
Contribution à l'étude de la fertilité de différents types de buttes d'inspiration permacole : gros plan sur les propriétés biologiques du sol

Auteur : Gourmet, Camille

Promoteur(s) : De Clerck, Caroline

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : sciences agronomiques, à finalité spécialisée

Année académique : 2022-2023

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/18091>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Contribution à l'étude de la fertilité de différents types de buttes d'inspiration permacole : gros plan sur les propriétés biologiques du sol

CAMILLE GOURMET

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

ANNEE ACADEMIQUE 2022-2023

PROMOTRICE : CAROLINE DE CLERCK

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 de Gembloux Agro-Bio Tech. Le présent document n'engage que son auteur.

Contribution à l'étude de la fertilité de différents types de buttes d'inspiration permacole : gros plan sur les propriétés biologiques du sol

CAMILLE GOURMET

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

ANNEE ACADEMIQUE 2022-2023

PROMOTRICE : CAROLINE DE CLERCK

REMERCIEMENTS

À l'issue de ce travail de fin d'étude, je tiens tout particulièrement à remercier ma promotrice, Caroline De Clerck, pour son précieux encadrement, ses conseils éclairés, ainsi que son écoute et sa disponibilité qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie également les doctorants et les membres de l'unité de phytotechnie tempérée pour leur bienveillance et leur aide.

J'adresse par ailleurs des remerciements spéciaux à mes collègues tffistes Alice, Lucas, Noémie et Ophélie pour m'avoir aidée, conseillée, accompagnée et divertie pendant la réalisation de ce travail de recherche.

Un tout grand merci à Hadrien Nuydt, maraîcher en charge de la plateforme WASABI, pour son dynamisme, son implication dans le projet, sa disponibilité et son aide pour les activités culturelles.

Mes remerciements s'étendent également aux enseignants et chercheurs, Marie Dincher et Yves Brostaux pour leur expertise et leurs recommandations ; et Pauline Biron, Adrien Blum et Jennifer Michel pour leur accompagnement en laboratoire.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers mes parents et ma sœur Alice pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mon parcours universitaire. Merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces belles études.

Je souhaite remercier Rémy pour son soutien quotidien, ses recommandations, ses encouragements et sa compréhension pendant les périodes intenses de travail, merci d'avoir été là pour moi.

Enfin, je remercie mes chères amis et ma famille gembloutoise, sans qui la vie à Gembloux n'aurait pas été pareille. Merci d'avoir rendus ces cinq belles années si particulièrement uniques et mémorables...

*Puisque demain au lever de l'aurore,
il faut quitter ces vieux murs de Gembloux.*

RÉSUMÉ

Les sols ne cessent de subir des dégradations irréversibles, menaçant la sécurité alimentaire mondiale. Les pratiques agricoles intensives jouent un rôle significatif dans ces altérations. Face à cela, la permaculture offre des pistes de gestion durable des terres pour préserver au mieux la fertilité du sol. La culture sur buttes permacoles, basée sur un apport important de matière organique et le maintien d'une activité biologique, favorise l'autofertilité du sol à long terme et contribue au développement d'une agriculture résiliente et durable en réponse aux défis environnementaux et alimentaires actuels.

Dans ce contexte, ce travail tente d'enrichir la littérature scientifique en comparant quatre types de buttes permacoles de compositions différentes et un témoin de terre non butté. Une analyse des propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol a été opérée par le biais d'indicateurs de fertilité du sol, et ce dans chaque type de buttes sur deux horizons de sol différents.

Les résultats des analyses de sols révèlent des teneurs en éléments biodisponibles, d'azote total, de carbone organique, de taux d'émission de CO₂, d'humidité et de biomasse microbienne généralement supérieures dans les horizons « substrat » des buttes riches en matières organiques. Il semblerait donc que les teneurs élevées en matière organique des technosols des buttes permacoles aient une influence sur les paramètres étudiés. Quant à la production de biomasse végétale, la culture sur butte permacole ne se différencie pas de la culture sur sol non butté.

Au vu de la dynamique des mécanismes sous-jacents à la fertilité des technosols étudiés, il est essentiel d'assurer un suivi continu des indicateurs de fertilité. À cet égard, une étude sur le long terme permettra d'estimer au mieux le potentiel des cultures sur buttes permacoles en tant qu'éléments d'une agriculture durable.

MOTS CLÉS

Butte permacole, fertilité du sol, matière organique, propriétés biologiques, agriculture durable.

ABSTRACT

Soils continue to undergo irreversible degradation, threatening global food security. Intensive agricultural practices play a significant role in these alterations. In response, permaculture offers pathways for sustainable land management to best preserve soil fertility as effectively as possible. Permacultural raised bed cultivation, involving substantial organic matter input and the maintenance of biological activity, promotes long-term soil self-fertility and contributes to the development of resilient and sustainable agriculture in response to current environmental and food challenges.

In this context, this study aims to enrich scientific literature by comparing four types of permacultural raised beds with different compositions and an untreated flat soil control. The physical, chemical and biological properties of the soil were analysed using soil fertility indicators, in each type of raised bed across two different soil horizons.

The results of the soil analyses revealed higher levels of bioavailable elements, total nitrogen, organic carbon, CO₂ emission rates, moisture, and microbial biomass in the "substrate" horizons of organic-rich raised beds.

It would therefore appear that the elevated organic matter content in the technosols of permacultural raised beds influences the studied parameters. As for plant biomass production, permacultural raised bed cultivation does not differ significantly from flat soil cultivation.

Given the dynamics of the underlying mechanisms of fertility of the studied technosols, it is essential to ensure ongoing monitoring of fertility indicators. In this regard, a long-term study will provide the best possible assessment of the potential of permacultural raised bed cultivation as a component of sustainable agriculture.

KEY WORDS

Permacultural raised bed, soil fertility, organic matter, biological properties, sustainable agriculture.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

C/N : carbone organique total/azote total

C:B : rapport champignons : bactéries

Ca : calcium

C_{mic}/N_{mic} : rapport carbone microbien/azote microbien

CO₂ : dioxyde de carbone

COT : carbone organique total

F : buttes forestières

H⁺ : cation hydrogène

K : potassium

L : buttes lasagnes

Mg : magnésium

MO : matière organique

P : phosphore

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

S : buttes sandwichs

T : buttes en terre

WASABI : plateforme Wallonne de Systèmes innovants en Agriculture et Biodiversité urbaine

Z : témoins en terre non buttés

TABLE DES MATIÈRES

1	Introduction	1
1.1	Problématique de fertilité en maraîchage	1
2	État de l'art.....	2
2.1	Les buttes de style permacole	2
2.1.1	Intérêts et enjeux de la culture sur buttes.....	2
2.1.2	Les types de buttes.....	3
2.2	La fertilité du sol	4
2.2.1	La matière organique du sol : dynamique et impact sur les propriétés physico-chimiques et biologiques	5
2.3	Évaluation de la fertilité du sol	7
2.3.1	Indicateurs chimiques	7
2.3.2	Indicateurs physiques.....	8
2.3.3	Indicateurs biologiques	9
3	Objectifs	10
4	Matériels et méthodes.....	11
4.1	Localisation de l'essai	11
4.2	Conditions climatiques	11
4.3	Facteurs étudiés	11
4.4	Dispositif expérimental.....	12
4.5	Mise en place des cultures	13
4.6	Récolte et quantification de la biomasse aérienne.....	14
4.7	Analyses du sol	14
4.7.1	Échantillonnage	14
4.7.2	Caractéristiques chimiques du sol.....	15
4.7.3	Caractéristiques physiques du sol	16
4.7.4	Caractéristiques biologiques du sol	16
4.8	Analyses statistiques	18
5	Résultats.....	20
5.1	Quantification de la biomasse aérienne.....	20
5.1.1	Épinards.....	20
5.1.2	Laitues	21
5.1.3	Oignons tiges.....	22
5.2	Analyses du sol	22

5.2.1	Caractéristiques chimiques du sol.....	22
5.2.2	Caractéristiques physiques du sol.....	24
5.2.3	Caractéristiques biologiques du sol	27
6	Discussion.....	32
7	Conclusions et perspectives.....	38
8	Contribution personnelle	40
9	Bibliographie	41
10	Annexes.....	47

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Interactions entre le microbiote, les plantes et le sol (Jacoby et al., 2017)	6
Figure 2 : Représentation schématique de la dynamique du carbone et de l'azote dans le sol (Amin, 2012).....	7
Figure 3 : Composition des différents types de buttes, coupe transversale (Jacques, 2021) .	12
Figure 4 : Dispositif expérimental (Lerogeron, 2022)	13
Figure 5: Plan de culture d'une butte.....	14
Figure 6: Illustration des points de prélèvements de sol sur une des 20 buttes sélectionnées	15
Figure 7: Illustration des horizons dans la carotte de sol	15
Figure 8: Illustration des points de mesure d'humidité sur une butte	16
Figure 9: Schéma d'un puit profond connecté à un puit de détection (The James Hutton Institute, 2019).....	16
Figure 10: Illustration d'un kit MicroResp (The James Hutton Institute, 2019).....	17
Figure 11: Biomasse fraîche moyenne d'un plant d'épinard (en g) par type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: alpha = 0.05).	20
Figure 12: Sous-échantillon d'un plant d'épinard par type de butte	21
Figure 13: Biomasse sèche moyenne d'un plant d'épinard (en g) par type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: alpha = 0.05).	21
Figure 14: a. Biomasse fraîche moyenne d'un plant de laitue (en g) par type de butte. b. Biomasse sèche moyenne d'un plant de laitue (en g) par type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: alpha = 0.05).....	22
Figure 15: a. Biomasse fraîche moyenne d'un plant d'oignon tige (en g) par type de butte. b. Biomasse sèche moyenne d'un plant d'oignon tige (en g) par type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: alpha = 0.05).	22
Figure 16: Taux d'humidité (en m ³ /m ³) mesurés le 25 mai 2023 selon le type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: alpha = 0.05).	25
Figure 17: Taux d'humidité (en m ³ eau/m ³ sol) mesurés le 21 juin 2023 selon le type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: alpha = 0.05).	25
Figure 18: Taux d'humidité selon le versant et le type de butte le 25 mai 2023. Des lettres différentes indiquent que les moyennes marginales sont significativement différentes (niveau de significativité: alpha = 0,05).	26
Figure 19: Taux d'émission de CO ₂ selon le type de butte et l'horizon de sol. Des lettres différentes indiquent que les moyennes marginales sont significativement différentes (niveau de significativité: alpha = 0,05).	27
Figure 20: Biomasse microbienne carbonée (en µg/g sol frais) selon le type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: alpha = 0.05).	28

Figure 21: Quantité de bactéries du sol par type de butte et horizon de sol. Des lettres différentes indiquent que les moyennes marginales sont significativement différentes (niveau de significativité utilisé : $\alpha = 0,05$). 29

Figure 22: Quantité de champignons du sol par type de butte et horizon de sol. Des lettres différentes indiquent que les moyennes marginales sont significativement différentes (niveau de significativité utilisé : $\alpha = 0,05$). 30

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Calendrier de repiquages des légumes cultivés sur les buttes	13
Tableau 2: Calendrier des récoltes	14
Tableau 3: Moyennes du pH _{KCl} et des teneurs en éléments biodisponibles par horizon de sol et par type de butte. La couleur verte indique des valeurs plus élevées et la rouge, des valeurs plus faibles. Les zones de référence sont basées sur des essais effectués dans le cadre de la Commission des Sols de Wallonie par Ir A. Descamps (Essais non publiés).	23
Tableau 4: Moyennes des concentrations en humus, azote total, carbone organique et total et rapport C/N par horizon de sol et par type de butte. La couleur verte indique des valeurs plus élevées et la rouge, des valeurs plus faibles. Les zones de référence sont basées sur des essais effectués dans le cadre de la Commission des Sols de Wallonie par Ir A. Descamps (Essais non publiés).	24
Tableau 5: Moyennes des quantités de gènes bactériens (16 s) et fongiques (18 s) repris pour chaque horizon de sol et par type de butte. La couleur verte indique des quantités plus élevées et la rouge, des quantités plus faibles.....	31

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1: Extrait du guide MicroResp - Méthode de calcul du taux d'émission de CO ₂ (Cameron et al., 2017).....	47
Annexe 2: Protocole d'étude de la respiration microbienne dans le sol.....	49
Annexe 3: Tableau de résultats d'essais des méthodes de lyses et d'extractions du carbone du sol	55
Annexe 4: Protocole d'extraction de l'ADN bactérien et fongique (QIAGEN, 2016)	55
Annexe 5: Protocole de quantification d'ADN par fluorescence (Promega, 2022)	57
Annexe 6: Protocole de fumigation au chloroforme liquide avec extraction au K ₂ SO ₄ (Ryan, 2016).....	58
Annexe 7: Protocole de fumigation au chloroforme gazeux avec extraction au K ₂ SO ₄ (Biron et al., n.d.).....	60
Annexe 8: Protocole de lyse des cellules microbiennes au micro-onde avec extraction du carbone à l'H ₂ O (Bertozzi et al., 2020)	61
Annexe 9: Protocole de quantification de la biomasse microbienne carbonée par oxydation et titrage (Biron et al., n.d.)	62

1 Introduction

Alors que les sociétés humaines ont toujours été dépendantes des sols comme source d'éléments nutritifs et support de production, cette ressource indispensable à la vie ne cesse de se dégrader de façon irréversible (Genot et al., 2009), se voyant perdre sa capacité à remplir ses fonctions (Commission Européenne, 2002). Avec une régénération et des processus de formation extrêmement lents, le sol est considéré comme une ressource non renouvelable à l'échelle de la vie humaine (Commission Européenne, 2002; McKay, 2022).

La diminution de la disponibilité et la détérioration des terres arables ne sont pas sans conséquence sur l'état de la sécurité alimentaire mondiale, menant à une réduction du potentiel d'approvisionnement alimentaire (Commission Européenne, 2002; FAO, 2018) et à une hausse des prix, impactant principalement les populations les plus pauvres (Laffoon, 2016).

Les principales causes de la mise en péril de l'industrie agricole mondiale sont les changements climatiques, la pression démographique croissante, ainsi que l'évolution de nos systèmes économiques de plus en plus consommateurs (Laffoon, 2016). En effet, bien qu'une augmentation du taux de dioxyde de carbone dans l'atmosphère, accompagnée d'un léger réchauffement soient bénéfiques à la croissance de certaines plantes, l'occurrence plus fréquente de phénomènes météorologiques extrêmes aura pour conséquence de nuire à la productivité agricole (McKay, 2022). De plus, l'accroissement démographique conduit à une production agricole intensive causant un appauvrissement des sols via des dégradations physiques et chimiques (FAO, 2018; Prévost, 2021).

Il est aujourd'hui indispensable d'enrayer ce danger que représente la dégradation des sols (Prévost, 2021) et d'intégrer des modes de gestion durable à l'utilisation des terres agricoles à travers le monde, afin d'en préserver la valeur agricole et par conséquent la fertilité (Commission Européenne, 2002).

1.1 Problématique de fertilité en maraîchage

Les cultures maraîchères intensives se caractérisent par des cycles de productions de courtes durées tout au long de l'année et par de fortes exportations d'éléments minéraux, causés par l'intensivité des pratiques. Afin de contrer ces exportations, des apports conséquents de fertilisants et d'amendements sont nécessaires pour maintenir une productivité à court terme (Thibault et al., 2018). À cela s'ajoutent des opérations de travaux du sol permettant d'accélérer la minéralisation de la matière organique et d'ameublir le sol, ayant pour conséquences de perturber les communautés biologiques naturellement actives dans ces processus et de détruire la structure du sol (Thibault et al., 2018; Araya et al., 2021). À terme, les cultures maraîchères intensives conduisent à une réduction de la fertilité en aggravant l'érosion et en épuisant le carbone organique du sol (Araya et al., 2021).

Aussi productive soit-elle, il n'est plus à démontrer que l'agriculture conventionnelle intensive cause des dommages non négligeables à l'environnement. Une solution a été de repenser l'agriculture afin de répondre aux besoins humains de façon durable, en maintenant l'équilibre entre les différentes composantes du système de production, dans le but d'entretenir les interactions réciproques avantageuses entre les plantes et les microorganismes du sol (Commune de Ferney Voltaire, 2011; FAO, 2018). Pour ce faire, Bill Mollison et Masanobu Fukuoka, pionniers de la permaculture, se sont basés sur des traditions cohérentes avec pour objectif de produire sans détruire (Commune de Ferney Voltaire, 2011).

La permaculture est un système de conception écologique se basant sur des principes et sur une éthique de préservation de l'environnement et de l'humain, avec une vision sociale, écologique et économique, utilisé pour répondre aux besoins humains à travers des initiatives concrètes et durables (Ferme expérimentale Au Petit Colibri, 2011; Chambre d'agriculture Bourgogne-Franche-Comté, 2019). La permaculture ne se limite pas à définir des techniques agricoles, elle correspond davantage à un mode de réflexion concernant le rapport des êtres humains avec le vivant, afin que leur mode de vie soit cohérent avec les enjeux globaux actuels (Ferme expérimentale Au Petit Colibri, 2011).

Selon Wallner (2013), la conception permaculturelle intervient dans le choix et dans la création de techniques agricoles, celles-ci aboutissant en des systèmes potentiellement productifs et résilients, tout en s'adaptant au contexte.

Face aux enjeux climatiques actuels et aux surexploitations des terres arables, la permaculture nous offre des pistes d'amélioration de nos systèmes de culture en intégrant la gestion de l'eau à la notion de conservation du sol (McKay, 2022). En respectant les principes de la permaculture, la culture sur buttes permanentes semble présenter un intérêt quant au maintien de la qualité du sol sur le long terme. En sachant que d'ici 2050, 68% de la population mondiale vivra en milieu urbain (Gaudiaut, 2022), ce style de culture maraîchère en hors sol possède un potentiel intéressant afin de produire localement de façon durable.

À ce jour, peu de publications scientifiques existent concernant les effets bénéfiques de la culture sur buttes permanentes concernant la fertilité du sol sur le long terme. Ce travail, inscrit dans un essai longue durée, tente d'enrichir la littérature scientifique à ce sujet.

2 État de l'art

2.1 Les buttes de style permacole

La culture sur buttes provient de pratiques paysannes ancestrales et est associée à une réflexion concernant le maintien de la fertilité du sol, l'objectif étant de « nourrir le sol pour nourrir la plante » (Morez, 1992).

Selon Emilia Hazelip, pionnière de la permaculture, ce type d'agriculture serait « la forme de culture la plus naturelle connue, car elle travaille avec les dynamiques de la fertilité naturelle du sol » (Commune de Ferney Voltaire, 2011). En effet, dans les buttes, un maintien de la fertilité du sol est assuré avec la décomposition des matières organiques et des débris de culture la constituant, par les macro et microorganismes (Commune de Ferney Voltaire, 2011).

2.1.1 Intérêts et enjeux de la culture sur buttes

La culture sur buttes est pratiquée sur divers continents à travers le monde et présente de nombreux avantages. Cette pratique permet notamment la valorisation de débris végétaux, souvent peu utilisés en agriculture conventionnelle (branches, écorces, feuilles, épineux,...), comme source de matière organique (Chalker-Scott, 2017; Morez, n.d.). De plus, les buttes étant constituées de matière organique en décomposition, elles confèrent une autofertilité sur le long terme, ne demandant que très peu d'entretien (Chalker-Scott, 2017; Morez, n.d.). En effet, le sol d'une butte n'est pas travaillé. L'activité des macro et microorganismes qui humifient, mélangent et transforment les différentes couches de sol, et les processus d'agrégation du sol ne sont donc pas affectés (Foudral, 2011; Zhang et al., 2012). Ces organismes se trouvant dans de meilleures conditions de développement, les activités enzymatiques associées de la rhizosphère augmentent, influençant positivement le rendement (Zhang et al., 2012; Thibault et al., 2018).

Selon Zhang et al. (2012), les propriétés physiques du sol des buttes sont améliorées par rapport aux plantations à plat conventionnelles. En plus d'obtenir un sol aéré (Wallner, 2013)

et une structure de sol stable permettant aux racines de mieux s'implanter au fil du temps, la décomposition de la matière organique confèrerait à la butte une bonne rétention en eau et en éléments nutritifs limitant ainsi le lessivage (Miles, 2010; Laffoon, 2016; Thibault et al., 2018; McKay, 2022; Wheaton, n.d.).

Avec leur aspect bombé, les buttes présentent une ergonomie intéressante à plusieurs niveaux. Elles permettent une augmentation de la surface cultivable (Foudral, 2011; Holzer et al., 2011; Chalker-Scott, 2017) et la combinaison de cultures aux besoins lumineux divers (Foudral, 2011; Wallner, 2013). En effet, selon l'orientation de la butte, les versants présenteront des modalités variables de températures, d'humidités, d'exposition au vent et au soleil créant des microclimats différents d'un versant à l'autre. Par conséquent, la butte permet l'implantation de cultures aux exigences diverses (Foudral, 2011; Wallner, 2019).

Les buttes peuvent se construire en hauteur dans des bacs en bois, ce qui permet un maintien de la butte sur le long terme et évite au cultivateur de devoir se baisser en y travaillant (Foudral, 2011).

2.1.2 Les types de buttes

Les sols des buttes de style permacole se rapprochent des sols forestiers de par leurs caractéristiques, tout en ayant une vocation agricole. Ils pourraient être qualifiés de technosols, puisque construits par l'humain.

Il existe différents types de buttes de style permacole, chacune décrite et testée par différents grands noms de la permaculture. Pour l'ensemble des buttes, la vitesse de décomposition de la matière organique et la nature des éléments issus de cette décomposition seront facteurs de la dynamique de fertilité (Foudral, 2011).

La butte en terre est constituée de terre recouverte d'un paillis. Cette dernière aurait été introduite en Europe par Emilia Hazelip, ayant adapté le travail de Masanobu Fukuoka au climat méditerranéen. Cette technique culturelle permettrait notamment d'aérer les sols compactés, de limiter le développement d'adventices et d'éviter l'assèchement de la terre, en se basant sur des principes de non travail du sol et de couverture permanente (Commune de Ferney Voltaire, 2011).

Morez (n.d.) a décrit, la butte sandwich, principalement composée de branchages et de matières organiques carbonées telles que de la paille, le tout recouvert de compost et de terre. Celle-ci permettrait l'utilisation maximale de la matière organique. La vitesse de décomposition varierait selon les éléments constituant la butte, mais celle-ci serait relativement lente, conférant une amélioration constante de la fertilité du sol sur le long terme suite à la dégradation d'éléments plus volumineux. Il en résulte, selon Morez, un sol ne nécessitant pas d'apports de fertilisants pendant 2 à 4 ans et ayant retrouvé son niveau original après quelques mois (Morez, 1992; Foudral, 2011).

La butte lasagne de Patricia Lanza est constituée d'une superposition de couches de matières organiques carbonées (foins, branchages, feuilles sèches, fumier, marc de café...) en alternance avec des matières riches en azote (tontes de gazon, feuilles vertes, déchets alimentaires...), le tout recouvert d'une couche de terre et d'un paillis (Foudral, 2011). Ce type de butte présente l'avantage d'être directement utilisable après sa construction étant donné la décomposition rapide de certaines matières. La diversité des matériaux utilisés participera

de façon active à la richesse du sol de la butte, celui-ci évoluant avec le temps (McKay, 2022). Après quelques années, afin de maintenir la fertilité de la butte sur le long terme, il est recommandé d'ajouter de nouvelles couches de matières organiques riches en carbone et en azote (McKay, 2022).

La butte forestière de Sepp Holzer, aussi appelée Hügelkultur en allemand, est constituée de composés ligneux en son centre et de matières azotées, telles que de l'herbe, autour des matières ligneuses, le tout recouvert de terre (Miles, 2010; Holzer et al., 2011; Chalker-Scott, 2017; McKay, 2022). Les matières ligneuses utilisées peuvent être des brindilles, des branchages ou encore des rondins de bois qui délivreraient des nutriments organiques carbonés en se décomposant (Laffoon, 2016; Wheaton, n.d.). Les matières organiques azotées participeraient également à l'entretien de la fertilité de la butte au fur et à mesure de leur décomposition. La vitesse de décomposition variant selon les matériaux présents dans la butte, l'apport de nutriments s'établirait donc sur le long terme rendant la butte autofertile pour des périodes au-delà de 10 ans (Foudral, 2011; Chalker-Scott, 2017; McKay, 2022).

