

Laboratoire de Zooécologie du Sol, INRA, CEPE/CNRS, Montpellier, France

Une méthode de mesure du débit d'éléments dans un sol non perturbé: azote et carbone des lombriciens (Lumbricidae, Annelida)

M. B. BOUCHÉ

Avec 2 figures

(Accepté: 84-02-26)

1. Introduction

Le Programme Biologique International (P. B. I.) a eu le mérite de focaliser l'attention des biologistes pendant une longue période sur le fonctionnement des écosystèmes. Les diverses disciplines (Botanique, Zoologie, Pédologie, Microbiologie, ...) concourant à l'étude de compartiments, ont assuré une contribution à cette oeuvre commune au plan descriptif des éléments constitutifs des écosystèmes (nombre d'animaux, biomasses végétales, ...). Enfin, un langage commun interdisciplinaire permettait de tendre à une synthèse fonctionnelle focalisée sur les bilans énergétiques des divers composants biologiques de ces écosystèmes.

La Pédozoologie a assuré sa contribution à cette oeuvre comme l'a souligné notamment les thèmes retenus au cours du VIème Colloque de zoologie du sol à Uppsala en 1976 (LOHM & PERSSON 1977) marquant une synthèse du travail réalisé.

Deux critiques toutefois peuvent être adressées aux résultats du P. B. I. Le modèle de chaîne trophique purement biologique, popularisé par ODUM (1959) a été la référence unique de synthèse alors qu'il est fondamentalement insuffisant (BOUCHÉ 1978) particulièrement dans les niveaux où la nécromasse s'accumule (dans les sols) notamment parce qu'il néglige les dégradations extramétaboliques.

Les recherches pédozoologiques ont conduit à des bilans énergétiques extrapolés **de façon incontrôlable**. Il s'agit d'«actes de foi» dans lesquels intervient invariablement l'extrapolation de données physiologiques de laboratoire à des peuplements plus ou moins bien quantifiés et vivant dans des conditions de travail physique et de contraintes de milieu inconnues. Les «corrections» thermiques souvent apportées (usage de Q_{10}) sont elles-mêmes un autre «acte de foi» car on ne connaît pas la température **des animaux**, mais celle **du sol** et l'on ignore souvent (mais pas toujours: Microarthropodes, etc.) la position des animaux dans le gradient thermique variable du sol. Je résumais ces remarques dans l'abstract (BOUCHÉ 1977) par «Presently correct estimates of the rôle of soil animals in nutrient cycling cannot be made both for intellectual and methodological reasons». ... «A really heuristic elaboration of the concept in conjunction with new techniques, satisfactory from an ecological point of view, could lead step by step to a description of animal rôles in ecosystems». Cette critique étant faite il fallait, outre une plus grande rigueur conceptuelle qui reste en partie à élaborer, développer des méthodes de mesure **directe**, et parmi celles-ci, celles ayant trait au métabolisme vrai des vers de terre dans leurs conditions de vie (écométabolisme). La présente communication porte sur ce sujet.

2. Méthode

Fondamentalement la méthode vise à mesurer le débit $\frac{dQ}{dt}$ d'azote à travers les lombriciens en utilisant un isotope (^{15}N) dont on peut suivre l'évolution.

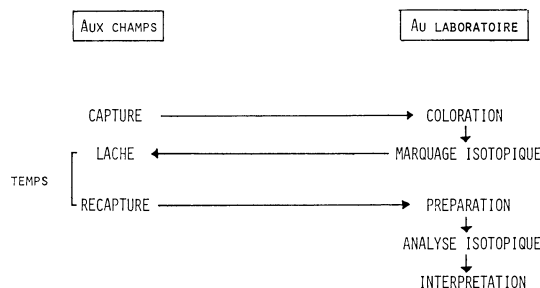


Fig. 1. Succession des différentes techniques mises en oeuvre pour la mesure des débits d'éléments dans le comportement lombricien. Erratum: LÂCHER du lien de LACHE; PRÉPARATION au lieu de PRÉPARATION; INTERPRÉTATION au lieu de INTERPRETATION.

Une population de lombriciens ayant une certaine masse (B) d'azote (N_b) assimile (A) par voie digestive ou cutanée et émane (E) sous forme de tissus élaborés (élaboration El) en cocons, amputats et cadavres et sous forme d'excrétat (Ex).

L'élaboration relève des calculs démographiques tandis que la mesure d'assimilation-excrétion relève de techniques proprement métaboliques. Si l'on considère un lombricien pendant une période donnée, l'azote assimilé (N_a) égale l'azote excrété (N_e) et l'azote accumulé (N_b) ou déstocké ($-N_b$) dans la biomasse ($N_a = N_e + N_b$). Si la biomasse et la composition tissulaire ne varient pas $N_a = N_e$. Nous avons établi que la composition tissulaire et la biomasse varient peu dans le court laps de temps des expériences entreprises et nous nous sommes attachés à mesurer $N_a = N_e$.

Le principe de cette mesure revient à placer dans son milieu normal, naturel, un échantillon de lombriciens marqués de façon homogène d'un isotope et de suivre dans cet échantillon le débit d'émanation de l'azote. Le travail comporte ces étapes suivantes (fig. 1): (1) Capture de l'échantillon au terrain; (2) Coloration des individus au laboratoire; (3) Marquage isotopique; (4) Relâché au terrain; (5) Recapture/mort immédiate; (6) Analyse isotopique; (7) Interprétation.

