THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Développement des Plantes

Présentée et soutenue par :

M. ROBIN BEGHIN-TANNEAU

le mardi 30 juin 2020

Titre :

Etude des conséquences de la digestion anaérobie du maïs sur ses caractéristiques amendantes : devenir des matières organiques, stockage du carbone, vie microbienne, capacité d'adsorption et stabilité structurale de l'horizon de surface de Luvisols cultivés

---

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire Physiologie, Pathologie et Génétique Végétales de Purpan (UP PPGV Purpan)

Directeur(s) de Thèse :

M. DIDIER KLEIBER

M. JAVIER DAVID SCHEINER

Rapporteurs :

Mme DOMINIQUE PATUREAU, INRA NARBONNE

Mme TIPHAINE CHEVALLIER, IRD MONTPELLIER

Membre(s) du jury :

Mme DOMINIQUE PATUREAU, INRA NARBONNE, Président

M. DIDIER KLEIBER, EI PURPAN, Membre

M. FREDERIC GUERIN, UNIVERSITE PAUL SABATIER, Invité

M. JAVIER DAVID SCHEINER, EI PURPAN, Membre

Mme MARITXU GUIRESSE, TOULOUSE INP, Invité

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Tiphaine CHEVALLIER et Dominique PATUREAU qui ont acceptés de rapporter ce travail avec intérêt et dont les remarques m'ont beaucoup aidé à améliorer ce travail.

Je te remercie Didier de m'accompagner depuis longtemps déjà. C'est l'occasion de te dire que je suis assez admiratif pour ton « à propos » et ta pertinence qui ont permis de garder le cap durant ces travaux de thèse.

Merci Javier. J'ai adoré apprendre à te connaitre durant cette thèse. Je suis particulièrement content de notre complémentarité qui fonctionne bien.

Merci Maritxu pour tes avis toujours très avisés qui m'ont été d'une grande aide durant cette thèse et qui seront précieux pour les projets à venir.

Je te remercie chaleureusement Frédéric pour ton accueil qui a rendu possible notre collaboration et pour ta gentillesse qui l'a rendu agréable. Je souhaite te témoigner mon admiration pour ton travail de scientifique.

Au-delà de mes encadrants, je souhaite remercier les nombreux scientifiques que j'ai sollicités durant cette thèse et dont j'ai toujours trouvé la porte ouverte pour la faire avancer.

A Purpan, je pense notamment à Monique, Marielle, Cécile, Frédéric, Mireille, les gars de la maintenance qui ont pris du temps pour répondre à mes petites questions qui avaient une grande importance pour moi. J'en profite également pour remercier les enseignants-chercheurs de Purpan qui, durant la thèse, m'ont accordé leur confiance pour assurer des enseignements. Je suis très fier de vous rejoindre à Purpan. Merci Antoine pour ces moment partagés lors de la préparation et l'animation des TDs au cours desquels j'ai beaucoup appris.

Au sein de l'unité de recherche Ecolab, je remercie notamment Issam MOUSSA, Virgine SUC, Frédéric JULIEN, David BAQUE, pour leur accueil et leur compétence.

Je remercie Bruno BUATOIS pour son accueil au CEFE et qui a rendu possible l'analyse de phospholipides. Je remercie également Javier ESCUDERO pour son accueil aux Mines d'Albi et pour la production du biochar.

Merci aux spécialistes du Rock Eval Thierry ADATTE et David SEBAG. David, si tu me lis, j'ai hâte de poursuivre l'article et les travaux sur le Rock Eval !

Merci à Julie JIMENEZ d'avoir participé et enrichi mon comité de thèse.

Au moment d'écrire ces lignes, j'ai également une pensée pour ceux que je vais désigner comme appartenant au monde agricole. Merci à Rob MOES de la société PlanET d'avoir accepté de m'envoyer des litres de digestats de maïs ensilage et à Florian WAGNER de m'avoir accueilli afin que j'en ramène des m^3. Merci aux agriculteurs Vendéens et aux salariés de la coopérative CAVAC avec qui j'ai travaillé pour la première fois sur la méthanisation et qui ont joué un rôle dans cette thèse puisque ce sont eux qui pour la première fois m'ont fait part de leur interrogations concernant la valeur amendante des digestats de méthanisation.

Merci aux locataires des opens spaces pour les bonnes rigolades, les parties de tarot endiablées, les parties de foot et les soirées !

Merci les Charentais. On se connait depuis le lycée et pourtant l'amitié reste intacte !

Merci aux Purpanais et aux Lillois, rencontrés durant les études, et avec qui je passe à chaque fois de très bons moments !

Merci aux Toulousains rencontrés durant cette thèse avec qui j'ai découvert plein de choses, depuis l'escalade jusqu'aux randos dans les Pyrénées en passant par les recettes de cuisines les plus originales les unes que les autres !

Merci bien sûr à mes parents, mon petit frère qui sont mes plus grands supporters et sur qui je peux toujours compter.

Merci à la famille Fournier pour ces heureux moments !

Merci à ma bonne étoile de m'avoir permis de rencontrer Claire. Merci Claire d'être toujours là (et même lorsqu'il s'agit de passer une partie de la nuit au milieu d'un champ pour mesurer la respiration des sols) !

Liste des abréviations

C : Carbone

CEA : Capacité d'Echange en Anions

CEC : Capacité d'Echange en Cations

DBO : Demande Biologique en Oxygène

CO2 : Dioxide de carbone

MS : Matière sèche

N : Azote

P : Phosphore

PLFA : Phospholipid fatty acids (Acides gras phospholipidiques)

STEP : STation d'EPuration

Sommaire

Introduction générale 15

1. Connaissances, enjeux, hypothèses et démarche 21

1.1. Les propriétés des Luvisols cultivés 21

1.1.1. Le complexe adsorbant 24

1.1.2. La stabilité structurale des agrégats 25

1.1.3. Le rôle des sols cultivés dans le changement climatique : puit et source de carbone 28

1.2. Les matières organiques des sols cultivés 30

1.2.1. Le rôle des matières organiques dans la formation et l'évolution des sols 30

1.2.2. Typologie générale des matières organiques et des acteurs de leur biotransformations physiques et chimiques 31

1.2.3. Les outils pour la caractérisation des communautés microbiennes des sols 34

1.2.4. Les effets des apports en matières organiques sur la formation et la stabilité des agrégats 39

1.2.5. Les effets des apports en matières organiques sur le complexe adsorbant 41

1.2.6. La gestion quantitative du stock en matières organiques dans les sols 43

1.2.7. Les concepts expliquant le devenir des matières organiques apportées dans les sols 47

1.2.8. La contribution de la modification temporaire de la dynamique des matières organiques endogènes à la suite de l'apport de produits organiques au stockage de carbone : les effets « priming » 50

1.2.9. Les outils pour la prédiction du stockage de carbone dans les sols à la suite de l'apport en produits organiques 56

1.3. La méthanisation agricole 63

1.3.1. Les aspects biochimiques et microbiologiques de la digestion anaérobie 63

1.3.2. L'effet de la digestion anaérobie sur la composition physico-chimique des produits organiques 66

1.3.3. La mise en œuvre de la méthanisation agricole 67

1.3.4. Le développement de la méthanisation en France et en Europe 69

1.4. Les effets de la digestion anaérobie des produits organiques sur la fertilité des sols : formulation des hypothèses 72

1.4.1. L'effet de la digestion anaérobie des produits organiques sur la vie microbienne impliquée dans la biodégradation des matières organiques des sols et les effets « priming » 72

1.4.2. L'effet de la digestion anaérobie sur la stabilité des matières organiques apportés dans les sols 74

1.4.3. Une nouvelle approche analytique pour appréhender la stabilité des matières organiques des produits organiques et des sols 77

1.4.4. L'effet de la digestion anaérobie des produits organiques sur la séquestration de carbone dans les sols....80

1.4.5. L'effet de la digestion anaérobie des produits organiques sur la fertilité chimique des sols....82

1.4.6. L'effet de la digestion anaérobie des produits organiques sur la structure des sols agricoles....84

1.5. Synthèse du travail bibliographique et annonce de la démarche adoptée....85

2. Matériel et méthodes....89

2.1. Produits organiques étudiés....90

2.2. Sols étudiés....92

2.2.1. Typologie des sols étudiés....92

2.2.2. Prélèvement et préparation des échantillons de sol pour les incubations en conditions contrôlées....93

2.3. Caractéristiques physico-chimiques initiales des produits organiques et des Luvisols étudiés....94

2.3.1. Les caractéristiques physico-chimiques et isotopiques des sols étudiés....94

2.3.2. Les effets de la digestion anaérobie et de la pyrolyse sur la composition chimique et isotopique des produits organiques....97

2.4. Analyse par pyrolyse Rock Eval des matières organiques des produits organiques avant incubation et des sols à l'issue des incubations....103

2.5. Mesure de la décomposition des matières organiques apportées et endogènes....107

2.5.1. Dispositifs d'incubation des sols en conditions contrôlées et au champ....107

2.5.2. Mesure et maintien de l'humidité des sols lors des incubations en conditions contrôlées....108

2.5.3. Mesure de la production totale de CO_2 par les sols....109

2.5.4. Partition de la production de CO_2 issue des matières organiques endogènes et apportées....111

2.5.5. Calcul de la proportion potentielle des matières organiques apportées stables dans les sols....112

2.5.6. Calcul des effets « priming »....112

2.6. Mesure de l'évolution des teneurs en Ctot, Ntot, N-NO_3^-, N-NH_4^+ et en P total en solution dans les sols durant les incubations n°3 et 4....113

2.7. Mesure de la structure des communautés microbiennes....115

2.7.1. Extraction, fractionnement et méthylation des lipides du sol....115

2.7.2. Analyse des phospholipides en Chromatographie Phase Gazeuse (CPG) et quantification....116

2.7.3. Attribution des PLFA à des taxons de microorganismes.....117

2.8. Mesure de la capacité d'échange cationique et du taux de saturation 118

2.8.1. Préparation des solutions de cobalthexamine et des prises d'essai 119

2.8.2. Réaction d'échange.....120

2.8.3. Dosage des ions cobalthexamine et calcul de la CECE 120

2.9. Mesure de la stabilité structurale des agrégats de sol 121

2.9.1. Préparation des échantillons 121

2.9.2. Description des pré-traitements.....121

2.9.3. Mesure de la distribution de la taille des particules et expression des résultats.. 122

2.9.4. Mesure d'un facteur agrégeant : les polysaccharides extractibles à l'eau.....122

2.10. Traitement statistique des données 123

3. Origine du stockage du carbone dans les sols à la suite de l'apport en produits organiques lors de l'incubation au champ 127

3.1. Introduction 127

3.2. Plan expérimental et modalités 127

3.3. Résultats 130

3.4. Discussion.....133

3.5. Conclusion 134

4. Bilan de matière du cycle du carbone entre l'atmosphère et la pédosphère, avec ou sans digestion anaérobie des produits organiques, en conditions contrôlées.....137

4.1. Incubations préliminaires : sensibilité de la respiration des microorganismes à l'humidité des sols et aux fréquences d'apports en eau 139

4.1.1. Objectifs des incubations préliminaires.....139

4.1.2. Plan expérimental et modalités 140

4.1.3. Respiration des microorganismes en fonction de l'humidité des sols 141

4.1.4. Evolution de la respiration des microorganismes lors du séchage des sols...143

4.2. Contribution scientifique : « Carbon sequestration in soil amended with anaerobic digested matter » (incubation n°2) 144

4.3. Les résultats de l'incubation n°2 sont-ils particuliers ou généralisables ? Quelles sont les conséquences des apports en produits organiques sur les concentrations en C, N et P de la phase liquide des sols ? *153*
4.3.1. Introduction 153
4.3.2. Résultats 154
4.3.3. Discussion 168
4.3.4. Conclusion 176

4.4. L'analyse des communautés de micro-organismes des sols après l'apport en produits organiques et leur lien avec les effets « priming » observés *177*
4.4.1. Introduction 177
4.4.2. Résultats 178
4.4.3. Discussion 181
4.4.4. Conclusion 184

5. Caractéristiques des matières organiques des produits apportés et des sols amendés (méthode d'analyse Rock Eval 6) 187

5.1. Les effets de la digestion anaérobie et de la pyrolyse sur les caractéristiques des matières organiques apportées *187*
5.1.1. Les teneurs en TOC des produits organiques 187
5.1.2. Les indices hydrogènes et oxygènes des produits organiques 188
5.1.3. Les Index-I et -R des produits organiques 189

5.2. L'analyse des caractéristiques des matières organiques des Luvisols *191*
5.2.1. Comparaison des teneurs en C organique (TOC) des sols à l'issue des incubations 191
5.2.2. Comparaison des indices hydrogène (IH) et oxygène (IO) des sols à l'issue des incubations 192
5.2.3. Comparaison des index -I et -R des sols à l'issue des incubations 196

6. Les effets de la digestion anaérobie des produits organiques apportés sur le complexe adsorbant et la structure des Luvisols 201

6.1. Les effets des apports en produits organiques sur le complexe adsorbant des sols *202*
6.1.1. Résultats 202
6.1.2. Discussion 204

6.2. Evolution de la stabilité structurale au cours de la décomposition des produits organiques *207*
6.2.1. Résultats 207

6.2.2. Discussion....213

Conclusion générale....219

6.3. Principaux résultats de cette étude....219

6.4. Implications agronomiques de cette étude....223

6.5. Limites et perspectives à cette étude....223

Bibliographie....227

Annexes....249

Annexe 1 : Protocole du prélèvement par carottage....250

Liste des figures....252

Liste des tableaux....258

Résumé....261

Abstract....262

Introduction générale

Introduction générale

Le début de la production végétale est situé au sein du croissant fertile, il y 10 000 ans avant J-C. Les céréales endémiques de cette zone du Moyen-Orient ont d'abord fait l'objet de cueillettes intensives permettant le développement d'un mode de vie sédentaire au moyen de procédés de stockage. Ces céréales ont été peu à peu sélectionnées et domestiquées par le développement du semis, en plaçant les graines dans des trous formés par l'extrémité pointue d'un bâton (Parr & Hornick, 1992). Avec l'invention du travail du sol, (située entre 3000 à 2500 ans avant J-C), les surfaces cultivées ont fortement augmenté et l'agriculture s'est largement développée à travers l'élevage, le maraichage et l'arboriculture. Les agriculteurs maitrisent alors l'utilisation des produits organiques et des fabacées fixatrices d'azote afin de maintenir la fertilité des sols, définie comme la capacité d'un sol à produire la biomasse cultivée. Ces pratiques ont perduré et se sont développées. Par exemple : les témoignages écrits de penseurs romains comme Caton le Censeur (234-149 avant J-C), de Pline l'Ancien (23-79 avant J-C) ou de Columella (4 à 70 après J-C) évoquent l'importance de maintenir la fertilité des sols grâce à des pratiques telles que l'apport de fumiers, de composts, de résidus de cultures et la culture de couverts végétaux (Parr & Hornick, 1992). L'apport de produits organiques dans un sol cultivé, afin de maintenir sa fertilité, est donc une pratique très ancienne. Les produits organiques apportés, exogènes au sol, regroupent une large famille de produits d'origines variées (agricole, urbain, industriel) ; primaires lorsqu'ils proviennent directement d'une plante ou secondaires lorsqu'ils sont issus d'un procédé de traitement (compost, effluent d'élevage, digestat de méthanisation, issus de céréales, boues de STEP, pyrolyse etc.). Les produits organiques destinés à une valorisation agronomique sont caractérisés par des critères d'efficacité et d'innocuité.

Les produits organiques étaient une ressource principale, jusqu'à Liebig et sa démonstration de la nutrition azotée minérale des plantes en 1840 puis la découverte des engrais de synthèse permettant aux agriculteurs d'augmenter la production de biomasse végétale. Le recours aux engrais de synthèse va réduire la dépendance de la production de biomasse à l'apport des produits organiques (Schröder, 2014). Désormais, dans un contexte d'échanges mondialisés impliquant la spécialisation des zones de production, les sous-produits organiques représentent plutôt un risque de pollution. Pourtant, leurs effets ne se résument pas à une quantité d'éléments minéraux disponibles pour les plantes ou potentiellement lessivables. Leur spectre d'action est large, des propriétés physiques aux propriétés chimiques et biologiques du sol, et complexe ; ce qui explique pourquoi de nombreux travaux scientifiques s'y intéressent jusqu'à aujourd'hui. L'apport de produits

organiques entraine une série d'interactions avec les composants des sols : le biote, les minéraux, les matières organiques endogènes déjà présentes et les végétaux ; conduisant à leur décomposition plus ou moins progressive. La nature de ces interactions dépendent : de leur composition, des caractéristiques des sols et de l'environnement (température, humidité etc.) (Alvarez & Lavado, 1998; Alvarez & Alvarez, 2000). Les enjeux de la compréhension du devenir des produits organiques dans les sols sont :

- Agronomiques car les produits organiques apportés jouent un rôle essentiel dans l'évolution de la fertilité des sols cultivés ;
- Environnementaux, à l'échelle locale et planétaire, car les matières organiques influencent la qualité de l'atmosphère, de l'eau et des cultures. Le stockage ou la libération de carbone par le sol jouent un rôle significatif dans le cadre du changement climatique (Lal, 2004; Oertel *et al.*, 2016) ;
- Scientifiques car les interactions des matière organiques avec les sols forment une boite noire dont le fonctionnement est difficile à appréhender (Young & Crawford, 2004; Lehmann & Kleber, 2015).

Dans le cadre de leur valorisation agricole, trois principaux modes de gestion des produits organiques peuvent être distingués : l'apport au sol des produits organiques sans traitement supplémentaire, après maturation aérobie (compostage), et après maturation anaérobie (méthanisation). Notre sujet d'étude est consacré à la comparaison des produits organiques avant et après leur digestion anaérobie. Le produit organique modèle choisi dans le cadre de l'étude est le maïs pour une raison méthodologique.

La méthanisation désigne un ensemble de procédés variés dont le point commun est l'exploitation de la digestion de la matière organique en milieu anaérobie, conduisant à la production d'un biogaz utilisé comme une source d'énergie renouvelable. Les digestats, issus de la méthanisation, sont reconnus comme étant des engrais organiques pouvant potentiellement se substituer aux engrais de synthèse en raison de leur effet court terme azote expliqué par une teneur plus importante en azote minéral en comparaison avec les produits organiques avant méthanisation (Gutser *et al.*, 2005; Loria *et al.*, 2007; Stinner *et al.*, 2008; Gunnarsson *et al.*, 2010; Goberna *et al.*, 2011; Webb *et al.*, 2013; Fouda *et al.*, 2013; Frøseth *et al.*, 2014; Cavalli *et al.*, 2016). En revanche, les effets de l'épandage régulier des digestats de méthanisation sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols restent peu connus (Möller & Müller, 2012). Cette étude s'intéresse aux effets de la digestion anaérobie des produits organiques sur les propriétés des sols cultivés, et plus précisément sur la capacité de stockage en carbone, la vie microbienne, la stabilité structurale et la fertilité chimique de l'horizon de surface de Luvisols.

Ce mémoire s’articule en 6 chapitres :

La première partie de ce mémoire introduira le contexte et les enjeux associés à la problématique de notre étude et permettra de formuler les hypothèses testées puis d’annoncer la démarche adoptée. Le chapitre 2 décrira le matériel et les méthodes utilisés. Le chapitre 3 sera consacré à la présentation des résultats de l’incubation au champ portant sur l’origine du stockage en carbone. Le chapitre 4 précisera le bilan de matière du cycle du carbone entre l’atmosphère et le sol avec ou sans la digestion anaérobie, calculé à partir d’incubations en conditions contrôlées ; ainsi que les mécanismes en jeu. Le chapitre 5 présentera les résultats de l’analyse par pyrolyse Rock Eval des matières organiques des produits organiques et des sols. Le chapitre 6 portera sur les effets de la digestion anaérobie des produits organiques apportés sur la structure et le complexe adsorbant des Luvisols.

Chapitre I

1. Connaissances, enjeux, hypothèses et démarche

Dans ce chapitre, différents points bibliographiques seront développés : les propriétés des Luvisols cultivés, les rôles des matières organiques sur les propriétés des sols agricoles, et la méthanisation ; ensuite, l'état de l'art des effets de la digestion anaérobie des produits organiques sur la fertilité des sols permettra d'annoncer les hypothèses de travail. La cinquième partie présentera la démarche adoptée pour notre étude.

1.1. Les propriétés des Luvisols cultivés

Les sols agricoles sont destinés à remplir de multiples fonctions. Leur qualité correspond alors à leur aptitude à remplir différentes fonctions dans un contexte d'usage. Les sols agricoles sont historiquement caractérisés par leur fertilité définie comme : leur aptitude, relative à un contexte climatique et un système de culture donné, à favoriser le développement des plantes cultivées. Pour favoriser le développement des plantes cultivées, les sols agricoles doivent répondre à leurs besoins en assurant plusieurs fonctions comme : l'alimentation hydrique, la nutrition minérale et le support du développement racinaire. La capacité des sols agricoles à assurer ces fonctions est objectivée par la définition de propriétés du sol. Les différentes propriétés d'un sol interagissent de manière complexe (Figure 1). Les propriétés des sols agricoles sont interdépendantes ; elles peuvent être quasi-permanentes ou facilement modifiables et être issues de la pédogenèse et/ou de l'anthropisation ; être de nature physique, chimique, biologique. L'agronomie est une discipline scientifique qui consiste à identifier la propriété limitante d'un sol pour la réalisation d'une fonction souhaitée et les actions permettant de l'améliorer. L'utilisation de matières fertilisantes peut par exemple être une action améliorante. Les matières fertilisantes peuvent remplir le rôle d'engrais et/ou d'amendements. Les engrais ont pour rôle d'apporter aux plantes des éléments nutritifs. Les amendements ont pour rôle d'améliorer les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols durant le cycle d'une culture et sur le plus long terme. Les produits organiques apportés peuvent être à la fois des engrais et des amendements.

Au-delà de la production végétale et animale, les sols agricoles sont le déterminant de fonctions environnementales et écologiques influençant notamment : le stockage de carbone et les émissions de gaz à effet de serre, la gestion du cycle de l'eau, la biodiversité, la rétention et la biodégradation de polluants. Devant la nécessité de prendre en compte les aspects environnementaux et écologiques afin de consolider la durabilité des modèles de production agricoles, il est nécessaire de définir les fonctions agro-écosystémiques des sols qui ne soient plus les seuls concepts de fertilité des agronomes.

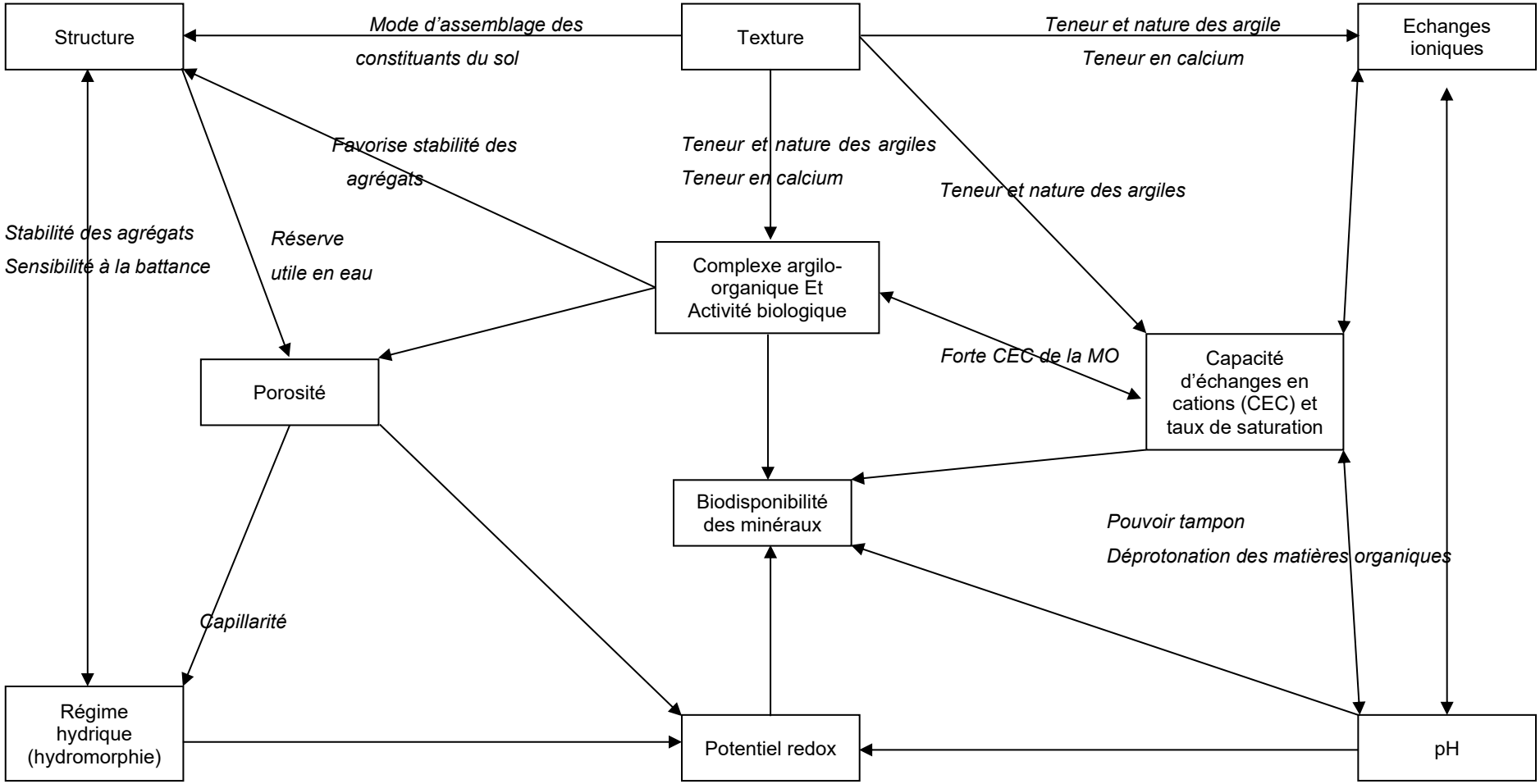


Figure 1 : Schéma conceptuel des interactions entre les propriétés du sol (non exhaustif) (Duchaufour, 2001; Gobat et al.*, 2003)*

Les sols étudiés dans le cadre de notre étude sont des boulbènes caractéristiques du Sud-Ouest de la France occupant environ 16% des surfaces agricoles utilisées (800 000 hectares, Zimmer *et al.*, 1991; Gavalda, 2001). Ils sont rattachés, en terme de taxonomie, à la famille des Luvisols selon le Référentiel Pédologique (Baize & Girard, 2008) représentant 7% des sols mondiaux et sont la 6ème unité pédologique en terme d'extension géographique. Les Luvisols se développent sur des dépôts alluviaux, d'où leur répartition calquée en grande partie sur le réseau hydrographique. Les Luvisols sont caractérisés par l'importance des processus d'argilluviation (Baize & Girard, 2008) dont la principale conséquence est une différenciation morphologique entre :

- Des horizons supérieurs appauvris en argile et en fer, moins colorés, faiblement structurés, généralement assez perméables ;
- Et des horizons plus profonds, enrichis en argile et en fer, à structure bien développée, plus colorés, moins voire peu perméables. Lorsque les horizons plus profonds présentent des traces d'hydromorphies, les Luvisols sont qualifiés de rédoxiques.

Les contraintes agronomiques liées aux Luvisols sont notamment d'ordre physique avec des manifestations souvent flagrantes et limitantes (battance, engorgement, instabilité structurale). A ces contraintes liées aux propriétés intrinsèques du sol peuvent se greffer celles générées par les conditions climatiques du Sud-Ouest de la France qui se traduisent par un excès d'eau en hiver et par un déficit hydrique en été qui est accentué par la faible réserve utile du sol. Depuis les années 1960, le développement des aménagements pour le drainage et l'irrigation ont permis d'améliorer les propriétés des Luvisols du Sud-Ouest de la France. L'amélioration des propriétés des boulbènes a réorienté leur vocation vers les monocultures intensives destinées à la vente (maïs, sorgho, tournesol, blé) (Gavalda, 2001). La modification de cet agro-système a entrainé une diminution des teneurs en matières organiques des boulbènes augmentant leur dépendance à l'apport de matières fertilisantes (Gavalda, 2001).

Cette étude a pour objectif d'évaluer le rôle des digestats de méthanisation en tant qu'amendements ; à travers leurs influences sur le statut organique de Luvisols. Le complexe argilo-organique et l'activité des micro-organismes jouent en effet un rôle pivot sur les propriétés du sol (Figure 1). Le complexe argilo-organique et l'activité des micro-organismes dépendent des apports en produits organiques. Le travail mené s'est donc focalisé plus particulièrement sur trois propriétés de l'horizon de surface des Luvisols, en raison de leurs liens directs avec le cycle de la matière organique (Figure 1) :

- La stabilité structurale des agrégats ;
- Le complexe adsorbant ;
- La capacité de stockage en carbone.

1.1.1. Le complexe adsorbant

Les ions en solution peuvent être absorbés par les racines, mais également lixiviés, ou encore adsorbés par le complexe adsorbant. En captant les ions, le complexe adsorbant permet de les stocker. Les racines sont capables d'acidifier localement le milieu afin d'induire la solubilisation des cations adsorbés (Havlin, 2005). On désigne par l'expression complexe adsorbant, l'ensemble des colloïdes organiques et/ou minéraux, dotés de charges négatives susceptibles de retenir les cations sous la forme dite échangeable, c'est-à-dire pouvant être remplacés par d'autres cations, dans certaines conditions précises (Figure 2, Duchaufour, 2001). L'état du complexe adsorbant, et ses modifications éventuelles par échange d'ions affecte de nombreuses propriétés (elles même interdépendantes) du sol comme : le pH et le potentiel redox (Cottes *et al.*, 2019), la fertilité minérale, l'activité biologique et la structure du sol (Figure 1). Parallèlement, les minéraux insolubles du sol à charges positives (par exemples des oxyhydroxydes), retiennent, de la même façon les anions (PO_4^{3-}, SO_4^{2-}) : ils constituent un complexe anionique. Par convention, le complexe adsorbant est réduit à la Capacité d'Echanges en Cations (CEC) car elle est beaucoup plus importante que la Capacité d'Echanges en Anions (CEA) dans la plupart des sols cultivés. La capacité d'échange cationique (CEC) représente la quantité maximale de cations échangeables qu'un sol peut retenir sur son complexe d'échange à un pH donné. Elle correspond à la somme des sites d'échange occupés par des cations dits « basiques » (qui s'associent peu avec OH-) : Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Na^+ et des cations « acides » (facilement associés à OH^-) : H^+, Al^{3+} appelés aussi acidité d'échange. Le taux de saturation en cations « basiques » permet d'évaluer la réserve en cations « basiques » et l'acidité potentielle d'un sol.

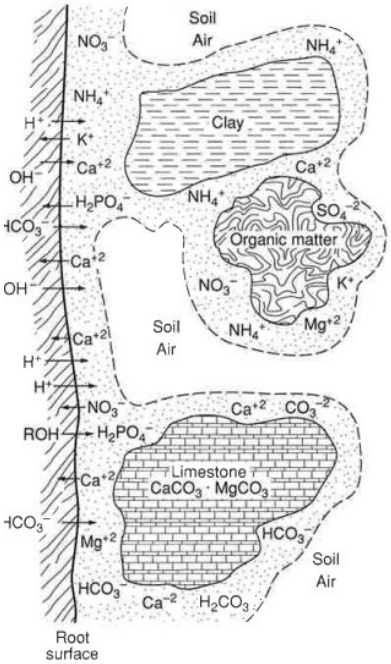


Figure 2 : Schéma des échanges en ions entre la solution des sols, les racines (root) les matières organiques (organic matter), les particules d'argiles (clay) et de calcaire (limestone) (Duchaufour, 2001).

1.1.2. La stabilité structurale des agrégats

1.1.2.1. L'organisation des particules en structure

La structure désigne le mode d'assemblage des constituants du sol les uns par rapport aux autres (Monnier, 1965) définissant ainsi la façon dont le sol est organisé dans l'espace (Dexter, 1988) et dans le temps (Roger-Estrade, 1995).

La structure détermine la répartition dans l'espace de la matière solide et des pores dont certains sont occupés par de l'eau, d'autres, les plus grossiers, par de l'air (Duchaufour, 2001). Cette répartition conditionne de nombreuses propriétés physiques et chimiques du sol tel que (Figure 1) : l'aération et la possibilité de respiration des racines, la rétention par les forces capillaires d'une réserve d'eau. La porosité s'observe et se décrit à différentes échelles (Kay, 1990) :

- Les micropores (diamètre inférieur à 0,2 µm) retiennent l'eau capillaire non disponibles par les racines ;
- Les mésopores (diamètre de 0,2 à 30 µm) se ressuient de façon très progressive, et sont donc tantôt occupés par de l'eau disponible, tantôt par de l'air suivant les conditions météorologiques.
- Les macropores (diamètre ≥ 30µm) sont normalement occupés par de l'air après ressuyage rapide des pluies.

La structure d'un sol peut être décrite en fonction de trois composantes (Kay, 1990) : la forme, la stabilité et la résilience.

- La forme structurale décrit l'arrangement hétérogène des solides et des vides existant dans un sol en un temps donné. La forme structurale d'un sol est optimale pour sa fertilité lorsque la porosité totale est élevée avec une bonne répartition entre les pores grossiers et les pores fins permettant à la fois son aération et une bonne réserve utile. Pour cela, la structure en « grumeaux » doit comporter des agrégats de différentes tailles formés dans un milieu à forte activité biologique.
- La stabilité structurale permet de définir la sensibilité des agrégats du sol à la dégradation au cours du temps. La résistance des agrégats à des contraintes physiques détermine la sensibilité d'un sol à la battance et à l'érosion (Le Bissonnais, 1996), la germination et l'enracinement des plantes cultivées (Lynch & Bragg, 1985) et aussi la capacité d'un sol à séquestrer du carbone par protection physique des molécules organiques (Jastrow *et al.*, 1996).

- La résilience structurale définit la capacité d'un sol à retrouver sa forme structurale grâce à des processus naturels lorsque les contraintes physiques s'atténuent ou cessent d'être appliquées (Abiven, 2004).

1.1.2.2. Les facteurs influençant la stabilité structurale

Les principales caractéristiques des sols influençant la stabilité structurale ont fait l'objet de nombreuses études et revues (Le Bissonnais, 1996; Kay *et al.*, 1997; Bronick & Lal, 2005) :

- La texture du sol. La stabilité structurale augmente avec la teneur en argile, sans toutefois qu'il soit possible d'établir de corrélations significatives généralisables à tous les types de sols (Le Bissonnais, 1996). L'effet de la teneur en argile dépend en particulier de la teneur en eau (Gollany *et al.*, 1991). Les sols limoneux et sableux sont plus fragiles que les sols argileux. Ainsi, les Luvisols sont caractérisés par un premier horizon ayant une texture plutôt limoneuse entrainant une sensibilité à la battance (Favrot *et al.*, 1992).
- La matière organique. La matière organique influence la stabilité structurale par plusieurs mécanismes : en jouant le rôle de liant entre les particules modifiant ainsi les propriétés hydriques du sol et en influençant l'activité biologique des sols (Monnier, 1965). La stabilité des agrégats des Luvisols est particulièrement dépendante des teneurs et des flux en matières organiques en raison de leurs faibles teneurs en argiles (Chenu *et al.*, 2000).
- La teneur en sodium, calcium et autres cations. La nature et la teneur en cations échangeables influencent la stabilité structurale par leur effet sur les processus de dispersion / floculation des argiles (Voelkner *et al.*, 2015). Cette caractéristique est fortement liée à la texture du sol et au type d'argile.
- La minéralogie des argiles. Le type d'argile joue un rôle ambivalent sur la stabilité structurale. Les argiles avec une capacité d'échange cationique forte induisent des agrégats plus résistants, car elles offrent une surface de contact plus importante, mais elles peuvent se disperser plus facilement quand les conditions s'y prêtent.
- Les oxydes de fer et d'aluminium. Ces oxydes jouent le rôle de floculant de l'argile et des matières organiques dans le sol et contribuent ainsi à augmenter la stabilité structurale. Leur effet est particulièrement effectif et observé dans les sols tropicaux, où les teneurs en argiles sont importantes (Six *et al.*, 2002). Leur effet a également été mis en cause pour expliquer les différentes structures (prismatique et/ou vertique) observées au sein des l'horizons inférieurs des Boulbènes (Michel *et al.*,).

La première caractéristique des Boulbènes est une différentiation importante de leur texture au sein de leur profil avec : un premier horizon pauvre en argile et une accumulation d'argile à une profondeur d'environ 0,6 m. L'horizon supérieur des Boulbènes, pauvre en argiles, ayant une petite capacité d'échanges en cations (d'environ 6 cmolC+/kg), plutôt acide (pH d'environ 6) et avec une faible teneur en matières organiques se distingue par sa faible stabilité structurale.

1.1.3. Le rôle des sols cultivés dans le changement climatique : puit et source de carbone

Le cycle du carbone peut être défini comme l'ensemble des échanges en carbone entre les différents réservoirs terrestres (Figure 3). Le cycle du carbone est au cœur du changement climatique induit par l'augmentation de la quantité de chaleur piégée à la surface terrestre du fait des émissions de gaz à effet de serre, dont notamment le CO_2, entrainant une augmentation de leur concentration dans l'atmosphère. L'augmentation des teneurs en gaz à effet de serre dans l'atmosphère provoque un changement climatique avec des effets négatifs sur les systèmes naturels et anthropiques ayant des conséquences sur la production alimentaire, les moyens de subsistances, la santé et l'économie (IPCC *et al.*, 2014). Les flux en carbone entrants et sortants dans l'atmosphère à l'échelle planétaire sont déséquilibrés en raison des activités anthropiques entrainant l'émission de 9,0 Gt C associée à la combustion de composés fossiles (Figure 3). Le bilan de ce déséquilibre entre les flux entrants et sortants conduit à une augmentation annuelle du stock de carbone dans l'atmosphère évalué à 4,4 Gt C sur la période 2005-2014 (Le Quéré *et al.*, 2015).

Récemment, un collectif de scientifiques a souligné le rôle potentiel du stockage de carbone dans les sols à l'échelle planétaire pour maitriser la teneur en CO_2 dans l'atmosphère (Minasny *et al.*, 2017). Une augmentation annuelle théorique de 4‰ du stock global de C dans les sols sur une profondeur de 0,30 m permettrait de stopper l'augmentation de la concentration en CO_2 dans l'atmosphère. Les auteurs soulignent que cette estimation ambitieuse, destinée à promouvoir l'adoption de pratiques favorisant le stockage du carbone dans les sols, ne tient pas compte du fait que l'augmentation potentielle du stockage concerne peu les sols occupés par une végétation primaire mais plus particulièrement les sols cultivés (Chenu *et al.*, 2019).

Le sol est un volume qui s'étend verticalement de la roche altérée jusqu'à la surface et horizontalement de façon presque continue à la surface des continents, seulement interrompu par les affleurements rocheux et les cours d'eau. Il occupe une surface d'environ 130 millions de km² (FAOSTAT, 2016). Les sols accueillant actuellement une activité agricole représentent environ 37% de cette surface soit environ 40,3 millions de km². Les autres surfaces sont occupées par : des forêts non exploitées (31%), des glaciers, des déserts et une végétation clairsemée ou des zones régulièrement inondées (32%). Parmi les forêts, 69% sont des forêts naturellement régénérées ou plantées après une occupation humaine. La quantité de carbone stockée dans les sols cultivés sur 1 m de profondeur est évaluée entre 480 à 790 Gt (Minasny *et al.*, 2017). Une augmentation de 4‰ de ce stock peut compenser entre 20 à 35% des émissions anthropiques de carbone dans l'atmosphère.

L'évolution naturelle des sols est modifiée par l'Homme, à la suite de leur défrichement et de la culture d'une végétation domestiquée en remplacement de la végétation primaire. Une des conséquences de cette mise en culture est la diminution initiale du stock en carbone organique des sols, de 60% dans les régions tempérées à 75% ou plus dans les tropiques (Wallace, 1994). Durant l'anthropocène la mise en culture des sols, accompagnant l'augmentation de la démographie mondiale, a participé de manière significative à l'augmentation de la concentration en dioxyde de carbone (CO_2) dans l'atmosphère (Ruddiman, 2003). L'adoption de certaines pratiques agricoles à l'échelle mondiale pourrait à court terme permettre de (ré)augmenter le stock de carbone organique dans les sols cultivés (Lal, 2004; Minasny *et al.*, 2011). Les pratiques identifiées pour favoriser le stockage du carbone dans les sols cultivés sont notamment : le reboisement, la conversion en prairies, l'apport d'amendements organiques, l'incorporation de résidus, les techniques de semis direct sous couvert végétal sans travail du sol et la rotation des cultures (Paustian *et al.*, 2016; Minasny *et al.*, 2017). Le reboisement et la conversion en prairies sont controversés puis qu'ils résident dans le choix de l'usage des sols ; au détriment des cultures végétales vivrières.

