

IMPACTS DU TRAVAIL DU SOL ET DE LA GESTION DES RÉSIDUS SUR L'ACTIVITÉ DES MICROORGANISMES ET LE STOCKAGE DE CARBONE

SAMAD IDI-ISSA

TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

MASTER EN AGROECOLOGIE

ANNÉE ACADÉMIQUE 2021-2022

CO-PROMOTEURS : CAROLINE DE CLERCK, BENJAMIN DUMONT

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique ¹ de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

¹ Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par les co-promoteurs membre du personnel enseignant de l'ULiège ou de l'ULB

IMPACTS DU TRAVAIL DU SOL ET DE LA GESTION DES RÉSIDUS SUR L'ACTIVITÉ DES MICROORGANISMES ET LE STOCKAGE DE CARBONE

SAMAD IDI-ISSA

TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

MASTER EN AGROÉCOLOGIE

ANNÉE ACADÉMIQUE 2021-2022

CO-PROMOTEURS : CAROLINE DE CLERCK, BENJAMIN DUMONT

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord ma promotrice, Caroline DeClerck, pour son soutien sans faille et sa bonne humeur contagieuse. Elle a su me porter, me guider et m'accompagner jusqu'à ce point.

Je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin au laboratoire de phytopathologie, au laboratoire du GP, à la ferme expérimentale, à l'open space du BV et au TERRA.

Je dédie enfin ce travail à ma famille sans laquelle rien de tout cela n'aurait été possible.

Résumé

L'agriculture de conservation est envisagée comme option pour une agriculture durable par la communauté scientifique et la sphère politique. Mais il y a un besoin pour des résultats de long terme tant sur les performances agronomiques qu'environnementale de ce système de culture. Dans le cadre d'un essai de longue durée en Belgique, le travail du sol (labour conventionnel contre travail réduit) et l'incorporation des résidus de culture (incorporé ou non) sont testés sur sol limoneux. La présente étude a cherché à évaluer l'impact de 14 ans de ces pratiques différenciées sur l'activité des microorganismes, le stockage de carbone d'origine organique, et l'efficacité agronomique pendant la saison de croissance de la culture en place : du froment d'hiver. Les résultats montrent un impact significatif des modalités expérimentales sur la phénologie de la culture à trois moments de la saison : en plein tallage, au remplissage du grain, et à la surmaturité. Puis aucun impact significatif des modalités expérimentales sur la respiration microbienne et l'activité enzymatique. Nous faisons l'hypothèse du rôle d'un développement racinaire différent, en raison d'un comportement du sol différent en labour et travail réduit, pour expliquer les différences de phénologie.

Abstract

Conservation agriculture is being considered as an option for sustainable agriculture by the scientific community and the political sphere. But there is a need for long-term results on both the agronomic and environmental performance of this cropping system. In a long-term trial in Belgium, tillage (conventional versus reduced tillage) and incorporation of crop residues

(incorporated or not) are tested on loamy soil. The present study sought to evaluate the impact of 14 years of these differentiated practices on the activity of microorganisms, organic carbon storage, and agronomic efficiency during the growing season of the current crop: winter wheat. The results show a significant impact of the experimental modalities on the phenology of the crop at three times of the season: at full tillering, at grain filling, and at overmaturity. Then, no significant impact of the experimental modalities on microbial respiration and enzymatic activity. We hypothesize the role of a different root development, due to a different soil behavior under plowing and reduced tillage, to explain the differences in phenology.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	5
RÉSUMÉ.....	5
ABSTRACT	5
TABLE DES MATIERES.....	7
TABLE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	10
I. CONTEXTUALISATION SOCIO-HISTORIQUE ET INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
A. Agriculture et changement climatique, un lien ambivalent	2
B. Agriculture, changement climatique, et débats de société	6
II. OBJECTIFS.....	9
III. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
A. Cycle biogéochimique du C	10
B. Cycle biogéochimique de l’N	13
C. Microorganismes du sol, et cycles biologiques du C et de l’N dans les écosystèmes terrestres.....	14
D. Microorganismes et dynamique de la MO dans le sol	22
E. Facteurs d’influence sur le stockage du C	28
1. Travail du sol	29
2. Rétention des résidus	31
F. Diacétate de fluorescéine.....	33

IV.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	33
A.	Matériel	33
1.	Site expérimental	33
2.	Dispositif expérimental	35
3.	Itinéraire technique, pratiques culturales et traitements expérimentaux	36
B.	Méthodes	37
1.	Mesures effectuée sur la culture	37
2.	Mesures effectuées sur les sols	39
C.	Analyse statistique des données.....	44
V.	RÉSULTATS ET DISCUSSION	45
A.	Résultats	45
1.	Développement de la culture.....	45
2.	Paramètres physico-chimiques du sol	47
3.	Microorganismes du sol	48
B.	Discussion.....	50
VI.	CONCLUSION	58
VII.	PERSPECTIVES	59
VIII.	BIBLIOGRAPHIE	61
IX.	ANNEXES.....	80
A.	Annexe 1	80
B.	Annexe 2	55
C.	Annexe 3.....	63
D.	Annexe 4.....	82
E.	Annexe 5.....	84

Table des figures

Figure 1 : Cycle biogéochimique global du carbone.....	11
Figure 2 : Cycle biogéochimique global de l'azote.....	14
Figure 3 : Diagramme simplifié du couplage des cycles du carbone et de l'azote dans les écosystèmes terrestres.....	16
Figure 4 : Cycle biologique de l'azote dans les écosystèmes terrestres.....	19
Figure 5 : Modèle conceptuel du devenir de la matière organique dans le sol.....	23
Figure 6 : Propriété générale des deux fractions au turnover le moins court de la matière organique du sol.....	24
Figure 7 : Influence des microorganismes du sol sur la pédogenèse.....	26
Figure 8 : Plan expérimental de SOLRESIDUS.....	35
Figure 9 : Les composantes du système MicroResp.....	40
Figure 10 : Levée post-hivernale en fonction des modalités expérimentales.....	44
Figure 11 : Biomasse aérienne en fonction des modalités expérimentales et au cours du temps.....	45
Figure 12 : Évolution des stades phénologiques par modalités expérimentales au cours du temps.....	46
Figure 13 : Activité enzymatique par modalités expérimentales.....	48
Figure 14 : Respiration microbienne par modalités expérimentales.....	49
Figure 15 : Adventices par modalités expérimentales.....	51
Figure 16 : Phases et stades de la formation d'un grain de blé.....	53

Liste des tableaux

Tableau 1 : Groupes fonctionnels des microorganismes impliqués dans les cycles du carbone et de l'azote d'un agroécosystème tempéré.....	20
Tableau 2 : Composition biochimique d'un chaume de froment.....	21
Tableau 3 : Composition biochimique d'un chaume de colza.....	21
Tableau 4 : Statistiques descriptives sur les paramètres physico-chimiques du sol.....	47

I. Contextualisation socio-historique et introduction générale

En 1945, à la suite des deux premières guerres mondiale, l'ONU est formée dans le but de maintenir la paix mondiale. Mais à mesure de son développement elle a diversifié ses objectifs globalistes. En 1972, après avoir organisé le premier sommet international jamais tenu sur l'environnement, l'ONU met à son agenda la sauvegarde de la nature. Puis, de fil en aiguille, l'IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) voit le jour en 1988 à l'issue de la conférence de Toronto sur le climat changeant.

Les organisations intergouvernementales et la communauté scientifique (dans une moindre mesure, le secteur privé et des acteurs non gouvernementaux) sont ceux qui, aujourd'hui, cadrent, discutent et déterminent les discours et actions publiques à propos des problématiques climatiques et environnementales (Jahn et Lux, 2009 dans Bernard et Lux, 2017).

L'IPCC a été mise en place pour évaluer le changement climatique global et produire un rapport sur cette évaluation à intervalles réguliers. Sur base des rapports de l'IPCC, les premières conférences puis accords globaux sur le changement climatique ont vu le jour. Les deux accords les plus notables sont le protocole de Kyoto en 1997 et les accords de Paris en 2015, car les deux ont ce point commun qu'ils établissent (en fixant des objectifs ainsi que les moyens pour y parvenir) que les sociétés du monde doivent tendre vers une réduction de leurs émissions de gaz à effets de serre (GES). Preuve en est que l'IPCC (2021) réaffirme, à travers son dernier rapport en date plus que jamais, sa théorie anthropique du changement climatique.

L'agriculture -seulement au sens de : terres cultivées, prairies temporaires ou permanentes, et élevage- est un des principaux secteurs émetteurs de GES anthropiques globaux, y contribuant pour 11% (FAO, 2020) ².

² Il faut différencier les émissions directement causées par les activités agricoles (c'est-à-dire les émissions liées aux processus biologiques qu'impliquent la culture et l'élevage) des émissions indirectement en lien avec l'agriculture (c'est-à-dire les émissions liées au système alimentaire mondial : de la fabrication des engrais de synthèse à l'entreposage et à l'emballage des aliments) (FAO, 2020 ; Tubiello et al., 2021). Les activités

L'analyse des narratifs entourant les maints discours appelant depuis quelques décennies (plus ou moins depuis le début des années 1980 (Amekawa, 2011) à un changement de paradigme dans l'agriculture moderne, montre que deux notions distinctes reviennent souvent ensemble, et quand c'est le cas, elles se font appel l'une à l'autre : la sécurité alimentaire et la durabilité des agroécosystèmes (Bernard et Lux, 2017 ; Tomlinson, 2013). En effet, à leur égard un narratif général peut être dégagé : grâce au développement de l'agriculture moderne, entre 1960 et 2010, les rendements globaux ont augmenté de 200% (FAO, 2011 et IAASTD, 2009 dans Bernard et Lux, 2017) ; mais, ces gains fantastiques de productivité sont venus au prix de pratiques agricoles non durables (notamment labour intensif, usage intensif de pesticides/engrais de synthèse, monoculture) qui ont dégradé de manière continue les sols agricoles, l'agrobiodiversité voire la biodiversité globale (de plus, même significativement participé à renforcer le poids de l'agriculture sur le changement climatique là où elles étaient pratiquées) ; jusqu'à un point critique atteint aujourd'hui, tout cela rajoutant alors une empreinte d'urgence supplémentaire à la crise climatique actuelle (Bernard et Lux, 2017) ; qui plus est une non durabilité technique à cause d'une dépendance aux énergies fossiles, non renouvelables, et bientôt épuisées (Green, 1978 ; Inman, 2016 ; Campbell, 2005 ; World Energy Council, 2013).

A la lumière de ce narratif général, basé sur ces deux notions concomitantes et connexes, s'explique une prise de conscience large et partagée que les conséquences environnementales de l'agriculture moderne ne peuvent plus être négligées.

Ainsi, plus que l'expression de la nécessité d'un changement de paradigme agricole, récemment les discours internationaux parlent même d'une inévitabilité de ce changement (IAASTD, 2009).

A. Agriculture et changement climatique, un lien ambivalent

Les conséquences du changement climatique pour l'agriculture ne seront, nécessairement, pas les mêmes partout dans le monde, car les climats des différentes régions du monde sont intrinsèquement différents (Campbell, 1995 ; Kang et Banga, 2013). Les impacts agronomiques sous-tendus dans une région tempérée telle que la Belgique, ne seront typiquement pas les mêmes dans une région tropicale (Rosenzweig et Liverman, 1992 ; Kurukulasuriya et Rosenthal, 2013 ; Kang et Banga, 2013). Selon différentes projections et

agricoles causent essentiellement des émissions de N₂O et CH₄ : à l'échelle mondiale elles contribuent à 42% et 75% des émissions globales de CH₄ et N₂O, respectivement (FAO, 2020).

modélisations traitant du changement climatique, dans les régions tempérées, hormis évènements climatiques extrêmes, on s'attend globalement à : un premier effet positif de l'enrichissement en CO₂ de l'atmosphère sur la physiologie des cultures (car les plantes tempérées ont en général un métabolisme en C₃), et un second effet positif de l'ampleur relative de la combinaison d'une hausse du CO₂ atmosphérique et des températures moyennes (car il y aura probablement un déplacement bénéfique à l'optimum pour les processus physiologiques du ratio CO₂ atmosphérique/température atmosphérique ; de même qu'un bénéfique allongement de la saison de croissance pour la succession et la rotation culturale) (Rosenzweig et Liverman, 1992 ; Kang et Banga, 2013).

Pour autant, il n'y aura pas que des effets à priori positifs du changement climatique à venir en régions tempérées. Un élément de préoccupation majeur dans ce sens est le devenir sol agricole sous changement climatique³. Les températures plus élevées de l'air causeront des températures plus élevées des sols, ce qui devrait augmenter de manière générale les taux de réaction chimique en solution et les réactions contrôlées par diffusion dans les sols (Buol et al., 1990 dans Rosenzweig et Liverman, 1992). La décomposition de la matière organique (MO) s'en verra accélérée, ce qui résultera en un relargage plus marqué de CO₂ dans l'atmosphère par les microorganismes du sol ainsi qu'une diminution du ratio carbone :azote (C :N) dans les sols agricoles (Rosenzweig et Liverman, 1992). Ces phénomènes pourraient être à l'origine à la fois d'une aggravation du changement climatique et d'un appauvrissement de la fertilité des sols arables.

Cependant, ces impacts négatifs devraient théoriquement pouvoir être compensés par les plus grandes quantités de biomasse racinaire et de résidus de culture (biomasse aérienne à but non alimentaire : tiges, chaumes..) que les plantes cultivées produiront, en résultant tout justement de leurs réponses physiologiques positives anticipées face aux changements climatiques en cours et à venir en régions tempérées (Rosenzweig et Liverman, 1992).

Si tant est qu'on restitue les résidus de culture au champ. Amender le sol agricole est une pratique culturale ancienne, connue pour maintenir la santé du sol et les cycles de nutriments dans l'agroécosystème car restaure la MO du sol au fil des cultures successives (Khosro et al.,

³ D'autres impacts négatifs majeurs du changement climatique en région tempérée (hors évènements climatiques extrêmes) sont à noter : comme par exemple la prolifération potentiellement beaucoup plus marquée des bioagresseurs car, notamment, les températures hivernales plus chaudes permettront leur meilleure survie et reproduction (Stinner, et al., 1989 dans Rosenzweig et Liverman, 1992). Voir l'article de Kang et Banga (2013) pour un tableau assez complet des impacts positifs comme négatifs

2011). Les résidus de culture sont l'amendement le plus évident et celui par excellence (Khosro et al., 2011). Le soucis est que ces derniers sont de plus en plus captés par la bioéconomie ⁴. Or d'après Droste et al. (2020), le carbone organique (CO) d'un sol lui constitue une assurance naturelle contre le climat changeant : à l'intérieur d'une même saison de croissance, plus une culture présente des stocks de CO du sol élevés, moins elle est vulnérable et plus ses rendements sont stables -voire augmentent- face aux fluctuations et aléas climatiques. L'activité biologique a beaucoup à voir avec les mécanismes déterminant l'ampleur des stocks de CO, leur persistance, et la manière dont ils façonnent plusieurs caractéristiques physico-chimiques essentielles dans les sols (Bot et Benites, 2005). Ainsi restituer les résidus relève d'une stratégie d'adaptation aux changements à venir dans le fonctionnement interne des sols agricoles ⁵.

Au-delà du concept d'adaptation de l'agriculture au changement climatique, il y a eu un intérêt grandissant depuis la dernière décennie dans la capacité de « puits de carbone » naturels à compenser les émissions anthropiques de CO₂ grâce à la photosynthèse qu'ils font, dans une optique cette fois de mitigation du changement climatique ⁶. L'initiative 4 pour 1000 est née dans cet effort lors des accords de Paris (Lal, 2016a). Elle appelle à séquestrer du carbone atmosphérique en augmentant le contenu en CO des sols agricoles mondiaux, jusqu'à une profondeur de 40cm et à un taux réaliste : 4‰ par an soit seulement 0,4% par an.

Elle se veut un outil politique qui servira à implémenter cette voie complémentaire mais robuste de mitigation du changement climatique (Chabbi et al., 2017). En effet, de par la manière dont les écosystèmes terrestres cultivés sont conduits on peut augmenter le pool de carbone -via la voie du CO- qui y reste immobilisé un long moment sans être dégradé et sans retourner dans l'atmosphère. Tout l'intérêt réside dans le fait que les sols sont un réservoir, et donc un potentiel majeur stockant de carbone : ils détiennent plus de carbone que

⁴ Un marché émergent qui valorise les résidus de culture énergétiquement (biocarburants) et industriellement (matériaux de constructions biosourcés) en tant que ressource renouvelable et qui représentait déjà en 2017 un chiffre d'affaire de 38 milliards d'euros (site de l'ADEME)

⁵ L'ONU a discuté une typologie des adaptations que l'homme (par extension les sociétés humaines) peut (ou devrait) faire en agriculture face au changement climatique (Khosro et al., 2011).

Il y a quatre catégories générales d'adaptations par ordre de complexité et d'échelle. Parmi celles-ci, les adaptations technologiques sont le développement et la promotion de technologies agricoles innovantes permettant de soit lutter contre le changement climatique soit de s'accommoder de ses effets soit les deux à la fois. Il est donc question dans ce texte d'adaptations technologiques.

⁶ L'IPCC définit la mitigation comme une intervention anthropique qui réduit les sources ou évite les risques d'émission de GES (IPCC, 2001)

l'atmosphère et la végétation terrestre combinée, soit deux-tiers du carbone dans les écosystèmes terrestres (Post et al., 1982 ; FAO, 2015) ⁷.

A cette fin -de séquestration de CO dans les sols agricoles- des pratiques de gestion optimale des agroécosystèmes ont été ciblées puis recommandées (*recommended management practices*, RMPs) : il s'agit d'un équilibre optimal et opérationnel entre augmenter la captation photosynthétique de carbone et ralentir/limiter la perte de carbone du sol à l'atmosphère. Parmi ces RMPs, figure notamment la manière de travailler le sol quand on y restitue des résidus de culture (Smith et al., 2008 ; Lal, 2016a ; Chabi et al., 2017).

Cependant, les RMPs doivent être maintenues dans le temps pour être efficaces (Lal, 2016a). L'initiative 4 pour 1000 incarne dès lors un changement de paradigme dans la gestion des agroécosystèmes : faire de l'agriculture pour restaurer, maintenir et améliorer la santé des sols afin de conduire les cultures comme des puits de carbone efficaces, le *carbone farming*. En effet, plusieurs études montrent à quel point la séquestration de CO dans les sols agricoles fournirait une manne de co-bénéfices via l'amélioration d'autres services écosystémiques en tout genre mis à part la mitigation du CO₂ atmosphérique, par exemple : réduction du risque d'érosion des sols agricoles, réduction des risques de lixiviation et ruissellement de surface à partir des sols agricoles, plus grande biodiversité du sol et de l'agroécosystème, réduction du besoin en apports de fertilisants synthétiques (Lal, 2011).

Par conséquent, le *carbone farming* se veut avant tout une option agronomiquement pertinente : au centre des synergies entre adaptation et mitigation du changement climatique et se plaçant dans la continuité de la longue lignée des avancées et concepts majeurs en pédologie ainsi qu'en matière de gestion holistique du sol (Bockheim et al., 2005).

Les cultures européennes émettent trois-quarts de N₂O et CH₄ (30 g C.m⁻².an⁻¹) contre un quart de CO₂ (10 g C.m⁻².an⁻¹) (Schulze et al., 2009). Le N₂O et le CH₄ ont, dans l'absolu, une capacité de réchauffement atmosphérique bien supérieure à celle du CO₂ ; mais parce qu'ils résident après leur émission, moins longtemps que le CO₂ de l'atmosphère, ils n'ont pas le même potentiel de réchauffement climatique (IPCC, 2007 ; Lynch et al. 2020 ; Lynch et al. 2021). Ainsi le potentiel de réchauffement de l'atmosphère globale d'un gaz est la

⁷ La rationale est qu'on pourrait stocker environ 2,2 Gt de carbone atmosphérique par an, soit 30% des émissions mondiales de CO₂ par an si on se mettait à stocker 0,4% de CO par an dans les sols agricoles mondiaux (Minasny, 2017). Mais ces chiffres ne sont que conditionnels et l'idéologie est vraiment la plus importante ici (Lal, 2016a).

mesure du forçage radiatif⁸ d'une tonne de ce gaz, comparativement à une tonne de CO₂, dans une période temps donnée (généralement on table sur 100ans)⁹.

Ce n'est alors pas seulement parce que le CO₂ est le GES le plus émis en quantité par les sociétés modernes et qu'il présente la plus grande contribution au forçage radiatif (60%) (Arrouyas et al., 2002), que les discours internationaux appellent tous à viser une émission nette nulle de CO₂ et se concentrent beaucoup plus sur ce CO₂ que sur les autres GES : il s'agit aussi d'adopter une vision à l'échelle des temps géologiques dans les politiques de mitigation du changement climatique (Clarck et al., 2016).

On conçoit alors ici bien un des enjeux de l'adaptation au changement climatique en régions tempérées : la manière dont on gèrera les résidus de culture et par extension la manière dont on gèrera l'activité des microorganismes du sol via le travail du sol, sera déterminante pour le futur de l'agriculture tempérée.

Deux thèmes qui seront centraux à travers la présente étude.

B. Agriculture, changement climatique, et débats de société

Ce qui nous amène à mentionner un débat en cours dans le cadrage du narratif général évoqué au début ce texte. Débat portant sur la nature du changement de paradigme à effectuer : est-il tangible que cet inéluctable changement doive, ou pas du tout, aussi représenter un doublement de la productivité agricole globale actuelle afin de permettre de nourrir une augmentation à 9milliards de la population mondiale d'ici à 2050 (Tomlinson, 2013). Le cadrage de ce narratif général est primordial car si on va dans un sens ou dans l'autre on se retrouvera à soutenir des nouveaux paradigmatiques agricoles très différents : soit une sorte de « nouveau productivisme » agricole (De Schutter et Vanloqueren, 2011 ; Borlaug, 2000 ; Gates, 2009) parfois appelé nouvelle révolution verte, soit une agriculture écologique teintée de discours d'écologie politique (Horlings et Marsden, 2011 ; Perfecto et Vandermeer, 2010 ; McNeely et Scherr, 2003 ; Gliessman, 2015) souvent désignée agroécologie -et concepts analogues tels qu'intensification durable (Amekawa, 2011).

En somme, deux visions non compatibles du futur de l'agriculture et des ruralités du monde : la première misant sur des pratiques agricoles basées sur une technologie de pointe, telle que

⁸ Encore appelé communément « effet de serre », c'est la perturbation totale du bilan énergétique atmosphérique (par les GES d'origine anthropique) via la rétention d'énergie solaire qui n'aurait pas dû l'être

⁹ Les limitations de la mesure en CO₂ équivalent ont toutefois été mises en évidence par plusieurs études : (Lynch et al., 2021) : Pierrehumbert, 2014 ; Allen et al., 2016 ; Tanaka et O'Neil, 2018 ; Wigley, 2018

l'agriculture de précision (Srinivasan, 2006) ou encore la modification génétique des plantes cultivées (Huang et al., 2002 ; Phipps et Park, 2002) ; et la seconde misant sur des pratiques agricoles basées sur les principes écologiques, telles qu'intégrer des éléments du paysage naturel dans le paysage agricole pour réduire l'usage des pesticides afin d'entre autres préserver la biodiversité (Altieri et Nicholls, 2004 ; Gurr et al., 2004), ou encore éliminer le labour/réduire le travail du sol pour augmenter l'activité biotique du sol agricole et ainsi améliorer sa fertilité et ses services écosystémiques (Holland, 2004). Incompatibles aussi notamment car, une vision -celle de l'agroécologie-, critique ouvertement l'autre. Critiques allant des solutions technologiques mêmes proposées par la nouvelle révolution verte (Altieri et Nicholls, 2005), à ce qu'implique ces solutions technologiques comme par exemple : les partenariats entre l'industrie biotechnologique (incarnant la nouvelle révolution verte) avec l'agribusiness (les industries pétrolières et les industries automobiles) pour produire et stimuler l'économie du biodiesel (Holt-Gimenez et Kenfield, 2008).

De par la nature institutionnelle -entre autre- des arènes dans lequel il a été engendré, l'issue de ce débat au cadrage de narratif est à gros enjeux sociotechnique car le cadrage retenu par la majorité influencera de bout en bout l'objet dont il se veut traiter. Wezel et al. (2014) classent le travail réduit du sol, les rotations culturales comprenant des légumineuses et la rétention au champ des résidus de culture comme des pratiques culturales faisant partie de l'agroécologie.

Certaines études tendent à montrer que le non travail du sol ne génère pas de changement significatifs dans le CO₂ du sol sur le long terme par rapport à la pratique du labour conventionnel (Powlson et al. 2014; 2011; Richards et al. 2014). D'autres études encore tendent à montrer que c'est la combinaison des trois pratiques que sont rotation culturale, non labour et rétention des résidus qui engendre un haut potentiel de mitigation des GES (Sà et al., 2016). Ainsi, si le bénéfice environnemental d'orienter les systèmes de production agricoles vers l'agriculture de conservation afin de les rendre durables semble clair, la communauté scientifique tend encore à être en désaccord sur le bénéfice agronomique (Cook et al., 2016). Par extension sur le bénéfice politico-économique : l'Europe étant un des plus grand producteurs de nourriture au monde, elle ne peut se permettre de perdre en rendement dans ses cultures pour des questions de stratégie technico-économique et d'économie politique ¹⁰.

¹⁰ Site de l'european environment agency (eea) : <https://www.eea.europa.eu/signals/signals-2015/articles/agriculture-and-climate-change>

Plus qu'un simple enjeu scientifique, la présente étude visant à déterminer l'impact de la gestion des résidus et du travail du sol sur l'activité des microorganismes et le stockage de carbone revête une portée critique sur bien des domaines.

II. Objectifs

La présente étude a été menée sur base d'un essai expérimental mis en place il y a de cela 14 ans par la faculté Gembloux AgroBio-Tech en écho aux thématiques développées en introduction : l'essai SOLRESIDUS. Les modalités expérimentales y testées sont : labour conventionnel contre seulement un travail réduit du sol, résidus exportés contre résidus laissés. Le tout sur fond d'une rotation culturale alternant deux cultures successives par an, avec un CIPAN (Culture intermédiaire piège à nitrate).

Un but de la présente étude est d'évaluer l'effet de 14 ans de pratiques différenciées, entre gestion des résidus et travail du sol, sur l'activité des microorganismes et le stockage du carbone.

Afin de mettre en évidence un effet des pratiques différenciées sur la dynamique de la MO, et éventuellement donc sur celle du stock de CO, nous avons comme objectif d'étudier la communauté microbienne sous chaque pratique : (i) en la décrivant globalement grâce une mesure de biomasse microbienne, (ii) en décrivant son comportement global face à la MO du sol grâce à des mesures d'activité biologique.

Un second but de l'étude est d'évaluer l'effet des pratiques différenciées depuis 14 ans d'un point de vue agronomique, afin de mettre en évidence l'efficacité du système productif sous chaque pratique : (i) en décrivant globalement le comportement de la culture pendant la saison de croissance, grâce à un suivi phénologique et à la mesure de paramètres phytotechnique clefs (biomasse aérienne, levée des semences).

III. Synthèse bibliographique

La vie sur Terre repose sur le recyclage des éléments chimiques essentiels, car si l'énergie solaire est inépuisable, les réserves d'éléments chimiques globales sont *in fine* limitées. Ce sont les microorganismes détritvoraux qui rendent ce recyclage possible, en dégradant les molécules complexes des organismes morts et leurs déchets pour les remettre à disposition des autotrophes dans la biosphère sous forme de composés simples. On parle de cycles biogéochimiques pour désigner ces cycles des nutriments, car ils font appel à des composants biotiques et abiotiques des écosystèmes (Campbell, 1995). Les appréhender est alors selon nous la porte d'entrée idéale pour situer cette étude dans le champ de la littérature scientifique : on peut saisir par là une des clés pour comprendre des mécanismes primordiaux entre changement climatique et fonctionnement interne des sols agricoles.

La complexité des cycles biogéochimiques peut facilement être approchée par les mécanismes qui gouvernent leur fonctionnement harmonieux (Campbell, 1995 ; Basu et Xavier, 2017). Premièrement, le cycle à proprement parler est un modèle général de circulation des nutriments établi par la science, séparant les nutriments entre ceux disponibles et ceux non disponibles, ceux organiques et ceux non organiques ; et décrivant les processus généraux permettant qu'un nutriment passe d'un état à l'autre : que ce soit un processus biochimique, biophysique, géophysique ou géochimique. Deuxièmement, il faut voir que les cycles du carbone (C) et de l'azote (N) se font à l'échelle mondiale, car ces éléments circulent dans l'atmosphère à l'état gazeux : l'air est le plus grand réservoir actif et les régule.

A. Cycle biogéochimique du C

L'atome de C est complètement indissociable du vivant : tous les êtres vivants sont formés de squelettes de C et les autotrophes comme les hétérotrophes dépendent de cet atome pour leur survie. Notamment par exemple pour faire fonctionner leur métabolisme énergétique (Müller et al., 2012).

Le cycle global du C se répartit dans l'ensemble de la biosphère et entre quatre principaux réservoirs : l'atmosphère, la biosphère, l'hydrosphère et la géosphère (Schimel, 1995 ; Des Marais, 2001). Il est naturellement dans un équilibre décrivant un cycle « parfait », dans le

sens où le C est retourné à l'environnement à peu près à la même vitesse qu'il n'en est retiré - par les organismes vivants. Ce qui est rendu possible par une régulation fine, par des processus engageant du C sous différentes formes moléculaires, et décrivant différents types ainsi que différentes dynamiques, de transformation du C. Ainsi, à tout moment dans son cycle biogéochimique un atome de C est soit en train d'être transformé d'une forme moléculaire vers une autre, soit en attente d'être transformé et cette attente est plus ou moins longue et sert un but différent selon le processus engagé. La

Le C inorganique est soit du carbonate de calcium (CaCO_3) qui se retrouvent dans les roches sédimentaires calcaires, les coquilles d'animaux, le corail etc., soit du C sous forme gazeuse (CO_2 , CH_4 , $\text{CO}\dots$). Dans l'atmosphère, la concentration en CO_2 est d'environ 0.04%, soit 0.06×10^{18} moles de CO_2 (Holland, 1984 dans Des Marais, 2001). Le C organique est par définition un constituant de molécules où il est lié à l'hydrogène (Pellerin et al., 2020), on parle d'hydrate de carbone.

Le C passe ainsi globalement entre réservoirs, par différents sous-cycles, chacun ayant une échelle de temps propre. La figure 1 illustre ceci.

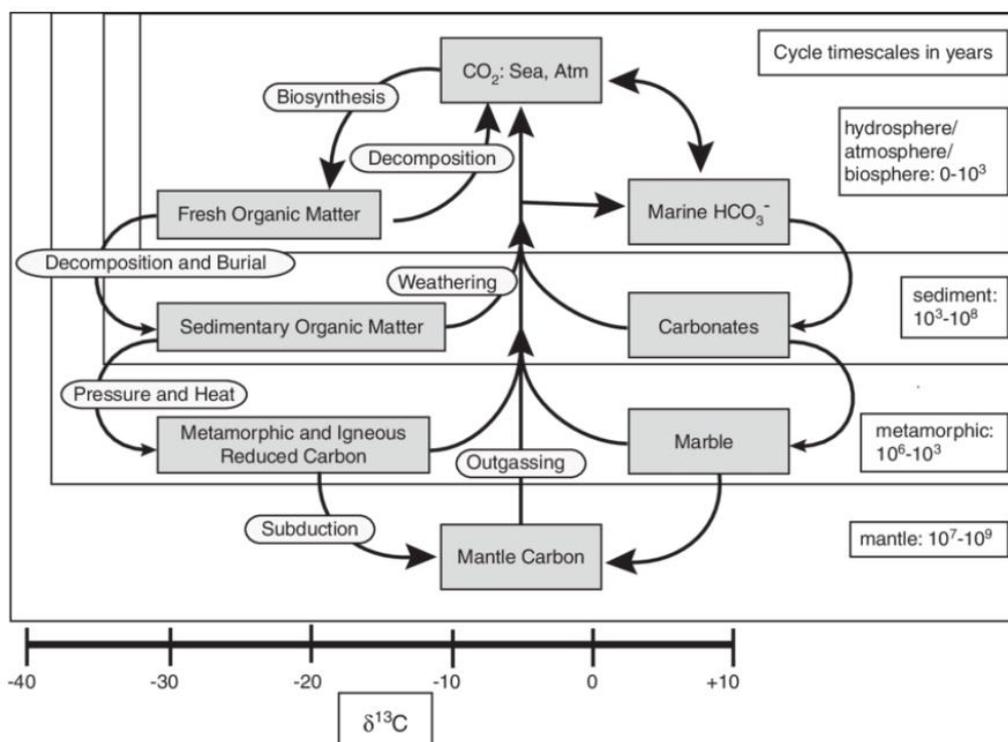


Figure 1 : Cycle biogéochimique global du C, montrant les principaux stocks actifs (cases grises) dans le manteau terrestre, la croûte terrestre, les océans, l'atmosphère, l'hydrosphère et la biosphère ; ainsi que les processus (flèches) qui lient ces réservoirs (cases blanches) et stocks actifs entre eux. Les cases blanches « sédiment », « metamorphic » et « mantle » constituent ensemble le réservoir de la géosphère. La longueur des

cases grises reportée à l'axe horizontal donne des valeurs typiques de $\delta^{13}C$ pour chaque sous-réservoir. Les valeurs dans les cases blanches à droite indique les échelles de temps dans lesquels le C traverse typiquement chacun des quatre sous-cycles (= temps de *turnover*). (tiré de Summons et al., 2011 et originel de Des Marais, 2001)

Ci-après sont décrits les flux associés aux processus biogéochimiques dépeints dans la figure 1.

Sous-cycles dans l'ensemble formé des réservoirs hydrosphère/atmosphère/biosphère : ces deux sous-cycles sont regroupés ensemble car les trois réservoirs impliqués sont caractérisés par leur taille relativement petite et leur taux d'échange de C entre eux très élevé (Des Marais, 2001). La biosphère (représentée par le sous-réservoir «*fresh organic matter*») domine à l'échelle globale les échanges de C entre le CO₂ atmosphérique et la MO.

La fixation de CO₂ atmosphérique est faite principalement par les organismes photosynthétiques aux taux suivants : 4000×10^{12} mol.an⁻¹ de production primaire pour les écosystèmes marins et 5000×10^{12} mol.an⁻¹ pour les écosystèmes terrestres (Martin et al. 1987; Olson et al. 1985; Field et al. 1998 dans Des Marais, 2001).

Environ 99.9% du C fixé par la biosphère est recyclé relativement rapidement en CO₂ dans les océans et l'atmosphère, le reste étant perdu par sédimentation (Berner and Canfield 1989 dans Des Marais, 2001).

Sous-cycle sédimentaire : le vieillissement des sédiments organiques/carbonates met des nutriments à disposition de la biosphère terrestre/marine (Holland, 1984 ; Barker et al. 1997 dans Des Marais, 2001 ; Kaviya, 2019). Le taux annuel global d'enterrement de MO terrestre est 10×10^{12} mol.an⁻¹ (Berner and Canfield 1989 dans Des Marais, 2001) et le taux annuel global d'enterrement de carbonates est estimé à 50×10^{12} mol.an⁻¹ (Holser et al. 1988 dans Des Marais, 2001).