Chaque étape de ce travail soulève des problèmes spécifiques et a fait l'objet de travaux de divers chercheurs apportant ainsi une contribution à l'ensemble. J'ai dû remanier cette procédure au fur et à mesure de l'élaboration des diverses étapes et je présente aujourd'hui une procédure fonctionnelle de façon critique car elle n'est ni « parfaite » ni « achevée ».

Les symboles utilisés pour les unités de temps seront jour = d (**dies**) et année = an (**annus**), et pour les unités de masse (m) avec le tube digestif plein (mp) ou vide (mv), humide (mph ou mvh), sèche (mvs ou mvf), ou après fixation au formol (mpf ou mvf).

3. Capture

En principe celle-ci ne pose pas de difficultés intrinsèques. Les méthodes au formol (avec lavage immédiat) ou à la bêche-tri manuel (qui blesse certains individus) conviennent bien (BOUCHÉ, 1969). Ces méthodes perturbantes interdisent toutefois une réintroduction des animaux dans leur lieu d'origine, ce qui pose un problème d'« effet de surpopulation » et peut-être accroît le stress de réintroduction (voir 6. Relâché). Il faut se procurer en pratique 40 à 50 vers de la catégorie étudiée (en fait 6 ou 7 vers pour chaque date des futures recaptures, en admettant que seulement 5 seront relâchés: FERRIÈRE & BOUCHÉ, en prép.).

4. Coloration des individus

La première coloration a été réalisée au laboratoire avec le vert menthe E par URSULA MEINHART (1976). MAZAUD (1979) a repris et diversifié cette méthode en la rendant plus fiable et efficace et l'a étendue à des colorants rouges (MAZAUD & BOUCHÉ 1980), particulièrement la coccine.

La procédure la plus efficace est avec anesthésie. Nous pratiquons celle proposée par SAUSSEY (1966) modifiée.

(1) Anesthésie: les lombriciens sont placés dans de l'eau du robinet avec un petit sac de tissu contenant de l'acétone-chloroforme qui diffuse lentement dans l'eau. Les lombriciens sont retirés dès que leurs mouvements deviennent très faibles.

(2) Dessiccation à l'air: sur un grillage ou papier filtre (environ 5') jusqu'à un flétrissement avancé de l'animal.

(3) Trempage dans la solution colorante pendant 3' 30 à 2':

- vert: 10% de vert menthe E 1)
- rouge: 10% de coccine. 1)

¹⁾ Fournisseurs: Vert menthe E: DRAGOCO Sarl, 13 rue Madeleine Michelis, F - 92522 NEUILLY SUR SEINE (France). Coccine: A. ISNARD, Matières premières aromatiques, 36 rue Jules Massenet, F - 94300 VINCENNES (France).

(4) Ressuyage-dessiccation: sur un grillage plastique, 10' environ jusqu'à un flétrissement avancé des individus.

(5) Remise dans un sol frais (10—15 °C) où l'animal se réhydrate et se réveille.

(6) Contrôle d'activité deux ou trois jours après.

MAZAUD (1979) a montré que les colorants ont une pénétration transcutanée, probablement forcée par les deux flux successifs (3 et 5) d'eau de réhydratation; après une diffusion intramusculaire pariétale de quelques heures à une journée le colorant est accumulé dans les chloragocytes péri-intestinaux et du typhlosolis. Cette coloration péri-intestinale s'observe aisément, même avec le choix de couleurs proches des pigmentations naturelles, car les teintes de la coccine et du vert menthe E sont caractéristiques; cette coloration se maintient plus d'un an.

5. Marquage isotopique

L'objectif est d'effectuer un marquage homogène avec un isotope servant de marqueur pour suivre le débit d'un élément tel ^{14}C , ^{15}N , ... Il faut d'abord élaborer un aliment végétal marqué. Pour des raisons de commodité et de standardisation nous avons retenu une algue, présente dans la prairie d'origine des animaux étudiés (BOURELLI *et al.*, en prép.) et classiquement cultivée pour la production de molécules marquées: *Synechococcus cedrorum* SAUVAGEAU, Cyanophyceae, Chroococcales (KRATZ 1967; TOVEY *et al.* 1974). Le milieu de culture, assez complexe, comprend les éléments suivants: Na, K, P, N, Mg, Ca, Fe, Cl, S, Zn, Mn, Mo, Cu, Co et accessoirement C, O. Il est donc possible d'incorporer dans les algues puis dans les lombriciens ces éléments. Pour le carbone, l'introduction se fait par un contrôle gazeux de l'atmosphère et apport de $^{14}\text{CO}_2$.

De premières expériences, en partant de cocons, pour obtenir des animaux homogènes, ont montré que les animaux renouvelaient pratiquement la totalité de leur carbone et azote en conditions contrôlées en 40 jours. Un élevage de 50 à 60 jours effectué dans ces conditions permet donc d'obtenir une substitution quasi totale du carbone ou/et de l'azote.

Les animaux sont placés à 15 °C dans le sol d'origine (en choisissant les horizons pauvres en matière organique et si nécessaire en éliminant le carbone par traitement à l'eau oxygénée). Ils sont alimentés par apport d'environ 112 mg *ms* d'algue/g *mvh* de lombriciens/semaine (*ms* = masse de matière sèche, *mvh* = masse humide vil).

Aucun essai avec un sol synthétique sans matière organique, l'artisol (FERRIÈRE *et al.* (1981) n'a été effectué jusqu'à présent, mais il est probable que ce procédé devrait être adopté pour éviter tout apport, hors les algues, dans l'alimentation.