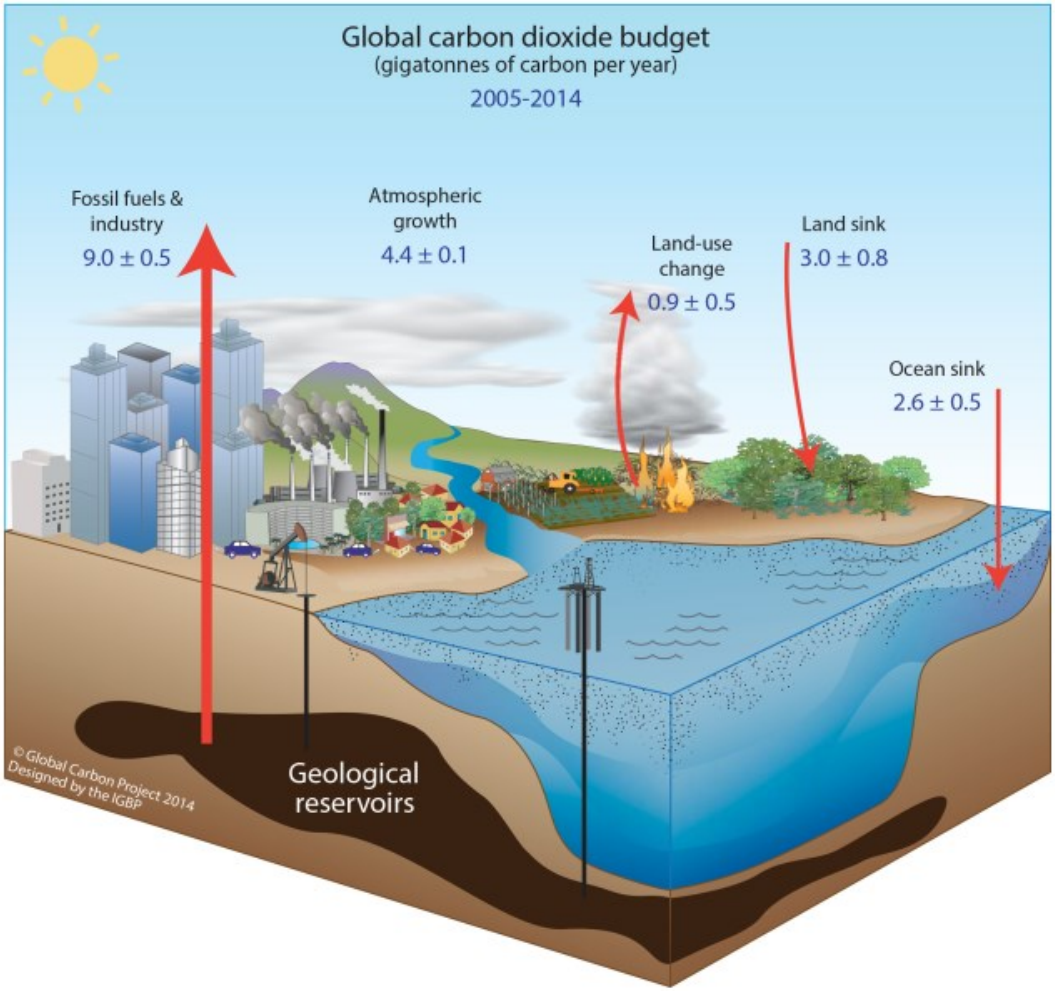


Figure 3 : Représentation schématique des perturbations du cycle du carbone à l'échelle planétaire en raison des activités anthropiques, moyennées pour la décennie 2005-2014. (Le Quéré et al.*, 2015)*

1.2. Les matières organiques des sols cultivés

Les sols sont constitués par une fraction minérale et une fraction organique (Duchaufour, 2001). La fraction minérale, notamment caractérisée par sa granulométrie, est héritée de l'altération du matériau géologique d'origine (et de son éventuel transport). La fraction minérale d'un sol cultivé est peu modifiable par l'action humaine. La fraction organique est acquise durant la pédogenèse. La fraction organique et son association avec la fraction minérale peuvent être significativement modifiées par l'agriculture.

1.2.1. Le rôle des matières organiques dans la formation et l'évolution des sols

Au-delà de son sens premier qui désigne : ce qui est sous nos pied, le sol est une entité superficielle, souvent meuble et naturelle, c'est-à-dire dont l'existence initiale ne dépend pas de l'homme. Cette entité résulte de la transformation d'un matériau minéral d'origine (lithosphère) au contact de l'atmosphère et des êtres vivants (biosphère), sous l'influence de processus physiques, chimiques et biologiques (Girard *et al.*, 2011). Lorsque qu'un matériau minéral d'origine vient à affleurer, sous forme de roches éruptives, magmatiques, sédimentaires ou métamorphique, il est progressivement colonisé par la flore et la faune. Cette colonisation entraine une accumulation de matières organiques ainsi qu'une désagrégation physique et une altération chimique du matériau minéral. Ces matières organiques, regroupant des constituants morts ou vivants d'origine animale, végétale ou microbienne, transformés ou non, s'accumulent dans le sol et y subissent des transformations physiques, chimiques et surtout biologiques (Duchaufour, 2001).

Le devenir des matières organiques mortes dans les sols consiste en une décomposition définie comme le processus de séparation de matériaux organiques apportés dans le sol en leur constituants de base (Manlay *et al.*, 2007). La minéralisation des matières organiques mortes est essentiellement réalisée par les micro-organismes. Les mécanismes abiotiques de minéralisation sont mineurs dans les sols (Lavelle *et al.*, 1993; Wolters, 2000). Les constituants ultimes issus de la minéralisation sont des molécules minérales simples tels que : le CO_2, le nitrate (NO_3^-), l'oxyde de potassium (K_2O), l'orthophosphate ($H_2PO_4^-$) etc. La mesure de la production de CO_2 par les sols est un indicateur de la décomposition des matières organiques (Lashermes *et al.*, 2009). Dans un système fermé sans exportation ou pertes, les éléments minéraux sont recyclés par les racines des plantes pour leur développement. L'altération de la roche mère, notamment via l'acidification induite par l'activité biologique, enrichit progressivement le milieu en éléments minéraux biodisponibles favorisant

le développement de végétaux complexes. Les sols sont constitués d'un mélange de minéraux et de matières organiques.

L'altération de l'horizon minéral, les phénomènes de migration et l'accumulation de matières organiques constituent les principaux processus de la genèse d'un sol. La pédogenèse aboutit à la différentiation en plusieurs horizons sous l'effet du facteur temps et du milieu dont notamment le climat et la végétation qui lui est étroitement associée. Au bout d'un temps déterminé d'une évolution progressive, un certain état d'équilibre stable est atteint, caractérisant aussi bien la végétation que le sol correspondant (Duchaufour, 2001). Chaque étape de cette évolution peut être considérée comme un écosystème, désignant un système fonctionnel intégrant sol, végétation et milieu. La succession d'écosystèmes ainsi observée aboutit à un écosystème stable (appelé climax). Le temps nécessaire au déroulement complet d'un cycle d'évolution progressive est très variable ; il oscille entre un millénaire environ à plus d'un million d'années (Duchaufour, 2001). Pour de nombreux agronomes, l'objectif est de rapprocher les systèmes agricoles d'un écosystème le plus stable et résilient possible en copiant celui de la forêt. Cette approche est à l'origine des principes du semis direct sous couvert permanent (Séguy *et al.*, 2012).

1.2.2. Typologie générale des matières organiques et des acteurs de leur biotransformations physiques et chimiques

La masse des matières organiques contenues dans les sols est très variable selon leur type pédologique et leur mode d'occupation, pouvant aller de 0 à 100%. Ce domaine de variation est cependant beaucoup plus restreint dans les sols cultivés où il est généralement compris entre 2 et 5% (Figure 4). Cette faible proportion dans les sols agricoles ne diminue en rien l'importance de leurs rôles. Parmi les matières organiques, les matières organiques mortes et les organismes vivants sont distingués. La proportion de leurs biomasses est très variable en fonction du sol considéré (Figure 4).

Parmi les matières organiques mortes, les matières organiques particulaires peuvent être distinguées des matières organiques transformées (Calvet *et al.*, 2015). Les matières organiques particulaires sont des fragments de tissus végétaux et des organismes vivants du sol, de taille variable (du micromètre à quelques dizaines de millimètres), plus ou moins altérés, mais où des structures cellulaires sont encore reconnaissables. Les matières organiques transformées sont constituées de mélanges de molécules de tailles très variées, allant de la petite molécule (quelques atomes) à des macromolécules complexes et des polymères. Il s'agit des matières organiques chimiquement transformées, des composés des rhizodépôts et des molécules excrétées par les micro-organismes, notamment les enzymes.

La complexité des différents processus de dégradation des matières organiques particulaires induit une immense diversité des matières organiques transformées et leur caractérisation constitue un enjeu scientifique majeur.

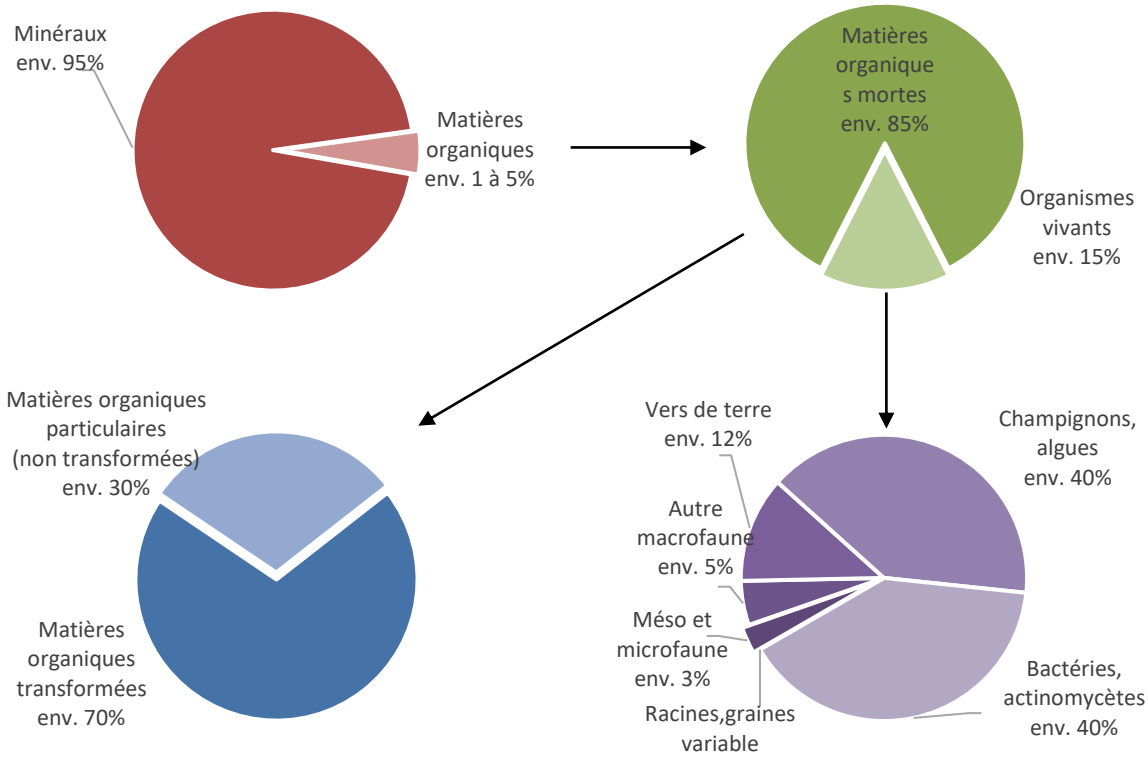


Figure 4 : Proportions approximatives en masse des constituants organiques dans les sols cultivés (Calvet et al.*, 2015)*

La biomasse vivante représente environ 15% de la masse des matières organiques des sols cultivés en milieu tempéré (Figure 4). Presque tous les embranchements du vivant sont représentés dans les sols depuis les procaryotes (bactéries et archées) jusqu'au eucaryotes où les quatre grands règnes sont présents : les plantes, les animaux, les champignons, et les protistes. Les organismes vivants des sols peuvent être notamment distingués par leur taille qui est un déterminant majeur de leurs fonctions :

- Les racines de plantes modifient et maintiennent la structure du sol. La macrofaune fragmente, incorpore et décompose les produits organiques apportés au sol. La fragmentation altère la structure physique et la digestion altère la structure chimique ce qui modifie biodégradabilité des matières organiques apportées. De nombreux groupes de la faune du sol sont ainsi reconnus sur le court terme comme stimulant l'activité des micro-organismes et la biodégradation des matières organiques du sol (Winding *et al.*, 1997; Vidal *et al.*, 2017). La macrofaune des sols est également à l'origine de la formation de pores et d'agrégats via la production de matières fécales.

Dans le cadre de notre étude, les échantillons de sols utilisés pour les incubations en conditions contrôlées ont été tamisées à 5 mm négligeant de ce fait le rôle de la macrofaune.

- Les organismes appartenant à la mésofaune (200 µm à 2 mm) sont en partie responsables de la fragmentation des produits organiques apportés. Parmi la mésofaune, les acariens et les collemboles sont également capable de se nourrir de la microflore participant ainsi à la régulation des microorganismes décomposeurs. Par exemple, les protozoaires et nématodes bactérivores tendent à diminuer la densité de microorganismes (Trap *et al.*, 2016) ;

- Les micro-organismes regroupent tous les individus de petites tailles (< 100µm), qu'ils soient microfaune ou microflore du sol. Les microorganismes représentent environ 80% de la biomasse vivante du sol (Figure 4). Les groupes appartenant à la microflore ; et particulièrement les bactéries et les champignons, sont les principaux acteurs des modifications chimiques de la matière avec notamment : la décomposition des matières organiques (Six *et al.*, 2006), la phosphatase, l'oxydation et/ou la réduction des molécules azotées en fonction du milieu. Ils agissent également sur l'amélioration de la structure des sols. Les groupes appartenant à la microfaune ; et particulièrement les protozoaires et les nématodes, ont comme rôle principale de réguler les communautés de la microflore en raison de leur fonction de prédation. Ils affectent ainsi indirectement les cycles du C, de l'N et du P.

La connaissance fine des fonctions spécifiques des espèces et de leurs interactions reste peu connue ; notamment concernant les microorganismes en raison de leurs grandes diversités tant d'un point de vue taxonomique que fonctionnel (Curtis & Sloan, 2005). Par exemple, quelques milliers d'espèces de bactéries sont connues pour un nombre d'espèces estimé à plusieurs millions dans un gramme de sol (Gans *et al.*, 2005; Decaëns, 2010). Ordinairement, l'apport de produits organiques augmente la biomasse microbienne et modifie la structure et la diversité des communautés de microorganismes du sol (Sullivan *et al.*, 2006).

1.2.3. Les outils pour la caractérisation des communautés microbiennes des sols

Différentes approches sont possibles pour caractériser les communautés microbiennes des sols, apportant des informations distinctes (Tableau 1). Plusieurs stratégies méthodologiques sont distinguées avec notamment :

- La mesure directe de la biomasse microbienne totale notamment par fumigation ou dosage de l'ATP des sols. Ces approches historiquement très utilisées et normalisées sont uniquement quantitatives ;
- L'analyse de la cinétique de la respiration induite par l'apport d'un substrat qui permet d'obtenir une information quantitative sur les microorganismes actifs et leur taux de croissance spécifique. Cette approche a été utilisée afin de caractériser les modifications fonctionnelles des communautés microbienne à la suite de l'apport en digestat (Chen *et al.*, 2012) ;
- Le dosage enzymatique qui est une approche fonctionnelle de la vie microbienne très utilisée afin d'étudier les processus biologiques de la décomposition des matières organiques. Cette approche a été utilisée dans le cadre d'étude concernant la valeur amendante des digestats (Möller, 2015) ;
- L'analyse des phospholipides membranaires de microorganismes des sols permettant de quantifier la biomasse totale des microorganismes vivants et de caractériser la structure des communautés microbiennes ;
- Les approches moléculaires basées sur l'extraction de l'ADN (et de l'ARN) des sols permettent une caractérisation taxonomique fine des micro-organismes des sols.

L'ensemble de ces approches ont été utilisées au moins une fois dans le cadre de l'étude de la valeur amendante des digestats de méthanisation (Chen *et al.*, 2012; Johansen *et al.*, 2013; Pezzolla *et al.*, 2015; Möller, 2015). Parmi ces différentes méthodes, nous avons eu recourt à l'analyse des acides gras phospholipidiques (PLFA, Phospholipid fatty acids) des sols pour caractériser les communautés microbiennes des sols. Les phospholipides sont des composants essentiels des membranes de toutes les cellules vivantes. Les microorganismes produisent des chaines de PLFA de différentes longueur et composition afin de maintenir l'intégrité de leurs membranes et de leurs fonctions cellulaires en réponse à leurs conditions environnementales. Les PLFA de sol composés d'une chaine carbonée comprise entre 14 et 20 atomes de carbones proviennent essentiellement des membranes de bactéries et de champignons (Zelles, 1999). Extraits d'échantillons de sol sous forme d'acides gras, les PLFA apportent des connaissances quantitatives et qualitatives relatives à la biomasse microbienne

viable/active du sol. Les enzymes cellulaires hydrolysent et libèrent le groupe phosphate dans les minutes ou les heures qui suivent la mort cellulaire (White *et al.*, 1979). Les PLFA peuvent permettre une différentiation taxonomique à un niveau phénotypique à l'intérieur de communautés microbiennes complexes (Zelles & Bai, 1993). Cette méthode est particulièrement adaptée à la détection des modifications rapides de la structure de la communauté microbienne du sol. Elle est utilisée afin d'étudier la réponse des communautés microbiennes des sols cultivés faisant suite à la modification de leur environnement comme par exemple : l'apport de produits organiques (Moeskops *et al.*, 2012; D'Hose *et al.*, 2018), le travail du sol (Calderón *et al.*, 2001), la gestion des prairies (Patra *et al.*, 2008) ou la mise en culture de sols tropicaux (Bossio *et al.*, 2005).

Tableau 1 : Liste non exhaustive des différentes approches méthodologiques pour l'étude de la vie microbienne des sols d'après (Pascault, 2010)

Méthode		Procédure	Informations	Avantages	Inconvénients
Mesures de la densité microbienne	Fumigation-incubation ou Fumigation-extraction	Traitement du sol par un biocide (chloroforme) pour tuer les µorganismes puis comparaison CO_2 produit par l'activité biologique des sols non fumigés et fumigés après ensemencement (Jenkinson & Powlson, 1976) ou Comparaison carbone organique soluble des sols non fumigés et fumigés (Wu *et al.*, 1994)	Mesures indirectes de la biomasse microbienne des sols ($\mu gC.g^{-1}$)	• Normalisées • Très utilisée comme bioindicateur de la qualité des sols afin d'évaluer les effets d'une modification des agroécosystèmes	• Mesure seulement quantitative et non qualitative ne distinguant pas les domaines de µorganismes (arachaea, champignons, bactéries)
	Extraction ATP	Dosage de l'ATP extrait des µorganismes utilisé comme biomarqueur			
Dosage enzymatique		Sélection à partir d'un inventaire puis dosage des enzymes potentiellement impliquées dans les mécanismes étudiés	Richesse relative d'un sol en enzymes	• Approche fonctionnelle des mécanismes biologiques en œuvre	• Nécessite une sélection des enzymes dosées *à priori* • Difficultés d'interprétation car les enzymes restent actives quand elles sont stabilisées sur la matière organique ou la surface minérale

Méthode	Procédure	Informations	Avantages	Inconvénients
Analyse de la cinétique de la respiration induite par l'apport d'un substrat (Panikov & Sizova, 1996; Blagodatsky *et al.*, 2000)	Stimulation de l'activité des µorganismes d'un sol par l'apport d'un substrat lors d'une incubation en conditions contrôlées non limitantes. La description de la cinétique de la respiration induite d'après des paramètres mathématiques permet de caractériser la biomasse microbienne active	• Estimation de la biomasse microbienne active • Caractérisation fonctionnelle des communautés microbiennes actives	• Méthode fonctionnelle permettant de caractériser la biomasse microbienne active plutôt que la biomasse microbienne totale	• Peu utilisée • Le choix du substrat détermine les communautés stimulées • Ne reflète pas la diversité des µorganismes
Analyse des phospholipides à acides gras (PLFA)	Extraction, fractionnement, méthylation et chromatographie des phospholipides membranaires des µorganismes des sols utilisés comme biomarqueurs	• Caractérisation quantitative et qualitative des communautés microbiennes des sols	• Informations fournies pour une analyse : mesure des biomasses microbiennes, profils de la structure des communautés microbiennes, informations taxonomiques des communautés microbiennes. • Caractérisation des µorganismes actifs car les phospholipides se dégradent rapidement dans les sols	• Méthode difficile à mettre en œuvre, non normalisée • Classification taxonomique des µorganismes délicate à cause du manque de données qualitatives et quantitatives sur la distribution des acides gras au sein des taxons • Résolution moyenne de la diversité microbienne

Méthode	Procédure	Informations	Avantages	Inconvénients
Approches moléculaires basées sur l'ADN extrait du sol	Extraction ADN	• Caractérisation quantitative à partir de la biomasse moléculaire (bactérienne ou fongique)	• Fort potentiel des méthodes de caractérisation quantitative et qualitative ; • Résolution pouvant être très précise (espèce)	• Plusieurs méthodes complexes existent avec des caractéristiques propres nécessitant une spécialisation forte • Acquisition de références en cours pour la caractérisation taxonomique • Ne permet pas de différencier les µorganismes actifs et inactifs
	Amplification par PCR puis séquençage	• Inventaire taxonomique des espèces ciblées		
	Séquençage massif	• Diversité		

1.2.4. Les effets des apports en matières organiques sur la formation et la stabilité des agrégats

L'apport de matières organiques peut modifier la stabilité structurale soit directement, par action physico-chimique directe avec les particules de sol (facteur abiotiques), soit indirectement, au cours de la décomposition de la matière organique apportée par les organismes du sol (facteurs biologiques).

Différentes expériences ont visé à mettre en évidence l'effet direct d'un apport de matière organique sur la stabilité structurale, avec ou sans la médiation des micro-organismes. Martin & Waksman (1940) n'ont observé aucun effet de l'apport de produits organiques sur la stabilité structurale dans un sol stérilisé. En revanche, dans un sol non stérilisé, les auteurs ont pu mettre en relation l'augmentation de la stabilité structurale avec l'intensité de la biodégradation des matières organiques. Metzger *et al.* (1987) ont également mis en évidence une augmentation de la stabilité des agrégats à la suite de l'apport en produits organiques lors d'incubation en conditions contrôlées avec l'augmentation de l'activité microbienne mesurée évaluée par la mesure de la production de CO_2 des sols. L'inhibition sélective de certains groupes de microorganismes a permis de lier l'importance de l'activité fongique à l'augmentation de la stabilité des agrégats. Les auteurs suggèrent l'importance de la sécrétion d'osides et de la production de mycélium par les champignons sur la formation et la stabilisation des agrégats. Le facteur abiotique est notamment associé à la formation de microagrégats constitués de particules organominérales plutôt persistants (Jastrow *et al.*, 1997). L'action physico-chimique directe de l'apport de produit organique semble toutefois faible et sans doute négligeable dans la plupart des cas (Abiven *et al.*, 2009).

L'effet principal des matières organiques sur la structure des sols est principalement lié aux processus de décomposition par les micro-organismes (Linden *et al.*, 1994). Les micro-organismes influencent la structure des sols à travers deux principaux types d'agents agrégeant (Abiven, 2004; Figure 5) :

1. Des agents agrégeant transitoires comme par exemple des polysaccharides, qui peuvent être décomposés rapidement par les micro-organismes des sols. L'effet de ces agents agrégeant transitoires sont directement liés à l'intensité de l'activité des micro-organismes à la suite de l'apport de produits organiques ;
2. Des agents agrégeant temporaires, comme les hyphes mycéliens qui sont plutôt associés au développement des communautés de champignons à la suite de l'apport de produits organiques.

Sur la base des travaux de Monnier (1965), Abiven (2004) propose un schéma de synthèse présentant les effets de différents produits organiques sur la stabilité structurale en fonction de leur biodégradabilité (Figure 5). Quatre groupes sont distingués. Le premier groupe intègre les produits organiques dont les matières organiques sont pratiquement entièrement labiles entrainant une intense activité microbienne et une production importante d'agents agrégeant transitoires ayant un effet rapide et important mais peu durable sur la stabilité des agrégats des sols. Le second et le troisième groupe intègrent des produits organiques constitués d'un mélange de matières organiques labiles et récalcitrants entrainant une décomposition importante à moyenne, assez rapide à lente. La décomposition de ces produits organiques a pour effet : la production de facteurs agrégeant transitoires et temporaires. Le quatrième groupe est caractérisé par des produits organiques très peu biodégradables, stimulant peu l'activité biologique des sols et ayant peu d'effet sur la stabilité structurale des sols. La structure des sols est donc très dépendante des flux en produits organiques apportés stimulant l'activité biologique des sols. Le stock en matières organiques joue un rôle moindre dans le maintien de cette propriété des sols.

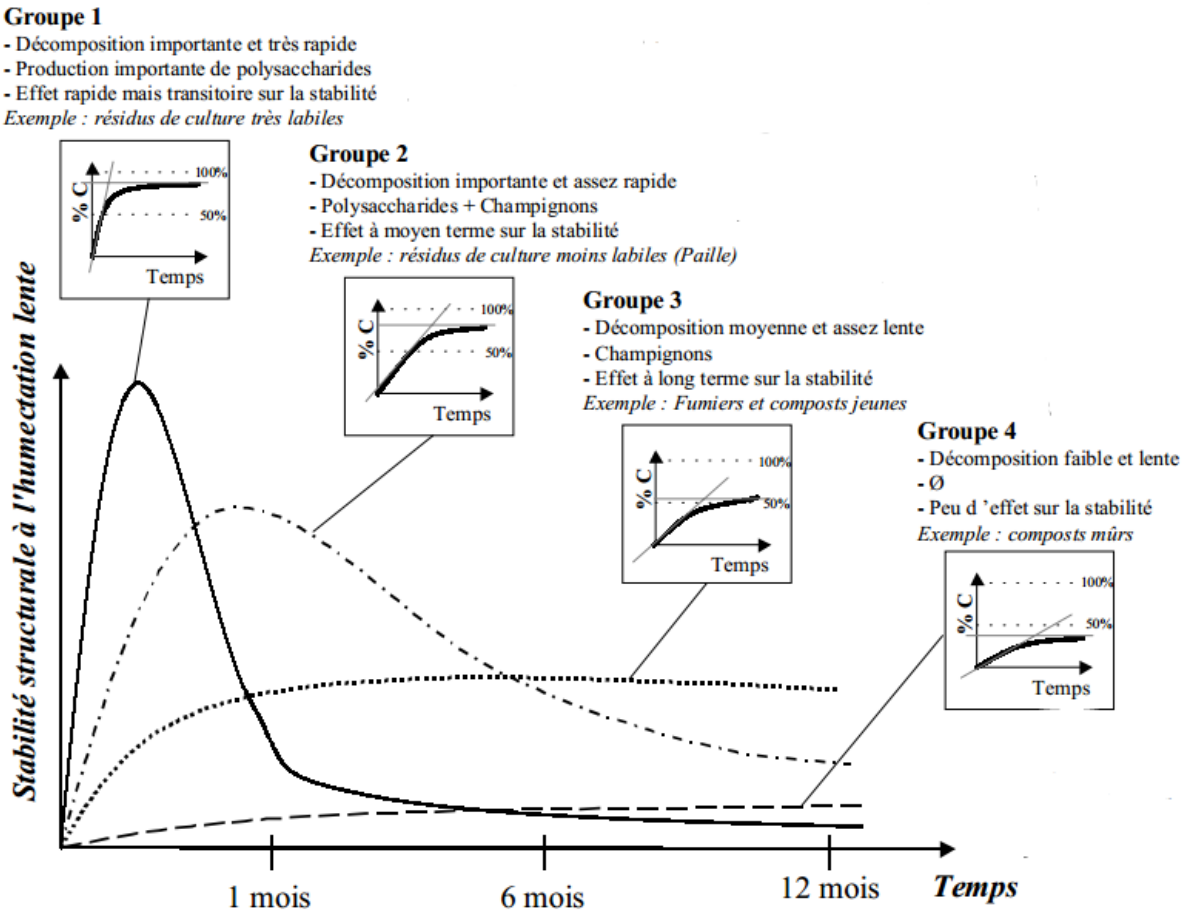


Figure 5 : Présentation schématique des effets des apports en produits organiques sur la stabilité structurale en fonction de la biodégradabilité de leurs matières organiques (Abiven, 2004)

1.2.5. Les effets des apports en matières organiques sur le complexe adsorbant

La Capacité d'Echange en Cations (CEC) est fortement liée à la minéralogie du sol dont notamment : la quantité et la nature des argiles, mais aussi à la quantité et aux types de matières organiques (Tableau 2). Les matières organiques stabilisées des sols ont une CEC plus élevées que les argiles. La CEC d'un sol varie avec le pH en raison, notamment de l'existence de deux types de charges au sein du complexe (Tableau 2). Les charges permanentes, indépendantes du milieu extérieur, résultent des substitutions d'ions au sein des feuillets des argiles (Duchaufour, 2001). Les charges variables apparaissent lorsque le pH du milieu extérieur s'élève en raison de la déprotonation des sites de bordures des minéraux argileux (oxydes ou hydroxydes) mais surtout à la surface des constituants organiques (groupes aminés, carboxylique ou phénolique par exemple) (Calvet *et al.*, 2015).

Composants du complexe		CEC ($cmol_{C+}$/kg)	Type de charges
Matières organiques issues de végétaux (non transformés)		0 à 20	Variables
Matières organiques stabilisées du sol		200 à 500	Variables
Argiles	Montmorillonites	100	Permanentes
	Vermiculites	100 à 150	
	Illites	20 à 50	
	Kaolinite	5 à 50	Variables
Allophanes		100	Variables

Tableau 2 : Capacités d'échange en cations de différents éléments des sols (Duchaufour, 2001)

L'importance des matières organiques dans la CEC d'un sol est très variable en raison de la forte variabilité des teneurs en argiles. En raison de leur faible teneur en argile et de leur nature (illites et/ou kaolinite, (Gavalda, 2001), la CEC des horizons de surface des Boulbènes utilisées pour l'étude est faible : environ 6 $cmol_{C+}$/kg (Gavalda *et al.*, 2005). La CEC des Boulbènes peut potentiellement être augmentée par le stockage de matières organiques (Tableau 2). Pour une CEC moyenne des matières organiques stabilisées d'un sol évaluée à 318 $cmol_{C+}$/kg (Parfitt *et al.*, 2008), une augmentation de 50% de la teneur en carbone d'un sol Boulbène, passant de 1 à 1,50 gC $100g_{MS}^{-1}$, entraine une augmentation de 27% de sa CEC ; passant de 6 à 7,6 $cmol_{C+}$/kg. Toutefois, pour augmenter la teneur en carbone de 1 à 1,50 gC $100g_{MS}^{-1}$, il est nécessaire de séquestrer environ 32,5 t_{MO} ha^{-1} (pour une profondeur de 0,25 m et une densité apparente de 1,3 t m^{-3}). Pour séquestrer cette quantité de matières organiques dans un sol, il est nécessaire d'apporter environ 250 t_{MB} de fumier (Indice de Stabilité de la Matière Organique ISMO de 65% Figure 14, teneur en MO/MB de 20%) soit 25 t_{MB} an^{-1} durant 10 ans en plus des produits organiques déjà apportés. Afin d'augmenter plus

efficacement la CEC des sols, il est possible d'apporter des produits organiques ayant une forte CEC intrinsèque et composés de matières organiques récalcitrantes à la biodégradation.

Par exemple, Glaser & Birk (2012) ont étudié le cas des sols d'Amazonie centrale. En Amazonie centrale, les Ferrasols typiques sont notamment caractérisés par une faible teneur en matières organiques et une minéralogie des argiles induisant une faible CEC. La CEC, et d'autres propriétés du sol comme sa stabilité structurale, sont fortement impactés par la diminution des teneurs en matières organiques associée au défrichage puis à leur mise en culture. Les matières organiques sont rapidement minéralisées en raison des conditions de température et d'humidité favorisant l'activité des microorganismes. L'apport de produits organiques issus des résidus végétaux des cultures, très biodégradables, ne permettent pas d'augmenter la teneur des sols en matières organiques. Ainsi, la CEC des Ferrasols typiques cultivés est relativement faible (inférieure à 12 cmolC+/kg). La fertilité intrinsèque de ces sols est ainsi limitée par ses propriétés physiques et chimiques. Dans certaines parcelles, les Ferrasols typiques ont été transformés en « Terra preta de Indio » par l'action de l'Homme. Les « Terra preta », littéralement les sols noirs, sont des sols anthopisés riches en matières organiques (Plaggique) notamment caractérisés par un pH moins acide que les Ferrasols Typiques, une plus grande CEC (13 à 25 $cmol_{C+}$/kg) et teneur en nutriments plus importantes (Glaser & Birk, 2012). L'amélioration de ces propriétés favorisent le développement des végétaux en augmentant en moyenne leur production de biomasse de 10% par rapport au sol témoin (Crane-Droesch et al. 2013). Les « Terra preta » ont été formés par l'apport de produits organiques pyrogéniques, c'est-à-dire modifiée par l'action de la chaleur en absence d'oxygène (entre 250 et 1000°C). Les biochars, différenciés des autres produits organiques pyrogéniques par leur vocation à être incorporés au sol pour des raisons agronomiques et environnementales (Brown *et al.*, 2015), ont pour principales caractéristiques : une forte récalcitrance à la biodégradation biologique (structure aromatique condensée), dans certains cas une forte CEC (20 à 600 cmolC+/kg), un pH basique et une augmentation de la surface spécifique (Lehmann & Joseph, 2015). L'apport de produits organiques pyrogènes a donc permis d'améliorer durablement les propriétés chimiques des Ferrasols typiques en raison de leur forte stabilité et de leur CEC importante. De la même manière les produits organiques compostés améliorent durablement les propriétés chimiques des sols dont notamment la CEC (Warman, 2005) en raison de la récalcitrance de leur matières organiques et de leur CEC intrinsèque (Bernal *et al.*, 2009).

L'augmentation de la CEC d'un sol cultivé peut donc être induite l'apport de matières organiques peu biodégradables dont les groupes fonctionnels sont ionisés.

1.2.6. La gestion quantitative du stock en matières organiques dans les sols

Les chapitres précédents ont permis de mettre en évidence l'importance de la gestion des flux, des stocks et des teneurs en matières organiques pour la gestion des qualités des sols. Les flux améliorent notamment la fertilité physique des sols via la stimulation de la vie microbienne. La stimulation de la vie microbienne dépend de la quantité et de la nature des produits organiques apportés (Figure 6). La teneur en matières organiques influence notamment la fertilité chimique des sols (Figure 1, Figure 2). L'augmentation des stocks en matières organiques permettent une utilisation des sols comme puit de carbone (Figure 3). Ce chapitre a pour objectif de présenter les concepts associés à la gestion du stockage en matières organiques dans les sols agricoles. L'unité de base de la mesure des flux en matières organiques dans les sols est le carbone. Deux éléments permettent d'expliquer l'importance du stock en carbone dans le sol : sa profondeur et sa teneur.

1.2.6.1. La prédiction de l'évolution des teneurs en matières organiques

La réalisation d'un bilan prévisionnel entre les flux entrants issus des apports en matières organiques et les flux sortants issus de leur minéralisation sous forme de CO_2 permet de prédire l'évolution du stockage en C (Figure 6). Afin de modéliser leur minéralisation annuelle, les matières organiques du sol sont fractionnées (conceptuellement et analytiquement) en compartiments fonctionnels. Le plus simple des modèles est basé sur deux compartiments (Hénin & Dupuis, 1945). Le premier compartiment désigne les matières organiques apportées au sol et le second les matières organiques endogènes au sol :

- L'indice de stabilité (historiquement désigné : « coefficient d'humification » ou « K1 »), est attribué à chaque produit organique apporté au sol et désigne le pourcentage de matières organiques intégrées au compartiment des matières organiques endogènes au sol. Les matières organiques apportées sont considérées comme intégrées au compartiment des matières organiques endogènes lorsque leur vitesse de minéralisation sont identiques (Lashermes *et al.*, 2009).

- Le coefficient de minéralisation de la matière organique endogène (historiquement de l'humus ou « K2 ») désigne le pourcentage du stock en matières organiques endogènes qui est minéralisé chaque année. A partir de ce modèle, il est donc possible de calculer la quantité de produits organiques à apporter chaque année au sol afin de maintenir ou augmenter la teneur en matières organiques.

D'autres modèles ont depuis été proposés afin de prévoir de façon plus efficace l'évolution des stocks de carbone dans les sols cultivés ; constatée lors des essais de très longue durée. Les modèles AMG à trois compartiments (Andriulo *et al.*, 1999), RothC à 5 compartiments (Coleman & Jenkinson, 1996) et CENTURY à 6 compartiments (Parton *et al.*, 1987, 1993) sont les plus utilisés. Cependant, les différents compartiments des matières organiques endogènes sont difficilement caractérisables et il est donc difficile de paramétrer leur cinétique.

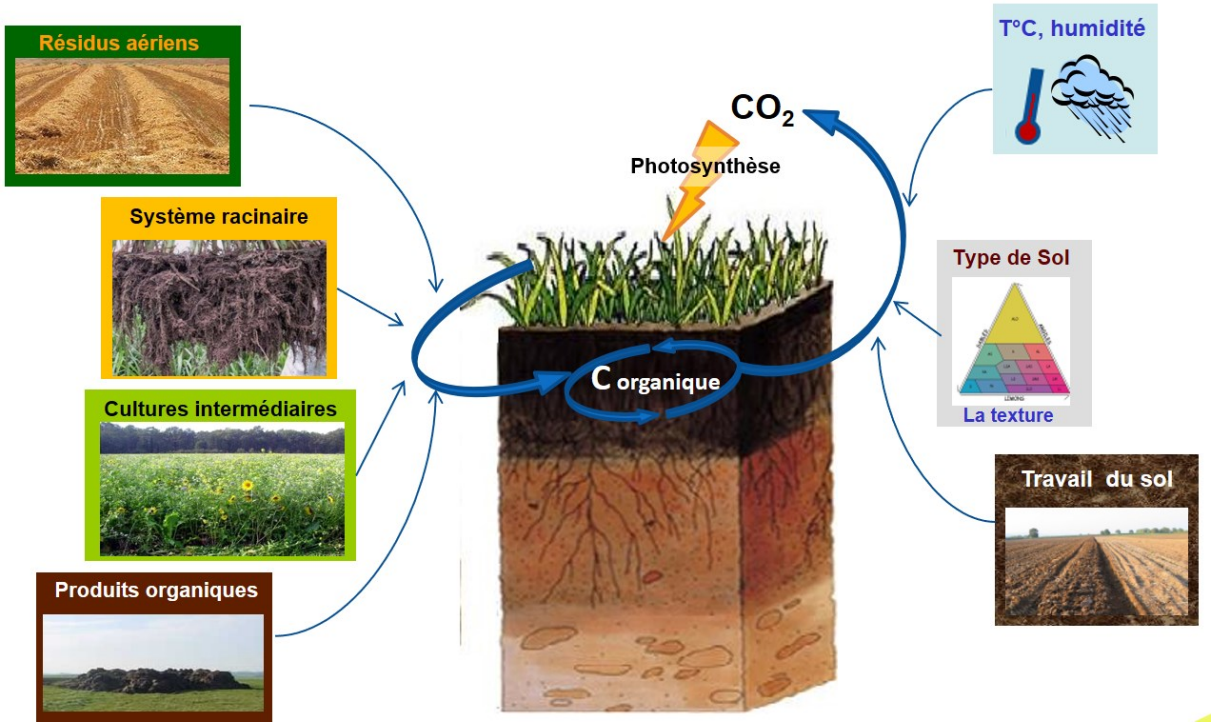


Figure 6 : Principe du bilan entre les entrées et les sorties en matières organiques dans les sols agricoles. (Duparque et al.*, 2016)*

1.2.6.2. Les leviers pour l'augmentation des teneurs en matières organiques au sein des sols cultivés (cultures annuelles)

Plusieurs leviers peuvent être explorés afin d'augmenter le stockage de carbone dans les sols cultivés : 1. la diminution des flux sortants annuels en carbone via le ralentissement de l'activité biologique, 2. l'augmentation des flux entrants annuels en carbone afin qu'ils soient supérieurs aux flux sortants, 3. l'augmentation de la durée moyenne de résidence des matières organiques apportées aux sols.

1. La majeure partie de la décomposition des matières organiques est réalisée par les micro-organismes hétérotrophes. Les différents facteurs influençant la décomposition des matières organiques apportées sont liées à l'activité de ces micro-organismes. Leur activité dépend des conditions du milieu avec en premier lieu : la température, l'humidité et la biodisponibilité en O_2 (Swift *et al.*, 1979), le pH du sol et le potentiel redox (Cottes *et al.*, 2019). Lorsqu'au moins un de ces facteurs est limitant, l'activité biologique s'en trouve ralentie favorisant ainsi le stockage de carbone à condition qu'une biomasse nécessaire aux flux entrants en carbone soit présente. Certains cas extrêmes illustrent ces aspects dont notamment : les pergélisols, les tourbières et les podzols. Les conditions du milieu dépendent notamment : du climat et des caractéristiques intrinsèques des sols. Par exemple, Thomsen *et al. (*1999) ont mis en évidence l'influence indirecte de la texture sur le décomposition des matières organiques des sols via la modification de la structure et de la biodisponibilité en eau et en O_2 en résultant. La sensibilité moindre des sols en conditions tempérées au déstockage de carbone par rapport aux sols cultivés en zones tropicales peut notamment s'expliquer par leur différence de température (Minasny *et al.*, 2017) mais également par les teneurs en argiles globalement faibles du fait de leur lessivage. Alvarez *et al.* (1995) attribuent la diminution de la respiration basale des sols conduits en semis direct sous couvert à la diminution de leur température. Cependant Dimassi *et al. (*2014) ont montré à l'issue d'un essai au champ à long terme (41 années) que l'absence de travail du sol n'induit pas une augmentation du stockage en C mais plutôt une stratification du stockage de C avec une augmentation des teneurs sur l'horizon de surface et une diminution sur les horizons profonds.

2. L'augmentation des flux entrants en carbone est une solution explorée afin d'améliorer la fertilité des sols notamment à travers l'implantation des cultures intermédiaires, et des couverts végétaux dans le cadre des techniques de semis direct sous couverture végétale permanente (Séguy *et al.*, 2012). Une culture intermédiaire est implantée entre la récolte d'une culture principale et le semis de la culture suivante pendant une

période plus ou moins longue appelée interculture. L'implantation d'une culture permet de capter du carbone supplémentaire via la photosynthèse par rapport à un sol nu. La méta-analyse réalisée par Poeplau & Don, (2015) valide l'intérêt de cette pratique afin d'augmenter le stockage du carbone dans les sols. L'augmentation des teneurs en C induit une augmentation de la quantité de matières organiques potentiellement minéralisée sur une année qui doit être compensée par une augmentation de la quantité de biomasse retournée au sol. La production de la biomasse est potentiellement favorisée par l'amélioration des propriétés physico-chimiques et biologiques induite par l'augmentation des teneurs en C initiant une augmentation graduelle de la photosynthèse jusqu'à la rencontre d'un facteur limitant.