Les essences intégrées à la butte doivent être choisies judicieusement, autant au niveau de la capacité de décomposition du bois, qu'à celui du relargage d'éventuelles substances allélopathiques pouvant avoir un effet sur les plantes cultivées (Wheaton, n.d.).

Les buttes sont idéalement toutes recouvertes d'un paillis (paille, carton...) (Foudral, 2011; McKay, 2022) permettant notamment de limiter la perte d'humidité, de contrôler le développement d'adventices, de contrer le tassement du sol dû à la pluie ou au vent, de faciliter la colonisation de la butte par la macro et microfaune et de limiter les fortes variations de température. Diverses sources recommandent le renouvellement du paillis chaque année, puisqu'il participe à l'entretien de la fertilité de la butte en se dégradant au cours de l'année (Commune de Ferney Voltaire, 2011; Foudral, 2011).

En résumé, la dynamique des buttes de style permacole permettrait de cultiver sans dépendre de la fertilisation minérale et de l'irrigation des cultures (Wallner, 2013; Wheaton, n.d.). En effet, selon McKay (2022) ces systèmes fonctionneraient de la même façon qu'en milieu naturel, l'abondance de macro et microorganismes présents naturellement étant suffisante au maintien de la fertilité du sol. Malgré une meilleure rétention en eau dans les buttes en comparaison à un sol classique, il est nécessaire de gérer au mieux les ressources en eau. En effet, en climat chaud, le dessèchement du sol peut être favorisé par la forme en dôme des buttes (Morez, 1992).

2.2 La fertilité du sol

Il existe plusieurs définitions de la fertilité du sol au sein desquelles les notions de fertilité, de qualité et de santé des sols se recoupent (Araya et al., 2021). De façon générale, la fertilité d'un sol peut être définie par sa capacité à soutenir la production de biomasse végétale (Genot et al., 2009; Thibault et al., 2018) en assurant ses fonctions telles que la décomposition de la matière organique, le stockage et la purification de l'eau ou encore le cycle des éléments nutritifs (Thibault et al., 2018).

La fertilité d'un sol agricole dépend des conditions du milieu et des activités humaines menées via la conduite des itinéraires techniques, influençant les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol (Genot et al., 2009).

Il est donc important d'étudier un sol à travers ses propriétés intrinsèques afin d'en évaluer la fertilité pour la gérer de façon durable, en évitant tout types de dégradation (Gayan et al., 2020; Araya et al., 2021). En plus de représenter un outil d'aide à la décision notamment quant au choix de l'itinéraire phytotechnique (Genot et al., 2012), ces informations permettront sur le long terme d'établir des liens entre les pratiques de gestion mises en œuvre et les variations de fertilité observées (Gayan et al., 2020).

2.2.1 La matière organique du sol : dynamique et impact sur les propriétés physico-chimiques et biologiques

La matière organique (MO) du sol représente un réservoir important d'éléments nutritifs tels que le carbone, l'azote, l'hydrogène, l'oxygène, le phosphore ou encore le soufre, nécessaires au développement des plantes. Elle est composée d'organismes vivants, de résidus de végétaux et d'animaux et de produits en décomposition. La MO peut être séparée en deux catégories, la matière organique « exogène » provenant notamment de débris végétaux et la matière organique humifiée, équivalente à un produit stable de dégradation, accumulée dans le sol et séquestrant du carbone organique (Amin, 2012; Genot et al., 2012).

La qualité du sol dépend fortement de la teneur en matière organique présente (Genot et al., 2012). En effet, celle-ci rend des services essentiels en termes de fertilité, et ce par le maintien des fonctions clés du sol (Commission Européenne, 2002; Genot et al., 2009; Thibault et al., 2018). En agissant comme moteur de l'activité biologique, la MO participe au maintien de la structure du sol et à la stabilité des agrégats. La création d'un milieu structuré par les microorganismes permet une meilleure rétention d'eau et circulation d'air dans le sol (Cosentino et al., 2006; Genot et al., 2012; Thibault et al., 2018).

La MO a donc un impact sur les paramètres physico-chimiques et biologiques du sol, ces derniers influençant la fertilité du sol. De fait, une teneur élevée en MO favorise notamment la capacité d'échange cationique, via la formation du complexe argilo-humique, affectant la rétention et la disponibilité des nutriments pour les plantes (Genot et al., 2012; Garcia et al., 2018). L'accessibilité des éléments nutritifs pour les végétaux est également impactée par le pH, la texture et la structure du sol, ou encore l'activité biologique (Soltner, 2005).

Le sol doit être considéré comme étant un écosystème complexe abritant une biodiversité abondante, constituée de faune et de microorganismes tels que les bactéries et les champignons. L'activité biologique s'y déroulant lui confère un maintien de sa structure et de sa fertilité, via la décomposition et la stabilisation des résidus organiques (Commission Européenne, 2002; Amin, 2012; Jacoby et al., 2017). Les interactions entre les macro, microorganismes du sol et les plantes mènent donc à des processus de biodégradation de la matière organique exogène. Cette dernière n'étant pas assimilable par les plantes, elle sera d'abord minéralisée, c'est-à-dire transformée en forme minérale avant d'être rendue biodisponible par dissolution (Genot et al., 2009; Amin, 2012; Wallner, 2013; Jacoby et al., 2017).

Ces processus de minéralisation sont spécifiques à chaque population microbienne et aux échanges intervenant dans la rhizosphère (Romaní et al., 2006; Amin, 2012; Wallner, 2013). En effet, les végétaux sécrètent des exsudats racinaires leur permettant de communiquer avec les microorganismes telluriques, qui par production d'enzymes, minéralisent les éléments nutritifs essentiels à la croissance des plantes (Figure 1) (Romaní et al., 2006; Zhang et al.,

2012; Jacoby et al., 2017). La mesure de l'activité enzymatique permet, entre autres, d'estimer le taux de dégradation du carbone organique présent dans le sol (Romaní et al., 2006).

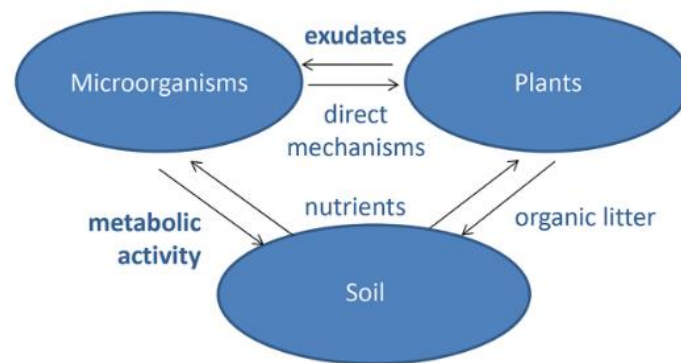


Figure 1 : Interactions entre le microbiote, les plantes et le sol (Jacoby et al., 2017)

Au niveau des écosystèmes terrestres, le sol est le plus grand réservoir de carbone organique circulant activement (Amin, 2012). Des échanges de carbone s'établissent entre l'atmosphère, l'océan, la végétation et le sol, et ce notamment via la respiration microbienne et végétale, la photosynthèse ou encore la dissolution du CO₂ dans l'eau (Janzen, 2004).

La minéralisation du carbone organique, préalablement assimilé par la biomasse microbienne, résulte en un dégagement de CO₂ dans l'atmosphère, qualifié de respiration microbienne (Figure 2) (Amin, 2012).

La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique et les restitutions de matières organiques telles que les résidus de récoltes et les exsudats racinaires participent aux apports naturels d'azote dans le sol. Cet azote est assimilé par la biomasse microbienne pour être minéralisé par des processus d'ammonification et de nitrification. Des pertes en azote minéral peuvent avoir lieu par volatilisation, dénitrification ou encore par lessivage (Figure 2).

Les cycles du carbone et de l'azote sont fortement liés du fait de l'implication simultanée de ces éléments dans l'entretien et la croissance des plantes et des microorganismes (Amin, 2012).

Par ailleurs, une fraction des matières organiques du sol ne sont que partiellement décomposées par des processus d'humification (Amin, 2012). En effet, selon leur niveau d'oxydation, les MO sont davantage impliquées dans la formation des agrégats du sol par adsorption sur les surfaces minérales. Cette incorporation dans les agrégats du sol leur confère une protection temporaire, empêchant ainsi les microorganismes d'y accéder pour une décomposition ultérieure (Lehmann et al., 2015). Malgré leur protection contre la dégradation microbienne, les substances humiques stables seront tout de même minéralisées sur le long terme (Garcia et al., 2018). Le processus de minéralisation de la MO est également influencé par la température et l'humidité, impactant l'activité microbienne (Rodrigo et al., 1997). C'est donc un phénomène dépendant de multiples facteurs intrinsèques au sol et des conditions environnementales.

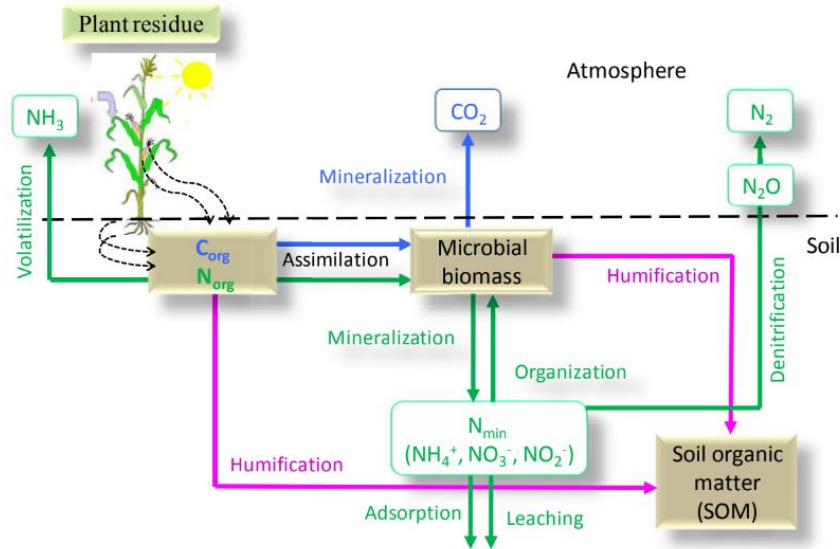


Figure 2 : Représentation schématique de la dynamique du carbone et de l'azote dans le sol (Amin, 2012)

Pour plus d'informations au sujet de la dynamique de la matière organique dans le sol et, les cycles du carbone et de l'azote au niveau terrestre, se référer à Janzen (2004), Grosbellet (2008), Amin (2012) et Jacoby et al. (2017).

Par son influence sur les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol, la matière organique participe à la complexité et à diversité des sols et les rend plus résistants aux dégradations tel que l'érosion (Commission Européenne, 2002; Genot et al., 2009). Afin d'établir un diagnostic fiable de la fertilité, il est donc primordial de considérer le contenu et les caractéristiques des matières organiques présentes dans les sols étudiés (Genot et al., 2009).

Plusieurs indicateurs informatifs de l'état du sol ont été identifiés dans ce travail, ceux-ci peuvent être liés à des facteurs physiques, chimiques et biologiques favorisant la croissance des plantes (Genot et al., 2009; Thibault et al., 2018; Araya et al., 2021).

2.3 Évaluation de la fertilité du sol

Il existe une multitude d'indicateurs utilisables pour évaluer la fertilité d'un sol, leur pertinence variant en fonction du contexte. Le choix des indicateurs à utiliser dépendra fortement du sol étudié et du type de culture, ce qui peut entraîner une redondance ou une efficacité moindre dans certains contextes (Thibault et al., 2018).

Dans cet état de l'art ne seront définis que les indicateurs utilisés dans la suite de ce travail. Pour plus d'informations concernant les indicateurs de fertilité du sol existant, Thibault et al. (2018) abordent le sujet de façon approfondie.

2.3.1 Indicateurs chimiques

Les éléments nutritifs présents dans l'air et le sol sont indispensables à la croissance saine des plantes et assurent chacun un rôle spécifique dans le développement des végétaux (Genot et al., 2009). La teneur en éléments nutritifs du sol (COT, N, P, K, Mg, Ca ...) est évaluée en mesurant la disponibilité des éléments présents dans la solution du sol (Genot et al., 2012; Thibault et al., 2018). Ces éléments biodisponibles se retrouvent en solution ou sur le complexe absorbant du sol sous forme de cations, tels que le calcium, le magnésium et le

potassium, ou d'anions composés notamment de phosphore ou d'azote minéral (Schvartz et al., 2005; Genot et al., 2009, 2012). D'autres éléments tels que le carbone et l'oxygène sont prélevés dans l'atmosphère (Schvartz et al., 2005). Le statut organique du sol est évalué en mesurant le taux de carbone organique total (Genot et al., 2009, 2012; Thibault et al., 2018).

L'état qualitatif de la matière organique peut être traduit à l'aide du rapport C/N (Genot et al., 2009, 2012). En effet, ce dernier illustre les conditions de minéralisation de la MO (Genot et al., 2012) et son état de dégradation (Thibault et al., 2018). Le rapport C/N est calculé sur base des teneurs en carbone organique et en azote total du sol (Soltner, 2005; Genot et al., 2012). Un rapport C/N optimal se trouve entre 9 et 10 (Thibault et al., 2018).

Le rapport C/N tend à baisser lors de la décomposition de la matière organique suite à une libération plus importante de carbone, sous forme de CO₂, que d'azote. Cette diminution varie selon la proportion d'azote et de carbone présente dans les débris végétaux du sol. Les matières organiques riches en azote, dites « matières vertes », présenteront une libération d'azote similaire à celle du carbone lors de leur décomposition, ne faisant donc baisser que faiblement le rapport C/N. À contrario, les débris végétaux pauvres en azote auront tendance à dégager plus de carbone que d'azote lors de leur décomposition et par conséquent induire une forte baisse du rapport C/N du sol (Soltner, 2005).

Le rapport C/N peut également donner des informations sur l'activité biologique d'un sol, cette dernière étant optimale lorsque le C/N est autour de 10 (Thibault et al., 2018). Dans un sol pauvre en azote, un rapport C/N élevé peut traduire une minéralisation lente de la MO (Baize, 2000), due à une activité biologique réduite à cause du manque d'azote inorganique nécessaire à leur développement, ayant été préalablement immobilisé ou dénitrifié (Hadas et al., 2004).

Dans certains cas, des sols caractérisés par un C/N du sol élevé et contenant une grande quantité de carbone organique ou de matières carbonées difficilement décomposables, peuvent mener à une croissance et activité microbienne importante, causant une immobilisation de l'azote (Hadas et al., 2004). Face à cette immobilisation de l'azote minéral, des phénomènes de faim d'azote peuvent survenir, impactant le bon développement des végétaux (Chabalier et al., 2003).

Le pH d'un sol varie au cours du temps et selon le climat. Cet indicateur reflète les conditions physico-chimiques de la solution du sol (Genot et al., 2009). Le pH est la mesure de la concentration d'ions H⁺ dans la solution du sol, ce qui en détermine le statut acido-basique (Soltner, 2005; Genot et al., 2009, 2012). Il a une influence sur la biodisponibilité des cations nutritifs dans la solution du sol et leur fixation au complexe argilo-humique (Soltner, 2005; Genot et al., 2009). Lors de l'acidification du sol, les cations nutritifs sont plus vulnérables au lessivage, car ils sont remplacés par les ions H⁺ au niveau du complexe d'échange argilo-humique et sont dissous dans la solution du sol (Schvartz et al., 2005).

De plus, la composition des communautés microbiennes totales et actives est influencée par des facteurs environnementaux tels que le pH (Romanowicz et al., 2016).

2.3.2 Indicateurs physiques

Il existe une multitude d'indicateurs physiques pouvant informer sur la fertilité du sol, tels que la structure, la texture, la teneur en eau du sol, la porosité ou encore la stabilité des agrégats (Sharma et al., 2010). Ces derniers ne seront pas abordés dans ce travail.

L'humidité et la température du sol ont une influence sur la fertilité. De fait, à basse température, la minéralisation est ralentie par la baisse d'activité biologique, pouvant de la même façon être impactée par des conditions anoxiques dues à un taux d'humidité excessif (Rodrigo et al., 1997). Par ailleurs, l'humidité présente une influence sur la composition des communautés bactériennes et fongiques du sol (Romanowicz et al., 2016).

2.3.3 Indicateurs biologiques

Les indicateurs biologiques du sol évaluent la diversité, l'abondance et l'activité des organismes vivants, tels que la faune et la flore, présentes dans le sol (Sharma et al., 2010). La diversité biologique peut être considérée comme un indicateur fiable de la durabilité de la fertilité biologique du sol et de sa résilience, ainsi que de la productivité végétale (Thibault et al., 2018).

Les organismes telluriques jouent un rôle crucial dans la préservation de la santé du sol (Gayan et al., 2020) et dans la nutrition des plantes (Zhang et al., 2012; Jacoby et al., 2017), notamment via la décomposition et la minéralisation de la matière organique (Romaní et al., 2006; Sharma et al., 2010).

La dynamique de l'activité microbienne est influencée par les conditions abiotiques du sol, telles que la température, l'humidité, la teneur en matière organique et sa composition biochimique, et par les pratiques agricoles menées (Zhang et al., 2012; Gayan et al., 2020). L'activité microbienne est notamment stimulée par l'ajout de matière organique (Cosentino, 2006), menant à une amélioration de la productivité grâce à une augmentation de la disponibilité en nutriments essentiels pour les plantes (Zhang et al., 2012).

L'activité microbienne peut être évaluée par la respiration des microorganismes et par l'activité enzymatique de la rhizosphère (Zhang et al., 2012).

La respiration microbienne du sol est une mesure du taux de minéralisation de la matière organique via la quantification du CO₂ émis lors de ce processus de décomposition (Thibault et al., 2018). La respiration microbienne est un indicateur directement proportionnel de l'activité des organismes aérobies du sol (Zhang et al., 2012).

La biomasse microbienne carbonée correspond à une mesure de l'abondance des microorganismes du sol par la quantification du carbone organique microbien. Cet indicateur biologique est sensible aux modes de gestion et aux caractéristiques physico-chimiques du sol, telles que l'humidité et la température. Il peut donc être utilisé de façon relative afin de comparer des sols se trouvant dans des conditions pédoclimatiques similaires (Thibault et al., 2018; Gayan et al., 2020).

La diversité microbienne évalue la proportion des populations bactériennes et fongiques du sol. Cet indicateur informe de la durabilité de la fertilité biologique, le fonctionnement du sol régissant des organismes présents (Thibault et al., 2018). De fait, ces derniers présentent une multitude de fonctions particulières (Fernandez, 2013) et leur abondance est sensible aux pratiques culturales ainsi qu'aux types d'occupation des sols (Thibault et al., 2018).

3 Objectifs

Ce travail s'inscrivant dans un essai longue durée, a pour objectif de comparer la fertilité du sol de différents types de buttes de style permacole sur le long terme, en se focalisant sur la composante biologique de cette fertilité. Son intérêt réside dans l'innovation du sujet de recherche. En effet, à notre connaissance, aucune étude scientifique n'a jamais comparé la fertilité des différents types des buttes permacoles, ainsi que leur évolution sur le long terme, dans des conditions abiotiques identiques.

Afin d'atteindre ces objectifs, la croissance et le rendement des cultures établies, ainsi que des propriétés physico-chimiques et biologiques du sol, ont été analysés. Pour cette expérimentation, quatre types de buttes s'inspirant des techniques les plus connues de buttes permacoles ont été sélectionnés, ainsi qu'un témoin de terre non butté.

4 Matériels et méthodes

4.1 Localisation de l'essai

L'essai est conduit sur la parcelle maraîchère de la plateforme Wallonne de Systèmes innovants en Agriculture et Biodiversité urbaine (WASABI), au sein du campus de Gembloux Agro-Bio Tech Uliège (50°33'48.2" nord, 4°41'58.3" est), et ce depuis 2021 sur une surface d'environ 600 m².

4.2 Conditions climatiques

Selon les données de l'IRM (2020), les précipitations moyennes sont de 793,4 mm par an et la température moyenne annuelle est de 10,2 °C à Gembloux.

4.3 Facteurs étudiés

Les quatre types de buttes mises en place sont la butte sandwich (S), la butte lasagne (L), la butte forestière (F) ainsi que la butte en terre (T). Ces quatre types de buttes sont accompagnés d'un témoin en terre non butté (Z). Leur composition est détaillée en Figure 3. L'ensemble des buttes a été construit dans des bacs en robinier, sans fond, de 4.2 m de long, 1.2 m de large et 0,6 m de haut, ceci afin d'en assurer une meilleure stabilité. La constitution des buttes diffère pour chaque type à l'exception de la terre de fond et de surface, identiques pour toutes et provenant du site d'implantation des buttes. Les MO composant les buttes proviennent des alentours de la parcelle maraîchère, hormis le lombricompost et le paillis de miscanthus recouvrant les buttes.

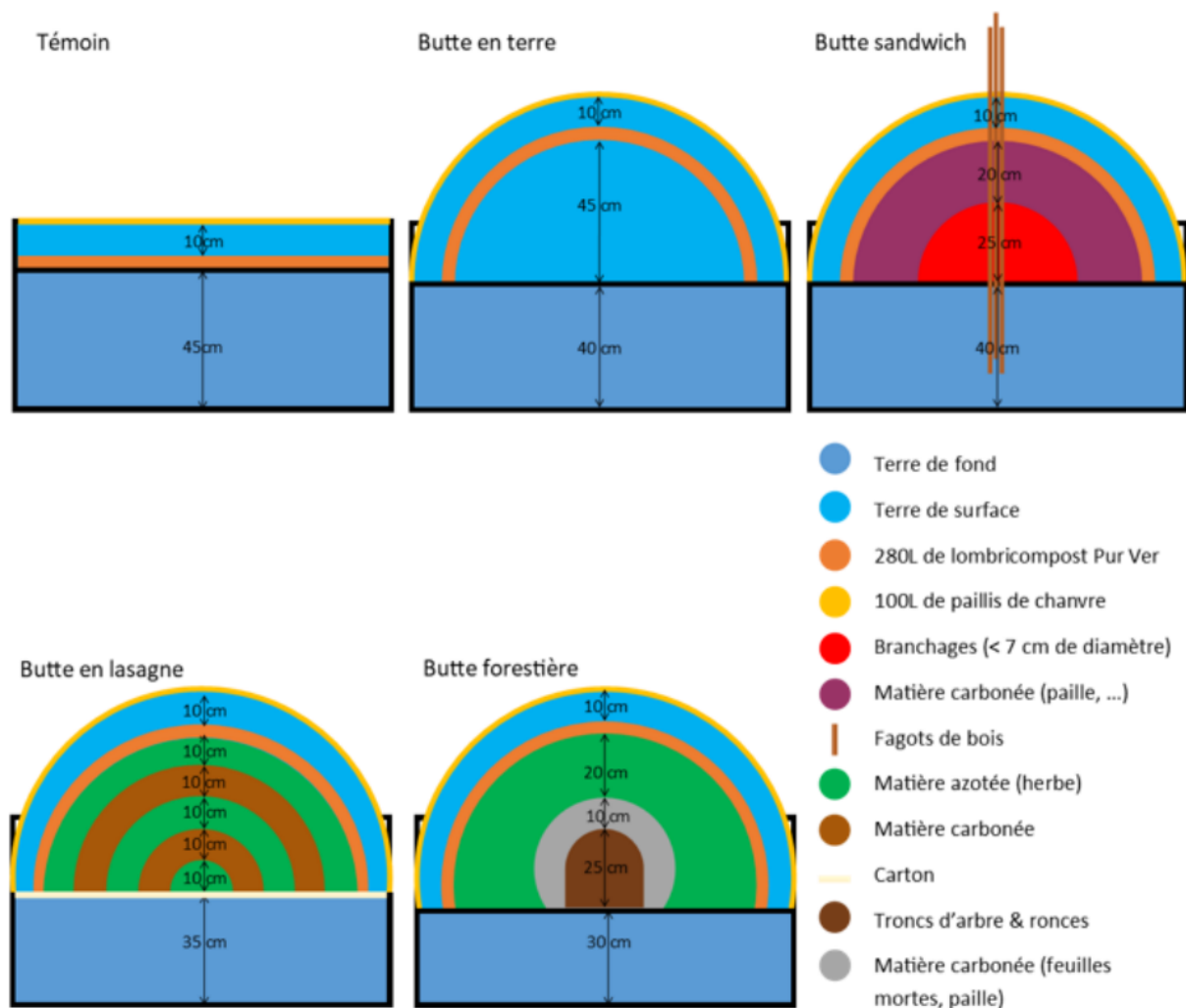


Figure 3 : Composition des différents types de buttes, coupe transversale (Jacques, 2021)

4.4 Dispositif expérimental

Il s'agit d'un dispositif en randomisation totale constitué de cinq modalités (Z, T, F, L et S) à neuf répétitions, accueillant au total 45 buttes. Celles-ci sont réparties en 15 groupes de trois buttes de même modalité, désignés par une lettre allant de A à O. La construction des buttes s'est étendue sur une période d'un an, celles mises en place entre mai et août 2020 possèdent l'identifiant « avs 2020 », « aps 2020 » pour celles construites de septembre à décembre 2020 et « avs 2021 » pour celles construites de mars à mai 2021 (Figure 4). Dans ce travail, les buttes les plus récentes, à raison de quatre par modalités, ont été sélectionnées pour mener les analyses autres que la caractérisation des rendements. Ces buttes sont encadrées en rouge sur la Figure 4.