6. Relâché

Les animaux sont emmenés au terrain où ils sont séparés en lots de 5 à 6 individus et pesés. Au terrain, un lot est sacrifié au temps 0 (celui du lâché) et chaque lot est libéré autour d'un piquet. On peut limiter les migrations horizontales par un anneau vertical en métal ou matériau plastique, mais en général les migrations sont très réduites comme nous l'avons montré (MAZAUD & BOUCHÉ 1980). Ce relâché se fait en «surpopulation» ce qui a un effet perturbateur démontré (MAZAUD & BOUCHÉ 1980). L'idéal serait de faire une capture sans perturbations du milieu et de relâcher les animaux au point de capture: nous n'avons pas encore élaboré une telle méthode. En attendant, nous limitons à 4—6 individus le nombre d'animaux en surnombre. Au moment du lâché, on protège les animaux des oiseaux et prédateurs par des filets ou une surveillance.

7. Recapture

La recapture se fait par une méthode qui peut être perturbante (formol, bêche, ...) car elle coïncide avec l'arrêt d'expérience au point de lâché. Chaque point de lâché est ainsi prélevé pour une date donnée (les temps de recapture sont du type 0, 2, 4, 8, 15, 30, 45 jours). On cherche à reprendre le maximum d'animaux colorés (y compris douteux); plus des $\frac{3}{4}$ des animaux sont normalement retrouvés (FERRIÈRE & BOUCHÉ, en prép.).

Afin d'avoir «un instantané» de la composition corporelle des animaux, tous les animaux (y compris ceux non lâchés du temps 0) sont sacrifiés par trempage dans l'eau chaude (60 à 80 °C) pendant quelques instants puis **rapidement** pesés, disséqués et séchés à l'air chaud (50 °C) puis pesés à nouveau.

8. Analyse isotopique

Celle-ci varie évidemment avec les éléments et n'est pas propre à la méthode de mesure de débit. Pour l'azote, nous avons utilisé la minéralisation au Kjeldahl, récupération du NH_4 en solution puis évaporation, solidification de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, oxydation du NH_4^+ en N_2 par hypobromate de sodium selon ROSS & MARTIN (1970), introduction dans un spectromètre de masse AFI MS 20 à double intro-

duction, l'une pour le gaz étudié, l'autre pour un gaz standard à 0,3651 % de ^{15}N . Les résultats sont donnés en

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{15\text{N}/14\text{N \textit{échantillon}} - 15\text{N}/14\text{N \textit{standard}}}{15\text{N}/14\text{N \textit{standard}}} \times 1000$$

Une telle méthode permet d'obtenir des mesures très précises jusqu'à une dilution dont les écarts dépendent des tris isotopiques effectués par les organismes. DOMENACH & CHALAMET (1977) montrent ainsi des variations naturelles du $\delta^{15}\text{N}$ de $-19,1$ à $+54,5$ suivant les formes de l'azote fractionné par *Nitrosomonas europaea* (0,3581 à 0,3850). En utilisant des lombriciens marqués avec de l'azote ^{15}N , par enrichissement à 10 %, on peut donc retrouver des dilutions jusqu'à 1 % et même en dessous sans risque d'erreurs.

On peut également utiliser de l'azote appauvri (à 0,001 %).

9. Interprétation

L'interprétation des résultats s'est appuyée jusqu'à présent sur des essais préliminaires ^{14}C et ^{15}N avec relâché en boîte d'élevage (avec sol de prairie perturbé par la mise en boîte) et température constante (15 °C). La méthode de coloration n'était pas encore parfaitement maîtrisée lors de ces essais préliminaires. Nous ignorions également la rapidité de renouvellement des tissus lombriciens — mise en évidence lors de ces essais — de sorte que les animaux avaient été élevés en présence d'algues marquées depuis leur éclosion jusqu'au « lâché » en boîte N ou C naturels.

Nos expériences ont été pratiquées sur des adultes de *Nicodrilus longus longus* (UDE, 1885) originaire de Cîteaux, Côte d'Or, P. 343 in BOUCHÉ, 1972. Ces animaux ayant atteint leur « plateau » de croissance n'ont pas présenté de variations notables de biomasse de sorte qu'aucune correction n'est nécessaire; en conséquence, l'azote assimilé se substitue à l'azote émané ($N_a = N_e$).

L'interprétation des résultats implique d'abord de bien garder à l'esprit la nature des phénomènes en cause. L'azote émané peut provenir de fractions très différentes:

- métabolites qui viennent juste d'être assimilés et sont très rapidement dégradés en fournissant leur énergie chimique au métabolisme général en CO_2 , NH_4 , urée, etc. ...
- métabolites qui après assimilation sont réorganisés selon des structures codées, comme des protéines et excrétés sous cette forme (type enzyme du tube digestif),
- métabolites qui après réorganisation selon des structures codées sont incorporés dans des tissus relativement labiles (types muscles ou relativement stables (type chitines des soies).

Il y a entre ces diverses catégories une multitude d'intermédiaires et des échanges et ces fractions ne sont énoncées que pour montrer que la première d'entre elles peut avoir une « durée de vie » très courte et sa quantité instantanée (q) va être renouvelée de très nombreuses fois pendant la durée de l'expérience: la quantité totale Q transitant par cette fraction très labile est considérable même si q est petite (c'est un fort débit). Le raisonnement inverse s'applique évidemment aux fractions les plus stables.

La demi-vie biologique de l'azote ne nous donne pas une mesure du débit mais seulement une indication du départ de l'azote initial. La première moitié de l'azote initial a un taux de renouvellement beaucoup plus grand que la seconde.