3. Wang *et al. (*2010) ont étudié l'influence du choix de l'espèce implantée en culture intermédiaire sur le stockage de carbone dans les sols. L'étude, réalisée en conditions contrôlées (phytotron) souligne l'influence de deux paramètres : la quantité de C apportée au sol et les caractéristiques des matières organiques apportées. Par exemple, dans cette étude, la culture du triticale induit un stockage de 266,2 gC par m² contre 71,8 gC par m² pour le trèfle blanc après 127 jours d'incubation. Cette différence s'explique par : l'importante quantité de biomasse aérienne du triticale (341,6 g par m²) par rapport au trèfle blanc (136,1 g par m²) et par la proportion du carbone apporté décomposé (22% pour le triticale contre 47% pour le trèfle blanc). Les auteurs attribuent la plus forte décomposition du trèfle blanc par rapport au triticale à son ratio C/N et à sa composition biochimique (Vanlauwe *et al.*, 1996). Ainsi, au-delà, de la quantité de carbone apportée aux sols, la durée moyenne de rétention de la matière organique apportée est un éléments clef de l'augmentation de son stockage. La durée moyenne de rétention des matières organiques apportées est fortement déterminée par ses caractéristiques intrinsèques.

L'augmentation des flux entrants en C dans le sol et l'augmentation du temps moyen de résidence du C apporté sont donc les solutions à privilégier afin d'augmenter le stockage de carbone dans les sols. Au-delà de la mitigation de la concentration en CO_2 dans l'atmosphère, l'augmentation des teneurs en carbone dans les sols modifient leur fonctionnement biologique et physico-chimique améliorant ainsi leur fertilité comme démontré par Marenya & Barrett (2009).

1.2.7. Les concepts expliquant le devenir des matières organiques apportées dans les sols

Afin d'augmenter le stockage du carbone, il est nécessaire d'augmenter la durée moyenne de résidence des matières organiques dans les sols. Pour cela, un des leviers identifiés consiste à diminuer la sensibilité des matières organiques apportées à la biodégradation ; c.à.d. augmenter leur stabilité (Sollins *et al.*, 1996). Ce chapitre a pour objectif de présenter les principaux mécanismes associés à la stabilité des matières organiques dans les sols.

1.2.7.1. Le concept historique de l'humification

Le premier modèle conceptuel décrivant le devenir des matières organiques dans les sols est celui de l'humification. Le paradigme de l'humification repose sur l'observation de l'accumulation de matières organiques dans de nombreux sols. La première hypothèse expliquant cette accumulation est la synthèse de macromolécules intrinsèquement non biodégradables à partir de précurseurs issus des matières organiques apportées dans les sols. De nombreux auteurs ont cherché à isoler ces molécules intrinsèquement non biodégradables. La méthode de fractionnement chimique des matières organiques, développée par F. C. Achard (1753-1821) et J. J. Berzelius (1759-1848) puis standardisée par (Swift, 1996) est notamment utilisée pour extraire les composés organiques considérés comme non assimilables appelés : « acides humiques ». Les acides humiques correspondent à une fraction insoluble à la suite d'une succession d'extraction au sein de solutions alcaline puis acides. Les différents compartiments de matières organiques extraites lors des étapes successives de la procédure d'extraction sont de moins en moins sensibles aux phénomènes de déstabilisations chimiques et donc considérées comme potentiellement plus récalcitrantes aux processus de biodégradation. Les pionniers de la datation par carbone 14 ont mis en évidence un temps moyen de résidence dans les sols de la fraction « acides humiques » extrêmement long (1400 ans, Campbell *et al.*, 1967) par rapport aux matières organiques particulaires plutôt récalcitrante telle que la lignine (5 à 30 ans, Amelung *et al.*, 2008). Ce concept et la méthode de caractérisation associée sont bien adaptés aux modèles de prédiction de l'évolution des teneurs en matières organiques des sols basés sur leur compartimentation fonctionnelle d'après leur temps moyen de résidence. Cependant, la fidélité de cette vision fonctionnelle pour décrire la stabilité des matières organiques semble limitée. Kleber & Johnson (2010) soulignent notamment que l'extraction des « acides humiques » est une méthode de fractionnement des matières organiques des sols altérant et modifiant leur nature rendant incertaines les explications de leur stabilité basées sur leurs caractérisations. Les nouvelles méthodes d'observations *in situ* (spectroscopie par Résonance Magnétique

Nucléaire, spectroscopie de structure près du front d'absorption de rayons X, spectroscopie de masse d'ionisation par éléctronébuliseur, microscopie) ont permis de mettre en évidence d'autres mécanismes de stabilisation basés sur des associations dynamiques de molécules de faible poids moléculaire stabilisés par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes (Sutton & Sposito, 2005).

1.2.7.2. Les mécanismes de stabilisation et de déstabilisation associés à la vision dynamique du devenir des matières organiques

La représentation historique de l'humification évolue progressivement vers une vision dynamique des matières organiques des sols considérée plutôt comme un « continuum » de particules de nature chimique variée, présentant des niveaux d'organisation et de stabilisation différents ; et dynamiques (Crow *et al.*, 2006, Figure 7). Cette vision de la stabilité des matières organiques intègre la récalcitrance primaire des matières organiques apportées et tient compte également, de différents mécanismes de stabilisation et de déstabilisation. Les mécanismes pris en compte sont notamment (Sollins *et al.*, 1996; Lützow *et al.*, 2006) :

- Les interactions physico-chimiques avec les surfaces des particules d'argiles, l'aluminium et les oxydes de fer (Kopittke *et al.*, 2020) ;
- La diminution de l'accessibilité physique aux microorganismes à la suite de la formation d'agrégats.

L'augmentation du degré d'oxydation des composés organiques lors de leur décomposition (et de leur néoformation via les constituants des microorganismes) favorise leur solubilité dans l'eau et donc leur biodisponibilité mais également les opportunités d'être stabilisés via des interactions avec les surfaces minérales et d'être incorporés au sein d'agrégats (Sollins *et al.*, 1996).

Bien qu'abondamment étudiés depuis des décennies, les mécanismes du devenir des matières organiques dans les sols ne sont pas entièrement élucidés du fait de la diversité et de la complexité des phénomènes biologiques, chimiques et physiques en jeu. Les matières organiques des sols restent le matériau le plus complexe sur Terre (Young & Crawford, 2004).

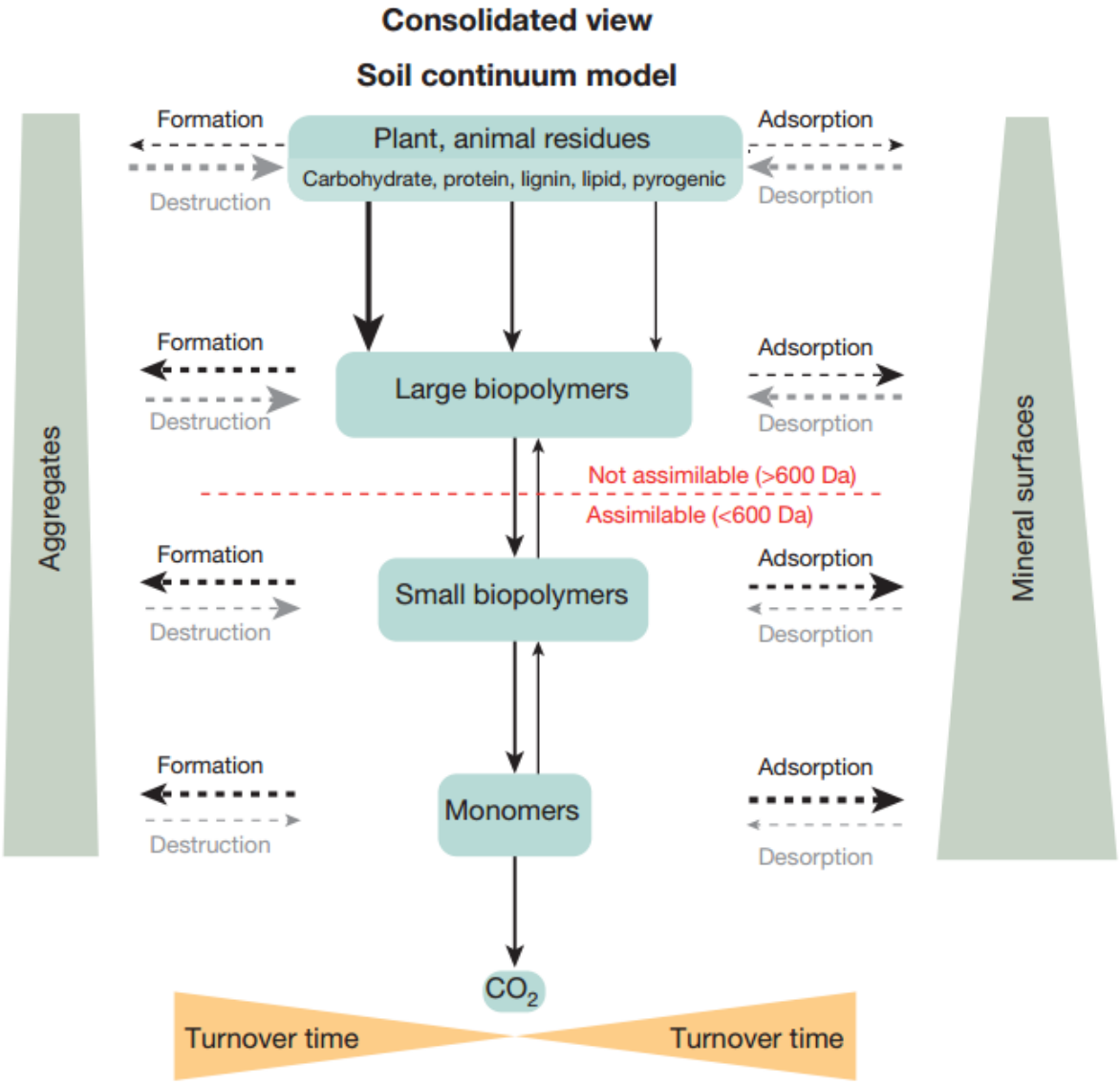


Figure 7 : Modèle conceptuel de la transformation continuelle du continuum des matières organiques mortes dans les sols (Lehmann & Kleber, 2015). Les flèches en pointillés de la Figure 7 représentent plutôt des transferts abiotiques et les flèches unies des transferts sous l'effet de processus biotiques. La stabilité des matières organiques dans les sols dépend de mécanismes biotiques : désignés par la récalcitrance et par des mécanismes abiotiques comme la formation d'agrégats et l'adsorption par surfaces minérales. Au-delà, de la résistance intrinsèque de certains composés organiques à la biodégradation, ce modèle envisage la décomposition des matières organiques comme un problème logistique dont les modalités clefs sont : l'écologie microbienne, l'activité enzymatique, des facteurs environnementaux et des matrices de protection. Ce modèle prend en compte à la fois l'influence du milieu (type de sol, climat, vie microbienne) et celle de la composition des matières organiques apportées sur leur devenir dans les sols.

1.2.8. La contribution de la modification temporaire de la dynamique des matières organiques endogènes à la suite de l'apport de produits organiques au stockage de carbone : les effets « priming »

Deux aspects expliquent la quantité de carbone effectivement stocké dans un sol à la suite de l'apport d'un produit organique :

- La stabilité des matières organiques apportées définie fonctionnellement comme la proportion de carbone issu du produit organique apporté qui sera effectivement intégré au compartiment des matières organiques endogènes du sol à terme (c.à.d ayant une vitesse de décomposition identique ou plus faible que celle des matières organiques endogènes aux sols). Les matières organiques apportées subissent de nombreuses transformations (oxydation, néoformation via leur intégration au sein de microorganismes) avant d'atteindre une certaine stabilité (Figure 7) ;
- Le changement temporaire de la minéralisation des matières organiques endogènes au sol induit par l'apport d'un produit organique. Ce phénomène est appelé effet « priming » (Kuzyakov & Bol, 2006).

Au-delà des conditions environnementales (température, humidité, biodisponibilité de l'oxygène, pH, etc.), le principal facteur limitant de la biodégradation des matières organiques par les microorganismes hétérotrophes est la fourniture d'énergie par l'apport de produits organiques (Blagodatskaya *et al.*, 2009). Ainsi, la biodégradation des matières organiques endogènes est influencée par la quantité, les caractéristiques et les fréquences des apports en produits organiques. Le changement temporaire des procédés de minéralisation peut également être induit par l'apport d'un élément comblant un facteur limitant pour le développement de la biomasse microbienne. L'effet « priming » a été décrit à la suite de l'apport de différents éléments comme : C, de N (Jenkinson *et al.*, 1985), de P (Kuzyakov *et al.*, 2000) ou de S (O'donnell *et al.*, 1994) (Chapman, 1997). L'étude porte uniquement sur l'effet priming associé au cycle du carbone.

1.2.8.1. Les effets « priming » positifs, négatif, apparent et réel

L'effet « priming » peut être distingué selon qu'il soit positif ou négatif (Figure 8). Un effet « priming » positif désigne une accélération de la décomposition des matières organiques endogènes à la suite de l'apport d'un produit stimulant l'activité microbienne des sols. Au contraire, un effet « priming » négatif désigne un ralentissement de la décomposition des matières organiques endogènes.

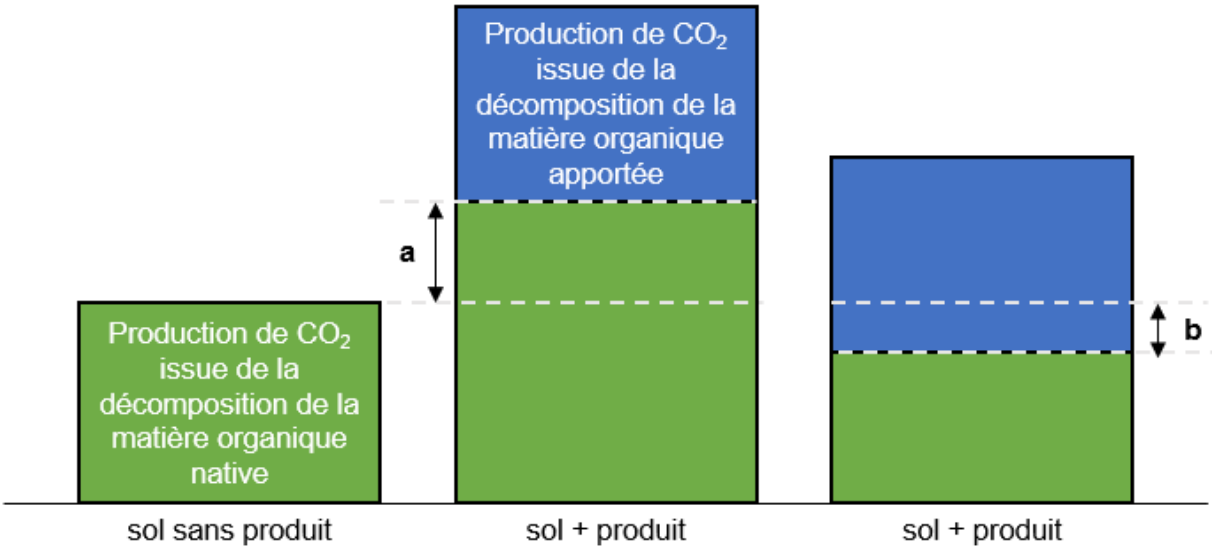


Figure 8 : Schéma des effets "priming" à la suite de l'apport en matière organique. (a) Effet « priming » positif : accélération de la décomposition de la matière organique endogène (i.e. native). (b) Effet « priming » négatif : ralentissement de la décomposition de la matière organique endogène (i.e. native). D'après (Kuzyakov et al.*, 2000)*

L'effet « priming » peut également être distingué selon qu'il soit « apparent » ou « réel » :

- L'effet « priming » apparent, est une modification temporaire de la vitesse de minéralisation des matières organiques endogènes déjà déstabilisées (biodisponibles) des sols intervenant rapidement après l'apport d'un produit organique ou inorganique. Il n'a pas d'effet sur le stock en matières organiques des sols à terme car il ne joue pas de rôle dans les mécanismes de stabilisation/déstabilisation. Les communautés microbiennes associées à ce phénomène sont identifiées comme ayant des « stratégies r » (c.à.d ayant une croissance rapide). Plusieurs cas de figures ont été identifiés (Blagodatskaya & Kuzyakov, 2008):
    - La stimulation du métabolisme des micro-organismes (« triggering effect ») à la suite d'un apport modéré en carbone biodisponible entrainant une augmentation modérée de leur respiration et donc de l'intensité de la minéralisation des matières organiques labiles présentes dans le sol. Cette stimulation est quasi immédiate (quelques minutes à quelques heures).
    - La croissance des communautés microbiennes (« pool substitution ») pour faire face à un apport conséquent en matières organiques biodisponibles entrainant une augmentation importante de l'intensité de la minéralisation des matières organiques endogènes biodisponibles du sol (Jenkinson *et al.*, 1985). Ce phénomène intervient après la stimulation du métabolisme des micro-organismes (quelques heures).
    - La dégradation préférentielle matières organiques apportés par rapport aux matières organiques natives des sols (« Preférential Substrate Utilization »)

entrainant un priming « effect » apparent négatif. Dans le cas d'un effet « priming » apparent, ce phénomène est contrebalancé par les deux premiers cas de figure.

- L'effet « priming » réel correspond à une modification de l'équilibre entre les mécanismes de déstabilisation et de stabilisation des matières organiques natives des sols. Il est transitoire et fait suite à la stimulation des micro-organismes des sols par l'apport d'un produit organique ou inorganique. Les phénomènes de stabilisation et de déstabilisation reviennent ensuite à leur état initial (Kuzyakov & Bol, 2006; Blagodatskaya & Kuzyakov, 2008). Lors de l'apport de matières organiques labiles, ce déséquilibre est en faveur de la déstabilisation des matières organiques natives entrainant un effet « priming » positif réel. Ainsi, même si l'apport de matières organiques conduit au stockage de carbone dans les sols, un déstockage des matière organiques natives peut avoir lieu en parallèle (Kögel-Knabner, 2017).

1.2.8.2. L'effet « priming » positif réel à la suite de l'apport en matières organiques labiles : le cas de l'exsudation racinaire

L'effet « priming » positif réel est associé à la capacité des micro-organismes du sol à utiliser un apport de matières organiques labiles comme source d'énergie afin de décomposer les matières organiques endogènes récalcitrantes (Fontaine *et al.*, 2011). Les sources de matières organiques labiles peuvent être des produits organiques (Blagodatskaya *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014) mais également des exsudats racinaires. Les effets « priming » associés à la rhizodéposition sont particulièrement étudiés en raison de leur rôle dans la nutrition des plantes à travers la régulation du stockage et du déstockage des nutriments du sol en fonction de la végétation en place (Fontaine *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2016).

La Figure 9 illustre les mécanismes possibles de la succession des effets « priming » positifs apparent et réel dans le cas d'un apport en matières organiques labiles par les racines (exsudats). Ils sont expliqués par l'activité et le développement des différentes communautés en microorganismes. L'analyse des communautés de microorganismes par extraction des phospholipides des sols couplée au marquage isotopique (^{13}C) a montré que les bactéries représentent le premier groupe à métaboliser la majorité des matières organiques labiles apportées au sol (Moore-Kucera & Dick, 2008; Paterson *et al.*, 2009). Les bactéries sont plutôt associées à une stratégie de « comportement » démographie « r ». Les stratèges « r » manifestent de fortes aptitudes à coloniser des milieux nouveaux, instables et éphémères, grâce à un taux de reproduction élevé, un développement rapide et une bonne capacité de dispersion (Gobat *et al.*, 2003). La stimulation du métabolisme des micro-organismes ayant

une stratégie « r » entraine l'augmentation de l'intensité de la minéralisation des matières organiques endogènes labiles présentes dans le sol (« triggering effect ») se traduisant par un effet « priming » apparent. L'effet « priming » réel, apparaissant dans un deuxième temps, est attribuée aux micro-organismes ayant une stratégie « K ». Les stratèges « K » (Gobat *et al.*, 2003) ont des niches écologiques plus spécialisés qu'ils maintiennent grâce à leurs aptitudes compétitives. La survie de ces espèces repose sur la spécialisation. Leur fécondité est limitée par la capacité du milieu. La sélection « K » favorise l'efficacité dans l'exploitation du milieu. Fontaine *et al.* (2003) ont suggéré que le développement des stratèges « K » se fait à partir de la nécromasse des stratèges « r » à la suite de l'épuisement des matières organiques labiles. Les champignons sont identifiés comme étant les plus adaptés pour augmenter la décomposition des matières organiques endogènes, car ils sont spécialisés dans le catabolisme des composés organiques récalcitrants (Otten *et al.*, 2001) et adaptés à la prospection extensive de sources de matières organiques grâce à leur mycéliums (Fontaine *et al.*, 2011). Toutefois, les micro-organismes responsables de l'effet « priming » positif ne se résument pas seulement aux champignons. Nottingham *et al. (*2009) ont montré grâce à l'analyse des communautés de microorganismes par extraction des phospholipides des sols couplée au marquage isotopique (^{13}C) que les bactéries à Gram négatif sont également impliquées dans l'effet "priming" positif. De même, tous les taxons appartement aux champignons ne sont pas impliqués dans l'effet « priming ». Par exemple, Shahzad *et al. (*2015) ont observé une faible corrélation entre le développement des champignons mycorhiziens arbusculaires et l'effet « priming » réel positif.

Les mécanismes décrits sont particulièrement valables lorsque l'énergie disponible est limitante pour le développement des organismes hétérotrophes. C'est notamment le cas pour les sols cultivés pour lesquels l'apport de produits organiques est modéré et ponctuel ou pour les horizons inférieurs (Fontaine *et al.*, 2007). Dans les cas où les milieux sont riches en matières organiques comme les horizons supérieurs des sols forestiers, le facteur limitant au déclenchement des effets « priming » semble alors être la stœchiométrie du milieu et notamment le faible ratio C:N (Chen *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2016).

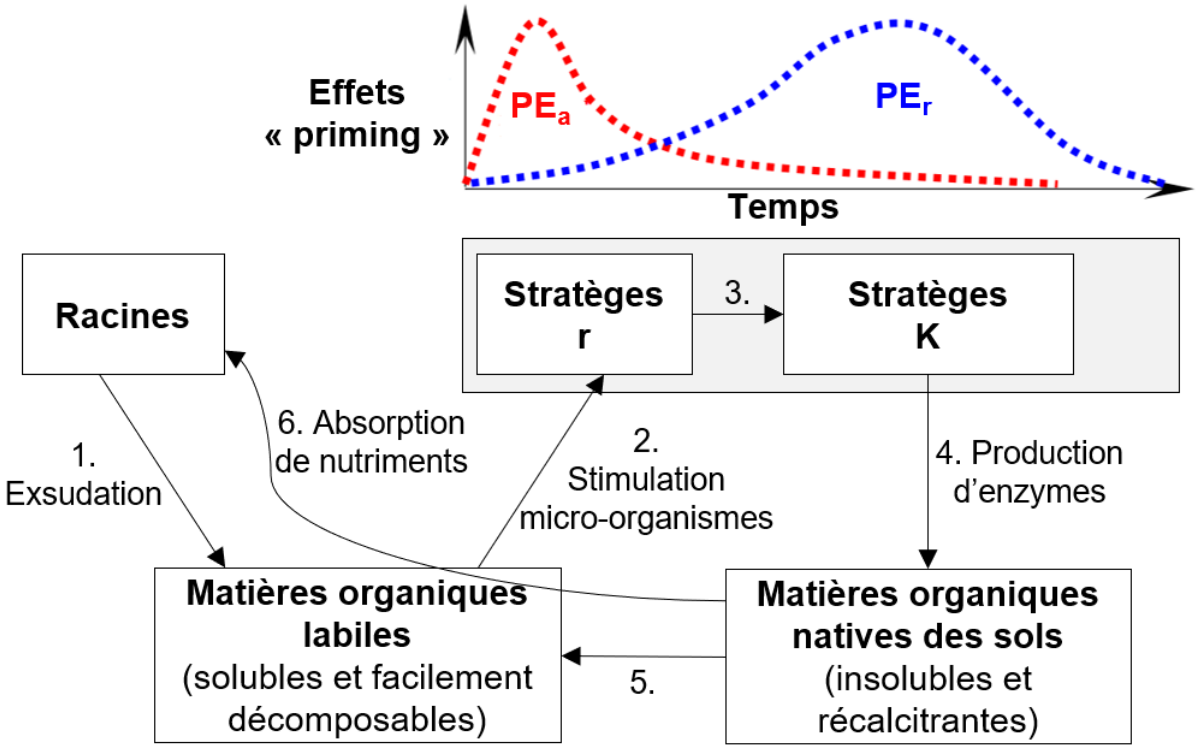


Figure 9 : Schéma conceptuel des processus à l'origine des effets « priming » apparent (PEa) et réel (PEr) associés à l'exsudation racinaire. 1. Apport par les racines de matières organiques labiles par rhizodéposition. 2. Stimulation des microorganismes ayant une stratégie de croissance rapide (r). 3. Stimulation des microorganismes ayant une stratégie de croissance lente (K). 4. et 5. Déstabilisation puis décomposition des matières organiques endogènes des sols. 6. Absorption par les racines des éléments minéraux issus de la décomposition des matières organiques apportées et endogènes. D'après (Kuzyakov, 2010)

1.2.8.3. L'effet « priming » négatif réel : le cas des biochars

L'effet « priming » négatif réel est moins souvent mentionné que l'effet « priming » positif réel. Dans la revue bibliographique réalisée par Kuzyakov *et al.* (2000), un effet « priming » réel positif est rapporté dans 46 publications et un effet « priming » négatif dans 16 publications. Toutefois, l'étude bibliographique réalisée par Wang *et al.* (2016) montre que cette tendance s'inverse dans le cas de l'apport de biochar. Un biochar est le produit solide de la pyrolyse qui est défini comme le chauffage d'une biomasse en l'absence (ou en quantité limitée) d'oxygène, à plus de 250°C (Lehmann & Joseph, 2015). A partir des cinétiques des effets « priming » lors d'incubations, Zimmerman *et al.* (2011) proposent une explication des mécanismes associés à l'effet « priming » négatif réel à la suite de l'apport de biochars. Dans un premier temps, l'apport de biochars et notamment ceux comportant des teneurs en matières organiques labiles les moins faibles entraine un effet « priming » positif apparent associé au développement des microorganismes ayant une stratégie de développement rapide (r). Dans un deuxième temps, l'effet « priming » positif apparent fait place à un effet « priming » négatif réel. Les auteurs attribuent cet effet « priming » négatif réel à : l'adsorption des matières

organiques endogènes par la matière organiques des biochars augmentant ainsi leur stabilité (Zimmerman *et al.*, 2011) et/ou à l'adsorption des enzymes extracellulaires des micro-organismes ayant une stratégies K réduisant leur capacité à déstabiliser les matières organiques endogènes (Maestrini *et al.*, 2015). La capacité de sorption des composés organiques par les biochars sont reconnues par la communauté scientifique (Ahmad *et al.*, 2014; Lehmann & Joseph, 2015).

1.2.8.4. Les méthodes de quantification des effets « priming »

La quantification des effets « priming » nécessite de différencier les atomes de carbone des matières organiques apportées et ceux des matières organiques endogènes (Figure 8). Deux méthodes existent pour différencier les atomes de carbone des matières organiques : l'utilisation de la différence naturelle de l'abondance en isotopes de carbone 13 (^{13}C) selon le type photosynthèse des plantes (C_3 ou C_4) ou le marquage par la culture des plantes dans une atmosphère ayant un ratio isotopique (^{13}C ou ^{14}C) enrichi ou appauvri. Afin de quantifier les effets « priming », les modèles de notre étude sont donc : le maïs (plante en C4) et des sols sur lesquels uniquement des plantes en C3 ont été cultivés.

Les effets « priming » sont quantifiés en deux étapes (Kuzyakov, 2010, Figure 8) :

1. En calculant la respiration basale des sols amendés ; c.à.d la proportion du CO_2 produit par les sols amendés associée à la décomposition des matières organiques natives ;
2. En soustrayant la quantité de CO_2 produite par les sols témoins non amendés à celle associée à la respiration basale des sols amendés.

Les effets « priming » apparent, provenant d'une modification du taux de renouvellement de la biomasse microbienne, et réel, provenant d'une modification de la vitesse de décomposition des matières organiques endogènes, ne peuvent pas être différenciés par la méthode du marquage isotopique. L'effet « priming » observé résulte d'une combinaison des effet « priming » apparent et réel. Kuzyakov (2010) souligne que l'effet « priming » apparent s'observe très rapidement après l'apport d'un produit organique (jusqu'à 3 jours) et que l'effet « priming » réel opère plutôt après quelques jours. Ainsi, l'importance relative de l'effet « priming » apparent par rapport à l'effet « priming » réel diminue au cours du temps.

1.2.9. Les outils pour la prédiction du stockage de carbone dans les sols à la suite de l'apport en produits organiques

De nombreux outils prédictifs ont été développés afin de faciliter l'évaluation du stockage de carbone induit par l'apport de produits organiques. Plusieurs méthodes seront abordées dans ce chapitre (Tableau 3) : l'étude de la décomposition des matières organiques apportées aux sols, les fractionnements chimiques, les méthodes thermiques d'analyse, et la caractérisation des matières organiques par pyrolyse Rock-Eval.

1.2.9.1. L'étude de la décomposition des matières organiques

La décomposition des matières organiques est évaluée par la mesure du CO_2 produit par les sols lors d'incubations en conditions contrôlées non limitantes pour l'activité microbienne. La quantité de CO_2 produit par les sols témoins non amendés correspond à la décomposition des matières organiques endogènes. La quantité de CO_2 produit par les sols amendés correspond à la quantité de CO_2 produit par la décomposition des matières organiques apportées et endogènes. En faisant l'hypothèse que la vitesse de décomposition des matières organiques endogènes n'est pas influencée par l'apport de matières organiques, la quantité de carbone issue de la soustraction de la quantité cumulée de CO_2 produit par les sols amendés par celle des sols non amendés est attribuée à la décomposition des matières organiques apportées. La quantité de carbone attribuée à la décomposition des matières organiques apportées, soustraite à la quantité de carbone apporté permet de calculer la quantité de carbone stocké dans les sols en conditions contrôlées. La quantité de carbone stocké au champ, exprimé en proportion du carbone initialement apporté, est prédite par l'estimation de l'asymptote de l'évolution du cumul de la décomposition en conditions contrôlées à partir d'une régression non linéaire (Lashermes *et al.*, 2009).

Cette mesure, moins difficile à mettre en œuvre qu'une expérience au champ sur le long terme, peut être réalisée dans différentes conditions (température, humidité) et pour différents types de sol afin de prendre en compte les caractéristiques pédoclimatiques locales. Les incubations en conditions contrôlées permettent également d'étudier l'influence de l'apport en produits organiques sur d'autres propriétés du sol tel que : sa structure, sa capacité d'adsorption etc. Toutefois, cet outil reste assez long et couteux à mettre en œuvre et ne permet pas à lui seul la compréhension des mécanismes liants la composition des produits organiques et leur devenir dans les sols. En l'absence de marquage des atomes de carbone apportés, cette méthode ne permet pas d'identifier un effet « priming ». En faisant l'hypothèse que la vitesse de décomposition des matières organiques endogènes n'est pas influencée par

l'apport de matières organiques, la quantité de carbone stockée est uniquement attribuée à la stabilité des matières organiques apportées (Lashermes *et al.*, 2009).

1.2.9.2. Les méthodes de fractionnement chimique pour la prédiction de la récalcitrance des matières organiques apportées

Le fractionnement chimique des produits organiques ; notamment à partir de la méthode développée par Van Soest & Wine (1967), couplé aux incubations de sol amendés en conditions contrôlées a permis de mettre en évidence l'importance du déterminisme entre leur composition et leur devenir. Historiquement, la méthode Van Soest était utilisée pour déterminer la digestibilité des fourrages en alimentation animale. Son principe repose sur la différentiation séquentielle des constituants par traitement aux détergents neutre et acides. Les fractions obtenues sont attribuées à certaines fibres mais ne correspondent pas systématiquement à ces structures moléculaires ; notamment pour les produits organiques autres que les végétaux. Thuriès *et al.* (2002) ont associé les composés labiles a des composés organiques azotés et hémi-cellulosiques solubles et les composés récalcitrants à des composés ligneux.

Lashermes *et al.* (2009) ont mis au point un modèle de prédiction du stockage de carbone dans les sols à la suite de l'apport en produits organiques à partir des corrélations entre les résultats du fractionnement biochimique Van Soest et des incubations de sols en conditions contrôlées. Ce modèle de prédiction, standardisé (AFNOR XP U44-162) appelé : Indice de Stabilité de la Matière Organique (ISMO), est notamment utilisé afin d'alimenter le modèle « AMG » pour prédire de l'évolution des teneurs en C dans sols (Andriulo *et al.*, 1999). Le stockage de carbone dans les sols à la suite de l'apport en produits organiques résulte : de la proportion des matières organiques apportées stables et de la modification potentielle de la vitesse de minéralisation des matières organiques endogènes induite par l'apport de produits organiques (priming « effect » réel). Pour des raisons méthodologiques, ces deux phénomènes ne sont pas systématiquement distingués ; et les effets « priming » sont souvent considérés comme négligeables (Lashermes *et al.*, 2009) entrainant la confusion des termes de stabilité et de stockage de carbone.

Cette méthode n'est pas complétement adaptée pour caractériser la biodégradabilité des produits organiques issus d'un traitement biologique aérobique ou anaérobique qui induisent un niveau de complexité des matières organiques supplémentaire accompagné d'une récalcitrance indépendante de leur solubilité. Cette récalcitrance peut être associée à la synthèse de composés secondaires par les microorganismes et/ou à l'association avec des minéraux (Sollins *et al.*, 1996). Afin de consolider la valeur prédictive de l'ISMO, Lashermes *et al.* (2009) ont ainsi complété le fractionnement Van Soest par la mesure du taux de

minéralisation des matières organiques en 3 jours lors d'incubation de sols amendés. En effet, parmi les différentes fractions, la stabilité des matières organiques de la fraction soluble est notamment impactée par les traitements biologiques. Askri (2015) distingue une fraction soluble qui se minéralise rapidement et une qui se minéralise lentement afin de modéliser le devenir du carbone des digestats dans les sols. Mottet *et al.* (2010), Peltre *et al.* (2011) et Jimenez *et al.* (2015, 2017) ont proposé des méthodes complémentaires, par spectroscopie infrarouge et par fluorescence 3D, afin d'évaluer la complexification des matières organiques et améliorer la prédiction de leur biodégradabilité en évitant la mise en place d'incubations. Les méthodes de caractérisation spectroscopiques permettent de saisir l'ensemble de la complexité des matières organiques. Toutefois, le fractionnement Van Soest induit des modifications physico-chimiques des composés organiques fractionnés rendant incertaine la caractérisation de leur nature. Les méthodes de fractionnement chimiques sont des méthodes fonctionnelles utilisées dans le cadre de la prédiction de la récalcitrance des matières organiques apportées mais ne permettent pas d'expliquer les phénomènes associés à leur stabilité et au stockage de carbone induit.

1.2.9.3. Les méthodes calorimétriques et thermogravimétrique d'analyse des matières organiques pour l'étude de la récalcitrance des matières organiques apportées

Les méthodes thermiques d'analyse des matières organiques apportées sont basées sur l'hypothèse que la vitesse de décomposition d'une matière organique dépend : de l'énergie que doivent investir les microorganismes hétérotrophes pour la décomposer, de l'énergie produite par sa décomposition et du ratio entre ces deux éléments. Les microorganismes ayant une stratégie de développement rapide et étant peu spécialisés décomposeront rapidement les matières organiques qui nécessitent peu d'investissement en énergie. Au contraire, les microorganismes ayant une stratégie de développement plus lente et étant très spécialisés auront la capacité d'investir plus d'énergie pour décomposer une matière organique plus récalcitrante. Cette hypothèse fait suite aux travaux de Bosatta & Ågren (1999) et de Lützow *et al.* (2006) associant la récalcitrance biologique intrinsèque des matières organiques apportées au nombre et aux types de réactions enzymatiques nécessaires pour la décomposer ; expliquant notamment la plus faible vitesse de minéralisation des polymères de hauts poids moléculaires.

L'analyse thermique consiste à mesurer les évolutions d'une propriété physique d'un échantillon lorsqu'il est soumis à une variation programmée (généralement linéaire) de température avec le temps dans une atmosphère contrôlée (Grenet & Legendre, 2010). L'analyse thermique regroupe plusieurs techniques en fonction de la propriété de l'échantillon étudié :

- L'analyse thermogravimétrique mesure la variation de masse de l'échantillon en fonction de la température (et/ou du temps). La thermogravimétrie permet de qualifier la sensibilité thermique à la décomposition des matières organiques pouvant être mise en relation avec la quantité d'énergie devant être investie par les organismes pour sa décomposition (Rovira *et al.*, 2008). L'application de différentes gammes de températures permet de définir des fractions de matières organiques en fonction de leur stabilité (Sánchez *et al.*, 2008). Les grandeurs exploitées lors de l'analyse thermogravimétrique, à partir des thermogrammes, sont : la masse (TG) et sa dérivée (DTG) par rapport au temps en fonction de la température. Le thermogramme TG, exprimé en % de la masse totale initiale mesurée, permet notamment de comparer la stabilité globale des produits organiques. Sa dérivée (DTG) permet de séparer plus clairement les différentes étapes d'un thermogramme et ainsi de fractionner les matières organiques en fonction de leur stabilité. Cependant, la thermogravimétrie ne permet pas une analyse fine des réactions associées à l'augmentation de la température (Wirth *et al.*, 2014). Par exemple, une perte de masse rapide à basse température est caractéristique d'une évaporation (volatils) ou d'une déshydratation (eau absorbée). Au contraire, les transformations de type réaction ou fusion ne traduisent pas par une modification de la masse de l'échantillon. De plus, la perte de masse n'est pas toujours parfaitement corrélée avec la quantité d'énergie libérée lors de la décomposition (Rovira *et al.*, 2008; Plante *et al.*, 2011).
- Les techniques se rapportant à l'étude de la température de l'échantillon et des échanges thermiques entre celui-ci et le milieu extérieur permettent l'identification des phénomènes autres de la décomposition (identifiée par la thermogravimétrie) tel que la déshydratation, la fusion etc. Ces techniques permettent également de quantifier la quantité d'énergie libérée lors de la décomposition (Rovira *et al.*, 2008). Deux techniques permettent de mesurer le phénomène thermique propre à l'échantillon. L'analyse Calorimétrique Différentielle (DSC pour Differential Scanning Calorimetry) permet de mesurer la libération ou la consommation d'énergie sous forme de chaleur par l'échantillon. L'analyse Thermique Différentielle (ATD), plus ancienne, permet de mesurer la différence de température entre le creuset de mesure et le creuset de référence.

L'analyse thermique a notamment été utilisée afin d'évaluer la stabilité (maturité) des produits organiques compostés (Dell'Abate *et al.*, 1998; Mondini *et al.*, 2003; Baffi *et al.*, 2007; Som *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2012) et méthanisés (Gómez *et al.*, 2007a). L'analyse thermique peut être couplée avec des techniques d'analyses des produits de la décomposition des matières organiques afin de déterminer leur nature. Les techniques d'analyses des

produits de la décomposition sont notamment : la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, la chromatographie en phase gazeuse, la spectroscopie de masse et l'analyse élémentaire (Plante *et al.*, 2011). La pyrolyse Rock Eval, présentée ci-après, est une analyse thermique principalement basée sur l'analyse des produits de décomposition des matières organiques soumis à différents gradients de températures.

1.2.9.4. L'analyse de la stabilité des matières organiques par pyrolyse Rock Eval

La pyrolyse Rock-Eval (pyrolyse RE) est une technique initialement développée par l'industrie pétrolière pour les analyses géochimiques des roches sédimentaires kérogènes (Espitalié *et al.*, 1977). Du fait de sa facilité d'utilisation pour caractériser de nombreux échantillons et de la qualité des informations apportées, son application a été étendue cette dernière décennie à différents matériaux organiques dont notamment les matières organiques des sols (Disnar *et al.*, 2003; Saenger, 2013; Barré *et al.*, 2016; Sebag *et al.*, 2016). Cette méthode a l'avantage de caractériser les matières organiques en l'absence de traitement chimique préliminaire. La méthode consiste en un craquage thermique de la matière organique en deux étapes successives (Figure 21), suivies de la quantification des composés produits lors de ce craquage.

Tableau 3 : Principales méthodes pour la prédiction de la stabilité des matières organiques apportés

Méthode		Procédure	Informations			Avantages	Inconvénients
			Caractérisation	Stabilité	Dynamique		
Etude de la décomposition des matières organiques		Incubation en conditions contrôlées non limitantes pour l'activité microbienne. Suivi de la décomposition par mesure production CO_2	-	Estimation de la stabilité des matières organiques apportées par régression non linéaire à partir de l'évolution du cumul de leur décomposition	Mesurée lors du suivi de la décomposition des matières organiques apportées au sol par la mesure de la production de CO_2	• Méthode de référence • Mesure directe fonctionnelle	• N'intègre pas la modification possible de la décomposition des MO endogènes • Long • Couteux
Fractionnements chimiques	**Méthode** (Van Soest & Wine, 1967)	Extraction séquentielle de fractions de matières organiques par traitement aux détergents neutre puis acides. Méthode initialement développée pour l'étude de la digestibilité des fourrages	C, N, C/N des différentes fractions	Interprétation des résultats à l'aide d'un modèle de prédiction de la stabilité des matières organiques à partir des corrélations mises en évidence avec des incubations en conditions contrôlées (Lashermes *et al.*, 2009). La solubilité des différentes fractions soumis aux détergents neutres puis acides est un indicateur de leur biodégradabilité		• Méthode de référence standardisée (AFNOR XP U44-162) notamment utilisée pour alimenter les modèles de prédiction de l'évolution des teneurs en C des sols (Andriulo *et al.*, 1999)	• Nécessite des quantités assez importantes de produits organiques • Moyennement adaptée pour les produits organiques compostés ou méthanisés
	Méthode (Van Soest & Wine, 1967) **+ Couplage spectro.**	Extraction à l'aide de solvants + couplage avec spectroscopie proche-infrarouge pour chacune des fractions (Peltre *et al.*, 2011) ou fluorescence 3D (Jimenez *et al.*, 2017)	C, N, C/N des différentes fractions + Qualification de la complexité des matières organiques	Les méthodes de caractérisation spectroscopiques permettent notamment d'évaluer la biodégradabilité des matières organiques complexes solubles dans le détergent neutre formées à la suite du compostage et de la digestion anaérobie		• Prise en compte de la complexité chimique des matières organiques compostés ou méthanisés	• Nécessite des quantités assez importantes de produits organiques • Coût • Modification chimique des composés lors du fractionnement ?

