

Méthodologie de préparation de plantes et de leurs sols rhizosphériques pour des analyses biologiques et de pesticides intégrées

Mots-clés : outil scientifique exploitable par BE, plante, sols, analyses biologiques et chimiques, préparation d'échantillons

Type d'outil	Milieus étudiés	Disciplines mobilisées	Destinataires
Méthodologie de préparation d'échantillons de plantes et sols	Sol - plante (racine, rhizome, tige, feuille) dans tous milieux	Ecologie, biologie, biochimie, chimie	Bureaux d'études, gestionnaires, laboratoires

OBJECTIFS

Synthétiser les différentes étapes essentielles, de l'échantillonnage à la préparation des plantes et des sols rhizosphériques, pour des analyses chimiques et biologiques en précisant à chaque étape des points de vigilance, dans le but de :

- réfléchir à la stratégie d'échantillonnage et de prélèvements sur le terrain ;
- stocker les échantillons des plantes et des sols rhizosphériques ;
- préparer les échantillons de sols pour des dosages biologiques et chimiques ;
- préparer les échantillons des plantes pour des dosages biologiques et chimiques.

Dans le cas du suivi de la restauration d'une ancienne zone humide, la préparation des échantillons a permis par exemple de :

- quantifier les phytosanitaires et les caractéristiques physico-chimiques de sols ;
- quantifier les phytosanitaires de plantes ;
- quantifier des métabolites de plantes ;
- quantifier la respirométrie des sols ;
- quantifier les mycorhizes de plantes.

(si besoin, les protocoles de quantification sont disponibles dans le rapport du projet DynaMOT)

L'ESSENTIEL

Une méthodologie de préparation d'échantillons de plantes et de sols rhizosphériques avant analyses pour connaître i) le devenir et l'effet des pesticides dans les compartiments sols-plantes et/ou ii) l'effet de mesures de restauration de site sur les sols-plantes (i.e. un décapage du sol). Il est alors possible de réaliser sur un même échantillon de plante et de son sol rhizosphérique des analyses physico-chimiques, biologiques et de pesticides. Cette méthodologie résume les étapes clés avant analyses, du prélèvement sur le terrain à la préparation des échantillons au laboratoire. Cette méthode pourra être adaptée à tous types de milieux et de problématique impliquant un sol rhizosphérique et la végétation associée.

CONTENU DE L'OUTIL

Protocole détaillé, étape par étape, de la préparation de plantes et sols, du terrain au laboratoire pour de futures analyses.

AVANTAGES	INCONVENIENTS
<ul style="list-style-type: none"> + Permet différentes analyses biologiques et/ou chimiques sur les mêmes échantillons + Permet de réaliser des liens statistiques solides pour l'analyse future des données + Pas besoin de matériel, de compétences spécifiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Méthodologie qui devra être adaptée à la question posée - Besoin de moyens humains pour effectuer rapidement ces préparations

MISE EN ŒUVRE

Temps	Moyens humains	Compétences	Matériel	Coûts
<ul style="list-style-type: none"> - 1 à 3 journées de prélèvements terrain - 2 à 4 semaines pour 2 personnes (mi-temps) pour la préparation des échantillons (selon analyses) 	<ul style="list-style-type: none"> Une équipe (2 à 6 personnes) pour les prélèvements. A minima 2 personnes pour les préparations d'échantillons. 	<ul style="list-style-type: none"> Pas de compétence particulière requise. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de matériel spécifique. - Besoin d'une salle / laboratoire pour la préparation (stockage au frais des échantillons, balance, étuve, réfrigérateurs...) - Possibilité d'externaliser le broyage 	

CONTEXTE

La méthodologie de préparation des échantillons proposée a été développée dans le cadre d'un projet financé par l'agence de l'eau RMC ([DynaMOT](#), Action n° 58). Elle a été conçue pour réaliser des analyses chimiques et biologiques sur un même échantillon de plante et de son sol rhizosphérique associé, prélevé sur le terrain. Ce protocole permet de prendre en compte la variabilité biologique et chimique du terrain et d'optimiser les analyses. Les données analytiques recueillies seront alors solides, comparables et interprétables.

