologique est qualifiée de « forte » et au-delà de 400 RLU de « très forte ».

Valeurs clefs de la base de données d'analyses de vitalité biologique par mesures de l'ATP exprimées en ng d'ATP par g de matière sèche réalisées depuis 2018 sur différents vignobles

Valeur moyenne	168 ng d'ATP/g MS
Valeur médiane	140 ng d'ATP/g MS
Valeur minimale	3 ng d'ATP/g MS
Valeur maximale	972 ng d'ATP/g MS

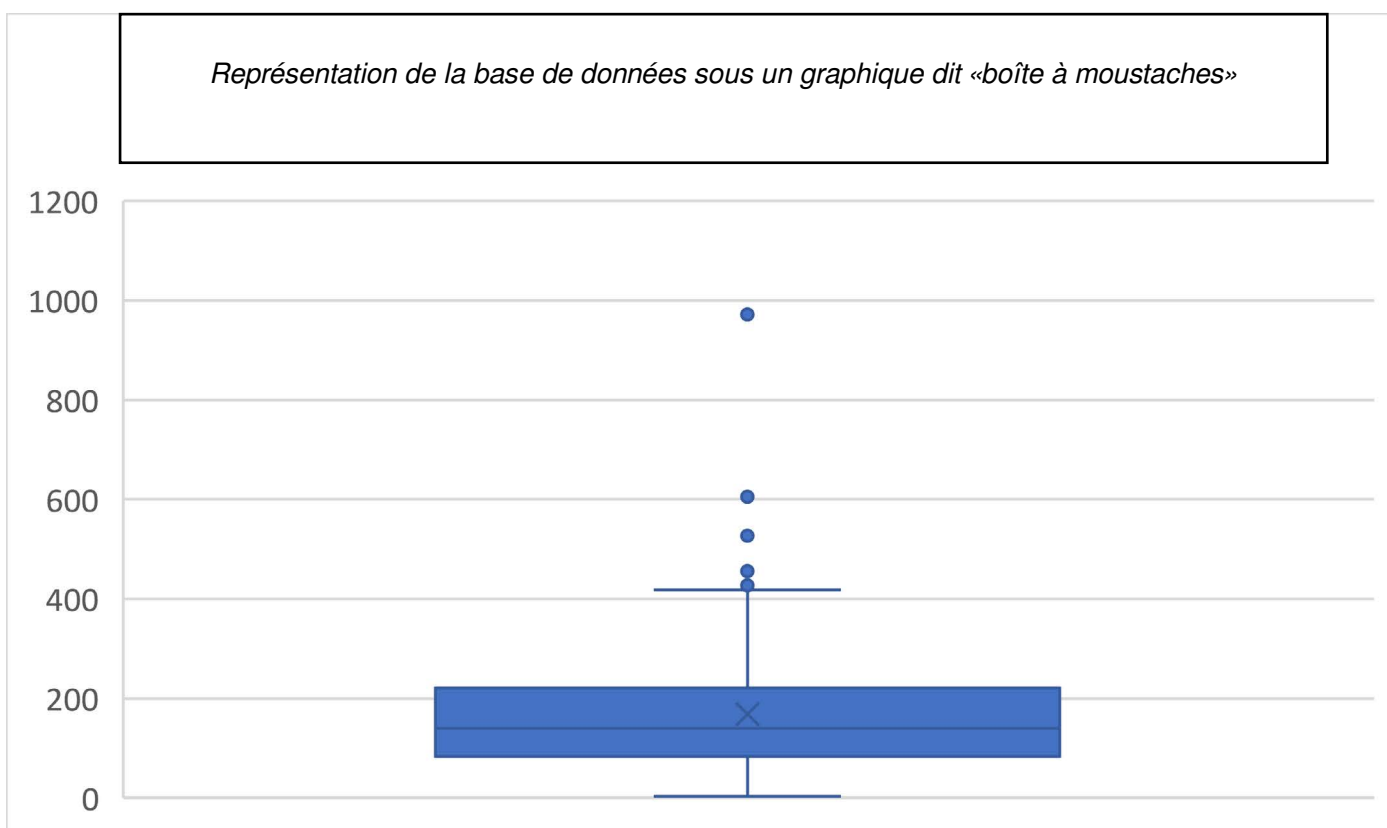


Figure 1 :

Représentation en graphique type boîte à moustaches de l'exploitation de la base de données des analyses de vitalité biologique des sols par mesure de l'ATP au laboratoire EXCELL ces 3 dernières années.