Méthode		Procédure	Informations			Avantages	Inconvénients
			Caractérisation	Stabilité	Dynamique		
Méthodes thermiques d' analyse	**Calorimétrie et/ou Thermogravimétrie**	Enregistrement des changements de masse et/ou d'énergie en fonction de la température	-	Définition de fractions de matières organiques sur la base de leur stabilité thermique	Lien avec la dynamique réelle de la décomposition à vérifier	• Rapide • Peu coûteuse (en collaboration) • Permet de décrire le continuum complet de la stabilité des matières organiques • Pas de prétraitement de l'échantillon • Possibilité de couplage avec des techniques d'analyse des effluents gazeux afin d'investiguer la composition des matières organiques	• Changement d'énergie et de masse perturbée par le signal minéral
	Pyrolyse Rock-Eval (RE)	Craquage thermique de l'échantillon et analyse des effluents gazeux (HC, CO et CO_2)	• Corg • Fractionnement des matières organiques sur la base de leur stabilité thermique • Caractérisation des différentes fractions par : Indice du degré de transformation de la matière organique immature et Indice de récalcitrante (Sebag *et al.*, 2016)		Lien avec la dynamique réelle de la décomposition à vérifier	• Rapide • Peu coûteuse (en collaboration) • Permet de décrire le continuum complet de la stabilité des matières organiques • Pas de prétraitement de l'échantillon	• Méthode en développement, encore peu employée en science du sol

1.3. La méthanisation agricole

La méthanisation agricole est présentée à travers :

- La biochimie et la microbiologie de la digestion anaérobie ;
- Son effet sur la composition physico-chimique des produits organiques ;
- Sa mise en œuvre ;
- Son développement en France et en Europe.

1.3.1. Les aspects biochimiques et microbiologiques de la digestion anaérobie

La digestion anaérobie s'apparente aux fermentations ; pouvant être définies comme les catabolismes des matières organiques en l'absence d'oxygène par des organismes en vue de produire de l'énergie (Zeikus, 1980). Un très grand nombre d'organismes, en passant par les bactéries, les champignons, ainsi que l'être humain, effectuent des fermentations. Les processus biologiques des fermentations sont apparus très tôt sur terre lorsque son atmosphère été dépourvu d'oxygène. Toutefois, malgré leur ancienneté, ces processus sont très évolués et permettent aux organiques anaérobies de se développer dans des milieux faiblement oxydatifs sur une large variété de substrats (Zeikus, 1980). Les fermentations se caractérisent par des dégradations partielles des matières organiques et la formation de composés organiques réduits comme par exemple : l'éthanol, le méthane et acide acétique. Plusieurs types de fermentation peuvent être distingués en fonction de la nature des produits de la réaction : alcoolique, lactique, acétique, méthanique. Les fermentations ont été domestiquées par l'Homme pour : la production de vin, bière et pain (alcoolique), de produits laitiers, charcuteries, choucroute, ensilage (lactique), de vinaigre (acétique), de biogaz (méthanique).

La digestion anaérobie désigne communément le processus biologique de méthanisation (ou fermentation méthanique) ; c.à.d. la conversion en l'absence d'oxygène des matières organiques en un biogaz essentiellement composé de CH_4 et de CO_2 sous l'action de micro-organismes appartenant à une communauté microbienne complexe, tant du point de vue taxonomique que fonctionnel (Figure 10). C'est un processus naturel ubiquiste qui se réalise dans tous les milieux où se trouve des matières organiques en l'absence d'oxygène, et où les conditions physico-chimiques sont compatibles avec celles du vivant. Elle se réalise essentiellement : dans les sols submergés tel que les rizières (Adhya *et al.*, 1994) ou les marais, et dans le tube digestif de nombreuses espèces animales depuis les insectes (Hackstein & Stumm, 1994) jusqu'aux ruminants (Johnson *et al.*, 1994). La digestion anaérobie

a été domestiquée au XIXème siècle par l'Homme (Abbasi *et al.*, 2012) en vue de produire une énergie renouvelable à partir de produits organiques et/ou de traiter des déchets organiques.

Le modèle simplifié développé par Zeikus (1980) pour décrire le processus de méthanisation fait consensus : il comprend quatre étapes, réalisées par différents groupes microbiens (Figure 10). Chaque étape mène à la formation de composés intermédiaires, servant à leur tour de substrats lors de l'étape suivante. Ces étapes ne sont pas séquentielles mais plutôt simultanées. La digestion anaérobie, jusqu'à la production finale de biogaz, nécessite un consortia de bactéries dépendantes les unes aux autres.

- L'hydrolyse et l'acidogénèse sont les deux étapes qui permettent de dégrader les matières organiques en métabolites précurseurs de la production de méthane (Escudie & Cresson, 2017). Les polysaccharides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques sont clivées, généralement par des enzymes spécifiques extracellulaires, jusqu'à l'obtention de monomères. Les bactéries participant à cette étape ont un métabolisme de type anaérobie strict ou facultatif et forment un ensemble phylogénétique hétérogène regroupant de nombreux groupes bactériens. Au cours de l'acidogenèse, les monomères sont transformés en acide gras volatils (acétate, propionate, butyrate et valérate), en alcools, en CO_2 et en Hydrogène (H_2). Durant l'acidogenèse, les bactéries anaérobies strictes du genre *Clostridium* (bacilles gram positifs) sont les plus représentées. La vitesse de cette étape est très élevée par rapport aux étapes suivantes où les microorganismes ont un temps de duplication plus long. Ainsi, un apport massif de composés rapidement biodégradables peut entrainer une accumulation d'intermédiaires inhibiteurs (H_2 et acétate) des micro-organismes acétogènes et méthanogènes pouvant arrêter la digestion anaérobie.

- L'étape d'acétogenèse permet la transformation des divers composés issus de la phase précédente en précurseurs directs du méthane : l'acétate, le dioxyde de carbone et l'hydrogène. On distingue deux groupes de bactéries acétogènes : celles qui sont productrices obligées d'hydrogènes et celles qui ne le sont pas. Les bactéries productrices obligées d'hydrogènes ne sont capables de catalyser les précurseurs de l'acétate que lorsque les pressions partielles en hydrogènes sont très faibles (10^{-4} à 10^{-6} atm). Ainsi, leur fonctionnement induit une association syntrophique avec des microorganismes hydrogénotrophes (idéalement, des archées méthanogènes). Les bactéries acétogènes non productrices d'hydrogènes peuvent être distinguées en deux groupes : celles qui le produisent à partir de composés organiques simples et

celles qui utilisent l'hydrogène et le dioxyde de carbone. Ces dernières ne semblent pas entrer en compétition pour l'hydrogène avec les archées méthanogènes hydrogénotrophes et sont présentes en quantité beaucoup plus faible dans les biotopes anaérobies. Elles ont pu toutefois être identifiées comme partenaires hydrogénotrophes de syntrophes.

- Lors de la méthanogenèse, les substrats (acétate, formate, CO_2 et le dihydrogène) sont convertis en méthane en conditions d'anaérobie stricte par des bactéries qui appartiennent au domaine des *Archea.* Les *Archea,* aussi appelées archéobactéries sont des microorganismes unicellulaires procaryotes. Ces êtres vivants ubiquitaires sont caractérisés par une structure cellulaire dépourvue de noyau. Leur apparition est estimée entre -4,11 et -3,78 milliards d'années lorsque l'atmosphère terrestre été dépourvue d'oxygène. D'après Battistuzzi *et al.* (2004), 26 genres de méthanogènes ont été décrits. La production de méthane est principalement réalisée par deux catégories d'*Archea* : les méthanogènes hydrogénophiles (ou hydrogénotrophes) et les méthanogènes acétoclastes (ou acétotrophes). Les *Archea* méthanogènes hydrogénophiles, syntrophiques bactéries acétogènes productrices d'hydrogènes, produisent du CH_4 à partir de CO_2 et de H_2. Les *Archea* méthanogènes acétoclastes produisent du 70% méthane d'un digesteur à partir de l'acétate.

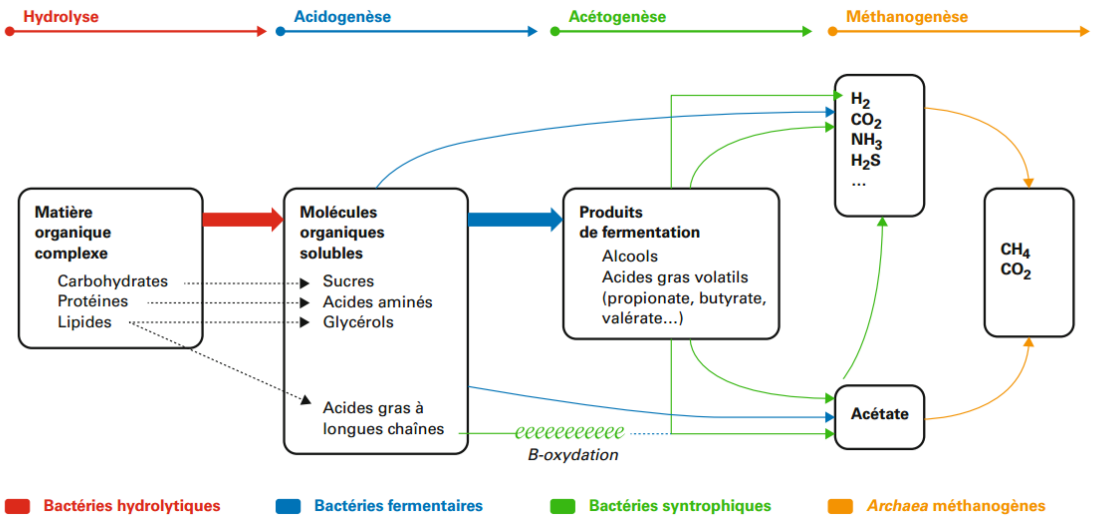


Figure 10 : Représentation schématique de la digestion anaérobie des matières organiques (Escudie & Cresson, 2017)

1.3.2. L'effet de la digestion anaérobie sur la composition physico-chimique des produits organiques

Les digestats de méthanisation désignent un large ensemble de produits organiques ayant des compositions très variables ayant pour point commun d'être issus d'une digestion anaérobie. Ils peuvent être définis comme un mélange complexe d'eau, de composés organiques et inorganiques incluant des nutriments et des matières organiques peu biodégradables (Möller, 2015). La forte hétérogénéité de leurs caractéristiques et de leurs propriétés agronomiques rend difficile la gestion de leur valorisation.

Guilayn *et al.* (2019) proposent une typologie des digestats de méthanisation en 6 groupes ou les teneurs en matières sèches et en azote (N) apparaissent comme les premiers descripteurs de leur variabilité. La teneur en matières sèches ségrégue les digestats issus des procédés en voie sèche de ceux issus des procédés en voie humide. Parmi les digestats issus d'une digestion en voie humide, trois groupes sont distingués en fonction de leurs rationnements. Le premier groupe est majoritairement issu de substrats fibreux tel que l'ensilage et le fumier. Il est caractérisé par une teneur en matières organiques relativement importante d'environ 75%$_{MS}$ pouvant être associée au phénomène de biodégradation préférentielle des matières organiques et à l'accumulation des matières organiques les plus récalcitrantes telle que les fibres lignocellulosiques. Leurs teneurs en N et en Phosphore (P) sont relativement faibles mais sont relativement riches en Potassium (K). Les digestats du second groupe sont principalement issus de la digestion de boues d'épuration, des résidus d'IAA et de lisier de porc. Ils sont caractérisés par une faible teneur en MO et en K mais par de forte teneur en P et des teneurs moyennes en N. Les digestats du troisième groupe ont des teneurs en MO, en K et en P intermédiaires par rapport aux autres et sont notamment caractérisés par de fortes teneurs en N total et en N ammoniacale. Ils sont issus de déchets organiques d'origine alimentaire et de lisier de porc. Les digestats utilisés dans le cadre de cette étude appartiennent au premier groupe.

Au-delà de la mise en évidence de typologies de digestats à partir de leurs caractéristiques, il est également approprié de décrire les évolutions génériques de la composition des produits organiques lors de la digestion anaérobie. Plusieurs évolutions génériques de la composition des produits organiques durant la digestion anaérobie sont observées avec notamment : une augmentation du pH devenant basique, un abattement de la DBO, une augmentation de la teneur en éléments minéraux, une augmentation du ratio NH4+/N, une réduction du taux de matière organique et du rapport C/N (Möller, 2015). Ces évolutions génériques sont les conséquences de la minéralisation des matières organiques,

et de l'exportation d'une partie des éléments dont notamment : le C, l'Oxygène (O) et l'Hydrogène (H) ; et de la conservation de tous les autres.

1.3.3. La mise en œuvre de la méthanisation agricole

La méthanisation désigne un ensemble de procédés et de technologies variées dont le point commun est la digestion biologique en milieu anaérobie de substrats organiques. Les objectifs de la méthanisation sont : la production d'un biogaz afin de transformer la biomasse en énergie et/ou d'abattre la Demande Biologique en Oxygène (DBO) des déchets organiques dans le cadre de leur traitement.

La proportion de matières organiques biodégradées lors de la digestion anaérobie dépend de la nature du produit, et notamment du type de matières organiques qui le constitue (Tableau 4), ainsi que des processus de méthanisation mis en œuvre. Lors de la méthanisation entre 40 et 80% des matières organiques sont dégradées diminuant ainsi d'autant la quantité de carbone disponible pour les sols (Moletta, 2015).

Type de matière organique	Valeur courante de taux de dégradation en digesteur (en %)
Lipides	50 à 60
Protéines	50
Cellulose	60 à 80
Hémicellulose	65
Amidon	90
Acides gras	80
Lignine	0

Tableau 4 : Taux de dégradation des matières organiques en digesteur (Moletta, 2015)

Les différents gisements de substrats méthanisables sont principalement : les déjections animales, les résidus de cultures, les cultures intermédiaires à vocation énergétique (CIVE), les déchets des industries agroalimentaires (IAA), des ménages et des collectivités. En France, les matières d'origines agricoles représentent 90% de la production potentielle d'énergie primaire (Bastide, 2013). La production potentielle d'énergie primaire dépend : de la quantité mobilisable et du potentiel méthanogène des substrats organiques. Le potentiel méthanogène est défini par la quantité de méthane produit par un substrat organique lors de sa biodégradation en milieu anaérobie. Il est exprimé en Nm^3 de méthane par tonne de matière fraiche dans des conditions normales de pression (103 mbar) et de température (20°C). Il dépend principalement : de la teneur en matières organiques des substrats et de leurs compositions en matières organiques. La production maximale théorique de méthane est de

(Moletta, 2015) : 373 Nm^3 t_{MO}^{-1} pour un sucre simple (glucose), de 496 Nm^3 t_{MO}^{-1} pour les protéines ($C_5H_7NO_2$) et de 1014 Nm^3 t_{MO}^{-1} pour les lipides ($C_{57}H_{104}O_6$). La lignine n'est pas biodégradée par les bactéries anaérobies. Au-delà du potentiel méthanogène des substrats mobilisables (Figure 11), le choix du rationnement d'un méthaniseur est ajusté en fonction de leur qualité et de leur contrainte comme leur saisonnalité et leur aptitude au stockage, leur coût par unité de méthane potentiellement produit. Le rationnement d'un digesteur est la première composante de la rentabilité d'un projet de méthanisation.

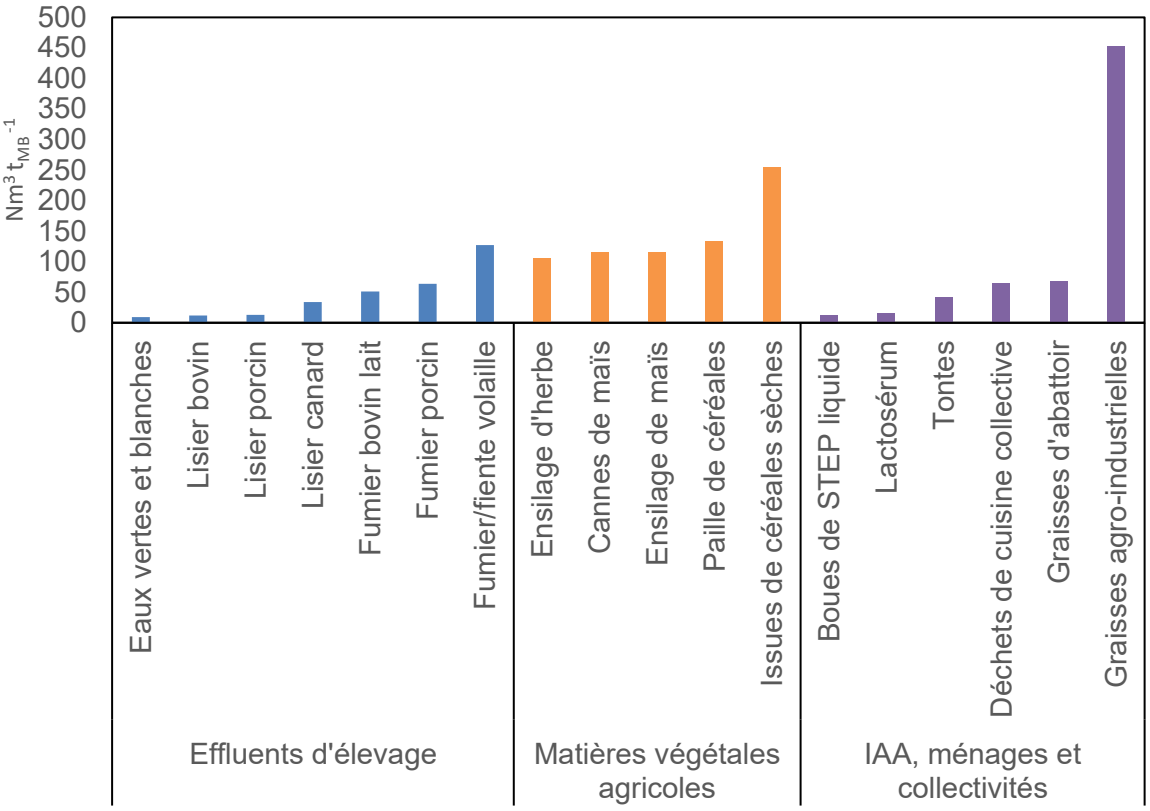


Figure 11 : Potentiel méthanogène de différents substrats organiques d'après (Moletta, 2015)

Il existe de nombreux modes de mise en œuvre de la méthanisation en fonction notamment : de la teneur en matières sèches (MS) de la ration (voie humide : < 15%$_{MS}$ ou voie sèche : > 15%$_{MS}$), de la température de fonctionnement du digesteur (mésophile : 35 à 40°C ou thermophile : environ 55°C), du type de procédé (continu ou discontinu). Parmi les nombreuses technologies, la digestion par voie humide continue à température mésophile est la plus représentée au sein du parc de méthanisation agricole ; notamment en raison sa maturité (Weiland, 2006). Dans le cadre de cette étude, les digestats utilisés seront issus de ce type de technologie.

Il existe quatre modes de valorisation du biogaz : la production de chaleur ayant une bonne efficacité énergétique à condition qu'il y ait des besoins de chaleur à proximité (transport via des réseaux de chaleur), la cogénération d'électricité (environ 30% de l'énergie primaire) et de chaleur (environ 50% de l'énergie primaire) à partir d'un moteur et d'un générateur, l'injection du biogaz épuré ou biométhane dans un réseau de gaz naturel, l'utilisation du biométhane comme carburant notamment à destination d'une flotte captive de véhicules avec une consommation constante sur l'année (bus, bennes à déchets etc.).

1.3.4. Le développement de la méthanisation en France et en Europe

La filière biogaz appartient aux filières des biocarburants intégrant notamment le bois, l'éthanol et le bioéthanol. Les biocarburants sont des sources renouvelables d'énergie, produits à partir de matières organiques non fossiles provenant de la biomasse. Les principaux enjeux des filières des biocarburants en Europe sont : leur efficacité énergétique et leur possible concurrence avec l'usage alimentaire de la biomasse produite. De ce point de vue, la filière bois énergie se distingue des autres filières car elle provient de la sylviculture généralement réalisée sur des surfaces inadaptées aux productions végétales ayant un usage alimentaire. Les rapports de l'énergie nette récoltée sur l'énergie investie pour la production de bois, biogaz, bioéthanol et biodiesel sont respectivement comprises entre 5 et 7 ; 2 et 3 ; 1 et 1,3 ;2 et 3 (Moletta, 2015). Outre la filière bois, l'efficacité énergétique est donc nettement en faveur des filières biogaz et biodiesel. Les filières biogaz et biodiesel se distinguent par la nature de substrats organiques nécessaires à leurs productions. Le biodiesel nécessite exclusivement l'utilisation des fruits matures d'oléagineux (colza) pouvant également être utilisés pour des usages alimentaires. En revanche, le biogaz peut être produit à partir de presque tous les types de biomasses (hormis les végétaux ligneux) incluant les déchets organiques à biodégrader ce qui permet de moduler la concurrence avec l'alimentation.

Le développement de la filière biogaz est dépendant de l'usage des matières végétales agricoles et notamment des cultures énergétiques en raison de leur fort potentiel méthanogène (Figure 11) et de l'importance des gisements potentiels (Bastide, 2013). A ce titre le développement de la filière biogaz Allemande, à ce jour la plus grande productrice d'Europe, s'est basée sur la substitution des cultures alimentaires par les cultures énergétiques (Observ'ER, 2014). Environ 80% de l'énergie primaire de la méthanisation en Allemagne provient des cultures énergétiques, dont notamment le maïs ensilé. Le maïs ensilé pour la méthanisation représente près de 30% de la production Allemande de maïs et plus de 6% de sa SAU totale. Cependant, la durabilité du système allemand est remise en cause en raison du coût environnemental de la réorientation partielle des prairies pour la monoculture de maïs et la concurrence entre l'alimentation des animaux et celle des méthaniseurs. Depuis 2012,

les amendements législatifs en Allemagne visent à diminuer la dépendance des nouvelles unités de méthanisation vis-à-vis de l'ensilage de maïs. En France, la politique de soutien de la filière biogaz est clairement conditionnée par un faible niveau de concurrence avec l'usage alimentaire des surfaces agricoles. Pour une installation de méthanisation l'utilisation des cultures alimentaires ou énergétiques, cultivées à titre de culture principale, sont limitées dans une proportion maximale de 15% du tonnage brut total des intrants par année civile (*Décret n° 2016-929 du 7 juillet 2016 pris pour l'application de l'article L. 541-39 du code de l'environnement*, 2016). Au-delà du traitement des effluents d'élevage, le développement de la méthanisation en France est plutôt basé sur l'utilisation de Cultures Intermédiaires à Vocation Energétique (CIVE). Une CIVE est une culture implantée et récoltée entre deux cultures principales alimentaires dans une rotation culturale. La culture principale d'une parcelle est soit présente le plus longtemps sur un cycle annuel ; soit indentifiable entre le 15 juin et le 15 septembre sur la parcelle, en place ou par ses restes ; soit commercialisée sous contrat. Les CIVE sont donc des espèces à croissance rapide, pour l'été ou/et l'hiver et permettant de produire un maximum de biomasse par hectare pour diminuer les coûts. De nombreuses espèces peuvent être utilisées en tant que CIVE comme : maïs, sorgho, seigle, tournesol, moha, avoine, phacélie, pois fourrager, fèveroles etc. Les couverts végétaux entre deux cultures principales améliorent la fertilité des sols par rapport à un sol nu ; notamment en améliorant le recyclage des éléments minéraux (Couëdel *et al.*, 2018), en augmentant les apports en carbone dans les sols et leur activité biologique (Mendes *et al.*, 1999) améliorant ainsi leur stabilité structurale (Hermawan & Bomke, 1997). Cependant, les effets de l'utilisation de la partie aérienne des couverts végétaux pour la méthanisation sur la fertilité des sols par rapport à un apport direct restent méconnus.

En 2017, la France est le 4ème pays producteur de biogaz en Europe (hors biogaz des centres d'enfouissement et des stations d'épuration) avec une production de 561 ktep après l'Allemagne (7252 ktep), le Royaume-Uni (1130 kep) et l'Italie (1488 kep) (Observ'ER, 2018). L'Allemagne est historiquement le premier producteur de biogaz en Europe ; sa production semble avoir atteint son maximum. Après un fort développement de la filière biogaz au Royaume Uni, en Italie et en Pologne, la croissance décélère actuellement dans ces pays. La croissance de la filière biogaz est importante au Danemark (+34%, avec un total de 235 ktep), en France (+14%) et en Finlande (+11%, avec 31 ktep). Le gisements global de produits organiques mobilisables à 2030 pour la méthanisation en France sont évalués à 4800 ktep d'énergie primaire soit environ 2% de la consommation annuelle d'énergie primaire (Bastide, 2013). Le potentiel de développement de la filière méthanisation est important avec environ 12% de la ressource mobilisable actuellement exploitée en France. Le développement des filières méthanisation en Europe est dépendante des politiques de soutien. Ces politiques

s’articulent autour de plusieurs mesures avec la mise en place : de tarifs d’achat en faveur des énergies renouvelables, d’aides financières à l’investissement conditionnées aux performances environnementales des installations, et d’évolutions des normes règlementaires en lien avec l’évolution de la connaissance et des technologiques de la filière.

En raison du développement récent de la filière biogaz en Europe, les valeurs agronomiques des digestats étaient relativement méconnues sur le plan scientifique ce qui engendrait des freins tant sur le plan social que réglementaire. De nombreuses études sur le sujet ont permis de faire évoluer les connaissances. En France, la possibilité réglementaire de mise sur le marché de certains digestats de méthanisation agricole en tant que matière fertilisante depuis 2019 témoigne d’une meilleure connaissance des valeurs agronomiques des digestats (Arrêté du 8 août 2019 approuvant deux cahiers des charges pour la mise sur le marché et l’utilisation de digestats de méthanisation agricole en tant que matières fertilisantes | Legifrance, 2019). Auparavant, l’agriculteur méthaniseur était responsable d’un déchet et de ces incidences sur le milieu jusqu’à la destination finale ; désormais, pour certains digestats, l’agriculteur méthaniseur est responsable d’un produit jusqu’à sa mise sur le marché. Actuellement, les valeurs des digestats de méthanisation agricole en tant qu’engrais (apports en éléments nutritifs) sont connues ; notamment en ce qui concerne leur effet azote court terme (Möller & Müller, 2012). Leur valeur en tant qu’amendement ; sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques, restent toutefois plus méconnue (Möller & Müller, 2012). En Europe, il existe actuellement environ 17 400 unités de méthanisation avec d’importantes perspectives de développement et notamment en France (Scarlat *et al.*, 2018). Dans le cadre de l’augmentation de la proportion de produits organiques transformés par digestion anaérobie, il est nécessaire de comprendre ses effets sur leurs valeurs fertilisantes et amendantes.

1.4. Les effets de la digestion anaérobie des produits organiques sur la fertilité des sols : formulation des hypothèses

Les hypothèses de notre travail de recherche ont été formulées à la lumière des connaissances présentées précédemment et de l'état de l'art des effets de la digestion anaérobie des produits organiques sur :

- La vie microbienne à travers les effets « priming » ;
- La stabilité des matières organiques apportées ;
- Les caractéristiques des matières organiques ;
- La capacité de stockage en C ;
- La stabilité structurale ;
- Le complexe adsorbant et la biodisponibilité de l'azote et du phosphore.

1.4.1. L'effet de la digestion anaérobie des produits organiques sur la vie microbienne impliquée dans la biodégradation des matières organiques des sols et les effets « priming »

L'apport de digestats de méthanisation augmente la biomasse microbienne et stimule son activité par rapport à un témoin sans apport de produits organiques ou d'une modalité avec l'apport de fertilisants minéraux (Ernst *et al.*, 2008; Terhoeven-Urselmans *et al.*, 2009; Möller, 2015). Cette stimulation est expliquée par l'augmentation de la biodisponibilité en carbone et en nutriments. En revanche, la mesure la respiration induite en conditions contrôlées à court terme montre que les apports en digestats stimulent moins l'activité microbienne que les apports en produits organiques avant méthanisation (Ernst *et al.*, 2008; Johansen *et al.*, 2013). Au champ, aucune différence significative de la production en CO_2, indicateur de l'activité microbienne, n'a pu être mise en évidence lors de la comparaison entre l'apport de produits organiques avant et après méthanisation (Bachmann *et al.*, 2014). Dans le cadre de l'étude réalisée par Bachmann *et al.* (2014), l'absence de différence peut s'expliquer : par la brièveté de la respiration induite par l'apport de produits organiques, l'importance de la respiration basale par rapport à la respiration induite et une longue durée entre deux mesures lors de l'expérience (2 semaines).

Afin de déterminer si la méthanisation peut modifier la structure des communautés microbiennes de sols, Chen *et al.* (2012) ont comparé la décomposition d'un mélange de lisier et de maïs ensilage avant et après digestion anaérobie. Les deux produits organiques ont stimulé l'activité microbienne des sols et ont induit une augmentation de la respiration par

rapport au sol nu. Après 21 jours d'incubation, la respiration induite correspondait à 6,4% du carbone organique apporté contre 30% pour le produit non méthanisé. La biomasse microbienne active après l'apport des produits organiques avant et après méthanisation a été multipliée par 9,5 et par 2,3 respectivement par rapport au sol témoin non amendé. L'apport du mélange non méthanisé a augmenté l'activité des enzymes chargées de la décomposition de la cellulose (ß-glucosidase, cellobiohydrolase) et de l'hémicellulose (xylanase). L'apport du digestat n'a pas augmenté l'activité de ces enzymes mais a augmenté l'activité des enzymes chargées de décomposer les composés ligneux (chitnase) et azotés (leucylaminopeptidase). La stimulation des enzymes ß-glucosidase et cellobiohydrolase, impliquées dans la biodégradation des matières organiques endogènes à la suite de l'apport du produit organique non méthanisé est un indicateur d'un possible effet « priming » positif réel (Blagodatskaya & Kuzyakov, 2008). En revanche, l'absence de stimulation de ces enzymes à la suite de l'apport en digestat implique plutôt un faible effet « priming » positif réel. Chen *et al.* (2011) ont mis en place une expérience afin d'évaluer l'effet « priming réel » et ainsi de déterminer son importance dans le stockage du carbone à la suite de l'apport de produits organiques avant et après méthanisation. Cette expérience, basée sur le traçage des isotopes du ^{13}C apportés par les produits organiques, n'a pas fonctionné en raison de la forte proportion en carbone inorganique (riche en ^{13}C) dans les digestats de méthanisation.

Chen *et al.* (2012) ont mis en évidence, par des méthodes indirectes, la possibilité d'une modification des d'effets « priming » dans les sols en raison de la digestion anaérobie de produits organiques. Les hypothèses testées dans le cadre de notre étude sont les suivantes :

- L'effet « priming » positif réel induit par l'apport de matières organiques labiles (Figure 9) est diminué ou inexistant dans le cadre de l'apport de digestats ;
- L'apport de matières organiques de compositions différentes modifie la structure des communautés microbiennes du sol et est à l'origine des effets « priming ».

1.4.2. L'effet de la digestion anaérobie sur la stabilité des matières organiques apportés dans les sols

La plupart des incubations en conditions contrôlées ayant pour objectifs de comparer le stockage de carbone dans les sols avant et après méthanisation ont conclu à une proportion plus importante du C apporté, finalement stocké à la suite de l'apport des digestats (Bertora *et al.*, 2008; Marcato *et al.*, 2009; Tambone *et al.*, 2009; Cayuela *et al.*, 2010; Stumpe *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012; Schouten *et al.*, 2012; Johansen *et al.*, 2013; Thomsen *et al.*, 2013; Fuente *et al.*, 2013). Des résultats opposés ont été également publiés (Bernal & Kirchmann, 1992; Kirchmann & Bernal, 1997), pour des raisons non clairement identifiées. La proportion du C stocké à la suite de l'apport des produits organiques méthanisés est très variable en fonction des études et semblent fortement dépendre du rationnement du digesteur et de la mise en œuvre de la digestion. Pour les lisiers, l'augmentation de la proportion du C stocké est faible (Bertora *et al.*, 2008; Marcato *et al.*, 2009; Stumpe *et al.*, 2012) ; probablement en raison de leur forte teneur en eau induisant une digestion anaérobie conséquente des lisiers avec ou sans la mise en place d'équipements de méthanisation pour la maximisation, la récupération et la valorisation du biogaz. La différence de stockage entre les produits organiques avant et après méthanisation devient plus importante lorsque d'autres produits organiques sont mélangés aux lisiers afin d'augmenter la quantité de matières organiques digérées (Tambone *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012; Schouten *et al.*, 2012; Johansen *et al.*, 2013; Fuente *et al.*, 2013). Ces études ont été réalisées en mesurant la production supplémentaire de CO_2 induite par l'apport de produits organiques par rapport à un sol témoin non amendé lors d'incubations en laboratoire. Les auteurs attribuent les modifications de stockage de carbone à la plus grande stabilité des matières organiques des digestats de méthanisation ; en faisant l'hypothèse que ces apports ne modifient pas la minéralisation des matières organiques endogènes au sol. Pour certaines études l'effet « priming » est évoqué lors de l'interprétation de leur résultats mais aucune ne le mesure directement (Bernal & Kirchmann, 1992; Chen *et al.*, 2012).

L'augmentation de la stabilité des produits organiques lors de la méthanisation est expliquée par l'augmentation de la proportion en matières organiques récalcitrantes dans les digestats ; en raison de la minéralisation préférentielle des matières organiques labiles durant la digestion anaérobie (Gómez *et al.*, 2007b; Pognani *et al.*, 2009; Tambone *et al.*, 2010; Thomsen *et al.*, 2013). Ces différents taux de dégradation des matières organiques en digesteur (Tableau 2) induisent une modification de la composition en matières organiques des produits méthanisés d'après la méthode de fractionnement Van Soest (Figure 12). A la suite de la digestion anaérobie, la proportion en fibres les plus biodégradables (« soluble »

et/ou « hémicellulose ») diminuent et la proportion en fibres récalcitrantes (« lignine ») augmente. La digestion anaérobie entraine un enrichissement relatif du digestat en fibres associées à la lignine (cette fraction biochimique n'est pas biodégradée en anaérobiose) et en longues chaines aliphatiques ainsi qu'une diminution des fractions lipidiques et des polysaccharides (Marcato *et al.*, 2009) (Tambone *et al.*, 2009). Le calcul de l'indice de stabilité des matières organiques (ISMO) à partir du fractionnement Van Soest permet d'évaluer la stabilité des digestats de méthanisation (Figure 13).

Conformément à l'état de l'art présenté, l'hypothèse testée dans le cadre de notre étude est la suivante :

- La digestion anaérobie induit une augmentation de la proportion de carbone apporté, stocké dans le sol par rapport aux matières organiques avant la digestion anaérobie en raison de la plus grande stabilité des matières organiques apportées et d'une diminution de l'effet « priming » positif.

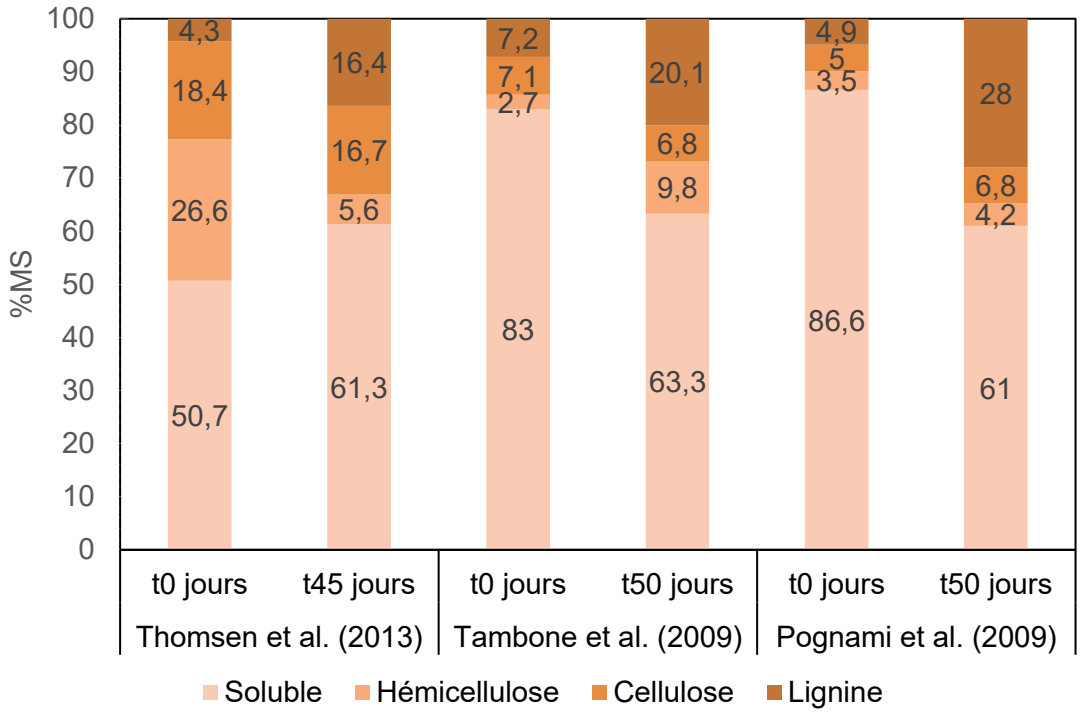


Figure 12 : Composition des produits organiques avant et après méthanisation d'après la méthode de fractionnement (Van Soest & Wine, 1967)

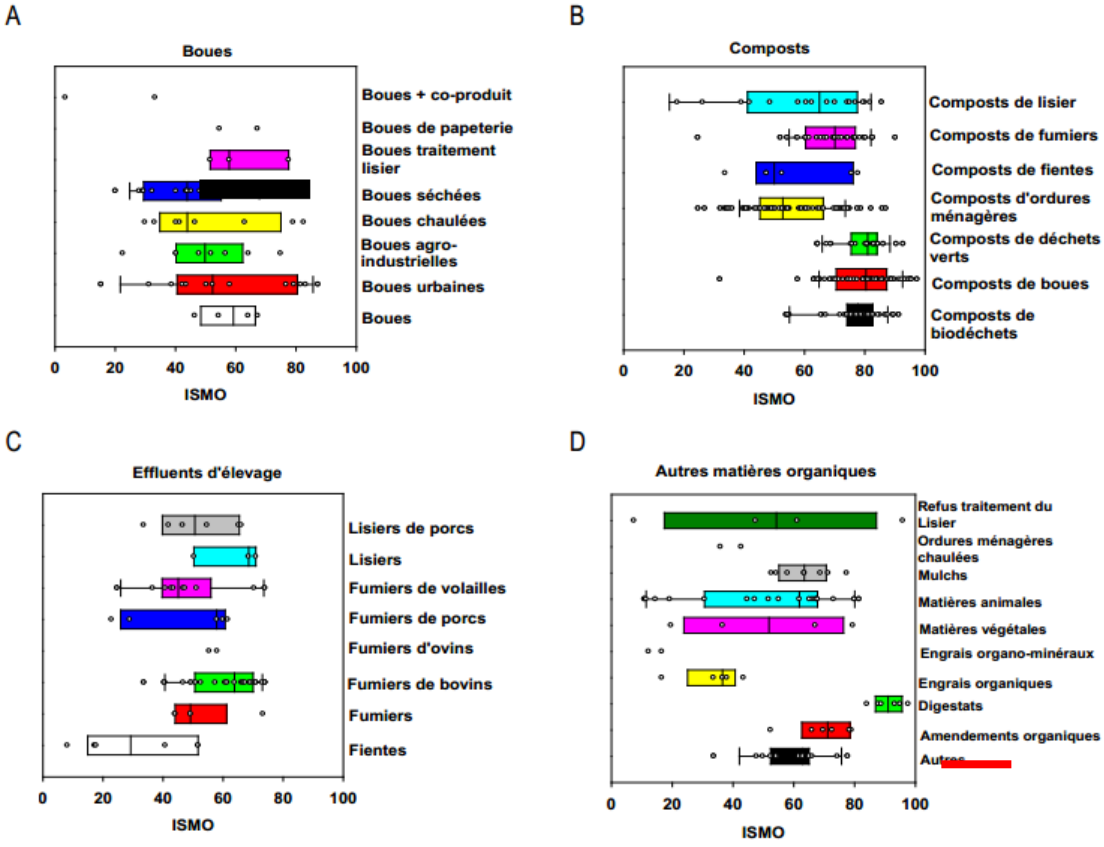


Figure 13 : Distribution des valeurs de l'indicateur de stabilité des matières organiques (ISMO), calculé pour différents types de produits organiques. La limite gauche de la boite est définie par le 1er quartile, la limite droite par le 3ème quartile, la médiane est représentée par le trait fin qui partage la boite. (Lashermes et al., 2009)

1.4.3. Une nouvelle approche analytique pour appréhender la stabilité des matières organiques des produits organiques et des sols

Gómez *et al.* (2005) ont réalisé l'analyse thermique de substrats représentatifs de déchets ménagers organiques (mélange de produits organiques à partir de choux, de pomme de terre, de banane etc.) avant, pendant et après digestion anaérobie (Figure 14). Leurs durées moyennes de rétention étaient respectivement de 0, 5 et 41 jours. La dérivée du thermogramme de perte de masse (DTG) et l'analyse thermique différentielle (DTA) permettent de fractionner les matières organiques en fonction de leur sensibilité à la décomposition et de l'énergie produite lors de leur décomposition pour différentes gammes de températures. Un premier pic de perte de masse est observé entre 70 et 110°C pour les trois modalités testées. Les valeurs négatives de l'analyse thermique différentielle (Figure 14b), synonymes de réaction endothermiques, permettent d'attribuer ce premier pic à la déshydratation résiduelle des échantillons. Un second groupe de pics de pertes de masses est observé par DTG et DTA entre 200 et 400°C. La perte de masse, pour cette gamme de températures, est moitié moins importante pour le digestat par rapport aux substrats avant digestion et deux fois moins importante par rapport aux substrats durant la digestion. Les matières organiques décomposées à ces gammes de températures peuvent être associées aux matières organiques labiles, rapidement biodégradées lors d'incubations (Sánchez *et al.*, 2008). L'augmentation de la sensibilité à la décomposition des matières organiques à ces gammes de température pour les substrats peu après leur incorporation (temps moyen de résidence de 5 jours) peut être associée au phénomène d'hydrolyse. La plus faible quantité d'énergie produite lors de la décomposition des substrats peu après leur incorporation par rapport aux substrats initiaux (Figure 14b) permet de conforter cette hypothèse. L'hydrolyse a induit une augmentation de sensibilité des matières organiques à la décomposition et a diminué leurs enthalpies. Pour les digestats, la sensibilité à la décomposition ainsi que l'énergie produite pour ces gammes de température est plus faible. En revanche, une sensibilité des digestats à la décomposition ainsi qu'une production d'énergie est observée autour de 500°C. Ce pic est absent pour les autres modalités. L'apparition de ce pic peut être le signe de la synthèse de composés complexes récalcitrants issus de la synthèse de composés secondaires par les microorganismes et/ou à l'association avec des minéraux (Sollins *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 2007b; a, 2011; Sánchez *et al.*, 2008; Marcato *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2017; Provenzano *et al.*, 2018). Gómez *et al.* (2007) soulignent toutefois l'absence de pic autour de 500°C pour les digestats issus d'une digestion thermophile.