Sous-cycle métamorphique : « *aux températures et pressions élevées de la zone de subduction, le carbonate de calcium et la MO résiduelle [profondément enterrés,] sont transformés par le volcanisme : c'est la métamorphose, ou diagenèse profonde ; le CO₂ et la vapeur d'eau qui en résultent sont [in fine] dégazés dans l'atmosphère à partir d'éruptions volcaniques et de sources chaudes* » (Fung , 2003).

Sous-cycle crustal : pendant le processus de métamorphose, certains composés carbonés atteignent la croûte terrestre et passent alors du sous-cycle métamorphique au sous-cycle

crustal (Des Marais, 2001). Le taux de C dégazé depuis le manteau est d'environ 2×10^{12} mol.an⁻¹ (Des Marais 1985; Marty and Jambon 1987 dans Des Marais, 2001).

D'après les brèves descriptions qui en sont données, il est possible de concevoir comment chacun des sous-cycles cycles biogéochimiques globaux est influencé par l'autre et comment ces influences opèrent à des échelles de temps différentes.

Le sous-cycle entre la biosphère et l'atmosphère est celui qui nous intéresse le plus dans un contexte de changement climatique, on parle communément de cycle biologique du C pour le désigner. Dans le cadre précis de notre sujet, il est nécessaire d'explicitier le cycle biologique terrestre du C (cf. partie III.C).

B. Cycle biogéochimique de l'N

L'N est tout aussi essentiel à la vie que le C : dans les tissus vivants l'N est par exemple partie intégrante des enzymes, qui sont les entités effectuant entre autre la photosynthèse (Schlesinger et Bernhardt, 2013).

Le cycle global de l'N se répartit sur les mêmes quatre réservoirs que celui du C. En revanche, ce n'est pas un cycle « parfait » comme l'est celui du C : le cycle global de l'N est naturellement déséquilibré. C'est-à-dire que peu importe l'écosystème, l'N tendra à en disparaître sur des échelles de temps plus ou moins longues (Peterjohn & Schlesinger, 1990). Les raisons de cela sont multiples (par exemple : rétroactions positives sur les pertes d'N) (Vitousek et Howarth, 1991), mais la plus éloquente est probablement sa grande mobilité inhérente (Schlesinger et Bernhardt, 2013).

Les formes d'N organique sont un éventail de substances simples ou plus complexes retrouvées dans les organismes vivants ou les organismes morts/en décomposition : acides aminés libres, nucléotides, protéines ... (Marino et Howarth, 2014). L'N inorganique quant à lui se retrouve principalement : sous forme de diazote (N₂) et ammoniac (NH₃) en tant que gaz, sous forme de nitrates (NO₃⁻) et nitrites (NO₂⁻) en tant qu'ions oxydés, et sous forme d'ammonium (NH₄⁺) en tant qu'ion réduit. L'atmosphère contient 79% de N₂.

La figure 2 illustre les sous-cycles dans le cycle global de l'N.

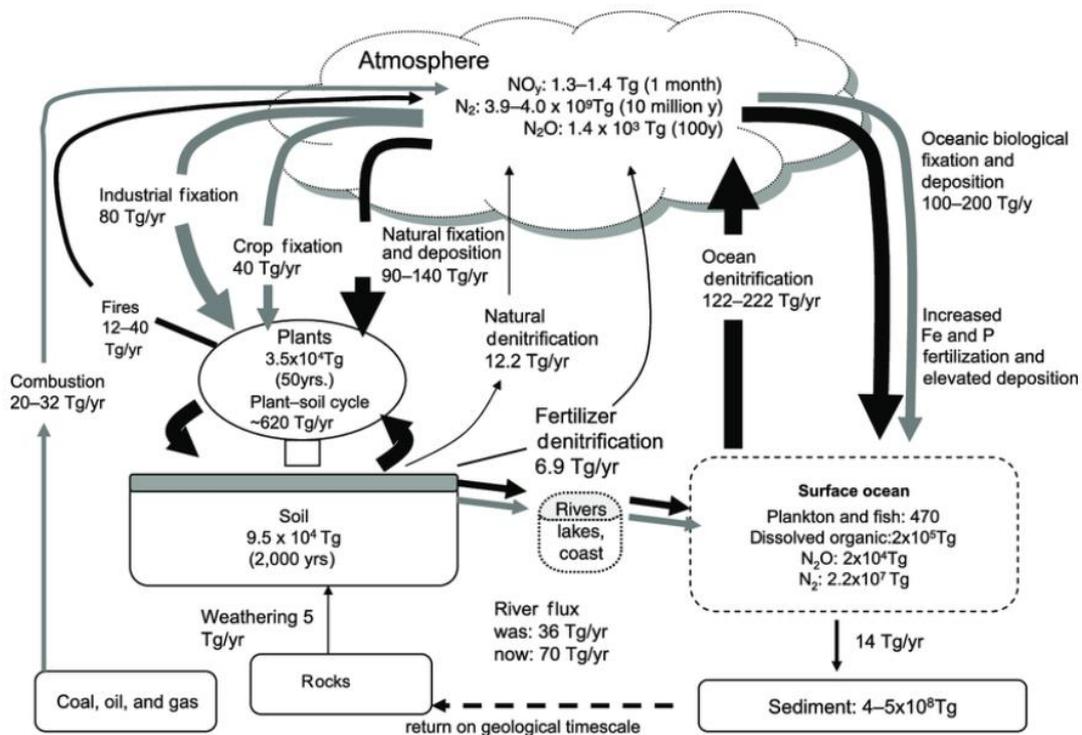


Figure 2 : Principaux réservoirs, flux et temps de turnover dans le cycle biogéochimique global de l’N (avec l’influence de l’homme). Les temps de turnover sont indiqués entre parenthèse. La taille des réservoirs est exprimée en Tg de N (10^{12}). Les flux entre les réservoirs sont exprimés en $Tg \cdot an^{-1}$. Les flèches noires représentent le cycle naturel et les grises les influences humaines. La taille des flèches est proportionnelle à l’importance des flux (tiré de Kooijman et al., 2010)

Du reste, les processus biogéochimiques opérant à des échelles de temps plus longues sont les mêmes, sur la forme, que ceux décrits dans le cycle du C.

Le cycle biologique terrestre de l’N est tout aussi important à expliciter dans le cadre précis de notre sujet (cf. partie III.C).

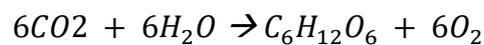
C. Microorganismes du sol, et cycles biologiques du C et de l’N dans les écosystèmes terrestres

Il s’agit dans cette partie d’aborder le détail des interactions biochimiques entre les microorganismes du sol, l’N, et le C, au sein des composantes biologiques, de la part des cycles biogéochimiques de ces deux éléments qui se fait dans les écosystèmes terrestres.

Les résultats d’études précédentes portant aussi sur l’essai que nous étudions dans le cadre de ce travail ont montré des émissions de N_2O inégales entre modalités expérimentales : pour la campagne sur la culture de froment d’hiver de 2016, Broux et al., (2017) observaient que les sols des parcelles en travail réduit émettaient deux fois plus de N_2O que celles en labour

conventionnel ; tandis que sur les campagnes de 2009 à 2011 Pierreux et al. (2012) observaient des émissions de CO₂ significativement supérieures depuis les parcelles où les résidus étaient retenus et incorporés que les parcelles où ça n'était pas le cas. Il est dès lors fondamental, dans notre étude, d'avoir en tête précisément les voies métaboliques qui mènent à la production de CO₂ et de N₂O à partir de MO pour apprécier le rôle des microorganismes dans la mitigation des GES par le stockage de MO.

La photosynthèse se fait en présence de lumière, chlorophylle, phosphate, nitrate et d'autres nutriment selon l'équation résumée :



,où C₆H₁₂O₆ est du glucose et symbolise la globalité des composés organiques (Fung, 2003).

Après la photosynthèse, le photosynthétat est réparti dans les feuilles, les racines et les parties ligneuses de la plante, qui en utilise une partie pour respirer et une autre pour construire ses tissus, constituer des réserves, ou nourrir les organismes en symbiose avec elle (exsudation racinaire) (Fung, 2003 ; Trumbore, 2006). Quand les plantes meurent ou que les feuilles tombent, du C et de l'N sont transférés au réservoir de MO morte du sol où ils sont décomposés par les microorganismes. En effet, dans la MO, l'N est directement lié au C par liaison covalente au sein de composés structuraux ou phénoliques (Vitousek et Howarth, 1991). Il est essentiel de faire la distinction entre CO du sol et MO du sol. La MO du sol correspond aux éléments organiques du sol à différents stades de décomposition du sol (comme par exemple les tissus provenant de végétaux ou d'animaux morts), les organismes vivants du sol et les sous-produits de la décomposition microbienne du sol (FAO, 2017 ; FAO et ITPS, 2015 ; Lal, 2016b). Le CO du sol est un constituant de la MO du sol. Il correspond à entre 45 et 60% de la MO du sol en termes de masse des éléments chimiques la constituant. En effet, la MO du sol est un arrangement moléculaire de différents atomes (hydrogène, oxygène, nitrogène, etc.), pas seulement de carbone (Lal, 2016b ; FAO, 2017).

Ainsi les cycles biologiques de l'N et du C sont fortement intriqués de telle sorte que toute MO décomposée dans un sol agricole fait intervenir les deux cycles comme le montre la figure 3.

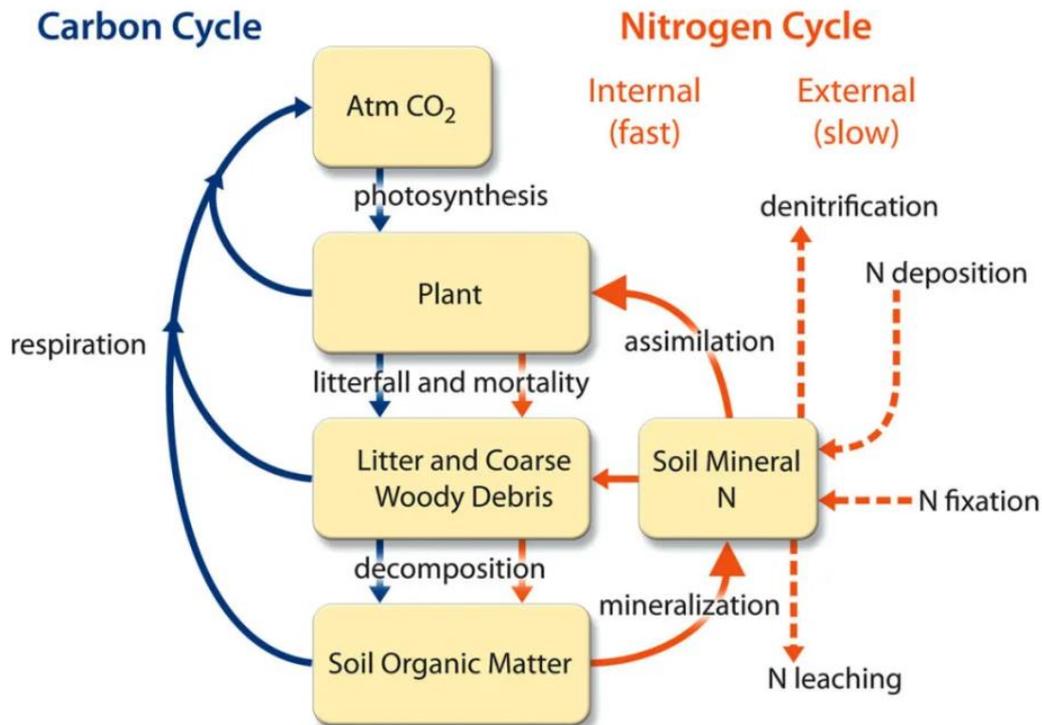


Figure 3 : Diagramme simplifié illustrant les principaux flux et stocks de C et N dans un écosystème terrestre et les processus microbiens y associés. Crédits image : <https://makeupandbreakup.com/2021/11/28/carbon-cycle-nitrogen-cycle-biogeochemical-cycles-of-nature/>.

La décomposition de la MO fraîche (= MO morte non décomposée) commence dès qu'elle est incorporée au sol : c'est la minéralisation (Chevalier, 1924). Par définition, il s'agit d'une oxydation par les microorganismes du sol au cours de laquelle les grandes molécules organiques subissent une dépolymérisation hydrolytique ou oxydative : soit en molécules inorganiques solubles (=décomposition partielle), soit jusqu'au stade le plus transformé possible, avec transformation des petites molécules organiques en CO₂, H₂O et sels minéraux (=décomposition totale) (Davet, 1996 ; Roger Garcia, 2001 ; Whalen et Hamel, 2004). Ils ont besoin de faire cette oxydation pour nourrir leur métabolisme énergétique, car sont en grande majorité des hétérotrophes (Müller et al., 2012 ; Roger Garcia, 2001 ; Vitousek et Howarth, 1991). 80 à 90% de l'oxydation biologique totale est effectuée par les microorganismes du sol (Roger Garcia, 2001) et 75 à 85% de la vie dans le sol seraient des microorganismes (Reichle, 1977).

Les microorganismes dans les sols sont : quelques métazoaires, des protozoaires, des algues microscopiques, des champignons, des bactéries, des actinomycètes, des cyanobactéries et des virus (Roger Garcia, 2001 ; Whalen et Hamel, 2004). Ensembles ils représentent une diversité formidable de : modes de reproduction, phénologie, et morphologie.

Les algues et les cyanobactéries ont un effet négligeable sur la dynamique des nutriments dans les agroécosystèmes tempérés (Paul et Clarck, 1996).

Les bactéries du sol ont des capacités métaboliques très diverses ; et, dans la décomposition biochimique de la MO fraîche, interviennent beaucoup aux étapes de conversion des composés organiques en des formes inorganiques (Whalen et Hamel, 2004). La plupart sont des espèces unicellulaires mais les actinomycètes et plusieurs cyanobactéries sont filamenteuses (Whalen et Hamel, 2004). Ce sont des organismes sédentaires qui vivent en colonie à la surface du sol ou, dans le sol au sein des agrégats (s'y attachant par les sécrétions d'exopolysaccharides sur leur membrane cellulaire) (Roger Garcia, 2001 ; Whalen et Hamel, 2004).

Les champignons sont capables de décomposer les composés organiques les plus complexes qu'il est possible de retrouver dans le sol (Paul et Clark, 1996). Ils bougent dans les sols sur de courtes distances, à mesure que leur hyphe grandit vers les patch de sol riches en nutriments ou vers les débris organiques (Whalen et Hamel, 2004). Les champignons arbusculaires mychoriziens (AM) ne décomposent pas la MO (Whalen et Hamel, 2004).

Bien qu'il y ait généralement, par gramme de sol, un nombre plus élevé de bactéries que d'autres microorganismes, celles-ci représentent généralement moins de la moitié de la biomasse microbienne d'un sol : les champignons en sont le composant majeur (Wollum et al., 1998 ; Olsson et al., 1999).

Prise en charge du C organique dans le cycle biologique du C :

Les substrats facilement décomposés : acides aminés, sucres facilement solubilisés, et acides nucléiques (=MO labile), sont minéralisés avant tout, et en quelques jours, suite à la colonisation microbienne de la MO fraîche. Ensuite vient le tour des substrats plus difficiles à décomposer, qui demandent un bagage enzymatique spécifique et un investissement en énergie important : cellulose et ensuite lignine (Müller, 1998 ; ; Pankhrust, 1996 ; Whalen et Hamel, 2004). Les organismes cellulolytiques sont capables de décomposer les polysaccharides délignifiés et peuvent donc aussi intervenir au moment de la lignilolyse (Pankhrust, 1996).

La cellulose est un polyoside (elle est formée d'unités glucopyranose réunies en chaînes elles-mêmes regroupées en fibrilles) (Roger Garcia, 2001). Les microorganismes la décomposent totalement en glucose suivant un ensemble de réactions enzymatiques appelé la **cellulolyse**.

La lignine est un polymère de composés en C₆ avec des chaînes en C₃ (Roger Garcia, 2001). Elle est dégradée en deux étapes au cours de la **ligninolyse** : d'abord dépolymérisée, puis soit les monomères résultants sont décomposés totalement, soit ils sont décomposés partiellement.

En ce qui concerne l'N. Dans l'écosystème sol-plante, trois transformations microbiennes des composés azotés de la MO fraîche sont les plus importantes pour la production de biomasse végétale et donc pour le cycle biologique de l'N : la minéralisation de l'N organique et l'immobilisation de l'N minéral détermine l'équilibre entre les formes assimilables/non assimilables par la plante ; les apports au sol d'N par fixation biologique d'N moléculaire atmosphérique ; les pertes par nitrification-dénitrification de l'ammoniaque et volatilisation (Roger Garcia, 2001).

Prise en charge de l'N inorganique dans le cycle biologique de l'N :

Les procaryotes qui fixent biologiquement l'N peuvent être libres ou symbiotiques. La **fixation** de N₂ est une réduction de l'N moléculaire en ammoniac effectuée par la nitrogénase. Ce processus permet d'alimenter le métabolisme énergétique des fixateurs d'N. En régions tempérées les bactéries de la rhizosphère des dicotylédones et certaines monocotylédones (dont le froment, qui est la plante cultivée dans cette étude) sont l'un des deux systèmes fixateurs non symbiotiques les plus efficaces. Parmi l'étendue des plantes cultivées sous ces latitudes, l'activité nitrogénase des bactéries de la rhizosphère du froment est l'une des plus élevées (Roger Garcia, 2001).

La **nitrification** est l'oxydation de l'ammonium en azote nitrique.

La **dénitrification** est un processus respiratoire anaérobie : le nitrate est utilisé en tant qu'accepteur final d'électrons au lieu de l'oxygène par certains microorganismes pour leur métabolisme énergétique (Roger Garcia, 2001). Ce processus a lieu quand l'O₂ est limité. Un grand nombre d'espèces de bactéries font une réduction dissimilatrice du nitrate (conduisant à l'accumulation de nitrite dans la matrice du sol), et seulement un petit nombre possèdent le bagage enzymatique pour faire une réduction assimilatrice.

Prise en charge de l'N organique :

La **minéralisation** de l'N organique se fait en deux étapes : protéolyse puis ammonification de la MO. Le processus de minéralisation génère de la respiration de la part des microorganismes (Whalen et Hamel, 2004). (i) La protéolyse est la libération d'acides aminés et de bases azotées à partir de la MO, elle se fait par hydrolyse et consiste en la rupture de la

liaison covalente C-N. (ii) L'ammonification est l'attaque par fermentation ou oxydation des produits de la protéolyse, que les microorganismes font, afin de les utiliser pour la synthèse de constituants cellulaires (Roger Garcia, 2001).

L'ammonium produit peut être fixé entre les feuillets d'argile. Il devient alors inaccessible pour l'assimilation (par dénitrification) ou la nitrification. Mais s'il est plutôt adsorbé à la surface de l'argile, il est au contraire nitrifié plus activement que l'ammonium dans la solution du sol.

La MO décomposée partiellement, peut être fixée organiquement, retenue dans les membranes cellulaires des hyphes, et devenir ainsi beaucoup moins accessible par les plantes pour un certain temps. Elle fait alors office de réserve potentielle d'ammonium pour les microorganismes. C'est **l'immobilisation**.

La figure 4 résume l'intégration de ces transformations microbiennes dans le cycle biologique de l'N et montre les voies menant à l'émission de N₂O.

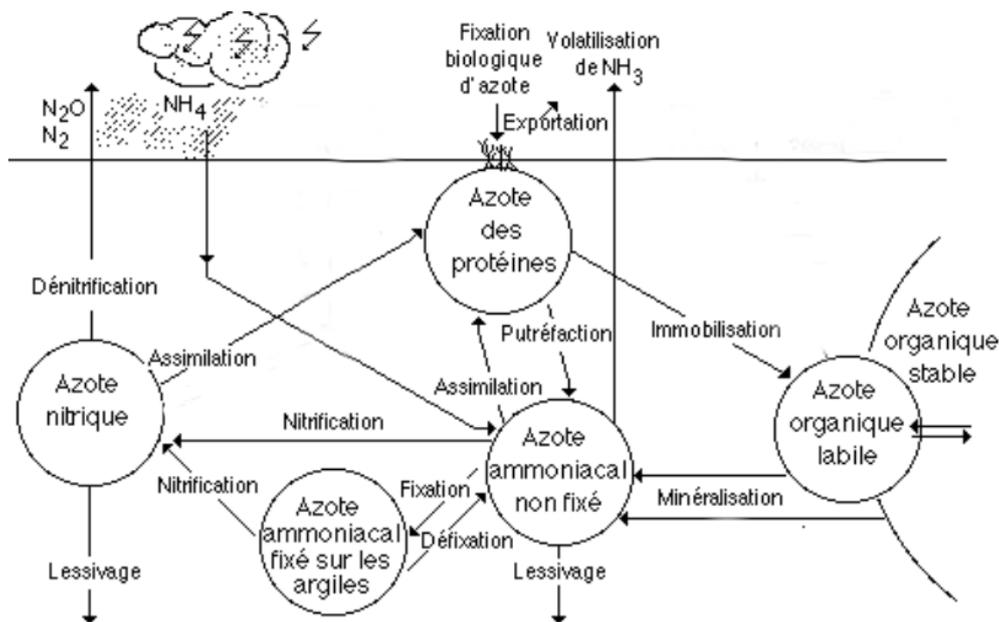


Figure 4 : Cycle de l'N dans le système sol-plante-atmosphère avec les processus microbiens de transformation de l'N (adapté de Roger Garcia, 2001).

Au regard des réactions biochimiques entrant en jeu dans la décomposition de la MO que nous venons d'aborder, le tableau 1 suggère le noyau dur de la diversité microbienne dans un agroécosystème tempéré, sur base d'une classification par activité catalytique des microorganismes du sol.

Catégorie	Bactéries	Actinomycètes	Champignons
Cellulolytiques	<i>Cytophaga</i>	<i>Norcadia</i>	<i>Aspergillus</i>
	<i>Clostridium</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Fusarium</i>
	<i>Cellulomonas</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Trichoderma</i>
Lignilolytiques			<i>Coprinus</i>
			<i>Agaricus</i>
			<i>Poria</i>
Nitrifiants	<i>Mycobacterium</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Aspergillus</i>
	<i>Bacillus</i>		
	<i>Nitrosomonas</i>		
	<i>Nitrobacter</i>		
Dénitrifiants	<i>Achromobacter</i>		
	<i>Pseudomonas</i>		
	<i>Thiobacillus</i>		
	<i>Bacillus</i>		
Fixateurs de N ₂	Cyanobactéries		
	<i>Azotobacter</i>		
	<i>Beijerinckia</i>		
	<i>Klebsiella</i>		
	<i>Azospirillum</i>		
	<i>Rhizobium</i>		

Tableau 1 : Groupes fonctionnels de taxons dont l'activité catalytique intervient dans les cycles du C et de l'N du sol d'un agroécosystème tempéré (tiré de Roger Garcia, 2001)

Pour ce qui est du taux de décomposition d'un substrat organique dans le sol, il varie en fonction de la quantité, de la taille, et de la composition chimique de la MO fraîche, en fonction aussi des types de microorganismes présents ainsi que des conditions environnementales affectant leur activité (de Ruyter et al., 1994 ; Lee et Pankhurst, 1996).

L'effet de la température sur l'activité des microorganismes est bien connu : les vitesses de minéralisation sont multipliées de 2 à 3 par augmentation de 10°C (Pellerin et al., 2020), car l'activité des enzymes des microorganismes du sol (aussi bien exo- qu'endoenzymes) est directement proportionnelle à la température. Le pH influence l'activité des microorganismes car il détermine la réversibilité de transferts de protons entre la phase liquide, gazeuse, les complexes organo-minéraux et les microorganismes du sol (Morel, 1999).

D'après Zhang et al. (2008) cependant, outre les facteurs pédoclimatiques, le taux de décomposition de la MO varie surtout en fonction de la qualité de la MO fraîche (son ratio C :N et son contenu en N, P, K, Ca, Mg). Dans notre étude, la MO fraîche apportée au sol est lignocellulosique : chaumes de blés et chaumes de colza, dont les compositions biochimiques

sont données tableaux 2 et 3 respectivement. Le tableau 4 donne les proportions relatives en nutriments nécessaires à la croissance végétale, que renferment ces mêmes chaumes.

Component	Content (%)
Cellulose	35–40
Hemicellulose	30–35
Lignin	10–15
Policosanols	0.3
Phytosterols	1.2
Phenolic Compounds (<i>p</i> -Coumaric acid, Ferulic acid)	2.13 1.35
Triterpenoids	Traces
Ash	5.9

Tableau 2 : Composition biochimique d'un chaume de froment (tiré de Pasha et al., 2013)

Composition	Proportion
Cellulose	49.52 %
Hemicellulose	12.69 %
Lignin	17.72 %
Moisture	9.70 %
Ash	6.54 %
Others	3.83 %

Tableau 3 : Composition biochimique d'un chaume de colza (tiré de Ji et al., 2014)

Élément (%)	Dans un chaume de blé	Dans un chaume de colza
C	42.1 ±1.19	42.93 ±1.62
N	0.60 ±0.15	0.77 ±0.32
P	0.45 ±0.22	0.78 ±0.51
K	23.45 ±7.68	14.66 ±6.15
S	0.37 ±0.11	0.62 ±0.19

Tableau 4 : Les nutriments dans des résidus de froment et colza (tiré de Wang et al., 2020)

D'après Mooshammer et al. (2014a), les résidus de plantes cultivées sont minéralisés plus vite en-dessous d'un C :N de 20-25. D'après Singh et al. (2020) encore, un C :N supérieur à 25 :1 résulte en l'immobilisation rapide d'N inorganique alors qu'en dessous il y a minéralisation. Des résidus de betterave sucrière par exemple, avec un C :N de 11, peuvent être minéralisés jusqu'à hauteur de 75% pendant les 10 semaines suivant leur incorporation au sol (Whitmore et Groot, 1997). Le C :N des chaumes de blé tourne entre 50 et 100 et est considéré comme

haut (Reichel, 2018). Chen et al. (2013) rapportent un C :N de 65, soit aussi relativement haut, pour les chaumes de colza.

Mais il y a des divergences dans la communauté scientifique sur la pertinence du ratio C :N pour décrire fidèlement l'activité biologique du sol. D'après Ostrowska et al. (2015) ce ratio manque de refléter d'autres facteurs influençant fortement la minéralisation de la MO tels que la qualité de la biomasse microbienne. Ça reste quoiqu'il en soit un indicateur largement adopté et robuste pour prédire la dynamique de minéralisation des sols aux mêmes caractéristiques physico-chimiques et étant sous mêmes climats (Tian et al., 2010 ; Li et al., 2016).

D. Microorganismes et dynamique de la MO dans le sol

On appelle humus, de la MO qui a perdu ses fibres et tissus originels et qui a aussi une structure chimique modifiée. Se retrouvant alors composée de substances qui, dérivées d'une première transformation microbienne de la MO, deviennent relativement récalcitrantes chimiquement à la décomposition après une seconde transformation : acides fulviques, acides humiques et humine (Berg et Laskowski, 2005 ; Roger Garcia, 2001). Des études récentes suggèrent que lesdites substances humiques seraient en fait des artefacts dû à la méthode d'extraction utilisée pour analyser leur présence (Lehmann et Kebler, 2015).

Un nouveau paradigme serait ainsi à l'ordre du jour pour qualifier la MO du sol : au lieu de parler d'humus pour référer à la MO âgée, en opposition à de la MO qui ne se conserve que peu de temps dans le sol ; plutôt concevoir la MO du sol comme un continuum de MO plus ou moins décomposée et perpétuellement en proie à plus de décomposition, selon un gradient thermodynamique allant des composés organiques les plus gros (poids moléculaire) et riches en énergie à ceux les plus petits et pauvres en énergie (Lehmann et Kebler, 2015). Dans ce paradigme, les phénomènes expliquant fondamentalement la persistance de la MO dans le sol (et donc le stockage de CO), est, d'une part sont inclusion dans des agrégats ; d'autre part son association aux colloïdes, avec une capacité d'association qui augmente à mesure de sa décomposition en molécules de plus en plus petites (Bol et al., 2005 ; Six et al., 2006 ; Lützow, 2006 ; Schmidt et al., 2011 ; Lehmann et Kebler, 2015).

La figure 5 illustre ceci.

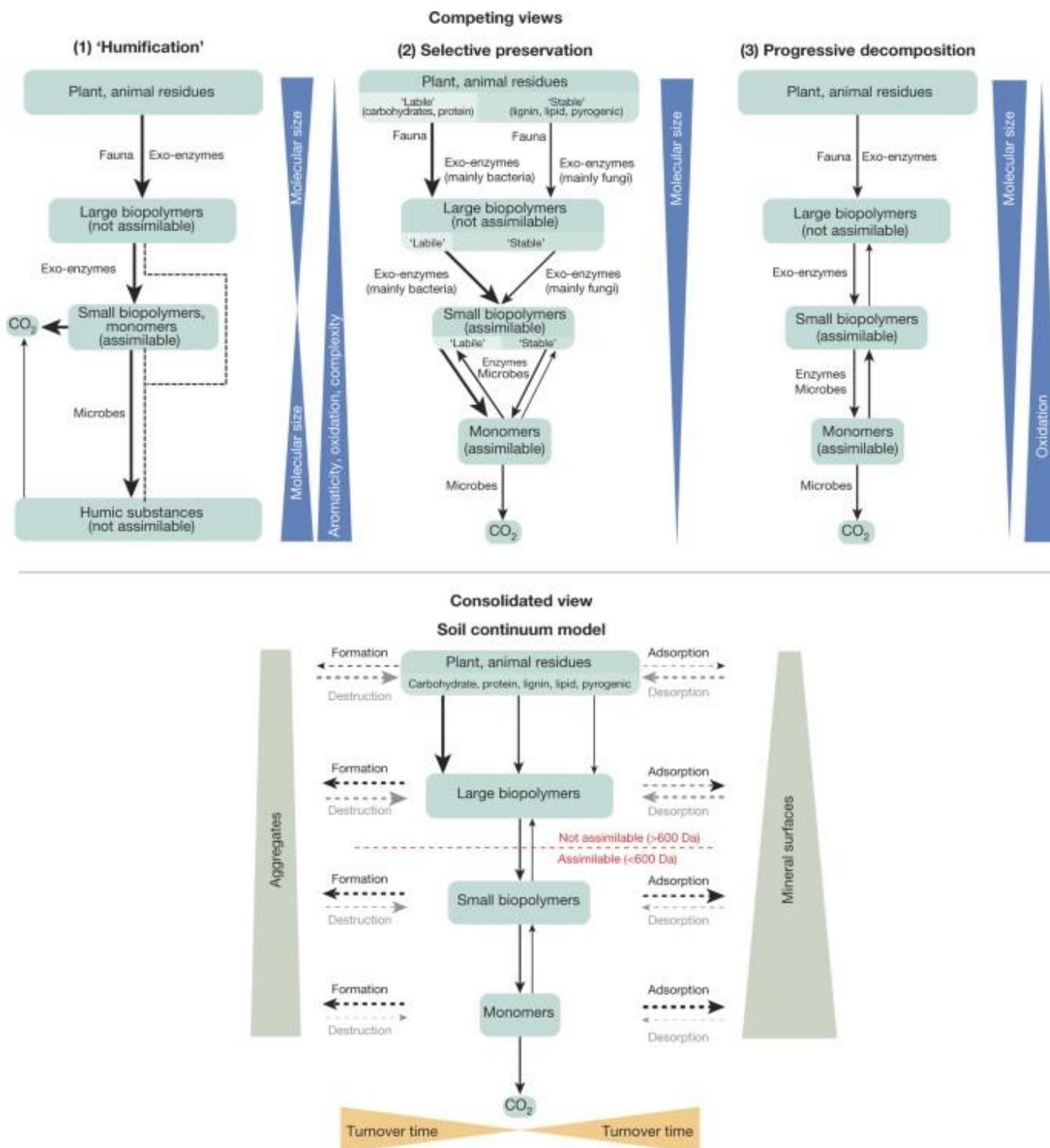


Figure 5 : Mise en perspective et réconciliation des modèles conceptuels historiques (1), (2), (3), du devenir de la MO dans le sol ; pour émerger vers une vue consolidée des cycles du continuum de la MO du sol. Les lignes fléchées pointillées indiquent un transfert principalement abiotique, les lignes pleines indiquent un transfert principalement biotique ; les lignes plus épaisses indiquent des taux plus rapides ; les cases et les extrémités ± grandes illustrent des pool plus grands ; toutes les différences sont illustratives. Toutes les flèches représentent des processus qui sont fonction de la température, de l'humidité et du biote présent (tiré de Lehmann et Kebler, 2015)

En accord avec ce nouveau paradigme, une nomenclature récente classe la MO du sol en MAOM (matière organique associée aux minéraux), POM (matière organique particulaire), et DOM (matière organique dissoute, assimilable à la MO labile) (Cambardella et Elliott, 1992; Christensen, 2001; von Lützw et al., 2007 ; Lavallee et al., 2020). Chacune de ces trois fractions a un comportement différent dans le sol, et influe donc différemment le cycle biologique du C. La figure 6 reprend les principales différences entre POM et MAOM qui sont les deux fractions constituant le stock effectif de MO dans un sol.

	POM	MAOM
Protection mechanisms	None or occlusion in large aggregates	Mineral associations (occlusion in fine aggregates, organo-mineral clusters, and micropores; sorption to mineral surfaces)
Mean residence time	<10 years—decades	Decades—centuries
Dominant formation pathway	Fragmentation, depolymerization	In vivo transformation or ex vivo modification of low molecular weight compounds
Subject to saturation?	No	Yes
Dominant chemical constituents	Plant-derived (e.g., phenols, celluloses, hemicelluloses), fungal-derived (e.g., chitin, xylanase)	Low molecular weight compounds of microbial (e.g., microbial polysaccharides, amino sugars, muramic acid) and plant origin
C/N ratio	10–40	8–13
Nutritional role	<ul style="list-style-type: none"> • More complex compounds with high activation energies • Not assimilable by plants, few or no assimilable compounds for microbes 	<ul style="list-style-type: none"> • More simple compounds with low activation energies • More assimilable compounds for microbes and plants

Figure 6 : Propriétés générales de la POM et la MAOM (tiré de Lavallee et al., 2020)

Le taux de MO d'un sol exprime un bilan entre : les pertes de MO (toutes catégories de MO confondues) par minéralisation ($=MO\ totale/taux\ de\ minéralisation\ de\ la\ MO$) et les gains de MO au cours du temps par stabilisation (Sollins et al., 1996 ; Morel, 1999). La séquestration de C organique tente de jouer autour de ce bilan : l'équilibre de ce bilan s'établit lorsque les pertes de MO égalent les gains. En raison de la lenteur des processus évolutifs de la MO stable, l'équilibre est long à atteindre, mais une fois qu'il est atteint, s'il est modifié il va recommencer à tendre vers un nouvel équilibre. Ce qui sous-tend aussi la notion de capacité stockante maximale de MO (CO) ; dans laquelle, la texture du sol joue un rôle central : la possibilité d'augmentation des concentrations absolues en C serait plus importante

pour les sols riches en argiles (>35%) que pour les sols moins riches (18-35%) (Lehtinen, et al., 2014). Van De Vreken et al. (2016) suggèrent cependant que la concentration en oxalates de Fe et d'Al extractibles, qui sont des minéraux contribuant aussi à la formation des complexes organo-minéraux, pourraient avoir un rôle plus important que la texture.