Exemples de résultats

Le graphique ci-dessous présente les résultats obtenus sur les différentes placettes d'une parcelle de Merlot du Libournais au début du printemps (prélèvements de mars) et au milieu de l'été (prélèvements de juillet). Il est intéressant de remarquer que les niveaux de vitalité biologique étaient globalement relativement élevés au printemps, qu'ils ont sensiblement baissé au milieu de l'été et que la placette qui présentait le niveau de vitalité le plus faible en mars est celle qui présente le niveau de vitalité le plus élevé mi-juillet. Cette placette correspond à la partie la moins argileuse de la parcelle étudiée.

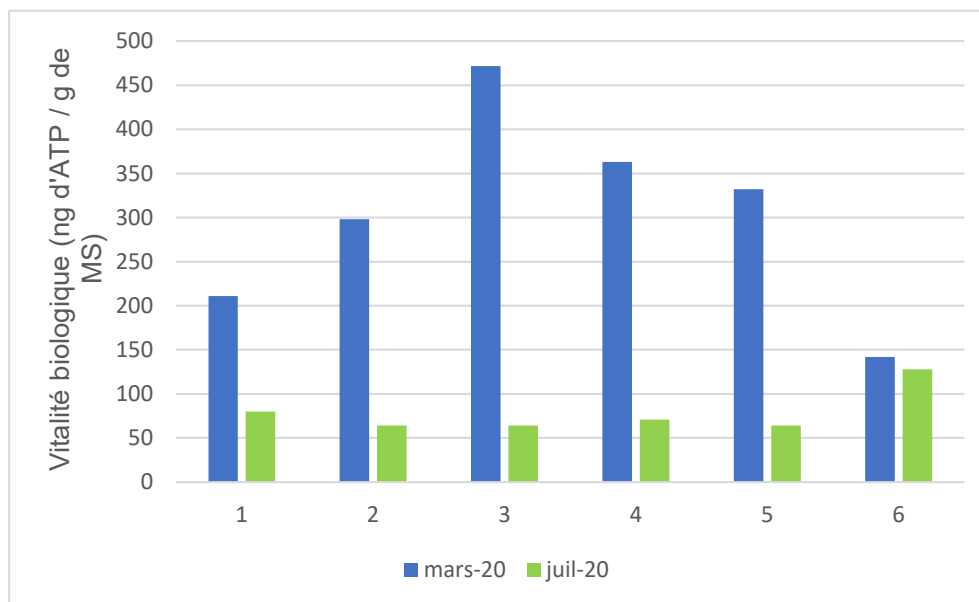


Figure 2 :

Comparaison des analyses de vitalité biologique (ATP) sur 6 placettes d'une même parcelle de Merlot dans le libournais entre le début mars (1er point de mesure en bleu) et la mi-juillet (2ème point de mesure en vert).

Parmi les composés du sol probablement hostiles à la vie microbienne, le cuivre est évidemment au centre de tous les questionnements. De nombreuses publications évoquent ce sujet (Karimi et al 2021 ; Nunes et al. 2016 Wang et al. 2009) mais les résultats proposés y sont divergents. Certaines données découlent sur des conséquences fortes de la présence de cuivre sur la richesse (biomasse, diversité...) microbienne et d'autres démontrent que le cuivre n'a pas d'effet significatif sur des voies métaboliques centrales et essentielles comme l'activité bêta-glucosidase impliquée dans le cycle du carbone et la dégradation de la matière organique. Ces études visent souvent à corrélérer la dose de cuivre employée sur la saison et la vie microbienne dans le sol. A partir de nos indicateurs d'ATP et d'ADN, nous avons cherché à étudier les effets des teneurs réelles en cuivre total et échangeable dans le sol au moment de l'analyse microbiologique.