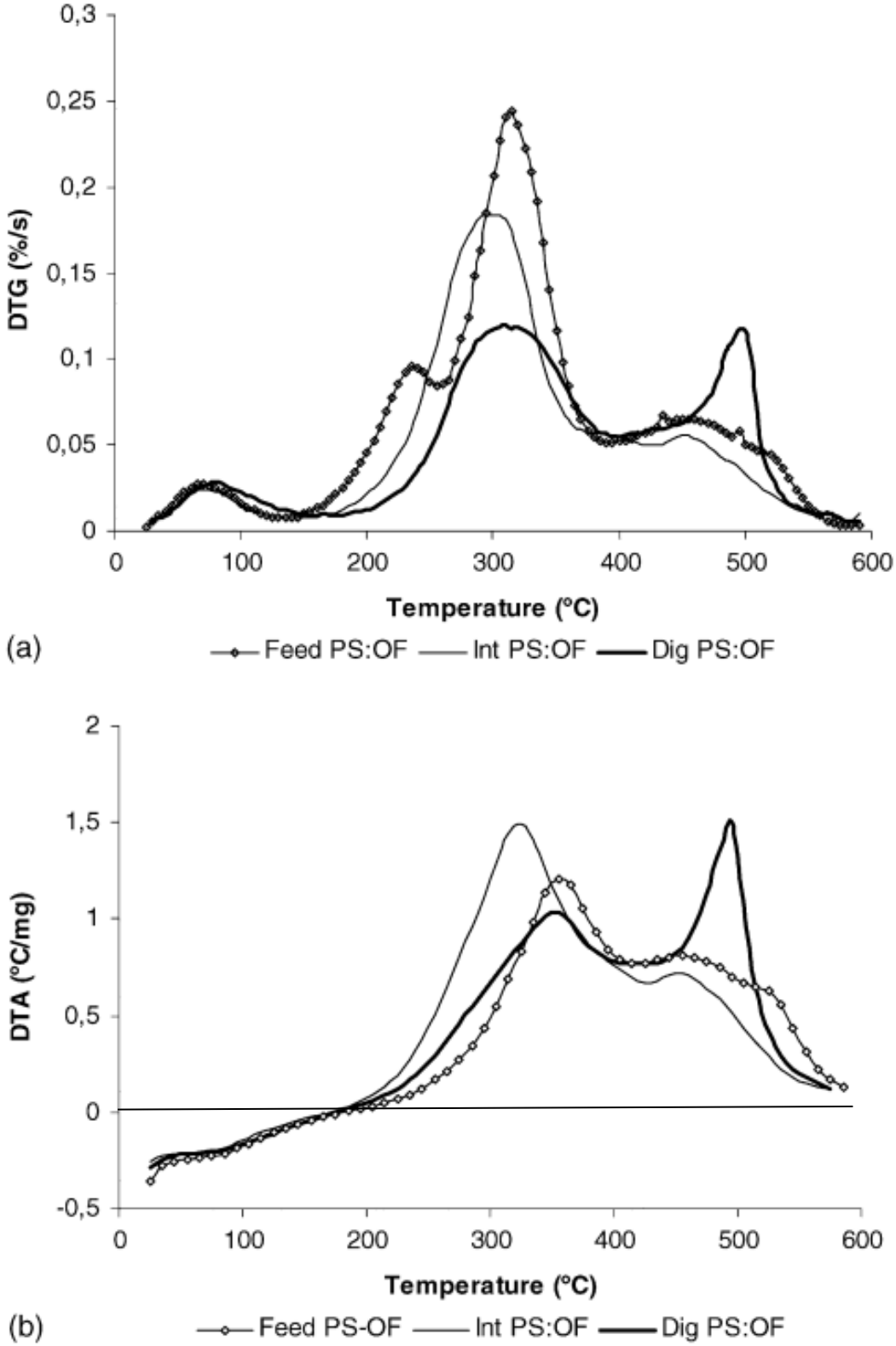


Figure 14 : Caractéristiques des produits organiques (mélange d'effluents d'élevage) avant ("Feed PS"), pendant ("In PS") et après ("Dig PS") digestion anaérobie par l'analyse thermique différentielle (Gómez et al.*, 2005)*

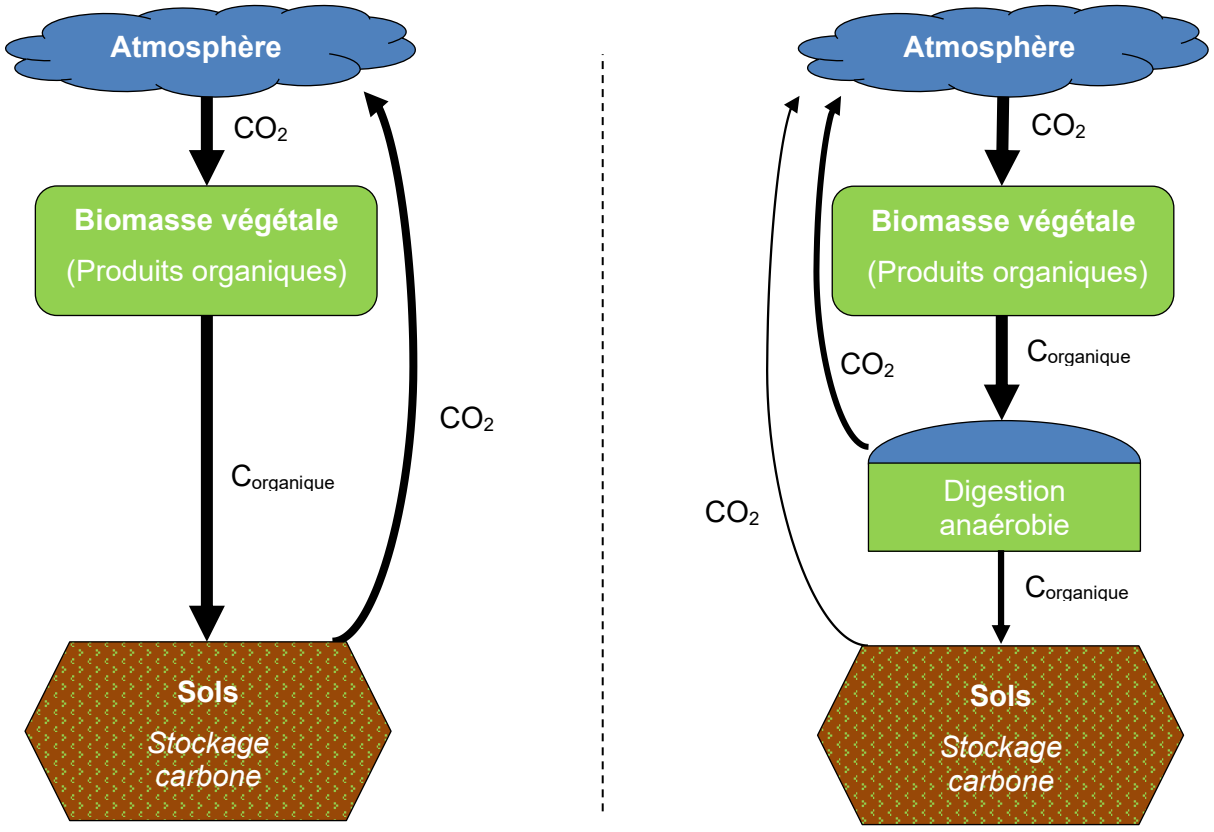
Gómez *et al.* (2007) ont couplé l'analyse thermique à la spectroscopie 13C NMR afin d'évaluer la stabilité des matières organiques puis de caractériser leurs transformations. Cette étude a mis en évidence l'augmentation de la stabilité des produits organiques durant la méthanisation et parallèlement l'augmentation du degré d'aromaticité, l'augmentation des groupes carboxyle/carbonyle des matières organiques et la réduction des sucres. De la même manière, le couplage de la thermogravimétrie et de la spectroscopie 1H NMR a mis en évidence une transformation, durant la digestion anaérobie, des matières organiques en matériaux organiques complexes avec notamment l'accumulation de composés aliphatiques (Gómez *et al.*, 2011). Ainsi, au-delà de l'augmentation en matières organiques récalcitrante associée à la dégradation préférentielles des matières organiques labile, la digestion anaérobie entraine également la formation de composés organiques complexes plus stables thermiquement. Sánchez *et al.* (2008) ont mis en évidence la corrélation existante entre les résultats des analyses thermiques pour les digestats de méthanisation avec d'autre indicateurs de stabilité de la matière organique : la décomposition des matières organiques lors d'incubations, la demande biologique en oxygène (DBO).

Les analyses thermiques, parfois couplées à d'autres méthodes de caractérisation, ont permis de mettre en évidence une augmentation de la stabilité des matières organiques durant la digestion anaérobie associée à la dégradation préférentielle des composés les plus labiles entrainant une accumulation des composés récalcitrants et à une complexification des matières organiques. A notre connaissance, aucune analyse thermique par pyrolyse Rock Eval n'a été réalisée pour les digestats de méthanisation. Les hypothèses testées dans le cadre de notre étude sont donc les suivantes :

- L'analyse thermique par pyrolyse Rock Eval permet de mettre en évidence l'augmentation de la stabilité thermique des matières organiques digérées par rapport aux matières organiques avant la digestion ; pouvant être corrélée avant leur stabilité dans le sol ;
- L'analyse thermique par pyrolyse Rock Eval des matières organiques d'un sol amendé permet d'évaluer les modifications de leurs caractéristiques par rapport à un sol non amendé.

1.4.4. L'effet de la digestion anaérobie des produits organiques sur la séquestration de carbone dans les sols

Les sols représentent un potentiel puit de carbone et peuvent être à l'origine d'une séquestration de carbone. La séquestration est définie comme un transfert de carbone depuis l'atmosphère vers le sol (Olson *et al.*, 2014). Il peut être estimé (sans prendre en compte les phénomènes d'érosion et de lixiviation du carbone soluble) par la différence entre la quantité de carbone capté par la biomasse végétale lors de la photosynthèse et les émissions de CO_2 induites à la suite de son apport au sol (Figure 15a). Dans le cadre de la méthanisation (Figure 15b), une partie des matières organiques est d'abord minéralisée sous forme de CO_2 lors de la combustion du biogaz issu de la digestion anaérobie. Ensuite, lorsque le digestat est incorporé au sol, une partie des matières organiques qu'il contient est rapidement minéralisée sous forme de CO_2 et une partie est stable dans les sols. Ce paragraphe s'intéresse à la comparaison de la quantité de CO_2 émise dans l'atmosphère avec ou sans méthanisation.



(a) Scénario sans digestion anaérobie

(b) Scénario avec digestion anaérobie

Figure 15 : Scenarii de l'effet de la digestion anaérobie sur le bilan de matière du cycle du carbone entre l'atmosphère et la pédosphère

Dans le cadre de ces scénarii, il est important de noter que les parcelles d'où proviennent les végétaux à l'origine des produits organiques ne sont pas forcément les mêmes parcelles sur lesquelles seront apportés les digestats. Par exemple, pour une unité de méthanisation à la ferme, utilisant uniquement ses propres produits organiques pour la digestion, l'agriculteur peut choisir d'épandre le digestat brut sur les parcelles de maïs alors que l'essentiel des matières organiques proviennent plutôt des chaumes des parcelles de blé. Au contraire, l'agriculteur peut choisir de réaliser une séparation de phase afin d'utiliser la phase liquide comme fertilisant organique sur certaines parcelles et la phase solide comme amendant pour restaurer la teneur en matières organiques sur d'autres. Les scénarii présentés par la Figure 15 désignent un modèle conceptuel à l'échelle d'un territoire. Dans le cadre des expériences de l'étude, la même quantité de carbone sera apportée au sol pour chacun des produits organiques. La quantité de carbone minéralisée lors de l'étape de la digestion anaérobie sera évaluée à partir des potentiels méthanogènes des produits organiques.

Thomsen *et al.* (2013) ont étudié l'effet de la méthanisation sur la séquestration de carbone dans le sol. Pour cela, les auteurs ont comparé lors d'incubations en laboratoire la quantité de carbone stocké lorsque le fourrage est incorporé directement au sol, ou auparavant : passé dans un méthaniseur, ou digéré par des animaux, ou digéré par des animaux puis passé dans un méthaniseur. Le stockage de carbone exprimé par unité de carbone incorporé au sol augmente selon : digestat d'effluent > digestat de fourrage > effluent > fourrage. En estimant la consommation de carbone durant la digestion animale à 70% du carbone initial, durant la méthanisation du fourrage à 80% du carbone initial et durant la méthanisation des effluents à 46% du carbone initial, les auteurs ont conclu que la part du carbone finalement séquestré par le sol est similaire dans tous les scénarii et correspond à 12 à 14% du carbone initial des végétaux. A notre connaissance, il s'agit de la seule étude mesurant l'effet de la méthanisation sur la séquestration de carbone dans le sol et il n'existe pas de résultats d'essais au champ de moyenne/longue durée, comparatif avec et sans méthanisation des végétaux, mesurant la part du carbone initial retenue dans les sols.

L'hypothèse testée dans le cadre de notre étude est la suivante :

- Les émissions de CO_2 dans l'atmosphère sont équivalentes avant ou sans digestion anaérobie préalable à l'apport des matières organiques dans les sols car le plus important stockage de carbone dans les sols amendés par des matières organiques digérées par rapport aux matières organiques avant digestion permet de compenser la minéralisation d'une partie des matières organiques durant la digestion anaérobie.

1.4.5. L'effet de la digestion anaérobie des produits organiques sur la fertilité chimique des sols

1.4.5.1. L'effet de la digestion anaérobie des produits organiques sur la biodisponibilité de l'azote et du phosphore

La fertilité chimique des sols après l'apport de digestats est très largement étudiée sous l'aspect de la valeur fertilisante azotée court terme des digestats (Möller, 2015). La minéralisation des matières organiques durant la digestion anaérobie, associée au milieu faiblement oxydant et basique au sein du digesteur, entraine l'accumulation d'azote sous forme ammoniacale au sein des digestats (Möller & Müller, 2012). La forme ammoniacale d'une forte proportion de l'N des digestats est à la fois rapidement biodisponible pour la nutrition des plantes mais également sensible à la volatilisation (Whelan *et al.*, 2010; Riva *et al.*, 2016). La valeur fertilisante azotée court terme des digestats est donc potentiellement meilleure que celle des produits organiques non digérés à conditions que la volatilisation ammoniacale soit limitée (Stinner *et al.*, 2008; Webb *et al.*, 2013). Les digestats de méthanisation peuvent être utilisés comme des engrais organique azotés pouvant se substituer aux engrais de synthèse (Gutser *et al.*, 2005; Loria *et al.*, 2007; Gunnarsson *et al.*, 2010; Riva *et al.*, 2016).

A la suite de l'apport de la phase solide de digestats (après une séparation de phase ou un séchage) au sol, Fuente *et al.* (2013) ont observé une forte diminution de la teneur en azote sous forme minérale dans la phase liquide. Cette diminution est associée à l'immobilisation de l'azote en raison de l'augmentation de l'activité microbienne et du rapport C/N important (C/N = 25) des matières organiques des digestats. L'hypothèse testée dans le cadre de notre étude est la suivante :

- L'apport de digestat de méthanisation, auparavant séché, induit une immobilisation de l'azote de la phase liquide du sol moindre par rapport à l'apport du produit organique avant la digestion en raison de la plus grande stabilité des matières organiques des digestats de méthanisation et par conséquence de la moindre activité microbienne.

La digestion anaérobie n'induit pas d'exportation de phosphore via le biogaz mais modifie la forme du phosphore apporté au sol (Möller & Müller, 2012). La biodégradation des matières organiques durant la digestion anaérobie libère du phosphore sous forme minérale. Le pH basique au sein des digesteurs induit la formation de phosphate ($HPO_4^{2-} \rightarrow PO_4^{3-}$) puis sa précipitation sous forme de phosphate de calcium ou de magnésium, ou de struvite (Möller

& Müller, 2012). La digestion anaérobie induit le passage du phosphore sous formes organiques à des formes minérales précipitées. Les différentes expériences visant à déterminer l'influence de la digestion anaérobie sur la biodisponibilité du phosphore n'ont pas mis en évidence de différences significative sur la croissance des plantes entre l'apport de produits organiques avant et après méthanisation (Loria *et al.*, 2007; Bachmann *et al.*, 2011, 2014; Alburquerque *et al.*, 2012). L'absence de différence provient probablement du fait que le phosphore du sol se trouve majoritairement sous forme insoluble dans les sols et que sa solubilisation est largement expliquée par leur pH et par la prospection racinaire (Havlin, 2005). Contrairement à l'azote, la gestion de la fertilisation du phosphore est plutôt une gestion de stock plutôt que de flux. L'hypothèse testée dans le cadre de notre étude est la suivante :

- Les teneurs en phosphore dans la phase liquide du sol sont similaires après l'apport de digestat de méthanisation ou du produit organique avant digestion.

1.4.5.2. L'effet de la digestion anaérobie des produits organiques sur la capacité d'échange en cations (CEC)

L'effet de la digestion anaérobie des produits organiques sur la CEC n'a pas fait l'objet de publication. L'hypothèse de travail est donc formulée par analogie avec la digestion aérobie mise en œuvre lors du compostage des produits organiques.

Lors de la digestion aérobie, l'oxydation des matières organiques est accompagnée d'une déprotonation des groupements fonctionnels organiques entrainant une augmentation de leur CEC. La mesure de la CEC peut ainsi être utilisée comme un indicateur de la maturité du compost (Harada & Inoko, 1980; García *et al.*, 1991; Iglesias Jiménez & Pérez García, 1991; Saharinen *et al.*, 1996). Par conséquence, la CEC des sols amendés avec du compost augmente en raison de la CEC intrinsèque et de la stabilité des matières organiques des composts (Shiralipour *et al.*, 1992; Adani *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012).

Par analogie avec ce qui est observé lors du compostage, nous faisons l'hypothèse que :

- Les phénomènes de fermentation, de réduction et d'oxydation des matières organiques lors de la digestion anaérobie devrait induire une déprotonation des groupes fonctionnels organiques susceptibles d'augmenter la CEC des matières organiques des digestats. La déprotonation est potentiellement importante et durable au sein du digesteur en raison du milieu basique. La CEC intrinsèque des matières organiques des digestats couplée à la faible biodégradabilité dans le sol devrait induire une augmentation de la CEC des sols amendés par rapport aux sols non amendés.

1.4.6. L'effet de la digestion anaérobie des produits organiques sur la structure des sols agricoles

L'apport de digestats améliore les propriétés physiques des sols par la réduction de leur densité apparente, l'augmentation de conductivité hydraulique à saturation (Garg *et al.*, 2005; Beni *et al.*, 2012) et la stabilité des (Pagliai *et al.*, 1981; Beni *et al.*, 2012; Alburquerque *et al.*, 2012; Frøseth *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2019) par rapport à un sol sans apport de produit organique. Ces effets positifs sont associés à la stimulation de l'activité microbienne des sols à la suite de l'apport de digestat en comparaison avec un sol sans apport (Möller, 2015). Voelkner *et al.* (2015) a toutefois mis en évidence l'effet potentiellement négatif mais limité de la présence de potassium (cation monovalent échangeable) dans les digestats sur la structure des sols.

A notre connaissance, aucune étude investigue strictement l'effet de l'apport de produits organiques méthanisés sur les propriétés physiques des sols en comparaison avec l'apport de produits organiques avant méthanisation. L'hypothèse testée dans le cadre de notre étude est :

- La digestion anaérobie des produits organiques peut potentiellement pénaliser la stabilité structurale des agrégats par rapport à l'apport de produits organiques non méthanisés en raison de la plus grande stabilité biologique des matières organiques apportées diminuant l'activité biologique des sols et de la présence de cations monovalents échangeables.

1.5. Synthèse du travail bibliographique et annonce de la démarche adoptée

La filière biogaz est en développement en France et dans plusieurs pays européens en raison de la politique de soutien des moyens de production d'énergie renouvelable. La proportion des produits organiques valorisés comme source d'énergie grâce à la méthanisation tend à croitre. En conséquence, une part croissante des produits organiques destinés à une valorisation agronomique vont être digérés en milieu anaérobie avant d'être épandus. La digestion anaérobie induit une modification des caractéristiques et des propriétés agronomiques des produits organiques. Les effets de la digestion des produits organiques sur leur propriétés amendantes restent méconnues. La connaissance de leurs propriétés amendantes est d'autant plus importante que la méthanisation induit une diminution de la quantité de carbone apportée au sol. Les propriétés amendantes des produits organiques apportés représentent un enjeu important pour la fertilité des Luvisols étudiés. En raison de la faible teneur en argile de leurs horizons de surface, la fertilité des Luvisols cultivés est particulièrement dépendante d'une bonne teneur et des flux en matières organiques afin de maintenir leurs qualités physiques et chimiques. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'évaluer les conséquences de la digestion anaérobie du maïs sur ses caractéristiques amendantes : devenir des matières organiques, stockage du carbone, vie microbienne, capacité d'adsorption en cations et stabilité des agrégats de l'horizon de surface de Luvisols cultivés.

Après la description du matériel et méthodes utilisés dans cette étude (chapitre II), le chapitre III sera consacré à déterminer si la digestion anaérobie du maïs induit une augmentation de la stabilité des matières organiques apportées et une réduction de l'effet « priming » positif dans les conditions d'un essai au champ. Les résultats des incubations en conditions contrôlées présentées dans le chapitre IV permettront d'expliquer et de tester la reproductibilité des résultats du chapitre III pour un autre couple maïs avant/après méthanisation, et pour un autre Luvisol ; et de déterminer si les émissions de CO_2 dans l'atmosphère sont équivalentes avec ou sans digestion anaérobie préalable à l'apport des matières organiques dans les sols. Les incubations en conditions contrôlées permettront également d'évaluer si les teneurs en azote et en phosphore en solution dans la phase liquide des sols sont différentes après l'apport de maïs ou de digestat de maïs. Le chapitre V sera consacré aux résultats de l'analyse Rock Eval 6 afin de déterminer si cette méthode permet de caractériser la potentielle augmentation de la stabilité thermique des matières organiques à la suite de la digestion anaérobie et si l'apport de digestat de maïs induit une augmentation de la stabilité thermique des matières organiques du sol. Le chapitre VI sera dédié aux hypothèses concernant l'augmentation de la CEC des sols induite par l'apport des digestats

et la plus faible stabilité structurale des sols amendés avec les digestats de maïs par rapport à ceux amendés avec le maïs.

Chapitre II

2. Matériel et méthodes

Dans le cadre de notre étude, une incubation au champ et quatre incubations en conditions contrôlées ont été réalisées (Figure 16). Ce chapitre présente : les produits organiques, les sols, les dispositifs expérimentaux et paramètres mesurés utilisés lors des incubations.

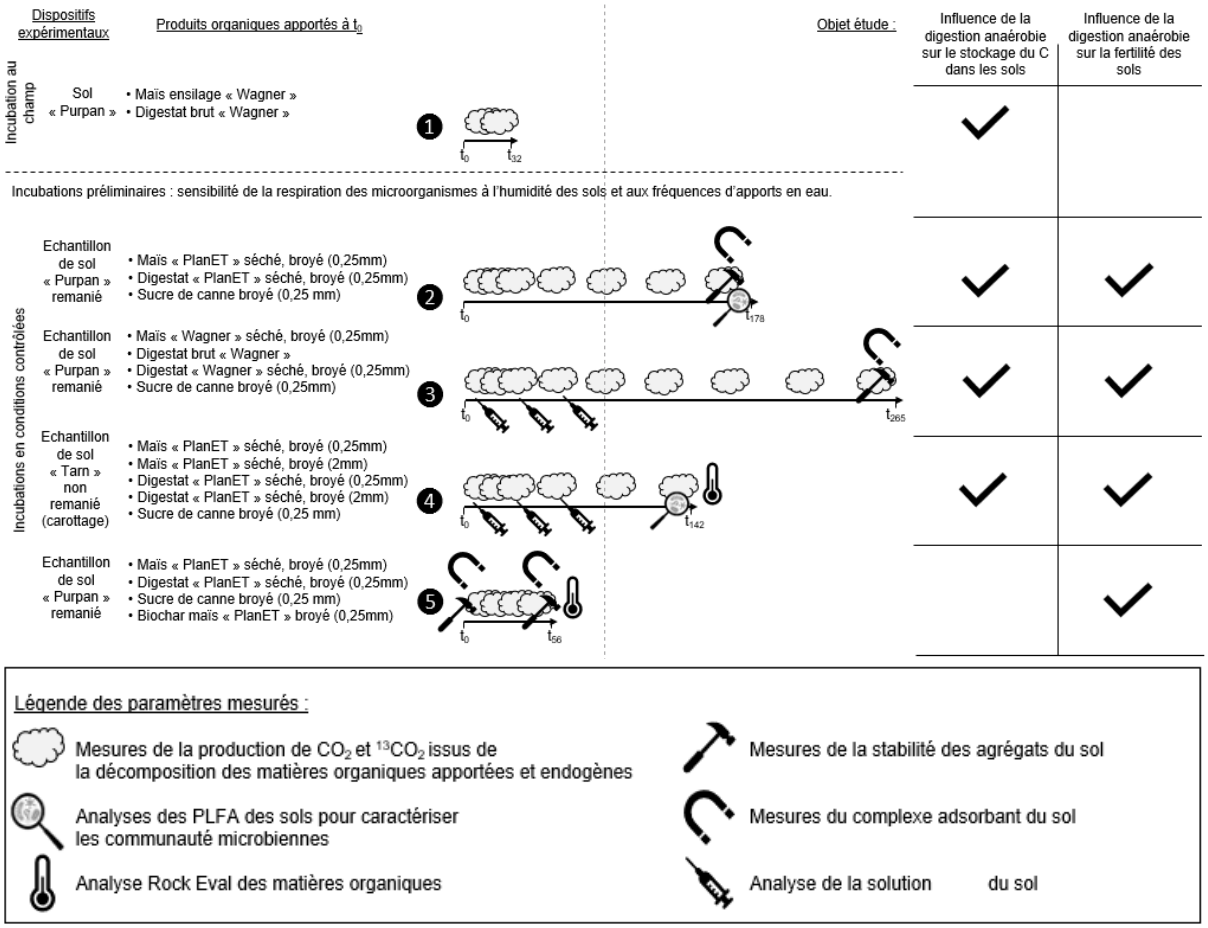


Figure 16 : Plan d'expériences des incubations mises en place et paramètres mesurés dans le cadre de l'étude

2.1. Produits organiques étudiés

Afin de tracer l'origine du CO_2 produit par la minéralisation des matières organiques des sols, les produits organiques exogènes apportés proviennent uniquement de plantes réalisant leur photosynthèse en C4. Des produits organiques avant puis après digestion anaérobie ont été collectés afin d'étudier l'influence de la digestion anaérobie sur leurs qualités amendantes :

- Maïs ensilage utilisé comme substrat pour l'alimentation d'un digesteur expérimental au sein de la société PlanET Biogastechnik GmbH à Vreden en Allemagne (modalité **Maïs PlanET**) ;
- Digestat brut issu du digesteur expérimental de 1 m^3 en infiniment mélangé en condition mésophile de la société PlanET Biogastechnik GmbH alimenté (après un ensemencement à l'aide de lisier issu d'une exploitation de bovins lait) par le maïs PlanET (modalité **Digestat PlanET)** ;
- Maïs ensilage utilisé comme substrat pour l'alimentation d'un digesteur agricole (avec un complément de fumier et de lisier), au sein de la société Wagner GmbH à Steinweiler en Allemagne (Figure 17, modalité **Maïs Wagner**) ;
- Digestat brut issu d'un des trois digesteurs en infiniment mélangé en condition mésophile de la société Wagner GmbH (Figure 17, modalité **Digestat Wagner**).



Figure 17 : Unité de méthanisation agricole de la société Wagner GmbH à Steinweiler en Allemagne (https://wagner-steinweiler.com/)

Afin d'étudier l'influence de la composition biochimique et du degré d'oxydation sur la valeur amendante des produits organiques exogènes, du sucre de canne et un produit organique exogène pyrolysé ont également été introduits dans les expérimentations de l'étude. Le traitement du maïs par compostage n'a pas pu être inclus à l'étude en raison de la difficulté technique de sa mise en œuvre.

- Sucre de canne blanc raffiné fourni par la société Sucres et services basée Portet sur Garonne (modalité **Sucre**) ;

- Biochar issu de la pyrolyse à 500°C sur une durée de 2h00 avec 1h30 de montée et de descente en température à partir du maïs ensilage PlanET sec (NF EN ISO 18134-2), broyé puis tamisé à 1 mm (modalité **Biochar**). La pyrolyse a été réalisée au centre RAPSODEE (CNRS – UMR 5302) de l'Ecole des Mines d'Albi.

Le sucre et le biochar, ayant une teneur en matière sèche sur brut proche de 100% ont été conservés à température ambiante en sachet sous vide. Après la réception des produits organiques humides : maïs ensilage et digestat, des aliquotes en sachet sous vide ont été congelés (-20°C). Quelques semaines avant leur utilisation pour les expériences, les échantillons de maïs et de digestat ont été décongelés puis séchés à 70°C et conservés à température ambiante en sachet sous vide. Les produits organiques ainsi séchés et conservés ont une teneur en matière sèche sur brut de 94% pour les maïs et de 90% pour les digestats. L'ensemble des produits organiques ont été broyés (broyeur à lame et à billes) jusqu'à atteindre la finesse maximum souhaitée vérifiée par tamisage (2 mm, 1 mm et 0,25 mm). Cette préparation a permis de faciliter leur incorporation au sol lors des incubations, de diminuer la variabilité de leur composition et de limiter l'effet de la taille des particules.

Les quantités de produits organiques exogènes apportés aux sols correspondent à un apport d'environ 6 $mgC.g_{sol\ sec}^{-1}$ pour l'ensemble des traitements en conditions contrôlées. Cet apport est équivalent à l'incorporation d'environ 50 $t_{MS}.ha^{-1}$ avec pour hypothèse une profondeur de sol de 0,25 m et une densité apparente au champ de 1,3 $g.cm^{-3}$. Pour comparaison, un maïs ensilage irrigué en Europe produit une biomasse aérienne d'environ 20 $t_{MS}.ha^{-1}$.

2.2. Sols étudiés

2.2.1. Typologie des sols étudiés

Deux Luvisols typiques (Baize & Girard, 2008) du sud-ouest de la France ; localement appelés « boulbènes », et ayant pour matériaux parentaux des dépôts alluviaux du pléistocène supérieur (première époque géologique du quaternaire) ont été utilisés lors de l'étude (Figure 18). Ils proviennent :

- D'une prairie naturelle située au sein de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan (sol nommé : **Purpan** (43.601417, 1.396889, en degré décimal) sur la basse terrasse de la vallée de la Garonne à proximité de Toulouse.
- D'une prairie temporaire (luzerne) sur la basse terrasse du Tarn (sol nommé : **Tarn**) (43.880861, 1.826194, en degré décimal).

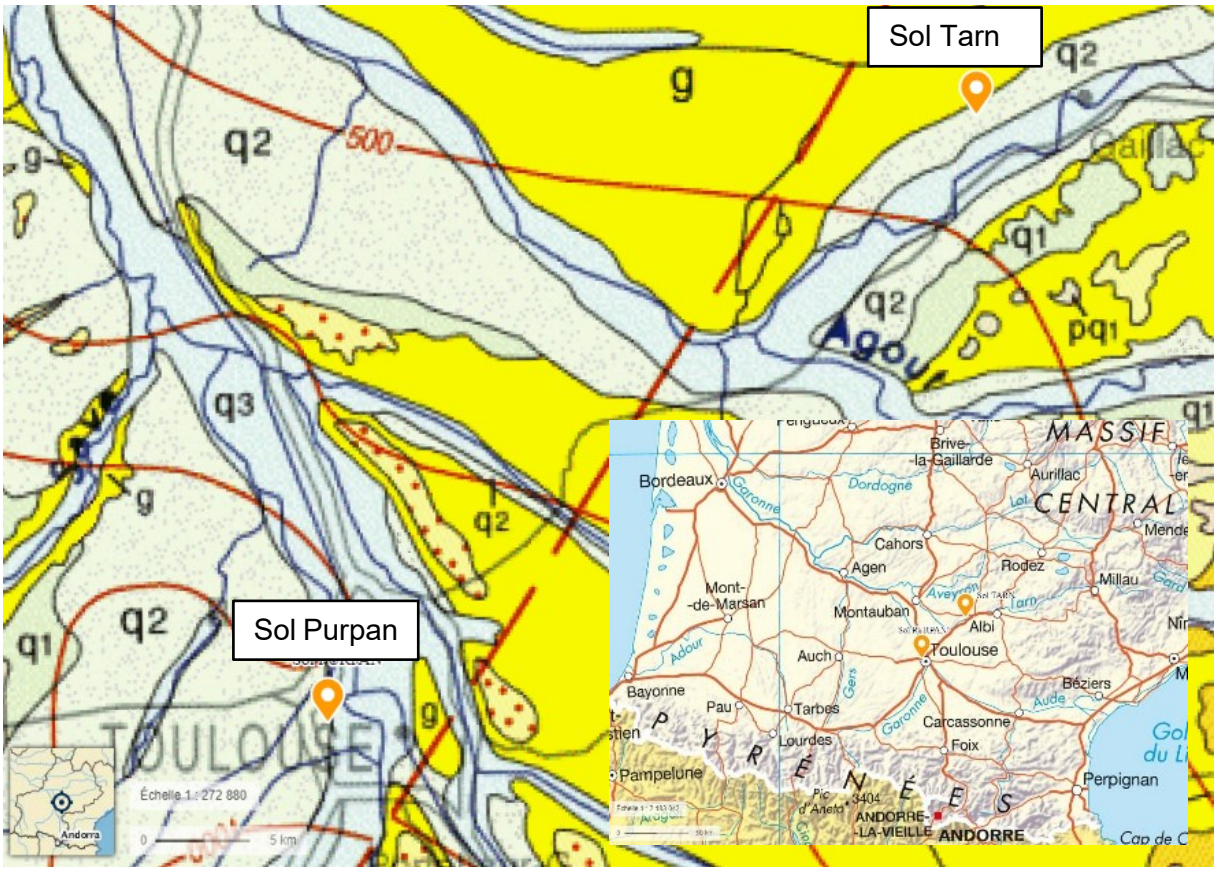


Figure 18 : Localisation et contexte géologique des sols utilisés (fonds de carte : www.géoportail.gouv.fr)

2.2.2. Prélèvement et préparation des échantillons de sol pour les incubations en conditions contrôlées

Plusieurs prélèvements de sols ont été réalisés préalablement aux différentes incubations en conditions contrôlées. Deux méthodes distinctes de prélèvement et de conditionnement ont été mises en place : le prélèvement et le conditionnement d'échantillons remaniés et le prélèvement d'échantillons non remaniés par carottage. Le remaniement des échantillons de sol permet leur homogénéisation mais modifie leur structure. Ces deux méthodes sont présentées dans les paragraphes à suivre.

2.2.2.1. Prélèvement et préparation des échantillons de sols remaniés

Les échantillons de sols remaniés (incubations n°2, 3 et 5, Figure 16) ont été prélevés sur le site de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan sur une profondeur de 0 à 20 cm correspondant à des horizons Ap puis Ae (Eluvial, Baize & Girard, 2008). Le sol a ensuite été tamisé à 5 mm et homogénéisé puis stocké en laboratoire (20°C) durant plusieurs semaines, atteignant une teneur en matières sèches à l'équilibre de 98% avant les incubations.

Aucun échantillon de sol remanié du Tarn n'a été prélevé car l'agriculteur a réalisé un chaulage juste après les prélèvements initiaux réalisés par carottage. L'apport de $CaCO_3$, dont le ratio isotopique des carbones stables ($\delta^{13}C$) est positif, est susceptible de perturber les mesures isotopiques du CO_2 émis par le sol.

2.2.2.2. Prélèvement par carottage et préparation des échantillons de sols non remaniés

La méthode du carottage a été utilisée lors de l'incubation n°4 afin de minimiser la perturbation de la structure du sol et ainsi s'approcher des conditions en champs (Priemé & Christensen, 2001; Arias-Navarro *et al.*, 2017). Le mode opératoire, détaillé en Annexe 1, a été défini à partir du mode opératoire décrit par Arias-Navarro *et al.* (2017).

Les échantillons de sols non remaniés ont été prélevés au sein de l'horizon A (Baize & Girard, 2008). sur une profondeur de 0 à 8 cm. Les prélèvements par carottage ont été réalisés les 17 et 30 août 2017 respectivement pour le sol Purpan et Tarn. Les sols ont ensuite été stockés en laboratoire à une température constante de 20°C durant plusieurs semaines, atteignant une teneur en matières sèche sur brut à l'équilibre de 98%, avant leurs utilisations pour les expériences.

2.3. Caractéristiques physico-chimiques initiales des produits organiques et des Luvisols étudiés

2.3.1. Les caractéristiques physico-chimiques et isotopiques des sols étudiés

Les deux échantillons de Luvisols typiques utilisés pour l'étude présentent une texture de sable argilo-limoneux (Horizon A, Figure 19). Ils sont peu dégradés avec un processus d'appauvrissement de l'argile modéré, un pH légèrement acide et une C.E.C saturée (Tableau 5). Les valeurs de C.E.C sont plutôt faibles en cohérence avec des teneurs en argiles moyennes. La C.E.C plus importante du sol Purpan (14,4 $Cmol.kg^{-1}$, Tableau 5) par rapport au sol Tarn (9,7 $Cmol.kg^{-1}$, Tableau 5) peut être attribuée à une teneur en C plus importante (32,5 et 20,3‰ respectivement, Tableau 6). La teneur en C plus importante du sol Purpan peut être attribuée à son historique. Le sol Purpan est une praire naturelle alors que le sol Tarn est une prairie temporaire auparavant occupée par des vignes. La teneur en C plus importante du sol Purpan par rapport au sol Tarn est cohérente avec sa plus faible masse volumique observée lors des prélèvements par carottage (1,08 et 1,26 g/cm^3 respectivement, données non montrées). Lors des carottages, aucune compression du sol n'a été observée. Ces valeurs sont cohérentes avec celles de la littérature pour des prairies (Blanco-Canqui *et al.*, 2006).

La teneur en carbone du sol Purpan issu du prélèvement remanié (12,5‰, Tableau 6) est plus faible que la teneur en carbone du prélèvement par carottage (32,5‰). Cette différence importante peut s'expliquer les types d'horizons pédologiques au sein desquels les échantillons ont été prélevés. Le prélèvement par carottage a été réalisé à une faible profondeur (8 cm) au sein de l'horizon A (Organique, (Baize & Girard, 2008) alors que le prélèvement du sol remanié a été réalisé sur une profondeur de 20 cm mélangeant ainsi les horizons Ap et Ae (Eluvial, (Baize & Girard, 2008) pauvres en matières organiques (Blanco-Canqui *et al.*, 2006). L'absence de travail du sol entraine une stratification des teneurs en matières organiques avec une forte teneur sur l'horizon A (Alvarez *et al.*, 1995). La teneur en carbone de l'échantillon de sol remanié du sol Purpan (12,5‰, Tableau 6) est dans la moyenne des analyses réalisées par Arrouays *et al. (*2001) pour les sols agricoles métropolitains à des profondeurs équivalentes.

Les sols étudiés ne présentent pas de carences en éléments majeurs ou en oligo-éléments (Tableau 5). Le ratio C/N du sol Purpan est caractéristique d'un sol potentiellement actif biologiquement (9,6, Tableau 6)

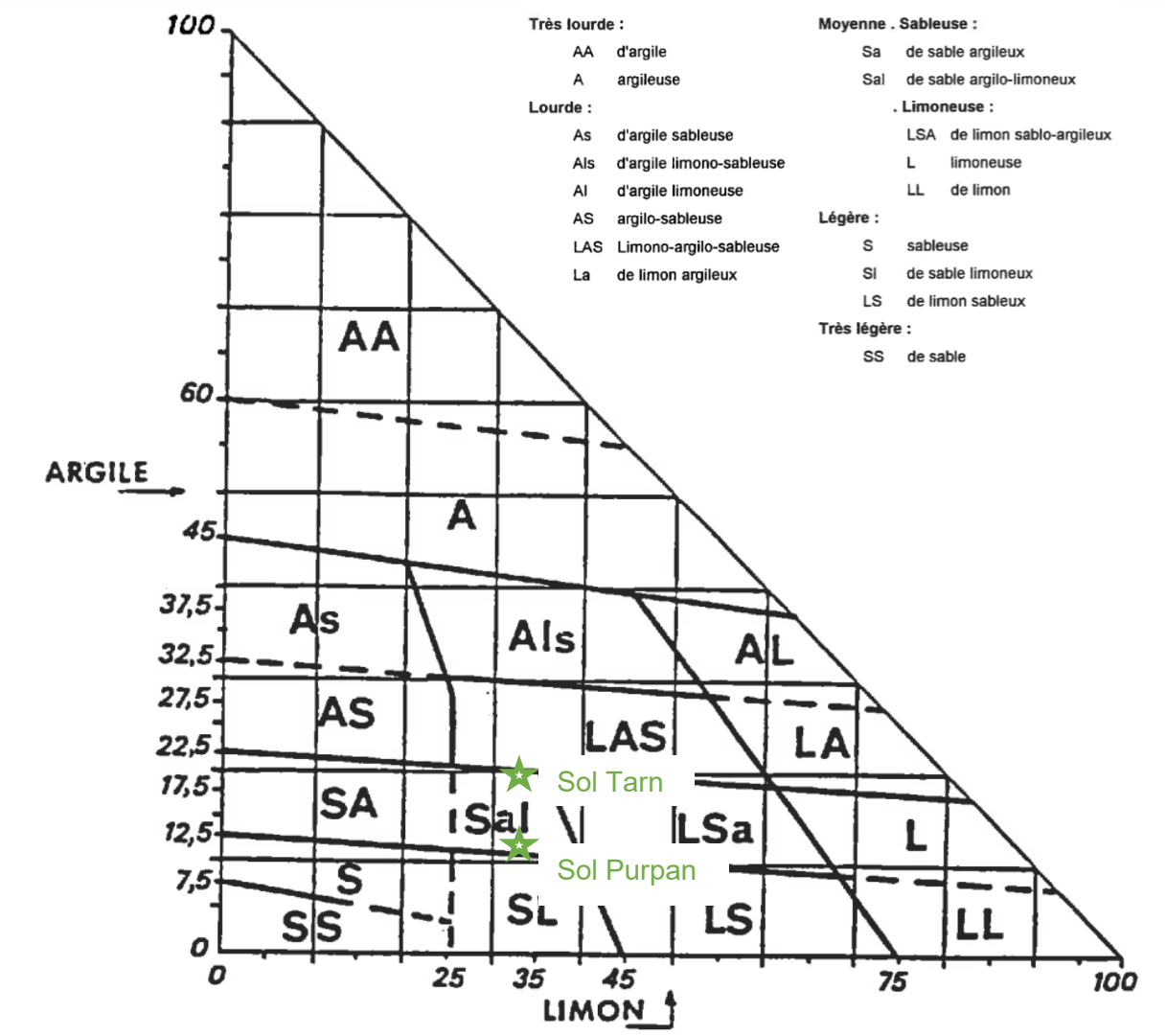


Figure 19 : Diagramme triangulaire des textures (GEPPA, 1963). Textures déterminées sur les échantillons de sol prélevés par carottage sur l'horizon A (SADEF, accréditation COFRAC n°1-0751)

Afin de tracer l'origine du CO_2 produit par la minéralisation de la matière organique, les sols étudiés proviennent de parcelle où uniquement des plantes réalisant leur photosynthèse en C3 ont été cultivées. Ainsi, les ratios isotopiques en carbones stables ($\delta^{13}C_{total}$, Tableau 6) de la matière organique des sols échantillonnés sont caractéristiques des plantes réalisant leur photosynthèse en C3 (O'Leary, 1981). Les ratios isotopiques en carbones stables sans ou avec acidification ($\delta^{13}C_{total}$ et $\delta^{13}C_{organique}$ respectivement, Tableau 6) ne sont pas statistiquement différents ce qui indique que la proportion de carbone inorganique est négligeable. Les ratios isotopiques $\delta^{13}C$ du CO_2 produit par les sols Purpan et Tarn (non amendés) issu de la biodégradation des matières organiques, seront donc être égaux à -26,1 et -27,0% respectivement.