Ainsi, le concept d'accumulation de MO dans le sol au cours du temps, est selon un modèle mathématique récent, à comprendre globalement tel quel : quand des composés végétaux sont apportés au sol, la majorité est minéralisée et transformée en produits microbiens en moins d'un an ; pour les composés ligno-cellulosiques en quelques années ; globalement, du carbone apporté par la MO fraîche, 10 à 20% va être protégé de la décomposition et minéralisé ensuite très lentement, en plusieurs dizaines d'années (Pellerin et al., 2020). Ainsi, le stockage de MO (et donc de CO) est très largement déterminé par : la proportion de MO protégée de la décomposition qui alimentera le pool de MO au *turnover* le plus lent, et, le temps moyen de résidence de la MO stable au sein de ce pool le plus lent avant qu'elle ne soit à son tour décomposée (Pellerin et al., 2020).

La pédogenèse est un processus qui se fait sur l'échelle des temps géologiques par la transformation de la roche-mère sous l'action de facteurs physiques et chimiques (Kaviya et al., 2019 ; Des Marais, 2001). Mais les microorganismes, par leur action sur la MO du sol, du sol interviennent dans ce processus en le favorisant plus ou moins : par exemple, les champignons produisent des acides organiques qui vont altérer la roche-mère ; et de manière générale, la production de CO₂ par respiration et oxydation des microorganismes (et respiration des racines) libère de l'acide carbonique dans les espaces poreux, ce qui altère aussi la roche mère (Fung, 2003 ; Gadd, 2007 ; Cruse et al., 2013 ; Kaviya, 2019). Par ailleurs, plusieurs études montrent que les microorganismes peuvent favoriser la formations d'agrégats dans le sol : en sécrétant une variété de substances collantes réagissant avec la MO, les argiles, et les métaux polyvalents (particulièrement le cas des champignons, voire des champignons arbusculaires mycorhiziens) ; en liant les particules de sol grâce à leur hyphe (pour les champignons); en développant une charge électrostatique (à travers leur membrane cellulaire) qui maintiendra ensemble les microagrégats (pour les bactéries) ; (Chotte et al., 2005 ; Davinic et al., 2012 ; Kallenbach et al., 2016). Ainsi, il y a une rétroaction positive exercée par les microorganismes, sur l'activité des microorganismes, tel que schématisé par la figure7.

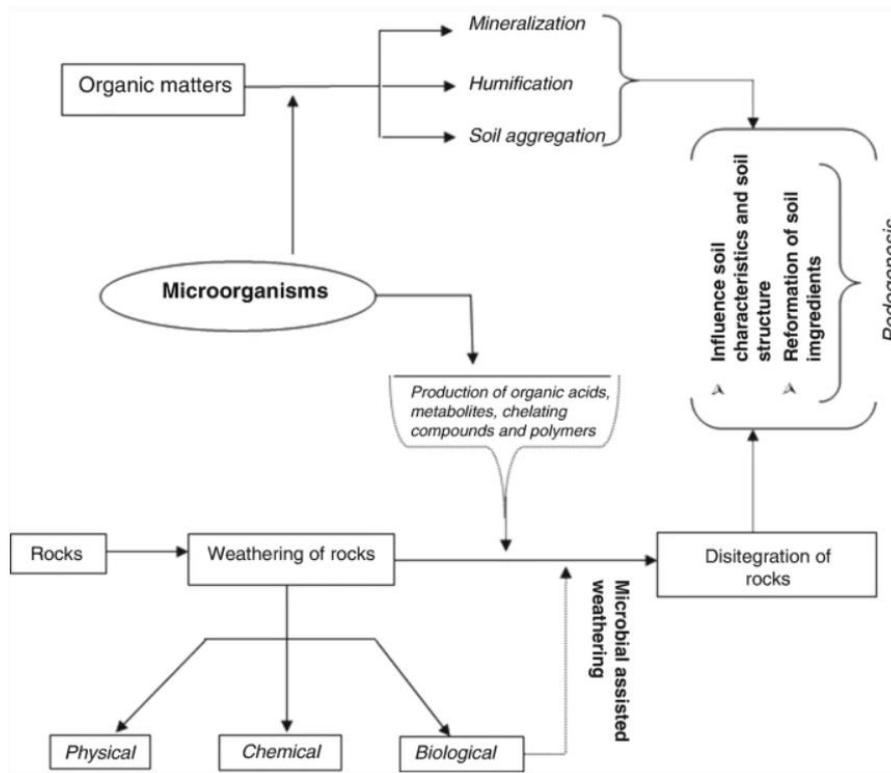


Figure 7 : Influences des microorganismes du sol sur la pédogenèse (tiré de Kaviya et al., 2019). En accord avec le nouveau modèle conceptuel du devenir de la MO, discuté plus haut, « humification » dans ce diagramme devrait plus vouloir dire décomposition en molécules de plus en plus petites.

Cette rétroaction positive peut contribuer à un temps de résidence plus long de la MO dans le sol, dans la mesure où les micro-agrégats (du micromètre au nanomètre) réduisent fortement les activités enzymatiques (Zimmerman et al., 2004), et donc favorisent son temps de résidence plus élevée en défavorisant sa décomposition si elle s’y trouve.

Rousk et al. (2015) ont montré que l’ajout de C labile stimule tellement les microorganismes en surface qu’ils respirent l’équivalent de 2 à 13 mois de MO du sol plus ou moins stabilisée. C’est le *priming*, et cet effet implique un stockage de C non proportionnel aux apports de MO, ainsi qu’une déstabilisation de la MO préexistante (surtout en profondeur). Ce n’est pas un phénomène nouveau (Roger, 1999) mais il est aujourd’hui mieux compris. D’après Fontaine et al. (2011), l’effet *priming* est par exemple effectué par certains champignons : quand la ressource en nutriments dans le sol est faible au moment de l’ajout de MO fraîche, les champignons explorent le sol pour minéraliser de la MO stabilisée d’abord depuis un long moment (quelques dizaines d’années), puis celle en profondeur depuis un très long moment (quelques milliers d’années), ceci afin d’avoir de l’énergie pour faire fonctionner leur catabolisme dans le but de décomposer la MO fraîche ajoutée ; au contraire quand la ressource en nutriments dans le sol est suffisante au moment de l’ajout de MO fraîche, les

champignons ne voient pas l'intérêt d'investir de l'énergie pour aller explorer le sol et ainsi diminuer le pool de MO stabilisée. Une compréhension, qui, mise en parallèle avec plusieurs travaux tendant à montrer : qu'un taux de décomposition plus élevé, engendré par un taux de CO₂ atmosphérique plus élevé, a en fait avant tout un effet contrasté sur les fractions POM et MAOM (dont seulement l'utilisation relative par les microorganismes change, sans impact sur le stock total de CO du sol) ; ce qui nous invite à relativiser les effets du changement climatique à venir en régions tempérées, en envisageant que la possible modification des dynamiques internes d'exploration et d'utilisation de la MO du sol par les microorganismes, ne soit pas nécessairement accompagnée d'une déplétion des stocks de CO (Cardon et al., 2001 ; Drake et al., 2011; Phillips et al., 2010 ; Sulman, et al., 2014 ; Keiluweit et al., 2015).

Cependant de manière plus générale, Mooshamer et al. (2014a, 2014b) suggèrent que, lorsque les microorganismes font face à un déséquilibre nutritionnel, que ce soit en C, N, ou phosphore (P), ils font des ajustements d'utilisation d'efficacité des éléments concernés, ce qui a pour effet de moduler les cycles de ces éléments, modulation qui entraîne ou non une cascade de changements de plus ou moins grande envergure sur la séquestration de CO.

A tout cela, de rajouter les facteurs qui modulent invariablement, de leur propre manière et à leur propre échelle, la dynamique de la MO dans le sol.

La biocénose dans le sol suit des schémas dans sa distribution spatiale (Bardgett et van der Putten, 2014). (i) À la plus petite échelle spatiale (du micromètre au millimètre) : la distribution suit les propriétés du sol telles que l'eau du sol et la variation dans la micro-architecture du sol ce qui joue sur la minéralisation et la persistance de la MO (car (a) l'activité des microorganismes dans les agrégats est conditionnée par la diffusion de l'oxygène dans l'agrégat or celle-ci diminue avec l'eau même si paradoxalement l'eau augmente l'espace disponible à la croissance dans les agrégats, et ces deux effets opposés sont conditionnés par la porosité structurale et texturale, et donc ultimement, par la texture et la structure du sol (Roger Garcia, 2001), (b) ceci impacte la minéralisation du C de la POM dans les micropores des microagrégats, ainsi que la formation de MAOM à partir de cette POM minéralisée en fonction du réseau de pores dans le microagrégat (Schlüter et al., 2022), (c) en outre Sessitsch et al. (2001) ont montré que plus la taille de l'agrégat était petit, plus la communauté microbienne était diverse et nombreuse). (ii) À l'échelle locale (du centimètre au mètre) : la distribution spatiale conditionne la température (dépend localement de la granulométrie (Pellerin et al., 2020), mais conditionne aussi par exemple le pH (varie le long du profil du sol et selon la texture du sol, en fonction de la présence plus ou moins élevée de

certaines ou certains autres ions, ce qui joue beaucoup sur l'abondance relative d'espèce microbiennes/de groupes fonctionnels et donc sur la biodiversité microbienne dans de très petits espaces (Pankhurst et al., 1996).

La biocénose du sol suit des schémas aussi dans sa distribution temporelle (Ranjard et Richaume, 2001 ; Bardgett et Van der Putten, 2014). (i) Sur des échelles de temps réduites (quelques jours) la communauté microbienne répond rapidement aux pics locaux de MO exploitables et variations climatiques rapides, car à ceux-ci sont associés des pics d'émission de N₂O et CO₂ (par exemple un pic d'exsudats racinaires). (ii) Sur des échelles de temps plus longues (une saison de culture) la communauté microbienne varie dans sa biodiversité voire change du tout au tout en fonction de la gestion du sol, de la fertilité du sol et de la culture en place (par exemple, le type et la quantité de substrat organique végétal influence fortement la diversité fonctionnelle de la communauté microbienne (De Fede et al., 2001 ; Grayston et al., 2001), or Six et al. (2006) proposent par exemple que plus de C stable serait formé en fonction de l'efficacité d'utilisation du C de la communauté microbienne considérée (Smit et al., 2001 ; Lauber et al., 2013).

L'incorporation des résidus de culture et le travail du sol induisent toutes deux des variations saisonnières dans les processus microbiens et la dynamique des nutriments (Whalen et Hamel, 2004).

La relation dynamique entre microorganismes du sol et accumulation de MO est inhéremment complexe. Mais il était nécessaire de l'explicitier dans son essence afin de l'étudier.

E. Facteurs d'influence sur le stockage du C

Il s'agit dans cette partie de traiter des pratiques culturales appliquées testées expérimentalement dans l'essai étudié, et leurs éventuels effets sur la dynamique du stockage de MO (CO).

Les pratiques culturales sont conçues pour maximiser le rendement de la culture, mais elles impliquent souvent des effets multilatéraux dans les différentes composantes des agroécosystèmes : des adventices jusqu'au microclimat au-dessus des parcelles... (Whalen et Hamel, 2004).

D'après l'IPCC (2006), la période à partir de laquelle l'effet d'une pratique peut être mise en évidence sur le stockage de CO est généralement 20 ans. Mais certains auteurs considèrent 12 (Liu et al., 2014) voire 7 années (Goidts et van Wesemael, 2007) une période suffisante.

1. Travail du sol

À court terme, le travail du sol induit des pertes de CO₂ à partir du sol : la quantité perdue étant proportionnelle au volume de sol perturbé (Reickosy et Lindstrom, 1993 ; Rochette et Flanagan, 1999 ; Reickosy et Archer, 2007). Le travail du sol par inversion complète (avec une charrue à versoirs) avant la culture est considéré comme une cause primaire de perte de C du sol (Reickosy et Lindstrom, 1993). Tandis que le travail de conservation du sol ¹¹ montre, globalement, au moins un statu quo, au mieux un stockage de CO : Alvarez (2005) dans une méta-analyse des données d'études de 137 sites, met en évidence que l'accumulation de CO du sol en travail réduit du sol suit une courbe sigmoïdale en fonction du temps, dans 26% des cas. Il montre aussi que le stockage annuel de CO en travail réduit (par rapport au labour conventionnel) est beaucoup plus important (12 tC.ha⁻¹ contre 2.1 tC.ha⁻¹) quand le taux de MO (CO) du sol a atteint son équilibre. Cependant il y a tendance à avoir entre labour conventionnel vs travail réduit, et labour conventionnel vs non travail, des écarts de taux stockage plus élevés en cas de non travail (Alvarez, 2005 ; Meurer et al., 2018). Le non travail montre aussi clairement une tendance à l'accumulation de CO dans la très proche surface (5-10cm), ce qui n'est pas toujours le cas du travail réduit (West et Post 2002; Six et al. 2002; Sperow et al., 2003 ; Alvarez, 2005). A l'heure actuelle il n'existe cependant pas de modèle de l'effet du travail du sol sur le stockage de CO expliquant la totalité des effets réels observés au champ (Pellerin et al., 2020).

Les pertes en CO₂ des sols de plus long terme sont, en revanche, principalement dérivées de la décomposition microbienne des résidus de MO du sol/racines/rhizodépôts/ (Brown et al., 2013). Le travail du sol ne faisant qu'influencer cela.

Premièrement, l'intensité et le type de travail du sol contrôlent directement la disponibilité en substrat pour les microorganismes ainsi que le taux de décomposition des substrats : en affectant la quantité et la distribution des résidus de culture (et des racines) dans le profil du sol (Huggins et al., 2007). La profondeur d'enfouissement (ou de mélange) impacte aussi la répartition du stock de CO (Pellerin et al., 2020) : Meurer et al. (2018) rapportent par exemple que le taux de stockage de CO augmente sur les 30 premiers cm en travail de conservation comparativement à labour conventionnel, mais sur 150 cm les différences sont gommées. En effet, même si de manière générale il est reconnu que le travail réduit favorise la séquestration

¹¹ Toute méthode de travail du sol qui laisse au moins une couverture de 30% de la surface du sol par les résidus de culture. La forme la plus extrême est l'absolu non travail du sol, les formes les moins extrêmes sont sa perturbation en surface (la MO est alors mélangée à la terre) (Franzleubbers, 2004).

de CO, il est de rigueur de nuancer : la charrue à versoirs enterre les résidus au plus bas de la couche de labour (généralement 30cm), des labours répétés mélangent et redistribuent la MO dans l'entièreté de la couche de labour, après 10 ans de labour la MO est répartie uniformément dans l'entièreté de la couche de labour (Angers et al., 1995 ; Clapp, 2000 ; Franzleubbers, 2004) ; ainsi, après un long moment de mélange, la MO dérivée des résidus s'associe aux argiles ce qui favorise aussi le stockage en labour (Balesdent, 2000). En outre, l'impact que le travail du sol a sur la séquestration de CO est contrôlé de manière générale par le climat. Fanzleubbers (2002) dans une étude en Amérique du nord, rapporte que selon l'écorégion, la distribution de la MO le long du profil entre non travail et labour conventionnel, est plus marquée dans les climats chauds et humides que dans les climats froids et secs. Ogle et al. (2015) montrent similairement dans une méta-analyse, que l'impact du travail du sol est plus grand dans un environnement tropical humide que dans un environnement tempéré sec.

Deuxièmement, le travail du sol contrôle indirectement les processus de décomposition microbienne en influençant l'aération du sol, son contenu en eau, sa température et surtout les propriétés des agrégats (Brown et al., 2013). En effet, (i) travailler le sol est aussi synonyme de sa fragmentation, fragmentation qui détruit les agrégats et aussi agit sur la localisation de la MO à l'intérieur de ceux-ci (Pellerin et al., 2020). D'où, fragmenter le sol veut en fait dire : soit lever la restriction de décomposition sur la MO protégée dans les agrégats, soit modifier la dynamique de minéralisation de la MO à l'échelle de l'architecture de l'agrégat. (ii) Favoriser le contact entre les résidus et la terre en mélangeant le sol joue aussi sur les dynamiques de minéralisation de la MO en facilitant la colonisation des résidus et la disponibilité du N minéral des résidus incorporés (Balesdent, et al., 2000 ; White et Rice, 2009). Mais, Six et al. (2002) précisent, en proposant que, s'il y a une meilleure stabilisation de CO observée en RT (West et Post, 2002), ce serait plus spécifiquement parce que le *turnover* en CT est rapide ce qui fournit moins d'opportunités pour la stabilisation de la POM au sein des microagrégats stables formés dans les macroagrégats ; alors que le *turnover* des macroagrégats lent en RT permet la formation de plus de microagrégats et donc plus de stabilisation de CO.

Le type de travail du sol joue sur l'émission de N₂O (Rochette et al., 2008), car il joue sur plusieurs variables déterminantes pour le processus de dénitrification : compacité du sol, régime hydrique, régime thermique, disponibilité en C et en N ... (Pellerin et al., 2020). Six et al. (2004) ont fait une étude sur un essai de longue durée, les résultats montraient que les

émissions de N₂O augmentent en non labour (comparé au labour) jusque 10 ans après l'abandon du labour conventionnel, mais au bout de 20 ans la dénitrification s'amointrit. D'après eux, ceci est dû à des changements de l'état structural du sol sous influence de l'activité biologique en non labour : il est devenu plus poreux et plus drainant.

D'après Cookson et al. (2008) l'intensité du travail du sol influe sur la biomasse et l'efficience métabolique des microorganismes : plus la perturbation du travail du sol est importante, plus la biomasse fongique diminuerait et la biomasse bactérienne augmenterait ; et, en fonction de la profondeur où on se place et du type de travail du sol, les microorganismes utiliseraient différemment les substrats à leur disposition (par exemple les microorganismes en surface et dans un sol peu ou pas perturbé utilisaient plus les acides carboxyliques que ceux en profondeur ou dans un sol labouré). Six et al. (2006) observant une amélioration quantitative et qualitative de la MO du sol des agroécosystèmes favorisant une communauté microbienne à dominance fongique. D'après Zhang et al. (2022), les résultats d'un essai de long terme (16 ans) testant les impacts du travail du sol et de la fertilisation minérale, montrent que : l'efficience d'utilisation du C augmente avec la fertilisation dans la couche 0-10cm et elle augmente plus en non travail du sol qu'en labour conventionnel, mais la diversité microbienne chute avec la fertilisation mais chute moins en non travail. Ce qui suggère plus de potentiel d'augmentation de la POM et MAOM en non travail.

2. Rétention des résidus

La rétention des résidus et leur incorporation au sol a des effets généraux sur la texture et la structure du sol. (i) Restituer les résidus de culture au sol peut améliorer les propriétés physiques du sol par : augmentation de la teneur en humidité, diminution de la densité apparente, augmentation de la porosité totale et de la stabilité des agrégats (Lou et al., 2011 ; Brankatschk et Frinbeiner, 2015 ; Zhao et al., 2019). Xu et al. (2018) ont observé qu'incorporer des résidus de maïs sur un sol sablo-limoneux faisait baisser la densité apparente le long du profil du sol, et un peu plus dans la couche 0-20 cm que dans la couche 20-40 cm. Ils ont aussi observé un effet différencié pendant la saison de croissance : restituer les résidus améliorerait le rendement en grain, principalement via le poids 1000grains. Gao et al. (2020) ont aussi observé dans un essai de 6 ans cet effet différencié au cours de la saison de culture, mais à un autre moment : la porosité s'est vue augmentée de 23% au moment de la maturité physiologique. (ii) Restituer et incorporer les résidus de culture peut changer le pH, en lien avec le cycle biologiques de l'N : dans deux sols acides (podosol avec un pH initial de 4.5 et tenosol avec un pH initial de 6.2), Butterly et al. (2013) ont réussi à augmenter le pH

initial pendant 26 mois. Ce phénomène était dû d'une part à la composition biochimique des résidus et au type du sol : la MO s'associe facilement aux ions H^+ du sol si le pH du sol est inférieur au pKa des groupes acides des composés organiques. D'autre part à la décarboxylation et à l'ammonification des composés organiques azotés dans le cadre du cycle biologique de l'N. Il n'est pas nécessaire d'avoir une décomposition complète des résidus pour observer un changement de pH par la voie biologique (Tang et Yu, 1999). (iii) Restituer et incorporer les résidus influence la capacité d'échange cationique du sol (CEC). Rezig et al. (2013) ont montré qu'après 5 saisons de culture, l'incorporation de résidus de froment augmentait substantiellement (+21%) la CEC dans la couche 0-20cm, comparé au contrôle (+9%). (iv) Incorporer les résidus protège plus les agrégats vis-à-vis de l'impact des pluies, et des risques de compaction et d'érosion associés (Turmel, 2015).

Chacun de ces effets sur la structure et/ou la texture du sol améliore plus ou moins le stockage de CO par voie de conséquence. L'effet indirect d'une meilleure stabilité structurale est une augmentation du C stable dans le sol (Chenu et al., 2000 ; Bronick et al., 2005). D'après Mitchell et al. (2018), l'incorporation en surface des résidus joue dans le stock de MO du sol, car la MO en dérivée s'accumule rapidement dans la MAOM aux stades les plus précoces de la décomposition, ce qui mène à la formation de puits de C et d'N de long terme comme de court-terme. Même si la nuance est de rigueur car les taux d'accumulation dans la POM, plus facilement décomposable, sont tout aussi voire plus grands, surtout quand le sol approche sa saturation.

Les résidus incorporés augmentent la température et l'aération du sol ce qui crée un environnement favorable pour les microorganismes (Turmel, 2015). La biomasse microbienne et les activités de minéralisation seraient supérieures en surface dans les sols non labourés, suivant la répartition des résidus dans le profil dès les premières années de traitement (McCarty et al., 1998 ; Andrade, 2003 ; Vian, 2009). La masse volumique du sol serait en fait corrélée positivement à la population de bactéries anaérobies (Rahman et al., 2008) : d'après une méta-analyse de Zuber et Vilamil (2016) réalisée sur les données tirées de 139 études, le travail réduit promeut une communauté microbienne plus grande et plus active (enzymatiquement). Le type de résidus incorporé joue aussi sur la communauté microbienne : Su et al. (2020, dans Fu et al., 2021) ont montré que comparé à l'incorporation de résidus de froments, incorporer des résidus de maïs engendre une diversité fongique plus faible et une pathogénicité fongique plus élevée. Ils ont aussi observé que retourner des résidus de froment faisait baisser l'abondance relative de bactéries et champignons mais faisait augmenter celle

d'actinomycètes. Enfin, des changements dans la biomasse microbienne peuvent provenir de la quantité de substrats incorporés (Lee et Pankrust, 1996).

F. Diacétate de fluorescéine

Les activités enzymatiques reflètent les effets cumulatifs de la disponibilité en substrat, la demande de produit, l'activité microbienne et les conditions environnementales (Allison et al., 2011)

Des études conduites sous différents climats montrent comment les activités enzymatiques des microorganismes répondent jusqu'aux modifications les plus subtiles dans les conditions environnementales et les pratiques culturales telles que le travail du sol, la fertilisation minérale, l'application d'herbicides et de pesticides (Seghers et al., 2003 ; Alvear et al., 2005 ; Garcia-Ruiz et al., 2008 ; Gianfreda et Rao, 2011). Chu et al. (2016) ont même montré comment différents types d'enzymes répondent différemment à différentes pratiques culturales : dans la couche 0-10cm le non labour a augmenté l'activité de toutes les activités enzymatiques mesurées, tandis que le type de culture a affecté différemment chacune des enzymes testées.

La mesure de l'hydrolyse du diacétate de fluorescéine est communément utilisée pour investiguer l'effet des pratiques culturales sur les microorganismes du sol (Bandick et Dick, 1999 ; Haynes et Tregurtha, 1999).

IV. Matériel et méthodes

A. Matériel

1. Site expérimental

a) Localisation

Le site expérimental est situé en Belgique, en région wallonne, sur la ferme expérimentale de Gembloux Agro Bio-Tech (Latitude 50° 33' 45,92"N, Longitude 4° 42' 48,97"E). Il représente

une totalité d'1.7ha. Il possède des pentes allant de 1 à 5%, excepté sur une petite partie de sa surface où les pentes vont de 7 à 15% (WalOnMap, 2022).

b) Climat

Le climat local est océanique tempéré dans la classification de Köppen-Geiger. Il est caractérisé par des étés humides et des hivers doux et pluvieux (Lognoul et al., 2017), avec des précipitations annuelles moyennes de 819mm et une température annuelle moyenne de 9.8°C, observées sur la période 2009-2015 (Hiel et al., 2018).

Au cours des 30 dernières années, il y a eu environ 30 jours de gel en période hivernale (décembre à février) à l'échelle du pays mais l'hiver 2022 n'a présenté en moyenne que 16 jours de gel (BCGMS, 2022a). Sur la période de janvier à juin, pour l'année 2022, comparativement aux valeurs observées depuis les 30 dernières années dans la région agricole à laquelle appartient le site : le cumul des précipitations est globalement inférieur (d'environ 25%) et était caractérisé par l'alternance marquée de périodes sèches et pluvieuses, mais le cumul des degrés-jours est quant à lui globalement supérieur (d'environ 7%) (BCGMS, 2022b).

c) Pédologie

Le sol est un sol minéral à drainage naturel favorable. Il est de type luvisol cutanique selon la classification de la WRB (World Reference Base for Soil Resources). En effet, sa texture, héritée de dépôts de loess, est majoritairement limoneuse : avec 70 à 80% de limon, 18 à 22% d'argile et 5 à 10% de particules de sable (Degrune et al., 2016). L'horizon A est majoritairement mince (<40cm d'épaisseur) mais par endroits il est épais (>40cm). L'horizon B est principalement textural mais par endroits il est structural (Bah et al., 2005 ; Legrain, 2009 ; WalOnMap, 2022).

d) Caractéristiques physico-chimiques

D'après une étude physico-chimique réalisée en 2016 (Degrune et al., 2016), la MO dans l'horizon de surface était caractérisée par un ratio C :N variant entre 10 et 12. D'après une autre étude physico-chimique réalisée en 2018 (Hiel et al., 2018), toujours dans l'horizon de surface : le pH moyen des sols du site était de 6.79, les teneurs moyennes en P et K étaient respectivement de 1.49 et 2.56 mg.g⁻¹ de terre sèche.

En comparaison avec la moyenne des sols sous cultures de la région agricole dont fait partie ce site (pour la période 2003-2008) (Genot et al., 2008) : les valeurs de pH du site sont

normales (avec un pH 6.6 pour la moyenne régionale) mais les valeurs de ses éléments nutritifs sont faibles (avec des moyennes régionales de 9.8 en P et en 19.4 en K).

2. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est un carré latin de 4 lignes et 4 colonnes, soit 16 parcelles : 4 modalités sont répétées 4 fois. Chaque parcelle fait 40m de long et 15m de large. Les 4 modalités sont : travail conventionnel du sol avec exportation des résidus de culture (CTR-) ou avec restitution des résidus de culture (CTR+) et travail réduit du sol avec exportation des résidus de culture (RTR-) ou avec restitution des résidus de culture (RTR+).

Il a été mis en place en automne 2008, de même que l'itinéraire technique et les traitements. Avant 2008 le site entier était en travail conventionnel.

La figure 8 récapitule le dispositif expérimental en donnant en plus une correspondance entre numéros de parcelles et modalités expérimentales.

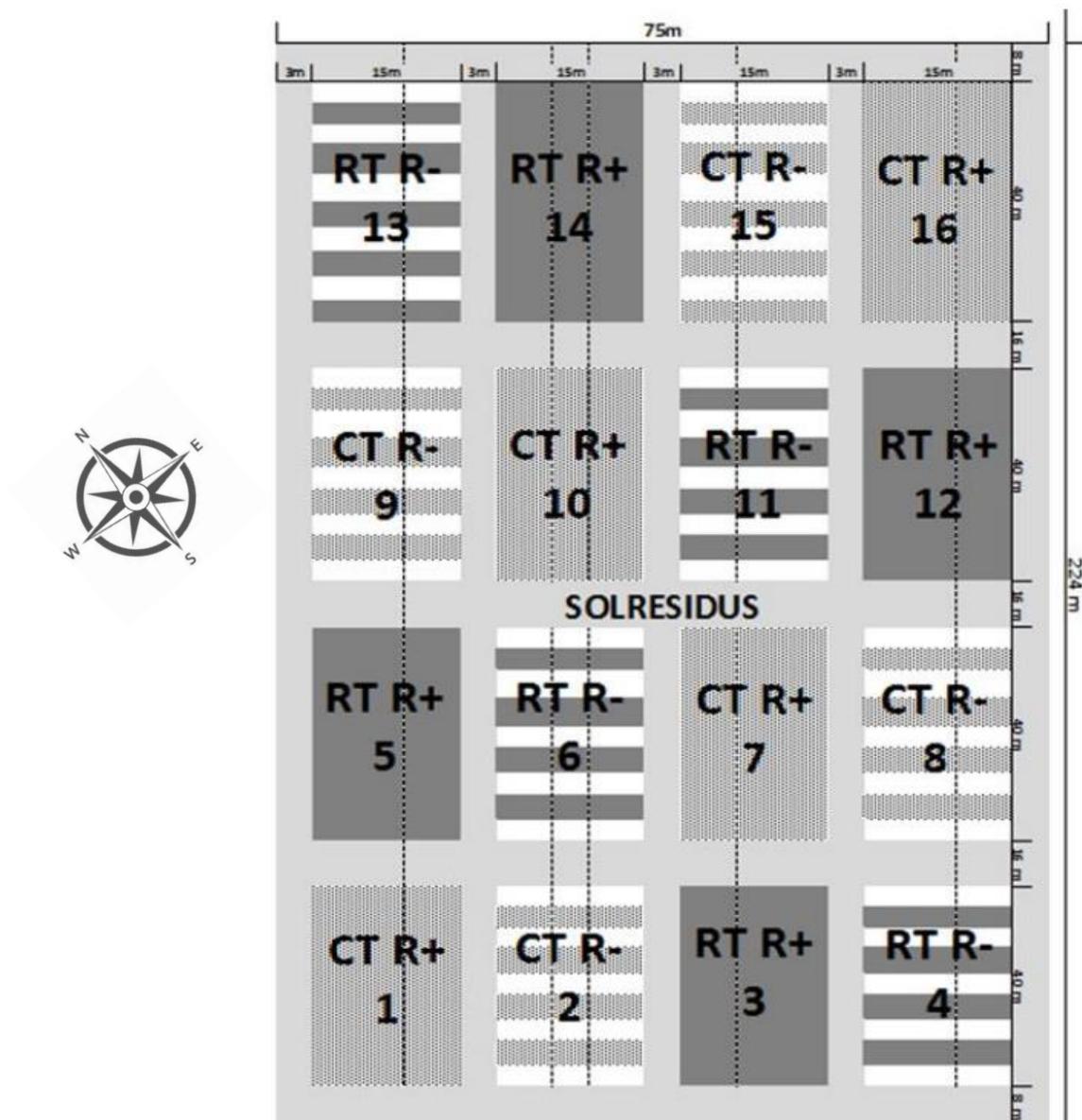


Figure 8 : Vue d'ensemble du plan expérimental SOLRESIDUS avec parcelles numérotées. RT : travail réduit du sol; CT : travail conventionnel du sol; + : résidus de culture incorporé dans le sol; - : résidus de culture exportés)

3. Itinéraire technique, pratiques culturales et traitements expérimentaux

La rotation culturale depuis le début de l'essai était comme suit : colza d'hiver (*Brassica napus*) en 2008-09, froment d'hiver (*Triticum aestivum*) en 2009-10, 2010-11 et 2011-12¹², moutarde (*Sinapis alba*) de couverture en 2012-13, féverole (*Vicia Faba*) en 2013, froment d'hiver en 2014, maïs (*Zea mays*) en 2015, froment d'hiver en 2016, betterave sucrière (*Beta vulgaris*) en 2017, froment d'hiver en 2018, colza d'hiver en 2019, maïs en 2019, froment

¹² La monoculture de froment au lancement de l'essai a été dictée par des impératifs expérimentaux de mise au point des mesures à établir

d'hiver en 2020, betterave sucrière en 2021. Cette année 2022 la culture plantée et donc celle sur laquelle porte la présente étude était du froment d'hiver.

Les résidus correspondent aux pailles récoltables. L'exportation des pailles est réalisée par pressage et enlèvement des ballots, laissant sur le champ les chaumes et les menues pailles. Pour le colza l'entièreté des pailles et des siliques est exportée.

Toutes les parcelles sont déchaumées deux fois lors de l'interculture à une profondeur de 10cm. Le déchaumage sert entre autre à mélanger en surface les résidus laissés au champ sur les parcelles avec rétention de résidus (R+). Mais les parcelles en travail conventionnel (CT) sont, en plus des déchaumages, labourées à une profondeur de 25cm avec une charrue à socs. Ainsi, sur les parcelles CTR+, les résidus sont enfouis en profondeur.

La préparation du lit de semences est identique sur toutes les parcelles et se fait à une profondeur de 7 cm avec un combiné rotative-semoir précédé par le passage d'un outil avant de type poussiculteur. La fertilisation minérale et les traitements fongicides et herbicides sont aussi les mêmes partout.

B. Méthodes

A chaque culture précédente des mesures ont été faites sur l'essai dans une perspective d'approche multidisciplinaire des modalités expérimentales testées : taux de germination, développement de la culture (stades BBCH et quantification de la biomasse), respiration du sol à l'aide de chambres fermées dynamiques Exception faite toutefois des deux premières saisons culturales qui ont servi à enclencher la différenciation entre les quatre modalités étudiées.

1. Mesures effectuée sur la culture

Dans le cadre de cette étude, nous avons repris certaines des mesures mises en place depuis le lancement de l'essai : celles qui nous permettraient de décrire le comportement général de la culture sous chaque modalité. Ce qui est un point nécessaire pour tirer des conclusions par rapport à une partie de notre question de recherche : afin de voir si les modalités expérimentales ont un effet sur la production de biomasse, en lien avec des préoccupations de rendement des cultures.

a) *Levée des semences*

Le suivi de la levée consistait à observer les graines semées ayant donné de jeunes pousses en sortie d'hiver. C'est une mesure qui a été faite une seule fois (le 10 mars).

Une observation consistait au dénombrement de tigelles émergées sur une longueur de 50cm, sur une ligne de semis. Il y a eu quatre observations par parcelles.

L'échantillonnage était de type systématique : le premier point d'observation a été choisi aléatoirement à l'entrée de la parcelle, le reste des points ont été choisis de manière systématique par rapport au premier point.

b) Stades BBCH

Le suivi de la phénologie consistait à évaluer à intervalle régulier le stade phénologique de la culture pendant qu'elle se développe. « *Le développement correspond aux étapes successives de différenciation par lesquelles passe l'épi du blé, depuis la germination de la graine, quand il n'est qu'un amas de cellules indifférenciées en division, jusqu'à la récolte* » (Gouache, 2015). C'est une mesure qui a été faite de manière hebdomadaire : à partir du 17 mars (en début de tallage) jusqu'au 10 juillet (le plus tard possible en fonction de la date de rendu du TFE).

Une observation consistait à observer visuellement (via dissection ou non, en fonction de ce qu'on souhaite observer) un plant de froment pour lui attribuer un stade sur l'échelle BBCH des céréales (cf. annexe 1). Il y a eu au départ (pour les quatre premières mesures) 10 observations par parcelle puis le nombre d'observation a été réduit à 3 par parcelle (à partir de la cinquième mesure).

Les plants ont été prélevés à la truelle.