Le premier nuage de points, en page 5, présentent les résultats obtenus sur 80 analyses réalisées sur différentes placettes de 5 vignobles (Bordelais et Languedociens) appartenant à une même structure. Une tendance apparaît : les terres présentant les vitalités biologiques les plus élevées sont celles dont les teneurs en cuivre échangeable sont les plus faibles. Cette première série d'analyses avait été réalisés durant l'été 2020. Une seconde campagne d'analyse a été menée en décembre 2020 consolidant donc l'observation avec le double de points de mesures ; indiquons ici que les valeurs de cuivre total et de cuivre échangeable sont solidement corrélées mais que des variations notables sont observées entre les deux points de mesures (été et début de l'hiver) traduisant certainement une différence de capacité de rétention du cuivre selon les sols étudiés.

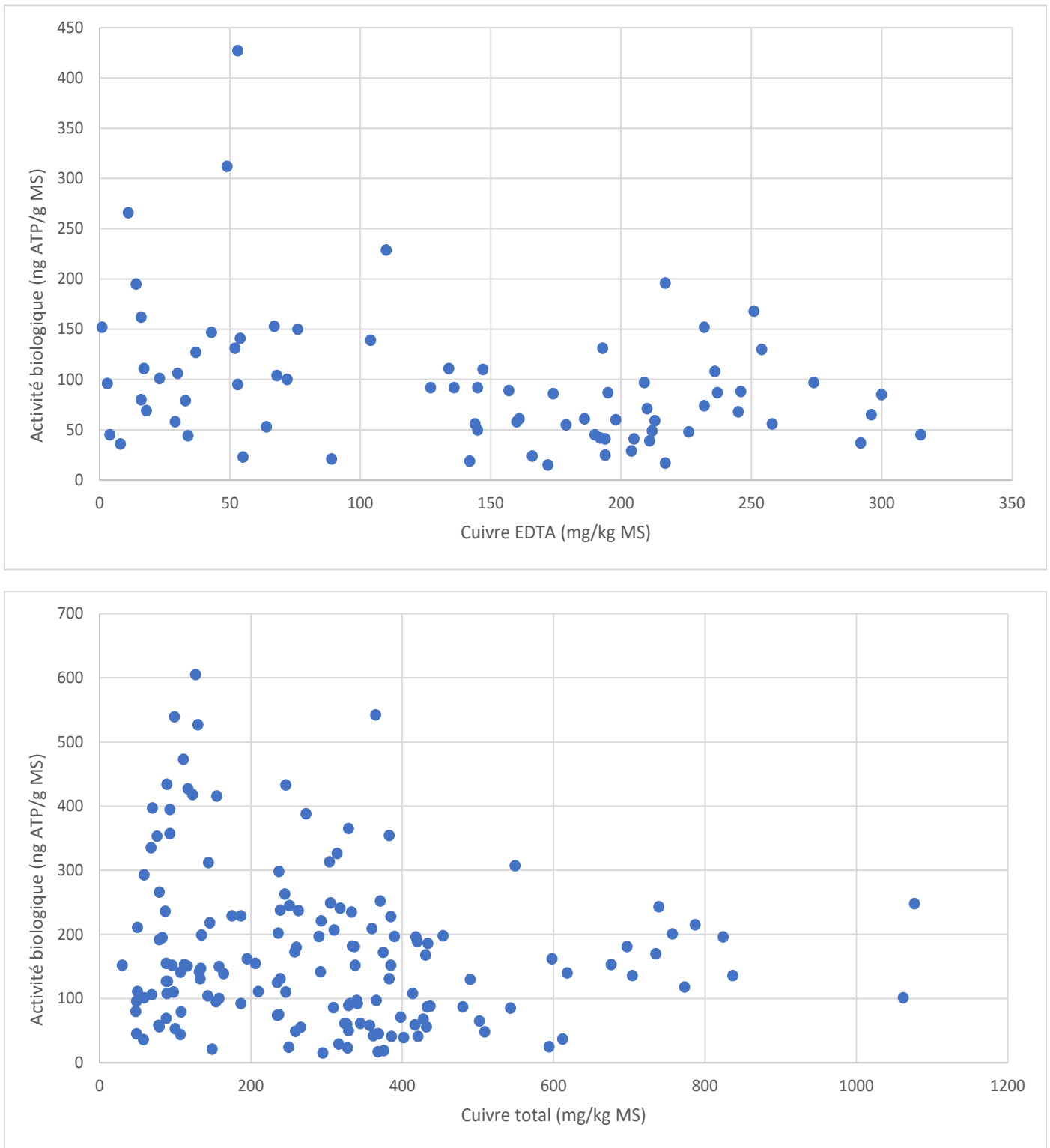


Figure 3 :

Confrontation entre les mesures de vitalité biologique (ATP) et celles de cuivre échangeable et de cuivre total.

L'étude d'autres résidus de pesticides présents dans le sol peut également s'avérer intéressante pour comprendre les différences de résultats de vitalité biologique. Le tableau ci-dessous confronte les données de vitalité biologique et le type de résidus de pesticides et leurs concentrations sur différentes parcelles d'un même vignoble. Les graphiques qui s'en suivent regroupent les placettes selon leur niveau de vitalité biologique. Nous constatons que celles qui présentent une vitalité biologique inférieure à 100 ng d'ATP/g de sol (pouvant donc être qualifiée de relativement faible) sont celles qui présentent le nombre de résidus et la somme des concentrations en résidus les plus élevés (même si bien sûr ce genre d'exploitation des données concernant les pesticides sont toujours assujettis à certaines précautions et à des notions de toxicité dont ne nous sommes pas experts).

Exemple de résultats obtenus lors d'analyses de vitalité biologique (ATP), du pH, du cuivre total et échangeable et de résidus de pesticides (parmi une liste d'environ 180 composés recherchés à différentes placettes de prélèvements d'un même vignoble.

Les pesticides sont exprimés en mg/kg MS.