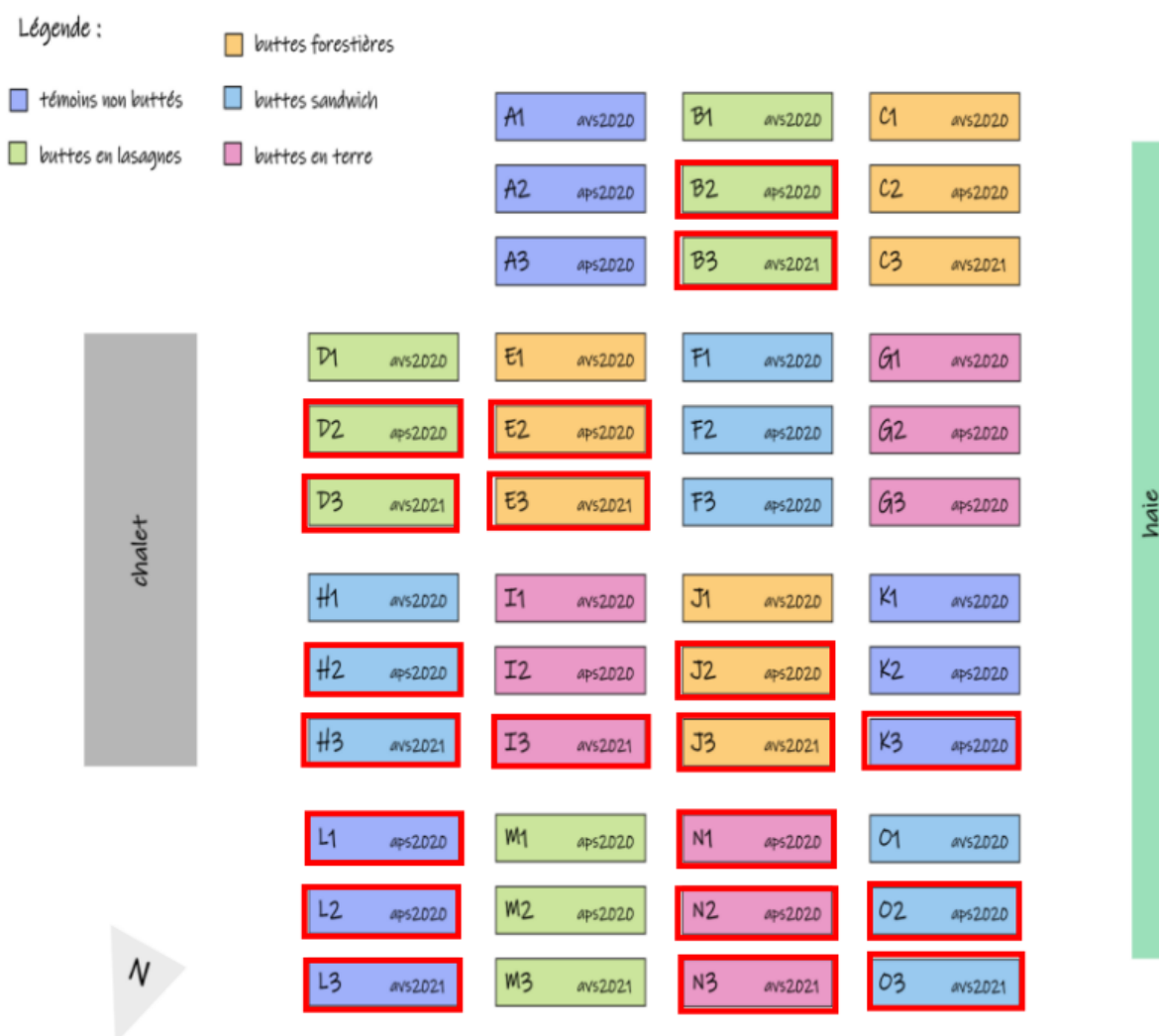


Figure 4 : Dispositif expérimental (Lerogeron, 2022)

4.5 Mise en place des cultures

Cinq espèces de légumes ont été sélectionnées à la fois pour diversifier au maximum la production afin de répondre au principe des buttes de style permacole, ainsi que pour leurs propriétés intéressantes en termes de date de semis, de récolte, de besoins nutritifs, d'association culturale et de profondeur d'enracinement. Les légumes cultivés sont des oignons tiges, des fenouils, des laitues, des épinards et des pois, remplacés cette année par du haricot.

Les plants proviennent du Centre Technique Horticole de Gembloux et ont été repiqués aux dates détaillées dans le Tableau 1.

Tableau 1: Calendrier de repiquages des légumes cultivés sur les buttes

Date	Opérations culturales
25 avril 2023	Repiquage des épinards
04 mai 2023	1 ^{er} Repiquage des laitues
11 mai 2023	Repiquage des oignons tiges 2 ^{ème} Repiquage des laitues
17 mai 2023	Repiquage des fenouils
24 mai 2023	Repiquage des haricots

Les plants ont été installés parallèlement à la largeur de la butte afin de laisser le même espace entre chaque rangée de plants, en suivant les écartements précisés sur la Figure 5. Le plan de culture comporte 11 plants de fenouils et de laitues, ainsi que 20 plants d'épinards, de haricots et d'oignons tiges. Les plants de laitues ayant été fortement abimés par les limaces, un deuxième repiquage a été réalisé le 11 mai afin de remplacer les plants touchés. Dû à un manque de plants disponibles pour le deuxième repiquage, seules les buttes A, B, D, E, F, H, I, J, L, M et N ont accueillis 11 plants de laitues, alors que les buttes C, G, K et O n'en possédaient que 5 chacune, positionnés en quinconce sur 3 lignes (2:1:2). Un manque de plants de fenouil lors du repiquage n'a permis d'implanter 11 plants que sur les buttes D, E, H, I, L, les autres ont accueillis 5 plants positionnés en quinconce sur 3 lignes (2:1:2).

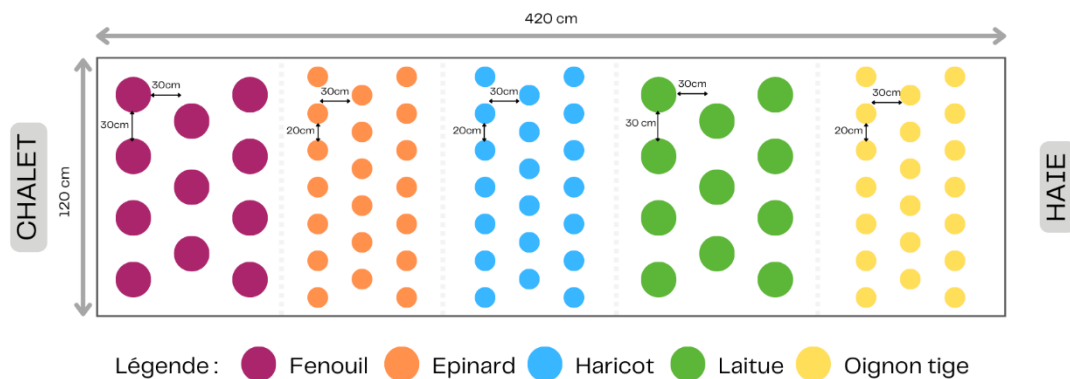


Figure 5: Plan de culture d'une butte

4.6 Récolte et quantification de la biomasse aérienne

Les dates de récoltes sont reprises dans le Tableau 2.

Tableau 2: Calendrier des récoltes

Date	Opérations culturales
31 mai 2023	Récolte des épinards
21 juin 2023	Récolte des laitues
26 juin 2023	Récolte des oignons tiges

Pour la récolte, les épinards, les laitues ont été coupés au niveau du collet, alors que les oignons tiges ont été déracinés.

La biomasse fraîche a été obtenue en pesant la récolte de chaque butte. Le nombre de plants récoltés par butte a été comptabilisé afin de pouvoir rapporter la biomasse fraîche totale par butte à une biomasse fraîche moyenne d'un plant par butte. Ensuite, un sous-échantillon d'un plant « moyen » par butte a été sélectionné parmi la récolte. Ces sous-échantillonnages de 9 plants par modalité ont été placés dans des sachets microperforés et mis à l'étuve à 60 °C pendant minimum 72 h. Pour finir, les plants séchés de chaque modalité ont été pesés afin d'en obtenir la biomasse sèche.

4.7 Analyses du sol

4.7.1 Échantillonnage

Le sol des buttes a été échantillonné en date du 28 avril à l'aide d'une tarière gouge manuelle de 25 cm de long et 2,5 cm de diamètre. L'échantillonnage, visant à étudier l'impact de la composition des buttes sur les propriétés biologiques du sol, a été réalisé sur les vingt buttes plus récentes identifiées en rouge sur la Figure 4. Chaque échantillon correspond au mélange

de huit prélèvements au sommet de chaque butte (Figure 6), et ce sur deux horizons de sol, donnant un total de deux échantillons composites par butte, un pour chaque horizon de sol. Les deux horizons de sol pourront être qualifiés d'horizon « sol » pour le premier et d'horizon « substrat » pour le second. Ils ont été définis arbitrairement sur base de critères visuels par différence de couleur ou de texture (Figure 7), l'horizon 2 ou « substrat » atteignant généralement une profondeur de 60 cm dans les buttes. Les 40 échantillons obtenus à la suite de ce deuxième échantillonnage ont servi de base aux analyses réalisées dans ce travail. Les sols ont été tamisés avec un tamis de 2 mm et stockés à 4 °C pour en préserver les propriétés tout au long de la période d'analyse.

Après échantillonnage, le trou formé par la tarière est bouché avec de la laine de mouton afin de limiter toute perturbation interne du sol de la butte.

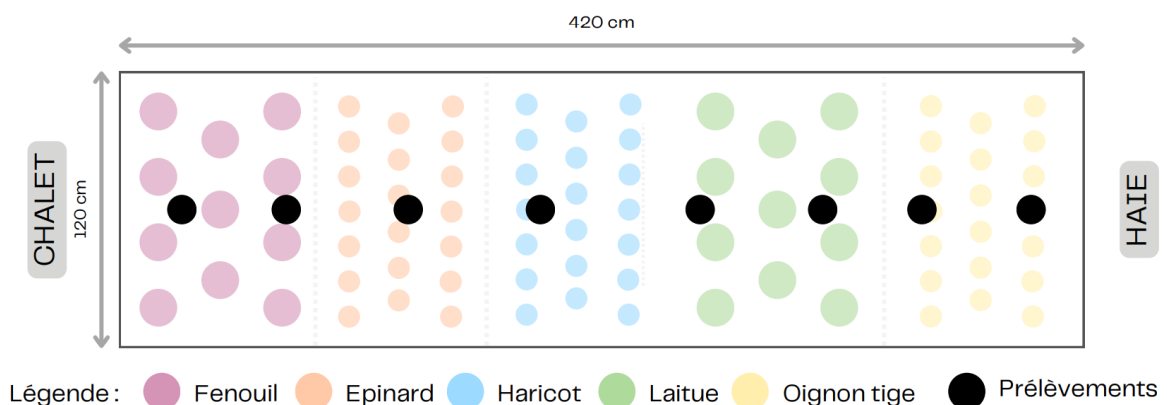


Figure 6: Illustration des points de prélèvements de sol sur une des 20 buttes sélectionnées



Figure 7: Illustration des horizons dans la carotte de sol

4.7.2 Caractéristiques chimiques du sol

Les analyses chimiques ont été réalisées par le pôle « Laboratoire d'analyses agricoles » du Centre provincial de l'agriculture et de la ruralité à La Hulpe. Le pH, le taux de carbone organique et total, la quantité biodisponible de phosphore, de calcium, de magnésium et de potassium, l'azote total, le rapport C/N, ainsi que le pourcentage d'humus ont été mesurés pour chacun des échantillons.

4.7.3 Caractéristiques physiques du sol

4.7.3.1 Humidité du sol

L'humidité du sol (m^3 eau/ m^3 sol) a été relevée le 25 mai et le 21 juin à une profondeur de 15 cm à l'aide du kit portable Delta-T pourvu d'une sonde ML2. La mesure a été réalisée en 9 points sur chacune des buttes : 3 au sommet, 3 sur le versant nord-ouest et 3 sur le versant sud-est (Figure 8).

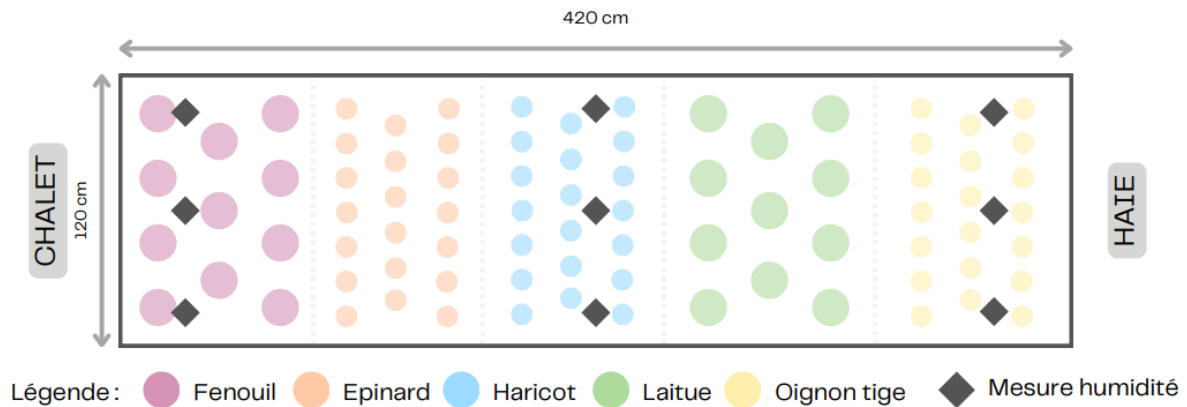


Figure 8: Illustration des points de mesure d'humidité sur une butte

4.7.4 Caractéristiques biologiques du sol

4.7.4.1 Étude de la respiration microbienne

L'étude de la respiration microbienne dans les sols des différents types de buttes a été réalisée sur les échantillons de sols d'horizons 1 et 2, et ce pour les 20 buttes sélectionnées lors de l'échantillonnage, donnant un total de 40 échantillons analysés.

Une méthode colorimétrique de mesure du taux de CO_2 émis par les échantillons de sol, développée par Campbell et al. (2003), a été suivie à l'aide du kit MicroResp (The James Hutton Institute, 2019). Il s'agit d'une technologie utilisant un indicateur coloré (rouge de crésol), s'éclaircissant avec une diminution du pH. Le gel indicateur contenant du bicarbonate de sodium, ce dernier réagit avec le CO_2 émis, induisant une diminution de pH : CO_2 (gaz) + H_2O + $HCO_3^- \leftrightarrow 2CO_3^{2-} + 3H^+$ (Figure 9).

L'absorbance du gel de détection par spectrophotométrie (à une longueur d'onde de 570 nm) permet de quantifier le taux d'émission de CO_2 (μg CO_2 -C/g/h) lors de la respiration microbienne (Rowell, 1995).

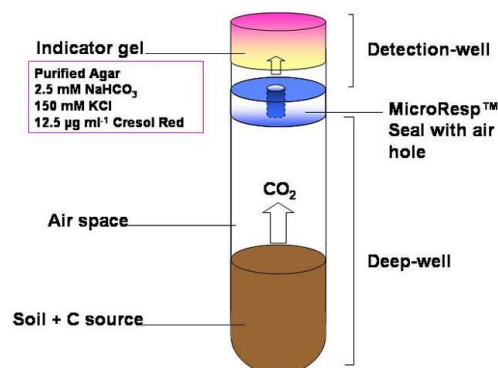


Figure 9: Schéma d'un puits profond connecté à un puits de détection (The James Hutton Institute, 2019)

Le kit MicroResp prêt à l'emploi est constitué d'un dispositif de remplissage, d'une plaque à 96 puits profonds accueillant les échantillons de sol, d'un tapis de fermeture en caoutchouc

perforé, d'une microplaque à 96 puits contenant le gel de détection et d'un dispositif de fermeture en métal (The James Hutton Institute, 2019) (Figure 10).

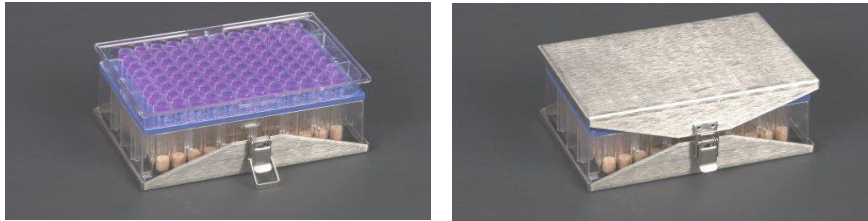


Figure 10: Illustration d'un kit MicroResp (The James Hutton Institute, 2019)

La teneur en humidité des échantillons de sol doit être normalisée à 30% de leur capacité maximale de rétention d'eau avant de pouvoir en mesurer la respiration microbienne. De l'eau distillée a été utilisée comme témoin négatif et une solution de NaHCO_3 25% comme témoin positif. Après six heures d'incubation, l'absorbance de la microplaque de détection a été lue à 570 nm à 20 °C à l'aide d'un spectromètre du type *Thermo Scientific Multi scan Go*. Les données d'absorbance pré et post incubation sont intégrées à des formules provenant du guide MicroResp afin de calculer le taux d'émission de CO_2 ($\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$) de chaque échantillon (Annexe 1). Le protocole détaillé de la manipulation se trouve en Annexe 2.

4.7.4.2 Détermination de la biomasse microbienne carbonée du sol

La détermination de la biomasse microbienne carbonée des sols des différents types de buttes a été réalisée sur les échantillons de sols d'horizon 2, et ce pour les 20 buttes sélectionnées lors de l'échantillonnage, donnant un total de 20 échantillons analysés.

La méthode utilisée consiste à déterminer la biomasse microbienne carbonée présente dans les échantillons de sol sur base de la quantité de carbone organique d'origine non microbienne et de la quantité totale de carbone organique présentes dans le sol.

Afin d'extraire le carbone du sol, trois méthodes ont été testées sur un échantillon de sol, dans le but de sélectionner la plus adéquate pour traiter l'ensemble des échantillons. Deux méthodes sont basées sur une lyse des cellules microbiennes par fumigation au chloroforme, sous forme liquide (Annexe 6) ou gazeuse (Annexe 7), suivie d'une extraction du carbone au K_2SO_4 . La troisième méthode consiste à chauffer au micro-onde les échantillons de sol en solution aqueuse afin de lyser les cellules microbiennes et d'extraire le carbone total (Annexe 8) (Bertozzi et al., 2020). Pour chacune des méthodes, les échantillons sont dupliqués, la moitié étant soumise à une fumigation ou un chauffage au micro-onde pour ensuite en extraire le carbone total et l'autre moitié n'étant pas fumigée ou chauffée pour n'en extraire que le carbone d'origine non microbienne.

Après extraction, les surnageants obtenus ont été oxydés par chauffage à reflux après ajout d'un mélange d'acides et d'une solution de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0.0667M, avant d'être titrés au sel de Mohr (Annexe 9). Seule la moitié des blancs formés de K_2SO_4 ou d'eau selon la méthode, ayant préalablement subis les mêmes traitements que les échantillons, sont chauffés à reflux lors de la phase d'oxydation. Ces derniers sont également titrés au sel de Mohr. Les données obtenues permettent de calculer la biomasse microbienne carbonée ($\mu\text{g C/g sol}$) présente dans les échantillons de sols en utilisant les formules suivantes :

Carbone organique extractible C_1 ($\mu\text{g/mL}$) :

$$C_1 = \frac{(V_{\text{blanc reflué}} - V_{\text{échantillon}})}{V_{\text{blanc non reflué}}} \times [\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7] \times V_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} \times E \times \frac{100}{V_{\text{échantillon ajouté}}}$$

Où $E = 3$ et $[K_2Cr_2O_7] = M \cdot 6 = 0.0667M \cdot 6$

Carbone organique extractible C_2 ($\mu\text{g/g}$ de sol sec) :

$$C_2 = C_1 \times \frac{m_{\text{extractant}}}{m_{\text{sol}}}$$

Carbone de la biomasse ($\mu\text{g C/g sol}$) :

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

(Biron et al., n.d.)

Après obtention des résultats pour les trois méthodes testées (Annexe 3), la méthode de fumigation au chloroforme liquide avec extraction au K_2SO_4 a été retenue pour traiter l'ensemble des échantillons, étant logistiquement moins contraignante et plus rapide. La méthode de fumigation au chloroforme gazeux semble être fonctionnelle, mais reste néanmoins très fastidieuse à réaliser au vu du nombre d'échantillons. Concernant la méthode de lyse au micro-onde et d'extraction à l'eau, celle-ci n'est pas fonctionnelle et ne nous a pas permis d'obtenir des résultats cohérents.

4.7.4.3 Quantification des bactéries et champignons du sol par PCR quantitative (qPCR)

La quantification des organismes d'origine bactérienne et fongique du sol a été réalisée sur les échantillons de sols d'horizons 1 et 2, et ce pour les 20 buttes sélectionnées lors de l'échantillonnage, donnant un total de 40 échantillons analysés.

L'ADN génomique total présent dans le sol a été extrait à l'aide du kit DNeasy® PowerSoil® de QIAGEN, en suivant le protocole en Annexe 4 (QIAGEN, 2016).

L'ADN extrait de chaque échantillon de sol a ensuite été quantifié en suivant le protocole en Annexe 5, à l'aide du système QuantiFluor® ONE dsDNA et le fluoromètre Quantus Fluorometer ("QuantiFluor® ONE dsDNA System Protocol," 2022).

Après quantification de l'ADN, la concentration de l'ensemble des échantillons a été normalisée à 10 μL d'ADN pour un volume final de 30 μL .

L'amplification du gène 16S, à l'aide des amorces 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3', 5'-ATT ACC GCT GCT GGC A-3', permet la quantification de la population bactérienne présente dans les sols, et l'amplification du gène 18S, à l'aide des amorces 5'-A CCA TTC AAT CGG TAT-3', 5'CGA TAA CGA ACG AGA CCT-3', celle des champignons.

La PCR en temps réel est réalisée avec le thermocycleur QuanStudio 3, utilisant des plaques à 96 puits. La réaction PCR se fait avec un volume de réaction de 10 μL par puits, contenant 5 μL de KAPA SYBR® FAST, 1 μL de chaque amorce, 2 μL d'eau sans nucléase et 1 μL d'échantillons d'ADN. Les conditions de réaction pour l'amplification de l'ADN sont de 95 °C pendant 5 minutes, 40 cycles de 95 °C pendant 30 secondes, 55 °C pendant 30 secondes et 70 °C pendant 1 minute. Pour chaque paire d'amorces, des dilutions en série sont effectuées (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 copies du gène intégré dans un plasmide) et utilisées pour construire une droite d'étalonnage.