L'échantillonnage était de type systématique.

c) Biomasse aérienne

Le suivi de la biomasse aérienne consistait à évaluer à intervalle régulier la croissance de la partie aérienne (tige et feuilles) de la culture. C'est une mesure qui a été faite deux fois : le 21 avril et le 11 mai.

Une observation consistait à prélever (au sécateur) la partie aérienne (jusqu'à ras du sol) de tous les plants de froment dans un quadrat (environ 0.5m²) afin de les sécher (à l'étuve dans des sacs microperforés : 72h à 65°C) puis les peser. Nous avons fait deux observations par parcelle.

L'échantillonnage était de type systématique.

2. Mesures effectuées sur les sols

Il s'agit de mesures inédites, en complément des mesures générales sur la culture, pour répondre à l'autre partie de notre de recherche.

a) Échantillonnage et conditionnement des sols

Nous avons étudié le sol sur une profondeur de 25cm car nous n'avons pas jugé nécessaire de prélever plus profond pour voir des différences entre les modalités.

Les prélèvements ont été fait avec une tarière à main selon un échantillonnage composite : un sous-échantillon comprenait quatre prélèvements équidistant les uns des autres (de sorte à dessiner les contours d'un quadrat). Il y avait quatre sous-échantillons par parcelle formant l'échantillon composite pour une parcelle, ceci afin de limiter au plus l'hétérogénéité spatiale inhérente aux sols. Faire des échantillons composites est essentiel pour évaluer la variabilité horizontale et la variabilité verticale de la répartition des microorganismes dans le sol (Ranjard et Richaume, 2001).

Tous les prélèvements ont été fait en une fois (le 25 avril).

Nous avons mis les échantillons dans des sacs en plastique à la suite de leur prélèvement puis les avons entreposés au réfrigérateur à 4°C, dès le retour du champ, afin de stopper la plus grande partie de l'activité biologique du sol en attendant qu'ils soient analysés.

Une fois dans les sacs, les mottes et les carottes ont été brisées à la main pour homogénéiser le plus possible leur contenu.

L'échantillonnage était de type systématique.

b) Analyses physico-chimiques

Nous avons pris du sol, de chacun des seize échantillons composite (le 25 mai), pour les envoyer au laboratoire provincial d'analyses agricoles de la Hulpe qui a effectué les analyses physico-chimiques suivantes : pH, teneurs en C organique et en C total (mg/kg), teneur en N total (%), C :N, humus (%) teneurs en P, K, Mg, Ca (mg/100g).

Le pH a été mesuré dans une solution de KCl. Le C organique, le C total et l'N total ont été mesurés par combustion sèche selon la méthode Dumas. L'humus a été calculé à partir d'un facteur de conversion entre le CO organique et le C total. Le P disponible a été déterminé par

dosage par colorimétrie à flux d'injection. Les cations disponibles ont été déterminés par dosage par colorimétrie à flux d'injection ¹³.

c) *Activité enzymatique des microorganismes du sol*

La méthode choisie est le dosage par spectrofluorométrie de l'hydrolyse du diacétate de fluorescéine (FDA) par un sol.

Son principe est de faire hydrolyser par les microorganismes d'un sol le substrat fluorogénique qu'est le FDA. Cette hydrolyse produira de la fluorescéine qui est un composé fluorescent sous UV. Ainsi, quantifier la fluorescence d'un mix réactif, dans une plage de temps donnée, équivaut à une mesure de l'intensité de l'activité microbienne totale d'un sol. Autrement dit, au *turnover* de la MO de ce sol.

Il s'agit d'une technique microbiologique : la fluorescence est mesurée dans une microplaque ELISA de 96 puits. Ainsi, la fluorescence d'un puit de la microplaque, constitue une mesure d'activité enzymatique, pour le sol utilisé dans ce puit. Nous avons donc fait 8 répétitions par parcelle, en guise des 8 puits retrouvés par colonne d'une plaque, avec : pour chaque parcelle, en plus de la colonne mesurant l'hydrolyse une colonne témoin positif contenant de la fluorescéine en concentration croissante ainsi que du sol et du tampon ; et, pour chaque plaque mesurée, deux témoins négatifs (un premier ne contenant que de la FDA et du tampon, et un second autre ne contenant que du tampon). Nous avons retenu un temps de 3h avant d'interrompre chaque hydrolyse, ceci après avoir fait une première mesure de calibration (avec seulement de la fluorescéine et du tampon). L'avantage de cette méthode est qu'elle est automatisée, relativement rapide et peut être appliquée dès que le sol a été prélevé.

Nous avons produit un protocole détaillé de cette méthode, en l'ajustant par essai/erreur lors de l'expérimentation, voir annexe 2.

La première microplaque (contenant les sols de quatre parcelles) a été préparée et mesurée le 26 avril, la deuxième et la troisième toutes deux le 28 avril, et la dernière le 20 mai. Le délai est dû aux possibilités limitées de réservation du spectrofluorimètre.

Les résultats que nous avons utilisé étaient les données des plaques à $t=3h$. Pour chaque plaque : nous avons soustrait la fluorescence du premier témoin négatif à la fluorescence de la fluorescéine produite par hydrolyse dans chaque répétition ; puis, les témoins positifs,

¹³ Source : site du laboratoire

<https://www.brabantwallon.be/bw/entreprendre-travailler/agriculture-1/pole-laboratoires-d-analyses-agricoles/>

particuliers à chaque parcelle, ont servi à établir une droite d'étalonnage (concentration de fluorescéine = f(flourescence du témoin positif) pour chaque parcelle, grâce à laquelle les répétitions de fluorescences des hydrolyses de chaque parcelle ont été traduites en concentration de fluorescéine. Ce qui nous donne une quantité de fluorescéine produite par hydrolyse et corrigée par le témoin négatif. Ainsi nous avons pu calculer la fluorescéine produite en moyenne par l'activité enzymatique d'un sol d'une parcelle (Sigler, 2004).

Ceci dit, les 8 répétitions n'ont pas été utilisées à chaque fois, pour chaque parcelle, dans le calcul de la moyenne par parcelle : certaines répétitions donnaient des valeurs aberrantes, ces dernières ont alors été retirées du calcul de la moyenne des répétitions afin d'éviter de fausser inutilement l'incertitude sur les données.

d) *Respiration microbienne*

Nous avons choisi la méthode MicroResp. C'est une technologie brevetée et commercialisée. Elle permet de doser par colorimétrie la respiration des microorganismes d'un sol, sur une courte période de temps (entre 4 et 6h, mais nous avons retenu 6h, comme proposé par Renault et al., 2013, et aussi après expérimentation).

Son principe est de disposer deux microplaques face à face en montant l'une, renversée sur l'autre : les deux microplaques étant séparées par un troisième élément (*seal* sur la figure 9), faisant en sorte que l'ensemble des puits de chaque plaque se faisant face deux à deux, communiquent entre eux en vase clos.

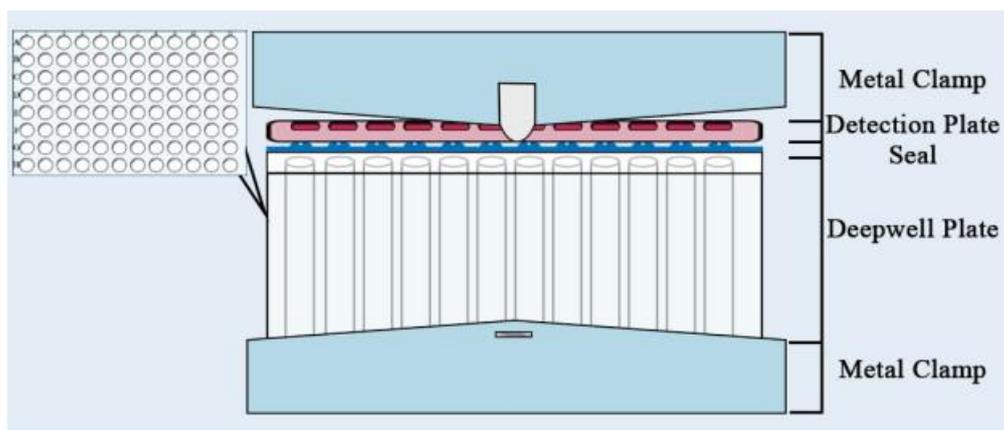


Figure 9 : Les composants du système MicroResp (tiré de Onica et al., 2018)

Une des microplaques est à puits profonds et contient une quantité fixée de sol (*deepwell plate* sur la figure 9). L'autre est une microplaque ELISA et contient une quantité fixée d'un gel d'indication préparé au préalable (*detection plate* sur la figure 9). Ce gel d'indication contient

du bicarbonate de sodium ce qui fait que lorsqu'il est exposé à du CO₂ gazeux, son pH s'acidifie par adsorption. A mesure que le pH s'acidifie, un indicateur coloré lui donnant sa couleur, et sensible aux changements de pH, change de couleur. Ainsi, lorsque les microorganismes du sol dans l'une plaque respirent, le gel change de couleur dans l'autre plaque au fur et à mesure du temps. Ce changement de couleur est quantifié par spectrophotométrie : en soustrayant l'absorbance mesurée du gel dans les puits après 6h de respiration des microorganismes à celle mesurée avant le montage du dispositif (au temps 0). Il s'agit aussi d'une manière d'estimer l'activité microbienne totale d'un sol.

Tout comme la méthode employée pour mesurer l'activité enzymatique, un puit représente une mesure. Nous avons donc fait 16 répétitions par parcelle, avec deux témoins négatifs par plaque mesurée : c'est-à-dire des colonnes ne contenant aucun sol. Dans les plaques, nous avons réparti les répliques des sols en bloc randomisé à la manière de Creamer et al. (2015), afin d'éviter tout effet de bord pendant l'incubation.

L'avantage de cette méthode est qu'elle est automatisée, rapide et permet d'utiliser du sol entier (nos résultats sont alors assimilables à des mesures en conditions naturelles). Les petites quantités de sol utilisées présentent certainement un problème de représentativité mais cela est en théorie contrebalancé par une bonne préparation des sols (Campbell et al., 2003). En effet, avant d'être incubé pendant 6h avec du gel d'indication, un sol doit être séché (105°C, 24h à l'étuve) pour connaître sa teneur en humidité basale et sa capacité de rétention d'eau maximale en fonction desquelles on ajustera son humidité, après l'avoir tamisé, pour assurer qu'il soit distribué dans les puits profonds de manière homogène.

Nous avons produit un protocole détaillé de cette méthode en l'ajustant par essai/erreur lors de l'expérimentation, voir annexe 3.

Deux premières plaques contenant cinq sols en tout ont été incubées ensemble et mesurées le 07 juin. Deux autres plaques contenant six sols en tout et aussi incubées ensemble, ont été mesurées le 10 juin.

Le traitement des données est un calcul en plusieurs étapes. Il faut commencer par normaliser toutes les absorbances à t₆ selon la formule suivante :

$$(A_{t6}/A_{t0}) \times \text{Moyenne}(A_{t0})$$

,dans la formule l'absorbance d'un puit à t₆ est en fait divisée par celle du même puit à t₀, et le terme Moyenne(A_{t0}) correspond aux absorbances à t₀ d'une même colonne.

Puis, convertir les absorbances normalisées en %CO₂ grâce à la formule suivante :

$$\frac{A + B}{(1 + D \times A_{normalisée})}$$

,où A= -0.2265, B= -1.606 et D= -6.771. Il s'agit en fait de l'équation de la droite d'étalonnage fournie par le fabricant.

Enfin, calculer le taux de production de CO₂ (en µg de CO₂-C. g de sol sec⁻¹. H⁻¹) selon la formule suivante :

$$\frac{\left(\frac{(\%CO_2/100) \times vol \times (44/22.4) \times (12/44) \times (273/(273 + T))}{poids\ frais\ du\ sol\ par\ puit \times (\% \text{ de poids sec du sol} / 100)} \right)}{temps\ d'incubation}$$

,où « vol » est l'espace libre dans le puit profond (normalement 945µl), « (44/22.4) » et « (12/44) » sont des constantes gazeuses, le « poids frais du sol » est en g, le « temps d'incubation » du sol avec le gel est en heures et « T » est la température d'incubation.

Par puit nous avons donc obtenu un taux de production de CO₂. Les 16 répétitions d'une même parcelle ont servi pour calculer un taux moyen de production de CO₂ par parcelle. Cependant les moyennes des sols des parcelles 3, 6, 14 et 8 ont été faites sur seulement 8 répétitions car la deuxième série de répétitions était dans chaque cas inexploitable.

e) *Biomasse microbienne*

Nous avons employé la méthode dite de fumigation-extraction. Son principe s'articule autour de deux parties : une étape où le C contenu dans la biomasse des microorganismes d'un sol est rendu mesurable et une autre étape où la MO du même sol est mesurée. En fumigeant au chloroforme des échantillons de sol dans un dessiccateur (par sa dépressurisation), on lyse les cellules des microorganismes du sol et se faisant on rend partiellement extractibles les composés variés précédemment contenus dans ces cellules. Ainsi, en mesurant la MO dans un sol fumigé et celle dans le même sol mais non fumigé, on peut déterminer la quantité de C microbien : elle correspond à la quantité de C retrouvée en plus dans un échantillon fumigé par rapport à un non fumigé. La MO des échantillons se mesure par titrage indirect à partir de filtrat d'échantillons de sols dans de l'acide phosphorique (papier filtre Whatmann 595 ½) : en présence d'acide fort et de dichromate (K₂Cr₂O₇) la MO du sol (présente dans les filtrats) est oxydée (l'oxydation se fait sous chauffage à reflux) et Cr(+VI) réduit en Cr(+III), la quantité de dichromate restante est ensuite titrée en retour avec du sulfate d'ammonium fer II, puis la quantité de C est calculée.

Nous avons fait deux répétitions par parcelle : des titrages à chaque fois pour deux échantillons fumigés et deux non fumigés, avec quatre témoins pour chaque répétition (deux témoins positifs consistant en de l'acide phosphorique reflué et deux témoins négatifs consistant en de l'acide phosphorique non reflué). L'avantage de cette méthode est qu'elle est automatisée (un titrateur automatique est utilisé), même si elle peut rapidement prendre beaucoup de temps en fonction du nombre d'échantillons à analyser et du nombre d'extractions qu'il est possible de faire simultanément (l'extraction prend 30min/échantillon).

Le calcul de la quantité de C : il faut commencer par calculer le carbone organique extractible C_1 ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) pour chaque échantillon :

$$C_1 = \frac{(V_{\text{blanc reflué}} - V_{\text{échantillon}})}{V_{\text{blanc non reflué}}} \times [\text{ac. phosphorique}] \times V_{\text{ac. phosphorique}} \times E$$

$$\times \frac{1000}{V_{\text{filtrat mis à oxyder}}}$$

,où « E » = 3 et correspond à la conversion du carbone organique C[C] en $\text{CO}_2[\text{C}(+\text{IV})]$, les volumes du premier terme sont les volumes mesurés par titrage, tous les volumes sont en ml et la concentration de la solution d'acide phosphorique est en $\text{mol}.\text{l}^{-1}$.

Puis, le carbone organique extractible C_2 ($\text{mg}.\text{g de sol sec}^{-1}$) pour chaque échantillon :

$$C_2 = \left(C_1 \times \frac{m_{\text{extractant}}}{m_{\text{échantillon frais}}} \right) / 1000$$

,où les masses sont en g, « $m_{\text{extractant}}$ » correspond au poids des acides qui ont servi à oxyder la MO du sol et « $m_{\text{échantillon frais}}$ » correspond au poids de l'échantillon de sol avant qu'il ne soit filtré avec l'acide phosphorique (10g).

Enfin on calcule le carbone de la biomasse B_C ($\text{mg}.\text{g de sol sec}^{-1}$):

$$B_C = \frac{m_{\text{carbone organique sol fumigé}} - m_{\text{carbone organique sol non fumigé}}}{0.38}$$

,ou le dénominateur est appelé k_{EC} : c'est la partie extractible du C de la biomasse microbienne (Joergensen, 1996).

Par parcelle, la biomasse microbienne moyenne représente alors une moyenne des deux répétitions.

C. Analyse statistique des données

Les analyses statistiques ont été faites avec Minitab 21. De manière générale nous avons fait une analyse de la variance (ANOVA, $\alpha = 0.05$) à un critère de classification (la modalité expérimentale) sur toutes les données. Afin de tester l'effet d'une modalité (chacune des 4 modalités regroupant 4 parcelles sur les 16 parcelles de l'essai) sur les variables que nous avons mesurées, donc : soit sur le développement de la culture, sur les paramètres physico-

chimiques, sur l'activité enzymatique, sur la respiration microbienne ou sur la biomasse microbienne. Les ANOVA ont été systématiquement complétées d'une comparaison avec le test de Tukey ($\alpha = 0.05$) sur les moyennes des variables dans chaque modalité.

Les graphiques ont été générés avec Excel.

V. Résultats et discussion

A. Résultats

1. Développement de la culture

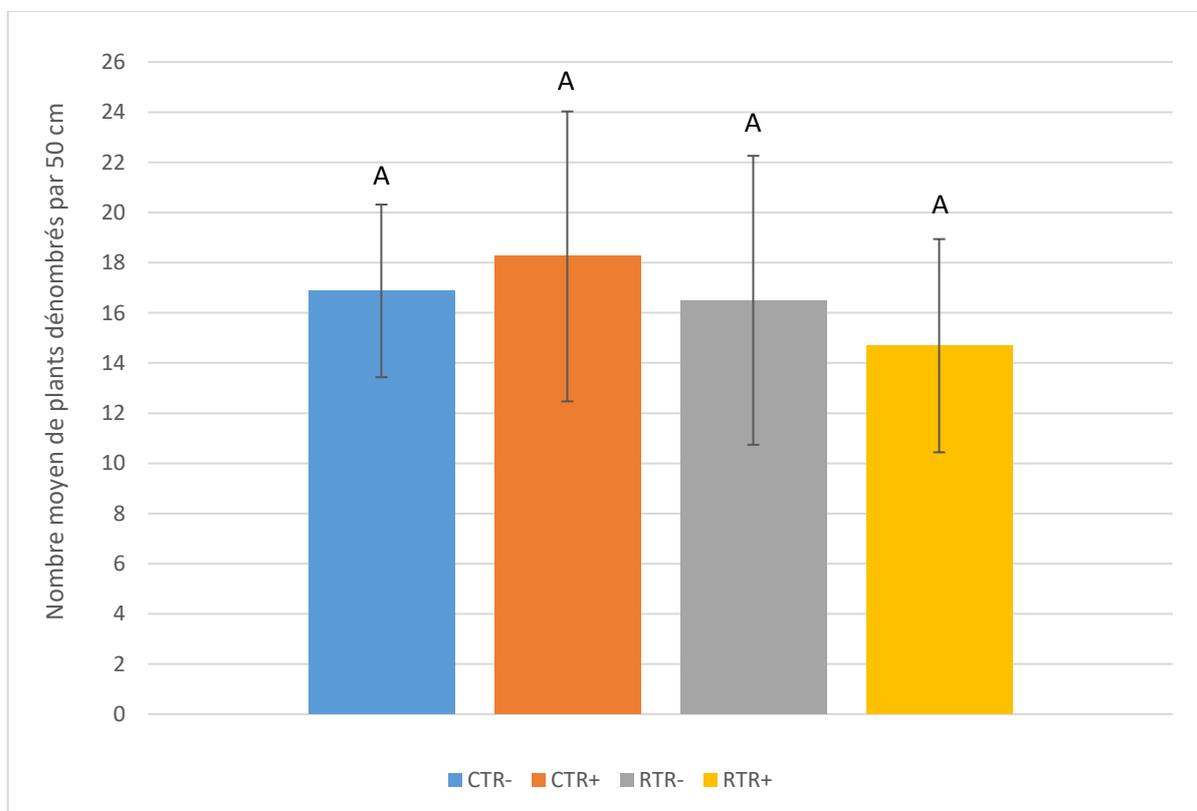


Figure 10 : Levée post-hivernale en fonction des modalités expérimentales (\pm erreur standard). Les lettres représentent quelles modalités sont significativement différentes dans le test de Tukey : les modalités ne partageant pas de lettre ont une moyenne significativement différente l'une de l'autre.

La figure 10 montre la levée des tigelles par modalité. Aucune différence significative n'a été détectée entre les modalités pour ce paramètre.

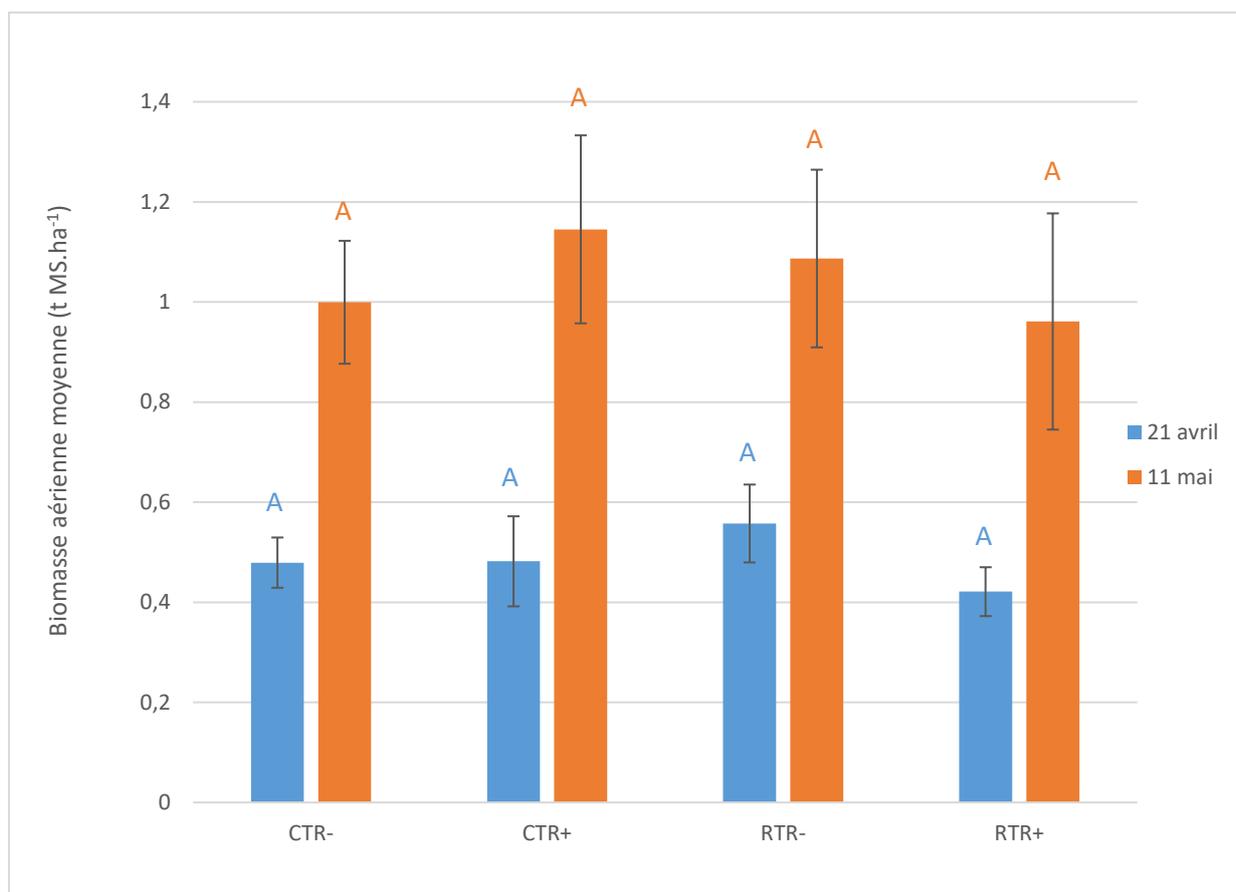


Figure 11 : Biomasse aérienne en fonction des modalités expérimentales au cours du temps.

La figure 11 montre la biomasse aérienne en fonction des modalités, à deux dates situées à 23 jours d'intervalle, et en pleine saison de culture. Là encore, aucune différence significative n'a été détectée entre les modalités.

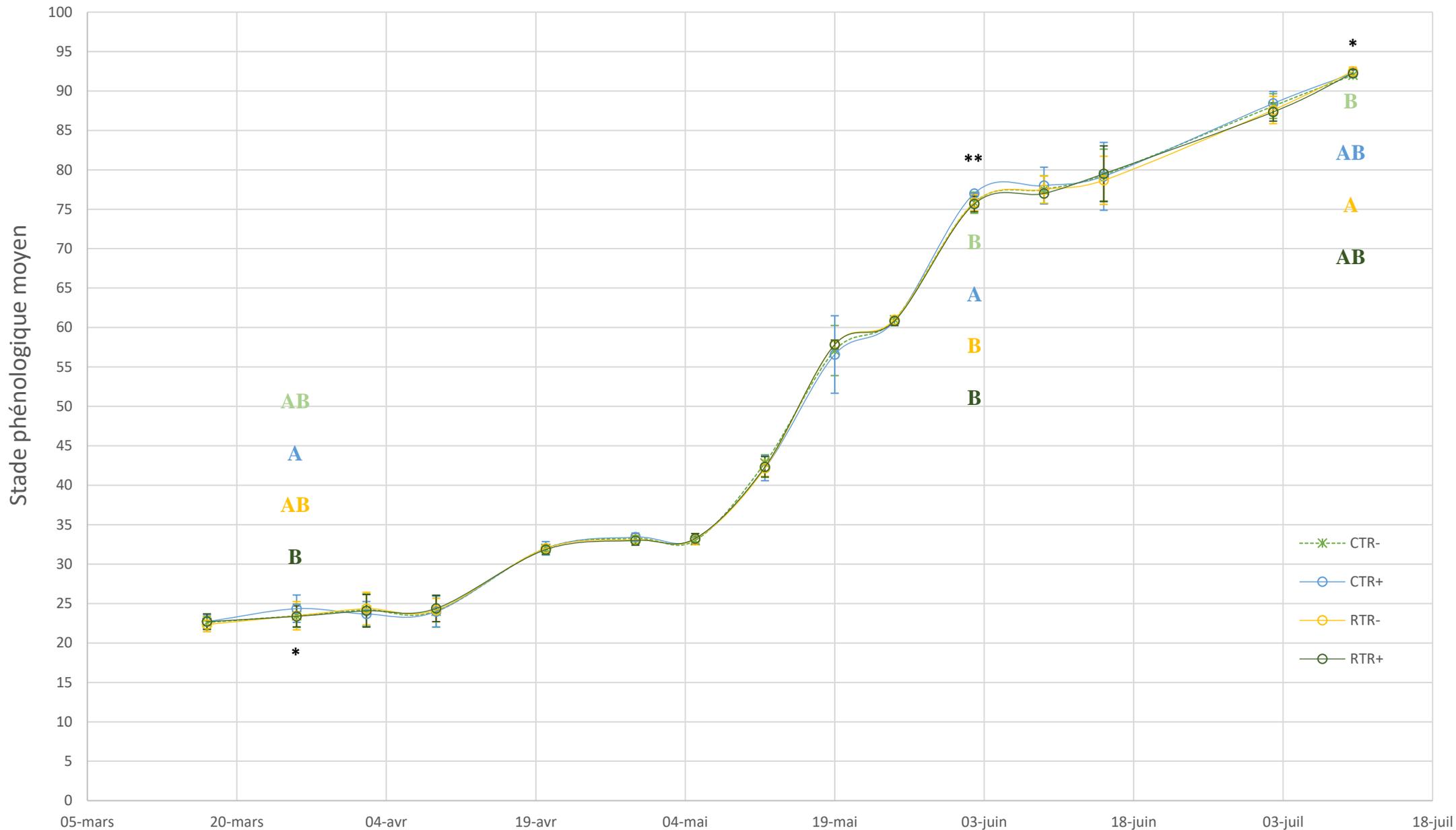


Figure 12 : Évolution des stades phénologiques par modalité expérimentale au cours du temps (\pm erreur standard).

Les astérisques représentent des différences significatives (ANOVA) entre les moyennes des quatre modalités : « * » = $p < 0.05$; « ** » = $p < 0.01$. Les lettres sont les résultats au test de Tukey. Pour des soucis de lisibilité, seuls les résultats significatifs au test de Tukey ont été reportés.

La figure 12 illustre l'évolution temporelle des stades phénologiques par modalités, entre le 17 mars et le 10 juillet (soit 131 jours). Sur l'ensemble de la période mesurée il y a très peu de différences significatives ayant été détectées par les tests statistiques entre les moyennes des stades phénologiques par modalité : seulement 3 relevés phénologiques sur les 15 totaux présentent des différences significatives. Autrement dit, la modalité expérimentale a eu une influence sur la phénologie de la culture seulement 20% du temps. Il s'impose alors de regarder plus dans le détail pour tenter d'interpréter cette information.

Vu le nombre peu élevé de différences significatives dans le temps, il n'est pas surprenant que les courbes pour chaque modalité aient toutes la même allure générale, que nous décrivons comme suit : huit parties distinctes, constituées d'une alternance d'un nombre égal de périodes de plateaux et de périodes d'augmentation plus ou moins rapide de la phénologie. À chaque période de plateau ou d'augmentation correspond grosso modo un stade phénologique en particulier, et chacune est plus ou moins longue qu'une autre (avec 26 jours pour la période de plateau la plus longue contre 7 jours pour la moins longue et 35 jours pour la période d'augmentation la plus longue contre 11 jours pour la moins longue).

Sur des considérations d'ordre plus physiologique : la première différence décelée entre modalités (26 mars) intervient au niveau du stade tallage, la seconde (02 juin) intervient au niveau du stade de remplissage des grains au moment où le grain est mi-laiteux, la dernière (10 juillet) intervient au niveau du stade de sénescence où le grain vient juste d'atteindre la surmaturité.

2. Paramètres physico-chimiques du sol

Paramètre	Modalités			
	CTR+	CTR-	RTR+	RTR-
pH	7.0825 ^a ± 0.1279	7.237 ^a ± 0.204	7.253 ^a ± 0.250	7.280 ^a ± 0.201
C :N	15.09 ^a ± 4.77	11.68 ^a ± 2.13	11.530 ^a ± 1.022	12.52 ^a ± 2.59
C total = C organique (g.kg ⁻¹)	17.43 ^a ± 6.44	12.20 ^a ± 3.16	13.688 ^a ± 1.628	14.80 ^a ± 4.06
Humus (%)	3.485 ^a ± 1.328	2.440 ^a ± 0.632	2.738 ^a ± 0.326	2.960 ^a ± 0.812
N total (%)	0.1135 ^a ± 0.00915	0.1035 ^a ± 0.007	0.1185 ^a ± 0.005	0.117 ^a ± 0.001089
Ca (mg/100g)	253.1 ^a ± 32.1	260.8 ^a ± 33.4	271.8 ^a ± 43.1	278.1 ^a ± 35.6
K	12.715 ^a ± 1.684	11.639 ^a ± 1.950	14.626 ^a ± 1.1	13.62 ^a ± 254
Mg	6.648 ^a ± 0.758	6.877 ^a ± 1.548	6.809 ^a ± 1.167	7.124 ^a ± 1.217
P	11.78 ^a ± 2.60	12.19 ^a ± 3.43	14.43 ^a ± 7.31	12.77 ^a ± 4.61

Tableau 4 : Statistiques descriptives sur les paramètres physico-chimiques du sol (moyenne ± erreur standard). Les lettres sont les résultats au test de Tukey entre modalités.

Le tableau 4 montre qu'aucun paramètre physico chimique mesuré n'est significativement différent d'une modalité à l'autre. Les pH sont globalement neutres ce qui est un indicateur du bon fonctionnement chimique du sol. Aucun élément nutritif n'est en carence dans l'essai.

Le C :N globalement supérieur à 12 indique, d'après REQUASUD ¹⁴, sur base des valeurs courantes dans la région wallonne, que notre sol fait une minéralisation lente.

Pour toutes les parcelles, le C total correspond exactement au CO. Cela est dû à la méthode de laboratoire utilisée pour mesurer le C total. En effet, dans les sols non calcaires, les méthodes de mesures du C total (combustion sèche ou humide), sont une mesure du C organique (Sparks, 1996).

CTR+ montre un C :N et un % en humus un peu plus élevés que les autres modalités ce qui pourrait indiquer un taux de MO un peu plus élevé que les autres modalités. Une éventualité corroborée par un taux de CO un peu plus élevé en CTR+ que dans les autres modalités : car le taux de CO est un bon estimateur du taux de MO. En effet, le taux de MO dans un sol est difficile à mesurer directement ; et est à la place, indirectement estimé par le taux de CO : en multipliant le taux de CO par un facteur estimant la quantité de MO par quantité de CO communément trouvée dans les sols (Sparks, 1996).

3. Microorganismes du sol

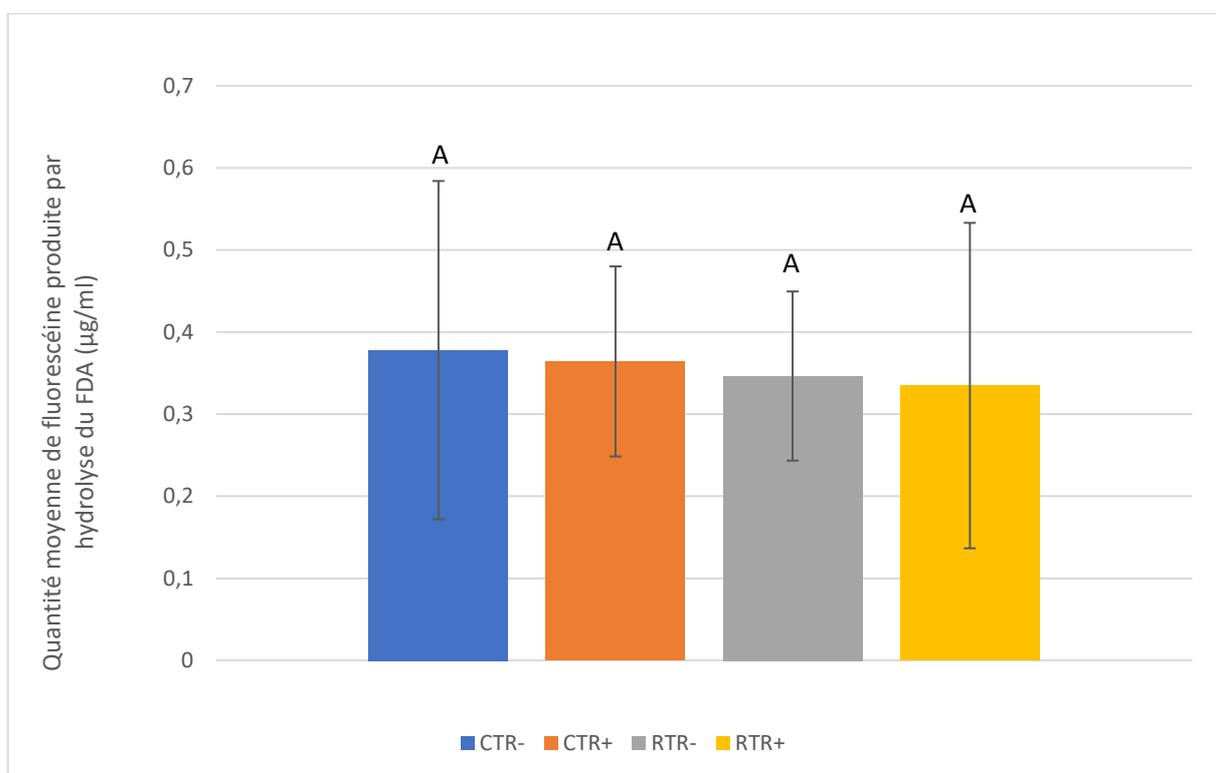


Figure 13 : Activité enzymatique, par modalités expérimentales, mesurée via l'hydrolyse du FDA.