Référence de la placette de prélèvement	Vitalité biologique du sol (ng/g)	pH NF ISO 10390	Cuivre échangeable (mg/kg) NF X31-120	Cuivre totale (mg/kg) ISO 11466	Diméthomorphe	Boscalide	Fludioxyne	Fluopicolide	Spiroxamine	Zoxamid	Quinoxyfen	Metrafenone	Cyflufenamid	Difénocnazole
32	36	5,75	375	685	0,023	0,058	0,028	0,024	ND	ND	ND	0,055	ND	ND
26	42	5,75	283	440	ND	0,038	ND	ND	ND	ND	ND	0,034	ND	ND
28	50	5,77	238	458	0,143	ND	ND	0,086	ND	ND	ND	0,029	ND	0,057
29	59	6,18	177	463	0,06	ND	0,043	0,031	ND	ND	ND	0,039	ND	ND
30	64	6,03	292	492	0,082	0,071	0,051	0,061	ND	ND	ND	0,065	ND	0,036
31	71	5,93	277	681	0,03	0,049	0,027	0,048	ND	ND	ND	0,056	ND	ND
25	83	5,49	295	490	ND	0,072	ND	0,04	ND	ND	ND	0,024	ND	ND
27	86	6,23	219	389	0,137	ND	0,024	0,064	ND	ND	ND	0,041	0,02	0,06
33	89	6,03	172	354	0,091	0,052	0,077	0,1	ND	0,026	ND	0,066	ND	ND
17	90	6,95	86	206	0,053	0,066	0,042	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	98	7,05	155	356	0,033	0,081	0,079	0,027	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	100	7	136	302	0,098	0,073	0,081	ND	ND	ND	ND	0,035	ND	ND
21	100	6,58	145	243	ND	0,092	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	102	6,77	278	501	0,04	0,054	0,038	0,027	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	103	6,81	84	255	ND	0,137	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	105	7,24	52	205	ND	0,083	0,046	ND	ND	ND	ND	0,026	ND	ND
18	111	6,72	103	324	0,068	0,036	0,031	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	113	5,66	308	519	ND	0,058	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22	115	6,34	157	287	ND	0,094	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	135	6,92	122	339	0,036	ND	0,029	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	142	7,15	187	338	0,046	0,078	0,055	0,027	ND	ND	ND	0,027	ND	ND
10	145	7,03	106	313	ND	0,079	0,034	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	166	7,07	145	297	0,052	0,058	0,043	ND	ND	ND	ND	0,026	ND	ND
5	195	6,85	131	241	0,071	0,05	0,064	ND	ND	ND	0,034	ND	ND	ND
1	211	6,51	157	338	ND	0,072	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	251	6,62	57	222	0,039	0,052	ND	ND	ND	ND	0,03	0,04	ND	ND
12	252	6,96	132	251	ND	0,054	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	298	6,56	152	371	ND	0,069	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	332	6,78	114	281	0,061	0,058	0,069	ND	ND	ND	0,033	0,041	ND	ND
7	456	6,76	144	302	0,039	0,062	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