4.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données ont été réalisées avec le logiciel RStudio®. Pour les variables de biomasse microbienne carbonée et de biomasses fraîches et sèches des cultures, une analyse de la variance à un facteur fixe « type de butte » a été réalisé à l'aide de la fonction *R anova()* afin d'identifier les éventuelles différences significatives entre les différents types de buttes. Les conditions d'applications ont été vérifiées sur les résidus de l'analyse de la variance avec les tests de Shapiro-Wilk (H_0 : normalité des résidus de l'ANOVA) et de Bartlett

(H_0 : égalité des variances). Ensuite, un test de comparaisons multiples de Tukey a été réalisé à l'aide de la fonction `HSD.test`, permettant d'identifier les différences significatives entre les moyennes de chaque modalité.

Concernant l'analyse statistique du taux d'émission de CO_2 et de la quantité de gènes bactériens et fongiques du sol, un modèle à effets mixtes a été ajusté aux données via la fonction R `lmer()`, avec le type de butte et l'horizon de sol comme facteurs fixes et l'identifiant de la butte comme facteur aléatoire. Une analyse de la variance a ensuite été réalisée avec la fonction `anova()`. Lorsque des différences significatives étaient identifiées par l'analyse de la variance, l'estimation des moyennes marginales de chaque modalité des facteurs fixes « type de butte » et « horizon de sol » de la variable étudiée a été réalisée à l'aide de la fonction `emmeans()`.

Pour l'analyse statistique des données d'humidités relevées aux dates du 25 mai et 21 juin, une analyse de la variance à un facteur fixe « type de butte » a été réalisée sur chaque jeu de données. L'analyse a été approfondie en ajustant un modèle linéaire à effets mixtes aux données du 25 mai présentant des différences significatives entre les moyennes des différentes modalités. Pour ce faire, la fonction `lmer()` a été utilisée, avec le type de butte et le versant de la butte comme facteurs fixes et l'identifiant de la butte comme facteur aléatoire. Une analyse de la variance a ensuite été réalisée avec la fonction `anova()`, suivie de l'estimation des moyennes marginales à l'aide de la fonction `emmeans()`.

5 Résultats

5.1 Quantification de la biomasse aérienne

5.1.1 Épinards

5.1.1.1 Biomasse fraîche

L'analyse statistique de la biomasse fraîche des épinards révèle une différence significative entre les témoins non buttés et les buttes sandwichs, les témoins présentant des rendements plus élevés, comme illustré en Figure 11 Figure 12. Aucune différence significative n'a été identifiée entre les buttes lasagnes, forestières, en terre et sandwichs, ainsi qu'entre les témoins non buttés, les buttes lasagnes, forestières et sandwichs.

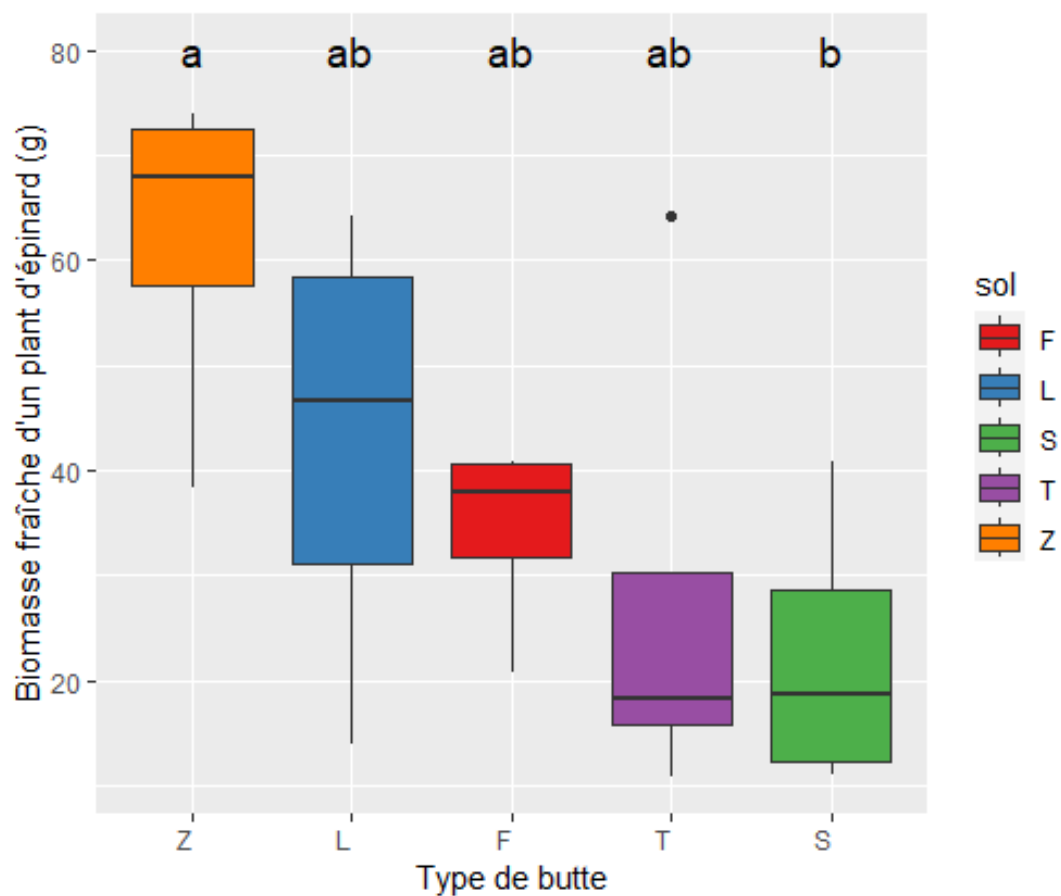


Figure 11: Biomasse fraîche moyenne d'un plant d'épinard (en g) par type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: $\alpha = 0.05$).



Figure 12: Sous-échantillon d'un plant d'épinard par type de butte

5.1.1.2 Biomasse sèche

L'analyse statistique de la biomasse sèche des épinards ne révèle pas de différence significative entre les moyennes des biomasses sèches des différents types de buttes (Figure 13).

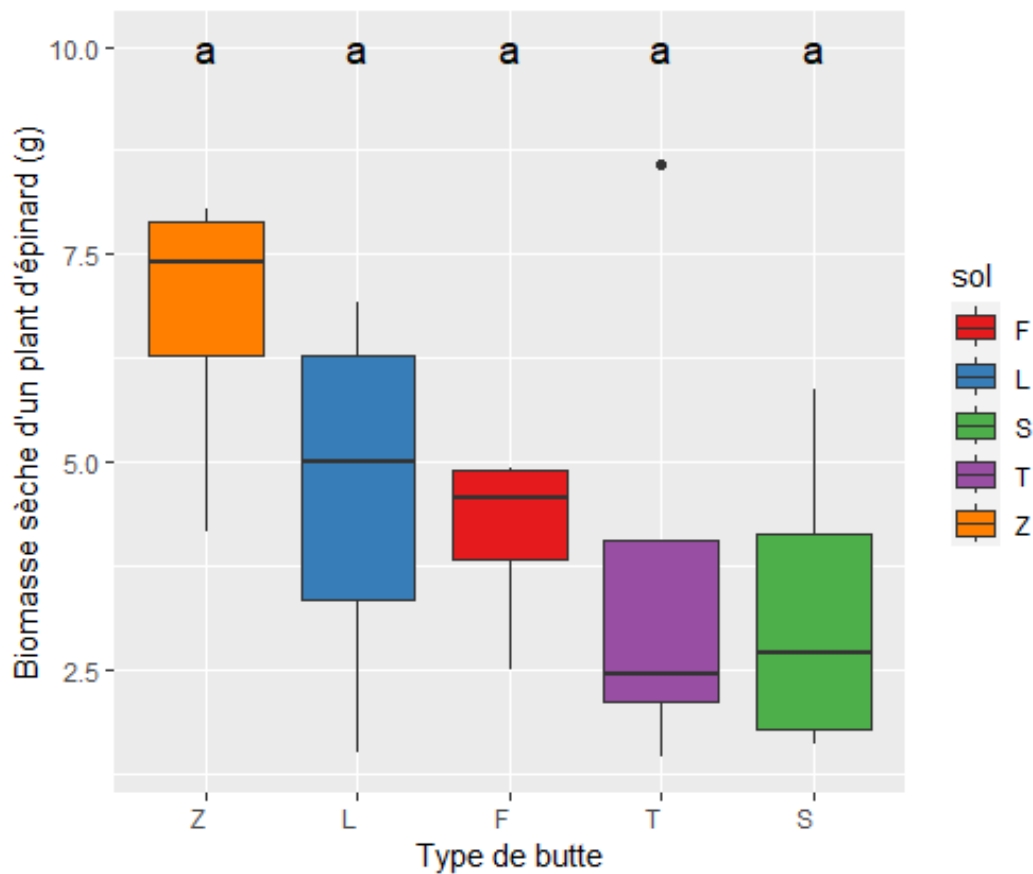


Figure 13: Biomasse sèche moyenne d'un plant d'épinard (en g) par type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: $\alpha = 0.05$).

5.1.2 Laitues

Les analyses statistiques de la biomasse fraîche et de la biomasse sèche des laitues ne révèlent pas de différence significative entre les moyennes des biomasses fraîches et sèches obtenues pour les différents types de buttes (Figure 14).

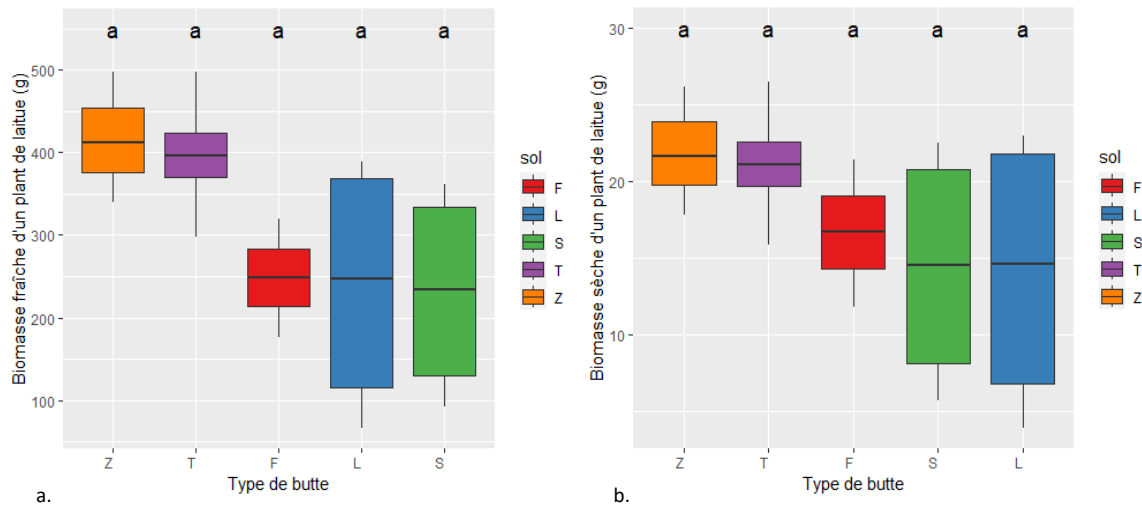


Figure 14: a. Biomasse fraîche moyenne d'un plant de laitue (en g) par type de butte. b. Biomasse sèche moyenne d'un plant de laitue (en g) par type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: $\alpha = 0.05$).

5.1.3 Oignons tiges

Les analyses statistiques de la biomasse fraîche et de la biomasse sèche des oignons tiges ne révèlent pas de différence significative entre les moyennes des biomasses fraîches et sèches obtenues pour les différents types de buttes (

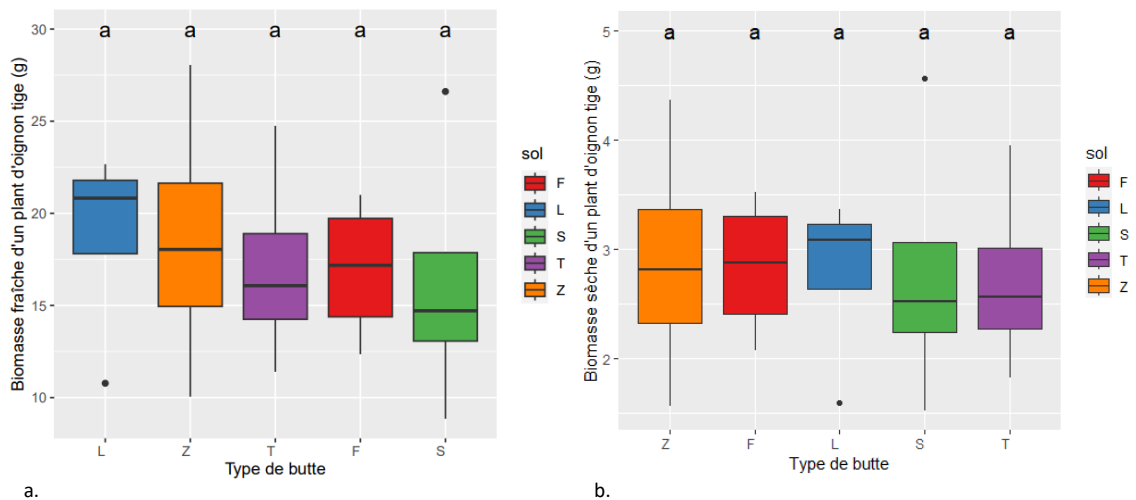


Figure 15).

Figure 15: a. Biomasse fraîche moyenne d'un plant d'oignon tige (en g) par type de butte. b. Biomasse sèche moyenne d'un plant d'oignon tige (en g) par type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: $\alpha = 0.05$).

5.2 Analyses du sol

5.2.1 Caractéristiques chimiques du sol

Les résultats des analyses chimiques des sols des buttes, réalisées par le laboratoire d'analyses agricoles du centre provincial de l'agriculture et de la ruralité de La Hulpe, sont repris dans les Tableau 3 Tableau 4.

Les analyses chimiques révèlent des concentrations en phosphore (P), potassium (K), magnésium (Mg) et calcium (Ca) plus importantes en horizon 2 qu'en horizon 1 dans les buttes

lasagnes, forestières et sandwiches. Concernant les buttes en terre et les témoins non buttés, l'horizon 1 est plus riche en éléments biodisponibles que l'horizon 2.

L'horizon 1 des témoins non buttés présente des teneurs en P, K et Mg plus importantes que l'horizon 1 des buttes en terre, lasagnes, forestières et sandwiches, les teneurs en Ca étant plus importantes dans les buttes en terre que dans les autres types de buttes. Si l'on considère l'horizon 2, ces teneurs sont plus importantes dans les buttes lasagnes, forestières et sandwiches que dans les buttes en terre et témoins non buttés.

En horizon 1, le pH est plus élevé dans les buttes en terre et les témoins non buttés, alors qu'en horizon 2, il est plus élevé dans les buttes en terre et en lasagnes.

Tableau 3: Moyennes du pH_{KCl} et des teneurs en éléments biodisponibles par horizon de sol et par type de butte. La couleur verte indique des valeurs plus élevées et la rouge, des valeurs plus faibles. Les zones de référence sont basées sur des essais effectués dans le cadre de la Commission des Sols de Wallonie par Ir A. Descamps (Essais non publiés).

Horizon de sol	Type de butte	P mg/100g	K mg/100g	Mg mg/100g	Ca mg/100g	pH_{KCl}
Zone de référence		3-6	14-21	7-10		6.6
1	Témoin	17.68 ± 2.53	40.28 ± 8.50	20.76 ± 2.95	385.33 ± 102.81	6.81 ± 0.27
1	Terre	13.10 ± 2.21	33.24 ± 3.25	20.37 ± 4.68	603.91 ± 500.18	6.82 ± 0.28
1	Lasagne	10.55 ± 1.77	34.04 ± 2.57	15.65 ± 1.32	262.43 ± 17.25	5.97 ± 0.14
1	Forestière	13.99 ± 5.02	32.27 ± 2.20	17.15 ± 2.13	334.44 ± 96.41	6.40 ± 0.66
1	Sandwich	11.63 ± 2.30	40.60 ± 7.21	17.84 ± 1.11	266.63 ± 22.31	5.91 ± 0.12
2	Témoin	13.85 ± 2.55	33.39 ± 7.88	14.62 ± 3.33	319.19 ± 96.09	6.56 ± 0.61
2	Terre	14.40 ± 4.096	18.78 ± 1.55	16.62 ± 4.74	413.95 ± 116.96	6.85 ± 0.21
2	Lasagne	52.01 ± 50.63	87.78 ± 29.29	69.81 ± 3.83	873.41 ± 55.75	6.88 ± 0.06
2	Forestière	50.8 ± 18.77	84.84 ± 18.11	61.18 ± 6.58	803.19 ± 124.07	6.75 ± 0.14
2	Sandwich	24.63 ± 8.42	79.80 ± 24.41	48.68 ± 9.10	584.27 ± 99.74	6.69 ± 0.17

Concernant le pourcentage d'humus et d'azote total, le rapport C/N et les concentrations en carbone organique et total, l'horizon 2 des buttes lasagnes, forestières et sandwiches présentent des valeurs plus élevées que celles en horizon 1. Au sein de l'horizon 1, les témoins non buttés et les buttes sandwiches possèdent des valeurs principalement supérieures à celles des autres types de buttes. Au sein de l'horizon 2, les buttes lasagnes, forestières et sandwiches présentent des valeurs supérieures à celles des buttes en terre et des témoins non buttés.

Tableau 4: Moyennes des concentrations en humus, azote total, carbone organique et total et rapport C/N par horizon de sol et par type de butte. La couleur verte indique des valeurs plus élevées et la rouge, des valeurs plus faibles. Les zones de référence sont basées sur des essais effectués dans le cadre de la Commission des Sols de Wallonie par Ir A. Descamps (Essais non publiés).

Horizon de sol	Type de butte	Humus %	Azote total %	C/N	Carbone organique g/kg	Carbone Total g/kg
Zone de référence				8-12		
1	Témoin	7.06 ± 0.68	0.21 ± 0.03	17.19 ± 2.80	35.30 ± 3.42	35.30 ± 3.42
1	Terre	5.81 ± 1.13	0.18 ± 0.02	15.81 ± 1.83	29.07 ± 5.65	29.177 ± 5.6
1	Lasagne	5.75 ± 0.82	0.19 ± 0.02	14.75 ± 0.63	28.76 ± 4.10	28.75 ± 4.10
1	Forestière	5.96 ± 0.55	0.19 ± 0.03	16.30 ± 2.55	29.80 ± 2.75	29.80 ± 2.75
1	Sandwich	6.61 ± 0.98	0.21 ± 0.02	15.59 ± 1.42	33.03 ± 4.87	33.03 ± 4.88
2	Témoin	6.07 ± 1.59	0.16 ± 0.04	19.57 ± 1.99	30.33 ± 7.95	30.33 ± 7.95
2	Terre	6.01 ± 0.79	0.16 ± 0.02	18.90 ± 0.59	30.08 ± 3.93	30.16 ± 4.08
2	Lasagne	60.26 ± 14.13	0.92 ± 0.1	32.46 ± 4.78	301.28 ± 70.65	302.21 ± 70.33
2	Forestière	48.999 ± 22.58	0.85 ± 0.19	27.56 ± 8.48	244.94 ± 112.9	245.57 ± 113.12
2	Sandwich	25.51 ± 9.25	0.55 ± 0.04	23.20 ± 8.63	127.555 ± 46.26	127.64 ± 46.24

5.2.2 Caractéristiques physiques du sol

5.2.2.1 Taux d'humidité du sol

L'analyse statistique du taux d'humidité du sol mesurée en date du 25 mai 2023 met en évidence des différences significatives entre le taux d'humidité des témoins non buttés, et celui des buttes sandwichs et en terre (Figure 16). Aucune différence significative n'apparaît entre le taux d'humidité des témoins non buttés, des buttes lasagnes et forestières, ainsi qu'entre les buttes lasagnes, forestières, sandwichs et en terre. De plus, aucune différence significative entre les moyennes n'est observée pour les humidités mesurées le 21 juin 2023 (Figure 17).

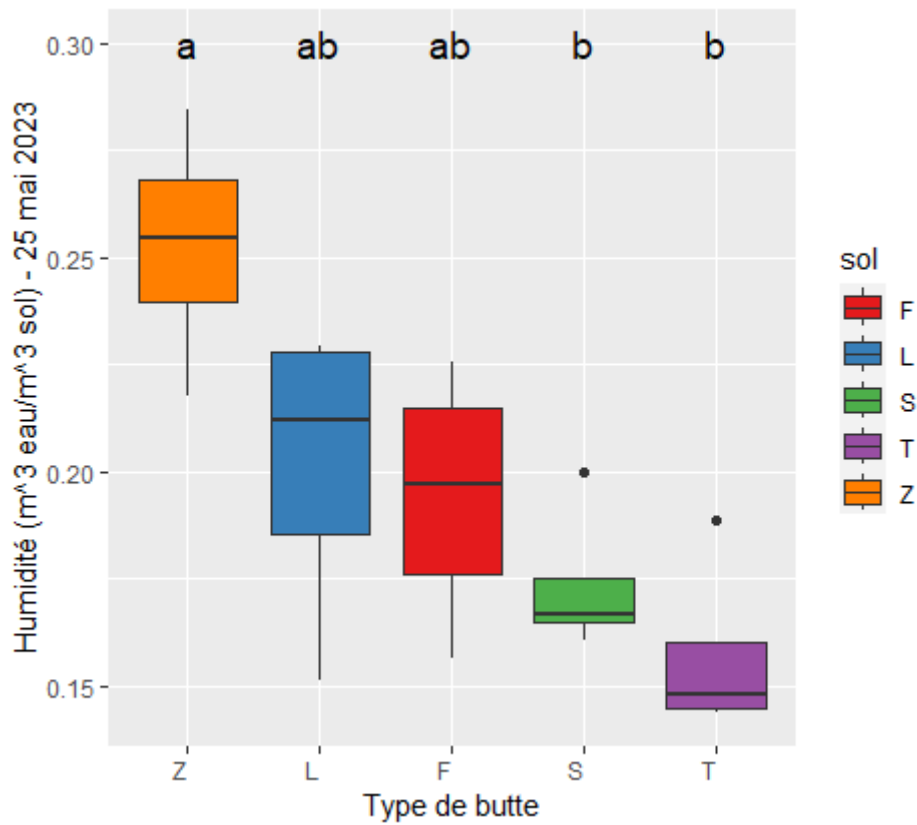


Figure 16: Taux d'humidité (en m^3/m^3) mesurés le 25 mai 2023 selon le type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: $\alpha = 0.05$).

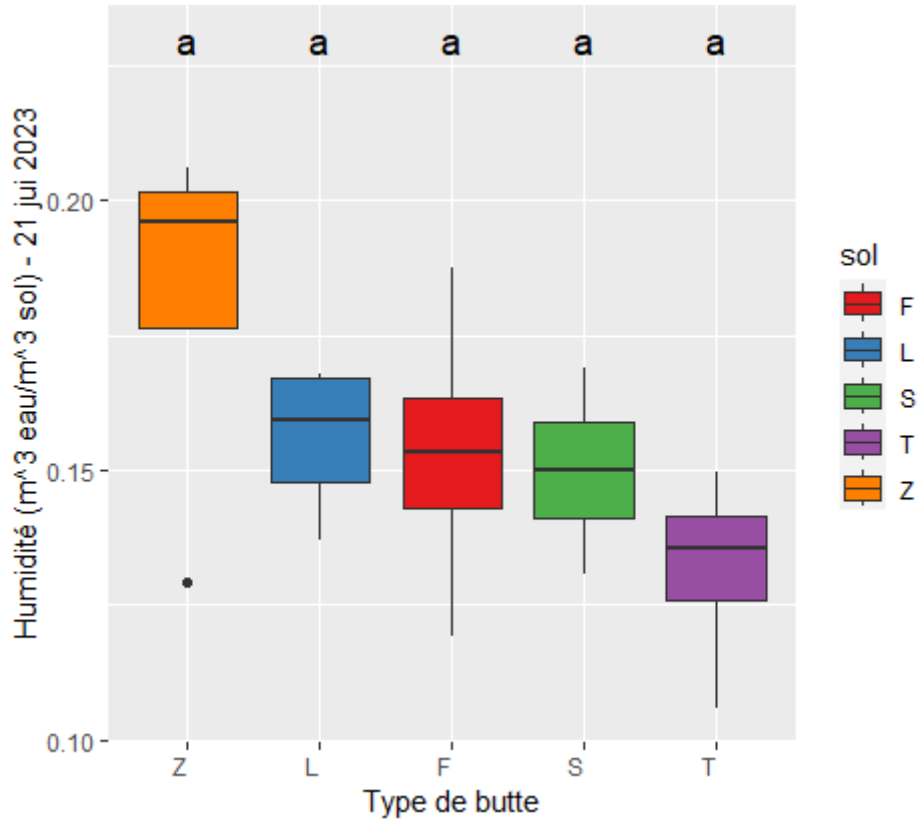


Figure 17: Taux d'humidité (en m^3 eau/ m^3 sol) mesurés le 21 juin 2023 selon le type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: $\alpha = 0.05$).