¹⁴ Réseau de laboratoires wallons d'analyses de sols

Aucune différence significative sur les mesures d'activités enzymatiques n'a pu être mise en évidence d'une modalité à l'autre qui, somme toute, sont des valeurs très proches. Ce qui est remarquable ceci dit, est la très forte variabilité dans les données au sein d'une même modalité. CTR- et RTR+ présentent les plus fortes variations dans les données : 54.5% et 59.2% respectivement. CTR+ et RTR+ présentent des données moins variables : 31.8% et 29.7% respectivement.

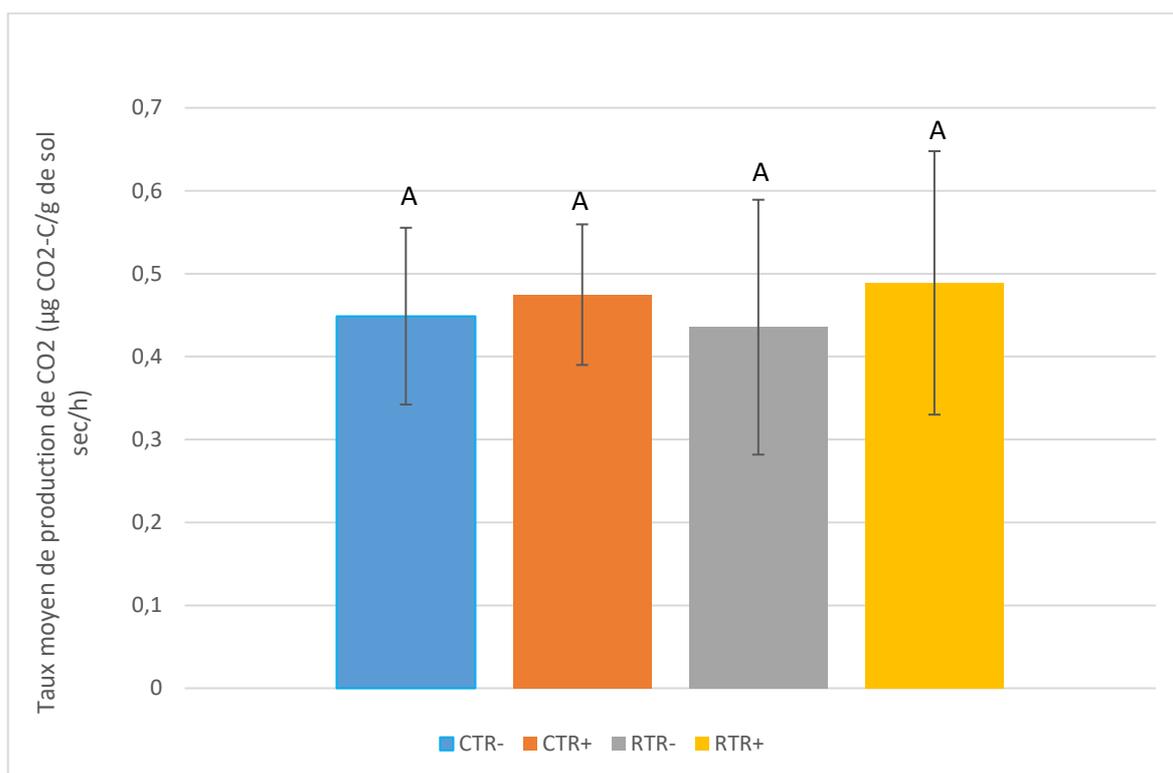


Figure 14 : Respiration microbienne, par modalités expérimentales, mesurée via la méthode MicroResp

Aucune différence significative n'a été détectée entre la respiration basale des microorganismes du sol des quatre modalités. Mais, tout comme les résultats aux mesures d'activité enzymatique, on remarque une forte variation des données au sein d'une même modalité : la plus faible variation dans les mesures est exprimée par les parcelles en CTR+ (17.9%) et la plus forte par celles en RTR- (35.3%).

En ce qui concerne les mesures de biomasse microbienne, nos résultats semblent incohérents et ne seront donc pas présentés. Nous n'avons pu calculer des valeurs de biomasse microbienne car les valeurs calculées de C organique extractible ne faisaient que peu de sens (elles étaient négatives). Les données brutes sont tout de même disponible à la consultation en annexe 4.

B. Discussion

Concernant la levée des semences. Hiel et al. (2018) trouvaient il y a six ans de cela, à l'occasion d'une étude sur l'essai, que les parcelles en RT avaient systématiquement un taux de germination significativement inférieures à celles en CT pour les saisons culturales 2010-11, 2013, et 2013-14 (soit, respectivement, trois ans, cinq ans et six ans après le lancement de l'essai), mais à partir de la saison culturale 2014-15 plus aucune différence significative en modalités n'a été observée sur ce paramètre. Notre étude n'a pas non plus révélé de différence significative dans le taux de germination entre modalités.

Concernant la biomasse aérienne. Il s'agit d'une mesure du développement de la culture. L'absence de différence significative sur ce paramètre entre modalités, et aux dates mesurées, nous indique tout au plus que pendant la saison de croissance le développement de la culture est normal. Hiel et al. (2018) avaient reporté pour certaines campagnes de cultures des années précédentes des différences de biomasse aérienne entre modalités, mais cela était dû soit au climat (sécheresse pendant les saisons 2009-10 et 2010-11) soit au taux de germination comme discuté au paragraphe précédent. Vu que nous n'observons pas ce genre d'impacts dans notre étude, il semble logique que le développement soit normal.

Concernant le suivi phénologique. La première différence peut à première vue être considérée comme non impactante sur le rendement. En effet, généralement dans le suivi phénologique des céréales à pailles telles que le froment, on se préoccupe de l'avancement phénologique des plants pour deux stades clefs : le stade épi 1cm¹⁵ et le stade épiaison (Deswarte, 2021). Car des retards ou une précocité trop importante à ces stades, en fonction des conditions climatiques de l'année, peuvent entraîner de fortes pertes de rendement. Par exemple, des fortes températures et un déficit hydrique en fin de cycle créent un milieu stressant pour une culture de froment, si l'épiaison n'est pas faite avant que ce stress ne soit ressenti par les plantes on peut enregistrer jusqu'à 1q.ha⁻¹ de perte par jour de retard à l'épiaison (Deswarte, 2021). Dans le développement d'un plant de froment, le stade épi 1cm intervient à l'interface entre les deux stades de la phase phénologique végétative que sont le tallage et l'élongation de la tige principale. Dans notre étude l'arrivée de ce stade a été enregistrée aux alentours du 12 avril. Le simple fait qu'aucune différence significative entre modalités n'ait été enregistrée aux alentours du 12 avril, nous indique que la différence significative effectivement enregistrée le 26 mars en plein tallage n'a *in fine* pas été impactante dans la phase phénologique végétative.

Cependant cette dernière différence reste à expliquer, car le plastochrone (rythme en degré-jours de production des ébauches de feuilles pour une parcelle) et le phyllochrone (rythme des émissions de

¹⁵ Il correspond au décollage d'1cm de l'épi du plateau de tallage. Ce n'est pas un stade de développement au sens strict mais plutôt un stade de croissance.

feuilles pour une parcelle) sont fixes et dépendent entre autre de la date de semis (Deswarte, 2021). De quoi alors pourrait découler cette différence où les plants des parcelles en CTR+ avaient un peu plus de talles et ceux des parcelles en RTR+ avaient un peu moins de talles ? Vu que les deux modalités sont en R+ on peut exclure un effet de la gestion des résidus. Ce qui nous laisse à penser un effet du travail du sol.

Eylenbosch et al. (2015) ont eu l'occasion de montrer dans une étude sur l'essai, sur la campagne sur la culture de froment d'hiver de 2012, grâce à une quantification des systèmes racinaires par imagerie proche infra-rouge, qu'en RT le système racinaire était beaucoup plus développé dans la couche 0-10cm alors qu'en CT le système racinaire était plus développé sur la profondeur du profil. Plusieurs autres études (Munkholm et al., 2008 ; Guan et al., 2015) montrent que la structure racinaire (densité de la longueur des racines, densité de la surface des racines, densité du poids des racines) est plus développée en CT qu'en RT, sur l'ensemble du profil du sol pendant la période de tallage du froment d'hiver.

Mirleau et al. (2017) font les mêmes types d'observation mais sur du tournesol. Certaines de ces études ont directement lié cela à des densités apparentes et résistances à la pénétration plus faibles en CT qu'en RT (Guan et al., 2015). D'un autre côté, Atwell (1990), en confirmant dans ses travaux les résultats des études précédentes, établit un lien entre développement racinaire et tallage plus importants dans des sols à structure relâchée (travaillés conventionnellement) en comparaison d'une structure plus compacte : ce serait à cause de troubles dans l'acquisition de nutriments du sol en lien avec des changements dans le métabolisme des racines et la dimension de leurs cellules quand le sol est difficile à explorer. Masle et Passioura (1987) ont mené une étude similaire en tentant d'élucider le lien entre résistance du sol et développement végétatif et racinaire de jeunes plants de froment. D'après leurs résultats, la croissance végétative des jeunes plants est plus affectée par la résistance du sol que ne l'est la croissance racinaire. Tout comme Atwell, ils ont aussi envisagé l'hypothèse d'une fourniture plus faible en nutriments par les racines pour expliquer cela, mais celle-ci a été écartée au profit de l'hypothèse d'une réponse des parties végétatives à un message hormonal induit chez les racines quand elles rencontrent une forte résistance du sol. Toutefois, cela échoue à expliquer pourquoi une différence significative est trouvée seulement à un moment du tallage et pas pendant tout le tallage.

Henriet et al. (2017) rapportent un développement de flore adventice au cours de la saison de culture plus important en RT qu'en CT. Dans une expérimentation de longue durée (16 ans) en Allemagne, Albrecht (2008) a étudié l'effet d'un travail réduit du sol (vs travail conventionnel et non travail) sur la population d'adventices. D'après ses résultats, changer de pratique en passant de CT à RT modifie la répartition des graines d'adventices le long du profil du sol pour aboutir, en RT, à une accumulation en surface et à plus de biodiversité d'adventices. Ce qui pourrait causer, en RT, la germination de peuplements d'adventices en pleine saison de culture. Suite à quoi pertes de rendement et augmentation toujours plus marquée de la

banque de graines adventices du sol sont à craindre. Or, l'arrêt du tallage chez un plant de froment est contrôlé par sa perception précoce de voisins (autres plantes de la même culture ou adventices), dans une tentative de quantifier la compétition pour la quantité lumière dans son entourage avant que sa photosynthèse ne soit impactée (Lecarpentier et al., 2019).

SOLRESIDUS a fait l'objet cette année d'une autre étude dans le cadre de laquelle toute la biomasse aérienne dans un quadrat (1m²) a été prélevée pour chaque parcelle, puis le nombre et les espèces d'adventices récoltées dans chaque quadrat a été enregistré (cinq quadrats ont été faits par parcelle). La figure 15 résume une partie des données issues de cette étude.

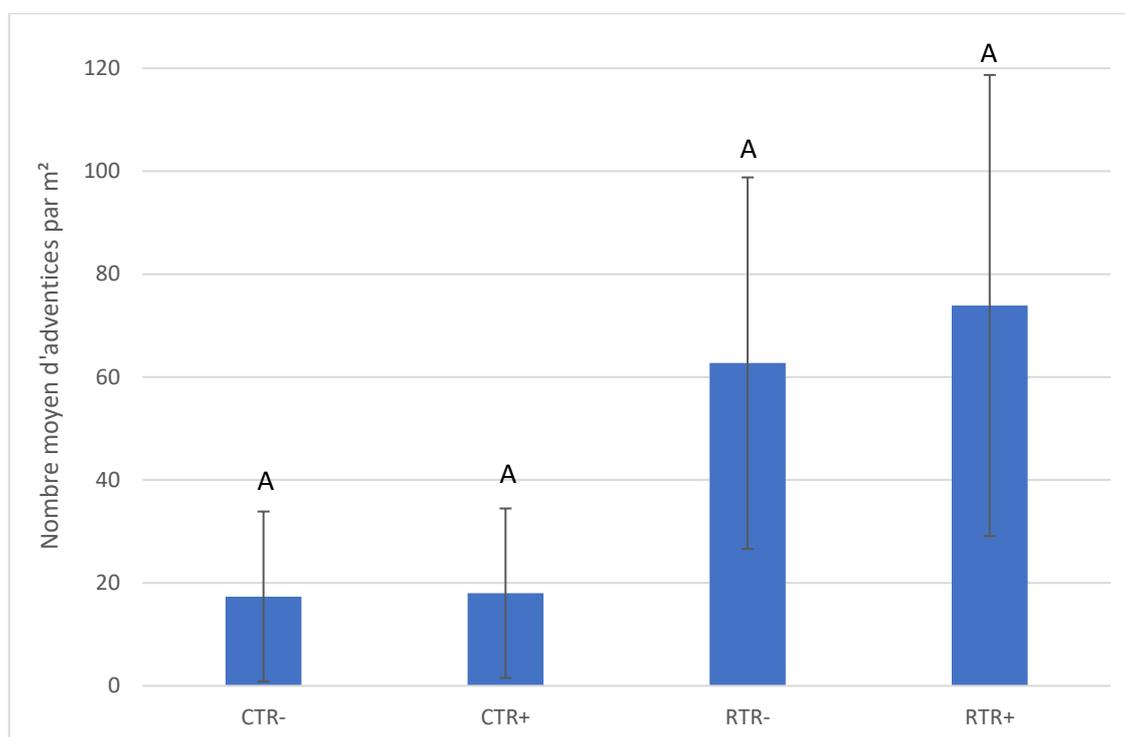


Figure 15 : Adventices dans chaque modalités pendant la saison de croissance.

On observe une présence d'adventices à priori beaucoup plus marquée dans les parcelles en RT que celles en CT, et un peu plus en RTR+ (73.9 ±44.8) que dans les trois autres modalités. Toutefois, d'après nos tests statistiques sur ces données (mêmes procédure décrite en matériel et méthodes) il n'y a pas de différence significative entre modalités (ni pour l'ANOVA ni pour le test de Tukey).

On pourrait émettre l'hypothèse suivante au vu de la discussion développée : (i) CTR+ prend une légère avance en plein tallage, en permettant le développement de plus de talles, car les racines se développent plus ; (ii) RTR+ prend un léger retard pour la raison inverse, mais aussi car plus d'adventices font compétition plus rapidement et plus agressivement aux froments ; en fin de tallage il n'y a plus de différence significative car, (iii) en CTR+, plus de développement plus rapidement signifie aussi plus de compétition au sein des froments, et (iv) en RTR+, un équilibre se serait installé entre les froments, entre

eux et aussi avec les adventices, vu que la compétition se fait depuis plus longtemps. Enfin, vu que la différence significative impliquait deux modalités en R+ et aucune en R-, on peut aussi imaginer que les effets proposés en hypothèse se sont manifestés dans chaque modalité de travail du sol parce que les résidus étaient retenus au champ.

La seconde différence entre modalités peut être considérée comme importante à première vue, dans la mesure où le stade de remplissage des grains est critique dans la détermination du poids des grains en fin de culture. En effet, à titre d'illustration, pendant ce stade qui dure environ 8 semaines, les grains accumulent en 4 à 5 semaines de 4 à 9 tonnes de matière sèche par ha (tMS.ha⁻¹) (Deswarte, 2021).

Il y a trois phases dans ce stade : cf. figure 16.

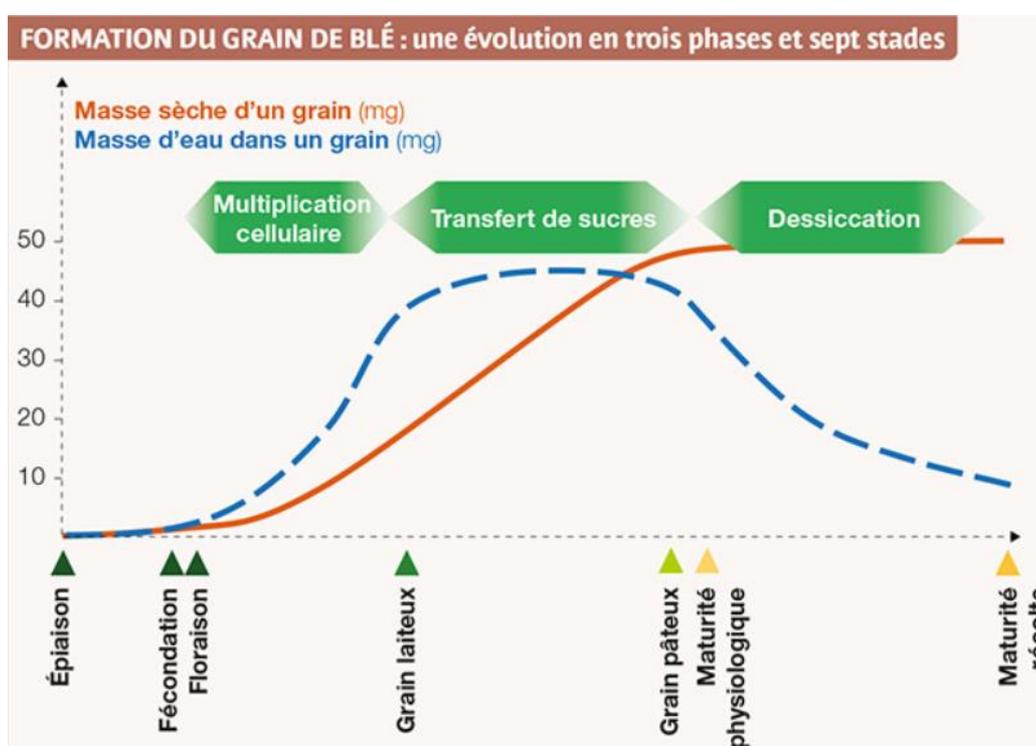


Figure 16 : Évolution de la teneur en eau et de la teneur en MS au fil des étapes de croissance, de remplissage et de dessiccation d'un grain de blé (tiré de Deswarte, 2021)

Le « grain laiteux » apparaît pile à la fin de la période de prolifération cellulaire qui se fait au sein des grains (où les grains gagnent en volume et en masse fraîche) et au début de la période de transfert de sucres (et protéines telles que l'amidon) de la plante-mère vers les grains (où les grains gagnent en masse sèche (MS)). Dans la différence significative enregistrée au 02 juin, CTR+ était en moyenne au stade fin laiteux quand toutes les autres modalités étaient encore au stade mi-laiteux. Ce qui veut dire qu'en CTR+, plus de grains avaient quasiment fini d'amasser leur MS totale.

Les translocations d'assimilats de la plante vers les grains se fait soit par la photosynthèse post-anthèse de la feuille étendard, soit par des réserves pré- et post-anthèse stockées dans les tiges (Bahlouli et al.,

2008). D'après Sofield et al. (1977), la cinétique d'accumulation de MS dans le grain, par les deux sources d'assimilats, est contrôlée par le climat : en cas d'activité photosynthétique optimale le remplissage se fait sur une longue durée et en cas de stress hydrique on observe une vitesse de remplissage élevée. De sorte que la vitesse de remplissage est plus élevée sous haute température et que la durée est plus longue sous température modérée (Sofield et al., 1977). Blum et al. (1996) pour leur part, ont montré que la vitesse de remplissage affecte le rendement via le nombre de grains par épi alors que la durée affecte le poids 1000 grains.

De plus, d'une part, Merrien et Milan (1992) ont montré durant que la période de remplissage, en conditions de stress, du tournesol peut favoriser la synthèse de protéines plutôt que celle d'huile ou d'acides gras, parce qu'elles coûtent moins énergétiquement. D'autre part, Sadras et al. (2005) ont observé une augmentation de 6%, des protéines dans les grains de froment cultivés en sol compacté, et la différence entre froments en sol compacté et labouré tenait à un rayonnement photosynthétiquement actif (RPA) et une transpiration tous deux plus élevés en sol labouré. Tous ces éléments mis bout à bout suggérant de voir le choix entre poids 1000 grains/durée de remplissage élevée et nombre de kernels par épi/vitesse de remplissage élevée comme un choix entre deux stratégies que la plante fait pour sa survie (Mirleau et al., 2017).

Une quantité d'eau du sol plus ou moins disponible en RT et peu voire pas en CT au moment du remplissage du grain s'expliquerait par : des taux d'infiltration supérieurs en RT par rapport à CT (Pikul et Asae, 1995), se traduisant en infiltrations substantielles sur de courtes périodes de temps suite à des précipitations en CT (Ben-Hur et al., 1998), et donc moins d'eau stockée dans les sols en CT qu'en RT. Copeck et al. (2015) présentent des résultats allant dans ce sens : après quatre saisons de culture sur le contenu en eau du sol RT a en moyenne plus d'humidité dans son sol que CT.

Moroke et al. (2011) font le lien entre efficacité d'utilisation de l'eau et des nutriments et la cinétique de remplissage du grain sous différents modes de travail du sol : en RT (comparé à CT), le contenu du sol en eau est suffisant au moment du remplissage des grains, alors, des plantes de sorgho tendent à détourner une fraction plus ou moins large de leur évapotranspiration (ETP) en transpiration et font donc moins de photosynthèse. L'étude de Guan et al. (2015) mentionnée dans la première partie de la discussion va aussi dans le sens d'un contenu en eau du sol plus élevé en RT qu'en CT pendant la saison de culture, avec en plus, des mesures enregistrées d'ETP supérieures en CT par rapport à RT.

On pourrait proposer l'hypothèse suivante au vu de la discussion développée : (i) d'après toute vraisemblance, les froments en RT et ceux en CT auraient un comportement physiologique différent pendant la phase de remplissage du grain : en RT les froments préféreraient réduire leurs métabolisme énergétique en réduisant leur ETP totale, ce qui impacterait leur taux de photosynthèse et leur efficacité

d'utilisation d'eau photosynthétique, alors qu'en CT les froments augmenteraient leur ETP totale, ce qui aurait les effets inverses ; (ii) ces différences de comportement impacteraient la dynamique de remplissage du grain et pourraient refléter des différences dans : d'un côté les ressources en eau disponibles, et d'un autre côté un choix de la plante d'utiliser ces ressources parcimonieusement et s'économiser (en RT) ou ne pas faire en fonction d'elles (en CT) ; (ii) au vu tous les éléments amenés, on pourrait imaginer que des messages hormonaux venant des racines jouent dans ce choix d'économie que font les froments en RT.

Les différences significatives enregistrées le 10 juillet peuvent être considérées comme non impactantes sur le rendement, car quand ce relevé a été effectué les grains venaient tout juste d'entrer en phase de surmaturité. Or, à l'échelle du couvert la transition d'une phase de remplissage du grain à une autre est relativement progressive : il existe un décalage dans le temps, de l'ordre de quelques jours, entre grains d'un même épi ainsi qu'entre épis (Deswarte, 2021). Ainsi les différences significatives observées pourraient être la manifestation de ce phénomène.

Concernant l'activité microbienne dans le sol. La respiration microbienne et l'activité enzymatique FDA sont toutes deux une indication sur l'activité catabolique des microorganismes dans le sol. Les variabilités relativement fortes constatées dans les jeux de données des mesures de respiration microbienne et d'activité enzymatique FDA pourraient être le reflet de l'hétérogénéité dans la répartition spatiale de la MO (à l'échelle du micromètre comme celle du mètre) inhérente aux propriétés texturales d'un sol et à la manière de le travailler. Une méta-analyse (Zuber et Vilamil, 2016) comparant les données de centaines d'études évaluant les effets de différents modes de travail du sol sur la biomasse microbienne et l'activité enzymatiques des microorganismes du sol va dans le sens de nos résultats, en indique que, dans des essais de long terme, la plupart des sols se comportent similairement au notre face au dosage de la fluorescéine. En effet, au-delà de 10 ans de pratiques différenciées il n'y a plus de différence entre l'activité enzymatique des sols labourés et sols non labourés/en travail réduit. Il en va de même pour la biomasse microbienne. Aucune variable (profondeur d'échantillonnage, précipitation, profondeur de travail du sol) n'expliquait statistiquement les valeurs de FDA obtenues.

L'absence de différences significative entre modalités sur ces deux dernières mesures, ainsi que sur le C:N, la teneur en CO₂, le pH, et la teneur en humus ; tend à nous montrer que, globalement, la communauté microbienne se comporte de la même manière face à la MO du sol sous toutes les modalités. En tout cas au moment de l'échantillonnage. Cela veut dire directement ou indirectement plusieurs choses. (i) La variabilité spatiale (verticale sur 25 cm et horizontale) sur les parcelles, lorsque prise en compte (via l'échantillonnage composite), n'est pas différente au point d'influer significativement : sur l'impact qu'une modalité a sur les propriétés physico chimiques du sol, et, dans la

relation entre microorganismes du sol et dynamique de la MO du sol. Ainsi, même s'il s'avérait que la diversité taxonomique est différente entre RT et CT comme le suggèrent les études de Degruene et al. (2016 ; 2017), ayant trouvé il y a huit de cela : un effet marqué de la profondeur sur la diversité fongique et bactérienne, qui était plus importante en surface pour toutes les modalités, et plus importante en CT qu'en RT ; ainsi qu'un effet marqué du travail du sol sur la diversité α et β des communautés fongiques et bactériennes, où CT comparé à RT avait plus de diversité α que β à la fois pour les communautés fongiques et bactériennes. Dans notre étude, cette éventuelle diversité taxonomique ne transparaît dans le devenir du CO. (ii) La minéralisation lente nous indique que les populations microbiennes ne cherchent pas à croître plus que nécessaire, ce qui peut vouloir dire que soit elles n'y ont pas intérêt (demande trop d'investissement d'énergie pour trop peu de retour), soit elles n'en sont pas capables (n'ont pas le bagage enzymatique pour décomposer la MO présente dans le sol). La deuxième éventualité pose la question de la diversité microbienne fonctionnelle ; mais, on ne peut pas, au niveau d'analyse où nous sommes allés, suspecter un rôle d'une diversité microbienne fonctionnelle dans une affinité différente pour, ou dans une utilisation différente, des résidus par les microorganismes du sol de chaque modalité expérimentale. (iii) Ainsi, le climat est le seul facteur indépendant du site et des modalités, qui n'a pas été testé et aurait peut-être pu influencer l'activité microbienne totale vers plus ou moins de minéralisation : il serait intéressant de voir comment les communautés microbiennes se comportent face à un stress abiotique, une variabilité dans les réponses d'une modalité à l'autre nous permettrait d'avoir une autre vision de l'activité biologique dans cet essai. Degruene et al. (2017) soulignent à travers leurs résultats que leur étude n'a porté que sur une période de temps déterminée tout comme la nôtre (mars à juin, la saison de croissance), et qu'il faudrait idéalement suivre la communauté microbienne sur toute l'année pour tirer des conclusions plus complètes.

Le contenu initial en CO total à l'échelle de l'essai était 11.8 g.kg^{-1} , et huit ans après le lancement de l'essai, en 2016, Hiel et al. (2018) n'ont pas trouvé de différence significative entre le CO total initial de l'essai et le CO total de l'essai au moment de leur étude. En 2016 aussi, Hiel et al. (2018) ont trouvé un taux moyen en CO dans la couche 0-30 cm, à l'échelle de toutes les parcelles, d'environ $12.7 \pm 1.2 \text{ g.kg}^{-1}$, sans différence significative entre le taux de CO des différentes modalités. D'après nos résultats, en 2022, ce taux moyen est d'environ $14.53 \pm 3.8 \text{ g.kg}^{-1}$, mais dans la couche 0-25cm. Au regard des profondeurs d'échantillonnage différentes, il est tentant d'envisager à priori une légère augmentation du CO total à l'échelle de l'essai depuis 2016. En effet, peut-être que le CO additionnel que nous aurions trouvé en échantillonnant 5cm plus profond aurait été suffisant pour parler d'augmentation depuis 2016, mais la variance relativement importante dans nos données comparativement à celle de Hiel et al. (2018) nous invite à la prudence.

Somme toute, ces résultats tendent à nous faire dire que le système que nous avons évalué est stable, signe qu'il est engagé dans un processus évolutif et transitionnel tel que déjà proposé par Hiel et al. (2018). Probablement que, le système tend vers son équilibre de taux de MO. Mais quoiqu'il en soit, la stabilité du système témoigne d'un taux constant de dégradation de la MO et donc de stockage potentiel de CO.

Il est tout de même intéressant de souligner que l'absence de différences significatives entre R+ et R- indique dans un sens que l'ajout des résidus n'influe, au final, pas énormément sur la dynamique de la MO dans le sol au bout de 14 ans de pratiques différenciées. Cependant, les résidus sont bel et bien incorporés en R+, alors, que deviennent-ils s'ils ne transparaissent pas dans les stocks de MO ? Peut-être que les effets se feront voir à encore plus long terme : c'est-à-dire que au fil du temps les composés les plus récalcitrants des résidus se feront décomposer petit à petit ce qui pourrait résulter en un taux de C total plus élevé en R+ qu'en R-, et à ce moment les systèmes en R+ pourraient tendre vers un nouvel équilibre du taux de MO, ce qui pourrait *in fine* changer la dynamique du cycle du C. D'après une étude sur un essai de 40 ans menée par Poeplau et al. (2017), continuer à apporter des résidus à un système à l'équilibre ne générera aucun stockage additionnel.

Sur des considérations d'ordre plus méthodologique à présent. Concernant les mesures de respiration microbienne, le fabricant précise dans son manuel que le gel d'indication dans chaque puits d'une plaque doit présenter un coefficient de variance (*écart-type/moyenne *100*) inférieur à 5% sur la totalité des absorbances mesurées à t0. Mais, des quatre plaques que nous avons préparées et mesurées, deux avaient un coefficient de variance d'environ 13% et les deux autres un d'environ 9%. C'est une erreur acceptable dans la mesure où nous n'avons pas réussi à isoler la cause de ces coefficients de variance dépassant 5% ni au cours de l'expérimentation ni dans la littérature. Mais elle -la cause- pourrait probablement être située au niveau de l'étape de préparation du gel ou de l'étape de son insertion dans les plaques ou encore au niveau de l'étape de stockage des plaques après leur préparation (notre hypothèse penche plus sur la deuxième étape citée). Acceptable aussi dans la mesure où le seuil de 5% n'est pas dépassé de beaucoup. Résoudre ce point pourrait être clé dans l'amélioration éventuelle du protocole expérimental produit.

Concernant les mesures d'activité enzymatique FDA, l'expérimentation mérite plus d'investigation car nous avons remarqué en faisant les droites d'étalonnage concentration de fluorescéine = f (fluorescence du témoin positif) que, systématiquement le R² chute drastiquement au bout d'une certaine concentration de fluorescéine (généralement 0.75 ou 0.5 µg de fluorescéine) dans la régression linéaire.

Concernant la biomasse microbienne, nous ne nous expliquons pas les problèmes rencontrés dans les résultats, car l'expérimentation a, à priori, été menée correctement à tous les niveaux, en accord avec le protocole expérimental. Il serait intéressant de refaire une expérimentation selon les mêmes procédés, sur

les sols de l'essai, pour voir dans quelle mesure des résultats similaires sont observables. Disposer de mesures de biomasse microbienne nous aurait donné des informations sur la taille des communautés dans chaque modalité, lesquelles nous aurions pu mettre en parallèle avec d'autres mesures que nous avons effectuées pour tirer des conclusions globalement plus pertinentes quant à la dynamique d'utilisation et de stabilisation de la MO du sol par les microorganismes, par exemple : rapporter le carbone microbien au CO total donne des informations sur la disponibilité des substrats carbonés pour les microorganismes (=quotient microbien) (Anderson et Domsch, 1989) ; rapporter la vitesse de la minéralisation du CO au carbone microbien (=quotient métabolique) donne une indication sur la quantité relative de C utilisé pour la croissance (augmentation de biomasse) et pour l'énergie de maintenance de la cellule (respiration) chez les microorganismes (Anderson et al., 1990) ; enfin, rapporter le pourcentage de FDA hydrolysée au carbone microbien (=quotient d'activité hydrolytique spécifique) donne une indication sur l'activité enzymatique FDA résultant de la croissance des microorganismes sur le substrat (enzymes extracellulaires) ou de la lyse intracellulaire du substrat (enzymes intracellulaires) (Perucci et al., 2000).

Dans les sols agricoles on s'attend à des quotients microbiens aux alentours de 2.2% (Anderson et Domsch, 1989). Une augmentation ou une diminution du C microbien est censée engendrer une évolution similaire du CO total (Anderson et Domsch, 1989). Selon van Capelle et al. (2012), le quotient microbien est plus élevé lorsque l'intensité du travail du sol est réduite.

Un quotient métabolique faible est le signe d'un taux de renouvellement faible de la biomasse microbienne, avec une tendance à l'accumulation, voire à la stabilisation de la MO (Anderson et Domsch, 1985). Un quotient métabolique élevé, est le signe de stress des microorganismes, indiquant un besoin d'énergie de maintenance plus élevé. Un quotient métabolique normal est le signe d'un bon équilibre physiologique de la biomasse microbienne : pas de stress nutritionnel ou environnemental. Selon Mangalassery et al. (2015), le quotient métabolique augmente avec l'intensité du travail du sol, en lien avec une augmentation de la porosité.

Le quotient d'activité hydrolytique spécifique peut donner des indications sur la dynamique entre décomposition de la MO, croissance microbienne et respiration microbienne.

VI. Conclusion

Dans cette étude nous avons mis en évidence certaines différences significatives indiquant que la culture se comportait différemment au cours de son développement pendant la saison de croissance. L'influence des modalités sur les structures physico-chimiques du sol est à suspecter.

L'absence de différence significative au niveau du comportement des microorganismes indique qu'il n'y a à priori pas de stockage de CO induit par les modalités sur cette saison de croissance.

Plus de tests sont nécessaires dans l'avenir pour mieux comprendre toutes la complexité des dynamiques en jeu et à la fois surveiller la direction que prend le système.

VII. Perspectives

Une phénologie retardée peut être un facteur déterminant dans le rendement. Pour compléter notre étude, il serait idéal de confronter nos résultats à des mesures supplémentaires sur le rendement de la culture en cours. Cela nous permettrait de vérifier si les différences au tallage et au remplissage du grain se traduisent en différences de rendement, et si l'absence de différence dans la biomasse continue jusqu'au rendement.

Dans l'optique d'une étude similaire à la nôtre, il serait idéal de faire des mesures supplémentaires pour compléter le suivi phénologiques et ainsi éventuellement isoler les causes des différences significatives observées. Ces mesures porteraient sur : la taille des chaumes au cours du développement phénologique, l'eau du sol par tranche de profondeur au cours du développement phénologique, l'utilisation de l'eau du sol par la cultures et les adventices, le suivi de la structure racinaire par tranche de profondeur au cours du développement phénologique, la résistance du sol en début de saison.