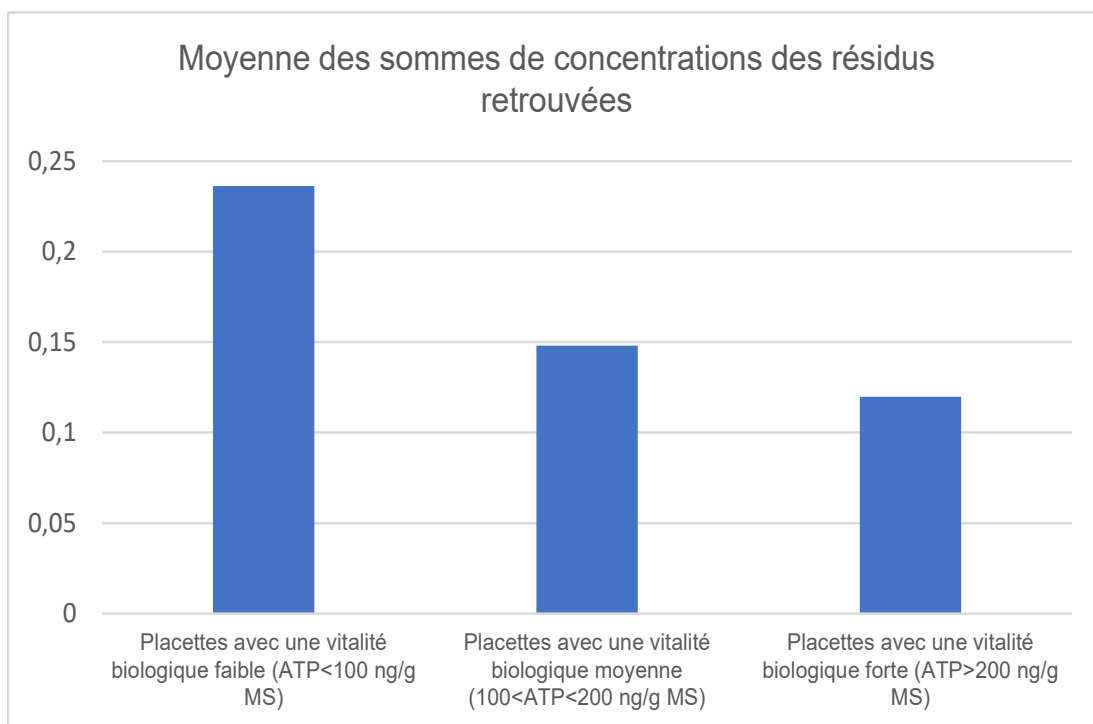
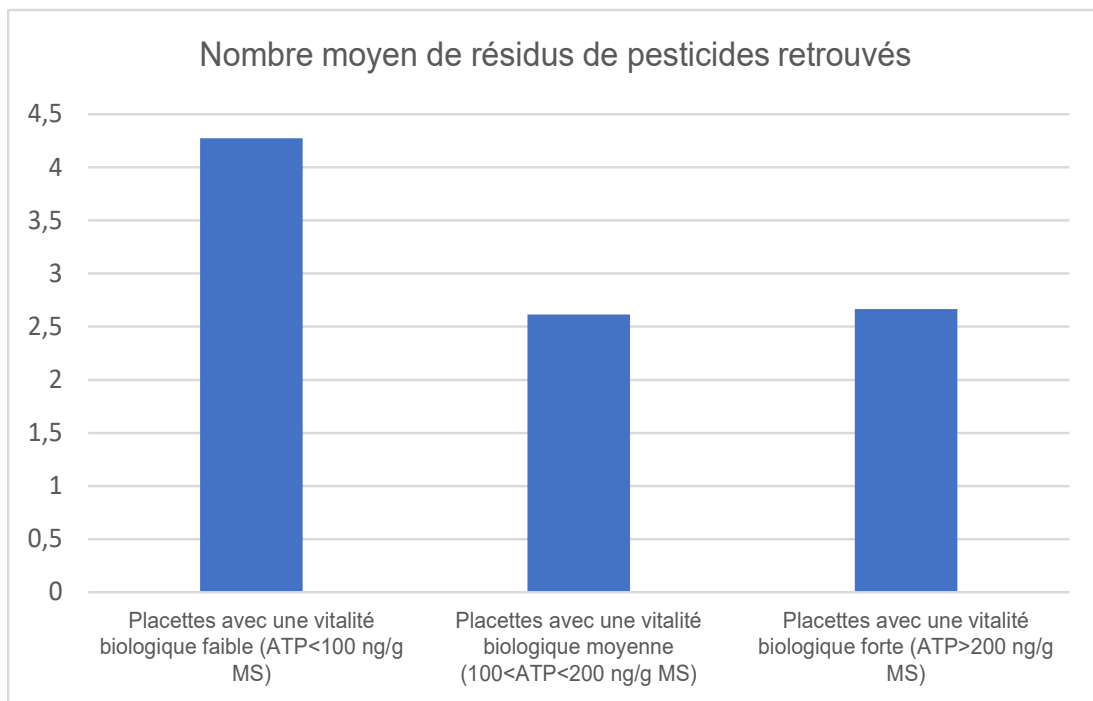