En fait, nous avons besoin de la lecture en « instantané » de l'azote excrété lorsque toutes les fractions sont marquées de façon homogène, c'est-à-dire au temps 0 ... La vitesse du débit est donc la dérivée de la courbe au temps 0. La courbe reflète par ailleurs dans sa forme générale les contraintes de ces échanges dans les conditions normales de vie.

Les premiers résultats, obtenus en laboratoire à partir d'animaux élevés avec des algues ^{15}N dès l'éclosion, ont montré un renouvellement quasi total élevé tant au ^{14}C qu'au ^{15}N . La figure 2 illustre la perte de ^{15}N initial en milieu sans ^{15}N .

Les valeurs expérimentales ont fait l'objet d'un important travail d'ajustement mathématique auquel ont contribué divers chercheurs (voir remerciements). C'est en définitive un programme écrit par F. SORRENTINO, d'après la méthode de MELDER-MEAD, qui a permis par itération d'obtenir un ajustement quasi parfait des données expérimentales au modèle mathématique proposé. C'est enfin (après avoir notamment essayé un ajustement à 1, 2, 3 termes exponentiels) la forme à 2 termes

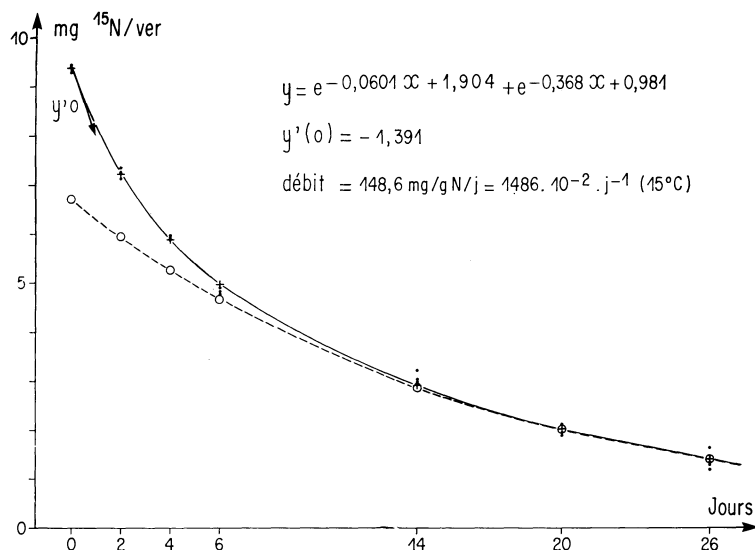


Fig. 2. La diminution de l'azote 15 initiale des lombriciens placés dans un milieu d'azote naturel (trait plein) permet le calcul du débit grâce à la dérivée y'_0 de la courbe $y = f(x)$ (point = valeur observée, + = valeur calculée). La fraction de N^{15} du comportement stable (dessous les tirets) reste seule présente après 15 jours, le comportement labile (dessus les tirets) ayant renouvelé tout son azote.

exponentiels qui a donné l'erreur moyenne la plus faible (erreur de 0,0456 sur des valeurs de y allant de 9,367 à 1,334). L'erreur maximale observée sur un point est de 2,9%.

$$y = (e^{-0,0601x} + 1,904) + (e^{-0,368x} + 0,981)$$

$$y'_0 = -1,391$$

Un tel résultat permet de constater: (1) le phénomène de perte d'une substance initiale répond à une loi exponentielle, le métabolisme étant lié à des réactions enzymatiques (dont la cinétique est traduite par des équations exponentielles); (2) l'ajustement optimal — et quasi parfait — obtenu avec deux termes exponentiels, témoigne d'une physiologie de l'azote (et du carbone car les mêmes conclusions ont été établies pour le ^{14}C) liée à deux régulations, ou groupes de régulations. Il y a deux «compartiments» physiologiques observables, un compartiment à flux métabolique rapide ($y'_0 = -0,9827$) et un compartiment à renouvellement plus lent ($y'_0 = -0,4083$). Nous reviendrons sur l'interprétation de ces deux «compartiments»; (3) un animal capturé au champ renouvelle dans ces conditions de laboratoire quasi totalement son azote en 30 jours, et peut donc être relâché après un tel marquage pour étude. Le compartiment le plus labile s'épuise en 15 jours, il représente 28% de l'azote initial mais 71% du débit (Tableau 1); (4) ce sont les premiers points de la courbe (et donc les conditions naturelles climatiques du moment) qui déterminent sa forme. Les conditions endogées étant relativement tamponnées, il est possible de lire sur une période de quelques jours dans la nature, un flux après relâché des animaux, et ajustage sur une équation exponentielle; (5) la dérivée de la courbe, appliquée à l'origine (lorsque toutes les fractions d'azote constitutives de l'animal sont également marquées) permet de calculer le débit d'azote émané, N_e , donc assimilé $N_a = N_e$. Dans notre exemple, la dérivée $y'_0 = -1,391$ sur des animaux ayant 9,36 mg d' N^{15} en moyenne donne:

$$0,1485 \text{ mg/mg d'azote corporel/jour}$$

pour des animaux de 2,0 g de tissus frais (à 85% d'eau et 10% d'azote par rapport à la masse sèche = 30 mg d'azote constitutif). Cela représente un débit relatif de 4,454 mg dans les conditions de l'expérience. J'appellerai débit relatif la quantité d'élément étudié transitant journalièrement dans le métabolisme (assimilation = émanation) rapportée à la quantité d'élément incorporée dans l'organisme, $d_r = 0,1485 \times d^{-1}$ dans notre exemple.