L'absence de différence significative sur la décomposition de la MO n'est qu'une première donnée. Idéalement, il faudrait d'autres méthodes telles que les technologies microbiennes à haut débit pour avoir un aperçu clair de la communauté microbienne et son écologie sous chaque modalité (Lahlali et al., 2021). A l'instar de Tardy et al. (2015) qui ont réussi à mettre en évidence des liens entre des changements dans la diversité microbienne, des pratiques culturales d'intensité différentes et la dynamique de la MO dans le sol

Chivenge et al. (2007) montrent qu'en mesurant la MO par fractions physiques on peut mettre en évidence un effet précis des pratiques culturales sur la stabilisation de la MO. D'après leurs résultats, en fonction de la texture du sol, une pratique culturale n'influence pas de la même manière les agrégats selon leur taille : par exemple en sol sableux la rétention des résidus favorisait la stabilisation de MO dans les fractions d'agrégats grands (250-2000 μ m), et en sol argileux le travail du sol défavoriserait la stabilisation de la MO dans les fractions d'agrégats moyennement grands (53-250 μ m). Ce qui présente un intérêt clair quant à la recommandation de pratiques dans le but de stocker du CO : typiquement, cela permettrait de déterminer quelle pratique influence quelle fraction d'agrégat, et couplé à de la

modélisation par exemple il serait possible de recommander un ensemble de pratiques au potentiel stockant le plus élevé.

VIII. Bibliographie

- Albrecht, H. (2008). Perspectives for Agroecosystem Management || Long-Term Effects of Reduced Tillage on the Populations of Arable Weeds. , (), 237–256.
- Allen, M. R., Fuglestedt, J. S., Shine, K. P., Reisinger, A., Pierrehumbert, R. T., & Forster, P. M. (2016). New use of global warming potentials to compare cumulative and short-lived climate pollutants. *Nature Climate Change*, 6(8), 773-776.
- Allison, S. D., Weintraub, M. N., Gartner, T. B., & Waldrop, M. P. (2011). Evolutionary-economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function. *Soil Enzymology*, 22, 229–243. doi: 10.1007.
- Altieri MA, Nicholls CI (2004) Biodiversity and pest management in agroecosystems. Food Product Press, New York
- Altieri, M.A. (2005). The myth of coexistence: Why transgenic crops are not compatible with agroecologically based systems of production. *Bulletin of Science, Technology & Society* 25(4): 361–371
- Alvarez, R. (2005). A review of nitrogen fertilizer and conservation tillage effects on soil organic carbon storage. *Soil Use and Management*, 21(1), 38-52.
- Alvear, M., Rosas, A., Rouanet, J. L., & Borie, F. (2005). Effects of three soil tillage systems on some biological activities in an Ultisol from southern Chile. *Soil and Tillage Research*, 82(2), 195-202.
- Amekawa Y. (2011) Agroecology and Sustainable Livelihoods: Towards an Integrated Approach to Rural Development, *Journal of Sustainable Agriculture*, 35:2, 118-162.
- Anderson, T.-H., Domsch, K.H. (1985). Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. *Biol. Fertil. Soils* 1, 81–89.
- Anderson, T.-H., Domsch, K.H. (1989). Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. *Soil Biol. Biochem.* 21, 471–479.
- Anderson, T.-H., Domsch, K.H. (1990). Application of eco-physiological quotients (qCO₂ and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biol. Biochem.* 22, 251–255.

- Andrade D.S., Colozzi-Filho A., Giller K.E. (2003). The Soil Microbial Community and Soil Tillage, pp. 51-81, In A. El Titi, ed. *Soil Tillage in Agroecosystems*. CRC Press LLC, Boca Raton.
- Angers, D.A., Voroney, R.P., and Cote, D. (1995). Dynamics of soil organic matter and corn residues as affected by tillage practices. *Soil Science Society of America Journal*, 59:1311–1315.
- Arrouays, D., Balesdent, J., Germon, J. C., Jayet, P. A., Soussana, J. F., & Stengel, P. (2002). *Stocker du carbone dans les sols agricoles de France? Rapport* (Doctoral dissertation, Inra).
- Atwell, B. J. (1990). The effect of soil compaction on wheat during early tillering: I. Growth, development and root structure. *New Phytologist*, 115(1), 29-35.
- Bah, B. B., Engels, P., Colinet, G., Bock, L., Bracke, C., & Veron, P. (2005). *Légende de la Carte Numérique des Sols de Wallonie (Belgique)*. Sur base de la légende originale de la Carte des sols de la Belgique de l'IRSIA à 1/20.000.
- Balesdent, J.; Chenu, C.; Balabane, M., (2000). Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil & Tillage Research*, 53 (3-4): 215-230.
- Bandick, A.K. and Dick, R.P. (1999) Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* 31,1471–1479.
- Basu, M., & Xavier Savarimuthu, S. J. (2017). *Fundamentals of environmental studies*. Cambridge University Press.
- Bardgett, R., van der Putten, W. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515, 505–511 (2014).
- BCGMS (2022a) (Belgian Crop Growth Monitoring System). *Bulletin Agrométéorologique (Belgique): Situation au 30 avril 2022*.
- BCGMS (2022b) (Belgian Crop Growth Monitoring System). *Bulletin Agrométéorologique (Belgique): Situation au 10 juin 2022*.
- Berg, B., & Laskowski, R. (2005). Origin and structure of secondary organic matter and sequestration of C and N. *Advances in Ecological Research*, 38, 185-226.
- Bernard, B., Lux, A. (2017). How to feed the world sustainably: an overview of the discourse on agroecology and sustainable intensification. *Reg Environ Change* 17, 1279–1290.
- Ben-Hur, M., M. Agassi, R. Keren, and J. Zhang. (1998). Compaction, aging, and raindrop-impact effects on hydraulic properties of saline and sodic vertisols. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62:1377–1383.

- Biederbeck VO, Zentner RP, Campbell CA. (2005). Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. *Soil. Biol. Biochem.* 37: 1775-1784.
- Blum A. & Pnuel Y. (1996). Physiological attributes associated with drought resistance of wheat cultivars in a mediterranean environment. *Aust. J. Agric. Res.*, 41, 799-810.
- Bockheim, J.G., Gennadiyev, A.N., Hammer, R.D. & Tandarich, J.P. (2005). Historical development of key concepts in pedology. *Geoderma*, 124: 23-36
- Bol, R., Poirier, N., Balesdent, J., & Gleixner, G. (2009). Molecular turnover time of soil organic matter in particle-size fractions of an arable soil. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 23(16), 2551-2558.
- Borlaug NE (2000) Ending world hunger. The promise of biotechnology and the threat of antiscience zealotry. *Plant Phys* 124:487–490.
- Bot, A., & Benites, J. (2005). The importance of soil organic matter: Key to drought-resistant soil and sustained food production (No. 80). *Food & Agriculture Org.*
- Brankatschk, G., & Finkbeiner, M. (2015). Modeling crop rotation in agricultural LCAs—challenges and potential solutions. *Agricultural Systems*, 138, 66-76.
- Butterly, C. R., Baldock, J. A., & Tang, C. (2013). The contribution of crop residues to changes in soil pH under field conditions. *Plant and soil*, 366(1), 185-198.
- Broux, F., Lognoul, M., Theodorakopoulos, N., Hiel, M. P., Bodson, B., Heinesch, B., & Aubinet, M. (2017). 10. 2. Le travail superficiel du sol, plutôt qu'un labour conventionnel, permet-il de réduire les émissions de N₂O vers l'atmosphère? Campagne sur un essai en froment d'hiver. *Livre Blanc Céréales*, 10.
- Bronick, C.J.; Lal, R., (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124 (1-2): 3-22.
- Brown, D. G., Robinson, D. T., French, N. H., & Reed, B. C. (Eds.). (2013). *Land use and the carbon cycle: advances in integrated science, management, and policy*. Cambridge University Press.
- Canuel, E.A., Hardison, A.K. (2018). Carbon Cycle. In: White, W.M. (eds) *Encyclopedia of Geochemistry*. Encyclopedia of Earth Sciences Series. Springer, Cham.
- Cambardella, C. A., & Elliott, E. T. (1992). Particulate soil organic-matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Science Society of America Journal*, 56, 777–783.

- Campbell, C. D., Chapman, S. J., Cameron, C. M., Davidson, M. S., & Potts, J. M. (2003). A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3593-3599.
- Campbell, C. J. (2005). *Oil crisis*. Multi-science publishing.
- Campbell, N. (1995). *Biologie* (3^e édition, 1190p), De Boeck – Wesmael, pp. 1071-1073
- Cardon, Z. G., Hungate, B. A., Cambardella, C. A., Chapin, F. S. I., Chapin, F. S., Field, C. B., ... Mooney, H. A. (2001). Contrasting effects of elevated CO₂ on old and new soil carbon pools. *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 365–373.
- Chabbi, A.; Lehmann, J.; Ciais, P.; Loescher, H. W.; Cotrufo, M. F.; Don, A.; SanClements, M.; Schipper, L.; Six, J.; Smith, P.; Rumpel, C. (2017). Aligning agriculture and climate policy. *Nature Climate Change*, 7(5), 307–309. doi:10.1038/nclimate3286
- Chevalier, A. (1924). Les organismes vivant dans la terre et leurs rapports avec la fertilité des sols. In: *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 4^e année, bulletin n°31, pp. 153-163.
- Chen, H., Li, X., Hu, F., and Shi, W. (2013). Soil Nitrous Oxide Emissions Following Crop Residue Addition: a Meta-Analysis. *Glob. Change Biol.* 19, 2956–2964.
- Chenu, C.; Le Bissonnais, Y.; Arrouays, D., (2000). Organic matter influence on clay wettability and soil aggregate stability. *Soil Science Society of America Journal*, 64 (4): 1479-1486.
- Chivenge, P. P., Murwira, H. K., Giller, K. E., Mapfumo, P., & Six, J. (2007). Long-term impact of reduced tillage and residue management on soil carbon stabilization: implications for conservation agriculture on contrasting soils. *Soil and Tillage Research*, 94(2), 328-337.
- Chotte, J. L. (2005). Importance of microorganisms for soil aggregation. In F. Buscot & A. Varma (Eds.), *Microorganisms in soils: Roles in genesis and functions* (pp. 107–119). Berlin: Springer.
- Christensen, B. T. (2001). Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *European Journal of Soil Science*, 52, 345–353.
- Chu, B., Zaid, F., & Eivazi, F. (2016). Long-term effects of different cropping systems on selected enzyme activities. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(6), 720-730.
- Clapp, C.E., Allmaras, R.R., Layese, M.F., Linden, D.R., and Dowdy, R.H. 2000. Soil organic carbon and ¹³C abundance as related to tillage, crop residue, and nitrogen.

- Copeck, K., Filipovic, D., Husnjak, S., Kovacev, I., & Kosutic, S. (2015). Effects of tillage systems on soil water content and yield in maize and winter wheat production. *Plant, Soil and Environment*, 61(5), 213-219.
- Cookson, W. R., Murphy, D. V., & Roper, M. M. (2008). Characterizing the relationships between soil organic matter components and microbial function and composition along a tillage disturbance gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3), 763-777.
- Creamer, R. E., Stone, D., Berry, P., & Kuiper, I. (2016). Measuring respiration profiles of soil microbial communities across Europe using MicroResp™ method. *Applied soil ecology*, 97, 36-43.
- Cruse, R. M., S. Lee, T. E. Fenton, E. Wang, and J. Laflen. 2013. Soil renewal and sustainability. In *Principles of Sustainable Soil Management in Agroecosystems*, edited by R. Lal and B. A. Stewart. Boca Raton, FL: CRC Press
- Davet, P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétale*, éditions Quae, p. 143.
- Davinic, M., Fultz, L. M., Acosta-Martinez, V., Caldero´n, F. J., Cox, S. B., Dowd, S. E., Allen, V. G., Zak, J. C., & Moore-Kucera, J. (2012). Pyrosequencing and mid-infrared spectroscopy reveal distinct aggregate stratification of soil bacterial communities and organic matter composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 46, 63–72.
- Degrune, F., Theodorakopoulos, N., Dufrêne, M., Colinet, G., Bodson, B., Hiel, M. P., ... & Vandenberghe, M. (2016). No favorable effect of reduced tillage on microbial community diversity in a silty loam soil (Belgium). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 224, 12-21.
- Degrune, F., Theodorakopoulos, N., Colinet, G., Hiel, M. P., Bodson, B., Taminiau, B., ... & Hartmann, M. (2017). Temporal dynamics of soil microbial communities below the seedbed under two contrasting tillage regimes. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1127.
- De Fede, K. L., Panaccione, D. G., & Sextstone, A. J. (2001). Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOG® community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rRNA genes. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(11), 1555-1562.
- de Ruiter, P.C., A.M. Neutel, and J.C. Moore. (1994). Modeling food webs and nutrient cycling in agroecosystems. *Trends in Ecology and Evolution* 9:378-383.
- De Schutter O, Vanloqueren G (2011) The new green revolution: how twenty-first-century science can feed the world. *Solut J* 2:33–44.

- Des Marais, D. J. (2001). Isotopic evolution of the biogeochemical carbon cycle during the Precambrian. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 43(1), 555-578.
- Deswarte J-C. (2021). Comprendre. Physiologie du blé : huit semaines pour remplir un grain. *Perspectives agricoles*(489).
- Drake, J. E., Gallet-Budynek, A., Hofmockel, K. S., Bernhardt, E. S., Billings, S. A., Jackson, R. B., ... Finzi, A. C. (2011). Increases in the flux of carbon belowground stimulate nitrogen uptake and sustain the long-term enhancement of forest productivity under elevated CO₂. *Ecology Letters*, 14, 349–357. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01593.x>
- European soil data centre (ESDAC) (consulté en ligne le 08 août 2022). Soil strategy. Retrieved from https://ec.europa.eu/environment/strategy/soil-strategy_en
- Eylenbosch, D., Fernández Pierna, J. A., Baeten, V., & Bodson, B. (2015). Use of NIR hyperspectral imaging and chemometrics to quantify roots and crop residues in soil. In 17th International Conference on Near Infrared Spectroscopy.
- FAO and ITPS. (2015). Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Main Report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy.
- FAO 2017. Carbone Organique du Sol: une richesse invisible. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, Italie.
- FAO, 2020. The share of agriculture in total greenhouse gas emission. Global, regional and country trends 1990–2017. FAOSTAT Analytical Brief Series No 1. Rome.
- Field CB & Mooney HA. (1986). The nitrogen/photosynthesis relationship in wild plants. In: Givnish TJ (Ed) *On the Economy of Plant Form and Function* (pp 25-55). Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Fontaine, S., Hénault, C., Aamor, A., Bdioui, N., Bloor, J. M. G., Maire, V., ... & Maron, P. A. (2011). Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil biology and Biochemistry*, 43(1), 86-96.
- Fung, I. (2003). *Encyclopedia of Physical Science and Technology || Carbon Cycle.* , (), 417–429. doi:10.1016/b0-12-227410-5/00921-2.

- Franzleubbers, A.J. (2004). Tillage and residue management effects on soil organic matter. In *Soil organic matter in sustainable agriculture*, ed. F. Magdoff and R.R. Weil. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 227–268.
- Franzleubbers, A.J. 2002. Soil organic matter stratification ratio as an indicator of soil quality. *Soil and Tillage Research*, 66:95–106.
- Fu, B., Chen, L., Huang, H., Qu, P., & Wei, Z. (2021). Impacts of crop residues on soil health: A review. *Environmental Pollutants and Bioavailability*, 33(1), 164-173.
- Gadd, G. M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological research*, 111(1), 3-49.
- Gao, F., Hu, J., Ren, B., Liu, P., Zhao, B., & Zhang, J. (2020). Improving soil properties and grains yield of winter wheat and summer corn under residue management strategies. *Agronomy Journal*, 112(5), 4287-4302.
- García-Ruiz, R., Ochoa, V., Hinojosa, M. B., & Carreira, J. A. (2008). Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2137-2145.
- Gates B (2009) Keynote presentation: Support for the world's poorest farmers. The World Food Prize 2009 Norman E. Borlaug International Symposium 14–16 Oct 2009, Des Moines.
- Genot, V., Renneson, M., Colinet, G., Goffaux, M. J., Cugnon, T., Toussaint, B., ... & Oger, R. (2012). Base de données sols de REQUASUD-3ème synthèse.
- Gianfreda, L., Sannino, F., Rao, M. A., & Bollag, J. M. (2003). Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. *Water research*, 37(13), 3205-3215.
- Gliessman SR (2015) *Agroecology: the ecology of sustainable food systems*, 3d edn. CRC Press, Raton.
- Goidts, E.; van Wesemael, B., (2007). Regional assessment of soil organic carbon changes under agriculture in Southern Belgium (1955–2005). *Geoderma*, 141 (3-4): 341-354
- Gouache D. (2009). Comment ça marche ? La précocité variétale : Chaque plante pousse à son rythme. *Perspectives agricoles*(362).
- Grayston, S. J., Griffith, G. S., Mawdsley, J. L., Campbell, C. D., & Bardgett, R. D. (2001). Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(4-5), 533-551.

- Green, B. M. (1978). *Eating Oil – Energy Use in Food Production*. Westview Press, Boulder, CO.
- Guan, D., Zhang, Y., Al-Kaisi, M. M., Wang, Q., Zhang, M., & Li, Z. (2015). Tillage practices effect on root distribution and water use efficiency of winter wheat under rain-fed condition in the North China Plain. *Soil and Tillage Research*, 146, 286-295.
- Gurr GM, Wratten SD, Altieri MA (2004) *Ecological engineering for pest management*. Advances in habitat manipulation for arthropods. CSIRO, Australia.
- Haynes, R.J. and Tregurtha, R. (1999) Effects of increasing periods under intensive arable vegetable production on biological, chemical and physical indices of soil quality. *Biology and Fertility of Soils* 28, 259–266
- Henriet, F., Jaunard, D., Gilleman, A., Monty, A. P., Mahy, G., & Bodson, B. (2017, February). Influence du travail du sol su. In *Livre Blanc Céréales*.
- Hiel, M. P., Barbieux, S., Pierreux, J., Olivier, C., Lobet, G., Roisin, C., ... & Dumont, B. (2018). Impact of crop residue management on crop production and soil chemistry after seven years of crop rotation in temperate climate, loamy soils. *PeerJ*, 6, e4836.
- Holland. HD. (1984). *The Chemical Evolution of the Atmosphere and Oceans*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Holland, JM. (2004). The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agric Ecosyst Environ* 103:1–25.
- Holt-Giménez, E. and I. Kenfield. (2008). When renewable isn't sustainable: Agrofuels and the inconvenient truths behind the 2007 U.S. Energy Independence and Security Act. Policy Brief No. 13. Oakland, CA: Institute for Food and Development Policy.
- Holt-Giménez, E., & Altieri, M. A. (2013). Agroecology, food sovereignty, and the new green revolution. *Agroecology and sustainable Food systems*, 37(1), 90-102.
- Horlings LG, Marsden TK. (2011). Towards the real green revolution? Exploring the conceptual dimensions of a new ecological modernization of agriculture that could 'feed the world'. *Glob Environ Change* 21:441–452.
- Huang J, Pray C, Rozelle S (2002) Enhancing the crops to feed the poor. *Nature* 418:678–684.
- Huggins, D.R., Allmaras, R.R., Clapp, C.E., Lamb, J.A., and Randall, G.W. 2007. Corn-soybean sequence and tillage effects on soil carbon dynamics and storage. *Soil Science Society of America Journal*, 71:145–154.

- IAASTD [International Assessment of Agricultural Knowledge, Science and Technology for Development] (2009) Synthesis report with executive summary: a synthesis of the global and sub-global IAASTD reports In: McIntyre BD, Herren H, Wakhungu J, Watson R (eds), Island Press, Washington, pp. 5-25
- Inman, M. (2016). *The Oracle of Oil: A Maverick Geologist's Quest for a Sustainable Future*. W. W. Norton & Company.
- IPCC. (2001). Working Group II. Impacts, adaptation and vulnerability. In *Fourth assessment report*, edited by M. L. Parry, O. F. Canziani, J. P. Palutikof, P. J. van der Linden, and C. E. Hanson. New York, NY: Cambridge University Press.
- IPCC. (2006). WGII. Fourth Assessment Report – Draft for Government and Expert Review, Chapter 5 – Food, Fibre, and Forest Products, pp. 7-8
- IPCC. (2007). *Climate Change : The Physical Science Basis* (eds Solomon, S. et al.) (Cambridge Univ. Press, 2008).
- IPCC. (2021). *Climate Change : The Physical Science Basis, Summary for Policymakers. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E.
- Ji, W., Shen, Z. Wen, Y. (2014). A Continuous Hydrothermal Saccharification Approach of Rape Straw Using Dilute Sulfuric Acid. *BioEnergy Research*. 7. 1392-1401. 10.1007/s12155-014-9468-y.
- Joergensen, R. G. (1996). The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the kEC value. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(1), 25-31.
- Kallenbach, C. M., Frey, D. S., & Grandy, A. S. (2016). Direct evidence for microbial-derived soil organic matter formation and its ecophysiological controls. *Nature Communications*, 7, 13630.
- Kang, M. S., & Banga, S. S. (2013). Global agriculture and climate change. *Journal of Crop Improvement*, 27(6), 667-692.
- Kaviya, N., Upadhyay, V. K., Singh, J., Khan, A., Panwar, M., & Singh, A. V. (2019). Role of microorganisms in soil genesis and functions. In *Mycorrhizosphere and pedogenesis* (pp. 25-52). Springer, Singapore.
- Keiluweit, M., Bougoure, J. J., Nico, P. S., Pett-Ridge, J., Weber, P. K., & Kleber, M. (2015). Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. *Nature Climate Change*, 5, 588–595.

- Khosro, M., Gholamreza, H., Shiva, K., & Yousef, S. (2011). Soil management, microorganisms and organic matter interactions: A review. *African Journal of Biotechnology*, 10(86), 19840-19849.
- Klotzbücher, T., Kaiser, K., Guggenberger, G., Gatzek, C. & Kalbitz, K. A new conceptual model for the fate of lignin in decomposing plant litter. *Ecology* 92, 1052–1062 (2011).
- Kooijman, A., Sparrius, L. & Sevink, J. (2010). Nutrient cycling.
- Kurukulasuriya, Pradeep; Rosenthal, Shane. (2013). Climate Change and Agriculture : A Review of Impacts and Adaptations. Environment department papers;no. 91. Climate change series. World Bank, Washington, DC. © World Bank. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/16616> License: CC BY 3.0 IGO.
- Lal, R. (2011). Soil Carbon Sequestration: SOLAW Background Thematic Report–TR04B. Roma: FAO. Recuperado de http://www.fao.org/fileadmin/templates/solaw/files/thematic_reports/TR_04b_web.pdf.
- Lal, R. (2016 a). Beyond COP 21: Potential and challenges of the "4 per Thousand" initiative. *Journal of Soil and Water Conservation*, 71(1), 20A–25A. doi:10.2489/jswc.71.1.20A
- Lal R (2016 b) Soil health and carbon management *Food Energy Secur.* 5 212–22.
- Lahlali, R., Ibrahim, D. S., Belabess, Z., Roni, M. Z. K., Radouane, N., Vicente, C. S., ... & Peng, G. (2021). High-throughput molecular technologies for unraveling the mystery of soil microbial community: Challenges and future prospects. *Heliyon*, 7(10), e08142.
- Lavallee, J. M., Soong, J. L., & Cotrufo, M. F. (2020). Conceptualizing soil organic matter into particulate and mineral-associated forms to address global change in the 21st century. *Global Change Biology*, 26(1), 261-273.
- Lecarpentier C, Barillot R, Blanc E, Abichou M, Goldringer I, Barbillon P, Enjalbert J, Andrieu B. (2019) WALTER: a three-dimensional wheat model to study competition for light through the prediction of tillering dynamics. *Ann Bot*, 6 (123) 961-975.
- Legrain, X., & Bock, L. (2009). Légende de la Carte Numérique des Sols de Wallonie-Tableau simplifié.
- Lehmann, J., & Kleber, M. (2015). The contentious nature of soil organic matter. *Nature*, 528(7580), 60-68.
- Lehtinen, T.; Schlatter, N.; Baumgarten, A.; Bechini, L.; Krüger, J.; Grignani, C.; Zavattaro, L.; Costamagna, C.; Spiegel, H., 2014. Effect of crop residue incorporation on soil organic carbon and greenhouse gas emissions in European agricultural soils. *Soil Use and Management*, 30 (4): 524-538.

- Litchman, E., de Tezanos Pinto, P., Edwards, K. F., Klausmeier, C. A., Kremer, C. T., & Thomas, M. K. (2015). Global biogeochemical impacts of phytoplankton: a trait-based perspective. *Journal of Ecology*, 103(6), 1384–1396.
- Liu, C.; Lu, M.; Cui, J.; Li, B.; Fang, C., (2014). Effects of straw carbon input on carbon dynamics in agricultural soils: a meta-analysis. *Global Change Biology*, 20 (5): 1366-81.
- Lognoul, M., Theodorakopoulos, N., Hiel, M. P., Regaert, D., Broux, F., Heinesch, B., ... & Aubinet, M. (2017). Impact of tillage on greenhouse gas emissions by an agricultural crop and dynamics of N₂O fluxes: Insights from automated closed chamber measurements. *Soil and Tillage Research*, 167, 80-8.
- Lou, Y., Liang, W., Xu, M., He, X., Wang, Y., & Zhao, K. (2011). Straw coverage alleviates seasonal variability of the topsoil microbial biomass and activity. *Catena*, 86(2), 117-120.
- Lützow, M. V., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., & Flessa, H. (2006). Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions—a review. *European journal of soil science*, 57(4), 426-445.
- Lynch, J., Cain, M., Pierrehumbert, R., & Allen, M. (2020). Demonstrating GWP*: a means of reporting warming-equivalent emissions that captures the contrasting impacts of short-and long-lived climate pollutants. *Environmental Research Letters*, 15(4), 044023.
- Lynch, J., Cain, M., Frame, D., & Pierrehumbert, R. (2021). Agriculture's contribution to climate change and role in mitigation is distinct from predominantly fossil CO₂-emitting sectors. *Frontiers in sustainable food systems*, 300
- Lauber, C., Ramirez, K., Aanderud, Z. et al. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *ISME J* 7, 1641–1650 (2013).
- Lee, K.E. and C.E. Pankhurst. (1992). Soil organisms and sustainable productivity. *Australian Journal of Soil Research* 30: 855-892.
- Li Y., Wu J., Shen J., Liu S., Wang C., Chen D., Huang T. & Zhang J., 2016. Soil microbial C:N ratio is a robust indicator of soil productivity for paddy fields. *Sci. Rep.* 6, 1–8.
- Marino., R.W., Howarth., R. (2014). Nitrogen Fixation in Freshwater and Saline Waters☆, Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier.
- Masle, J., & Passioura, J. B. (1987). The effect of soil strength on the growth of young wheat plants. *Functional Plant Biology*, 14(6), 643-656.

- McCarty G.W., Lyssenko N.N., Starr J.L., 1998 - Short-term changes in soil carbon and nitrogen pools during tillage management transition. *Soil Science Society of America Journal*, 62, pp. 1564-1571.
- McNeely JA, Scherr SJ (2003) *Ecoagriculture. Strategies to feed the world and save biodiversity*. Island Press, Washington D.C.
- Merrien, A. & Milan, M.J. (1992). *Physiologie du tournesol*. CETIOM ed. CETIOM, Paris.
- Meurer, K.H.E.; Haddaway, N.R.; Bolinder, M.A.; Katterer, T., (2018). Tillage intensity affects total SOC stocks in boreo-temperate regions only in the topsoil-A systematic review using an ESM approach. *Earth-Science Reviews*, 177: 613-622.
- Minasny, B., Malone, B. P., McBratney, A. B., Angers, D. A., Arrouays, D., Chambers, A., ... & Winowiecki, L. (2017). Soil carbon 4 per mille. *Geoderma*, 292, 59-86.
- Mirleau-Thebaud, V., Dayde, J., & Scheiner, J. D. (2017). The influence of soil compaction and conservation tillage on sunflower's (*Helianthus annuus* L.) below ground system. *Phyton*, 86, 53.
- Mitchell, E., Scheer, C., Rowlings, D., Conant, R. T., Cotrufo, M. F., & Grace, P. (2018). Amount and incorporation of plant residue inputs modify residue stabilisation dynamics in soil organic matter fractions. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 256, 82-91.
- Monger, H. C.; Kraimer, R. A.; Khresat, S.; Cole, D. R.; Wang, X.; Wang, J. (2015). Sequestration of inorganic carbon in soil and groundwater. *Geology*, 43(5), 375–378. doi:10.1130/G36449.1
- Morel., R.(1999).*Environnement biologique de la racine. Les sols cultivés (2ème édition)*. Tec & Doc Lavoisier
- Moroke, T. S., Schwartz, R. C., Brown, K. W., & Juo, A. S. R. (2011). Water use efficiency of dryland cowpea, sorghum and sunflower under reduced tillage. *Soil and Tillage Research*, 112(1), 76-84.
- Mooshammer, M., Wanek, W., Hämmerle, I., Fuchslueger, L., Hofhansl, F., Knoltsch, A., et al. (2014a). Adjusting of microbial nitrogen use efficiency to carbon: nitrogen imbalances regulated soil nitrogen cycling. *Nat. Commun.* 5:3694. doi: 10.1038/ncomms4694
- Mooshammer, M., Wanek, W., Zechmeister-Boltenstern, S., & Richter, A. (2014b). Stoichiometric imbalances between terrestrial decomposer communities and their resources: Mechanisms and implications of microbial adaptations to their resources. *Frontiers in Microbiology*, 5, 22.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00022>

- Müller, T., Jensen, S., Nielsen, N. E., and Magid, J. (1998). Turnover of carbon and nitrogen in a sandy loam soil following incorporation of chopped maize plants barley straw and blue grass in the field. *Soil Biol. Biochem.* 30, 561–571. doi: 10.1016/S0038-0717(97)00178-8
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., ... & Martin, W. F. (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 444-495.
- Munkholm, L. J., Hansen, E. M., & Olesen, J. E. (2008). The effect of tillage intensity on soil structure and winter wheat root/shoot growth. *Soil Use and Management*, 24(4), 392-400.
- Ogle, S.M., Breidt, F.J., and Paustian, K. 2005. Agricultural management impacts on soil organic carbon storage under moist and dry climatic conditions of temperate and tropical regions. *Biogeochemistry*, 72:87–121.
- Olsson, P.A., I. Thingstrup, I. Jakobsen, and E. Baath. (1999). Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. *Soil Biology and Biochemistry* 31:1879-1887.
- Onica, B. M., Vidican, R., & Sandor, M. (2018). A Short Review about Using MicroResp Method for the Assessment of Community Level Physiological Profile in Agricultural Soils. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 75(1).
- Ostrowska A. & Porębska G., 2015. Assessment of the C/N ratio as an indicator of the decomposability of organic matter in forest soils. *Ecol. Indic.* 49, 104–109.
- Pasha, I., Saeed, F., Waqas, K., Anjum, F., Arshad, M. (2013). Nutraceutical and Functional Scenario of Wheat Straw. *Critical reviews in food science and nutrition.* 53. 287-95.
10.1080/10408398.2010.528080.
- Paul, E.A., and F.E. Clark. (1996). *Soil Microbiology and Biochemistry*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press.
- Phillips, R. P., Finzi, A. C., & Bernhardt, E. S. (2010). Enhanced root exudation induces microbial feedbacks to N cycling in a pine forest under long-term CO₂ fumigation. *Ecology Letters*, 14, 187–194.
- Pellerin, S., Bamière, L., Launay, C., Martin, R., Schiavo, M., Angers, D., ... & Rechauchère, O. (2020). Stocker du carbone dans les sols français. Quel potentiel au regard de l'objectif 4 pour 1000 et à quel coût? (Doctoral dissertation, INRA).
- Perfecto I, Vandermeer J (2010) The agroecological matrix as alternative to the land-sparing/agriculture intensification model. *Proc Natl Acad Sci* 107:5786–5791

- Perucci, P., Dumontet, S., Bufo, S.A., Mazzatura, A. and Casucci, C. (2000). Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils* 32, 17–23.
- Peterjohn, W. T., & Schlesinger, W. H. (1990). Nitrogen loss from deserts in the southwestern United States. *Biogeochemistry*, 10(1), 67-79.
- Phillips, R. P., Finzi, A. C., & Bernhardt, E. S. (2010). Enhanced root exudation induces microbial feedbacks to N cycling in a pine forest under long-term CO₂ fumigation. *Ecology Letters*, 14, 187–194. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01570.x>
- Phipps RH, Park JR (2002) Environmental benefits of genetically modified crops: global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use. *J Anim Feed Sci* 11:1–18.
- Pierrehumbert, R. (2014). Short-lived climate pollution. *Ann. Rev. Earth Planet. Sci.* 42, 341–379. doi: 10.1146/annurev-earth-060313-054843.
- Pierreux, J., Dufranne, D., Lemtiri, A., Locquet R., Lumaye, F., Olivier, C., Stroobants, A., Colinet, G., Roisin, C., et Bodson, C., (2012). Perspective-Impact de la gestion culturale sur le développement des cultures. Livre Blanc: Céréales Gembloux, 6-7
- Pikul, J.L., Jr., and J.K. Aase. (1995). Infiltration and soil properties as affected by annual cropping in the northern Great Plains. *Agron. J.* 87:656–662.
- Poeplau, C.; Reiter, L.; Berti, A.; Kätterer, T., 2017. Qualitative and quantitative response of soil organic carbon to 40 years of crop residue incorporation under contrasting nitrogen fertilisation regimes. *Soil Research*, 55 (1): 1.
- Poirier, V. (2007). Séquestration du carbone dans un sol agricole du Québec : influence du travail du sol et de la fertilisation des cultures [Mémoire de master, Département des sols et de génie agroalimentaire de la Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation de l'Université Laval].
- Post, W. M.; Emanuel, W. R.; Zinke, P. J.; Stangenberger, A. G. (1982). Soil carbon pools and world life zones. , 298(5870), 156–159. doi:10.1038/298156a0
- Postgate. J.R. (1974). Evolution within nitrogen-fixing systems. *Symposia of the Society for General Microbiology*, 24, 263-292. Cité dans Dommergues 1978.
- Powlson, D.S., C.M. Stirling, M.L. Jat, B.G. Gerard, C.A. Palm, P.A. Sanchez, and K.G. Cassman. (2014). “Limited potential of no-till agriculture for climate change mitigation.” *Nat. Clim. Chang.* 4, 678-683.

- Rahman M.H., Okubo A., Sugiyama S., Mayland H.F. (2008). Physical, chemical and microbiological properties of an Andisol as related to land use and tillage practice. *Soil and Tillage Research*, 101, 1-2, pp. 10-19.
- Ranjard, L., & Richaume, A. (2001). Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in microbiology*, 152(8), 707-716.
- Reichel, R., Wei, J., Islam, M. S., Schmid, C., Wissel, H., Schröder, P., ... & Brüggemann, N. (2018). Potential of wheat straw, spruce sawdust, and lignin as high organic carbon soil amendments to improve agricultural nitrogen retention capacity: an incubation study. *Frontiers in plant science*, 9, 900.
- Reichle DE (1977) The role of soil invertebrates in nutrient cycling. *Ecol Bull* 25:145–156
- Reicosky, D.C., and Lindstrom, M.J. (1993). Fall tillage method: Effect on short-term carbon dioxide flux from soil. *Agronomy Journal*, 85:1237–1243.
- Reicosky, D.C., and Archer, D.W. (2007). Moldboard plow tillage depth and short-term carbon dioxide release. *Soil and Tillage Research*, 94:109–121.
- Renault, P., Ben-Sassi, M., & Berard, A. (2013). Improving the MicroResp™ substrate-induced respiration method by a more complete description of CO₂ behavior in closed incubation wells. *Geoderma*, 207, 82-91.
- Rezig, F. A. M., Mubarak, A. R., & Ehadi, E. A. (2013). Impact of organic residues and mineral fertilizer application on soil–crop system: II soil attributes. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59(9), 1245-1261.
- Richards, M., T. Sapkota, C. Stirling, and C. Thierfelder. (2014). “Conservation agriculture: Implementation guidance for policymakers and investors.” CSA Practice Brief. Copenhagen and Rome: CGIAR Research Program on Climate Change, Agriculture and Food Security and United Nations Food and Agriculture Organization
- Richards, M., Arslan, A., Cavatassi, R., & Rosenstock, T. (2019). Climate change mitigation potential of agricultural practices supported by IFAD investments. *IFAD Res. Ser*, 35, 1-30.
- Rochette, P.; Worth, D.E.; Lemke, R.L.; McConkey, B.G.; Pennock, D.J.; Wagner-Riddle, C.; Desjardins, R.L., (2008). Estimation of N₂O emissions from agricultural soils in Canada. I. Development of a country-specific methodology. *Canadian Journal of Soil Science*, 88 (5): 641-654.