L'analyse statistique approfondie du taux d'humidité des sols des buttes mesuré le 25 mai, incluant les données spécifiques à chaque versant, permet de mettre en évidence une différence significative d'humidité entre le centre et les versants des buttes forestières, le centre étant plus sec. Des différences significatives sont également observées entre le centre et le versant nord-ouest des buttes sandwich et en terre (Figure 18). Pour les buttes lasagnes et les témoins non buttés, aucune différence significative d'humidité n'apparaît entre le centre et les versants des buttes.

Concernant l'humidité mesurée au centre des buttes, le témoin non butté possède une humidité significativement plus élevée que les buttes sandwichs et en terre. L'humidité du centre des buttes lasagnes et forestières n'est pas significativement inférieure à celle mesurée au centre des témoins non buttés.

Quant au versant nord-ouest, le témoin non butté présente une humidité significativement supérieure à celle de la butte en terre. L'humidité dans les buttes sandwichs, lasagnes et forestières ne sont pas significativement inférieures à celle des témoins non buttés, ni significativement supérieure à celle des buttes en terre.

Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les différents types de buttes pour le versant sud-est.

De façon générale, le centre des buttes a tendance à être plus sec que les versants et les témoins non buttés ont tendance à posséder un taux d'humidité plus élevé que les autres types de buttes.

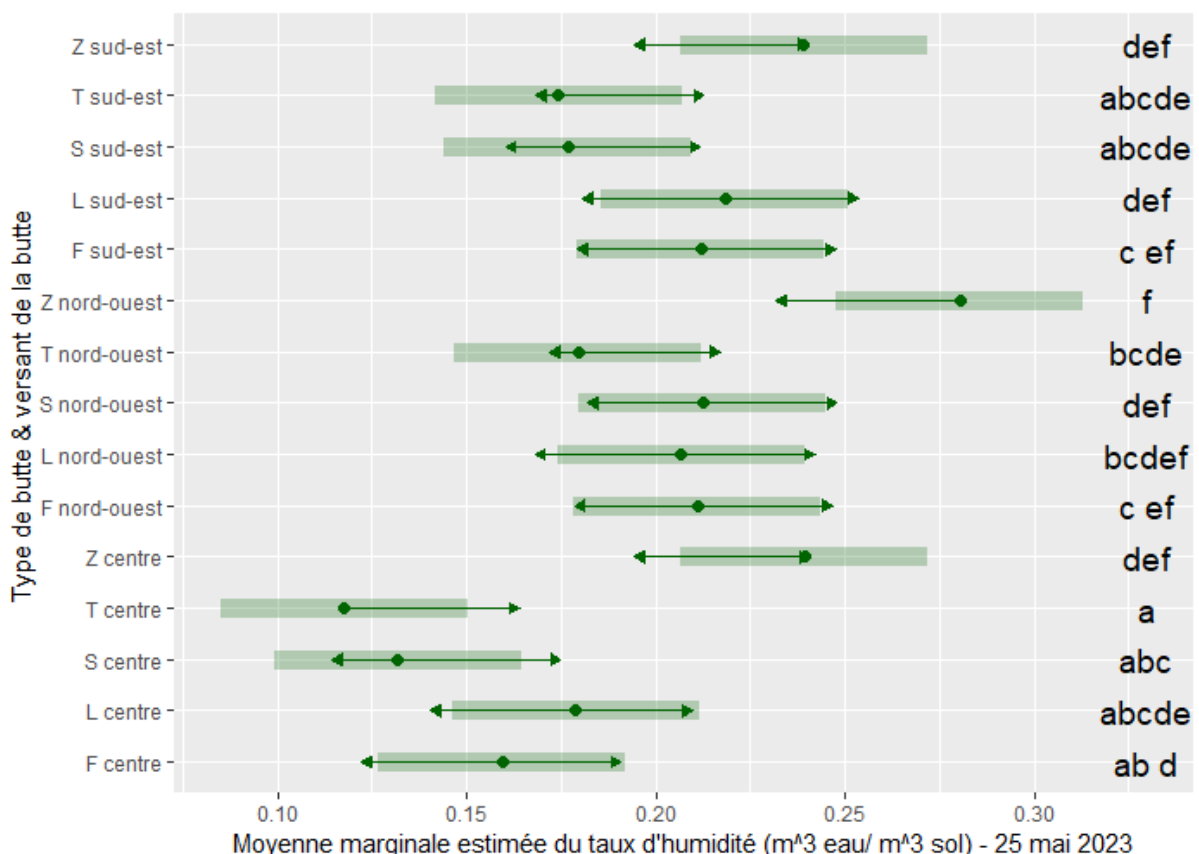


Figure 18: Taux d'humidité selon le versant et le type de butte le 25 mai 2023. Des lettres différentes indiquent que les moyennes marginales sont significativement différentes (niveau de significativité: $\alpha = 0,05$).

5.2.3 Caractéristiques biologiques du sol

5.2.3.1 Taux d'émission de CO₂

L'analyse statistique du taux d'émission de CO₂ selon le type de butte et l'horizon de sol met en évidence une différence significative entre l'horizon 1 et 2 pour les buttes lasagnes et forestières, l'horizon 2 émettant plus de CO₂. Les autres types de buttes ne présentent pas de différence significative de taux d'émission de CO₂ entre l'horizon 1 et l'horizon 2.

Au sein des échantillons de sols d'horizon 1, les buttes sandwichs présentent un taux d'émission de CO₂ significativement supérieur à celui des autres types de buttes. Ces dernières n'étant pas significativement différentes entre elles.

Concernant l'horizon 2, les buttes sandwichs présentent un taux d'émission de CO₂ significativement supérieur à celui des témoins non buttés et des buttes lasagnes et en terre. De plus, les buttes forestières possèdent un taux d'émission de CO₂ significativement supérieur à celui des buttes en terre en horizon 2 (Figure 19). Les buttes sandwichs et forestières ne sont pas significativement différentes quant à leur taux d'émission de CO₂, il en est de même des témoins non buttés et des buttes lasagnes et en terre.

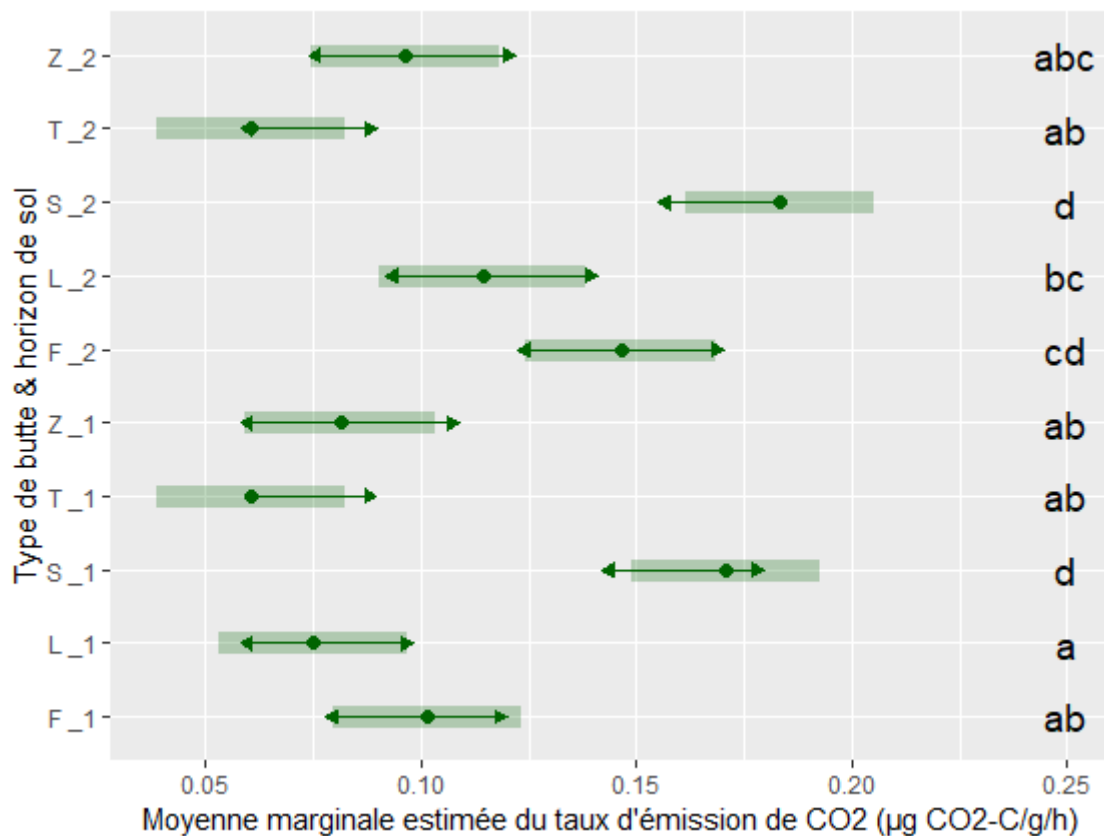


Figure 19: Taux d'émission de CO₂ selon le type de butte et l'horizon de sol. Des lettres différentes indiquent que les moyennes marginales sont significativement différentes (niveau de significativité: $\alpha = 0,05$).

5.2.3.2 Biomasse microbienne carbonée du sol

L'analyse statistique de la biomasse microbienne carbonée de l'horizon 2 des différents types de buttes met en évidence une masse de carbone microbien significativement supérieure dans les buttes lasagnes que dans les témoins non buttés (Figure 20). Aucune différence significative de biomasse microbienne carbonée n'est identifiée entre les buttes lasagnes, forestières, en terre et sandwichs, ainsi qu'entre les buttes forestières, en terre et sandwichs et les témoins non buttés.

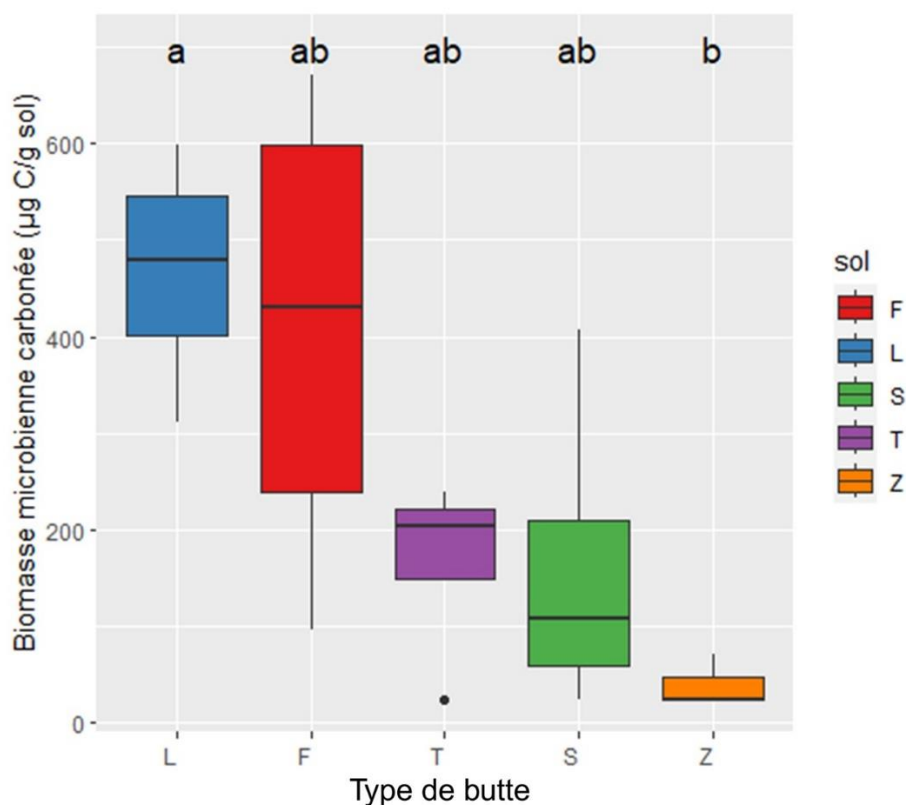


Figure 20: Biomasse microbienne carbonée (en $\mu\text{g C/g sol}$) selon le type de butte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes (niveau de significativité: $\alpha = 0.05$).

5.2.3.3 Quantité de gènes bactériens et fongiques du sol

L'analyse statistique de la quantité de gènes bactériens permet de mettre en évidence une différence significative entre les horizons de sol 1 et 2 pour les buttes sandwichs et forestières, l'horizon 2 étant dans ces modalités plus riche en bactéries que l'horizon 1. Aucune différence significative dans la quantité de gènes d'origine bactérienne n'est identifiée entre l'horizon 1 et 2 des buttes lasagnes, en terre et des témoins non buttés.

De plus, l'horizon 2 des sols des buttes sandwichs, lasagnes et forestières possède significativement plus de bactéries que celui des témoins non buttés et des buttes en terre (Figure 21). En horizon 1, aucune différence significative dans la quantité de gènes d'origine bactérienne n'est identifiée entre les différents types de buttes.

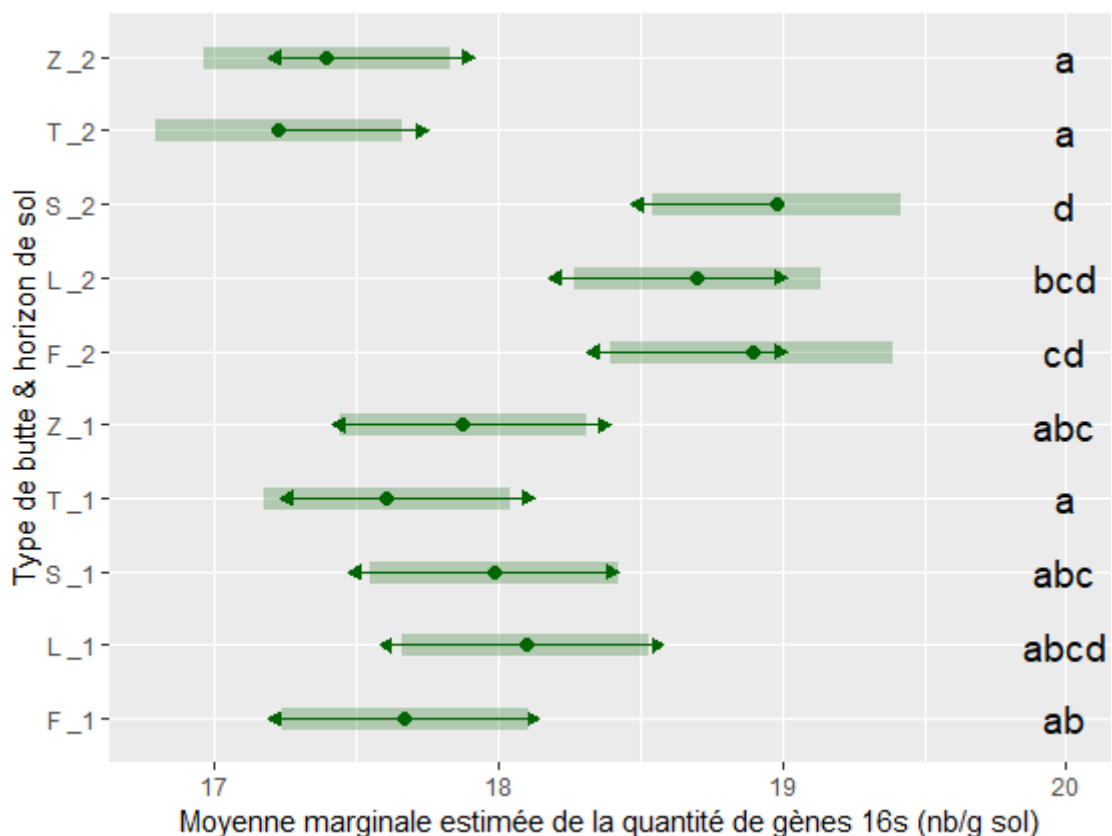


Figure 21: Quantité de bactéries du sol par type de butte et horizon de sol. Des lettres différentes indiquent que les moyennes marginales sont significativement différentes (niveau de significativité utilisé : $\alpha = 0,05$).

L'analyse statistique de la quantité de gènes fongiques permet de mettre en évidence une différence significative entre les horizons de sol 1 et 2 pour les buttes lasagnes et forestières, l'horizon 2 étant plus riche en champignon que l'horizon 1. Aucune différence significative dans la quantité de gènes d'origine fongique n'est identifiée entre l'horizon 1 et 2 des buttes sandwichs, en terre et des témoins non buttés.

Malgré l'absence de différence significative entre l'horizon 2 des différents types de buttes, les sols des buttes en terre et des témoins non buttés ont tendance à être plus pauvres en champignons que l'horizon 2 des autres types de buttes (Figure 22). En horizon 1, aucune différence significative dans la quantité de gènes fongiques n'est identifiée entre les différents types de buttes.

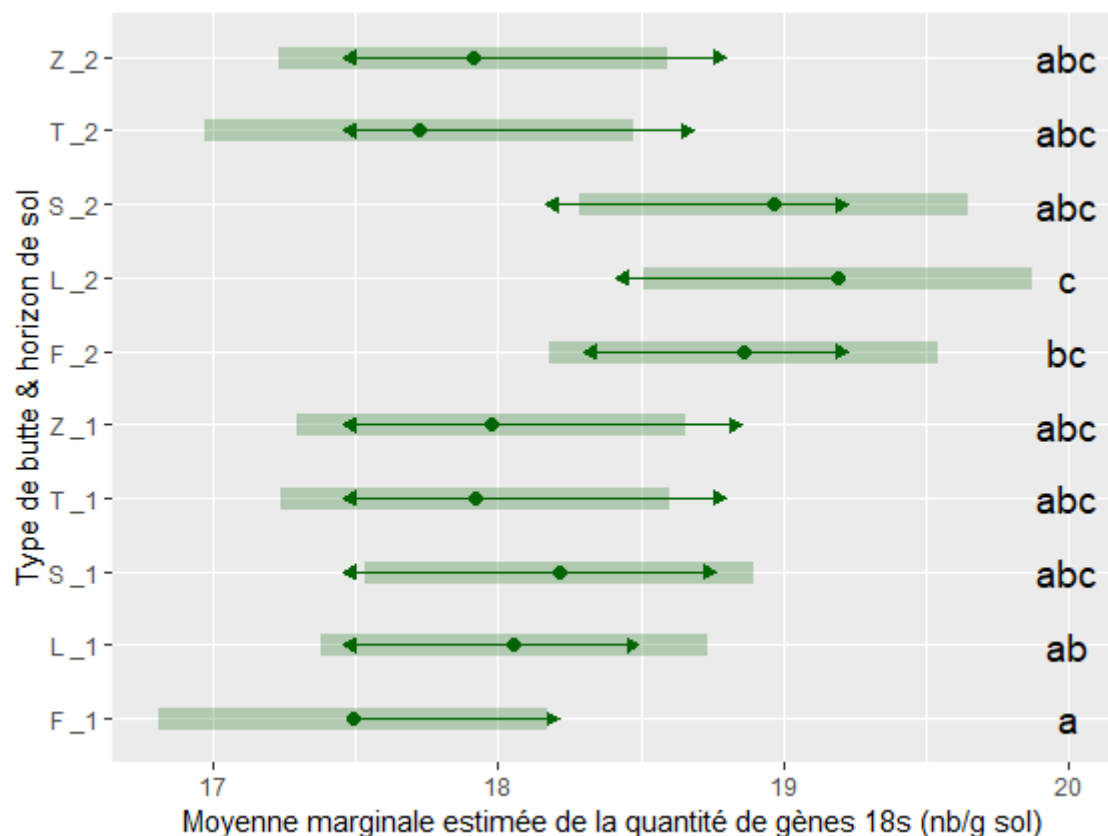


Figure 22: Quantité de champignons du sol par type de butte et horizon de sol. Des lettres différentes indiquent que les moyennes marginales sont significativement différentes (niveau de significativité utilisé : $\alpha = 0,05$).

Les moyennes des quantités de gènes bactériens (16 s) et fongiques (18 s) sont reprises dans le Tableau 5. L'horizon 1 des témoins non buttés et des buttes en terre possède une quantité totale plus élevée de bactéries et de champignons que l'horizon 2, au contraire des buttes sandwichs, lasagnes et forestières qui présentent une tendance inverse. De plus, dans l'ensemble des buttes, il y a plus de champignons que de bactéries, et ce pour les horizons 1 et 2, à l'exception de l'horizon 1 des buttes forestières qui possède plus de bactéries. Un rapport 18s : 16 s (Champignons:Bactéries) inférieur à 1 signifie que le sol contient davantage de bactéries et vice-versa pour un rapport supérieur à 1.

Tableau 5: Moyennes des quantités de gènes bactériens (16 s) et fongiques (18 s) repris pour chaque horizon de sol et par type de butte. La couleur verte indique des quantités plus élevées et la rouge, des quantités plus faibles.

Horizon de sol	Quantité de gènes (nb/g sol)	Témoïn non butté	Terre	Sandwich	Lasagne	Forestière
1	16 s	6.74E+07 ± 4.17E+07	4.62E+07 ± 1.47E+07	6.81E+07 ± 2.48E+07	7.39E+07 ± 1.90E+07	4.97E+07 ± 1.91E+07
1	18 s	7.97E+07 ± 5.12E+07	6.63E+07 ± 2.92E+07	8.56E+07 ± 2.93E+07	8.31E+07 ± 5.54E+07	4.25E+07 ± 1.73E+07
1	18s:16s	1.18	1.44	1.26	1.12	0.86
1	16s+18s	1.47E+08	1.13E+08	1.54E+08	1.57E+08	9.22E+07
2	16 s	3.98E+07 ± 2.13E+07	3.14E+07 ± 8.94E+06	1.85E+08 ± 6.80E+07	1.49E+08 ± 6.88E+07	1.28E+08 ± 8.32E+07
2	18 s	8.59E+07 ± 8.45E+07	4.62E+07 ± 5.78E+07	1.99E+08 ± 1.06E+08	2.33E+08 ± 8.84E+07	1.64E+08 ± 6.46E+07
2	18s:16s	2.16	1.47	1.08	1.56	1.28
2	16s+18s	1.26E+08	7.76E+07	3.84E+08	3.82E+08	2.92E+08

6 Discussion

Concernant les résultats des analyses chimiques, les importantes différences observées entre les horizons 1 et 2 des buttes lasagnes, forestières et sandwich valident la technique d'échantillonnage de sol et de séparation en horizons que nous avons utilisée. Il semblerait que cette technique s'étant basée sur des critères visuels tels que la couleur du sol, indicateur de la teneur en matière organique (Toky, 2011), a bien permis de séparer l'horizon « substrat » plus riche en MO de l'horizon « sol » plus pauvre en MO. Aucune différence de ce type entre les horizons 1 et 2 n'a été observée pour les buttes en terre et les témoins non buttés, ce qui pourrait s'expliquer par la composition homogène de ces types de buttes.