10. Discussion

10.0 Remarques générales

Les recherches entreprises depuis plusieurs années pour établir une méthode de mesure écométabolique applicable aux lombriciens aboutissent au plan méthodologique et ouvrent des perspectives de mesure in situ importantes:

- mesure directe du débit ^{15}N ,
- comparaison des courbes exponentielles naturelles en fonction des variables climatiques par rapport à des courbes de référence obtenues en conditions contrôlées,
- possibilité d'injecter dans le sol sans perturbations un compartiment bien délimité chargé en isotope et de «suivre» la dilution de cet isotope dans les autres compartiments (relations lombriciens-fractions organiques, lombriciens-micro-organismes, lombriciens-plantes, etc.).

Chaque étape du travail a été effectivement pratiquée isolément avec des moyens précaires essentiellement basés sur la bonne volonté de chercheurs stagiaires (voir remerciements). La manipulation est actuellement effectuée au terrain (travaux de G. FERRIÈRE).

Des progrès sont en cours pour essayer d'effectuer des captures sans perturbations et permettre ainsi des relâchés au même point.

En parallèle à ces progrès techniques, acquis ou en élaboration, la signification écologique des connaissances nouvellement acquises doit être dégagée.

10.1. Estimation des débits d'azote

SATCHELL (1963) en se fondant sur les travaux de NEEDHAM (1957) et en corrigeant pour la température par la courbe de KROGH obtient 27,2 kg d'excrétion d'azote par tonne de biomasse par hectare et par an, en confondant en fait l'excrétion corporelle et celle des fécès pas nécessairement d'origine lombricienne.

Les données obtenues ici par FERRIÈRE à partir de l'azote incorporé et à 15 °C peuvent être extrapolées directement en s'appuyant sur l'indice de mobilité (*Mib*) intégrant les variations d'activité motrice de l'espèce au cours de l'année. Nous n'avons pas utilisé ici l'indice *Iabr*, mieux adapté, en raison de l'indisponibilité de données sur certaines biomasses au moment des calculs et sur le fait que les biomasses de *N. longus* adultes varient peu de sorte que *Mib* reflète *Iabr* assez fidèlement pour les approximations actuelles (pour ces indices voir BOUCHÉ *et al.* 1983 b). L'indice *Mib* moyen annuel donne un équivalent thermique de 4,2 °C lorsque en hiver ce facteur est pratiquement le seul facteur limitant l'activité. Le débit relatif de $0,1485/d/15$ °C devient par correction thermique, basée sur un Q_{10} de 2: $0,070/d/4,2$ °C ($d = d_0 \times 2 \cdot \frac{t-t_0}{10}$). Pour une tonne de biomasse fraîche (*mvh*) en moyenne annuelle de 1,5% d'azote nous avons: $0,070 \times 365 \times 15 \text{ kg N} = 383 \text{ kg N an}^{-1}$. Comme nous l'avons vu cette approximation de l'excrétion ne représente pas le débit émané de la population car il faudrait rajouter les émanations de tissus élaborés (cadavres, cocons morts ou enveloppes, amputats) encore inconnues. La spéculation de SATCHELL entre autres permet de situer cette élaboration à environ $60 \text{ kg N an}^{-1} \text{ t}^{-1}$ de biomasse (*mvh*). C'est donc environ $440 \text{ kg d'N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ qu'une tonne de lombriciens recyclerait *via* son métabolisme, soit plus de 4 fois l'estimation de SATCHELL.

Ces différences s'expliquent assurément par les données très artificielles (hygrométrie, température, motricité animale) de NEEDHAM (1957), l'étude portant sur une espèce différente (mais les différences possibles sont loin de cet ordre de grandeur). Nous-mêmes n'avons pas effectué des estimations réellement directes, mais le nombre d'hypothèses introduites ici est beaucoup plus bas que dans le calcul de SATCHELL, car nous mesurons effectivement l'excrétion et observons directement un indice d'activité. Les hypothèses résident dans le fait d'admettre que:

- les conditions du sol «naturel» au laboratoire sont l'équivalent du terrain,
- la température au terrain à — 10 cm est celle des lombriciens (ce qui est inexact: BOUCHÉ, 1983),

- la correction de Q_{10} est adéquate,
- l'indice M_i reflète l'activité métabolique globale.

Notons enfin que BOUCHÉ *et al.* (1983) arrivent à estimer, avec un nombre réduit d'hypothèses, et de façon purement écologique (aucune manipulation du milieu et étude des animaux *in situ*), le débit d'azote dans le tube digestif à $2,86 \text{ mg N d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ B mvh}$ (B mvh = biomasse fraîche d'animaux au tube digestif vide) et la part d'azote qui ne se retrouve pas dans les fécès à $0,47 \text{ mg N d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ B mvh}$ pour *Nicodrilus velox* [BOUCHÉ 1967] espèce voisine écologiquement et phylétiquement de *N. longus longus*. Lors de cette mesure écologique *in situ* en forêt de hêtre (*Fagus silvatica*) la température du sol à -10 cm était en moyenne de 10°C . En admettant cette température comme étant celle des animaux et en extrapolant les résultats obtenus avec *N. longus* (15°C) à *N. velox* (10°C), le débit d'assimilation-émanation est, à biomasse constante ($N_e = N_a$) pour un Q_{10} de 2, de $1,58 \text{ mg N d}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ B mvh}$ ($1 \text{ g mvh} = 15 \text{ mg d'azote}$). Rappelons que les lombriciens réexcrètent une part importante de leur azote émané via le tube digestif; l'azote «disparu» ($0,47$) au cours du transit ne peut être que la fraction réexcrétée de façon cutanée ou gazeuse au cours du transit intestinal. Notre objet n'est pas ici de faire un calcul trop précis sur les parts d'excrétion intestinale et cutanée de *N. velox* par extrapolation de données obtenues sur *N. longus*, mais de souligner la cohérence des ordres de grandeur obtenus dans ces débits d'azote (débit buccal: $2,86$; débit assimilation: $1,58$; débit émanation cutanée: $0,47$; débit émanation intestinale: $1,10$; débit déjection: $2,39$).