- Rochette, P., Flanagan, L.B., and Gregorich, E.G. (1999). Separating soil respiration into plant and soil components using analyses of the natural abundance of carbon-13. *Soil Science Society of America Journal*, 63:1207–1213.
- Roger PA, Garcia J-L (2001) Introduction à la microbiologie du sol. Polycopié de cours (Université de Provence, Université de la Méditerranée, Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Luminy. 191pp.
- Rosenzweig, C., and D. Liverman. (1992). Predicted effects of climate change on agriculture: A comparison of temperate and tropical regions. In *Global climate change: Implications, challenges, and mitigation measures*, ed. S. K. Majumdar, 342-61. PA: The Pennsylvania Academy of Sciences.
- Rousk, J., Hill, P. W., & Jones, D. L. (2015). Priming of the decomposition of ageing soil organic matter: concentration dependence and microbial control. *Functional Ecology*, 29(2), 285-296.
- Sá, J.C.D., L. Séguy, E. Gozé, S. Bouzinac, O. Husson, S. Boulakia et al. 2006. "Carbon sequestration rates in no-tillage soils under intensive cropping systems in tropical agroecozones." *Conservation Agriculture Carbon Offset Consultation*. Rome: United Nations Food and Agriculture Organization, 1-13.
- Sadras, V. O., O'Leary, G. J., & Roget, D. K. (2005). Crop responses to compacted soil: capture and efficiency in the use of water and radiation. *Field Crops Research*, 91(2-3), 131-148.
- Schimel, D. S. (1995). Terrestrial ecosystems and the carbon cycle. *Global change biology*, 1(1), 77-91.
- Schlesinger, W. H., & Bernhardt, E. S. (2013). *Biogeochemistry: an analysis of global change*. Academic press.
- Schlüter, S., Leuther, F., Albrecht, L., Hoeschen, C., Kilian, R., Surey, R., ... & Vogel, H. J. (2022). Microscale carbon distribution around pores and particulate organic matter varies with soil moisture regime. *Nature communications*, 13(1), 1-14.
- Schmidt, M. & Noack, A. (2000). Black carbon in soils and sediments: Analysis, distribution, implications, and current challenges. *Global Biogeochemical Cycles*, 14(3): 777-793.
- Schmidt, M. W., Torn, M. S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I. A., ... & Trumbore, S. E. (2011). Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature*, 478(7367), 49-56.
- Schulze, E. D., Luysaert, S., Ciais, P., Freibauer, A., Janssens, I. A., Soussana, J. F., ... & Gash, J. H. (2009). Importance of methane and nitrous oxide for Europe's terrestrial greenhouse-gas balance. *Nature geoscience*, 2(12), 842-850.

- Seghers, D., Verthé, K., Reheul, D., Bulcke, R., Siciliano, S. D., Verstraete, W., & Top, E. M. (2003). Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(2), 139-146.
- Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M. H., Kirchmann, H., & Kandeler, E. (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and environmental microbiology*, 67(9), 4215-4224.
- Sigler., V. (2004, december). Fluorescein diacetate hydrolysis assay. Laboratory for Environmental Pathogens Research Department of Environmental Sciences University of Toledo.
- Six, J., Elliott, E. T., & Paustian, K. (1999). Aggregate and soil organic matter dynamics under conventional and no-tillage systems. *Soil Science Society of America Journal*, 63(5), 1350-1358.
- Six, J., Feller, C., Deneff, K., Ogle, S.M., Moraes Sa, J.C., and Albrecht, A. (2002). Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils – effects of no-tillage. *Agronomie*, 22 :755–775.
- Six, J., Frey, S. D., Thiet, R. K., & Batten, K. M. (2006). Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 70(2), 555-569.
- Smith, P., Martino, D., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P., ... & Smith, J. (2007). Greenhouse gas mitigation in agriculture. *Philosophical transactions of the royal Society B: Biological Sciences*, 363(1492), 789-813.
- Sofield T., Evans J., Cook M.G. & Wardlaw I.F. (1977). Factors influencing the rate and duration of grain filling in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.*, 4, 785-797.
- Sollins, P., Homann, P., & Caldwell, B. A. (1996). Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma*, 74(1-2), 65-105.
- Sparks, D.L. (1996). [SSSA Book Series] *Methods of Soil Analysis Part 3—Chemical Methods || Total Carbon, Organic Carbon, and Organic Matter.* , (), –.
- Sperow, M., Eve, M., and Paustian, K. (2003). Potential soil C sequestration on US agricultural soils. *Climatic Change*, 57:319–339.
- Sulman, B. N., Phillips, R. P., Oishi, A. C., Shevliakova, E., & Pacala, S. W. (2014). Microbe-driven turnover offsets mineral-mediated storage of soil carbon under elevated CO₂. *Nature Climate Change*, 4, 1099–1102.
- Srinivasan A (2006) *Handbook of precision agriculture: principles and applications*. Haworth Press, New York, USA

- Summons, R. E., Amend, J. P., Bish, D., Buick, R., Cody, G. D., Des Marais, D. J., & Sumner, D. Y. (2011). Preservation of martian organic and environmental records: final report of the Mars Biosignature Working Group. *Astrobiology*, 11(2), 157-181.
- Tanaka, K., and O'Neill, B. C. (2018). The Paris Agreement zero-emissions goal is not always consistent with the 1.5 °C and 2 °C temperature targets. *Nat. Clim. Change* 8, 319–324. doi: 10.1038/s41558-018-0097-x.
- Tang C, Yu Q (1999) Impact of chemical composition of legume residues and initial soil pH on pH change of a soil after residue incorporation. *Plant Soil* 215:29–38.
- Tardy, V., Spor, A., Mathieu, O., Lévêque, J., Terrat, S., Plassart, P., ... & Maron, P. A. (2015). Shifts in microbial diversity through land use intensity as drivers of carbon mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, 204-213.
- Tian H., Chen G., Zhang C., Melillo J.M. & Hall C.A.S., 2010. Pattern and variation of C:N:P ratios in China's soils: A synthesis of observational data. *Biogeochemistry* 98(1–3), 139–151.
- Tomlinson, I. (2013). Doubling food production to feed the 9 billion: a critical perspective on a key discourse of food security in the UK. *Journal of rural studies*, 29, 81-90.
- Trumbore, S. (2006). Carbon respired by terrestrial ecosystems—recent progress and challenges. *Global Change Biology*, 12(2), 141-153.
- Tubiello, F. N., Rosenzweig, C., Conchedda, G., Karl, K., Gütschow, J., Xueyao, P., ... & Sandalow, D. (2021). Greenhouse gas emissions from food systems: building the evidence base. *Environmental Research Letters*, 16(6), 065007.
- Turmel, M.-S.; Speratti, A.; Baudron, F.; Verhulst, N.; Govaerts, B., (2015). Crop residue management and soil health: A systems analysis. *Agricultural Systems*, 134: 6-16.
- Vian, J. F., Peigné, J., Chaussod, R., & Roger-Estrade, J. (2009). Effets du mode de travail du sol sur les microorganismes à l'échelle du profil cultural. *Étude et Gestion des Sols*, 16(3), 4.
- Vitousek, P. M., & Howarth, R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur?. *Biogeochemistry*, 13(2), 87-115.
- van Capelle, C., Schrader, S., Brunotte, J. (2012). Tillage-induced changes in the functional diversity of soil biota
- Van De Vreken, P.; Gobin, A.; Baken, S.; Van Holm, L.; Verhasselt, A.; Smolders, E.; Merckx, R., 2016. Crop residue management and oxalate-extractable iron and aluminium explain long-term soil organic

carbon sequestration and dynamics. *European Journal of Soil Science*, 67 (3): 332-340.

<http://dx.doi.org/10.1111/ejss.12343>

von Lützow, M., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Flessa, H., Guggenberger, G., Matzner, E., & Marschner, B. (2007). SOM fractionation methods: Relevance to functional pools and to stabilization mechanisms. *Soil Biology & Biochemistry*, 39, 2183–2207.

WalOnMap (2022). <http://geoportail.wallonie.be/walonmap>, dernier accès le 30/07/2022.

Wang Y.Q., Zhang Y.H., Wang Z.M., Tao H.B., Zhou S.L., Wang P. (2017): Effects of winter wheat season tillage on soil properties and yield of summer maize. *Plant Soil Environ.*, 63: 22–28.

Wang, X., Yang, Z., Liu, X., Huang, G., Xiao, W., & Han, L. (2020). The composition characteristics of different crop straw types and their multivariate analysis and comparison. *Waste Management*, 110, 87-97.

West, T.O., and Post, W.M. (2002). Soil organic carbon sequestration rates by tillage and crop rotation: A global data analysis. *Soil Science Society of America Journal*, 66:1930–194

Wezel, A., Casagrande, M., Celette, F. et al. (2014). Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 34, 1–20.

Whalen, J. K. & Hamel, C. (2004) Effects of Key Soil Organisms on Nutrient Dynamics in Temperate Agroecosystems, *Journal of Crop Improvement*, 11:1-2, 175-207

White, P.A.; Rice, C.W., 2009. Tillage Effects on Microbial and Carbon Dynamics during Plant Residue Decomposition. *Soil Science Society of America Journal*, 73 (1): 138-145.

<http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2007.038>

Whitmore, A. P., and Groot, J. J. R. (1997). The decomposition of sugar beet residues: mineralization versus immobilization in contrasting soil types. *Plant Soil* 192, 237–247.

Wigley, T. M. L. (2018). The Paris warming targets: emissions requirements and sea level consequences. *Clim. Change* 147, 31–45. doi: 10.1007/s10584-017-2119-5

Wollum, A.G. (1998). Introduction and historical perspective. In *Principles and Applications of Soil Microbiology*, eds. D.M. Sylvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, and D.A. Zuberer. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, pp. 3-20.

World Energy Council. Deciding the future energy policy scenarios to 2050 : 2013 survey summary.

Xu, X., Pang, D., Chen, J., Luo, Y., Zheng, M., Yin, Y., ... & Wang, Z. (2018). Straw return accompany with low nitrogen moderately promoted deep root. *Field Crops Research*, 221, 71-80.

Zhang, D., Hui, D., Luo, Y., & Zhou, G. (2008). Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors. *Journal of Plant Ecology*, 1(2), 85-93.

Zhao, X., Yuan, G., Wang, H., Lu, D., Chen, X., & Zhou, J. (2019). Effects of full straw incorporation on soil fertility and crop yield in rice-wheat rotation for silty clay loamy cropland. *Agronomy*, 9(3), 133.

Zimmerman, A. R., Chorover, J., Goyne, K. W., & Brantley, S. L. (2004). Protection of mesopore-adsorbed organic matter from enzymatic degradation. *Environmental Science & Technology*, 38(17), 4542-4548.

Zuber, S. M., & Villamil, M. B. (2016). Meta-analysis approach to assess effect of tillage on microbial biomass and enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 97, 176-187.

IX. Annexes

A. Annexe 1

PRINCIPAUX STADES REPERES DE LA VEGETATION EN

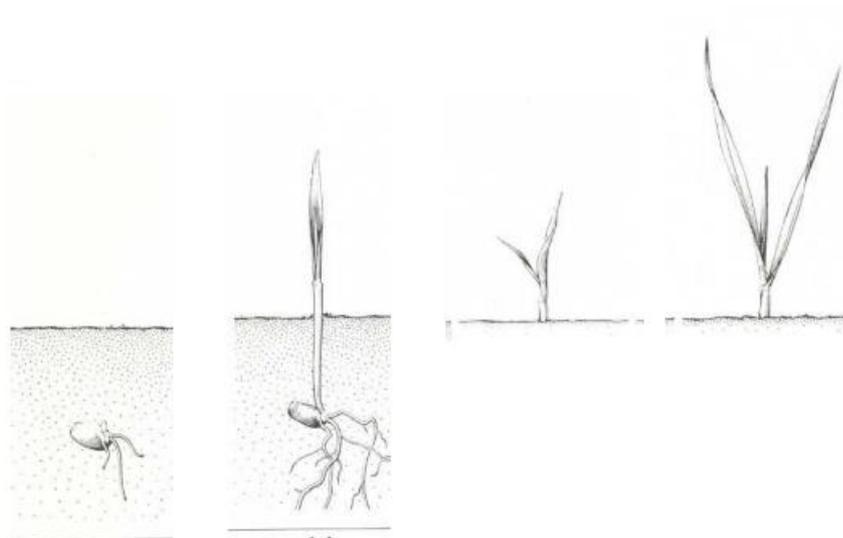
CEREALES (tiré de Livre Blanc « Céréales » F.U.S.A. et CRA-W. Gembloux — Février 2008)

(A)	(B)	(C)	Brève description	Dates approximatives de la réalisation des stades en région limoneuse			
				Froment d'hiver	Escourgeon et orge d'hiver	Froment de printemps et avoine	Orge de printemps
21	E	2	<u>Début tallage</u> : début de l'apparition des tiges secondaires ou talles.	Fin d'hiver - début mars	Avant et pendant l'hiver	Fonction de la date de semis et des conditions	
26	F	3	<u>Plein tallage</u> : plante étalée. Formation de nombreuses talles.	15-30 mars			
30	G	4	<u>Fin tallage</u> : la tige maîtresse se redresse, les talles commencent à se redresser. <u>Redressement</u> : talles dressés. Début d'allongement.	10-15 avril	20-25 mars	Particulières de la saison.	

30	H	5	<u>Epi à 1 cm</u> : fin redressement. Tout début du 1 ^{er} nœud.	20 avril	5-10 avril		
31	I	6	<u>Premier nœud</u> : se forme au ras du sol. Décelable au toucher.	5-10 mai	20-25 avril	15-20 mai	15-20 mai
32	J	7	<u>Deuxième nœud</u> : apparition du 2 nd nœud sur la tige principale.	12-15 mai	1-5 mai	Fin mai	20-25 mai
37	K	8	<u>Apparition de la dernière feuille</u> : encore enroulée. Tige enflée au niveau de l'épi.	20-25 mai	6-10 mai	Début juin	1-10 juin
39	L	9	<u>Ligule visible</u> : ligule (oreillette) développée. Début de l'apparition des barbes pour l'escourgeon.	25 mai 1 juin	15 mai	-	-
50	N	10,1	<u>Epi émerge</u> : le sommet de l'épi sort de sa gaine.	Début juin	20-25 mai	10-15 juin	15-20 juin
58	O	10,5	<u>Epi dégagé</u> : épi complètement dégagé de sa gaine.	10-15 juin	Début juin		

(A): Echelle selon Zadoks, échelle la plus couramment utilisée (B): Echelle selon Keller et Baggiolini

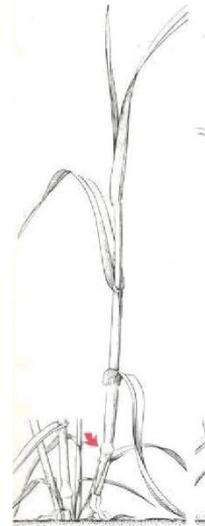
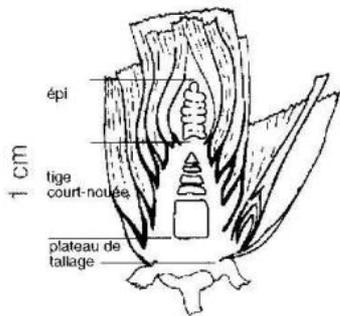
(C): Echelle selon Feekes et Large



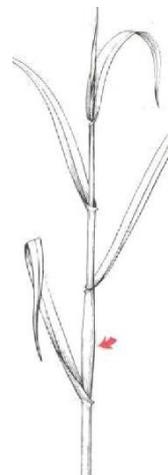
	Levée ³	Une feuille	Deux feuilles	Trois feuilles
Zadoks Keller et Baglioloni	10 A	11 B	12 C	13 D
Feekes et Large	1	1	1	1



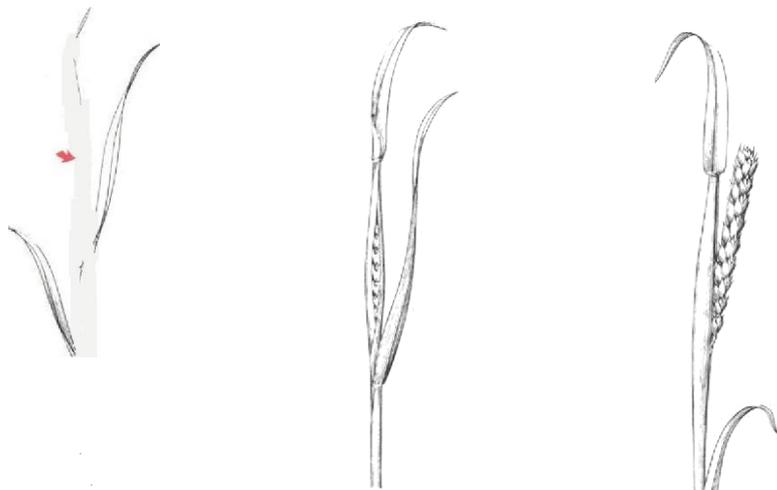
	Début tallage	Plein tallage	Fin tallage
Zadoks Keller et Baglioloni	21 E	26 F	30 H
Feekes et Large	2	3	4



	Redressement	Premier nœud
Zadoks	30	31
Keller et Baglioloni	H	I
Feekes et Large	5	6



	Deuxième noeud	Apparition de la dernière feuille
Zadoks	32	37
Keller et Baglioloni	J	K
Feekes et Large	7	8



	Ligule visible	Gaine éclatée	Emergence de l'épi
Zadoks Keller et Baglioloni	39 L	45 M	50 N
Feekes et Large	9	10	10.1



	Epi dégagé	Début floraison
Zadoks Keller et Baglioloni	58 O	60 P
Feekes et Large	10.5	10.5.1

Échelle BBCH améliorée, les échelles individuelles

Céréales Witzemberger et al., 1989; Lancashire et al., 1991

Échelle BBCH des stades phénologiques des céréales

(froment, blé = *Triticum* sp. L., orge = *Hordeum vulgare* L., avoine = *Avena sativa* L., seigle = *Secale cereale* L.)

Code Définition

Stade principal 0: germination, levée

- 0** semence sèche (caryopse sec)
- 1** début de l'imbibition de la graine
- 3** imbibition complète
- 5** la radicule sort de la graine
- 6** élongation de la radicule, apparition de poils absorbants et développement des racines secondaires
- 7** le coléoptile sort de la graine
- 9** levée: le coléoptile perce la surface du sol

Stade principal 1: développement des feuilles 1, 2

- 10** la première feuille sort du coléoptile
- 11** première feuille étalée
- 12** 2 feuilles étalées
- 13** 3 feuilles étalées
- 1.** *et ainsi de suite ...*
- 19** 9 ou davantage de feuilles étalées

Stade principal 2: le tallage³

- 20** aucune talle visible
- 21** début tallage: la première talle est visible
- 22** 2 talles visibles
- 23** 3 talles visibles
- 2.** *et ainsi de suite ...*
- 29** fin tallage
- 1** *Une feuille est étalée si sa ligule est visible ou si l'extrémité de la prochaine feuille est visible*
- 2** *Le tallage ou l'élongation de la tige principale peut intervenir avant le stade 13, dans ce cas continuez avec le stade 21*
- 3** *Si l'élongation de la tige principale commence avant la fin du tallage alors continuez au stade 30.*

Stade principal 3: élongation de la tige principale

- 30 début montaison: pseudo-tiges et talles dressées, début d'élongation du premier entre-nœud, inflorescence au plus à 1 cm au-dessus du plateau de tallage.
- 31 le premier nœud est au plus à 1 cm au-dessus du plateau de tallage 32
- 32 le deuxième nœud est au plus à 2 cm au-dessus du premier nœud 33
- 33 le troisième nœud est au plus à 2 cm au-dessus du deuxième nœud
- 3. *et ainsi de suite ...*
- 37 la dernière feuille est juste visible, elle est encore enroulée sur elle-même
- 39 le limbe de la dernière feuille est entièrement étalé, la ligule est visible

Stade principal 4: gonflement de l'épi ou de la panicule, montaison

- 41 début gonflement: élongation de la gaine foliaire de la dernière feuille
- 43 la gaine foliaire de la dernière feuille est visiblement gonflée
- 45 gonflement maximal de la gaine foliaire de la dernière feuille
- 47 la gaine foliaire de la dernière feuille s'ouvre
- 49 les premières arêtes (barbes) sont visibles (pour les variétés aristées)

Stade principal 5: sortie de l'inflorescence ou épisaison

- 51 début de l'épisaison: l'extrémité de l'inflorescence est sortie de la gaine, l'épillet supérieur est visible
- 52 20% de l'inflorescence est sortie
- 53 30% de l'inflorescence est sortie
- 54 40% de l'inflorescence est sortie
- 55 mi-épisaison: 50% de l'inflorescence est sortie
- 56 60% de l'inflorescence est sortie
- 57 70% de l'inflorescence est sortie
- 58 80% de l'inflorescence est sortie
- 59 fin de l'épisaison: l'inflorescence est complètement sortie de la gaine

Stade principal 6: floraison, anthèse

- 60 début floraison, les premières anthères sont visibles
- 65 pleine floraison, 50% des anthères sont sorties
- 69 fin floraison, tous les épillets ont fleuri, quelques anthères desséchées peuvent subsister

Stade principal 7: développement des graines

- 70 stade aqueux: les premières graines ont atteint la moitié de leur taille finale
- 73 début du stade laiteux
- 75 stade milaiteux: contenu de la graine laiteux, les graines ont atteint leur taille finale mais sont toujours vertes
- 77 fin du stade laiteux

Stade principal 8: maturation des graines

- 83** début du stade pâteux
- 85** stade pâteux mou: contenu de la graine tendre mais sec, une empreinte faite avec l'ongle est réversible
- 87** stade pâteux dur: contenu de la graine dur, une empreinte faite avec l'ongle est irréversible
- 89** maturation complète: le caryopse est dur et difficile à couper en deux avec l'ongle

Stade principal 9: sénescence

- 92** sur-maturité: le caryopse est très dur, ne peut pas être marqué à l'ongle
- 93** des graines se détachent
- 97** la plante meurt et s'affaisse
- 99** produit après récolte

B. Annexe 2

Dosage de l'hydrolyse du diacétate de fluorescéine (ou encore *fluorescein diacetate* en anglais, FDA) par spectrofluorométrie, pour mesurer des activités enzymatiques de microorganismes du sol

Principe : Un substrat fluorogénique est un composé qui donnera un produit fluorescent après avoir été modifié par une enzyme (Rotman et Papermaster, 1996). La FDA¹⁶ est colorant estérifié, polaire (donc capable de rentrer dans les cellules d'organismes vivants) et fluorogénique (car ne fluoresce pas tant qu'une enzyme active n'a pas retiré un de ses groupes chimiques latéraux, tels que l'acétate ou le butyrate) (Babiuk et Paul, 1970). Ainsi, après être entrée dans une cellule d'un organisme vivant donné (microorganismes et même mammifères), cette molécule sera hydrolysée par certaines enzymes (estérases, protéases, lipases) en fluorescéine. Fluorescéine qui, elle, est fluorescente et non polaire, donc se concentrera dans la cellule de l'organisme vivant qui l'hydrolyse, il s'ensuit alors que ladite cellule brillera -en vert- lorsque exposée à la lumière UV (Rotman et Papermaster, 1966 ; Lundgren, 1981 ; Babiuk et Paul, 1970).

L'hydrolyse de la FDA en fluorescéine par des enzymes du sol est alors utilisée comme indicateur de l'activité microbienne¹⁷ totale d'un sol (autrement dit, une mesure générale du

¹⁶ De formule moléculaire $C_{24}H_{16}O_7$, il est aussi appelé 3,6 – diacétylfluorescéine

¹⁷ Cependant cela n'est qu'en théorie, car des études contradictoires disent par exemple que le temps d'incubation –d'un substrat fluorogénique avec un sol- pratiqué dans ce type de tests d'activité enzymatique, qui est de quelques heures, n'est pas suffisant pour produire un produit fluorescent à partir d'enzymes intra-cellulaires et que donc toute mesure d'activité enzymatique par substance fluorogénique serait forcément extracellulaire. Ceci ne devrait pas être un problème dans la présente méthode car une sonication est pratiquée sur le sol et celle-ci est sensée éclater les membranes cellulaires. Mais, une considération légitime s'impose alors : savoir comment différencier l'hydrolyse faite par des enzymes intra-cellulaires (ou à la surface des cellules) de celle faite par des enzymes abiotiques stabilisées dans le sol, car par définition seulement l'activité d'enzymes associées à des cellules microbiennes actives est considérée comme activité microbienne. Le soucis découle du fait qu'il n'est au jour d'aujourd'hui pas possible de séparer et dire avec certitude que ce qu'on mesure dans un test d'activité enzymatique est une activité d'enzymes abiotiques ou d'enzymes régulées par une cellule microbienne vivante et active. Ainsi, il est opportun de considérer les deux sources d'activités pour

turnover de la matière organique du sol), car il a été montré que la plupart des microorganismes du sol (champignons, bactéries, et même certains protozoaires et algues) présentent bien une activité hydrolytique de la FDA (Schnurer et Rosswall, 1982).

A) Préparations préalables (dans l'ordre)

1) Tampon phosphate (0.1M, pH=7.6)

- Dissoudre avec un agitateur magnétique 8.7g d'hydrogénophosphate de potassium¹⁸ et 1.3g de phosphate de monopotassium¹⁹ dans 800ml d'eau distillée
- Ajuster le pH de la solution à 7.6 (Fontvielle et al., 1992)
- Ajuster le volume de la solution à 1l
- Le tampon phosphate (TP) peut être conservé au moins deux ans à 4°C, mais pour cela il faudrait l'autoclaver avant de le stocker au frais après sa préparation
 - ⇒ Il peut être préparé une fois pour toute la campagne de mesure, puis autoclavé, mis au frais et ressorti à chaque fois qu'on en a besoin. A chaque fois qu'on le ressort, il faut l'autoclaver à nouveau avant de le remettre au frais

2) Solutions de fluorescéine

- Solution de fluorescéine 1 (= solution mère) : dans un falcon, dissoudre 5mg de fluorescéine (sigma) dans 10ml d'acétone
 - ⇒ Peser la fluorescéine directement dans le falcon
 - ⇒ /\ l'acétone est toxique et volatil, il doit être manipulé sous une hotte chimique et avec des gants

expliquer les effets d'un traitement expérimental lorsqu'on tente d'interpréter une mesure d'activité enzymatique du sol (Nannipieri et al., 2012; Nannipieri et al., 2018)

¹⁸ De formule moléculaire K_2HPO_4 , il est aussi appelé orthophosphate dipotassique, hydrogénophosphate de dipotassium ou encore phosphate dipotassique

¹⁹ De formule moléculaire KH_2PO_4 , il est aussi appelé dihydrogénophosphate de potassium

- Solution de fluorescéine 2²⁰ : dans un deuxième falcon, diluer 40 fois la solution de fluorescéine 1 dans de l'acétone. Puis bien homogénéiser.
 - ⇒ La solution de fluorescéine 2 doit être préparée à chaque nouveau dosage
 - ⇒ La mettre au frais et à l'abri de la lumière dès que préparée

3) Solutions de FDA

- Solution de FDA 1 (= solution mère) : dans un falcon, dissoudre 50mg de FDA (sigma) dans 10ml d'acétone
- Solution de FDA 2²¹ : dans un falcon, diluer 400µl de solution de FDA 1 dans 4.8ml de TP et 4.8 ml d'acétone
 - ⇒ La solution de FDA 2 doit être préparée à chaque nouveau dosage

4) Extraits de sols à mettre dans la microplaque

- Prélever le sol qui doit être analysé par dosage du FDA
 - ⇒ Idéalement les mesures sur le sol devraient être effectuées immédiatement après échantillonnage, mais si cela n'est pas possible, les échantillons doivent être stockés à 4°C le temps d'être utilisés et ce pour une période maximale de 10 à 15 jours (Nannipieri et al., 2012)
- Dans un falcon, ajouter 625mg de sol frais, puis 10 ml de TP
- Incuber au thermoshaker 10min avec agitation : 250tours/min et à 28°C
- Sonication du falcon pendant 2min
- Incuber de nouveau 5min avec agitation au thermoshaker : 250tours/min et à 28°C
 - ⇒ L'extrait de sol est à présent prêt, mais veiller à l'homogénéiser à la main de temps en temps tant qu'il n'a pas été utilisé dans la microplaque, afin d'éviter qu'il ne décante trop et devienne inutilisable

B) Mesures de spectrofluorométrie par hydrolyse du FDA

²⁰ = solution pour établir les deux courbes d'absorbance standard de la fluorescéine, c'est-à-dire celle sans et celle avec prise en compte du quenching provoqué par le sol -lorsque la fluorescéine est en solution avec le sol-

²¹ = solution qui sera hydrolysée par les enzymes du sol

- Préparer sa microplaque selon ce qu'on veut mesurer
 - ⇒ /!\ pour tout ce qui suit, on utilise nécessairement des microplaques ELISA noires, car opaques : le but est d'éviter que la fluorescence de la fluorescéine d'un puit ne vienne interférer avec la mesure de la fluorescence de la fluorescéine d'un puit adjacent, il faut ainsi dans le même principe éviter toute contamination des puits voisins avec une erreur de pipetage sans quoi l'expérimentation serait nulle et non avenue
 - ⇒ /!\ quand il y a du FDA à ajouter, il est préférable de la rajouter au tout dernier moment dans les puits, c'est-à-dire juste avant de mettre la plaque dans l'appareil de mesure
 - ⇒ /!\ avant d'ajouter de l'extrait de sol dans une plaque il convient de l'homogénéiser pour remettre le sol en suspension, l'idéal serait de l'homogénéiser avant le remplissage de chaque colonne de puits d'une plaque, de plus il faut éviter de pipeter dans le fond du falcon sinon on ne prélèvera que du sol et non pas une solution de sol ce qui fausserait les mesures
 - ⇒ Préparation des plaques : chaque micropuit de chaque plaque est rempli de 250µl au total, le mix qui compose ces 250µl est cependant différent selon ce qu'on va mesurer au spectrofluoromètre. Il y a en tout 3 mesures différentes à effectuer (dans l'ordre) au spectrofluoromètre :
 - Premièrement, une mesure pour déterminer des valeurs de référence des longueurs d'ondes d'absorption de la fluorescéine à différentes concentration de fluorescéine, afin d'établir une courbe d'étalonnage $A = f(\text{concentration en fluorescéine})$ (cf. ci-dessous pour voir la manière dont remplir la plaque)
 - Cette mesure n'est faite qu'**une** seule fois pour toute la campagne de mesure qui suivra
 - Remplissage de la microplaque pour courbe standard de fluorescéine (après mesure, cf. annexe A pour établir la courbe d'étalonnage)

Puits 1	Puits 2	Puits 3	Puits 4	Puits 5	Puits 6	Puits 7	Puits 8	Puits 9	Puits 10	Puits 11	Puits 12
250µl + 0µl	250µl + 0µl	250µl + 0µl			250µl + 0µl	250µl + 0µl	250µl + 0µl				

240µl + 10µl	240µl + 10µl	240µl + 10µl			240µl + 10µl	240µl + 10µl	240µl + 10µl				
230µl + 20µl	230µl + 20µl	230µl + 20µl			230µl + 20µl	230µl + 20µl	230µl + 20µl				
210µl + 40µl	210µl + 40µl	210µl + 40µl			210µl + 40µl	210µl + 40µl	210µl + 40µl				
190µl + 60µl	190µl + 60µl	190µl + 60µl			190µl + 60µl	190µl + 60µl	190µl + 60µl				
170µl + 80µl	170µl + 80µl	170µl + 80µl			170µl + 80µl	170µl + 80µl	170µl + 80µl				
150µl + 100µl	150µl + 100µl	150µl + 100µl			150µl + 100µl	150µl + 100µl	150µl + 100µl				
130µl + 120µl	130µl + 120µl	130µl + 120µl			130µl + 120µl	130µl + 120µl	130µl + 120µl				
TP + Sol° fluorescéine 2	TP + Sol° fluorescéine 2	TP + Sol° fluorescéine 2			TP + Sol° fluorescéine 2	TP + Sol° fluorescéine 2	TP + Sol° fluorescéine 2				



3 répétitions pour faire la courbe standard de fluorescéine

3 répétitions supplémentaires pour faire la courbe standard de



Remarque : en théorie juste 3 répétitions au total suffisent mais nous faisons ici 3x2 répétitions pour des raisons logistiques

- Ensuite, une mesure pour établir une courbe d'étalonnage, $A = f(\text{concentration en fluorescéine quenchée})$, de la fluorescéine en prenant en compte le potentiel effet quenching que pourrait causer le sol dont l'activité enzymatique sera mesurée par dosage (ci-dessous pour voir la manière dont remplir la plaque) (Nannipieri et al., 2012)
 - Cette mesure est faite à chaque nouveau dosage
- Enfin, une mesure pour déterminer le taux d'hydrolyse de la FDA par le sol d'intérêt (cf. ci-dessous pour voir la manière dont remplir la plaque)
 - Cette mesure est le dosage à proprement parler
 - l'hydrolyse de la FDA est exprimée en $\mu\text{mol de fluorescéine hydrolysée min}^{-1} \text{ g de sol sec}^{-1}$

⇒ Dans le présent protocole, nous groupons la mesure pour courbe standard quenching (cf. annexe A après mesure pour établir la courbe d'étalonnage) et la mesure de l'hydrolyse du FDA, face à des préoccupations logistiques :

➤ Remplissage de la microplaque pour courbe standard quenching et hydrolyse FDA :

Puits 1	Puits 2	Puits 3	Puits 4	Puits 5	Puits 6	Puits 7	Puits 8	Puits 9	Puits 10	Puits 11	Puits 12
225µl + 25µl + 0µl	225µl + 25µl + 0µl	225µl + 25µl + 0µl	225µl + 25µl + 0µl		195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl		220µl + 30µl	250µl
215µl + 25µl + 10µl	215µl + 25µl + 10µl	215µl + 25µl + 10µl	215µl + 25µl + 10µl		195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl		220µl + 30µl	250µl
205µl + 25µl + 20µl	205µl + 25µl + 20µl	205µl + 25µl + 20µl	205µl + 25µl + 20µl		195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl		220µl + 30µl	250µl
185µl + 25µl + 40µl	185µl + 25µl + 40µl	185µl + 25µl + 40µl	185µl + 25µl + 40µl		195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl		220µl + 30µl	250µl
165µl + 25µl + 60µl	165µl + 25µl + 60µl	165µl + 25µl + 60µl	165µl + 25µl + 60µl		195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl		220µl + 30µl	250µl
145µl + 25µl + 80µl	145µl + 25µl + 80µl	145µl + 25µl + 80µl	145µl + 25µl + 80µl		195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl		220µl + 30µl	250µl
125µl + 25µl + 100µl	125µl + 25µl + 100µl	125µl + 25µl + 100µl	125µl + 25µl + 100µl		195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl		220µl + 30µl	250µl
105µl + 25µl + 120µl	105µl + 25µl + 120µl	105µl + 25µl + 120µl	105µl + 25µl + 120µl		195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl	195µl + 25µl + 30µl		220µl + 30µl	250µl
TP + Ech sol 1 + Sol° fluorescéine 2	TP + Ech sol 2 + Sol° fluorescéine 2	TP + Ech sol 3 + Sol° fluorescéine 2	TP + Ech sol 4 + Sol° fluorescéine 2		TP + Ech sol 1 + Sol° FDA 2	TP + Ech sol 2 + Sol° FDA 2	TP + Ech sol 3 + Sol° FDA 2	TP + Ech sol 4 + Sol° FDA 2		TP + Sol° FDA 2	TP

4 colonnes pour faire la courbe standard de fluorescéine avec quenching pour les 4

4 colonnes pour mesurer l'hydrolyse des 4 échantillons

Témoin négatif
2

Témoin négatif
1

⇒ !/ Immédiatement après avoir préparé une microplaque, la recouvrir de film couvrant (afin d'éviter que son contenu ne s'évapore) et l'emballer d'aluminium (afin de mettre le FDA/fluorecécine à l'abri de la lumière et ainsi éviter une hydrolyse non biologique/dégradation) (Nannipieri et al., 2012)

- ⇒ /!\ Si une plaque préparée doit être déplacée de son lieu de préparation, veiller à ne pas faire de geste brusque pendant le déplacement pour ne pas renverser ni trop remuer le contenu des puits
- Une fois la microplaque prête (d'abord enlever l'aluminium, le film couvrant s'il y en a), l'insérer dans l'appareil de mesure pour effectuer les mesures d'absorbance
 - ⇒ /!\ il faut d'abord exciter la fluorescéine à une longueur d'onde de 490nm (ce qui va la faire luminescer) avant de mesurer à 523nm sa densité optique
 - ⇒ L'appareil de mesure devra être réglé sur les paramètres suivants : incubation à 28°C et agitation continue de la plaque
- Ne pas jeter les microplaques, elles peuvent et doivent être lavées afin d'être réutilisées : les tremper une voire deux nuit dans un mélange d'eau et de liquide vaisselle, puis rincer et sécher à l'air libre

C) Bibliographie

Babiuk, L. A., & Paul, E. A. (1970). The use of fluorescein isothiocyanate in the determination of the bacterial biomass of grassland soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 16(2), 57-62.