Figure 4 :

Illustration graphique des résultats du tableau 3 en regroupant les placettes de prélèvement selon leurs résultats de mesures de vitalité biologique (ATP) et le nombre de pesticides quantifiés et la somme des concentrations retrouvées.

Comme évoqué en introduction la mesure de la vitalité biologique estimée par la quantité d'ATP peut être confrontée à la quantité de microorganismes présents. Pour estimer cette grandeur nous avons choisi de nous référer au dosage de l'ADN microbien total. Le tableau ci-dessous compare deux prélèvements issus d'un même vignoble qui bien qu'affichant une quantité d'ADN microbien total semblable présentent deux niveaux de vitalité biologiques radicalement différents. Ces deux prélèvements ont été réalisés sur deux typologies de sols bien différentes associées également à deux modes de conduites et de travail du sol différents.

Ces résultats laissent présager que pour une charge microbienne totale relativement semblable, la vitalité biologique et donc les activités métaboliques des microorganismes est nettement plus importante sur le site de prélèvement A. En pareil cas, il convient évidemment de s'interroger sur les causes de ces différences (hydromorphie des sols, concentrations en azote, en carbone, en minéraux, en éléments toxiques...) car ces différences d'activités peuvent certainement avoir des conséquences sur les cycles de la matière et les possibilités d'assimilation pour les ceps de vigne qui s'y trouvent.

Comparaison des valeurs de vitalité biologique (mesure de l'ATP) et de charge microbienne totale (estimée par la mesure de l'ADN) sur deux sites de prélèvements d'un même vignoble mais présentant une typologie de sol et des modes de travail différents. Si la quantité d'ADN est semblable, la vitalité biologique est considérée comme forte pour le site A et de faible pour le site B.