10.2. Débit d'azote et de carbone

Nous avons pu également mesurer le débit relatif de carbone incorporé dans les mêmes conditions que ci-dessus (^{14}C) ($0,1376 \text{ mg C/mg C corporel/d}$), valeur très proche du débit d'azote relatif. Le C/N des débits ($4,4$) est comparable à celui observé sur la biomasse de lombriciens (de l'ordre de $4,8$: BOUCHÉ 1967). Ce débit d'émanation observé reflète assez fidèlement la composition des lombriciens et est très différent de celui beaucoup plus élevé que l'on peut déduire (difficilement, il est vrai) du bilan de la digestion intestinale (excrétion intestinale observée directement au terrain sur *Nicodrilus velox*, BOUCHÉ *et al.* 1983). Cela peut indiquer une insuffisance de la méthodologie au temps $t = 0$ (perte plus rapide du carbone dans les fractions les plus labiles) mais surtout qu'en aucun cas, les bilans de la digestion ne doivent être confondus avec ceux du métabolisme intrinsèque. D'autres causes, comme la nourriture en conditions expérimentales, peuvent être également évoquées, ou encore le recyclage interne au tube digestif de l'azote excrété antérieurement. En utilisant les mêmes moyens d'extrapolation que pour l'azote, le carbone traversant une tonne de biomasse fraîche par an serait de l'ordre (cadavres compris) de $1835 \text{ kg C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$, ordre de grandeur probable.

Signalons enfin un certain nombre de faits indirects, allant dans le même sens que nos résultats:

- production très probable d'un abondant mucus riche en N et C (mucoprotéines),
- nécessité vitale de protection mécanique et microbiologique tant **cutanée qu'intestinale**, par le mucus,
- production **cutanée** de mucus probablement révélée par l'abondance des germes protéolytiques dans les parois des galeries des *Nicodrilus* anéciques de Cîteaux (*N. longus* + *N. nocturnus*) (LOQUET *et al.* 1977),
- importante production d'«hydrosolubles» intestinaux chez *Pontoscolex corethrurus* assimilable à des mucus (LAVELLE, comm. pers.).

10.3. Compartiments physiologiques

Nous avons vu que le débit d'azote a été observé par une courbe de perte de ^{15}N ajustable à une loi exponentielle en deux termes (1 et 3 termes donnant des ajustements moins bons): il en est de même du carbone avec usage de ^{14}C :

$$y = (e^{-0,201x} + 2,979) + (e^{-0,059x} + 2,702)$$

Tableau 1. Importance relative des deux compartiments «labile» et «stable» dans la constitution et l'émanation de carbone et d'azote de *Nicodrilus longus* à 15 °C

	Compartiment		Emanation	
	Proportion (%)	mg	Débit relatif mg/mg/d	Débit mg/g mvh/d
Total				
C	100	72	0,1376	9,907
N	100	15	0,1485	2,227
C/N		(4,8)		(4,45)
Compartiment «Labile»				
C	57,06	41,08	0,2009	8,253
N	28,47	4,27	0,3685	1,574
C/N		(9,62)		(5,24)
Compartiment «Stable»				
C	43,25	31,14	0,0491	1,529
N	71,66	10,75	0,0608	0,654
C/N		(2,90)		(2,33)

1 g mh = 150 mg mvs = 15 mg N (10 %) = 72 mg C (48 %)

Cette existence d'une loi en deux termes exponentiels, tant du carbone que d'azote, a conduit à rechercher les propriétés des «compartiments» régulant l'excrétion. Les résultats sont présentés au Tableau 1, pour 1 gramme masse «vide fraîche» (humide) (g mvh) à 15 °C. On observe d'une façon générale un débit d'azote rapide, en concordance avec le recyclage intra-intestinal fort probable déjà observé *in situ* (BOUCHÉ *et al.* 1983), fait renforcé par le fait qu'il s'agit surtout de l'azote du compartiment «labile». Le compartiment stable «économise» relativement son azote; son C/N suggère que sa composition est surtout formée de protéines et que les acides aminés à C/N bas, telle la lysine, seraient particulièrement recyclés (peu excrétés) par rapport aux acides aminés de chaîne longue ou aromatiques. Le rapport C/N des acides aminés constitutifs de *N. longus*, déduit du travail de Chaudonneret (BOUCHÉ 1982) est de 3,96, à comparer à celui du compartiment stable (2,9).

Ces compartiments «labiles» et «stables» recouvrent évidemment de multiples phénomènes physiologiques et ne peuvent être identifiés avec précision à des organes ou fonctions.