Fontvieille, D.A.; Outaguerouine, A.; Thevenot, D.R. (1992). "Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludges". *Environmental Technology*. 13 (6): 531–540

Lundgren, B. (1981). Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil. *Oikos*, 17-22.

Nannipieri, P., Giagnoni, L., Renella, G., Puglisi, E., Ceccanti, B., Masciandaro, G., ... & Marinari, S. A. R. A. (2012). Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biology and fertility of soils*, 48(7), 743-762.

Nannipieri, P., Trasar-Cepeda, C. & Dick, R.P. Soil enzyme activity: a brief history and biochemistry as a basis for appropriate interpretations and meta-analysis. *Biol Fertil Soils* 54, 11–19 (2018).

Rotman, B., & Papermaster, B. W. (1966). Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(1), 134.

Schnürer, J., & Rosswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and environmental microbiology*, 43(6), 1256-1261.

Annexe A

Sol° fluorescéine 2 dans le puit (en µl)	Quantité correspondante de fluorescéine (en µg/puit)
0	0
10	0.125
20	0.25
40	0.5
60	0.75
80	1
100	1.25
120	1.5

Tableau des correspondances quantité de fluorescéine-concentration de fluorescéine par p

C. Annexe 3

MicroResp : mesure de la respiration du sol par spectrophotométrie

A) Matériaux et réactifs

- Microplaque (de détection) en polystyrène, format 96 puits, fond plat, micropuits de 0.35ml
- Plaque à puits profonds en polypropylène, format 96 puits, fond rond, puits de 1.2ml de volume (fabriqué par MicroResp)
- Dispositif de remplissage - à plateau coulissant en plexiglas - de la plaque à puits profonds (fabriqué par MicroResp)
- Tapis en caoutchouc bidirectionnel de fermeture de la plaque à puits profonds (fabriqué par MicroResp)
- Pince métallique pour resserrer le système plaque à puits profonds/tapis de fermeture/microplaque de détection (fabriqué par MicroResp)
- Dessiccateur
- Bain-marie
- Réfrigérateur
- Spectrophotomètre
- Etuve
- Agitateur magnétique chauffant et son barreau aimanté
- Thermomètre
- Balance électronique et balance analytique électronique
- Micropipettes et leurs cônes (p1000, p100)
- Pipette pasteur
- Bécher, 1000ml et 100ml
- Eprouvette graduée, 1000ml
- Bouteille en verre
- Falcon, 50ml

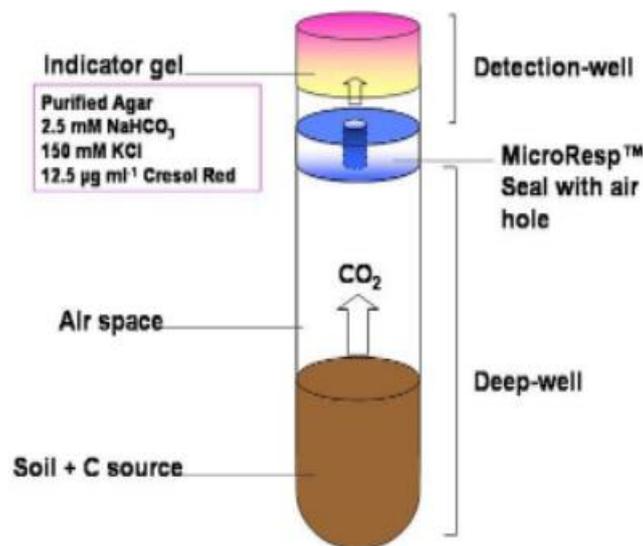
- Pinceau
- Gobelet en plastique
- Aiguille de transfert 16 ou 18G
- Parafilm
- Papier aluminium
- Ruban adhésif
- Echantillons de sol
- Source de carbone pour les microorganismes (=substrat). Peut-être n'importe quel composé parmi la liste suivante : L-Alanine, L-(+)-Arabinose, L-Arginine, Acide citrique, L-Cystéine-HCl, D-(-)Fructose, D-(+)-Galactose, D-(+)-Glucose, Acide γ -aminobutyrique, Acide α -cétoglutarique, L-Lysine-HCl, L-Acide malique, N-Acétyle glucosamine, Acide oxalique, Acide protocatéchuique, D-(+)-Tréhalose
- Eau déminéralisée
- Poudre d'agar-agar purifié
- Chaux sodée auto-indicatrice (Soda lime)
- Bicarbonate de sodium (NaHCO₃)
- Chlorure de potassium (KCl)
- Rouge de crésol (C₂₁H₁₇NaO₅S)

B) Principe

MicroResp a été développée par Campbell, Chapman et al. (2003) pour mesurer l'évolution du CO₂ sur une courte période de temps (4-6 h).

Il s'agit d'une technologie basée sur l'utilisation d'un indicateur coloré (Rouge de crésol) qui change de couleur avec le changement de pH : il passe du rose au jaune, quand le pH devient plus acide.

Le rouge de crésol est préparé dans un milieu d'indication contenant du bicarbonate de sodium. Lorsque du CO₂ réagit avec le bicarbonate de sodium contenu dans le milieu d'indication selon l'équation suivante et le schéma ci-dessous, le pH du milieu d'indication décroît et le rouge de crésol change la couleur de ce dernier, ce qui permet de doser la quantité de CO₂ qui a réagi avec le milieu d'indication (Roswell, 1995) :



Méthode colorimétrique Microresp de mesure du CO₂ libéré d'un échantillon de sol

(source : <https://www.microresp.com/science>)

C) Préparation des échantillons de sol

1) Préparation

- Faire des sous-échantillons de sol à partir des échantillons de sol prélevés sur le terrain. Tamiser, à l'aide d'un tamis de maille 2mm, chaque sous-échantillon afin de retirer les racines et les pierres
 - ⇒ *Laisser stockés à 4°C les échantillons de sol prélevés quand ils ne sont pas utilisés*
- Ensuite déterminer la teneur en humidité de chaque échantillon de sol prélevé en utilisant les sous échantillons tamisés (Voir annexe A pour déterminer la teneur en humidité d'un sol)
- Puis déterminer la capacité maximale de rétention d'eau de chaque échantillon de sol prélevé avec les sous échantillons qui ont servi pour déterminer la teneur en humidité (Voir annexe B pour déterminer la capacité maximale de rétention d'eau d'un sol)

2) Incubation

Avant que son activité microbienne ne soit mesurée, un sol doit être incubé. Cette incubation est nécessaire car le sol qu'on va utiliser pour la mesure (cf. partie D.3) ne doit pas être trop humide (auquel cas les échanges gazeux seraient restreints) ni trop sec (auquel cas l'activité microbienne serait restreinte). En effet, pour mesurer l'activité microbienne d'un sol, un éventail acceptable de sa teneur en humidité est de **30 à 60% de sa capacité maximale de rétention d'eau**.

Ainsi, il faut ajuster à entre 30 et 60% de leur capacité maximale de rétention d'eau l'humidité des sols qui iront dans les puits profonds pour mesure. Les sols qui sont plus humides que 60% de leur capacité maximale de rétention d'eau doivent être séchés à l'air libre jusqu'à atteindre 60% (au moins) de leur capacité maximale en rétention d'eau, puis incubés (Creamer, 2016).

Donc, l'incubation des sols sert à garder leur humidité constante une fois que celle-ci a été ajustée à un pourcentage propice à la mesure de l'activité microbienne.

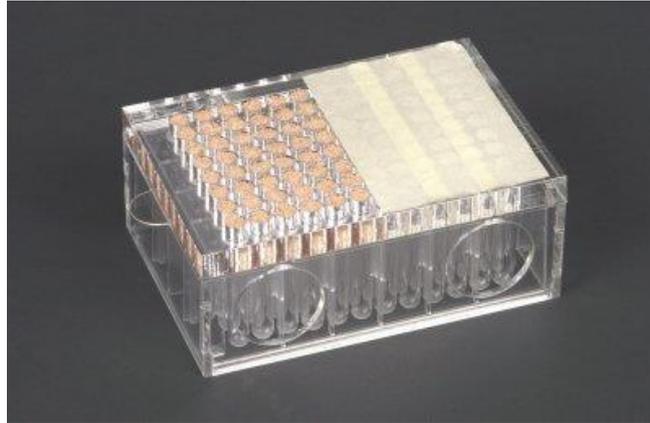
- Ajuster la teneur en humidité des sols dont la respiration sera mesurée (Voir annexe C pour l'ajustement de l'humidité d'un sol)
- Incuber les sols à 25°C dans une étuve, pendant 3 à 5 jours avant qu'ils ne soient utilisés pour des mesures. Avant d'y insérer les échantillons de sol, l'étuve aura été tapissée de papier absorbant mouillé et à l'intérieur d'elle, aura aussi été placée une assiette avec de la chaux sodée auto-indicatrice

⇒ Comment incuber ? :

- Remplir chaque puit profond de la plaque à puits profonds avec du sol frais **tamisé et dont la teneur en humidité a été ajustée**. Faire en sorte de déterminer le poids du sol dans chaque puits profonds (en suivant les étapes suivantes, cf. « comment remplir les puits profonds de sol » ci-dessous), c'est une donnée nécessaire
 - *Typiquement la quantité de sol requise pour une plaque profonde de 96 puits (cf. partie B.3) est de 35 à 50g de matière fraîche (MF)*
- Comment remplir les puits profonds de sol ?:
 - Insérer le plateau coulissant à sa place dans le dispositif de remplissage. Dispositif à l'intérieur duquel aura été emboîté au préalable la plaque à puits profonds vide (cf. image ci-dessous)



- Si on souhaite utiliser plusieurs sols, recouvrir certaines colonnes de la plaque avec du ruban adhésif avant de commencer le remplissage, de manière à ne mettre que le sol souhaité dans les puits souhaités (cf. image ci-dessous).
- Tarer la balance avec l'ensemble : dispositif de remplissage (comprends plateau en plexiglas) + plaque à puits profonds vide (+ ruban adhésif si on en utilise)
- Remplir les puits du dispositif de remplissage en saupoudrant du sol au-dessus d'eux (avec une spatule par exemple)
 - ❖ *!/ il ne faut en aucun cas forcer dans les puits le sol en tentant de le compacter. Pour remplir, on applique du sol sur les puits à remplir, puis on saisit le système de remplissage et on le tapote doucement mais fermement contre la paillasse pour faire tomber le sol dans les puits par la gravité. Et on recommence ainsi jusqu'à remplir les puits au maximum possible*



- Retirer le plateau en plexiglas séparant les puits du dispositif de remplissage des puits de la plaque à puits profond, de manière à ce que le sol dans les puits du dispositif de remplissage tombe dans les puits profonds situés en dessous (cf. image ci-dessous)
 - ❖ *Normalement si l'humidité du sol est bien ajusté il devrait tomber naturellement dans les puits, mais s'il a du mal à tomber, tapoter fermement mais doucement le système de remplissage contre la paille*



- Puis peser l'ensemble : dispositif de remplissage (comprends plateau en plexiglas) + plaque à puits profonds avec sol (+ ruban adhésif si on en a utilisé)

- ❖ *Si on veut utiliser plusieurs sols pour remplir la plaque, il faut peser après chaque remplissage de puits profonds, de manière à avoir accès au poids du sol dans chaque puits. L'important est de bien tarer avant chaque remplissage et de bien broser les ruban adhésifs (avec un pinceau par exemple) après chaque remplissage*
- Retirer le dispositif de remplissage, le laver à la main avec un détergent, rincer avec de l'eau déminéralisée et sécher
- Recouvrir la plaque remplie avec du parafilm et la mettre dans l'étuve. Il faudra veiller pendant la durée de l'incubation à ce que le parafilm ne se soit pas déchiré, et le remplacer si c'est le cas

D) Protocole de détection colorimétrique de respiration des microorganismes du sol

(crédit pour les images : www.microresp.com)

(référence supplémentaire : <https://www.youtube.com/watch?v=IqWOp21My6c>)

1) Préparation de la microplaque de détection

a) Préparation de la solution mère indicatrice

- ⇒ Mesurer 900ml d'eau déminéralisée et les mettre dans un bécher de 1000ml
- ⇒ Mettre le bécher sur l'agitateur magnétique chauffant et porter la température de l'eau déminéralisée à environ 60°C
 - ⇒ *!/ ne pas dépasser 65°C auquel cas le rouge de crésol sera rendu inutilisable et il faudra recommencer la préparation*

- ⇒ Ajouter à l'eau déminéralisée un barreau aimanté et lancer l'agitation à intensité moyenne
- ⇒ Ajouter à l'eau déminéralisée chaude : 18.75mg de Crésol Rouge, puis 16.77g de Chlorure de potassium et enfin 0.315g de Bicarbonate de sodium
 - ⇒ *Le mélange devrait normalement tourner au rose après l'ajout du Bicarbonate de sodium*
 - ⇒ *!\ le rouge de crésol est un colorant extrêmement difficile à enlever. Eviter tout éclaboussure sur la peau ou les vêtements. Il est donc conseillé d'utiliser des gants en le manipulant ainsi que de porter une blouse aux manches longues*
- ⇒ Une fois les trois solutés dissous, ajuster à 1000ml avec de l'eau déminéralisée et laisser mélanger encore un peu
- ⇒ Transférer les 1000ml de la solution obtenue dans une bouteille en verre. On se servira à partir de cette bouteille les quantités nécessaires pour la suite du protocole
 - ⇒ *Quand elle a fini d'être utilisée, fermer et stocker la bouteille à 4°C et à l'abris de la lumière. La solution mètre indicatrice peut rester stockée ainsi jusqu'à 6 mois*

b) Préparation de la solution d'agar purifié 3%

- ⇒ Ajouter 100ml d'eau déminéralisée dans un bécher de 100ml, puis 3g de poudre d'agar dans le même récipient
- ⇒ Dissoudre la poudre d'agar dans l'eau déminéralisée jusqu'à obtenir une solution translucide, grâce à l'agitateur magnétique chauffant: 100°C, faible-moyenne intensité, entre 5 à 10min
 - ⇒ *Commencer par agiter le mélange (avec un barreau aimanté) quelques secondes à froid pour mettre la poudre d'agar en suspension, puis porter la température du mélange à 100°C*
 - ⇒ *Arrêter fréquemment l'agitation pour surveiller l'apparition des premières bulles, dès qu'elles apparaissent la solution est prête. Il faut*

alors la retirer de la plaque chauffante, retirer et nettoyer le barreau aimanté, puis tout de suite passer à l'étape suivante

- ⇒ Après l'avoir transvasée dans une bouteille en verre, faire refroidir la solution d'agar 3% obtenue en la laissant à l'air libre 1 à 2 minutes tout en la remuant. Puis la placer dans un bain-marie à 60°C et la laisser dans le bain-marie
 - ⇒ *Eviter de la laisser trop longtemps au bain-marie sans la remuer de temps en temps avant de passer à la partie B.1.c)*
 - ⇒ *Il est conseillé de régler le bain marie sur 55°C plutôt que 60°C, de manière à être sûr de ne pas dépasser les 60°C. Car on placera aussi par la suite aussi la solution mère indicatrice au bain-marie (cf. partie B.1.c) et il faudra alors être absolument sûr que celle-ci ne chauffera pas au-delà des 65°C*

c) Préparation de la solution de détection (=solution d'agar 1%)

- ⇒ Il s'agit de combiner la solution mère indicatrice et la solution d'agar 3% selon un ratio 1 :2 (agar :indicatrice)
 - ⇒ *150ml de solution de détection permettent de remplir 7 à 8 microplaques de détection (cf partie B.1.d)*
- ⇒ Préalablement au mélange des deux solutions, il faut qu'elles soient à la même température. Il faut donc mettre dans une bouteille en verre la quantité de solution mère indicatrice requise pour le mélange, puis placer cette bouteille en verre dans le bain marie à 60°C
- ⇒ Une fois qu'on a vérifié au thermomètre que les températures des deux solutions à mélanger sont équilibrées (toutes les deux à température du bain marie), effectuer le mélange et l'homogénéiser. Puis replacer la bouteille contenant la solution de détection obtenue au bain marie
- ⇒ Passer immédiatement à la partie D.1.d)

d) Préparation d'une microplaque de détection

L'idéal est de préparer plusieurs microplaques en même temps, car le taux de réussite en les préparant n'est pas de 100%. De plus en procédant ainsi on peut faire plusieurs expérimentations à la suite.

- ⇒ Disperser dans chaque puit de la microplaque un aliquote de 150 μ l de la solution de détection. Veiller à remuer de temps en temps la solution de détection pour l'homogénéiser
 - ⇒ *On a le choix entre pipeter la solution de détection à même le bain-marie en la laissant à l'intérieur, ou la sortir du bain marie pour pipeter mais dans ce cas il faut préparer la plaque sans attendre car l'agar se gélifiera au bout d'environ une heure hors du bain marie*
 - ⇒ *Eviter au mieux toute formation de bulle d'air en déversant la solution de détection dans les puits*
- ⇒ Stocker la microplaque dans un dessiccateur, puis laisser le dessiccateur à l'abri de la lumière et à 25°C, en le fermant avec son couvercle, mais, **sans fermer la valve du couvercle** (cf. image ci-dessous)

Valve laissée ouverte



- ⇒ Laisser s'équilibrer ainsi pendant 1 à 2 jours (!\ **pas plus**)
- ⇒ Puis si la microplaque de détection n'est pas utilisée rapidement après cette période d'équilibration : la recouvrir de parafilm (!\ **sans étirer le parafilm**), ensuite mettre de la chaux sodée auto-indicatrice au fond du dessiccateur, enfin

placer un gobelet d'eau sur la plateforme du dessiccateur. Refermer le dessiccateur ainsi préparé, avec son couvercle, **dont la valve sera cette fois fermée.**

⇒ *Le but est de garder une atmosphère humide dans le dessiccateur tant qu'une microplaque y est conservée*

⇒ Remplacer la chaux sodée quand nécessaire (c-à-d quand elle change de couleur)

2) Préparation d'un substrat

On peut préparer autant de solution de substrat qu'on souhaite, avec autant de substrats différents qu'on souhaite. Tout dépend de l'objectif de l'étude.

Il se peut aussi qu'on ne veuille pas utiliser de substrat, auquel cas on mesurera uniquement l'activité des microorganismes du sol sur base de la matière organique contenue dans le sol au moment de l'échantillonnage. Dans ce cas ignorer cette partie et passer à la partie D.3).

⇒ Après avoir choisi son substrat, on le prépare en solution selon le ratio : 30mg de substrat par g d'eau du sol (l'eau du sol est en fonction du sol avec lequel on travaille)

⇒ Avant de connaître la concentration de la solution de substrat à préparer, on doit d'abord connaître le poids (g) ainsi que la teneur en humidité du sol qui ira dans chaque puit profond

⇒ *La teneur en humidité du sol est déjà mesurée (cf. partie C.2))*

⇒ *Quant au poids du sol dans chacun des puits profonds, il y a plusieurs manières de le déterminer : soit mesurer le poids de chaque échantillon de sol avant de le mettre dans un puit profond (cf. partie C.2)), soit mesurer le poids total d'un échantillon de sol qui sera distribué dans plusieurs puits grâce au dispositif de remplissage (cf. partie D.3)Méthode 2) et par la suite diviser ce poids total par le nombre de puits remplis avec ledit échantillon*

⇒ Une fois ces paramètres connus, ils permettent de calculer la quantité de substrat nécessaire pour préparer une solution de substrat à la fois concentrée à 30mg/g d'eau du sol et aussi en quantité suffisante pour remplir les 96puits profonds avec des aliquotes de 25µl

⇒ *Exemple de calcul :*

- *Si l'humidité du sol est de 24.36% alors il y a 0.244g d'H₂O par g de sol*
- *Si le poids de sol par puits profond est de 0.32g alors chaque puit contient 0.078g d'H₂O*
- *Si le substrat requis est de 30mg/g d'eau du sol alors la quantité de substrat à délivrer dans des aliquotes de 25µl est :
 $0.078 \times 30 = 2.34\text{mg}$*
- *Dissoudre 2.34g de substrat dans 25ml d'eau déminéralisée*

⇒ La solution de substrat est stockée à 4°C et peut rester stockée ainsi jusqu'à 2 semaines

3) Préparation de la plaque à puits profonds

Si on utilise un substrat, il faut avant tout le sortir du réfrigérateur et le laisser se réchauffer à température de la salle.

Quant aux échantillons de sol, ils sont déjà ajoutés et incubés à l'intérieur des puits profonds depuis 3 à 5 jours (cf. partie C.2). Quand on les sort d'incubation :

⇒ on y ajoute le(s) substrat(s) dans chaque puits profonds (aliquotes de 25µl) puis on passe à la partie D.4). Au cas où on n'utilise pas de substrat, on passe à la partie D.4) sans attendre

4) Assemblage des composants du système expérimental puis expérimentation

⇒ Allumer le spectrophotomètre

- ⇒ Vérifier que la microplaque de détection qu'on va utiliser présente la même quantité de solution de détection dans chaque micropuit et que sa couleur est constante d'un micropuit à l'autre
- ⇒ Appliquer fermement le tapis de fermeture en caoutchouc à la plaque à puits profonds contenant le sol et le substrat (si on en utilise) (cf. image ci-dessous)



- ⇒ Placer la microplaque de détection dans le spectrophotomètre et lire l'absorbance à 570nm
- ⇒ Sauvegarder les résultats au temps (« At0 ») et vérifier le % coefficient de variance (%CoV). Jeter la microplaque si le %CoV est >5% et recommencer du début avec une autre microplaque de détection
 - ⇒ *Formule CoV : (écart-type/moyenne)*100*
- ⇒ Immédiatement placer la microplaque de détection sur le tapis de fermeture refermant la plaque à puits profonds, en retournant la microplaque de telle sorte que le micropuit A1 corresponde au puit profond A12. Appliquer fermement en égalisant la pression pour sceller correctement l'ensemble : microplaque + tapis de fermeture + plaque à puits profonds (cf. image ci-dessous)



- ⇒ Puis sécuriser l'étanchéité du dispositif expérimental en mettant en place la pince en métal (cf. images ci-dessous)



- ⇒ Incuber le dispositif expérimental à 25°C pendant 6h
- ⇒ Après incubation, précautionneusement désassembler la pince en métal et enlever la microplaque de détection
- ⇒ Immédiatement lire l'absorbance à 570nm de la microplaque et sauvegarder les résultats « At6 »
- ⇒ Le sol contenu dans la plaque à puits profonds peut être jeté à présent
 - ⇒ *La microplaque de détection peut être réutilisée tant que la solution de détection n'a pas séchée et qu'elle est retournée à sa couleur et absorbance d'origines*
- ⇒ Le tapis de fermeture ainsi que la plaque à puits profonds sont lavés à la main avec un détergent, rincés avec de l'eau déminéralisée et séchés pour être réutilisés

Annexe A

Protocole pour déterminer la teneur en humidité d'un échantillon de sol

- Peser un échantillon de terre fraîchement prélevée. C'est le poids frais
- Sécher le sol 24h à 105°C
- Peser le sol sec. C'est le poids sec
- Calculer le poids sec du sol (%) de l'échantillon selon la formule suivante : $(\text{poids sec} / \text{poids frais}) * 100$
- Calculer la teneur en humidité du sol (%) selon la formule suivante : $100 - \% \text{ poids sec}$

Annexe B

Protocole pour déterminer la capacité maximale de rétention d'eau : adapté de l'article de Hardy (1923)

Il s'agit de la capacité des particules d'un sol de retenir physiquement le maximum d'eau contre la force de la gravité, par unité de son poids sec

- Peser la terre après qu'elle ait été tamisée et séchée à 105°C pendant 24h à l'étuve. C'est le poids sec
- Placer la terre séchée dans un gobelet en plastique dont le fond a été perforé avec une aiguille (cf. photographies ci-dessous)



⇒ *La quantité de terre à utiliser est au choix, mais il convient d'utiliser un volume d'au moins 20cc. Dans ce protocole nous avons rempli le gobelet en plastique de terre jusqu'à la ligne faite au marqueur comme visible sur la photographie ci-dessous*



- Garder le gobelet maintenu immergé dans de l'eau de telle sorte que la terre qu'il contient s'imbibera d'eau avec le temps, par capillarité

- Quand la terre dans le bécher sera complètement imbibée d'eau (c'est-à-dire quand la surface de l'échantillon de terre sera visiblement mouillée), la peser. C'est le poids du sol humidifié.
- Calculer la capacité maximale de rétention d'eau (%) de l'échantillon selon la formule suivante : $((\text{poids sol humidifié} - \text{poids sec}) / \text{poids sec}) * 100$

Annexe C

Protocole pour déterminer à quelle hauteur ajuster l'humidité d'un sol avant de l'incuber :

Disons qu'on a un sol dont la capacité maximale de rétention d'eau = 52%

Considérons un échantillon de 50g de ce sol. Cela voudrait dire que 52% du poids total de cet échantillon peut contenir de l'eau. Soit 25,5g.

Disons que la teneur en humidité basale de ce sol est de 15%. Ce qui veut dire qu'un échantillon de 50g de ce sol contient 7,5g d'eau. Soit, 7,5ml.

Disons qu'on a fixé qu'on ajusterait cet échantillon sol à 30% de sa capacité maximale de rétention d'eau. 30% de 25,5g = 7,65g. Soit 7,65ml.

Donc pour arriver à 30% de sa capacité maximale en rétention d'eau, il faut rajouter à cet échantillon de sol: $7,65 - 7,5 = 0,15\text{ml}$ d'eau.

Il faut donc rajouter 0,15ml d'eau à 50g d'un sol dont la teneur en humidité initiale est de 15% si on veut ajuster l'humidité de ces 50g de sol à 30% de la capacité maximale en rétention d'eau de ce sol.

Concrètement, pour ajuster l'humidité d'un échantillon de sol : on met le sol dans un berlin, contenant le volume d'eau nécessaire à l'ajustement, puis on mélange bien le sol avec l'eau pour la répartir l'eau de manière homogène dans le sol

Bibliographie

Campbell C.D., Chapman S.J., Cameron C.M., Davidson M.S. and Potts J.M. (2003) A Rapid Microtiter Plate Method To Measure Carbon Dioxide Evolved from Carbon Substrate Amendments so as To Determine the Physiological Profiles of Soil Microbial Communities by Using Whole Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3593-3599

Creamer, R. E., Stone, D., Berry, P., & Kuiper, I. (2016). Measuring respiration profiles of soil microbial communities across Europe using MicroResp™ method. *Applied soil ecology*, 97, 36-43.

Hardy, F. (1923). The maximum water-retaining capacity of colloidal soils; the interpretation of this and of certain other soil moisture constants. *The Journal of Agricultural Science*, 13(3), 340-351.

Rowell, M.J. (1995). Colorimetric Method for CO₂ Measurement in Soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 27(3), 373-375

D. Annexe 4

Parcelle n°	C organique extractible des échantillons fumigés (mg.g de sol sec ⁻¹)	C organique extractible des échantillons non fumigés (mg.g de sol sec ⁻¹)	Biomasse microbienne (mg.g de sol sec ⁻¹)
1	0,06845475	0,021490772	0,123589417
2	0,027894099	0,06092338	-0,08691916
3	0,059802734	0,004666192	0,145096163
4	0,083267001	-0,069664275	0,402450727
5	0,081398166	-0,067495482	0,391825388
6	0,124173732	0,185201818	-0,160600226
7	0,124865894	-0,056191467	0,476466739
8	0,042637134	-0,104627855	0,387539445
9	0,098079252	-0,074921956	0,455266339
10	0,042913999	-0,0816255	0,327735523
11	0,035646306	6,5721E-05	0,093633117
12	0,114691123	-0,031480366	0,384661813
13	0,085066621	0,106139438	-0,055454783
14	0,060840976	0,042652938	0,047863257
15	0,195950857	0,086423134	0,288230849
16	0,097456307	0,051262391	0,121562937

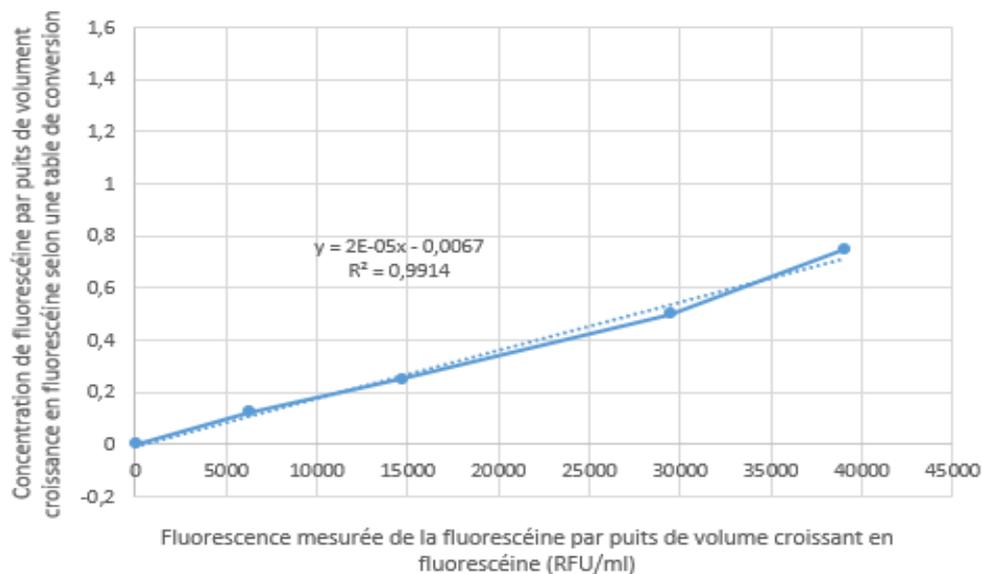
Calculs de biomasse microbienne à partir des échantillons de sol de la première répétition

Parcelle n°	C organique extractible des échantillons fumigés (mg.g de sol sec ⁻¹)	C organique extractible des échantillons non fumigés (mg.g de sol sec ⁻¹)	Biomasse microbienne (mg.g de sol sec ⁻¹)
1	0,140833885	-0,005090553	0,384011679
2	0,121178028	-0,042617066	0,431039722
3	0,093249504	0,000456845	0,244191208
4	0,093117141	-0,028128569	0,319067658
5	0,077895433	-0,022515908	0,264240372
6	0,133884844	0,00110948	0,34940885
7	0,08861681	-0,023886442	0,296061188
8	0,149636003	-0,041507587	0,503009446

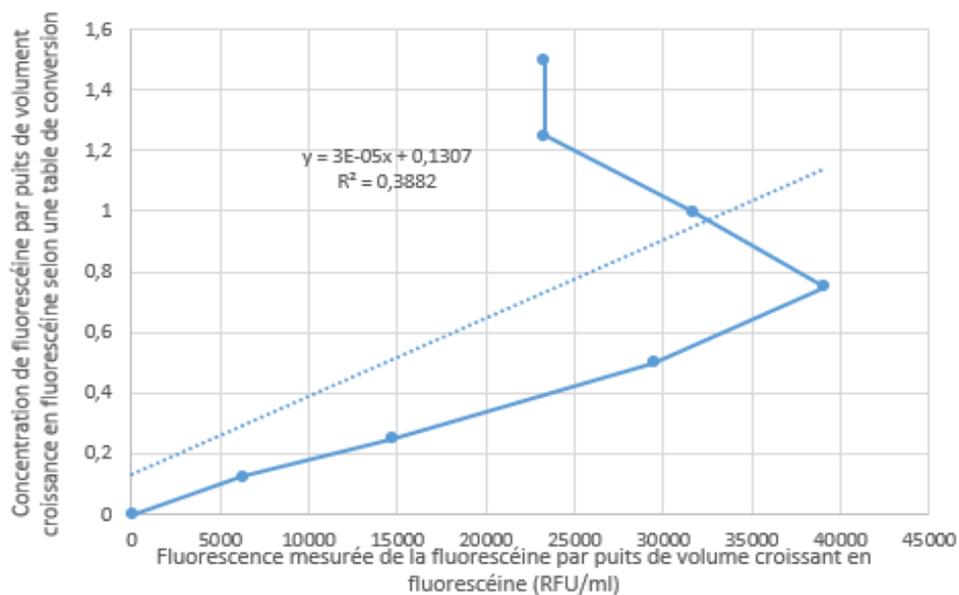
9	0,040900066	0,034981237	0,015575867
10	0,096889477	-0,03224017	0,33981486
11	0,391859696	-0,010376897	1,058517348
12	0,133884844	-0,017229564	0,397669497
13	0,152018531	0,030543319	0,319671611
14	0,057710126	0,026235928	0,082826837
15	0,073990735	0,173861968	-0,262819034
16	0,13117141	0,099918421	0,082244708

Calculs de biomasse microbienne à partir des échantillons de sol de la seconde répétition

E. Annexe 5



Droite d'étalonnage du sol 1 avec R^2 ajusté à la bonne concentration de fluorescéine



Droite d'étalonnage du sol 1 sans ajustement du R^2 à la bonne concentration de fluorescéine