/Sec		Sol (carottage)	
		Purpan	Tarn
pH Eau (NF ISO 10390)		6,7	6,4
Calcaire total (NF ISO 10693)	‰	0	0
C.E.C Metson à pH 7 (NF X 31-130)	$Cmol.kg^{-1}$	14,4	9,70
Saturation du complexe	%	93,6	88,7
Eléments majeurs (NF X 31-160 et NF X 31-108)	‰ P_2O_5 (Dyer)	0,42	0,24
	‰ K_2O	0,36	0,26
	‰ MgO	0,34	0,30
	‰ CaO	3,07	1,82
Oligo éléments (DTPA – NF X 31-121)	mg/kg Fe	65,6	88,0
	mg/kg Mn	29,1	37,3
	mg/kg Zn	2,7	4,5
	mg/kg Cu	3,5	24
	mg/kg Mo	0,35	0,38

Tableau 5 : Caractéristiques granulométriques et physico-chimiques des sols étudiés prélevés par carottage (SADEF, accréditation COFRAC n°1-0751)

/Sec	Purpan		Tarn
	Sol remanié	Carottage	Carottage
C_{total} (‰)	*12,5*	*32,5*	*20,3*
$C_{inorganique}$ (‰)	*12,6*	*Donnée manquante*	*18,0*
$\delta^{13}C_{total}$ (‰)	*-26,1*	*-27,8*	*-27,0*
$\delta^{13}C_{organique}$ (‰)	*-26,3*	*Donnée manquante*	*Donnée manquante*
N_{total} (‰)	*1,3*	*Donnée manquante*	*Donnée manquante*
C_{total}/N_{total}	*9,61*	*Donnée manquante*	*Donnée manquante*

Tableau 6 : Caractéristiques élémentaires des échantillons de sol remanié. Analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (Thermo FlashHT with DeltaV Advantage) au sein de la : « Division of Soil and Water management » de l'université de KU Leuven

2.3.2. Les effets de la digestion anaérobie et de la pyrolyse sur la composition chimique et isotopique des produits organiques

La composition chimique des maïs PlanET et Wagner est typique des maïs ensilages destinés à être conservés en silo avec notamment un pH acide d'environ 4 (Tableau 7). Les teneurs en Matières sèches (MS) sont plutôt supérieures à l'optimum pour la conservation en ensilage situé entre 300 à 350‰ MS (358 et 408 ‰ MS respectivement pour le maïs PlanET et Wagner) car les échantillons ont été prélevés sur les fronts d'attaques des silos exposés au phénomène d'évaporation de l'eau.

Les ratios isotopiques $\delta^{13}C$ des matières organiques des maïs PlanET, maïs Wagner et du sucre de canne de -12,3, -12,6 et -11,9 ‰ respectivement ($\delta^{13}C_{total}$, Tableau 8) sont caractéristiques des plantes ayant une photosynthèse de type C4 (O'Leary, 1981). Les ratios isotopiques $\delta^{13}C$ des digestats PlanET et Wagner sont respectivement de -13,7 et de -21,3 ‰ ($\delta^{13}C_{total}$, Tableau 8). Ces ratios isotopiques indiquent qu'une certaine proportion des matières organiques présentes dans les digestats est issue de plantes ayant une photosynthèse de type C3 ayant un ratio isotopique d'environ -27 ‰ (O'Leary, 1981). Un système d'équation à deux inconnues du premier degré permet d'évaluer à 10% et à 60% pour les digestats PlanET et Wagner respectivement la proportion de matières organiques issues de plantes en C3. Les matières organiques appartenant aux plantes en C3 dans le digestat PlanET proviennent des matières organiques résiduelles récalcitrantes incorporées lors de l'ensemencement du digesteur expérimental à l'aide de lisier. La proportion des matières organiques associées aux plantes en C3 dans le digestat Wagner provient du fumier pailleux et du lisier incorporés en même temps que le maïs pour le rationnement du digesteur. La moins bonne biodégradabilité de la paille par rapport au maïs peut expliquer la forte proportion des matières organiques issues des plantes en C3 dans le digestat Wagner malgré une ration très largement constituée de maïs ensilage. Le ratio isotopique $\delta^{13}C$ du biochar est identique à celui du maïs (-12,1 et -12,2 ‰ respectivement, Tableau 8). La pyrolyse n'a pas entrainé de fractionnement des isotopes du C comme également observé par Cross & Sohi (2011) et Singh *et al.* (2012). Pour l'ensemble des produits organiques exogènes, les ratios isotopiques $\delta^{13}C$ sans ou avec acidification ($\delta^{13}C_{total}$ et $\delta^{13}C_{organique}$ respectivement, Tableau 8) ne sont pas statistiquement différents ce qui indique que la proportion de carbone inorganique est négligeable.

Brut */Sec*		Maïs PlanET	Maïs Wagner	Digestat PlanET	Digestat Wagner	Biochar Maïs PlanET	Sucre
Matières sèches	‰	358	408	93,0	94,7	1000	1000
pH eau		4,3	4,0	8,4	8,0	9,4	6,9
N_{total} (Kjeldahl)	‰	4,03 *11,3*	5,22 *12,8*	2,76 *29,7*	3,47 *36,6*	19,8 *19,8*	0,00 *0,00*
$N\text{-}NH_4^+$ (NF EN 13652)	‰	0,85 *2,38*	0,83 2,03	0,99 *10,4*	0,84 *8,86*	0 *0*	0,00 *0,00*
$N\text{-}NH_4^+/N_{total}$		0,21	0,16	0,36	0,24	-	-
$C_{organique}$ (NF ISO 10694)	‰	165 *462*	*D. manq.*	40,8 *439*	Données manquantes		423 *423*
C_{org}/N_{total}		40,9	37,5	14,8	10,6	22,0	-
Eléments minéraux majeurs (NF EN 13650 eau régale, ICP MS NF EN ISO 17294)	P_2O_5 ‰	*1,94* *5,42*	1,62 *3,97*	*2,11* *22,7*	1,72 *18,2*	*12,2* 12,2	0,75 *0,75*
	K_2O ‰	5,57 *15,6*	4,56 *11,2*	4,95 *53,3*	4,*84* *51,1*	*34,7* *34,7*	0,12 *0,12*
	CaO ‰	1,07 *3,00*	1,07 *2,62*	1,33 *14,3*	1,52 *16,1*	*6,53* *6,54*	0,27 *0,27*
	MgO ‰	0,72 *2,01*	0,78 *1,92*	0,96 *10,3*	0,68 *7,15*	*3,96* *3,96*	0,03 *0,03*

Tableau 7 : Caractéristiques chimiques et compositions élémentaires des produits organiques après congélation (SADEF, accréditation COFRAC n°1-0751)

/Brut */Sec*		Maïs PlanET	Maïs Wagner	Digestat PlanET	Digestat Wagner	Biochar Maïs PlanET	Sucre
$\delta^{13}C_{total}$	‰	-12,3	-12,6	-13,7	-21,3	-12,0	-11,9
$\delta^{13}C_{organique}$	‰	-12,2	-12,6	-13,9	-21,2	-12,1	-11,9
Matières sèches	‰	944	940	900	900	1000	1000
$C_{total} = C_{organique}$	‰	429 *456*	438 *466*	391 *434*	399 *443*	752 *752*	423 *423*
N_{total}	‰	10,0 *10,6*	10,7 *11,4*	22,9 *25,4*	29,4 *32,7*	18,0 *18,0*	0,00 0,00
C_{total}/N_{total}		43,0	42,6	17,1	13,6	42,6	-

Tableau 8 : Compositions élémentaires des produits organiques après séchage, broyage et tamisage. Analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (Thermo FlashHT with DeltaV Advantage) au sein de la : « Division of Soil and Water management » de l'université de KU Leuven

La plus faible teneur en matière sèche des digestats par rapport aux maïs ensilages (93,0‰, 94,7‰, 358‰, 408‰ respectivement pour les digestats PlanET et Wagner et pour les maïs PlanET et Wagner, Tableau 7) peuvent s'expliquer par :

- le procédé de digestion humide en mode continu à volume constant nécessitant une teneur en matières sèches sur brute de la ration entrante d'environ 150‰ (Moletta, 2015). Du lisier est additionné afin d'ajuster l'humidité de la ration ;
- la minéralisation d'une partie de la matière organique augmentant la proportion d'eau. Ainsi, la teneur en matières sèches sur brut moyenne au sein des digesteurs est d'environ 90‰ (Tableau 7).

Les teneurs en $C_{organique}$ (/Brut) sont de 165‰, 40,8‰, respectivement pour les échantillons aliquotés puis congélés de maïs et digestat planET (Tableau 7). L'incorporation de lisier, ayant une forte humidité et donc une faible teneur en $C_{organique}$ (/Brut) (données non montrées), lors du rationnement du digesteur entraine une dilution du $C_{organique}$ (/Brut) dans les digestats par rapport aux maïs ensilages. La plus faible teneur du $C_{organique}$ (/Brut) des digestats par rapport aux maïs s'explique également par la minéralisation des matières organiques lors de la digestion anaérobie.

Les teneurs en $C_{organique}$ (/Sec) sur les échantillons aliquotés puis congelés (462‰ et 439‰) respectivement pour les maïs et digestat PlanET (Tableau 7) sont proches de celles obtenues à partir des échantillons séchés, broyés puis tamisés à 0,25 mm (456‰ et 434‰ respectivement pour les maïs et digestat PlanET, Tableau 8) témoignant d'une forte homogénéité des produits organiques et de bonnes conditions de reproductibilité inter-laboratoires.

La matière sèche d'une plante est composée en moyenne d'environ 88 à 96% de C, O et H dont plus de la moitié est exportée par le biogaz lors de la digestion anaérobie sous forme de CH_4 et de CO_2 tout en conservant les éléments minéraux (Möller & Müller, 2012). L'exportation, dans des proportions similaires de C, O et H induit le maintien de teneurs en $C_{organique}$ (/Sec) similaires entre les maïs et les digestats. Au contraire les teneurs (/Sec) des éléments non exportés via le biogaz (N, P_2O_5, K_2O, CaO, MgO) augmentent dans des proportions théoriquement similaires à celui du taux de dégradation des matières organiques digérées (Möller & Müller, 2012).

Le taux de dégradation des matières organiques du maïs ensilage durant la digestion anaérobie est évalué à 64% (Tableau 9) impliquant une augmentation théorique de la concentration (teneur /sec) des éléments non exportés via le biogaz d'un coefficient d'environ 2,8. Les teneurs en Ntotal (/Sec) ont été multipliées par 2,6 et 2,9 respectivement entre le maïs et le digestat PlanET et Wagner (Tableau 10). Ces coefficients multiplicateurs sont proches

du coefficient multiplicateur théorique calculé à partir du taux de dégradation théorique du maïs ensilage durant la digestion anaérobie (2,8). En revanche, pour les autres éléments (P_2O_5, K_2O, CaO MgO, Tableau 10), les coefficients multiplicateurs mesurés sont plus élevés que le coefficient multiplicateur théorique. La forte augmentation de la concentration de ces éléments peut s'expliquer par les phénomènes de précipitation et d'accumulation des éléments minéraux au fond du digesteur d'où est extrait ponctuellement le digestat (Marcato *et al.*, 2009).

Potentiel biogaz	203 Nm^3 / t $_{produit\ brut}$ 543 Nm^3 / t $_{matières\ organiques}$
Potentiel méthane	123 Nm^3 CH_4 / t $_{produit\ brut}$ 330 Nm^3 CH_4 / t $_{matières\ organiques}$
Taux de dégradation	64% matières organiques

Tableau 9 : Résultats du test de potentiel méthanogène sur le maïs ensilage PlanET. Le test a été réalisé par le laboratoire APESA (Technopole Hélioparc, Pau) d'après la mesure de la production de biogaz dans un réacteur en conditions anaérobies, dans lequel sont mis en contact une quantité connue de l'échantillon à tester et une quantité connue de microorganismes anaérobies (inoculum) actifs et adaptés aux conditions de la mesure, ces derniers étant placés dans des conditions optimales de fermentation. Le potentiel méthanogène est le volume de méthane produit lors de la dégradation de l'échantillon, rapporté à la quantité de matière organique initialement présente dans l'échantillon utilisé pour le test. Ce volume de gaz est exprimé dans les conditions normales de température (0°C, 273 K) et de pression, (1atm ~ 1bar). A ce jour aucune norme internationale ne précise les conditions de réalisation de cette mesure. La mesure a été réalisée sur une durée de 24 jours (permettant d'atteindre l'asymptote de la production de biogaz cumulée) à une température de 38°C. Ce dispositif est comparable aux procédés de méthanisation en voie liquide infiniment mélangé d'où proviennent les digestats prélevés.

/Sec	Maïs PlanET	Digestat PlanET	Maïs Wagner	Digestat PlanET
Ntotal (Kjedahl) ‰	11,3	29,7	12,8	36,6
Coefficient augmentation concentration à la suite digestion anaérobie		x 2,6		x 2,9
P_2O_5 ‰	5,42	22,7	3,97	18,2
Coefficient augmentation concentration à la suite digestion anaérobie		x 4,2		x 4,6
K_2O ‰	15,6	53,3	11,2	51,1
Coefficient augmentation concentration à la suite digestion anaérobie		x 3,4		x 4,6
CaO ‰	3,00	14,3	2,62	16,1
Coefficient augmentation concentration à la suite digestion anaérobie		x 4,8		x 6,1
MgO ‰	2,01	10,3	1,92	7,15
Coefficient augmentation concentration à la suite digestion anaérobie		x 5,1		x 3,7

Tableau 10 : Teneur sur matières sèches en éléments non exportés via le biogaz (d'après analyses SADEF) et coefficients d'augmentation de leur concentration à la suite de la digestion anaérobie

Les pH des digestats sont basiques et plus élevés que ceux des substrats entrants dans le digesteur (Tableau 7, Möller & Müller, 2012). Lors de la digestion anaérobie, plusieurs réactions expliquent la modification des concentrations en protons au sein d'un digesteur (Figure 20) conduisant à une augmentation globale du pH durant la digestion anaérobie.

Les principales réactions qui tendent à diminuer la concentration en protons sont :

- La dernière étape de minéralisation : la méthanogénèse, où les produits de l'acétogénèse (essentiellement acétate, formate, CO_2, et hydrogène) sont transformés en méthane qui est exporté au sein du biogaz ;
- La minéralisation de l'azote organique sous forme de NH_4^+ puis la formation possible de carbonate d'ammonium ($(NH_4)_2CO_3$).

Les principales réactions qui tendent à augmenter la concentration en protons sont :

- L'acidogénèse transformant les monomères, issus de l'hydrolyse des molécules organiques de hauts poids moléculaires, en acides gras. Ces acides gras sont comparables à ceux présents dans le maïs ensilage expliquant son acidité. Ces acides gras volatils sont transformés en précurseurs du CH_4 lors de l'acétogénèse induisant ainsi une remontée du pH dans le digesteur. La réaction d'acétogénèse étant assez lente, l'apport de substrats favorisant l'acidogénèse comme les lipides ou de substrats ayant une forte acidité comme l'ensilage doit être raisonnée afin d'éviter une diminution trop importante du pH dans le digesteur risquant d'inhiber les microorganismes méthanogènes (Moletta, 2015).
- La précipitation des éléments minéraux sous formes de carbonates, de phosphates (-ferrique, -calcique, -magnésien, etc.), de struvite ($MgNH_4PO_4$), etc.

La digestion anaérobie conduit à la conversion de l'azote organique en NH_4^+ (Möller & Müller, 2012) qui est ici mis en évidence par les ratio $N\text{-}NH_4^+/N_{total}$ plus important pour les digestats par rapport aux maïs (Tableau 7). Cependant, les ratios observés pour les digestats (Tableau 7) sont faibles par rapport aux références rapportées par Möller & Müller (2012). Ces faibles ratios peuvent s'expliquer par la volatilisation d'une partie de l'$N\text{-}NH_4^+$ lors du conditionnement des digestats en aliquotes. La volatilisation est facilitée par le pH basique des digestat décalant l'équilibre du couple NH_4^+/NH_3. La diminution des teneurs en N_{total} exprimées par unité de matières sèches des digestats après séchage, broyage et tamisage (Tableau 8) par rapport aux digestats après congélation (Tableau 7) peut s'expliquer par la volatilisation de l'$N\text{-}NH_4^+$ restant. La volatilisation de l'$N\text{-}NH_4^+$ explique l'augmentation du ratio C/N des digestats après congélation par rapport aux digestats après séchage, broyage et tamisage.

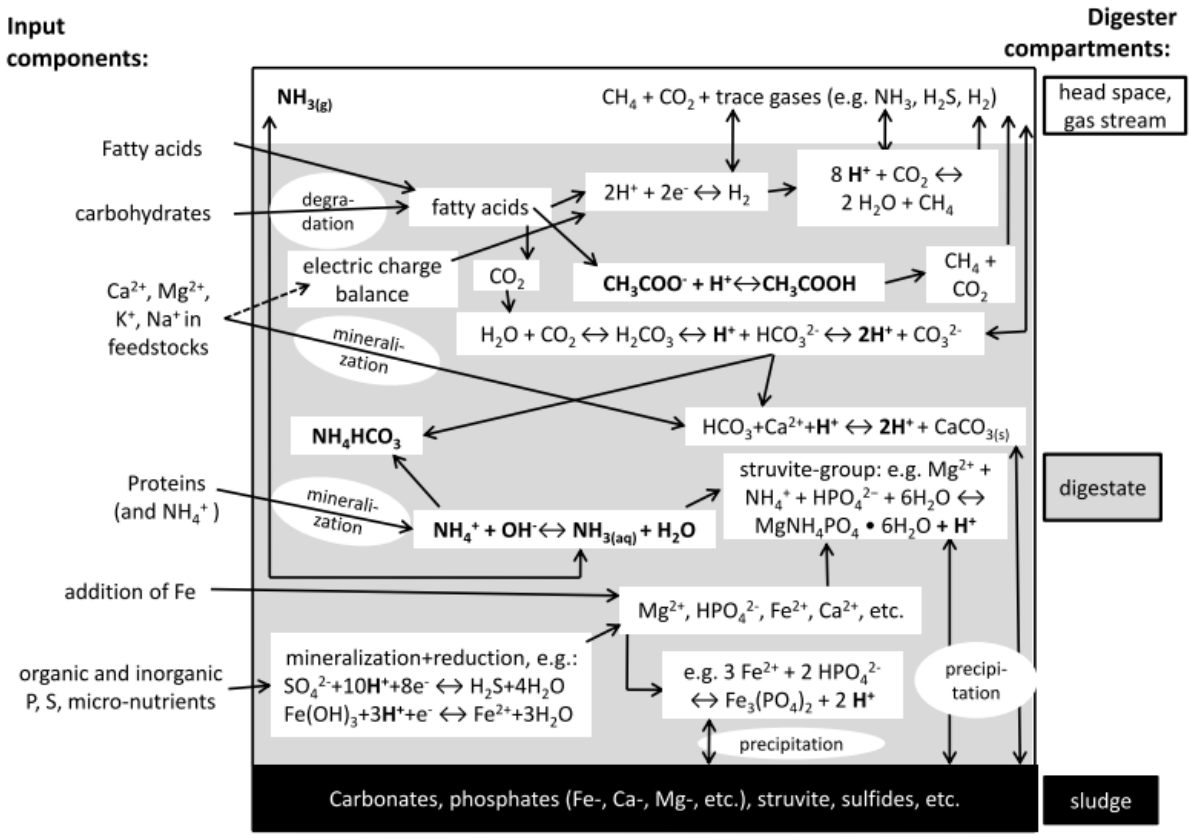


Figure 20 : Facteurs influençant la valeur du pH des digestats (Möller & Müller, 2012)

La décomposition des matières organiques du maïs PlanET par pyrolyse (à 500°C) a entrainé la production : d'un solide, d'une huile et d'un gaz. Le solide produit représente 28% de la masse initiale du maïs préalablement séché (données non montrées). La teneur en C organique du biochar est plus importante par rapport au maïs (752 et 429‰ respectivement, Tableau 8) en raison de la richesse en O et H des matières volatiles générées lors des réactions de craquage des matières organiques durant la pyrolyse. Les éléments minéraux (phosphore, potassium, calcium, magnésium), peu volatils à une température de 500°C, sont conservés entrainant une augmentation de leurs teneurs dans le biochar (Tableau 7). En revanche, La différence en la teneur en N_{total} dans le biochar et le maïs (19,8‰, 11,3‰, Tableau 7) a augmenté dans des proportions moindres par rapport aux autres éléments minéraux en raison de la volatilisation d'une partie des composés organiques azotés. L'accumulation des cations sous forme minérale et la décomposition des groupes fonctionnels acides expliquent le pH basique mesuré pour les biochars (Tableau 7, Ippolito *et al.*, 2015).

L'analyse des produits organiques avant et après méthanisation a permis de préciser les effets de la digestion anaérobie sur leur composition chimique. L'analyse isotopique des matières organiques des produits organiques et des sols, issus de plantes en C4 et C3 respectivement, a permis de valider leurs différences de $\delta^{13}C$.

2.4. Analyse par pyrolyse Rock Eval des matières organiques des produits organiques avant incubation et des sols à l'issue des incubations

L'analyse par pyrolyse Rock Eval a été réalisée avec un pyrolyseur Rock-Eval 6 ("Turbo" model, Vinci Technologies®, France) à l'Institut des sciences de la Terre de l'Université de Lausanne. Deux séries d'analyses ont été réalisées pour :

- Les matières organiques des produits organiques (séché, broyés, tamisés) ;
- Les matières organiques des sols à l'issue des incubations n°4 et 5 (Figure 16).

La méthode consiste en un craquage thermique de la matière organique en deux étapes successives (Figure 21), suivies de la quantification des composés produits lors de ce craquage.

Dans un premier temps, quelques grammes à dizaines de grammes de l'échantillon sont pyrolysés sous atmosphère inerte (N_2) entre 200°C et 650°C à température croissante régulière (25°C.min^{-1}). Les effluents produits durant cette première étape sont quantifiés en continu par un détecteur à ionisation de flamme « FID » (Flame Ionization Detector) pour les composés hydrocarbonés (HC) et de deux cellules infrarouges pour les composés oxygénés (CO et CO_2). La seconde étape est une oxydation du résidu de pyrolyse sous atmosphère oxygénée (air) entre 400°C et 700°C à température croissante régulière (20°C.min^{-1}). Le CO et CO_2 émis sont là encore détectés en continu par les cellules infrarouge. Le processus résulte en la production de différentes courbes d'émission d'effluents de pyrolyse et d'oxydation, obtenues entre des bornes de température déterminées :

- Courbe S1 (en mg HC.g^{-1} échantillon) : HC libres thermovaporisés lors de la phase isotherme (200°C) de la pyrolyse correspondant aux gaz et huiles. Cette courbe n'a d'intérêt que pour l'étude du potentiel pétrolier des roches et n'est pas pris en compte dans cette étude (les valeurs de S1 sont négligeables) ;
- Courbe S2 (en mg HC.g^{-1} échantillon) : HC produits lors du cycle de pyrolyse. L'étude de cette courbe permet d'évaluer la stabilité thermique des matières organiques du produit testé ;
- Courbes S3CO et S3CO_2 (en mg HC.g^{-1} échantillon) : CO et CO_2 produits par les matières organiques lors du cycle de pyrolyse. Les quantités de CO issus de la dégradation des matières organiques à des températures inférieures à 550°C et 400°C respectivement sont distingués des molécules de CO produits par la décomposition des carbonates à des températures supérieures (Lafargue *et al.*, 1998) (Behar *et al.*, 2001). De même, la borne d'intégration du CO_2

d'origine organique est fixée à 400°C. L'équilibre de Boudouard correspondant à la réduction du CO_2 par le carbone solide en CO est également pris en compte (Lafargue *et al.*, 1998) (Behar *et al.*, 2001) ;

- Courbe S4CO et $S4CO_2$ (en mg $HC.g^{-1}$ échantillon) : CO et CO_2 produits lors du cycle d'oxydation des matières organiques résiduelles, jusqu'à 700°C. Les signaux S4CO et $S4CO_2$ sont entièrement attribués au C d'origine organique. Le CO_2 récupéré au-delà de 650°C (S5) est, quant à lui, attribué au C d'origine minérale (Behar *et al.*, 2001).

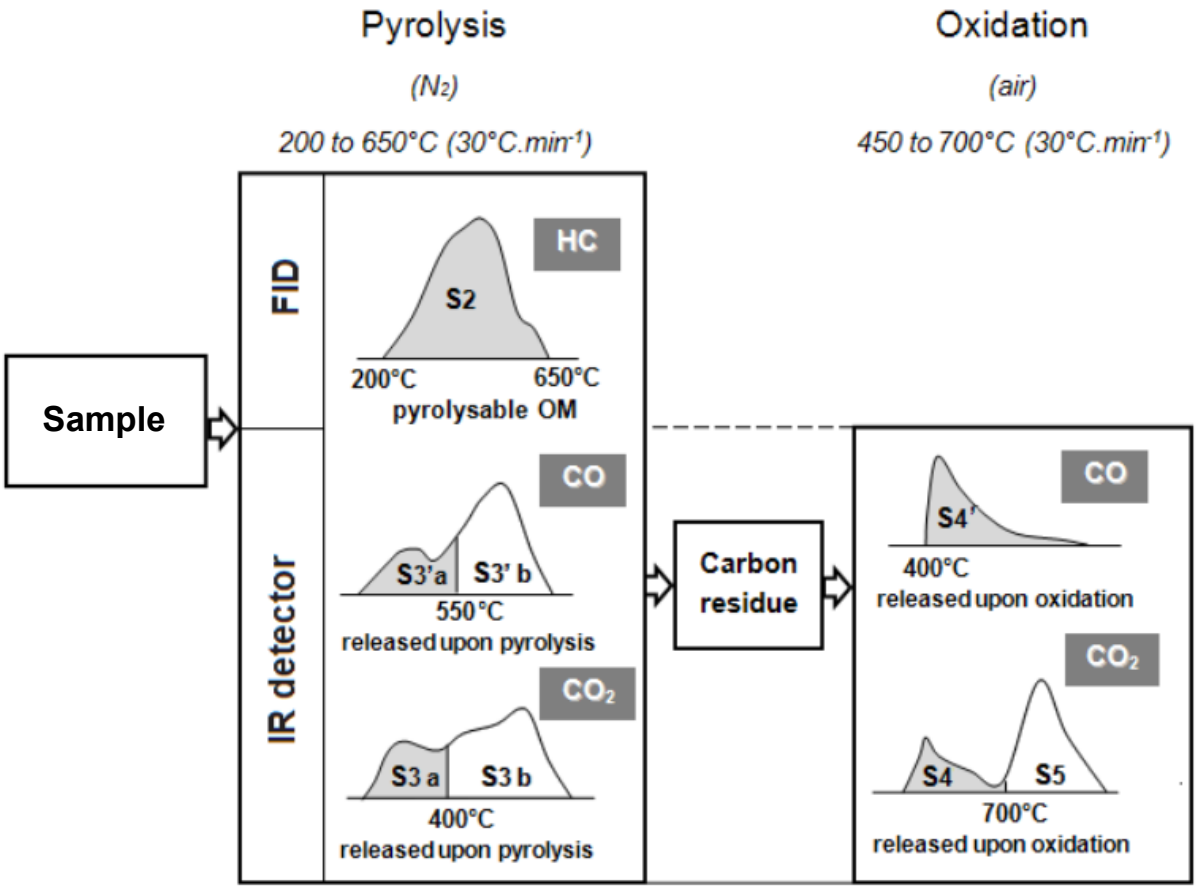


Figure 21 : Principales étapes et pyrogrammes de la procédure de pyrolyse Rock-Eval 6 (Saenger, 2013)

L'intégration de ces courbes permet de caractériser chaque échantillon en fonction de (Tableau 11) :

- La quantification du Carbone Organique Total (COT). Cette quantification est bien corrélée avec les valeurs de obtenues par analyses élémentaires pour des échantillons de sol (r^2 = 0,987) mais nécessite la correction suivante :

$$COT\ (analyse\ élementaire) = 1{,}294\ \times COT\ (Rock\ Eval) - 0.197$$

La quantification du COT par Rock Eval n'est cependant pas adaptée pour les matières organiques très stables thermiquement tel que les charbons (Lafargue *et al.*, 1998) ;

- La caractérisation globale des matières organiques par le calcul des Indices Hydrogène (IH) et Oxygène (IO_{CO2}). Les indices IH et IO_{CO2} sont bien corrélés avec les ratios atomiques H/C et O/C utilisés pour le diagramme de van Krevelen (Vandenbroucke & Largeau, 2007). Ces indices témoignent du niveau de déshydrogénation et d'oxydation (et d'aromatisation) et sont notamment utilisés afin d'évaluer le degré d'évolution des matières organiques des sols (Saenger *et al.*, 2013) ;
- La caractérisation de la stabilité thermique des matières organiques à partir du calcul des Index-I et -R (Sebag *et al.*, 2016). L'Index-I représente la proportion de matières organiques labiles thermiquement et l'Index-R représente la proportion de matières organiques récalcitrants thermiquement.

- *Tableau 11 : Calcul des principaux paramètres Rock-Eval pour la caractérisation des matières organiques. D'après Saenger (2013) à partir des notes techniques des équipes de l'Institut Français du Pétrole (IFP) et de Sebag* et al. *(2016)*

Paramètre calculé	Définition	Formule
Carbone pyrolysé (PC ; en $g.kg^{-1}$)	Quantité de carbone issu de la décomposition des matières organiques durant la phase de pyrolyse	$PC = S2 \times \frac{83}{100} + \left(S3CO a + \frac{1}{2} S3CO2\right) \times \frac{12}{28} + S3CO2a \times \frac{12}{44}$
Carbone résiduel (RC ; en $g.kg^{-1}$)	Quantité de carbone issu de la décomposition des matières organique durant la phase d'oxydation	$RC = S4CO \times \frac{12}{28} + S4CO2 \times \frac{12}{44}$
Carbone organique total (COT ; en $g.kg^{-1}$)	Correspond à la somme des quantités de carboné obtenues en phase de pyrolyse et d'oxydation	$COT = PC + RC$
Carbone minéral (Cmin ; en $g.kg^{-1}$)	Correspond à la somme des quantités de carbone enregistrées sous forme de CO_2 et de CO au-delà de certain seuil de température, en phase de pyrolyse et d'oxydation	$Cmin = \frac{1}{2} S3COb \times \frac{12}{28} + S3CO2b \times \frac{12}{44} + S5 \times \frac{12}{44}$
Indice d'hydrogène (IH ; en mg $HC.g^{-1}$ COT)	Proportion d'effluents hydrocarbonés émis durant la pyrolyse S2 rapportée au COT	$IH = \frac{S2}{COT}$
Indice d'oxygène (IOCO2 ; en mg $CO_2.g^{-1}$ COT)	Proportion de CO_2 provenant de la décomposition de la matière organique rapportée au COT	$IO_{CO2} = \frac{S3CO2a}{COT}$
I-Index	Proportion de matières organiques thermiquement labiles évaluée à partir de la courbe S2	Compartimentage des matières organiques d'après leur stabilité thermique (Gillespie *et al.*, 2014) : A1 (200 à 300°C, biopolymères labiles), A2 (340 à 400°C, biopolymères récalcitrants), A3 (400 à 460°C, géopolymères immatures), A4 (>460°C, géopolymères récalcitrants). $I - Index = log_{10}\left[\frac{(A1+A2)}{A3}\right]$
R-Index	Proportion de géopolymères évaluée à partir de la courbe S2 (Disnar *et al.*, 2003)	$R - Index = log_{10}\left(\frac{A3 + A4}{A1 + A2 + A3 + A4}\right)$
* $\frac{83}{100}$, $\frac{12}{28}$, $\frac{12}{44}$ sont respectivement les proportions moyennes de carbone dans les composés hydrocarbonés, CO et le CO_2.		

2.5. Mesure de la décomposition des matières organiques apportées et endogènes

2.5.1. Dispositifs d'incubation des sols en conditions contrôlées et au champ

Les incubations des sols étudiés ont été réalisées dans des enceintes ouvertes pouvant être temporairement fermées hermétiquement avec un obturateur et un couvercle à vis ouvrable ¼ de tour afin de mesurer leur production de CO_2 (Figure 22 a et b).

Les critères de choix des enceintes utilisées sont : une matière inerte non biodégradable, l'étanchéité de l'enceinte fermée, un diamètre compatible avec l'insertion des carottes de sol et le ratio hauteur sur diamètre permettant d'incuber le sol sur une profondeur d'environ 10 cm tout en atteignant une concentration de CO_2 comprise entre 1000 et 1500 ppm en moins de 20 min lors de la mesure de la production de CO_2 des sols (avec l'enceinte fermée) pour les modalités témoins (sol non amendé). Les enceintes utilisées sont des pots en PEHD d'un volume de 1 L (diamètre : 97 mm et hauteur : 154 mm) pour les incubations de sol remaniés en conditions contrôlées (Figure 22b) et de 2,5 L (diamètre : 116 mm et hauteur : 161 mm) lors des incubations au champ (Figure 22a) et d'échantillons de sol non remaniés (carottes de 110 mm de diamètre) en conditions contrôlées. Pour les incubations au champ, le fond des pots a été enlevé afin de pouvoir les enfoncer dans le sol. Au champ, les pots ont été enfoncés sur une profondeur de 10 cm et maintenus à leur emplacement durant la durée de l'expérience.



Figure 22 : Couplage d'un dispositif d'incubation au champ (a) et en conditions contrôlées (b) avec l'appareil de mesure Picarro G2201-i

2.5.2. Mesure et maintien de l'humidité des sols lors des incubations en conditions contrôlées

L'ensemble des incubations en conditions contrôlées ont été réalisées à une température ambiante constante de 20°C. L'humidité pondérale des sols a été ajustée une à deux fois par semaine pour l'ensemble des expériences en conditions contrôlées. La méthode de mesure, le niveau d'humidité des sols et la fréquence d'ajustement ont été définis à la suite d'incubations préliminaires destinées à étudier la sensibilité de la respiration des microorganismes à l'humidité des sols et aux fréquences d'apports en eau (Figure 16). L'humidité des sols a été ajustée en fonction de leur teneur massique en eau ou du taux de remplissage des pores en eau.

La mesure de la porosité d'un échantillon de sol consiste à soustraire sa densité par celle de ses particules. Elle se déroule en 3 étapes :

- Mesure de la masse volumique apparente des échantillons de sol ;
- Mesure de la masse volumique des particules de sol ;
- Calcul de la porosité, de son taux remplissage et du volume d'eau à additionner pour atteindre le taux souhaité.

2.5.2.1. Mesure de la masse volumique apparente des échantillons de sol incubés

La masse volumique apparente ($Masse\ volumique_{apparente}$) des échantillons de sol est mesurée d'après la norme AFNOR (1992) à partir de la masse sèche (AFNOR, 1994) des échantillons qui vont être incubés dans les jours précédents le début des incubations et du volume de sol incubé dans chacun des pots. Durant les incubations, le volume de sol incubé est mesuré afin d'ajuster la quantité d'eau déminéralisée à apporter.

2.5.2.2. Mesure de la masse volumique des particules de sol

La méthode (destructive) pour la mesure de la masse volumique des particules de sol consiste à :

- Introduire une masse connue (environ 50 g) de sol sec ($Masse_{sol}$) dans une fiole jaugée de 200 ml ($Volume_{fiole}$) préalablement pesée ($Masse_{fiole}$) ;
- Introduire environ 100 ml d'eau déminéralisée dans la fiole contenant le sol puis porter le mélange à une ébullition douce en agitant délicatement la fiole afin d'évacuer l'ensemble des bulles d'air ;
- Laisser refroidir et reposer le mélange durant 24h avec la fiole fermée ;
- Remplir la fiole jusqu'à 200 ml puis mesurer la masse de la fiole jaugée ($Masse_{total}$).

L'Équation 1 permet de calculer la densité des particules des échantillons de sol à partir de la méthode présentée ci-dessus.

Équation 1

$$Masse\ volumique_{particules}(g\ cm^{-3}) = \frac{Masse_{sol}}{Volume_{fiole} - \left[\frac{Masse_{total} - \left(Masse_{fiole} - Masse_{sol}\right)}{Densité_{eau}}\right]}$$

L'Équation 2 permet de calculer la porosité des échantillons de sol.

Équation 2

$$Porosité\ sol\ (\%) = \left(\frac{Masse\ volumique_{apparente}}{Masse\ volumique_{particules}}\right) \times 100$$

2.5.3. Mesure de la production totale de CO_2 par les sols

La minéralisation des matières organiques sous forme de CO_2 (et du CH_4) en conditions contrôlées et au champ ont été suivies au cours du temps. La minéralisation des matières organiques est suivie ponctuellement par la mesure de l'augmentation linéaire des concentrations en CO_2 et en CH_4 sur une période de temps d'environ 20 min pour chaque dispositif d'incubation couplé à l'appareil de mesure fermé hermétiquement (Figure 22). L'analyseur est couplé successivement aux dispositifs d'incubation à l'aide de tubes et d'un passe cloison au travers d'un couvercle étanche (Figure 22). L'étanchéité du dispositif a été testée par l'ajout de CH_4 et le suivi de sa concentration durant plusieurs heures (données non montrées). La calibration de l'analyseur a été vérifiée à l'aide de standards (Air Liquide France). Les mesures ponctuelles de la minéralisation des matières organiques sont réalisées quotidiennement au début des incubations puis hebdomadairement et mensuellement.

La technique de la spectroscopie par absorption laser dans un résonateur optique en anneau (CRDS ; analyseur Picarro G2201-i équipé d'une pompe externe étanche) a permis de mesurer l'évolution des concentrations en CO_2 et en CH_4. Un faisceau lumineux, dont la longueur d'onde est déterminée en fonction de l'analyte, est émis dans la cavité de l'analyseur puis éteint (Figure 23). La perte d'intensité lumineuse à la sortie de la cavité au cours du temps est ensuite mesurée. La spectroscopie a cavité optique laser est basée sur la relation entre la concentration de l'analyte et l'absorbance de l'énergie lumineuse à une certaine longueur d'onde. La cavité est équipée d'un résonateur optique en anneau permettant de multiplier la distance parcourue par la lumière et ainsi d'augmenter sa perte d'intensité sur la période de la

mesure. La diminution de l'intensité lumineuse est mesurée à l'aide d'une photodiode convertissant l'énergie lumineuse en signal électrique. L'intensité lumineuse est effectuée au niveau des miroirs semi-réfléchissants sur les rayons réfractés du laser. Les rayons réfléchis continuent leur parcours au sein de la cavité.

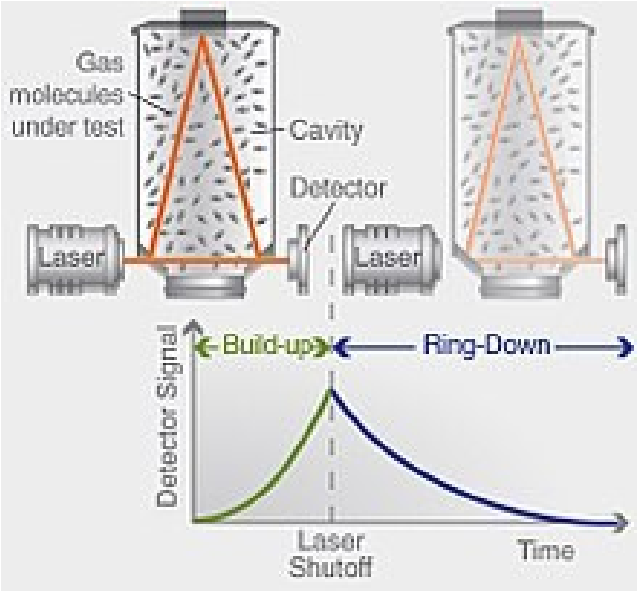


Figure 23 : Principe de fonctionnement de la spectroscopie par adsorption laser dans un résonateur optique en anneau (B. Atkinson, 2003).

La production de CO_2 (où de CH_4) est exprimée en µg CO_2-C.g_{MS}^{-1}.h^{-1} selon Équation 3 :

Équation 3

$$Production\ CO_2(t) = \frac{a \times V}{M_{MS}}$$

Avec « a » : la pente de l'augmentation linéaire de la concentration en CO_2 dans le temps durant la mesure (en µg CO_2-C.h^{-1}), « V » : le volume du dispositif d'incubation et de mesure net (hors volume du sol incubé) en m^3, « M_{MS} » : la masse de sol sec (en g).