II. Conclusion

La méthode écophysiological de mesure des débits d'azote ou de carbone dans le sol se prêle en fait à la mesure des débits de nombreux autres éléments chimiques ayant des isotopes mesurables. Les premiers essais avec ¹⁵N (et ¹⁴C) conduisent à des résultats cohérents entre eux permettant de conclure à un débit métabolique de C/N bas indiquant que ce sont les fractions à bas C/N qui sont effectivement assimilées (micro-organismes, ...) ce qui ne préjuge pas des phénomènes extramétaboliques de la lumière intestinale. Malgré leur caractère provisoire, les nouvelles données se sont avérées cohérentes avec les seules données écophysiological fondées que nous ayons sur le cycle de l'azote au niveau lombricien (BOUCHÉ *et al.* 1983). Enfin, ces observations recourent celles faites directement au terrain par DIETZ (DIETZ & BOTTNER 1981). Cet ensemble de faits souligne l'étroite synergie lombriciens/microorganismes dans les zones bioactives du sol. Les modèles classiques ne distinguant pas les dégradations extramétaboliques de celles des organismes eux-mêmes (BOUCHÉ 1978) s'avèrent aussi inadaptés que les extrapolations para-écologiques (BOUCHÉ 1977). Dans les zones d'activité biologique intense du sol, l'azote est minéralisé et réorganisé plusieurs fois et les débits observés au niveau lombriciens n'aboutissent pas nécessairement aux végétaux, pas plus qu'ils ne se développent exclusivement à partir de ceux-ci.

La thèse, fréquemment soutenue (KITCHELL *et al.* 1979) d'une dégradation biochimique quasi exclusivement microbienne, s'effondre lorsque les mesures fonctionnelles ne sont plus déduites de mesures indirectes et d'extrapolation invérifiable qui furent très tôt les seules disponibles (RAW 1961). Il est encore trop tôt pour une conclusion définitive mais il semble que l'importance métabolique des organismes de la décomposition soit assez proportionnelle à leur biomasse protéique (on ne considère pas ici les autres rôles importants de translocation, régulation, stimulation biologique, ...).

12. Résumé

Les données relatives au cycle des éléments, tel l'azote ou le carbone, sont extrapolées au champ ou aux écosystèmes sans possibilité de contrôle; c'est-à-dire hors du champ scientifique (para-écologie). Une nouvelle méthode par incorporation naturelle d'un compartiment lombricien, co-marqué par isotopes (^{15}N , ^{14}C , ...) et par coloration dans un sol non perturbé, permet de suivre les débits des éléments *in situ*. Les premiers résultats obtenus lors de la mise au point du procédé dans des conditions encore partiellement artificielles, se recourent avec des données d'observation directe. Le débit observé ($2,2 \text{ mg N g}^{-1} \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$ à 15°C) est beaucoup plus élevé que celui estimé para-écologiquement et montre que les animaux jouent un rôle métabolique direct important dans le cycle de l'azote et du carbone.

13. Remerciements

Ces recherches ont été réalisées pour la plupart dans des conditions de grande précarité par des étudiants stagiaires (D. MAZAUD, G. FERRIÈRE, D. RANC, S. DIETZ) qui ont beaucoup apporté au travail.

L'ajustement mathématique précis des données expérimentales à une équation correcte a été rendu possible grâce aux contributions de G. FRANCLHON, J.-C. HEIDET, F. SORRENTINO et P. SOTO. Des facilités matérielles et des discussions fructueuses avec J. P. TROY, R. BARDIN, P. BOTTNER et D. E. REICHLÉ ont beaucoup contribué au murissement et à l'élaboration de cette méthodologie générale.

Je tiens à exprimer à tous ma gratitude.

Ces travaux ont bénéficié des aides DGRST (contrat 77-7-1864) et de la collaboration de la RCP 08-475, CNRS.

14. Références

- BOUCHÉ, M. B., 1967. Etablissement et comparaison de diverses bioquantités pour trois espèces de Lumbricidae. In: O. GRAFF & J. E. SATCHELL (eds.), *Trav. Rec. Biol. Sol*, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 595—600.
- 1969. Comparaison critique des méthodes d'évaluation des populations des Lombricidés. *Pedobiologia* **9**, 1/2, 26—34.
- 1972. Lombriciens de France. Ecologie et systématique. *Ann. Zool.-Écol. anim.*, Éd. INRA Versailles, n° HS 72-2, 1—671.
- 1977. Écologie et paraécologie: peut-on estimer la contribution de la faune du sol aux cycles des éléments biogènes? In: U. LOHM & T. PERSSON (eds.), *Soil organisms as components of ecosystems. Proc. 6th Int. coll. soil zool., Ecol. bull.* (Stockholm) **25**, 157—163.
- 1978. Discussion d'écologie. III. Transferts d'énergie entre maillons trophiques. *Bull. écol.* **9**, 4, 289—299.
- 1982. Les lombriciens et le traitement des déchets, *IULA Nouvelles*, **3**, 9, 1—2.
- 1983. Ecophysiologie des lombriciens: acquis récents et perspectives. In: PH. LEBRUN *et al.* (eds.), *New Trends in Soil Biology. C. R. VIIIème Coll. Int. Zool. Sol*, Louvain-la-Neuve, Belgique, 30-août-2 sept., 1982, 321—333.
- Z. RAFIDISON & F. TOUTAIN, 1983. Etude de l'alimentation et du brassage pédo-intestinal du lombricien *Nicodrilus velox* (Annelida, Lumbricida) par l'analyse élémentaire. *Rev. écol. biol. sol* **20**, 1, 49—75.
- BOURELLI, P., G. FERRIÈRE & S. JAY, en prép. Note sur les algues édaphiques de la prairie permanente de Cîteaux.
- DIETZ, S., & P. BOTTNER, 1981. Etude par auto-radiographie de l'enfouissement d'une litière marquée au ^{14}C en milieu herbacé. In: «Migrations organominérales dans les sols tempérés». *Coll. int. CNRS n° 303*, CNRS, Paris, 125—132.
- DOMENACH, A. M., & A. CHALAMET, 1977. Rapports isotopiques naturels de l'azote. I. Premiers résultats: sols des Dombes. *Rev. écol. biol. sol* **14**, 2, 279—287.
- FERRIÈRE, G., L. FAYOLLE & M. B. BOUCHÉ, 1981. Un nouvel outil essentiel pour l'écophysiologie et l'écotoxicologie, l'élevage des lombriciens en sol artificiel. *Pedobiologia* **22**, 3, 196—201.
- & M. B. BOUCHÉ, en prép. Fonctions des lombriciens X. Premières mesures pédozoologiques d'un débit d'éléments. Cas de l'azote de *Nicodrilus longus* (UDE) en prairie permanente.