PRINCIPES

1- Stratégie du prélèvements in situ

Pour le programme DynaMOT, 3 exclos ont été créés (130 m²) dans lesquels 4 réplicats de 6 m² de surface ont été délimités par modalité (sol décapé / pas décapé). Pour chaque réplicat, 4 pseudo-réplicats sont constitués avec 6 plantes d'une même espèce et leurs sols rhizosphériques. Ceci permet d'échantillonner de manière homogène la surface correspondant à un réplicat.

Point de vigilance : le nombre de plante (6) peut augmenter si la surface est plus grande ou pour les plantes de petites tailles.

Point de vigilance : le sol rhizosphérique est le sol associé aux racines d'une plante lorsqu'on l'arrache (le sol qui part naturellement lorsqu'on arrache la plante n'est alors pas considéré comme du sol rhizosphérique).

Point de vigilance : pour un suivi sur le moyen terme, on ne retrouve pas forcément les mêmes espèces végétales d'une saison à l'autre. Il est donc nécessaire de prévoir des relevés de végétation sur le terrain avant prélèvements.

Point de vigilance : dans le choix des espèces végétales cibles, prendre en considération les différences de classe entre les Angiospermes monocotylédones et A. dicotylédones est important. En effets, ces deux classes ont des différences métaboliques qui peuvent conduire à des différences de transferts de polluants.

2- Stockage des échantillons prélevés

Les échantillons de plantes et de sols rhizosphériques sont :

- manipulés directement sur le terrain pour le prélèvement de fragments de racines fines pour l'analyse future des mycorhizes ;
- mis directement dans des grands sacs plastiques puis stockés en chambre froide au laboratoire (4 - 6°C).

Point de vigilance : les plantes sont conservées avec leurs sols (pas de séparation) en chambre froide.

3- Séparation des plantes et du sol rhizosphérique

- Les parties aériennes et racinaires des plantes d'un même pseudo-réplicat sont séparées en coupant en haut du collet racinaire.
- Dans un plat inox, les racines sont séparées du sol à la pince et stockées dans des béciers d'eau jusqu'à la fin du tri.
- Les feuilles sont séparées des tiges.
- Les différentes parties des plantes (racines, rhizomes, tiges, feuilles) sont regroupées, déposées sur du papier absorbant et stockées dans du papier aluminium ou des sacs plastiques (qualité PEHD) au congélateur (-15°C).

Point de vigilance : le temps de séparation des racines du sol peut être long. Il restera toujours un peu de racines fines dans le sol restant. On peut séparer les racines des rhizomes, grouper tiges et feuilles selon la problématique.

Point de vigilance : possibilité de compter les plantes (par exemple en comptant les collets) pour avoir des résultats exprimés / une plante.

Point de vigilance : possibilité de déterminer le taux d'humidité (% eau) des échantillons de plantes en pesant MF et ensuite réaliser une MS.

4- Préparation des sols rhizosphériques

- le sol frais dépourvu de racines (200 g) est conditionné dans des sacs plastiques (PEHD polyéthylène haute densité) en chambre froide avant d'être rapidement mis à disposition pour les analyses microbiologiques : respiration microbienne, profils physiologiques des communautés microbiennes.
- le reste du sol prélevé (400 g) est conditionné en barquette d'aluminium pour :
 - déterminer le taux d'humidité du sol : peser 5 - 6 g de sol environ-exactement (barquettes aluminium rondes), le placer à l'étuve à 105°C pendant 3 jours ;
 - tamiser à 2 mm le reste du sol pour les futures analyses ;
 - analyser des produits phytosanitaires : 80 g de sol sont congelés à -15°C ;
 - analyses physicochimiques du sol : séchage du sol à température ambiante (20 à 30°C) pendant 5 à 7 jours sur du papier Kraft-pédologie. Le sol est ensuite conservé en chambre froide pour les analyses physico-chimiques : pH, C, N, P, granulométrie, calcaire, et biologique (glomaline).

Point de vigilance : le sol peut être stocké en chambre froide dans des barquettes d'aluminium fermées en attendant le séchage.