Le volume du dispositif d'incubation et de l'appareil de mesure couplés est calculé à partir de l'augmentation linéaire de la concentration CH_4 après l'injection successives de quantités connues dans le dispositif. Le volume net est ensuite calculé en soustrayant le volume de sol incubé, estimé à partir de sa densité.

2.5.4. Partition de la production de CO_2 issue des matières organiques endogènes et apportées

L'abondance naturelle de l'isotope non radioactif (^{13}C) a été utilisé comme traceur afin de partitionner la production de CO_2 en productions issues de la minéralisation des matières organiques endogènes et exogènes. Cette méthode est basée sur la différence d'abondance en ^{13}C de la matière organique issue de plantes réalisant une photosynthèse en C3 par rapport aux plantes en C4 (Tableau 8, Kuzyakov, 2006). L'analyseur Picarro G2201-i permet de mesurer le ratio isotopique du CO_2 ($\delta^{13}C\text{-}CO_2$) produit par les sols.

Les productions en CO_2 ont été partitionnées selon les Equations Équation 4 et Équation 5 :

Équation 4

$$Production\ CO_{2\ matières\ organiques\ apportées}\ (t) = \left[\frac{\delta_C - \delta_A}{\delta_C - \delta_{MOE}}\right] \times Production\ CO_2\ (t)$$

Équation 5

$$Production\ CO_{2\ matières\ organiques\ endogènes}\ (t) = \left(1 - \left[\frac{\delta_C - \delta_A}{\delta_C - \delta_{MOE}}\right]\right) \times Production\ CO_2\ (t)$$

Avec « δ_C » : la signature isotopique ($\delta^{13}C\text{-}CO_2$) moyenne du CO_2 produit par les sols témoins sans amendement organique, « δ_A » : la signature $\delta^{13}C\text{-}CO_2$ de la modalité amendée mesurée, « δ_{MOE} » : le ratio isotopique de la matière organique apportée de la modalité mesurée (Tableau 8, $\delta^{13}C_{organique}$).

La méthode mathématique de Keeling (1958) est utilisée afin de déterminer la signature $\delta^{13}C\text{-}CO_2$. Cette méthode, basée sur le principe de conservation des masses dans un milieu fermé, consiste à déterminer le $\delta^{13}C$ du CO_2 produit à partir de l'extrapolation de la régression linéaire entre l'évolution de l'inverse des concentrations en CO_2 et des $\delta^{13}C\text{-}CO_2$ mesurés. Cette méthode a notamment permis de mettre en évidence la relation entre l'augmentation de la concentration en CO_2 dans l'atmosphère et la diminution du $\delta^{13}C\text{-}CO_2$; attribuant ainsi son augmentation à la combustion des ressources carbonées fossiles.

2.5.5. Calcul de la proportion potentielle des matières organiques apportées stables dans les sols

La proportion potentielle des matières organiques apportées aux sols considérées comme stables a été évaluée d'après la méthode utilisée par Lashermes ***et al.*** *(*2009). Un modèle mathématique a été associé à l'évolution de la proportion des matières organiques apportées non biodégradées (en % de quantité de C initialement apporté, Équation 6)

Équation 6

$$Proportion\ Matières\ Organiques\ Apportées_{non\ biodégradées}(t) = 1 - Cumul\ Production\ CO2_{matières\ organiques\ apportées}(t)$$

La formule du modèle mathématique utilisé est décrite par l'Équation 7. Le modèle permet de décrire le devenir des matières organiques en fonction de trois compartiments. C_1 et C_2 représentent deux compartiments de matières organiques biodégradables ayant des vitesse de minéralisation propres (k_1 et k_2) et $(1 - C_1 - C_2)$ la proportion des matières organiques potentiellement stables dans les sols. L'outil « Régression non linéaire » du logiciel XLSTAT 2018 sous MICROSOFT EXCEL 2016 a été utilisé afin de déterminer les facteurs de l'Équation 7 pour chacune des incubations.

Équation 7

$$Modélisation\ proportion\ Matières\ Organiques\ Apportées_{non\ biodégradées}(t) = C_1 \times e^{-k_1(t)} + C_2 \times e^{-k_2(t)} + (1 - C_1 - C_2)$$

2.5.6. Calcul des effets « priming »

Les effets « priming », exprimés en µg C-CO_2.$g_{sol\ sec}^{-1}$.h^{-1}, ont été calculés d'après l'Équation 8 :

Équation 8

$$Effet\ \text{priming}\ (t) = Production\ CO_{2\ matières\ organiques\ endogènes}\ (t) - Production\ moyenne\ CO_{2\ modalité\ Témoin}\ (t)$$

Avec : la $Production\ CO_{2\ matières\ organiques\ endogènes}\ (t)$ issue de Équation 5 et la $Production\ moyenne\ CO_{2\ modalité\ Témoin}\ (t)$ est la production moyenne de CO_2 des modalités Témoin.

Un effet « priming » positif correspond à une augmentation de la biodégradation des matières organiques endogènes et inversement pour un effet « priming » négatif.

2.6. Mesure de l'évolution des teneurs en Ctot, Ntot, $N\text{-}NO_3^-$, $N\text{-}NH_4^+$ et en P total en solution dans les sols durant les incubations n°3 et 4

Des échantillons d'eau des sols ont été prélevés durant les incubations n°3 et 4 à l'aide de « rhizons » (Tableau 12). Les rhizons sont des équipements permettant de prélever des échantillons de solution d'eau du sol. Ils sont constitués d'un tube poreux, d'un tube non poreux pouvant être raccordés à un tube de prélèvement sous vide « vacuette » (Figure 24). La porosité des tubes (0,15 µm) permet de prélever les minéraux et les matières organiques dissous et d'éviter le prélèvement des colloïdes et des sédiments en suspension (Hanser, 2015). Ce dispositif d'échantillonnage a été préféré par rapport aux méthodes consistant à : prélever des échantillons de sols puis de les centrifuger afin d'extraire la phase liquide ou à récupérer l'eau de ruissèlement ; car il permet de prélever des échantillons de phase liquide dans le cadre d'un dispositif étanche et d'éviter de détruire de l'échantillon de sol étudié.

Description	Référence
Rhizon MOM, 5 cm porous, reinforced with glass fiber wire, PVC/PE tubing 12 cm, male luer, 10/pkg	19.21.22
Vacuum tubes, 9 ml no additives, 50 pcs/box Needles, length 40 mm, diameter 0.8 mm, 10/pkg	19.21.03
Needles, length 40 mm, diameter 0.8 mm, 10/pkg	19.21.02

Tableau 12 : Référence des équipements utilisés pour le prélèvement d'eau des sols incubations fournis par « Rhizosphère Research Products » (Agro Business Park 7N, 6708 PV Wageningen, Netherlands)



Figure 24 : Dispositifs pour le prélèvement des échantillons de solution d'eau du sol

Les analyses des échantillons d'eau des sols ont été réalisées à la plateforme d'analyses physico-chimiques du laboratoire Ecolab (Toulouse). Les concentrations en Ctotalet en Ntot ont été déterminées d'après les normes NF EN 1484 et NF EN 12260 respectivement à l'aide d'un analyseur Shimadzu par la technique de l'oxydation catalytique à 720°C couplée à la mesure infrarouge. Les concentrations en $N\text{-}NO_3^-$ et en $N\text{-}NH_4^+$ ont été déterminées à l'aide d'un ALPKEM IV par la technique de la colorimétrie en flux continue (EN

ISO 11732). Les concentrations en Ptot ont été déterminées d'après la norme NF EN 6878 par un Uvi Light XT5 SECOMAM par la méthode spectrométrique au molybdate d'ammonium avec un pré-traitement des échantillons au persulfate en milieu acide.

2.7. Mesure de la structure des communautés microbiennes

La mesure de la structure des communautés microbiennes a été réalisée en suivant la méthode proposée par Quideau *et al. (*2016) consistant à extraire puis à analyser les phospholipides des sols. Les phospholipides sont des constituants des membranes cellulaires des microorganismes appartenant aux domaines des bactéries et de eucaryotes). Les microorganismes produisent des phospholipides de différentes longueurs et composition afin de maintenir l'intégrité de leurs membranes et de leurs fonctions. Ces caractères phénotypiques permettent de déterminer une empreinte globale de la structure des communautés microbiennes. Cependant il est important de noter qu'en raison : de la modification potentielle des compositions membranaires en PLFA en fonction de l'environnement et du fait qu'un même type de PLFA peut être présent au sein des membranes de différentes espèces, l'utilisation des PLFA afin d'identifier des groupes doit être interprété avec précaution.

La méthode se déroule en 5 phases :

- Extraction des lipides du sol ;
- Fractionnement des lipides ;
- Méthylation des lipides ;
- Analyse en CPG et quantification des PLFA ;
- Attribution des PLFA identifiés à des groupes de microorganismes.

2.7.1. Extraction, fractionnement et méthylation des lipides du sol

Les échantillons de sol (environ 10 g de MS) sont prélevés par carottage à l'issue des incubations (mesure destructive) puis congelés (-80°C). Les échantillons sont ensuite lyophilisés (jusqu'à atteindre une teneur en matières sèches à l'équilibre de 98%) puis conservés au congélateur (-80°C). Préalablement aux manipulations, la verrerie qui sera utilisée, est trempée et lavée dans une solution de détergent phosphate puis rincée avant d'être à nouveau trempée et lavée dans une solution acide (5% HCl) avant d'être rincée à l'eau purifiée (milli-Q). La préparation de la verrerie a pour objectif d'éviter la présence de lipides traces. Des « blancs » sans ajout d'échantillons de sol sont analysés afin de déterminer d'éventuelles contaminations. La quantité de sol sec utilisé (environ 3,5 g) pour l'extraction est mesurée. L'extraction des lipides du sol, basée sur la méthode de Bligh & Dyer (1959), est réalisée à l'aide de différents solvants. Lors de l'extraction, un standard initial (Methyl nonadecanoate, SIGMA 21479) est ajouté afin de déterminer le rendement d'extraction. Le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur centrifuge sous vide (Genevac, UK). Les tubes

contenant les lipides sont conservés au congélateur (-20°C) avant l'étape de fractionnement. Des cartouches d'extraction en phase solide à base de silice (Thermo Scientific™ 60108-411) sont utilisées pour le fractionnement des lipides. Les lipides neutres et les glucolipides sont éliminés par un rinçage des cartouches au chloroforme puis à l'acétone respectivement. Les phospholipides sont élués par le méthanol. Le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur centrifuge sous vide (Genevac, UK). Les tubes contenant les lipides sont conservés au congélateur (-20°C) avant l'étape de méthylation. Les esters méthyliques sont préparés par méthylation à chaud (37°C) au moyen d'une solution méthanolique de méthylate de potassium, suivie d'une estérification en milieu acide. Le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur centrifuge sous vide (Genevac, UK). Les tubes contenant les lipides sont conservés au congélateur (-20°C) avant l'analyse en CPG.

2.7.2. Analyse des phospholipides en Chromatographie Phase Gazeuse (CPG) et quantification

Lors de cette étape, les phospholipides sont dissous à l'aide d'une solution d'hexane contenant un standard final (Methyl stearate, SIGMA S5376) d'une concentration connue pour la quantification. Les phospholipides sont analysés à l'aide d'un chromatographe à phase gazeuse équipé d'une colonne DB-23 60mx0,25mx0,15µm (Agilent Technologies, palo Alto, USA) et d'un détecteur à ionisation de flamme FID (Agilent 6890, Agilent Technologies, palo Alto, USA). Les analyses en CPG ont été réalisées au laboratoire du Centre d'Ecologie Fonctionnelle & Evolutive (CEFE, Montpellier) au sein duquel la méthode a été développée dans le cadre de la thèse de Fanin ***et al.*** *(*2014). La méthode permet d'associer les différents temps de rétention observés sur les chromatogrammes aux différents phospholipides. La quantité de chacun des phospholipides identifiés est déduite à partir de l'Équation 9 (Quideau ***et al.***, 2016) :

Équation 9

$$Quantité\ PLFA\ (nmol\ {g_{sol\ sec}}^{-1}) = \frac{Surface\ PLFA \times \frac{Quantité\ standard\ final}{Surface\ standard\ final} \times \left(\frac{Quantité\ standard\ initial}{\frac{Surface\ standard\ final}{Surface\ standard\ initial} \times Quantité\ standard\ final}\right)}{Masse\ de\ sol\ analysé}$$

Où : « Surface » désigne la surface d'un pic mis en évidence par le FID, « Quantité » désigne la quantité en nmol de standard ajouté lors de l'extraction '(« initial ») ou lors de la solubilisation des phospholipides avant l'analyse CPG. La masse de sol est exprimée en gramme.

Les taux d'extractions des phospholipides sont en moyenne de 22% pour l'incubation n°2 et de 45% pour l'incubation n°3. Les différences de taux d'extraction inter-modalités ne sont pas statistiquement significatives (données non montrées). Les taux d'extraction ne sont pas précisés dans la littérature. Les phospholipides extraits sont considérés comme représentatifs des phospholipides des microorganismes des sols.

2.7.3. Attribution des PLFA à des taxons de microorganismes

La quarantaine de PLFA identifiés à l'aide de la CPG couplée au FID ont été attribués à des taxons d'après la bibliographie réalisée par (Fanin *et al.*, 2014). Les PLFA n'étant pas des biomarqueurs entièrement spécifiques des groupes taxonomiques identifiés, l'interprétation des résultats est indicative d'une tendance plutôt qu'absolue.

Les PLFA ramifiés* et saturés : i-C15:0, a-C15:0, i-C16:0, i-C17:0, a-C17:0, i-C18:0, sont plutôt communs des bactéries à Gram positif (G+) et ceux monoinsaturés ou possédant un cycle cyclopropane : C16:1ω7c, cy-C17:0, C18:1ω7c, cy-C19:0 sont plutôt attribués aux bactéries à Gram négatif (Frostegård & Bååth, 1996; Zelles, 1999). Les ramifications méthyles des PLFA sont indiquées par les lettres : « i » ou « a » pour « iso » ou « anteiso » respectivement. Dans le premier cas, le groupement méthyle est situé sur l'avant dernier carbone et dans le second, sur l'avant-avant dernier carbone. Les acides gras ramifiés en milieu de chaine : 10me-C16:0, 10me-C17:0 et 10me-C18:0 sont majoritairement trouvés au sein des membranes des actinobactéries (O'leary, 1988). Deux marqueurs phospholipidiques : C18:1ω9, C18:2ω6 sont utilisés comme des indicateurs de la biomasse fongique et un marqueur : 20:4ω6c comme un indicateur des protozoaires (Frostegård & Bååth, 1996; Zelles, 1999; Bååth, 2003). Les PLFA saturés non spécifiques. Les PLFA saturés : C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C19:0, C20:0 and C24:0 et i-C14:0, C16:1ω9c, C18:1ω5c and C18:3ω3 sont ne pas spécifiquement attribués à certains groupes microbiens.

Deux paramètres de la structure des communautés microbiennes ont été utilisés : le ratio entre les PLFA attribués aux bactéries à Gram positif et ceux attribués aux bactéries à Gram négatif, et le ratio entre les PLFA attribués aux champignons et ceux attribués aux bactéries à Gram positif et négatif.

2.8. Mesure de la capacité d'échange cationique et du taux de saturation

La mesure de la capacité d'échange cationique (CEC) a été réalisée sur des sols issus des incubations en conditions contrôlées ainsi que sur les produits organiques exogènes. La CEC est exprimée en utilisant un système d'unités indépendantes du poids atomique des cations absorbés permettant de les additionner ou d'établir des rapports entre eux. Elle s'exprime en centimoles de charges par kg de sol sec (cmolc/kg) ou, ce qui revient au même, en milliéquivalents de charges pour 100 g de sol sec (méqc/100 g).

La définition de la CEC du complexe organo-minéral des sols n'est pas univoque et dépend de sa méthode de détermination. Elle consiste généralement à mesurer la quantité de cations échangeables entre un échantillon de sol et une solution aqueuse concentrée mono-ionique, dont l'ion à une forte affinité pour l'adsorption. Cependant, elle dépend du pH de la solution par rapport au pH de la solution du sol, de l'affinité pour le complexe organo-minéral, du cation utilisé pour déplacer les cations adsorbés, de la force ionique de la solution, mais aussi de l'atteinte ou non de l'équilibre d'échange qui devrait être 'total'. L'équilibre d'échange dépend : de la cinétique de la réaction, de la température, de la durée de contact entre le sol et la solution, du mode d'agitation, etc… (Ciesielski *et al.*, 1997).

Plusieurs méthodes sont préconisées (AFNOR, 1996) : à l'acétate d'ammonium (méthode Metson) qui mesure la CEC potentielle à un pH tamponné à 7, à l'oxalate d'ammonium (méthode de Riehm), tamponnée à un pH d'environ 8,5 par le carbonate de calcium et au chlorure de cobaltihexamine ($Co(NH_3)_6Cl_3$).

La méthode utilisée dans le cadre de cette étude est celle de l'ion cobaltihexamine. L'ion cobaltihexamine est un ion stable, de grande taille (rayon ionique de 0,325 nm) qui a une capacité d'adsorption sur le complexe d'échange plus élevée que la plupart des autres cations. La méthode au chlorure de cobaltihexamine, qui est utilisée pour cette étude, mesure la CEC dite « effective ». La CEC « effective » (CECE) est une mesure de la CEC au pH du sol. Elle correspond à la somme des ions fixés sur le complexe d'échange dans les conditions naturelles, c'est-à-dire l'addition :

- Des charges cationiques basiques échangeables fixées sur le complexe nommées « S » (Ca^{2+}, Mg^{2+} , K^+ et Na^+) ;
- Des charges cationiques acides fixées sur le complexe nommées « Acidité d'Echange (AE) » (H^+ et Al^{3+}).

Le cation aluminium (Al^{3+}) acidifie le milieu en se liant avec des anions hydroxydes (OH^-) issus de la dissociation de la molécule d'eau, laissant ainsi des protons libres.

La mesure de la CECE a été réalisée en suivant la méthode au chlorure de cobalthexamine faisant l'objet de la norme (AFNOR, 1996).

La méthode se déroule en 4 phases :

- Préparation des solutions de cobalthexamine et des prises d'essai
- Réaction d'échange
- Dosage des ions cobalthexamine et calcul de la CECE

Le taux de saturation en charges cationiques basiques nommée « V », établie au pH du sol est ensuite établie d'après le rapport : S/CECE. Les cations échangeables sont dosés dans la solution d'échange par ICP-OES au sein du laboratoire Ecolab. Un ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry) est un appareil qui résulte du couplage entre un plasma d'argon permettant d'ioniser l'échantillon et d'un spectromètre permettant de doser les ions. Les cations échangeables dosés sont exprimés en cmolc/kg de produit ou de sol.

2.8.1. Préparation des solutions de cobalthexamine et des prises d'essai

Le nombre de centimoles positives apportées par la solution de cobalthexamine doit être environ 10 fois plus important que le nombre de centimoles potentiellement échangées par la prise d'essai ce qui détermine : la concentration des solutions de cobalthexamine, le volume de solution pour la réaction d'échange et la masse des prises d'essai.

A partir des résultats d'essais préliminaires, ayant pour objectif d'évaluer grossièrement les CECE des différents substrats testés, les paramètres des préparations ont été fixés (Tableau 13).

Substrat testé	Masse prise d'essai (g)	Concentration solution de cobalthexamine (mol l^{-1})	Volume solution réaction d'échange (ml)
Digestats	0,5	0,067	40
Autres produits organiques	0,5	0,0032	40
Echantillons de sols	2,5	0,017	40

Tableau 13 : Couples masse de prise d'essai et solution de cobalthexamine pour chacun des substrats testés

2.8.2. Réaction d'échange

Les prises d'essai, représentatives des échantillons de sol ou de produit organique séchés, sont réalisées et introduites dans quatre tubes à centrifuger. Les masses de prises d'essai sont consignées. La solution de chlorure de cobalthexamine est ajoutée dans chaque tube qui sont ensuite agités pendant 90 min. Les tubes sont ensuite centrifugés à 10 000 tours / min durant 12 minutes. Le surnageant est extrait. Le cas échéant, une dilution est effectuée afin d'obtenir une concentration maximum en cobalthexamine de 0,017 mol l^{-1} en vue du dosage par colorimétrie.

2.8.3. Dosage des ions cobalthexamine et calcul de la CECE

Le dosage des ions cobalthexamine après la réaction d'échange permet de déterminer la quantité de cations échangés.

L'ion cobaltihexamine présente un maximum d'absorption à la longueur d'onde 475 nm et un minimum à 380 nm. Cependant, la matière organique dissoute peut aussi absorber la lumière à 475 nm. (Ciesielski *et al.*, 1997) ont montré que la densité optique de la matière organique soluble à 475 nm divisée par celle à 380 nm peut être considérée comme constante est égale à 0,2. Pour l'ion cobaltihexamine pur, ce rapport est de 8,13. Par conséquent, une mesure à chacune des deux longueurs d'onde sera nécessaire pour éliminer l'interférence de la matière organique éventuellement présente dans les solutions.

A partir des deux valeurs d'absorbance mesurées (à 475 et 380 nm), une valeur "corrigée" sera calculée en tenant compte des rapports des densités optiques, à ces longueurs d'onde, de la cobaltihexamine et de la matière organique éventuellement dissoute Équation 10 :

Équation 10

$$Absorbance \text{ "475 nm corrigée"} = \frac{[(ABS\ 475\ nm) - 0{,}2\ \times\ (ABS\ 380\ nm)]}{(8{,}13 - 0{,}2)}$$

De la droite de régression tracée à partir des valeurs : absorbance "corrigée" des solutions étalons, les concentrations en ion cobalthexamine des échantillons seront ensuite déduites, puis, par différence avec les concentrations initiales, les quantités d'ion cobalthexamine adsorbées. Les quantités d'ion adsorbés seront transformées en concentration massique (mg d'ion adsorbé / kg de sol) en fonction de la masse de chaque échantillon analysé et du volume de solution utilisé, puis en valeur de CECE en $cmol^{+}.kg^{-1}$.

2.9. Mesure de la stabilité structurale des agrégats de sol

La mesure de la stabilité a été réalisée sur des sols issus des incubations en conditions contrôlées. Elle a été réalisée en suivant la méthode faisant l'objet de la norme NF X31-515 (AFNOR, 2005). Cette norme a été développée sur la base des travaux de Le Bissonnais (1996) et Le Bissonnais & Arrouays (1997). L'objectif de cette méthode est de donner une description réaliste du comportement du matériau « sol » soumis à des contraintes physique existant en conditions naturelles (particulièrement la pluie). Cette méthode a notamment été utilisée par (Abiven, 2004) afin d'étudier les relations entre les caractéristiques de produits organiques apportés et l'évolution de la stabilité structurale des sols. Ce test s'articule autour de trois pré-traitements différents correspondant à différents mécanismes de désagrégation :

- L'humectation rapide par immersion (humectation brutale de type pluie intense) ;
- La désagrégation mécanique par agitation après réhumectation (cohésion des agrégats indépendamment des phénomènes d'éclatement),
- L'humectation lente par capillarité (humectation lente correspondant à des pluies modérées).

La méthode se déroule en 4 phases :

- Sélection et préparation des agrégats,
- Application des 3 types de contraintes,
- Tamisage des échantillons,
- Pesée des fractions et calcul de l'indice de stabilité structurale.

2.9.1. Préparation des échantillons

Après échantillonnage du sol dans des conditions d'humidité modérées (une semaine après l'arrêt de l'humidification des sols soit environ 55% de WFPS), des agrégats compris entre 3 et 5 mm sont sélectionnés par tamisage et sont mis à l'étuve pendant 24 heures (40°C). Selon les expériences, les mesures ont été effectuées sur quatre à cinq répétitions.

2.9.2. Description des pré-traitements

Les pré-traitements sont réalisés sur des échantillons d'agrégats de 10 g préalablement pesés.

- Humectation Rapide : Les agrégats sont versés dans un bécher contenant 50 ml d'eau déminéralisée. Après 10 mn au cours desquelles la désagrégation a lieu, l'excès d'eau est évacué et l'échantillon est transféré sur un tamis de 50 µm grâce à une pipette d'éthanol.
- Désagrégation Mécanique : Les agrégats sont immergés dans l'éthanol pendant 30 mn. L'excès d'éthanol est ensuite évacué et l'échantillon est transféré dans un erlenmeyer contenant 50 ml d'eau déminéralisée. L'erlenmeyer est agité manuellement en effectuant 10 retournements successifs. L'échantillon est laissé à décanter pendant 30 mn puis l'excès d'eau est évacué. L'échantillon est transféré sur un tamis à 50 µm de la même façon que pour le pré-traitement à l'humectation rapide.
- Humectation Lente : Les agrégats sont placés sur un papier filtre posé sur une mousse préalablement humidifiée et placée dans un récipient remplis d'eau jusqu'au 1 cm de la surface de la mousse. Les échantillons sont laissés à réhumecter par capillarité pendant 30 mn, puis sont transférés sur un tamis de 50 µm comme précédemment.

2.9.3. Mesure de la distribution de la taille des particules et expression des résultats

Le tamis contenant l'échantillon immergé dans un bain d'éthanol est soumis à un mouvement hélicoïdal appliqué à 5 reprises. Ceci permet une première séparation granulométrique des éléments inférieurs à 50 µm. La fraction restée dans le tamis est récupérée et séchée à 40 °C pendant 24 h. Elle est ensuite passée dans une colonne de 6 tamis de tailles décroissantes : 2000 µm, 1000 µm, 500 µm, 200 µm, 100 µm et 50 µm. La masse de sol restant sur chacun des tamis est mesurée et exprimée en fonction de la masse initiale. La fraction inférieure à 50 µm est déduite de la masse initiale.

La mesure de la stabilité structurale est exprimée soit directement par classe de particules, soit sous la forme du Diamètre Pondéral Moyen (ou Mean Weight Diameter MWD) exprimé en mm tel que (Équation 11) :

Équation 11

$$MWD = \sum (diamètre\ moyen\ d'un\ échantillon\ \times masse\ pour\ cet\ échantillon)$$

2.9.4. Mesure d'un facteur agrégeant : les polysaccharides extractibles à l'eau

La concentration des polysaccharides extractibles à l'eau au sein des agrégats de sol issues de l'incubation n°2 a été mesurée afin de déterminer son influence sur leur stabilité (Abiven, 2004). La procédure d'extraction adoptée est celle de Puget *et al. (*1998) : 20 ml d'eau distillée sont ajoutés à 1g de sol sec et broyé dans des tubes "falcons" de 40 ml. Les

échantillons sont placés au bain-marie à 80°C pendant 24 h. Les échantillons sont agités et centrifugés à 20000 g pendant 25 mn. La concentration en polysaccharides est mesurée par la méthode de DuBois *et al. (*1956) : 1 ml de la solution est prélevé et mélangé à 1 ml d'une solution de phénol à 5% et 5 ml de H_2SO_4 72 M dans un tube à essai. Les tubes sont placés dans un bac d'eau à température ambiante pendant 10 mn. La densité optique de la solution est mesurée par spectrocolorimètre à la longueur d'onde de 490 nm. La concentration en polysaccharides de l'échantillon est exprimée par rapport à une courbe étalon réalisée à partir de solutions de glucose en $mg_{polysaccharides}.g_{sol\ sec}^{-1}$.

2.10. Traitement statistique des données

L'analyse statistique réalisée pour la comparaison des différentes modalités est basée sur le test Tukey-HSD pour un risque d'erreur de 5%, consécutif à une analyse de variance ANOVA. Une Analyse factorielle en Composantes Principales (ACP) a également été utilisé afin de visualiser simultanément les individus et les variables quantitatives d'un tableau de données, et de mettre en évidence les liens entre eux. Le logiciel XLSTAT 2018 sous MICROSOFT EXCEL 2016 a été utilisé.

Chapitre III

3. Origine du stockage du carbone dans les sols à la suite de l'apport en produits organiques lors de l'incubation au champ

3.1. Introduction

La proportion du carbone (C) finalement stocké dans les sols à la suite de l'apport en produits organiques peut s'expliquer par :

- La stabilité des matières organiques apportées ;
- L'augmentation ou la diminution transitoire de la vitesse de décomposition des matières organiques endogènes du sol.

Chen *et al.* (2012) ont suggéré, par des observations indirectes, que le stockage du carbone dans les sols amendés par des digestats de méthanisation pourrait être favorisé par le ralentissement de la minéralisation des matières organiques endogènes. Cette hypothèse a été testée par la mesure directe de la décomposition des matières organiques apportées et des matières organiques endogènes. Le CO_2 produit par le sol a été tracé grâce aux différences de l'abondance en isotope du carbone 13 (^{13}C) entre les matières organiques apportées et les matières organiques endogènes.

3.2. Plan expérimental et modalités

L'incubation au champ (n°1, Figure 16) a été réalisée dans une parcelle de prairie naturelle au sein de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan du 24 juillet au 22 aout 2018 au sein d'une zone de 15x15 mètres ayant une végétation visuellement homogène sur laquelle ont été prélevés les échantillons de sol Purpan utilisés pour les incubations en conditions contrôlées.

Le sol a été travaillé (rotovator, Figure 25) le 25 avril puis le 9 juin 2018 avant le semis du tournesol le 2 juillet. Les différents produits organiques exogènes ont été apportés, puis incorporés au sol sur une profondeur d'environ 0,1 m à l'aide d'une motobineuse, le 24 juillet 2018 marquant le début de l'expérience. Les enceintes d'incubation ont été installée le 24 juillet. Les mesures des productions en CO_2 ont débuté le 25 juillet et pris fin le 22 aout 2018. L'expérience a été réalisée en été afin d'éviter des conditions climatiques pluvieuses incompatibles avec l'utilisation du dispositif de mesure (Picarro G2201-i).



Figure 25 : Interventions réalisées sur la zone de l'expérience au champ

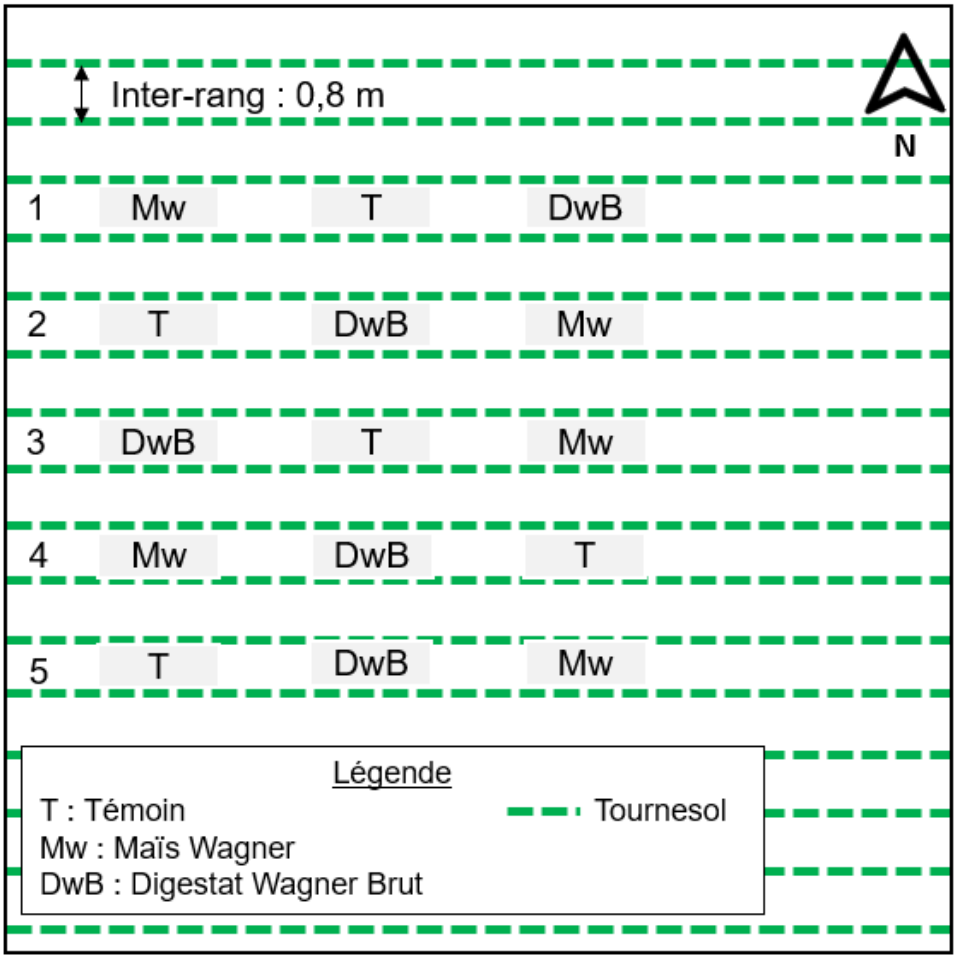


Figure 26 : Schéma du dispositif expérimental au champ

Le dispositif a été organisé en blocs aléatoires complets (Petersen, 1994), avec 5 blocs et 3 modalités (Figure 26). Les micro-parcelles d'un même bloc sont implantées dans l'inter-rang (0,80 m) d'une culture de tournesol (Figure 25). La culture de tournesol a été orientée au sud afin de garantir un ensoleillement équivalent pour l'ensemble des micro-parcelles de l'essai. Chaque micro-parcelle mesure 0,60 x 1,67 m pour une surface de 1 m² et est espacée de 1,3 mètres de la micro-parcelle voisine. Entre chaque bloc, un inter-rang est inoccupé afin de permettre le passage du dispositif de mesure.

Les modalités correspondent à deux types de matières organiques apportées différentes et à une modalité non amendée (témoin). La quantité de produits organiques est basée sur un apport de 50 $Mg.ha^{-1}$ de digestat ce qui correspond à environ 0,22 $kgC.m^{-2}$ de C et environ 170 et 80 $uN.ha^{-1}$ respectivement pour le digestat et le maïs (Tableau 14). La quantité de maïs apportée au sol a été calculée afin d'apporter une masse de carbone similaire à la modalité digestat. De l'eau déminéralisée a également été apportée pour la modalité contrôle et maïs Wagner afin que l'humidité des sols au début de l'incubation soit similaire pour les trois modalités.

Modalités	Contrôle	Digestat Wagner brut	Maïs Wagner
Masse produits organiques apportés ($kg_{MB}\ m^{-2}$)	0	5,0	1,5
Masse de matières sèche apportés ($kg_{MS}\ m^{-2}$)	0	0,5	0,4
Masse d'eau apportée ($kg\ m^{-2}$)	4,5	0	3,4
Masse de C apporté ($kg\ m^{-2}$)	0	0,22	0,28
Masse de N apporté ($kg\ m^{-2}$)	0	0,017	0,008
Masse de P apporté ($kg\ m^{-2}$)	0	0,009	0,002

Tableau 14 : Masses apportées lors de l'incubation au champ (calculs à partir des teneurs en éléments présentés par le Tableau 7)

L'humidité et la température des sols du sol durant l'essai ont été mesurées *in situ* à l'aide d'une sonde et d'un multimètre CONSORT C3040, et à l'aide d'un humidimètre de sol portable « SDEC TDR 100 ». Les conditions climatiques (température et précipitations) ont été mesurées à l'aide d'une station météo. Durant l'essai, la température moyenne diurne et nocturne étaient respectivement de 28 et 22 °C. Le 12 août, une précipitation de 11 mm a été enregistrée. En raison des températures diurnes importantes, entrainant notamment une humidité relative importante dans le dispositif, les mesures ont été réalisées de nuit.

3.3. Résultats

Durant les 32 jours de l'expérience, la production de CO_2 de la modalité témoin (sol nu avec apport d'eau) a diminué de manière linéaire, passant de 0,71 à 0,20 mg C-CO_2 m^{-2} s^{-1} (Figure 27a). Les apports de maïs et de digestat ont conduit à une augmentation significative de la production moyenne de CO_2 durant l'essai (Figure 27a). Lors du 2ème jour après l'apport, les pics de production de CO_2 ont atteint leur maximum avec des productions 1,5 et 6,4 fois plus importantes que celles des sols témoins pour le digestat et le maïs respectivement (Figure 27a). Les productions de CO_2 ont ensuite rapidement diminué pour atteindre un niveau équivalent à celui des sols témoins 8 jours après les apports (Figure 27a).

Durant l'expérience, la signature isotopique moyenne du CO_2 produit par les sols témoins (Figure 27b) est restée constante avec une valeur moyenne de -23‰ et un écart type de 1,4‰. Cette valeur est proche de celle mesurée sur des échantillons de sol par spectroscopie de masse (-26‰, Tableau 6). L'apport de maïs a entrainé une hausse du ratio isotopique du CO_2 produit (Figure 27b). Durant les 3 premiers jours, la signature isotopique est en moyenne de -15‰ (Figure 27b) traduisant une forte décomposition des matières organiques du maïs ayant un ratio de -12,2‰ (Tableau 7). De la même manière, l'apport de digestat a entrainé une augmentation du ratio isotopique du CO_2 produit durant les trois premiers jours (-19‰, Tableau 7). Les signatures isotopiques des sols amendés ont ensuite diminué jusqu'à être statistiquement identique à celle des sols témoins à partir du 8ème jour.

Le cumul des productions de CO_2 attribuées à la décomposition des matières organiques apportées permet d'évaluer le taux de décomposition du maïs et du digestat à 28 et 23% respectivement (Figure 28). Ces différences ne sont pas significatives.

On observe un effet priming « négatif » à la suite de l'apport en digestat (Figure 29). L'effet priming « négatif » est évalué à 47,5 gC m^{-2} sur la durée de l'essai (Figure 29).

L'apport de maïs a entrainé un effet « priming » positif durant les trois premiers jours puis un effet « priming » négatif par la suite (Figure 29). Ces différents effets priming se compensent avec un effet « priming » cumulé nul à la fin de l'expérience.

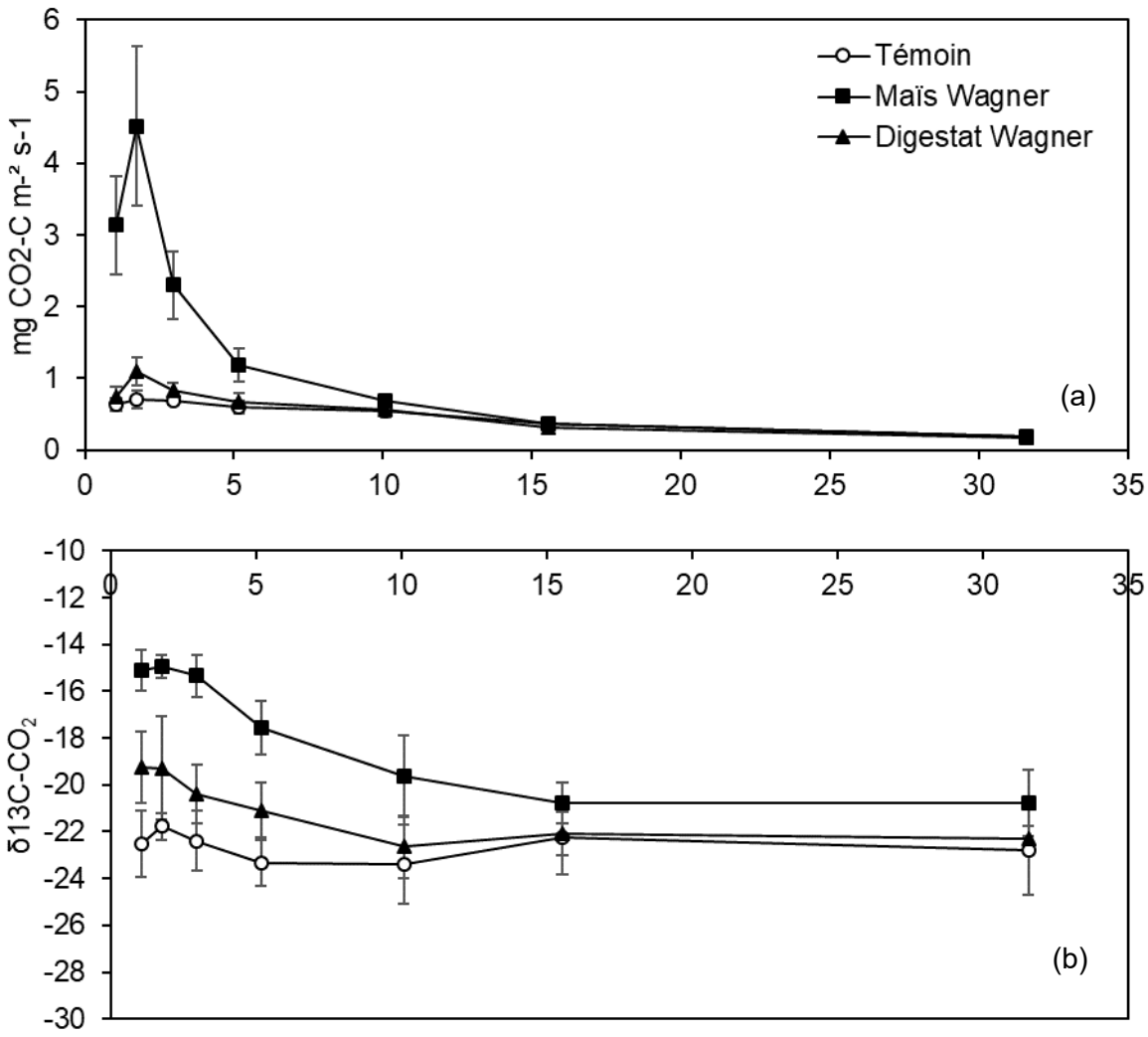


Figure 27 : (a) Cinétique de la production de CO2 des sols (mg CO2 m-2 s-1). (b) Signature isotopique d13C-CO2 du CO2 émis par les sols amendés et témoins. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types.