Les analyses chimiques des sols des différents types de buttes révèlent par ailleurs des teneurs en éléments biodisponibles supérieures aux teneurs de la zone de référence. Il semblerait donc qu'aucune modalité ne présente de déficience en éléments nutritifs disponibles pour les plantes. Cette observation va dans le sens des résultats obtenus pour les biomasses produites de l'ensemble des cultures, à l'exception de la biomasse fraîche en épinards des témoins non buttés, significativement supérieure à celle des buttes sandwichs.

Les teneurs en éléments biodisponibles, supérieures à la gamme de référence dans les buttes en terre et dans les témoins non buttés, pourraient s'expliquer par la provenance de la terre les constituant. En effet, le sol de ces buttes est relativement riche, provenant de prairies et de vergers. De plus, les cultures pratiquées sur ces buttes durant les trois années d'expérimentation écoulées n'étaient pas intensives, préservant donc la fertilité du sol. Un entretien de cette dernière a également eu lieu avec des apports via la biomasse racinaire, l'implantation d'engrais vert chaque automne (moutarde et vesce d'hiver) et l'ajout de paillage en fin de saison culturale.

Les résultats du dosage de carbone organique en horizon 2 des buttes sandwichs sont plus faibles que ceux des buttes lasagnes et forestières. Au vu de la composition des buttes sandwichs et des résultats obtenus pour l'ensemble des indicateurs de fertilité étudiés dans ce type de butte, les teneurs en carbone organique ne correspondent pas aux attentes. Un tamisage à 2 mm ayant été opéré avant la réalisation des analyses chimiques au laboratoire de La Hulpe, il se pourrait que les résultats soient biaisés dû au retrait des fragments de bois non décomposés, fort présents dans le sol échantillonné des buttes sandwichs. Néanmoins, les données de carbone organique obtenues pour ce type de butte pourraient fournir des informations concernant la quantité de carbone organique rapidement minéralisable, puisque les fragments déjà bien décomposés sont passés à travers le tamis.

Contrairement aux situations de 2021 et 2022, et à l'exception de la culture d'épinards pour laquelle les buttes sandwichs sont significativement moins productives que les témoins non buttés, les buttes sandwichs ne sont pas significativement moins productives que les autres types de buttes, malgré leur tendance à présenter de plus faibles rendements. Il semblerait donc que les problèmes de faim d'azote, dans le sol de ces buttes, observés les années précédentes aient disparu en 2023. La matière carbonée constituant les buttes sandwichs est principalement composée de bois raméal fragmenté ayant un rapport C/N pouvant aller de 60 à 150 selon le type de bois et le diamètre des fragments. La multiplication microbienne ayant été stimulée par l'apport important de carbone organique, les microorganismes ont dans un premier temps immobilisé l'azote inorganique nécessaire à leur croissance, le rendant indisponible pour les plantes (Passicousset et al., 2021). Cependant, l'azote étant relâché suite

à la mort des microorganismes, ce phénomène de faim d'azote est temporaire (Chabalier et al., 2003), la durée de l'appauvrissement pouvant varier selon les matériaux apportés, la profondeur d'enfouissement ou encore les conditions pédoclimatiques (Triple performance, n.d.).

La productivité des témoins non buttés pour la culture d'épinards, et les tendances des témoins et des buttes lasagnes à être les plus productifs pour la majorité des cultures, ne sont à priori pas liées à la composition chimique des sols, comme discuté ci-dessus. Par ailleurs, les analyses statistiques des biomasses fraîches et sèches d'épinards dans les témoins non buttés ne vont pas dans le même sens. Cela pourrait s'expliquer par le taux d'humidité relevé plus élevé dans ces types de buttes, la teneur en eau des légumes et par conséquent le rendement étant lié à la quantité d'eau fournie à la plante (Giouvanis et al., 2018; Mollier, 2022), ou par d'autres paramètres telle que la température du sol. En effet, Giouvanis et al. (2018) ont montré qu'entre une irrigation à 75% et à 100% du besoin en eau journalier, les biomasses sèches étaient similaires au contraire des biomasses fraîches. Ceci pourrait expliquer les différences significatives observées pour les rendements en biomasse fraîche des témoins non buttés, alors que non observées en biomasse sèche. Le nombre limité de plants échantillonnés pour définir la biomasse sèche de chaque modalité pourrait également introduire un biais dans les résultats et expliquer l'absence de différence significative. Il serait par conséquent intéressant de considérer un échantillonnage plus large dans les années à venir.

Dans les conditions pédoclimatiques de cet essai et en date du 25 mai, les buttes sandwiches et les buttes en terre sont significativement plus sèches que les témoins non buttés. Sachant que les buttes en terre et les témoins non buttés possèdent une composition identique, la forme en dôme de la butte en terre semblerait faciliter son dessèchement, ce que Morez (1992) a également observé. Comme discuté précédemment, le taux d'humidité de la butte pourrait influencer le rendement, étant donné que les biomasses produites sur les buttes en terre ont tendance à être plus faibles que celles des témoins non buttés. Concernant les buttes sandwiches, le besoin plus faible en arrosage qu'en agriculture classique énoncé par Morez (n.d.) ne semble pas être confirmé dans cet essai.

Les buttes sandwiches, lasagnes et forestières ont tendance à être plus humides que les buttes en terre, cela est probablement dû à leur composition plus riche en MO. En effet la MO possède une capacité de rétention d'humidité élevée, contribuant à l'amélioration de la capacité de rétention en eau disponible du sol (Libohova et al., 2018). Malgré cela, ces buttes riches en MO ont tendance à être plus sèches que le témoin non butté, vraisemblablement en raison d'une température interne plus élevée et d'une prise au vent plus importante.

De façon générale, il semblerait que le sommet des buttes ait tendance à être plus sec que les versants. Cette observation va dans le même sens que celle de Morand (2022), qui relève la base des buttes forestières comme plus humide. Les vents dominants venant du sud-ouest en Belgique (IRM, 2023a) pourraient expliquer l'assèchement principal du sommet des buttes, ces dernières étant installées parallèlement aux vents dominants dans l'axe NE-SO. À contrario, les données d'humidité des témoins non buttés s'avèrent assez homogènes probablement par la forme plane de ceux-ci qui diminue leur prise au vent.

Aucune différence significative n'a été identifiée entre les relevés d'humidités du 21 juin, contrairement à ceux du 25 mai. Cela pourrait s'expliquer par les régimes de précipitations précédant ces deux dates. En effet, en mai, les dernières précipitations journalières recensées par l'IRM avant la prise de mesures ont été de 12.5 mm le 12 mai et de 1 mm le 15 mai, alors qu'en juin elles ont été de 14 mm en date du 20 juin (IRM, 2023b). Le 25 mai, les relevés d'humidité ayant été réalisés à la suite d'une période sèche, les résultats obtenus informeraient sur la capacité de rétention en eau des différents types de buttes sans apport régulier en eau. La similarité des taux d'humidité entre les modalités, relevés en date du 21 juin, pourrait s'expliquer par la proximité temporelle de la prise de données avec des précipitations, l'ensemble des buttes étant encore assez humides.

Les valeurs d'émissions de CO₂ obtenues dans ce travail vont de 0.05 à 0.20 µg CO₂-C/g/h. Ces valeurs sont cohérentes avec celles de la littérature. En particulier, Vincent et al. (2019) ont mesuré la respiration potentielle de plusieurs sols en Wallonie et ont enregistré des gammes de valeurs allant de 0.15 en agriculture conventionnelle à 0.4 µg CO₂-C/g/h en agriculture de conservation. Ces valeurs sont, de manière surprenante, supérieures à celles de notre étude, attendues comme similaires à celles obtenues dans des sols en agriculture de conservation. De fait, les sols des buttes de style permacole s'apparentent davantage aux sols retrouvés en agriculture de conservation. Cependant, la méthode de mesure en conditions définies utilisée par Vincent et al. (2019) est différente de celle utilisée dans ce travail. De plus, d'autres différences dans les protocoles suivis pourraient expliquer ces variations. En effet, un ajustement de l'humidité du sol à 60% de la capacité maximale de rétention en eau a été réalisé dans l'étude de Vincent et al. (2019), alors que cet ajustement a été fixé à 30% dans ce travail. Enfin, la variabilité saisonnière de la respiration microbienne est à prendre en considération, sachant que les prélèvements de sols pour ce travail ont été opérés le 2 mai et que Vincent et al. (2019) ont montré des variations dans la respiration potentielle au cours de la saison culturale, les valeurs mesurées étant plus faibles en avril qu'en juin et en août.

La butte en terre et le témoin non butté présentent des taux d'émission de CO₂ de même ordre de grandeur en horizon 1 et 2, traduisant une respiration microbienne similaire dans les deux horizons de sol étudiés. Cette observation pourrait s'expliquer par la composition assez homogène de ces types de buttes, au contraire des buttes forestières et lasagnes, de nature assez hétérogène (Figure 3).

L'horizon 2 des buttes forestières et lasagnes présente un taux d'émission de CO₂ significativement supérieure à celle de leur horizon 1 respectif. La masse élevée de carbone organique en horizon 2 de ces buttes pourrait expliquer le taux d'émission de CO₂ plus intense dans cet horizon, Creamer et al. (2015) ayant montré que la respiration microbienne dépend principalement de la teneur en carbone organique du sol, ce que Vincent et al. (2019) nuance par la disponibilité des fractions carbonées.

Au contraire des buttes lasagnes et forestières, les buttes sandwichs ne présentent pas de différence significative dans les taux de CO₂ émis en horizons 1 et 2. Au vu de la teneur en carbone organique plus importante en horizon 2 et de l'étude de Creamer et al. (2015), un taux d'émission de CO₂ plus important était attendu en horizon 2. Plusieurs hypothèses sont émises quant à cette observation. Premièrement, les branchages et le bois raméal fragmenté constituant l'horizon 2 de ces buttes représentent des MO plus résistantes à la décomposition, notamment liée à la présence de composés phénoliques provenant du duramen et de la lignine du bois (Laroche et al., 1993). Il est plausible de penser que la minéralisation en

horizon 2 des buttes sandwichs n'a pas encore atteint son maximum et ne devrait qu'augmenter au fur et à mesure de l'avancée du travail de décomposition de la MO par les microorganismes du sol. Cette MO, bien que plus abondante qu'en horizon 1, n'est actuellement pas encore suffisamment décomposée pour être minéralisée en grande quantité, au contraire de celle présente en horizon 1, aboutissant à des taux d'émission de CO₂ similaires dans les deux horizons. La seconde hypothèse repose sur de possibles conditions anoxiques en horizon 2, induisant une faible minéralisation de la matière organique suite à la réduction de l'activité microbienne aérobie (Bastviken et al., 2003).

En horizon 2, le taux d'émission de CO₂ des buttes sandwichs est significativement supérieur à celui des buttes lasagnes, en terre et des témoins non buttés. Pour les buttes en terre et les témoins non buttés, cette observation va dans le même sens que celle de Creamer et al. (2015), la teneur en carbone organique de l'horizon 2 de ces buttes étant bien inférieure à celle des buttes sandwichs. Or, ce n'est pas le cas des buttes lasagnes, celles-ci présentant une teneur en carbone organique assez élevée en horizon 2. Afin de comprendre cet écart avec la littérature, il serait intéressant de considérer la résistance des MO face à la décomposition et la minéralisation. De fait, des études avancent que le temps de résidence des MO dans les sols dépend de l'adsorption de ces MO dans les agrégats du sol, les protégeant d'une décomposition plus poussée (Chenu et al., 2000; Lehmann et al., 2015). Pascaud et al. (2017) ont par ailleurs montré que divers paramètres tels que le pH, la structure de la MO, la texture du sol et sa toxicité envers les microorganismes influençaient l'effet protecteur des technosols sur la dégradation des matières organiques du sol.

Il serait donc plausible de penser que les conditions pédologiques des buttes lasagnes favoriseraient davantage la formation d'agrégats protégeant physiquement les MO du sol. Ces MO sont par conséquent moins accessibles par les microorganismes pour la minéralisation (Jean-François, 2009). Cela pourrait expliquer le plus faible taux d'émission de CO₂ dans les buttes lasagnes malgré les teneurs élevées en carbone organique. Cela montre qu'il serait préférable de se fier à la disponibilité des fractions carbonées présentes dans le sol afin d'en estimer la minéralisation, les teneurs en carbone organique ne semblant dans ce cas pas fournir une information assez fiable quant au taux d'émission de CO₂ attendu.

Malgré les compositions identiques de l'horizon 1 de l'ensemble des buttes lors de leur création, le taux d'émission de CO₂ des buttes sandwichs en horizon 1 est significativement supérieur à ceux des autres types de buttes. Cette observation n'allant pas dans le sens de la littérature précédemment introduite à ce sujet, elle pourrait éventuellement s'expliquer par une remontée des communautés microbiennes actives, fort présentes en horizon 2 de ce type de butte.

Les données de biomasse microbienne carbonée obtenues dans ce travail sont pour la plupart en cohérence avec celles recueillies par Vincent et al. (2019), donnant des gammes de biomasses microbiennes de sols en Wallonie allant de 220 à 550 µg C/g sol. Néanmoins, certaines données s'éloignent fortement des gammes de valeurs en Wallonie. Ceci pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité des sols engendrant une variabilité parmi les échantillons et par la nature des sols créés, ceux-ci étant fort différents des sols agricoles.

Les buttes lasagnes présentent une biomasse microbienne carbonée significativement supérieure à celle des témoins non buttés. Selon Vincent et al. (2019), un apport de MO peut

contribuer à l'augmentation de la biomasse microbienne, ce qui s'observe ici puisque l'horizon 2 des buttes lasagnes est plus riche en MO que celui des témoins non buttés (Tableau 4).

Par ailleurs, il semblerait que les résultats de ce travail ne rejoignent que partiellement l'affirmation de Vincent et al. (2019), selon laquelle la biomasse microbienne renseigne sur la quantité et l'activité des microorganismes. En effet, la quantité de gènes bactériens et fongiques de l'horizon 2 des buttes lasagnes suit la même tendance que la biomasse microbienne carbonée élevée de ce type de butte, ce qui n'est pas le cas de son taux d'émission de CO₂. Cette constatation relative à la minéralisation peut s'expliquer par la composition des communautés microbiennes, variant selon les conditions pédologiques et environnementales, autant dans leurs fonctions qu'en vitalité métabolique (Lafolie et al., 2004). Ces variations de communautés microbiennes ne permettraient donc pas d'estimer systématiquement l'activité de minéralisation avec les données de biomasse microbienne ou sur base des quantités de gènes d'origine bactérienne et fongique (Wang et al., 2003).

Les résultats mettent en évidence un total bactéries-champignons ayant tendance à être plus important en horizon 1 qu'en horizon 2 pour les témoins non buttés et les buttes en terre, alors que pour les buttes sandwiches, lasagnes et forestières, ce total est plus important en horizon 2. Cette observation pourrait être justifiée par les compositions différentes des horizons des buttes. En effet, la couverture de surface de l'ensemble des buttes, constitué de lombricompost, de terre de surface et de paillis de miscanthus (Figure 3), représente une source de matière organique additionnelle pour les témoins non buttés et les buttes en terre. Alors que les buttes lasagnes, forestières et sandwiches possèdent davantage de MO en horizon 2. Cette hypothèse est soutenue par le pourcentage d'azote total et la teneur en carbone organique supérieurs dans les horizons présentant un total bactéries-champignons plus élevé. Le laboratoire d'analyses agricoles de La Hulpe considère des teneurs en carbone organique de l'ordre de 43 g/kg de sol comme excellentes, et un sol présentant un pourcentage de 0.19 d'azote total comme normalement pourvu. Par conséquent, les quantités de gènes bactériens et fongiques obtenues pourraient être justifiées par les teneurs élevées en azote et carbone organique puisque Semenov et al. (2019) ont mis en évidence une relation linéaire entre le contenu en carbone organique et en azote total du sol, et le nombre de cellules métaboliquement actives telles que les bactéries et les champignons.

Par ailleurs, au vu du taux d'émission de CO₂ similaire en horizon 1 et 2 pour les buttes en terre et les témoins non buttés, la quantité de microorganismes dans ces buttes ne témoignerait pas directement de la minéralisation dans ces buttes.

L'analyse statistique révèle des quantités de gènes d'origine bactérienne en horizon 2 des buttes sandwiches, lasagnes et forestières, significativement supérieures à celles retrouvées en horizon 2 des témoins non buttés et des buttes en terre. La même tendance est retrouvée pour les quantités de gènes d'origine fongique, sans néanmoins présenter de différence significative. Étant donné les pourcentages en azote total et les teneurs en carbone organique plus élevés en horizon 2 des buttes sandwiches, lasagnes et forestières qu'en horizon 2 des témoins non buttés et des buttes en terre, cela pourrait expliquer le nombre plus important de microorganismes dans les buttes plus riches en matière organique. Ce raisonnement va dans le sens de l'étude de Semenov et al. (2019), comme discuté précédemment. Ces résultats sont également cohérents avec ceux des biomasses microbiennes carbonées, qui sont

significativement supérieures dans les buttes lasagnes que dans les témoins non buttés (Figure 20).

Les rapports champignons:bactéries obtenus dans ce travail, allant de 0.86 à 2.16, sont cohérents avec ceux de Fierer et al. (2005), obtenus par PCR quantitative, allant de 0.5 à 3.7 pour des sols prairiaux et forestiers. La majorité des buttes présentent un rapport C:B légèrement supérieur à 1, signifiant qu'il y a davantage de champignons que de bactéries dans les sols étudiés et qu'il existe un certain équilibre entre les communautés fongiques et bactériennes d'un point de vue quantitatif. Les champignons étant capables de décomposer la lignine (Derrien, 2017), au contraire des bactéries, une abondance de champignons était attendue dans les buttes sandwiches constituées de matières organiques plus riches en lignine telles que le bois raméal fragmenté, ce qui n'a pourtant pas été observé. De plus, selon Wang, Zhang, et al. (2019), des rapports C/N élevés devraient augmenter l'abondance relative des champignons, la biomasse fongique présentant un rapport C/N plus important que la biomasse bactérienne. Cette relation entre le rapport C/N et le rapport C:B n'a pas été observée dans ce travail. Ceci pourrait s'expliquer par le temps nécessaire aux communautés microbiennes pour se mettre en place à la suite de la création des sols des buttes il y a trois ans. Il serait encore trop tôt dans le cycle biologique des sols pour prétendre à des compositions microbiennes ayant atteint l'équilibre.

Il est intéressant de prendre en considération la nature des sols des buttes de style permacole, qualifiés de technosols, se rapprochant de sols forestiers de par leurs propriétés mais étant à vocation agricole. En effet, identifier la structure des sols étudiés constitue une étape cruciale dans la compréhension de leur fonctionnement et de leur aptitude à soutenir la vie biologique (Deeb, 2020). Les références issues de la littérature se basant principalement sur des sols forestiers ou agricoles, ceci pourrait expliquer les divergences entre ce qui est observé dans ce travail et dans la littérature.

7 Conclusions et perspectives

Dans la continuité des précédents travaux entrepris depuis 2021 afin de comparer la fertilité du sol de différents types de buttes d'inspiration permacole, ce présent travail s'est focalisé plus spécifiquement sur la composante biologique de cette fertilité. Il a dès lors participé à la poursuite de cette étude sur le long terme.

Ainsi, les sols de quatre types de buttes et d'un témoin de terre non butté, ont été analysés par le biais d'indicateurs de fertilité. Le rendement a également été évalué par quantification de la biomasse végétale aérienne produite.

À la suite de l'analyse des résultats de la biomasse végétale produite, il en ressort qu'aucune différence significative n'a été observée entre les buttes permacoles et le témoin non butté, à l'exception de la culture d'épinards pour laquelle la culture sur sols non buttés apparaît comme plus productive que celle pratiquée sur les buttes sandwiches.

Cependant, concernant les analyses chimiques, la majorité des paramètres étudiés présentent quant à eux des valeurs supérieures dans l'horizon « substrat » des buttes lasagnes, sandwiches et forestières, semblant ainsi témoigner de l'influence positive de la teneur en matière organique sur la fertilité chimique des sols.

De plus, les mesures d'humidité réalisées fournissent des informations quant à l'influence de la forme en dôme des buttes sur leur dessèchement, les témoins en terre non buttés étant significativement plus humides que les buttes en terre.

Enfin, les analyses biologiques montrent que les horizons « substrat » des buttes plus riches en MO présentent des communautés microbiennes généralement plus abondantes et plus actives.

Après trois années de culture, les buttes de style permacole ne semblent donc pas présenter des rendements supérieurs à ceux des sols non buttés. La production végétale allant de pair avec la fertilité des sols, un suivi annuel des cultures et des indicateurs utilisés dans ce travail est encore nécessaire pendant plusieurs années consécutives afin d'identifier les éventuels effets bénéfiques de la culture sur buttes permanentes sur le long terme.

De plus, l'analyse des formes d'azote présentes dans les sols ainsi que la détermination de la minéralisation nette de l'azote fourniraient des renseignements instructifs quant à la disponibilité de l'azote pour les plantes et son immobilisation par la biomasse microbienne.

Par ailleurs, afin de minimiser les éventuels biais dans les résultats des analyses chimiques liés au tamisage des échantillons, il serait recommandé d'envisager le broyage préalable de ceux-ci.

Les analyses chimiques et biologiques réalisées dans ce travail révèlent l'influence de la composition des buttes sur les propriétés du sol et sur les communautés microbiennes présentes.

Afin de comprendre au mieux la dynamique microbienne et d'en évaluer l'évolution dans les technosols étudiés, il serait dans un premier temps intéressant d'approfondir les analyses de biomasse microbienne en procédant également à la quantification de l'azote microbien. Les résultats obtenus permettront d'établir le rapport C_{mic}/N_{mic} qui caractérise les communautés microbiennes en présence, les bactéries présentant un rapport C/N inférieur à celui des champignons. D'éventuels changements d'organismes dans la communauté peuvent être indiqués par des variations de ce rapport au fil du temps (Vincent et al., 2019).

Une quantification des bactéries et champignons présents dans les sols a tout de même été réalisée dans ce travail par PCR quantitative. Cet outil pourrait à l'avenir également être utilisé

pour lier le gène à la fonction microbienne, notamment à l'aide du gène *amoA*, afin de quantifier de façon spécifique les communautés microbiennes selon leurs traits fonctionnels et non plus phylogénétiques (Rotthauwe et al., 1997).

Au vu de l'hétérogénéité des sols, il serait nécessaire d'augmenter le nombre de répétitions lors des analyses, procurant ainsi des résultats plus fiables. D'un point de vue pratique, la PCR quantitative permet le traitement d'un plus grand nombre d'échantillons, au contraire de la fumigation-extraction utilisée pour quantifier la biomasse microbienne. Cette technique étant assez fastidieuse et chronophage, il serait judicieux, dans la mesure du possible, de l'automatiser partiellement.

De plus, l'installation permanente de sondes de mesure de teneur en eau et du potentiel hydrique, ainsi que des sondes de température, et ce à différentes profondeurs dans les buttes, permettrait d'approfondir les analyses.

Ce travail s'est principalement focalisé sur la vie microbienne du sol, contribuant à la compréhension des mécanismes sous-jacents à la fertilité des technosols étudiés.

Néanmoins, de par leur influence sur le fonctionnement du sol, il serait également intéressant d'étudier les lombrics qui font partie des macroorganismes clés du sol. A cet égard, une évaluation de leur densité dans chaque type de buttes serait pertinente.

Au vu des dynamiques de décomposition de la MO, et de formation et destruction des agrégats du sol, influencées par des conditions biotiques et abiotiques en constante évolution, il serait intéressant de continuer à suivre le taux d'émission de CO₂ de façon régulière afin d'avoir une vision temporelle de ce paramètre. À cela pourrait s'ajouter l'analyse de la distribution de la MO dans les agrégats du sol afin d'estimer la capacité des technosols à stocker le carbone organique sur le long terme, ainsi que la quantification du carbone soluble accessible aux microorganismes (de Tombeur et al., 2018; Vincent et al., 2019).

Par ailleurs, l'évaluation de l'activité enzymatique de la rhizosphère peut être une autre approche intéressante à également aborder afin d'indiquer la performance du potentiel du cycle des éléments, de la nitrification, de l'oxydation et d'autres processus vitaux intervenant dans la qualité du sol (Dick, 1994).