	Vitalité biologique (ATP en ng/g MS)	Charge microbienne totale (μ g d'ADN/g MS)
Site de prélèvement A	338	14,4
Site de prélèvement B	89	14,7

Conclusions et perspectives

De façon très générale, le consortium microbiologique des sols est un élément clef dans le cycle de la matière organique (Anfrey 2017). Plus cette microflore est importante, diversifiée et active plus le processus de dégradation de la matière organique est rapide et rend davantage d'éléments nutritifs intermédiaires (minéraux, inorganiques et organiques) disponibles pour les ceps de vignes. L'analyse de la composante microbienne d'un sol revêt donc d'un intérêt évident mais requiert une relative prudence car les systèmes à étudier sont complexes et régis par de nombreuses interrelations écologiques.

Pour disposer de données précises, globales et pragmatiques, au laboratoire EXCELL, nous avons choisi de concentrer nos stratégies analytiques sur deux grandeurs liées à toute forme de vie microbienne : l'ADN et l'ATP. L'ADN permet d'estimer la quantité totale de cellules microbiennes présentes et l'ATP représente l'activité de cette microflore.

Après avoir compilé les résultats de nombreuses analyses ces trois dernières années, les niveaux de vitalité biologique peuvent désormais être bien discernés selon les quantités d'ATP mesurées. Ces analyses peuvent permettre de mettre en évidence d'importantes différences de niveau d'activité microbienne dans les sols en fonction de différents facteurs : typologie du sol, mode de travail de ce dernier ou bien la composition d'éléments nutritifs ou toxiques. Parmi ces derniers, les sollicitations les plus fréquentes actuellement sont celles qui visent à confronter la mesure de vitalité biologique aux teneurs en cuivre résiduel présent dans le sol.

Globalement afin d'aider dans les observations de vitalité biologique des sols par l'approche ATP, la mesure complémentaire de l'ADN permet de pondérer le niveau d'activité analysé. Nous observons ainsi que dans certains cas où les quantités d'ADN paraissent relativement élevées, les niveaux de vitalité peuvent être faibles ce qui interroge sur les causes et les conséquences de tels prolepses : si les microorganismes sont beaux et bien présents (quantité d'ADN) pourquoi ne sont-ils pas actifs ?

Références bibliographiques

- Anfray, P. 2017. Guide Pratique de la vie des sols. Ed. France Agricole. Paris.
- Karimi, B., Masson, V., Guillard C., Leroy E., Pelligrinelli S., Giboulot E., Maron P.A., Ranjard, L., 2021. La biodiversité des sols est-elle impactée par l'apport de cuivre ou son accumulation dans les sols vignes ? Synthèse des connaissances scientifiques. Etude et gestion des sols, vol. 28 pages 71 à 92.
- Nunes, I., Jacquioud. S., Brejnrod. A., Holm. P.E., Johansen, A., Brandt K.K., 2016. Coping with copper: legacy effect of copper on potential activity of soil bacteria following a century of exposure. FEMS Microbiol. Ecol. 92. Fiw175.
- Pochon, J. et de Barjac H. 1958. Traité de microbiologie des sols, applications agronomiques. Ed. Dunod. Paris.
- Wang, Q.Y., Zhou D.M., Cang, L., 2009. Microbial and enzyme properties of apple orchard soil as affected by long-term application of copper fungicide. Soil Biol. Biochem. 41, 1504-1509.
- Winogradsky, S. 1949. Microbiologie du sol, problèmes et méthodes ; 50 ans de recherche. Ed. Masson. Paris.

Les analyses agronomiques au laboratoire EXCELL

Le laboratoire EXCELL, expert dans les analyses physico-chimiques et microbiologiques de la phase fructifère (raisins) et des processus de vinifications et des vins, propose également des analyses physico-chimiques agronomiques complémentaires des approches microbiologiques abordées dans cet article :

- Analyses des limbes et des pétioles
- Analyses des sarments
- Analyses des sols.

N'hésitez pas à nous contacter pour toutes vos demandes et vos besoins en la matière :
secretariat@labexcell.com