5- Préparation des plantes

- Rinçage des parties aériennes des plantes à l'eau courante qui sont ensuite mis sur du papier absorbant (elles peuvent être dénombrées également à cette étape).
- Séparation des différents organes de la plante : racines, feuilles, tiges et rhizomes.
- Regrouper les organes des plantes entre eux, couper au ciseau si besoin (ex : grandes feuilles ou tiges).
- Congélation (-18°C) dans du papier aluminium.
- Lyophilisation (congélation préalable à -105°C, puis sublimation à 0,1 mbar -55 °C /1mbar/ 30h) - Butchi lyovapor - Un test de masse minimum a été préalablement effectué pour obtenir la durée de lyophilisation réalisé pour obtenir la durée.
- Broyage en une poudre de 5 à 10 µm (Broyeur à billes - Vibro-broyeur MM 400- 25Hz - 2 billes de 20 mm en inox dans des bols de 20 ml).

Les échantillons sont prêts pour les analyses futures de pesticides, protéines, phénols, flavonoïdes des plantes.

Point de vigilance : La MF/MS des plantes peut être déterminé mais faire attention à la taille des plantes (espèce, âge...).

Point de vigilance : au stage plantule, il est difficile de déterminer certaines espèces de plantes, notamment les poacées.



Figure 1 - Illustration de quelques étapes-clés de la méthodologie de préparation des échantillons de plantes et de sols rhizosphériques avant analyses

PERSPECTIVES ET PRECONISATIONS

Cette méthodologie de préparation permet d'anticiper au mieux les besoins de préparation des échantillons de plantes-sols rhizosphériques du terrain au laboratoire. Elle permet de concilier à la fois des futures analyses chimiques et biologiques. Elle est adaptable pour tous types de milieux (naturels, agricoles, industriels).

La stratégie d'échantillonnage est à adopter en fonction de la question posée et des moyens mis en œuvre. Pour le projet DynaMOT, un mois de préparation est nécessaire pour 200 échantillons de sols et 200 échantillons de plantes pour 2 personnes à temps plein.

Cette méthodologie est utilisable et adaptable si vous devez :

- Quantifier des micropolluants organiques (pesticides, HAP, PCB, dioxines...).
- Quantifier les ETMs mais il faudra remplacer certains contenants/récipients (aluminium...) pour éviter les contaminations.
- Réaliser des dosages microbiologiques sur l'état de fonctionnement d'un sol.
- Réaliser des dosages biologiques sur les plantes (molécules de défense, croissance...).
- Diagnostiquer l'effet des pesticides sur le fonctionnement du sol et de la végétation d'un site (lien direct entre la plante et le sol).
- Tester l'effet d'une restauration d'un site sur le fonctionnement du sol et de la végétation.

PERSONNES RESSOURCES

Geneviève CHIAPUSIO

Laboratoire CARRTEL (UMR USMB- INRAE)

genevieve.chiapusio@univ-smb.fr

04 79 75 81 07

Bernard DAVID

Laboratoire EDYTEM (UMR CNRS-USMB)

bernard.david@univ-smb.fr

04 79 75 88 03

DOCUMENT(S) SOURCE

G.Chiapusio, S.Puijalon, P.Binet, S.Criquet et B.David (2022). *Dynamique des transferts et effets des Micropolluants Organiques persistants dans le fonctionnement d'une Tourbière alcaline en restauration*, Projet DynaMOT, Action n° 58 du Programme 2018 au titre de l'accord - cadre Agence de l'Eau ZABR.

AUTEUR(S)

Geneviève CHIAPUSO (Laboratoire CARRTEL), Bernard DAVID (Laboratoire EDYTEM)

STRUCTURE(S) PORTEUSE(S) DU PROJET

Université Savoie Mont Blanc

CNRS

INRAE

Agence de l'eau RMC

SITES ET OBSERVATOIRES DE LA ZABR MOBILISES

Zone Humide sur le site en Chautagne-Savoie (commune de Chindrieux, gestion par le CEN Savoie depuis 2016).

THEMATIQUES ZABR ABORDEES

Flux Polluants, Ecotoxicologie, Ecosystèmes (FPEE)

PROJET

L'élaboration de cette méthodologie s'inscrit dans le cadre du projet [DynaMOT](#) « Dynamique des transferts et effets des Micropolluants Organiques persistants dans le fonctionnement d'une Tourbière alcaline en restauration » (2018-2020), projet financé par l'Agence de l'eau RMC.

BIBLIOGRAPHIE

- Vidéo "Chimie de campagne" : <https://www.youtube.com/watch?v=Cl39xEhckYs>