Les résultats obtenus au cours de ce travail, basés sur des prises de données ponctuelles, soulignent donc la nécessité de recherches continues pour parvenir à une compréhension approfondie des processus complexes prenant place dans les technosols étudiés.

8 Contribution personnelle

Au cours de ce travail de fin d'études, j'ai dans un premier temps collecté les échantillons de sol utilisés pour les analyses chimiques, de biomasse microbienne, de respiration microbienne et la quantification de gènes d'origine bactérienne et fongique. J'ai également effectué l'ensemble des analyses, hormis les analyses chimiques et procédé aux récoltes des légumes cultivés sur les buttes de style permacole. La collecte des données de biomasse végétale et le relevé des données d'humidité des sols ainsi que les analyses statistiques et l'interprétation des résultats ont été réalisés par mes soins. Enfin, j'ai rédigé ce rapport.

9 Bibliographie

- Amin B.A.Z., 2012. Rôle des enzymes lignocellulolytiques dans le processus de biodégradation de résidus végétaux dans les sols: Influence de la qualité des résidus sur l'efficacité des enzymes et leur dynamique.
- Araya T., Gebremedhin A., Baudron F., Hailemariam M., Birhane E., Nyssen J., Govaerts B. & Cornelis W., 2021. Influence of 9 years of permanent raised beds and contour furrowing on soil health in conservation agriculture based systems in Tigray region, Ethiopia. *LAND Degrad. Dev.* **32**(3), 1525–1539, DOI:10.1002/ldr.3816.
- Baize D., 2000. *Guide des analyses en pédologie*.
- Bastviken D., Olsson M. & Tranvik L., 2003. Simultaneous Measurements of Organic Carbon Mineralization and Bacterial Production in Oxic and Anoxic Lake Sediments. *Microb. Ecol.* **46**(1), 73–82, DOI:10.1007/s00248-002-1061-9.
- Bertozzi J., Andrade D.S., Oliveira C.C., Bala A. & Caviglione J.H., 2020. Microwave assisted biocidal extraction is an alternative method to measure microbial biomass of carbon from cultivated and non-cultivated soils. *Braz. J. Microbiol.* **51**(1), 255–263, DOI:10.1007/s42770-019-00186-z.
- Biron P. & Gilles Colinet, n.d. Carbone microbien.
- Cameron C., Campbell C.D., Davidson M.S. & Chapman S.J., 2017. MicroResp TM - Technical Manuel.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(6), 3593–3599, DOI:10.1128/AEM.69.6.3593-3599.2003.
- Chabalier P. & Saint Macary H., 2003. Valorisation des effluents d'élevage bovin à la Réunion : résultats de caractérisation. *Rumin. Élev. Valoris. Résumés Présent. Posters Symp. Régional Interdiscip. St-Denis La Réunion. 10-13 Juin 2003.* <https://agritrop.cirad.fr/527414/>, (25/07/2023).
- Chalker-Scott L., 2017. HUGELKULTUR: WHAT IS IT, AND SHOULD IT BE USED IN HOME GARDENS?
- Chambre d'agriculture Bourgogne-Franche-Comté, 2019. LA PERMACULTURE Une méthode de conception écologique et une tendance.
- Chenu C., Balesdent J. & Leclerc B., 2000. La protection physique et l'auto-protection des matières organiques du sol.
- Commission Européenne, 2002. COMMUNICATION DE LA COMMISSION AU CONSEIL, AU PARLEMENT EUROPÉEN, AU COMITÉ ÉCONOMIQUE ET SOCIAL ET AU COMITÉ DES RÉGIONS Vers une stratégie thématique pour la protection des sols.

- Commune de Ferney Voltaire, 2011. Guide pratique du potager synergique.
- Cosentino D., 2006. Contribution des matières organiques à la stabilité de la structure des sols limoneux cultivés. Effet des apports organiques à court terme.
- Cosentino D., Chenu C. & Le Bissonnais Y., 2006. Aggregate stability and microbial community dynamics under drying–wetting cycles in a silt loam soil. *Soil Biol. Biochem.* **38**(8), 2053–2062, DOI:10.1016/j.soilbio.2005.12.022.
- Creamer R., Stone D., Berry P. & Kuiper I., 2015. Measuring respiration profiles of soil microbial communities across Europe using MicroResp™ method. *Appl. Soil Ecol.* **97**, DOI:10.1016/j.apsoil.2015.08.004.
- de Tombeur F., Sohy V., Chenu C., Colinet G. & Cornelis J.-T., 2018. Effects of Permaculture Practices on Soil Physicochemical Properties and Organic Matter Distribution in Aggregates: A Case Study of the Bec-Hellouin Farm (France). *Front. Environ. Sci.* **6**.
- Deeb M., 2020. Influence des plantes, des vers de terre et de la matière organique sur la structure de technosols construits.
- Derrien D., 2017. Comprendre la dynamique des matières organiques des sols. In: *ONF - RenDez-Vous Techniques*. Presented at the 25 ans RENECOFOR.
- Dick R.P., 1994. Soil Enzyme Activities as Indicators of Soil Quality. In: *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. John Wiley & Sons, Ltd, 107–124.
- FAO, 2018. What is Conservation Agriculture? | Conservation Agriculture | Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/conservation-agriculture/overview/what-is-conservation-agriculture/en/>, (24/03/2023).
- Ferme expérimentale Au Petit Colibri, 2011. La démarche permaculturelle. *Ecolieu Au Petit Colibri - Ferme Expérimentale*. https://ecolieu-aupetitcolibri.fr/Permaculture/def_perma.html#diff_perma_culturebutte, (15/02/2023).
- Fernandez M., 2013. Structure et diversité des communautés microbiennes dans les sols urbains : existence d'une dynamique écologique ?
- Foudral M., 2011. Droit aux buttes. *Prise Terre*.
- Garcia C., Nannipieri P. & Hernandez T., 2018. The Future of Soil Carbon. In: *The Future of Soil Carbon*. Elsevier, 239–267.
- Gaudiaut T., 2022. Infographie: L'explosion urbaine dans le monde. *Stat. Infogr.* <https://fr.statista.com/infographie/26877/urbanisation-monde-evolution-part-de-la-population-urbaine-par-continent>, (14/04/2023).
- Gayán A., Nath D., Bhattacharyya B. & Dutta N., 2020. Assessment of soil quality indicators under rice ecosystem of Assam, India. *J. Environ. Biol.* **41**, 1655–1664, DOI:10.22438/jeb/41/6/SI-246.

- Genot V., Colinet G., Brahy V. & Bock L., 2009. L'état de fertilité des terres agricoles et forestières en région wallonne (adapté du chapitre 4 - sol 1 de « L'État de l'Environnement Wallon 2006–2007 »). *Biotechnol. Agron. Société Environ.* **13**.
- Genot V., Renneson M., Colinet G., Goffaux M.-J., Cugnon T., Toussaint B., Buffet D. & Oger R., 2012. Base de données sols de REQUASUD - 3ème synthèse.
- Giouvanis V., Sifis K., Papanikolaou C., Dimakas D. & Sakellariou-Makrantonaki M., 2018. Effects of Different Irrigation Levels in Cultivation of "Mountain Tea." *Proceedings* **2**, 662, DOI:10.3390/proceedings2110662.
- Grosbellet C., 2008. Evolution et effets sur la structuration du sol de la matière organique apportée en grande quantité.
- Hadas A., Kautsky L., Goek M. & Erman Kara E., 2004. Rates of decomposition of plant residues and available nitrogen in soil, related to residue composition through simulation of carbon and nitrogen turnover. *Soil Biol. Biochem.* **36**(2), 255–266, DOI:10.1016/j.soilbio.2003.09.012.
- Holzer S., Whitefield P. & Holzer S., 2011. *Sepp Holzer's permaculture: a practical guide to small-scale, integrative farming and gardening*, White River Junction, Vt: Chelsea Green Publ, 232.
- IRM, 2020. Statistiques climatiques des communes belges, Gembloux.
- IRM, 2023a. IRM - Paramètres. *KMI*. <https://www.meteo.be/fr/unpublish/climat-general-en-belgique/parametres>, (24/07/2023).
- IRM, 2023b. IRM - Juin. *KMI*. <https://www.meteo.be/fr/climat/climat-de-la-belgique/bilans-climatologiques/2023/juin>, (31/07/2023).
- Jacoby R., Peukert M., Succurro A., Koprivova A. & Kopriva S., 2017. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Front. Plant Sci.* **8**.
- Jacques F., 2021. Evaluation de la fertilité de différents types de buttes de style permacole.
- Janzen H.H., 2004. Carbon cycling in earth systems—a soil science perspective. *Agric. Ecosyst. Environ.* **104**(3), 399–417, DOI:10.1016/j.agee.2004.01.040.
- Jean-François V., 2009. COMPARAISON DE DIFFERENTES TECHNIQUES DE TRAVAIL DU SOL EN AGRICULTURE BIOLOGIQUE : EFFET DE LA STRUCTURE ET DE LA LOCALISATION DES RESIDUS SUR LES MICROORGANISMES DU SOL ET LEURS ACTIVITES DE MINERALISATION DU CARBONE ET DE L'AZOTE.
- Laffoon M., 2016. A Quantitative Analysis Of Hugelkultur And Its Potential Application On Karst Rocky Desertified Areas In China.
- Lafolie F., Renault P., Dudal Y., Debroux M., Haudin C.-S., Dassonville F., Pautremat N., Cannavo P., Saffih-Hdadi K., Sévenier G. & Mohrath D., 2004. Composition de l'eau et

- du sol : effet des activités microbiennes et des déplacements des micro-organismes. *Journ. Hydraul.* **28**(1), 3–14.
- Larochelle L. & Pagé F., 1993. «RÔLE DE LA MÉSOFAUNE DANS LA DYNAMIQUE DE TRANSFORMATION DE LA MATIÈRE LIGNEUSE APPLIQUÉE AU SOL».
- Lehmann J. & Kleber M., 2015. The contentious nature of soil organic matter. *Nature* **528**(7580), 60–68, DOI:10.1038/nature16069.
- Lerogeron L., 2022. Impact de la composition de différents types de buttes d'inspiration permacole sur la vie du sol et la fertilité associée, : faculté Gembloux Agro-Bio Tech - Université de Liège.
- Libohova Z., Seybold C., Wysocki D., Wills S., Schoeneberger P., Williams C., Lindbo D., Stott D. & Owens P.R., 2018. Reevaluating the effects of soil organic matter and other properties on available water-holding capacity using the National Cooperative Soil Survey Characterization Database. *J. Soil Water Conserv.* **73**(4), 411–421, DOI:10.2489/jswc.73.4.411.
- McKay S., 2022. *The-Practical-Permaculture-Project*.
- Miles M., 2010. *The-Art-and-Science-of-Making-a-Hugelkultur-Bed---Transforming-Woody-Debris-Into-a-Garden-Resource.pdf*.
- Mollier P., 2022. Irriguer différemment | INRAE.
- Morand Isabelle, 2022. Potager : la culture en butte forestière - Hortus Focus I mag.
- Morez R., 1992. *La matière organique et les éléments minéraux | cahier n°5*.
- Morez R., n.d. Agroécologie - Gestion de la terre nourricière.
- Pascaud G., Soubrand M., Lemee L., Laduranty J., El-Mufleh A., Rabiet M. & Joussein E., 2017. Molecular fingerprint of soil organic matter as an indicator of pedogenesis processes in Technosols. *J. Soils Sediments* **17**(2), 340–351, DOI:10.1007/s11368-016-1523-1.
- Passicousset J., Jeannotte R. & Caron-Garant E., 2021. Santé des sols et changements climatiques: Pour une meilleure résilience **54**(2), 10–13.
- Prévost P., 2021. *Les bases de l'agriculture-Comprendre la pratique -S'initier à l'agronomie, Lavoisier*.
- Promega, 2022. QuantiFluor® ONE dsDNA System - Quick Protocol.
- QIAGEN, 2016. DNeasy PowerSoil Pro Kit Quick-start Protocol - QIAGEN. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=3d576814-4f1e-4e26-9c94-57d5dc2bb60a&lang=en>, (06/07/2023).

- QuantiFluor® ONE dsDNA System Protocol, 2022. <https://be.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/quantifluor-one-dsdna-system-protocol/>, (06/07/2023).
- Rodrigo A., Recous S., Neel C. & Mary B., 1997. Modelling temperature and moisture effects on C–N transformations in soils: comparison of nine models. *Ecol. Model.* **102**(2), 325–339, DOI:10.1016/S0304-3800(97)00067-7.
- Romaní A.M., Fischer H., Mille-Lindblom C. & Tranvik L.J., 2006. Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. *Ecology* **87**(10), 2559–2569, DOI:10.1890/0012-9658(2006)87[2559:iobafo]2.0.co;2.
- Romanowicz K.J., Freedman Z.B., Upchurch R.A., Argiroff W.A. & Zak D.R., 2016. Active microorganisms in forest soils differ from the total community yet are shaped by the same environmental factors: the influence of pH and soil moisture. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**(10), fiw149, DOI:10.1093/femsec/fiw149.
- Rotthauwe J.H., Witzel K.P. & Liesack W., 1997. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(12), 4704–4712, DOI:10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997.
- Rowell M.J., 1995. Colorimetric method for CO₂ measurement in soils. *Soil Biol. Biochem.* **27**(3), 373–375, DOI:10.1016/0038-0717(94)00218-P.
- Ryan A., 2016. MICROBIAL-BIOMASS-C-AND-N-Liquid-Chl-Fumigation.
- Schvartz C., Decroux J. & Muller J.-C., 2005. *Guide de la fertilisation raisonnée: grandes cultures et prairies*, France Agricole Editions, 420.
- Semenov M.V., Manucharova N.A., Krasnov G.S., Nikitin D.A. & Stepanov A.L., 2019. Biomass and Taxonomic Structure of Microbial Communities in Soils of the Right-Bank Basin of the Oka River. *Eurasian Soil Sci.* **52**(8), 971–981, DOI:10.1134/S106422931908012X.
- Sharma S., Ramesh A., Sharma M., Joshi O., Govaerts B., Steenwerth K. & Karlen D., 2010. Microbial Community Structure and Diversity as Indicators for Evaluating Soil Quality. *In: Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture.* 317–358.
- Soltner D., 2005. *Les bases de la production végétale - TOME I : Le sol | Soltner*, Sciences et techniques agricoles.
- The James Hutton Institute, 2019. Science behind MicroResp™. <https://www.microresp.com/science>, (09/02/2023).
- Thibault C. & Lecompte F., 2018. Gestion de la fertilité des sols en cultures légumières et maraîchères. Rapport d'étude du GIS Picléq.
- Toky R.N., 2011. MODELISATION DES COULEURS DU SOL POUR LA PREDICTION DE LA TENEUR EN CARBONE ORGANIQUE ET EN FER.

- Triple performance, n.d. Comprendre et éviter une faim d'azote. *Triple Perform*.
- Vincent Q., Chartin C., Krüger I., van Wesemael B. & Carnol M., 2019. La qualité biologique et le carbone organique des sols agricoles en Wallonie.
- Wallner R., 2013. *MANUEL DE CULTURE SUR BUTTE*, Rustica.
- Wallner R., 2019. *Réussir la culture sur buttes*, Rustica.
- Wang W.J., Dalal R.C., Moody P.W. & Smith C.J., 2003. Relationships of soil respiration to microbial biomass, substrate availability and clay content. *Soil Biol. Biochem.* **35**(2), 273–284, DOI:10.1016/S0038-0717(02)00274-2.
- Wang X., Zhang W., Shao Y., Zhao J., Zhou L., Zou X. & Fu S., 2019. Fungi to bacteria ratio: Historical misinterpretations and potential implications. *Acta Oecologica* **95**, 1–11, DOI:10.1016/j.actao.2018.10.003.
- Wheaton P., n.d. hugelkultur: the ultimate raised garden bed.
- Zhang X., Ma L., Gilliam F., Wang Q. & Li C., 2012. Effects of raised-bed planting for enhanced summer maize yield on rhizosphere soil microbial functional groups and enzyme activity in Henan Province, China. *Field Crops Res.* **130**, 28–37, DOI:10.1016/j.fcr.2012.02.008.

10 Annexes

Annexe 1: Extrait du guide MicroResp - Méthode de calcul du taux d'émission de CO₂ (Cameron et al., 2017)



H6. Data Handling

i. Data Transfer and Sorting

Export the files from the spectrophotometer programme into an Excel spreadsheet and sort the absorbance (A_{570}) data into a list format with the 0hr (At0) and 6hr (At6) data in single columns alongside each other.

At0 plate

A1	A2	A3	...
B1	B2	B3	...
C1	C2	C3	...
...

At0 and At6 in columns

At0	At6
A1	A1
B1	B1
C1	C1
...	...
A2	A2
B2	B2
C2	C2
...	...
A3	A3
B3	B3
C3	C3
...	...

At6 plate

A1	A2	A3	...
B1	B2	B3	...
C1	C2	C3	...
...

ii. Normalisation of Absorbance data

Normalise the data (A_i) for time 6 by dividing the A_{570} data by the A_{570} data at time 0 (At0) and multiply by the mean of the A_{570} reading at time 0 (At0).

To Normalise:

$$6\text{hr data: } A_i = (At6 / At0) \times \text{Mean (At0)}$$



iii. % CO₂ Calculations

The following formula converts the normalised 6hr data (Ai6) to %CO₂:

$$\%CO_2 = A + B / (1 + D \times Ai)$$

Where A = -0.2265, B = -1.606, D = -6.771

The formula is for a linear-to-linear (rectangular hyperbola) standard curve fit. The parameters are from a calibration using Emax Microplate reader (Molecular Devices, USA) using a wavelength of 570nm. The calibration was measured over 6h, using soils <pH7 and for pathlength (depth of agar) and concentration of reagents, in the detection plate as described.

N.B. Calibration of the spectrophotometer is recommended as measurements differ from model to model (see Pg17).

iv. CO₂ production rate

The CO₂ rate is calculated by converting the 6hr % CO₂ data to µg/g/h CO₂-C using gas constants, and constants for incubation temperature in °C (T), headspace volume (vol) in the well (µl), fresh weight (fwt) of soil per well (g), incubation time (hr) and soil sample % dry weight (dwt).

The CO₂ rate (µg CO₂-C/g/h) is calculated as follows:

$$\frac{\left(\frac{(\%CO_2/100) \times vol \times (44/22.4) \times (12/44) \times (273/(273+T))}{soil\ fwt \times (soil\ \% \ dwt/100)} \right)}{\text{incubation time}}$$

N.B. Headspace volume is normally 945µl for our standard set-up. Adjust according to manufacturers specifications for the microplate and deepwell plate.

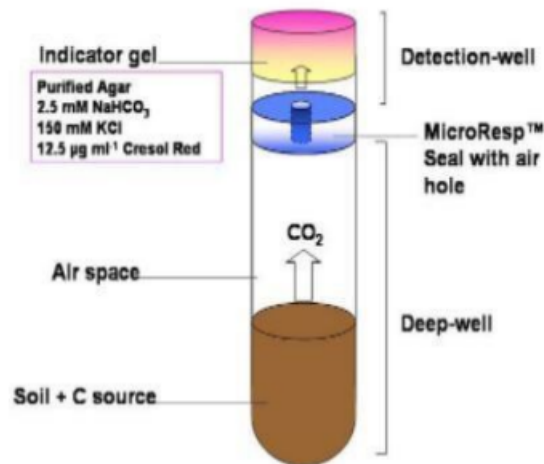
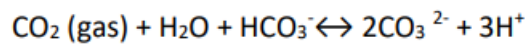
Protocole MicroResp

1 Principe

« MicroResp a été développée par Campbell (Campbell 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 (Rowell, 1995) :



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

(“Science behind MicroResp™,” 2019)» (TFE SAMAD IDI-ISSA, 2022).

2 Echantillons de sol

2.1 Prélèvements

Huit prélèvements sont réalisés sur la surface supérieure de chaque butte à l'aide d'une tarière de 30 cm de long. Chacun de ces prélèvements sont séparés arbitrairement en trois sur base de critères visuels et sont regroupés en échantillons composites. Chaque échantillon composite est représentatif d'une couche de sol constituant la butte. La couche 1 étant considérée comme la couche de surface faisant entre 15 et 30 cm selon les modalités, la couche 2 constituée de la matière organique en décomposition (10-30 cm) et la couche 3 de la terre de fond de la butte (20-30 cm).

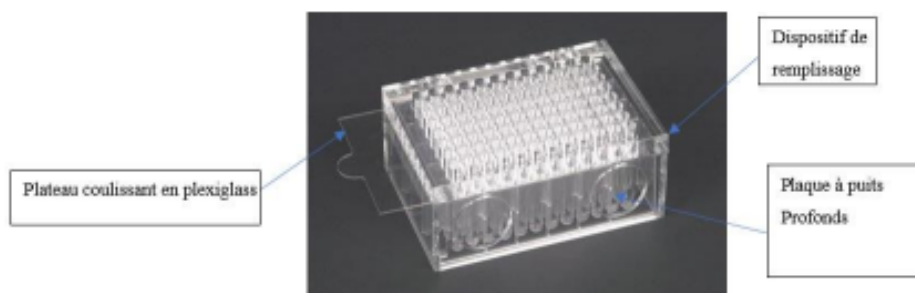
Si on sépare le sol de chaque butte en 3 couches, il y aura 3 couches x 5 modalités x 4 répétitions = 60 échantillons composites. Pour le MicroResp, les prélèvements de quatre répétitions par modalité de butte seront échantillonnés et l'on ne va s'intéresser qu'au 2 premières couches des buttes, ce qui donne un total de 2 couches x 5 modalités x 4 répétitions = 40 échantillons à analyser .

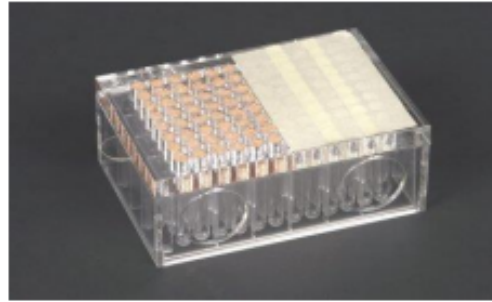
2.2 Préparation

1. Tamiser, à l'aide d'un tamis de maille 2mm, chaque échantillon afin de retirer les racines et les pierres.
⇒ *Laisser stocker à 4°C les échantillons de sol prélevés quand ils ne sont pas utilisés*
2. Echantillonner une partie des prélèvements de sol tamisés afin d'avoir des échantillons de taille adéquate.
3. Déterminer la teneur en humidité de chaque échantillon de sol
Pour ce faire :
 - a) Prélever une partie de l'échantillon (minimum 10 g) qui servira d'échantillon martyr, celui pourra être séché afin d'en connaître la masse sèche
 - b) Peser l'échantillon de terre fraîche → **masse fraîche martyr**
 - c) Sécher l'échantillon au four à 105°C pendant minimum 48h
 - d) Peser l'échantillon après séchage → **masse sèche martyr**
 - e) Calculer la proportion d'eau dans le sol frais :
 - a. **% Poids sec** par unité de sol frais = $(\text{masse sèche} / \text{masse fraîche}) \times 100$
 - b. **Teneur en eau du sol frais (%)** = $100 - \% \text{ Poids sec} = \% \text{ eau par unité de sol frais}$
4. Déterminer la capacité maximale de rétention d'eau de chaque échantillon de sol exprimée en pourcentage de sol sec (*capacité des particules d'un sol à retenir physiquement le maximum d'eau contre la force de la gravité, par unité de poids sec*)
 - a) Placer la terre sèche dans un gobelet en plastique perforé dans le fond à l'aide d'une aiguille.