- KITCHELL, J. F., R. V. O'NEIL, D. WEBB, G. W. GALLEPP, S. M. BARTELL, J. F. KOONCE & B. S. AUSMUS, 1979. Consumer regulation of nutrient cycling. *Bioscience* **29**, 1, 28—34.
- KRATZ, W. A., 1967. Photosynthesis and respiration of free blue green algae. *Plant. Physiol.* **42**, 275—280.
- LOHM, U., & T. PERSSON (eds.), 1977. Soil organisms as components of ecosystems. Proc. 6th Int. coll. soil zool., *Ecol. Bull.* (Stockholm), **75**, 1—614.
- LOQUET, M., M. B. BOUCHÉ, T. BHATNAGAR & J. ROUELLE, 1977. Essai d'estimation de l'influence écologique des lombriciens sur les micro-organismes. *Pedobiologia* **17**, 6, 400—417.
- MAZAUD, D. 1979. Evaluation de méthodes de marquage permettant le repérage des lombriciens au terrain; premières applications. Thèse docteur-ingénieur, sciences agronomiques, I. N. A. Paris-Grignon, Paris, 1—178 + annexes, 1—80.
- & M. B. BOUCHÉ, 1980. Introduction en surpopulation et migrations de lombriciens marqués [Overpopulated introductions and migrations of labelled earthworms]. In: D. L. DINDAL, Soil biology as related to land use practices, C. R. VIIème Coll. int. zool. sol, Syracuse, N. Y. Ed. EPA, Washington, EPA-560/13-80-038, 687—701.
- MEINHARDT, U., 1976. Dauerhafte Markierung von Regenwürmern durch ihre Lebendfärbung. *Nachr. Deutsch. Pflanzenschutzd.* **28**, 6, 84—86.
- NEEDHAM, A. E., 1957. Components of nitrogenous excreta in the earthworm *Lumbricus terrestris* L. and *Eisenia foetida* (SAVIGNY). *J. exp. biol.* **34**, 425—446.
- ODUM, E. P., 1959. Fundamentals of ecology (2th edition). Ed. Saunders, Philadelphia, 1—546.
- RAW, F., 1961. The agricultural importance of soil meso-fauna. *Soil and Fertility* **24**, 1—2.
- ROSS, P. J., & A. E. MARTIN, 1970. Rapid procedure for preparing gas samples for ¹⁵N determination. *Analyst* **95**, 817—822.
- SATCHELL, J. E., 1963. Nitrogen turnover by woodland population of *Lumbricus terrestris*. In: J. DOEKSEN & J. VAN DER DRIFT (eds.), Soil organisms. North Holland Publish., Amsterdam, 60—66.
- SUSSEY, M., 1966. Contribution à l'étude des phénomènes de diapause et de régénération caudale chez *Allolobophora icterica* (SAVIGNY) (Oligochète, Lombricien). *Mém. sol. linn. Normandie*, nouv. sér., sect. zool., **3**, mémoire n° 1, 1—158.
- TOVEY, K. C., et al., 1974. A new method of the preparation of uniformly ¹⁴C labelled compound by using *Anacystis nidulans*. *Biochemistry J.* **142**, 47—56.

Adresse de l'auteur: M. B. BOUCHÉ, Laboratoire de zoécologie du sol INRA, CEPE/CNRS, Route de Mende, B. P. 5051, F - 34033 Montpellier, France.

Synopsis: *Original scientific paper*

BOUCHÉ, M. B., 1984. Une méthode de mesure de débit d'éléments dans un sol non perturbé: azote et carbone des lombriciens (Lumbricidae, Annelida). [A method for measuring element fluxes in an undisturbed soil: nitrogen and carbon from earthworms]. *Pedobiologia* **27**, 197—206.

Data on chemical cycles, as nitrogen or carbon cycles, are extrapolated to the fields or ecosystems without the possibility for checking conclusions: i.e. from scientific knowledge (non-falsifiable: para-ecology). A new method, by natural introduction of an earthworm compartment into an undisturbed soil, with earthworms labelled both by isotopes (¹⁵N, ¹⁴C, ...) and by staining is described. This method allows us to measure fluxes of chemicals. The first results, gathered during the improvement of the method in partly artificial conditions, are cross-checked with other data given by direct observation in the field. Measured flux (2,2 mg N/g fresh mass empty gut/day/15 °C) is far more important than para-ecological estimations: animal metabolism plays directly an important rôle in nitrogen and carbon cycles.

Key words: carbon cycle, nitrogen cycle, earthworm, ¹⁵N, ¹⁴C, metabolism, ecological measure, ecological function