- b) Placer le gobelet dans un bac rempli d'eau. Attendre que la surface de l'échantillon soit mouillée et que l'ensemble de la terre soit gorgée d'eau.
- c) Une fois l'échantillon de sol entièrement humidifié, le peser → **masse humide martyr**
- d) Calculer la **capacité maximale de rétention d'eau** de l'échantillon par unité de sol sec (%) = $((\text{masse humide} - \text{masse sèche}) / \text{masse sèche}) * 100$
5. Ajuster la teneur en humidité des échantillons de sol à 30% de leur capacité maximale de rétention d'eau.
- a) Peser le restant de l'échantillon de sol frais → **masse fraîche à étudier**
- b) Calculer sa masse sèche théorique à l'aide du % de poids sec : % Poids sec * masse fraîche à étudier = **masse sèche théorique (g)**
- c) Calcul de la masse d'eau du sol frais : Teneur en eau du sol frais (%) * masse fraîche à étudier = **masse d'eau du sol frais (g)**
- d) Calcul de la masse d'eau du sol lorsque celui-ci a atteint 30% de sa capacité maximale de rétention d'eau : $30\% * \text{Capacité maximale de rétention d'eau (\%)} * \text{masse sèche théorique}$ → **masse d'eau du sol à 30% de la capacité maximale de rétention d'eau**
 Calcul de la masse d'eau à ajouter au sol frais pour atteindre 30% de sa capacité maximale de rétention d'eau : $\text{masse d'eau du sol à 30\% de la capacité maximale de rétention d'eau} - \text{masse d'eau du sol frais} = \text{masse d'eau à ajouter au sol frais}$
(1g d'eau = 1 ml d'eau)
- e) Afin de connaître le pourcentage de la capacité maximale de rétention d'eau déjà présent dans le sol frais, il suffit de faire de rapport entre la teneur en eau du sol frais et la capacité maximale de rétention d'eau : $\text{teneur en eau du sol frais (\%)} / \text{capacité maximale de rétention d'eau (\% de sol sec)}$.
6. Une fois la teneur en eau de l'ensemble des échantillons ajustée à 30% de leur capacité maximale de rétention d'eau, il suffira de remplir la plaque à puits profonds avec les échantillons à étudier. Pour ce faire, il est nécessaire d'utiliser le dispositif de remplissage MicroResp ainsi que la plaque coulissante en plexiglass. Afin d'éviter d'éventuels mélanges d'échantillons lors du remplissage des puits profonds, il est fortement recommandé de couvrir les puits vides et ceux déjà remplis à l'aide de ruban adhésif et de ne laisser ouverts que ceux à remplir.





7. Peser la plaque à puits profonds après chaque remplissage d'échantillon. Cette étape permettra d'obtenir la masse moyenne de sol dans un puit profond et ce pour chaque type d'échantillon. Cette donnée sera utilisée dans le calcul du taux de CO₂ émis.
8. Une fois la plaque à puit profond remplie, la recouvrir de parafilm.

2.3 Incubation

Avant de pouvoir mesurer l'activité microbienne des sols, ces derniers doivent être incubés dans une étuve pendant 60h à 25°C. Il est important que cette incubation se fasse dans une étuve qui permet de garder une température constante pendant toute la durée de l'incubation.

L'incubation permet de stabiliser les sols à une humidité constante une fois celle-ci ajustée à 30% de la capacité maximale de rétention d'eau.

3 Protocole de détection colorimétrique de respiration des microorganismes du sol

3.1 Présentation du dispositif

Dans cette expérimentation, le dispositif expérimental MicroResp sera utilisé afin de quantifier l'émission de CO₂ de différents types de sols. Ce dernier est constitué d'une plaque à 96 puits profonds, d'un dispositif de remplissage, d'un plateau coulissant en plexiglass, d'un tapis de fermeture en caoutchouc, d'une microplaque de détection et d'un dispositif de fermeture en métal.



3.2 Préparation de la microplaque de détection

3.2.1 Préparation de la solution mère indicatrice

1. Mesurer 900ml d'eau déminéralisée et les mettre dans un bécher de 1000ml
2. 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.
3. Ajouter à l'eau déminéralisée un barreau aimanté et lancer l'agitation à intensité moyenne
4. 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

5. Une fois les trois solutés dissous, ajuster le volume à 1000ml avec de l'eau déminéralisée et laisser mélanger encore un peu
6. Transférer les 1000ml de solution obtenue dans une bouteille en verre. On y prélèvera la quantité nécessaire pour la suite du protocole
 - ➔ *Stocker la solution à 4°C à l'abri de la lumière. Dans ces conditions, sa durée d'utilisation peut atteindre les 6 mois.*

3.2.2 Préparation de la solution d'agar purifié 3%

1. Ajouter 100ml d'eau déminéralisée dans un bécher de 100ml, puis 3g de poudre d'agar dans le même récipient
2. Dissoudre la poudre d'agar dans l'eau déminéralisée jusqu'à obtenir une solution translucide, à l'aide de l'agitateur magnétique chauffant réglé sur 100°C pendant 5 à 10 min.
3. 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.
4. Ensuite, placer la bouteille dans un bain-marie à 60°C

3.2.3 Préparation de la solution de détection

1. Combiner la solution mère indicatrice et la solution d'agar 3% selon un ratio 1:2 (agar : indicatrice).
 - ➔ *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.*

3.2.4 Préparation d'une microplaque de détection

L'idéal est de préparer plusieurs microplaques en même temps, car le taux de réussite n'est pas de 100% et cela permettra d'avoir plusieurs plaques à disposition afin d'enchaîner les expérimentations si besoin.

1. À l'aide d'une pipette, disposer dans chaque puit un aliquote de 150µl de la solution de détection
 - ➔ *Eviter la formation de bulle dans le gel lors de l'insertion de la solution indicatrice dans les puits.*
2. Stocker la microplaque dans un dessiccateur fermé et à l'abri de la lumière. Placer un petit erlenmeyer rempli d'eau et un pot de cristaux de chaux sodée au fond du dessiccateur.
 - ➔ *Le but est de garder une atmosphère humide dans le dessiccateur tant qu'une microplaque y est conservée.*
3. Laisser s'équilibrer la microplaque pendant 2 jours avant la première utilisation.

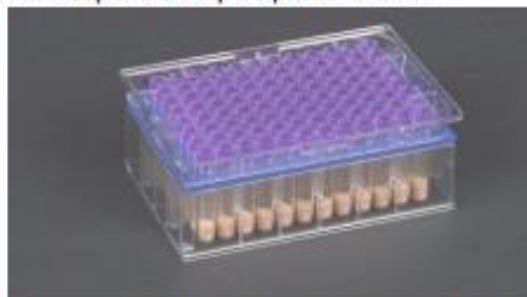
3.3 Préparation et remplissage de la plaque à puits profonds

1. Commencer par lire l'absorbance de la microplaque à 570nm et à 20°C à l'aide d'un spectrophotomètre du type *Thermo Scientific Multi scan Go* et sauvegarder les résultats « At0 ». Ensuite vérifier le % de coefficient de variance (%CoV) afin de savoir si la microplaque est conforme (%CoV < 5%).
 - i. Formule : $\% \text{ CoV} = (\text{écart-type}/\text{moyenne}) * 100$
 Après lecture de l'absorbance, replacer la microplaque de détection dans le dessiccateur en verre jusqu'à l'étape 8.
2. Introduire un témoin positif, une solution de NaHCO₃ 0.25% dans la 11^{ème} colonne de la plaque à puits profonds, à raison de 150µl par puit.

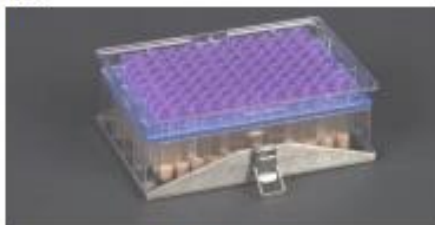
9. Introduire de l'eau distillée, à raison de 300µl par puit, comme témoin négatif (blanco) dans la 12^{ème} colonne de la plaque à puits profonds.
10. Insérer 150µl d'H₂SO₄ 30% dans les puits de la 11^{ème} colonne de la plaque puits profonds.
11. Une fois la plaque à puits profonds complètement remplie, la recouvrir avec le tapis de fermeture en caoutchouc.



12. Sortir la microplaque de détection du dessiccateur et l'emboîter au dispositif composé de la plaque à puits profonds et du tapis de fermeture en caoutchouc. Cela doit être réalisé de sorte que le micropuit A1 corresponde au puit profond A12.



13. Celer le tout à l'aide du dispositif en métal permettant d'assurer l'étanchéité du dispositif expérimental.



14. Incuber le dispositif pendant 6h à 20°C.
15. Après incubation, détacher le tout et immédiatement lire l'absorbance de la microplaque à 570nm et à 20°C à l'aide d'un spectrophotomètre du type *Thermo Scientific Multi scan Go* et sauvegarder les résultats « At6 ».
 - ➔ *La microplaque de détection peut être réutilisée tant que la solution détection n'a pas séché et qu'elle est retournée à sa couleur et absorbance d'origine.*

4 Bibliographie

- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(6), 3593–3599, DOI:10.1128/AEM.69.6.3593-3599.2003.
- Rowell M.J., 1995. Colorimetric method for CO₂ measurement in soils. *Soil Biol. Biochem.* **27**(3), 373–375, DOI:10.1016/0038-0717(94)00218-P.
- Science behind MicroResp™, 2019. . <https://www.microresp.com/science>, (09/02/2023).

Méthode	Bc (µg C/ g sol)
Fumigation au chloroforme liquide avec extraction au K ₂ SO ₄	638.925
Fumigation au chloroforme gazeux avec extraction au K ₂ SO ₄	682.045
Lyse au micro-onde avec extraction à l'H ₂ O	5336.675

Quick-Start Protocol June 2016
DNeasy[®] PowerSoil[®] Kit

The DNeasy PowerSoil Kit can be stored at room temperature (15–25°C) until the expiry date printed on the box label.

Further information

- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
 - If Solution C1 has precipitated, heat at 60°C until precipitate dissolves.
 - 2 ml collection tubes are provided.
1. Add 0.25 g of soil sample to the PowerBead Tube provided. Gently vortex to mix.
 2. Add 60 µl of Solution C1 and invert several times or vortex briefly.
Note: Solution C1 may be added to the PowerBead tube before adding soil sample
 3. Secure PowerBead Tubes horizontally using a Vortex Adapter tube holder (cat. no. 13000-V1-24).
 4. Vortex at maximum speed for 10 min.
Note: If using the 24-place Vortex Adapter for more than 12 preps, increase the vortex time by 5–10 min.
 5. Centrifuge tubes at 10,000 x g for 30 s.
 6. Transfer the supernatant to a clean 2 ml collection tube.
Note: Expect between 400–500 µl of supernatant. Supernatant may still contain some soil particles.
 7. Add 250 µl of Solution C2 and vortex for 5 s. Incubate at 2–8°C for 5 min.

Sample to Insight



Note: You can skip the 5 min incubation. However, if you have already validated the DNeasy PowerSoil extractions with this incubation we recommend you retain the step.

8. Centrifuge the tubes for 1 min at 10,000 x *g*.
9. Avoiding the pellet, transfer up to 600 μ l of supernatant to a clean 2 ml collection tube.
10. Add 200 μ l of Solution C3 and vortex briefly. Incubate at 2–8°C for 5 min.

Note: You can skip the 5 min incubation. However, if you have already validated the PowerSoil extractions with this incubation we recommend you retain the step.

11. Centrifuge the tubes for 1 min at 10,000 x *g*.
12. Avoiding the pellet, transfer up to 750 μ l of supernatant to a clean 2 ml collection tube.
13. Shake to mix Solution C4 and add 1200 μ l to the supernatant. Vortex for 5 s.
14. Load 675 μ l onto an MB Spin Column and centrifuge at 10,000 x *g* for 1 min. Discard flow through.
15. Repeat step 14 twice, until all of the sample has been processed.
16. Add 500 μ l of Solution C5. Centrifuge for 30 s at 10,000 x *g*.
17. Discard the flow through. Centrifuge again for 1 min at 10,000 x *g*.
18. Carefully place the MB Spin Column into a clean 2 ml collection tube. Avoid splashing any Solution C5 onto the column.
19. Add 100 μ l of Solution C6 to the center of the white filter membrane. Alternatively, you can use sterile DNA-Free PCR Grade Water for this step (cat. no. 17000–10).
20. Centrifuge at room temperature for 30 s at 10,000 x *g*. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.

Note: Solution C6 is 10 mM Tris-HCl, pH 8.5. We recommend storing DNA frozen (–20° to –80°C) as Solution C6 does not contain EDTA. To concentrate DNA see the Hints & Troubleshooting Guide.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, DNeasy®, PowerSoil® (QIAGEN Group). 1103425 06/2016 HB-2179-001 © 2016 QIAGEN, all rights reserved.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com

QuantiFluor® ONE dsDNA System

Instructions for Use of Products E4870, E4871 and E4891.



Quick Protocol

Materials Required

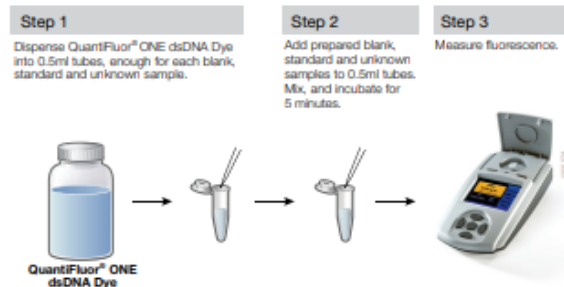
- QuantiFluor® ONE dsDNA System (Cat.# E4870, E4871, E4891)
- Quantus™ Fluorometer (Cat.# E6150)
- thin-walled 0.5ml PCR tubes (Cat.# E4941 or Axygen Cat.# PCR-05-C)
- nuclease-free water

Warm all assay components to room temperature before use.

Caution: We recommend the use of gloves, lab coats and eye protection when working with these or any chemical reagents.

The *Quantus™ Fluorometer Operating Manual* #TM396 and *QuantiFluor® ONE dsDNA System Technical Manual* #TM405 are available at: www.promega.com/protocols

Single-Tube Format Protocol



Note: If the Quantus™ Fluorometer was previously calibrated, you may not need to calibrate it again. Therefore, do not prepare blank and standard samples, and skip Steps 1, 2 and 6.

1. **Prepare Blank Sample:** Add 200µl of QuantiFluor® ONE dsDNA Dye to an empty 0.5ml PCR tube. Protect tube from light.
2. **Prepare 400ng Standard Sample:** Add 1µl of the provided QuantiFluor® ONE Lambda DNA standard (400µg/ml) to 200µl of QuantiFluor® ONE dsDNA Dye in an empty 0.5ml PCR tube. Vortex well and protect tube from light.
3. **Prepare Unknown Sample(s):** Add 1–20µl of unknown samples to 200µl of QuantiFluor® ONE dsDNA Dye in 0.5ml PCR tubes. Vortex well, and protect tube from light.
4. Incubate the prepared samples at room temperature for 5 minutes, protected from light.
5. Select the ONE DNA protocol on the Quantus™ Fluorometer.
6. If needed, calibrate the Quantus™ Fluorometer by reading the blank (Step 1) and standard (Step 2) samples in the Calibration screen, then select **Save**.
7. Enter the volume of the unknown sample (1–20µl used in Step 3) and desired concentration units.
8. Measure fluorescence of the unknown sample and record the final sample concentration results.

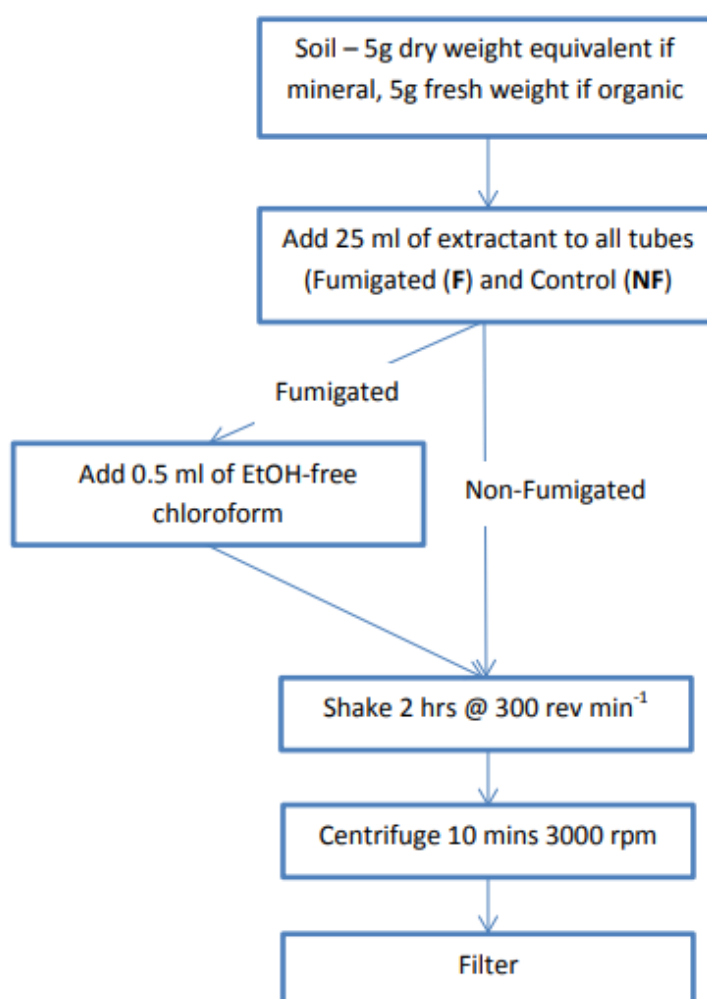
Additional protocol information in Technical Manual #TM405, available online at: www.promega.com

PAGE 1 - PART #FB200

MICROBIAL BIOMASS CARBON AND NITROGEN – liquid $CHCl_3$

Introduction

This provides a measure of the carbon and nitrogen which is bound up in soil microbial biomass. The fumigation procedure lyses the cells and releases C and N for extraction with K_2SO_4 . The alkaline persulphate digest oxidises most nitrogen forms to nitrate, with other forms such as amino acids, proteins and peptides, converted into ammonia for analysis on the auto-analyser. Similarly the digest hydrolyses organic phosphorus into inorganic orthophosphate.



COSHH INFORMATION

Chloroform is **DANGEROUS** if handled incorrectly: It causes eye and skin irritation, is toxic and carcinogenic and has the potential to cause serious irreversible damage to health if inhaled or swallowed. Chloroform vapours **must not** be allowed to escape into the laboratory atmosphere.

You need to be trained in this procedure and shown to be competent. Seek advice before starting work for the first time.

ALL WORK MUST BE CARRIED OUT IN A FUME CUPBOARD. WEAR GLOVES, LAB COAT AND SAFETY GLASSES

PROCEDURES

A. Fumigation

1. Sieve sample to <2mm.
2. For each sample weigh 5g dry weight equivalent of mineral soil, or 5g fresh weight if organic soil into two 50 ml Corning tubes (chloroform exposed (F) and control (non-fumigated (NF) (record exact weights).
3. Add 25ml of 0.5M K_2SO_4 (NB: Check the pH of the solution and adjust to 6.8-7.0 using NaOH. Acidic K_2SO_4 is not such an effective extractant.
4. Shake each tube briefly by hand.
5. Move F tubes to fume hood and add 0.5 mL of EtOH-free chloroform with a pipette to each.
6. Leave used pipette tip in fume hood to evaporate. **Remember to return and dispose of them!**
7. Tightly cap all tubes (give F tubes a good shake in the fume hood to ensure no leakage).
8. Move shaker into fume hood (it will fit if you turn it sideways). Place tubes horizontally, tightly packed and securely in bags on shaker to minimize any rubbing that will loosen lids. Agitate for approx. 300 rev min^{-1} for 2 h.
9. While shaking, set-up final tubes and funnels. F tubes must be opened and filtered in fume hood. NF samples may be filtered on a lab bench if there are space constraints in the fume hood. Place extraction tubes in racks with funnels and fold filter paper in each funnel.
10. After shaking, centrifuge each tube for 10 minutes at (3000 rpm) – the supernatant should be clear, although water extracts will still be strongly coloured but clear.
11. Decant the supernatant and filter through Whatman no 1 into final tubes. All F tubes with soil and funnels should stay in the fume hood as long as liquid chloroform remains (approx 24 hours) before washing. **Remember to return and wash them!**
12. Bubble all the filtered extracts (F and NF, samples and blanks) vigorously with air for 20 mins (use the PLFA blowdown block). This is the most effective method for removing residual chloroform.

Document de Travail – ULg, Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT), Eau-Sol-Plantes

Carbone Microbien

(selon la norme ISO 14240-2)

Echantillons fumigés

a. Fumigation

- Peser **10g** de sol frais dans des flacons **en verre**. Faire au moins 2 répétitions par échantillon. (toujours garder un rapport masse sol/volume extractant de 1/4).
- Garnir le dessiccateur d'un papier filtre humide. Placer les échantillons dans le dessiccateur ainsi qu'un bécher contenant 25mL de chloroforme + pierre ponce.
de dosage
- Faire le vide jusqu'à forte ébullition du chloroforme. Fermer le robinet, couper la pompe et attendre environ 2min. Répéter l'opération 6 fois puis laisser incuber à l'obscurité pendant 22 à 24h.
- Après 24h, ouvrir le robinet du dessiccateur pour évacuer les vapeurs et retirer le bécher de chloroforme ainsi que le papier filtre. Refermer le dessiccateur, et éliminer les vapeurs de chloroforme du sol par mise sous vide répétée (6 fois 2min).

b. Extraction

- Transvaser quantitativement le sol dans des tubes pH et ajouter 40mL de K_2SO_4 0.5M.
- Agiter pendant 30min à 200tr/min.
- Filtrer sur 595 ½.
- Si l'analyse n'est pas immédiate, congeler les extraits.

Echantillons non fumigés

- Peser **10g** de sol frais dans des tubes pH. Faire au moins 2 répétitions par échantillon. (toujours garder un rapport masse sol/volume extractant de 1/4).
- Extraire le carbone organique en ajoutant 40mL de K_2SO_4 0.5M.
KCl 1 ml
- Agiter pendant 30min à 200tr/min.
- Filtrer sur 595 ½.
- Si l'analyse n'est pas immédiate, congeler les extraits.

Biomasse Microbienne carbonée

1. Placer 5 g de sol dans un Falcon de 50mL et répéter cette opération afin d'avoir 2 Falcons par type d'échantillon
2. Ajouter 20mL d'eau déminéralisé dans chaque Falcon
3. Sans le bouchon, faire chauffer 1 des 2 Falcons de chaque type d'échantillon au micro-onde à 900W pendant 60 sec + 40 sec + 15 sec + 15 sec + 15 sec.
4. Centrifuger l'ensemble des échantillon pendant 10 min à 800 J (3000rpm).
5. Filtrer le tout à l'aide d'un filtre de type Whatman 1
6. Congelé de filtrat à -20°C
7. Avant de procéder à l'oxydation du filtrat, décongelé le filtrat en frigo à 4°C.

Carbone Microbien

(selon la norme ISO 14240-2)

c. Oxydation

- Dans un erlen de 250mL, prélever 8mL d'extrait filtré + 15mL de mélange d'acides + 2mL de solution de $K_2Cr_2O_7$ 0.0667M. Réaliser ~~3~~ blancs avec 8mL de K_2SO_4 0.5M (3 minéralisés (« essais à blanc refluxés ») et 3 non minéralisés) 4
- Faire bouillir doucement sous reflux pendant 30min.
- Ajouter **précautionneusement** 20 à 25mL d'eau distillée à travers le réfrigérant.
- Laisser refroidir avant de titrer avec le sel de Mohr.

d. Titrage

- Transvaser la totalité de l'erlen dans un bécher.
- Ajouter 1mL de H_3PO_4 et 100mL d'eau distillée et titrer au titrateur automatique.

3. Calcul des résultats

Carbone organique extractible C_1 ($\mu\text{g/mL}$) :

$$C_1 = \frac{(V_{\text{blanc refluxé}} - V_{\text{échantillon}})}{V_{\text{blanc non refluxé}}} \times [K_2Cr_2O_7] \times V_{K_2Cr_2O_7} \times E \times \frac{1000}{V_{\text{échantillon ajouté}}}$$

Où

$$E = 3 \text{ (conversion du carbone organique } C[C] \text{ en } CO_2[C(+IV)])$$

$[K_2Cr_2O_7]$ en N = concentration en M*6 = 0.0667M*6

Carbone organique extractible C_2 ($\mu\text{g/g}$ de sol sec) :

$$C_2 = C_1 \times \frac{m_{\text{extractant}}}{m_{\text{sol}}}$$

Carbone de la biomasse B_C :

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