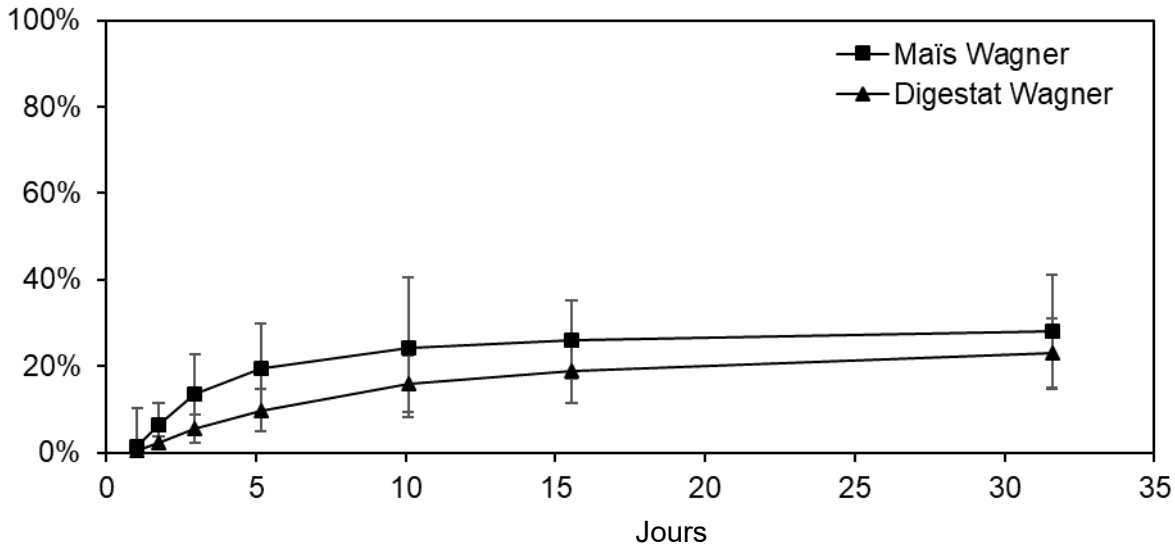


Figure 28 : Production cumulée de C-CO2 issue de la décomposition des produits organiques apportés exprimées en % de la quantité totale de C apportée. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types.

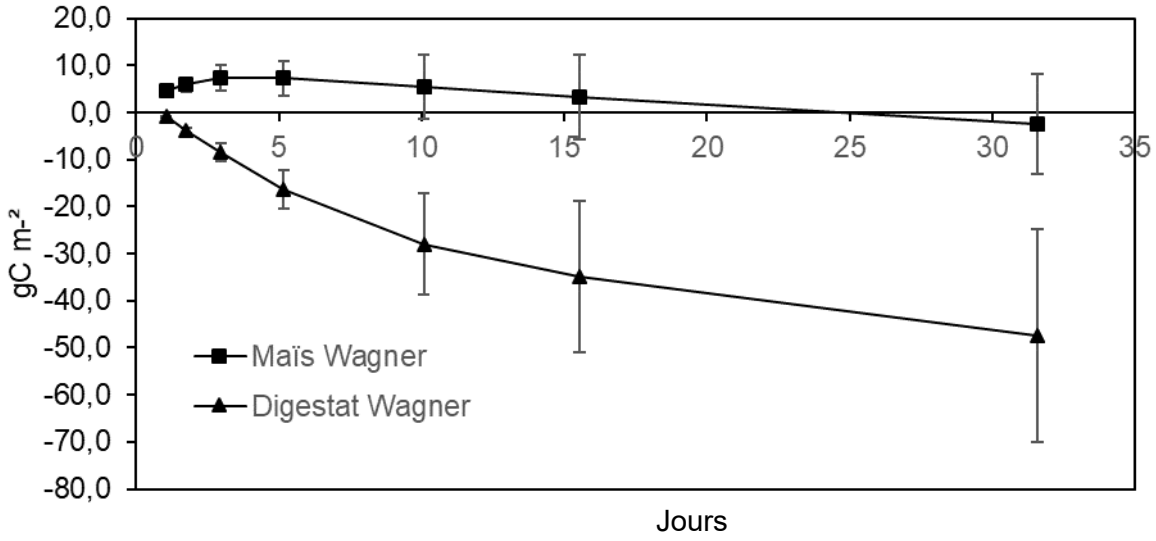


Figure 29 : Cumul des effets « priming » (gC m^{-2}) induits par l'apport de maïs ensilage ou de digestat brut ; c.à.d. de la différence entre les productions de CO_2 attribuées à la décomposition des matières organiques endogènes des sols amendés et des productions en CO_2 des sols témoins. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types.

3.4. Discussion

La diminution progressive de la production de CO_2 par les témoins est attribuée au séchage du sol. La Figure 30 illustre la bonne corrélation (R^2 de 0,75) entre la production de CO_2 des sols témoins et l'estimation de leur teneur en eau. L'équation de la courbe de tendance (Figure 30) permet d'évaluer que lorsque l'humidité du sol à la surface (10 cm) est nulle, la production de CO_2 est d'environ 0,25 mg CO_2 m^{-2} s^{-1}. Cette observation implique une activité microbienne en profondeur persistante malgré la sécheresse du sol en surface. Les micro-organismes en profondeur semblent bénéficier du flux d'humidité depuis le sous-sol vers la surface. Les faibles taux de biodégradation des matières organiques apportées (Figure 28) reflètent l'arrêt de la décomposition des matières organiques apportées en raison du manque d'eau plutôt que leur stabilisation.

Compte tenu de la petite surface d'emprise des enceintes d'incubations (106 cm^2), les faibles coefficients de variation des productions en CO_2 (Davidson *et al.*, 2002), respectivement de 15%, 18% et 16% pour les témoins, le maïs et le digestat (données non montrées), sont attribués à l'efficacité de l'homogénéisation des micro-parcelles permise par l'utilisation de la motobineuse. Ils sont également faibles pour les mesures des signatures isotopiques (6%, données non montrées).

L'apport de maïs induit un stockage de C dans le sol correspondant à 73% du C initialement apporté (Tableau 15). Ce stockage de C est attribué à l'absence d'effet « priming » (Figure 29) et à une forte stabilité des matières organiques apportées, induite par une humidité du sol limitante pour l'activité microbienne durant la période de l'incubation.

L'apport de digestat de maïs induit un stockage de C dans le sol correspondant à 99% du C initialement apporté (Tableau 15). Ce stockage de C est attribué à un fort effet « priming » négatif (Figure 29) et à une forte stabilité des matières organiques apportées induite par une humidité du sol limitante pour l'activité microbienne. Le cumul de l'effet « priming » négatif observé pour la modalité Digestat (Figure 29) correspond à une diminution de 45% de la respiration basale (modalité Témoin, données non montrées). Cependant, le dispositif d'essai au champ ne permet pas de déterminer sur quelle profondeur l'effet « priming » négatif est intervenu. Il est probable que l'effet « priming » observé soit intervenu seulement sur la profondeur d'incorporation des produits organiques (0,1 m). Ainsi, l'absence probable d'effets « priming » des matières organiques endogènes au-delà de 0,1 m a probablement masqué sont importance sur le volume de sol mélangé avec le digestat.

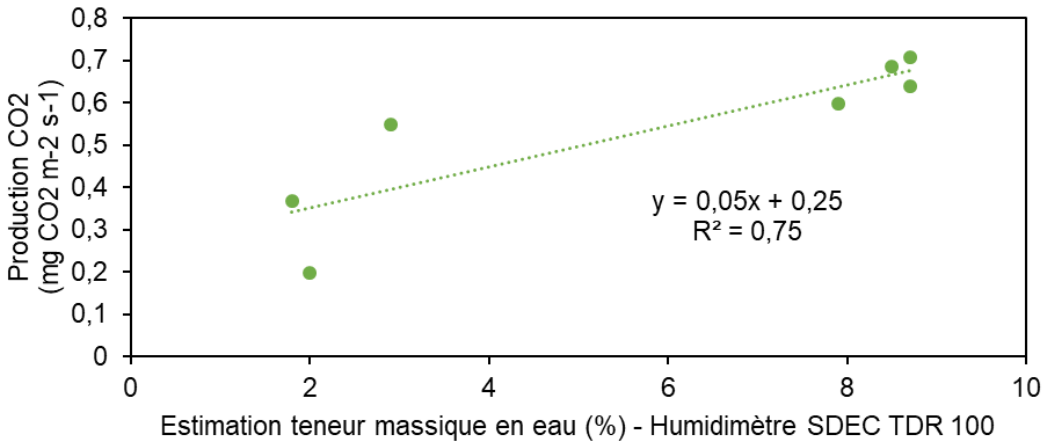


Figure 30 : Corrélations entre l'évolution de la production de CO_2 des sols témoins et leur niveau d'humidité

Modalité	Stabilité des MO apportées (1)	Effets « priming »* (2)	Stockage de C dans le sol (3) = (1) – (2)
Maïs Wagner	72 ± 8 A	- 1 ± 4 A	73 ± 8 A
Digestat Wagner	77 ± 8 A	-22 ± 10 B	99 ± 6 B
* +/- : représente respectivement une augmentation ou une diminution de la minéralisation des matières organiques endogènes (effets « priming » positifs ou négatifs).			

Tableau 15 : Stockage de carbone (C) induit par l'apport de maïs ou de digestat de maïs, exprimé en % du C apporté initialement. Le stockage est décomposé en fonction de la stabilité des matières organiques (MO) apportées et des effets « priming », qui sont également exprimés en % du C apporté. Les données sont moyennées (n=4) avec l'écart type associé. Les lettres en capitales réfèrent à la comparaison des traitements (au sein d'une même incubation) d'après le test Tukey (P<0,05).

3.5. Conclusion

Le dispositif d'incubation au champ a permis de valider l'hypothèse d'une modification significative des effets « priming » à la suite de l'apport du digestat de maïs en comparaison avec l'apport du maïs. Le digestat a ralenti la décomposition des matières organiques endogènes des sols (effet « priming » négatif) alors que l'apport de maïs ensilage ne modifie par la décomposition des matières organiques endogènes. Les différences de stabilité des matières organiques apportées par le digestat et le maïs ne sont pas significatives (Figure 28). Les matières organiques apportées ont été relativement peu dégradées en raison d'une humidité du sol trop faible, limitante pour l'activité des micro-organismes.

Le stockage de carbone lors de l'incubation au champ est expliqué par les effets « priming », la stabilité des matières organiques apportées et par la limitation de l'activité microbienne en raison de la sécheresse de l'horizon de surface. Ainsi, l'importance relative de la modification des effets « priming » par rapport à la stabilité des matières organiques n'a pas pu être déterminée.

Chapitre IV

4. Bilan de matière du cycle du carbone entre l'atmosphère et la pédosphère, avec ou sans digestion anaérobie des produits organiques, en conditions contrôlées

Les incubations en conditions contrôlées (Figure 31) ont eu pour objectifs :

- De mesurer la décomposition et en déduire la stabilité des matières organiques apportées. Le calcul de la stabilité potentielle des matières organiques apportées nécessite de réaliser les incubations dans des conditions non limitantes pour l'activité des microorganismes ;
- De quantifier l'importance relative des effets « priming » dans le stockage du carbone induits par l'apport de produits organiques par rapport à leur stabilité. Le dispositif d'incubation en conditions contrôlées permet de prendre en compte seulement la profondeur de sol impacté par l'apport en produits organiques ; ce qui n'a pas été le cas lors de l'incubation au champ ;
- De généraliser les résultats observés lors de l'essai au champ pour un autre couple de produits organiques avant et après digestion, pour un autre Luvisol ;
- De déterminer, par l'analyse des PLFA des sols, si l'apport de digestat ou de maïs modifie la structure des communautés microbiennes. Une modification de la structure des communautés microbiennes est attendue car elle permet d'expliquer les processus des effets « priming » (Figure 9) ;

Préalablement à ces travaux en conditions contrôlées, des incubations préliminaires ont été mises en place afin d'identifier les conditions expérimentales à suivre.

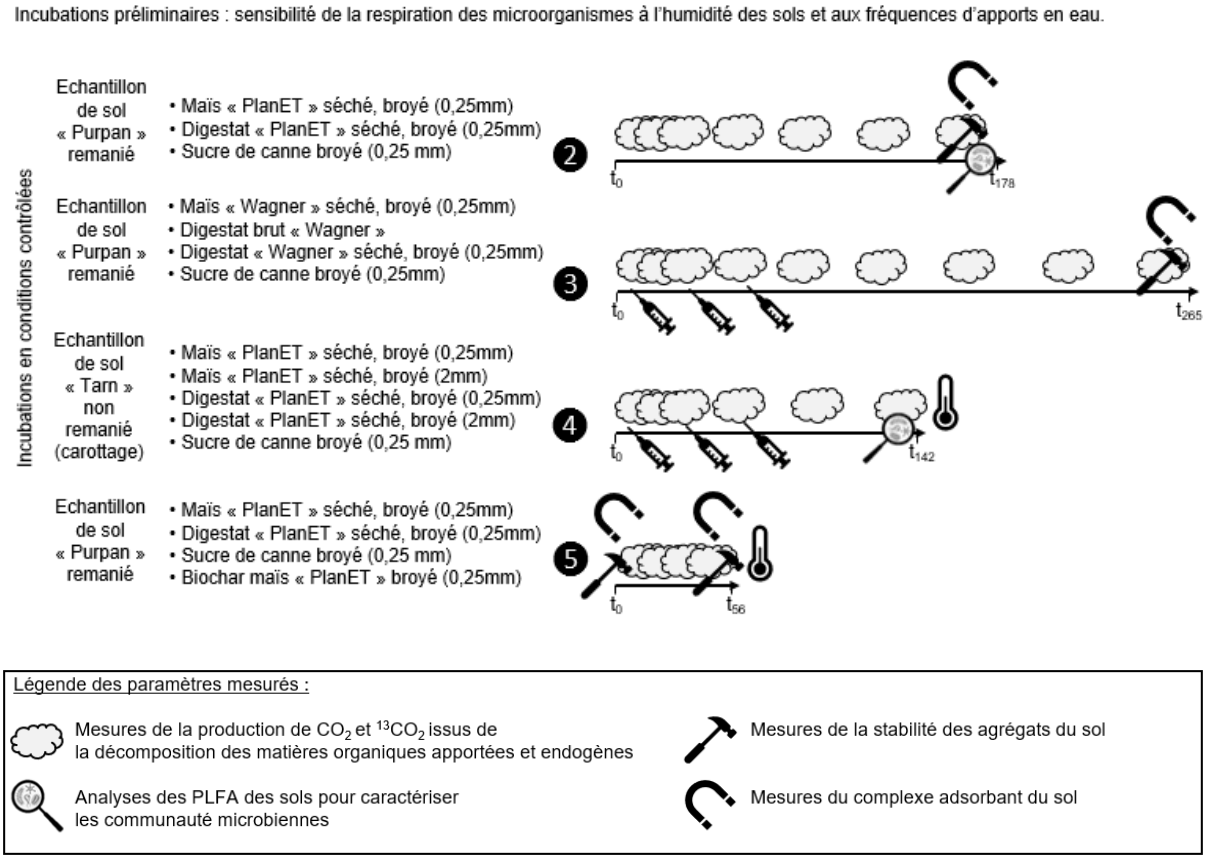


Figure 31 : Plan d'expériences des Incubations en conditions contrôlées mises en place pour l'étude de l'influence de la digestion anaérobie sur le stockage du carbone dans les sols

4.1. Incubations préliminaires : sensibilité de la respiration des microorganismes à l'humidité des sols et aux fréquences d'apports en eau

4.1.1. Objectifs des incubations préliminaires

Les objectifs de ces deux incubations préliminaires sont de déterminer l'influence du niveau d'humidité du sol et de la fréquence des apports en eau sur la respiration des microorganismes des sols en laboratoire.

La température et la teneur en eau des sols sont les deux principaux paramètres déterminant l'activité des micro-organismes hétérotopiques des sols (Smith *et al.*, 2003). Au-dessus du point de congélation, l'intensité des processus biologique augmente généralement de façon exponentielle à mesure que la température augmente, suivi d'une réponse modérée jusqu'à ce que l'optimum biologique soit atteint et d'une réponse négative au-dessus de la température optimale (Ellert & Bettany, 1992). L'optimum biologique des sols semble atteint pour une température de l'air ambiant entre 30 et 37°C (Rodrigo *et al.*, 1997). Les températures d'incubations en conditions contrôlées sont majoritairement réalisées à des températures ambiantes constantes comprises entre 15 à 28°C (Nicolardot *et al.*, 2001; Lashermes *et al.*, 2009). Ces gammes de températures ne visent pas une activité biologique maximum mais plutôt des températures représentatives des températures moyennes estivales observées pour des climats tempérés. Dans le cadre de cette étude, l'ensemble des incubations en conditions contrôlées ont été réalisées à une température constante de 20°C au sein d'une pièce climatisée.

La relation entre la teneur en eau et les processus microbiens dans les sols est complexe. Plusieurs processus physiques peuvent influencer l'activité microbienne en fonction de la teneur eau du sol ; en particulier : le mouvement de l'eau, la diffusion de gaz (et notamment O_2), la diffusion des solutés et le mouvement des microorganismes. Ces relations peuvent varier en fonction du type de sol, de la courbe de rétention en eau, de la porosité, de la concentration en matière organique, du pH et de sa température (Macduff & White, 1985). Ainsi, l'objectif de cet essai est de déterminer pour quel niveau d'humidité les sols étudiés ont une production maximum de CO_2. L'enjeu est également méthodologique puisque qu'il existe plusieurs façons de décrire l'humidité d'un sol : la teneur relative en eau massique ou volumique, le taux de remplissage des pores en eau et la tension de succion du sol (Rodrigo *et al.*, 1997). La tension de succion du sol pour une même teneur en eau est plutôt dépendante de sa texture (Miller & Johnson, 1964). La texture des sols utilisés dans cette étude étant similaires, cet indicateur ne sera pas utilisé. La teneur relative en eau est adaptée pour décrire

l'activité des micro-organismes (Macduff & White, 1985). Le pourcentage de pores remplis d'eau, tenant compte de la porosité des sols, permet également de décrire les activités aérobiques/anaérobiques (Linn & Doran, 1984).

4.1.2. Plan expérimental et modalités

Les deux sols étudiés, issus d'échantillons non remaniés, ont été incubés à différents niveau d'humidité. L'activité des microorganismes a été évaluée pour chacun des pots par la mesure de la production de CO_2. Le niveau d'humidité est exprimé par la teneur relative en eau massique et le pourcentage de pores remplis d'eau.

Le dispositif se compose de 24 échantillons de sols non remaniés issus de la parcelle « Purpan » et de 24 échantillons de sols non remaniés issus de la parcelle « Tarn ». Les traitements appliqués correspondent à différents niveaux d'humidité exprimés en fonction du taux de remplissage en eau des porosités et des teneurs massiques en eau (Tableau 16). Il y a 6 répétitions par traitement. Les teneurs massiques en eau ne correspondent pas aux taux de remplissage en eau des porosités pour les sols Purpan et Tarn en raison de leur différente masse volumique apparente. Les échantillons non remaniés du sol Purpan prélevés par carottage ont une masse volumique moyenne de 1,08 g/cm^3 et de 1,26 g/cm^3 pour le sol Tarn. L'humidité des sols a été progressivement ajustée aux niveaux visés durant 6 jours pour le sol Tarn et durant 10 jours durant le sol Purpan. L'humidité a ensuite été maintenue à l'objectif durant 20 jours pour le sol Tarn et durant 14 jours pour le sol Purpan afin que la production de CO_2 soit stabilisée à la suite d'un possible flush de sa production après la réhumidification (Nottingham *et al.*, 2009).

Taux de remplissage en eau des porosités (%)	Teneur massique en eau (%)	
	Sol « Purpan »	Sol « Tarn »
35	18	-
55	28	20
65	33	24
75	38	28
95	-	35

Tableau 16 : Niveaux d'humidité appliqués des sols « Purpan » et « Tarn » lors des incubations préliminaires

Dans un deuxième temps, les apports en eau sont stoppés afin de mesurer l'influence du séchage sur la production de CO_2 des sols et ainsi déterminer la fréquence des apports en eau nécessaire durant les incubations.

4.1.3. Respiration des microorganismes en fonction de l'humidité des sols

Pour des niveaux équivalents d'humidité, la production de CO_2 issu de la respiration des microorganismes est significativement plus importante pour le sol Purpan par rapport au sol Tarn (Figure 32, Test Tukey HSD non montré). La plus forte production de CO_2 des échantillons de sol Purpan incubés peut être attribuée à sa plus forte teneur en carbone par rapport au sol Tarn (3,25% et 2,03% respectivement, Tableau 6). La variabilité des productions de CO_2 pour un même sol et un même niveau d'humidité est élevée avec un coefficient de variation moyen de 16% (donnée non montrée). La forte variabilité des productions de CO_2 est associée à l'incubation d'échantillons non remaniés de sol ayant des proportions variables d'éléments grossiers (> 2 mm). La proportion d'éléments grossiers, inorganiques, influence les valeurs de production de CO_2, exprimées par unité de masse de sol incubé.

L'influence des niveaux d'humidité testés sur la production de CO_2 pour les échantillons de sol Tarn n'est pas significative (Figure 32). En revanche, les niveaux d'humidité testés ont une influence significative sur la production de CO_2 pour le sol Purpan (Figure 32). Les résultats significatifs obtenus avec le sol Purpan peuvent être attribués à deux éléments. Les niveaux d'humidité testés avec le sol Purpan sont différents avec un taux de remplissage en eau des porosités (%) commençant à 35% contre 55% pour le sol Tarn. L'intensité des processus biologique augmente probablement de façon exponentielle à mesure que l'humidité augmente au-dessus de l'absence d'eau suivi d'une réponse modérée jusqu'à ce que l'optimum biologique soit atteint. La forte production de CO_2 du sol Purpan par rapport au sol Tarn favorise également la mise en évidence d'un facteur limitant.

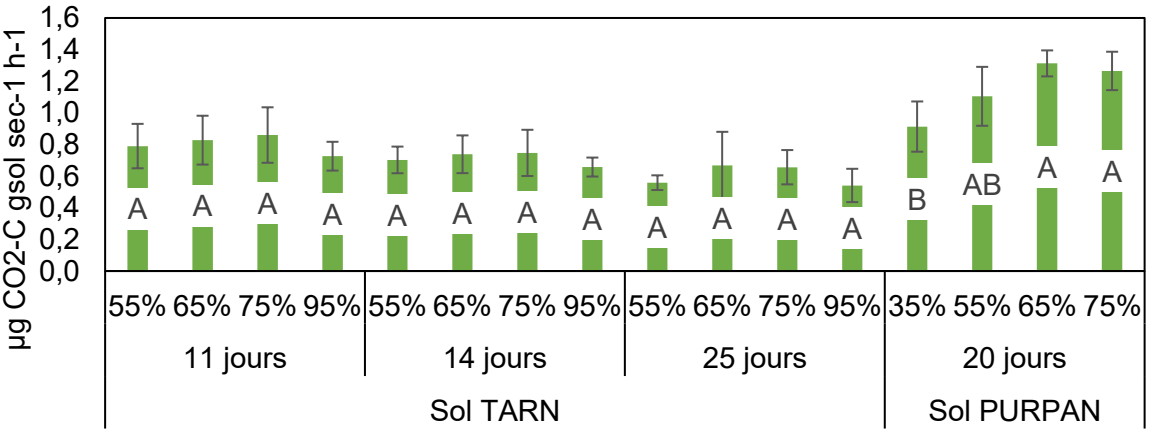


Figure 32 : Productions de CO_2 en fonction des taux de remplissage en eau des porosités (en %) pour le sol Tarn, 11, 14 et 25 jours après le début de l'humidification et pour le sol Purpan 20 jours après le début de l'humification. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types. Les lettres en capitale dans les étiquettes figurent les résultats des comparaisons multiples par paires des différents niveaux d'humidité pour chacune des durées d'incubation (test Tukey HSD)

La Figure 33 illustre la corrélation entre la production de CO_2 des sols et leur hu0midité exprimée en fonction du taux de remplissage en eau des porosités (a) ou de la teneur massique en eau (b). On observe une corrélation très forte entre l'augmentation de la production de CO_2 et l'humidité des sols exprimée en fonction du taux de remplissage en eau des porosités (R^2 = 0,81). En revanche, la corrélation entre l'augmentation de la production de CO_2 et l'humidité des sols exprimée en fonction de leur teneur massique en eau est faible (R^2 = 0,32). Ces observations mettent en évidence que l'expression de l'humidité des sols en fonction du taux de remplissage en eau des porosités est plus adaptée pour décrire la biodisponibilité de l'eau du sol. Le sol Tarn ayant un espace poral moindre nécessite moins d'eau pour atteindre le maximum biologique. Les courbes de tendance mettent en évidence une augmentation exponentielle de la production de CO_2 en fonction de l'augmentation de l'humidité lorsque les sols contiennent relativement peu d'eau, suivie d'une réponse modérée jusqu'à ce que l'optimum biologique soit atteint et d'une réponse négative au-dessus du niveau d'humidité optimal. Le maximum biologique pour les sols étudiés est évalué, à partir de l'équation de la courbe de tendance, à un taux de remplissage des porosités de 71%. Ce maximum, à la limite d'une condition anaérobie, est cohérent avec les valeurs de la littérature (Carter & Gregorich, 2007).

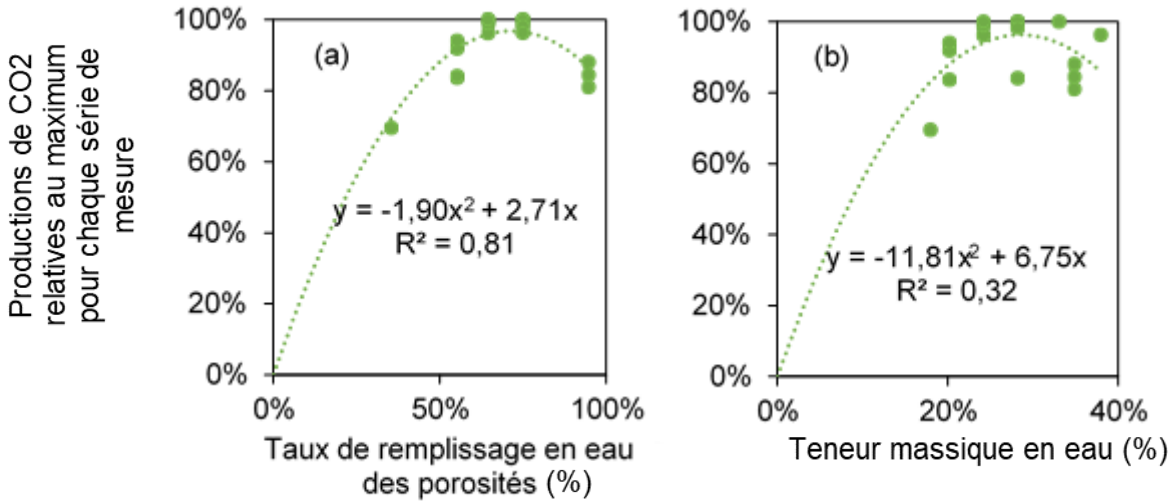


Figure 33 : Corrélations entre les productions de CO_2 des sols relatives au maximum pour chaque série de mesure (%) et du taux de remplissage en eau des porosités (a) ou de la teneur massique en eau (b).

4.1.4. Evolution de la respiration des microorganismes lors du séchage des sols

On observe une forte corrélation entre les productions de CO_2 et l'évolution du taux de remplissage en eau des porosités lors du séchage des sols incubés (R^2 = 0,84, Figure 34). La courbe de tendance de type linéaire permet d'évaluer l'influence de la diminution du remplissage des porosités des sols lors du séchage sur l'activité microbienne des sols. Lorsque le taux de remplissage diminue de 10%, l'activité microbienne diminue en moyenne de 13%.

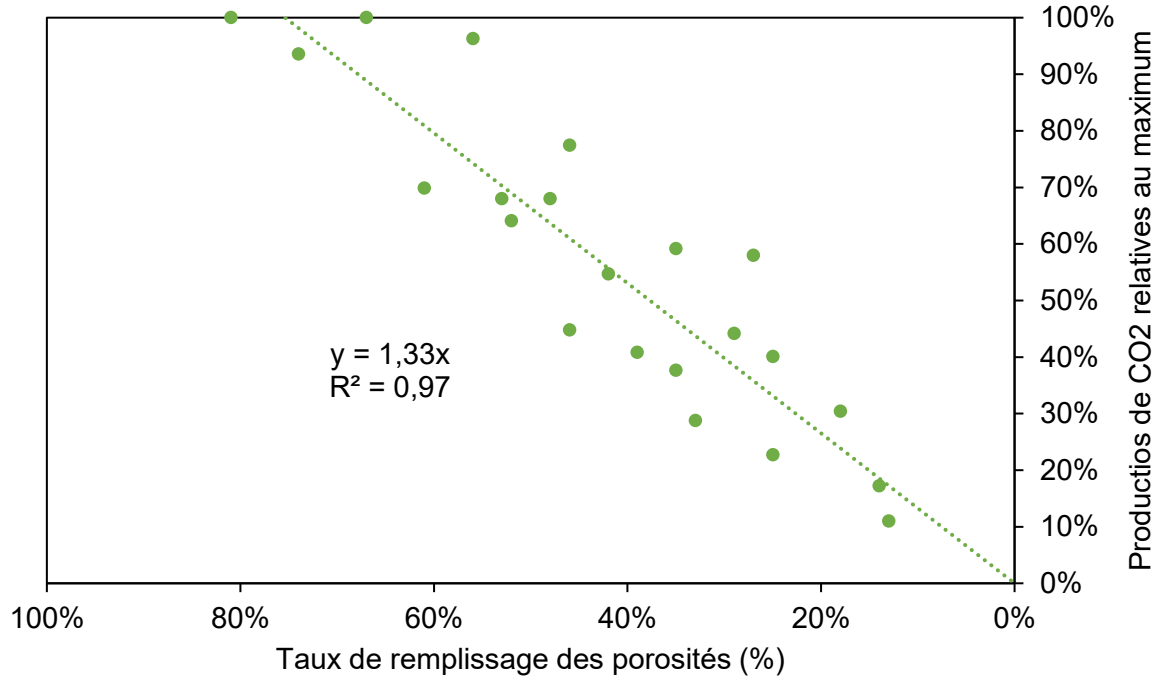


Figure 34 : Corrélations entre l'évolution des productions de CO_2 des sols relatives et l'évolution du taux de remplissage en eau des porosités lors du séchage des sols incubés

Ces incubations ont permis de mettre en évidence que l'expression de l'humidité des sols en fonction du taux de remplissage des porosités et plus efficace que son expression en fonction la teneur massique pour évaluer la biodisponibilité de l'eau. L'activité microbienne est maximum pour un taux de remplissage des porosités de 71%. Afin de maintenir l'activité microbienne à proximité de son maximum, le taux de remplissage des porosités lors des expériences a été maintenu entre 65% à la suite de l'apport en eau et 60% avant l'apport en eau ; ce qui correspond à une fréquence d'arrosage hebdomadaire. Lors des incubations en conditions contrôlées, la mesure de la production de CO_2 a été réalisée quelques jours avant et/ou après l'ajustement en eau.

4.2. Contribution scientifique : « Carbon sequestration in soil amended with anaerobic digested matter » (incubation n°2)

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Soil and Tillage Research* :

Béghin-Tanneau, R., Guérin, F., Guiresse, M., Kleiber, D., Scheiner, J.D., 2019. Carbon sequestration in soil amended with anaerobic digested matter. Soil and Tillage Research 192, 87–94. https://doi.org/10.1016/j.still.2019.04.024

L'étude est présentée ci-après sous sa forme publiée.

L'expérience au champ a mis en évidence le rôle de l'effet « priming » dans le stockage du carbone à la suite de l'apport en produits organiques. Cependant, son rôle dans le stockage de carbone n'a pas pu être quantifié relativement à la stabilisation des matières organiques apportées en raison de la sècheresse du sol. L'objectif de cette incubation a été d'évaluer l'importante relative des effets « priming » par rapport à la stabilisation des matières organiques apportées.

La conception expérimentale est similaire à l'incubation au champ avec l'utilisation de la différence du $\delta^{13}C$ entre les produits organiques apportés et les matières organiques endogènes afin de tracer l'origine des productions de CO_2. Les mesures de la production de CO_2 sont réalisés avec le même appareil (CRDS; Picarro G2201-i Analyseur équipé d'une pompe externe étanche). Les échantillons de sol « Purpan », remaniés, proviennent de la même parcelle que celle utilisée pour l'incubation au champ (Figure 35). Le maïs et le digestat utilisés sont ceux provenant de la société PlanET GmbH (Figure 35).

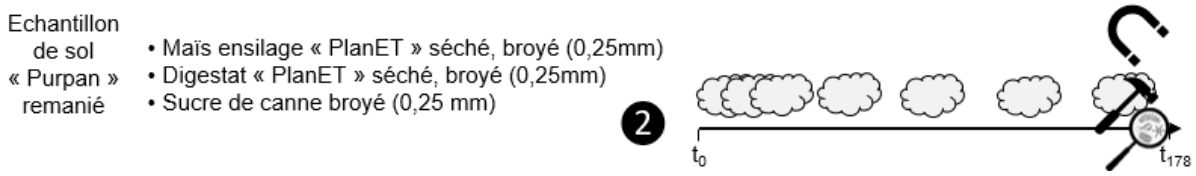


Figure 35 : Incubation n°2

Soil & Tillage Research 192 (2019) 87–94

Contents lists available at ScienceDirect

Soil & Tillage Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/still

Carbon sequestration in soil amended with anaerobic digested matter

R. Béghin-Tanneau[a,*], F. Guérin[b], M. Guiresse[c], D. Kleiber[a], J.D Scheiner[a,c]

[a] Unité de Recherche Pathologie et Génétique Végétales (PPGV), Université de Toulouse, INP- PURPAN, Toulouse, France
[b] Geosciences Environnement Toulouse UMR 5563 & UR 234 IRD, Université Paul-Sabatier, Avenue Edouard Belin 14, F-31400, Toulouse, France
[c] EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

A B S T R A C T

Organic carbon (C) sequestration in agricultural soils is regarded as a mean to mitigate carbon dioxide (CO2) concentration increase in the atmosphere and to secure food production. Among other practices, exogenous organic matter (EOM) addition in soils is a way to sequestrate organic C. In this study, we compared the organic matter stability, carbon sequestration, soil respiration in soils amended with sucrose, silage EOM and anaerobic digested EOM. We used agricultural soils from a perennial pasture (C3 plants) and EOM from sugar cane and maize (C4 plants). The 13C natural abundance tracer technique has been used to separate SOM-derived and EOM-derived CO2 productions from soil in order to measure EOM stability and priming effects. Undigested-EOM addition did not lead to C sequestration due to a low stability of its organic matter and a positive priming effect that enhanced native SOM respiration. Digested-EOM addition in soil led to C sequestration due to inherent stability of EOM and to a negative priming effect which decreased native SOM respiration. We finally evaluated carbon balance of both direct incorporation of silage in soil and anaerobic digestion followed to incorporation of digestate. Our broad estimation shows that the use of digestate amendment not only favour carbon sequestration but also reduce CO2 emissions by 27% as compared to the incorporation of maize silage.

1. Introduction

Anthropogenic emissions of greenhouse gases are likely to cause significant climate changes with negative feedbacks on natural and anthropogenic systems and have consequences on food production, livelihoods, health and economics (IPCC et al., 2014). Among other possibilities, agricultural soils ability to sequestrate organic carbon (C) can have a significant potential to mitigate carbon dioxide (CO_2) concentration increase in the atmosphere. In addition, abundance in organic matter enhance soil fertility and consequently its increase could secure food production (Lal, 2004). A global increase in agricultural soil organic C stocks by 0.4% per year could compensate the global emissions of greenhouse gases by anthropogenic sources (Minasny et al., 2017).

Soil organic C sequestration, described as long-term or permanent (i.e. 100 years) removal of CO_2 from the atmosphere into the soil (Stockmann et al., 2013), may be enhanced by adoption of best management practices such as: afforestation, conversion to pasture, crop rotation with cover crops, conservation tillage, and application of exogenous organic matter (EOM). EOM is defined as all organic matters applied in soil having fertilizing and amending values (Peltre et al., 2011). EOM includes all organic matters arising from external sources such as urban areas, municipalities, agriculture, forestry and industry, and by-products from their treatment process. C sequestration after EOM application depends on EOM stability in soil. Stability is defined as the proportion of residual EOM remaining in soils over the long-term after application. EOM is considered as stabilized when its degradation rate reaches a similar degradation rate as the Soil Organic Matter (SOM) (Lashermes et al., 2009). There are different ways to increase EOM stability such as: aerobic digestion (from composting), anaerobic digestion (with biogas production) and pyrolysis process (biochar).

During anaerobic digestion, the bacterial mineralization of organic matter produces biogas primarily composed of methane (CH_4) and CO_2. Biogas is a renewable energy source which represents an alternative to fossil energies. Residues, broadly called digestates, are a complex mixture of water and organic and inorganic substances including nutrients and refractory organic matter (Möller, 2015). In Europe, there are 17,400 biogas plants installed with a significant development perspective (Scarlat et al., 2018). Anaerobic digestion could become an important means of treating biomass before its agronomic recovery. So far, anaerobic digestion was mostly developed to produce energy and the potential use of digestate as EOM for increasing C sequestration is still under evaluation. Indeed, most studies concluded that digested EOM has higher stability in soil than undigested EOM (Bertora et al., 2008; Marcato et al., 2009; Cayuela et al., 2010; Chen et al., 2012; Schouten et al., 2012; Stumpe et al., 2012; Fuente et al., 2013; Johansen et al., 2013; Thomsen et al., 2013) but opposite results were also found (Bernal and Kirchmann, 1992; Kirchmann and Bernal, 1997). Reasons for these contradictory results have not been clearly identified. Digested EOM's stability is attributed to an increase in

* Corresponding author.
E-mail address: robin.beghin@purpan.fr (R. Béghin-Tanneau).

https://doi.org/10.1016/j.still.2019.04.024
Received 31 January 2019; Received in revised form 27 March 2019; Accepted 30 April 2019
0167-1987/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

recalcitrant organic matter (regarding biomineralization) proportion due to a preferential mineralization of labile organic matter during anaerobic digestion (Gómez et al., 2007; Pognani et al., 2009; Tambone et al., 2010; Thomsen et al., 2013). Stumpe et al. (2012) and Chen et al. (2012) hypothesized that priming effects, such as variation of native SOM mineralization, could occur after digestate application. These considerations suggest that both modifications of digested EOM's stability and priming effects may explain changes in soil organic C sequestration after its application. So far, the interactions of digested EOM with the mineralization of native SOM are unmeasured.

The aim of the present study is to determine to what extend EOM stability and changes in native SOM mineralization contribute to organic C sequestration in soil for undigested versus digested EOM addition. To separate SOM-derived and EOM-derived CO_2 production, we used the ^{13}C natural abundance as a tracer, based on the difference in the ^{13}C isotope abundance of C3 and C4 plants (Kuzyakov, 2006).

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

EOM from maize silage or sugar-cane sucrose (C4 plants) were applied on a soil from a perennial pasture (C3 plants). Soil CO_2-C production was partitioned into components derived from SOM and EOM using the difference in natural abundance in $\delta^{13}C$ values of C4 EOM from maize silage or sugar-cane sucrose and C3 SOM from perennial pasture. Soil respiration stimulation was tested under three treatments following the addition of 5.3 ± 0.7 mg C $g_{dry\ soil\ (DS)}^{-1}$ of sugar-cane sucrose, undigested maize silage, digested maize silage in an agricultural soil. This input is equivalent to a biomass input of 41 dry Mg ha^{-1} assuming a useable soil depth of 0.25 m and a bulk density of 1.3 in field. As a comparison, an irrigated maize silage crop in Europe has an above-ground biomass yield of about 20 dry Mg ha^{-1} (Amon et al., 2007). Sucrose was chosen as a known reference to evaluate the consistency of the results with the literature. Controls were soil-only. There were four replicates of each treatment and four controls.

Soils manipulations were carried out on 490 g_{DS} in 1 L high density polyethylene gas-tight chambers of 9.7 cm diameter and, 15.4 cm height. EOM was placed on soil surface and subsequently tilled at full depth (5 cm). Soil humidity was gravimetrically adjusted after EOM incorporation at 65% Water Filled Pore Space (WFPS) according to Franzluebbers (1999). Weekly watering, with dezionized water, maintained soils at 65% WFPS with a maximum decrease at 55% WFPS before rewetting. The chambers were placed in an air-conditioned room under well-aerated conditions with a controlled temperature of 20 °C day and night. They remained open during the incubation.

2.2. Materials

Luvisoil (FAO system) with loamy texture, from a perennial pasture, was collected in the second terrace of Garonne valley (France) from the upper 20 cm, air dried at 20 °C, sieved with a 5 mm mesh and homogenised. Soil C amount was 1.25% and soil pH was 6.7 (Table 1) which are within the range for a perennial pasture in Garonne valley. SOM $\delta^{13}C$ value (Table 1) was characteristic of C3 plant (O'Leary, 1981). In this field, no C4 plant cultivation was reported in living memory. SOM $\delta^{13}C$ without acidification (SOM $\delta^{13}C_{total}$) and following acidification (SOM $\delta^{13}C_{organic}$) were not statistically different (Table 1) which reflected that inorganic C amount was negligible.

Table 1
Characteristics of SOM and EOM used in the experiment.

Elemental analysis	Control soil	Sucrose	Undigested maize	Digested maize
C_{total} (%)	1.25	42.3	42.9	39.1
$\delta^{13}C_{total}$ (‰)	−26.1	−11.9	−12.3	−13.7
$\delta^{13}C_{organic}$ (‰)	−26.3	−11.9	−12.2	−14.0
N (%)	0.13	NC	1.00	2.29
C:N	9:1	NC	43:1	17:1

Raw undigested and digested maize silage were collected from an experimental digester at PlanET Biogastechnik GmbH laboratory (Vreden, Germany). The anaerobic digester used was a 1 m^3 airtight tank where maize silage was continuously stirred with dairy liquid manure under mesophilic conditions at 37 °C. The targeted dry matter content inside the digester was about 10%. Maize silage feeding into the digester and digestate removal were done daily. The mean residence time of the organic matter inside the digester was about 30 days. Therefore raw undigested and digested maize were dried (70 °C), ground and sieved (0.25 cm) to minimize particle size effect and variability during sampling before soil incorporation. They were applied dry to the soil. A preliminary soil incubation with dried and undried amendments showed no statistical differences in terms of respiration (data not shown). EOM $\delta^{13}C$ values were characteristic to C4 biomass (Table 1). EOM $\delta^{13}C_{total}$ and EOM $\delta^{13}C_{organic}$ were equivalent (Table 1) which reflected that inorganic C amount was negligible.

The C:N ratio were 43:1 and 17:1 for the undigested maize and digested maize respectively (Table 1). A decrease in C:N ratio of EOM after anaerobic digestion is commonly reported since C is exported as biogas when nitrogen (N) is kept during the process (Möller and Müller, 2012). Before drying, raw digested maize silage C:N ratio was 14:1 and a third of total nitrogen was ammoniacal nitrogen (data not shown). Since ammoniacal nitrogen (NH_4^+) is sensitive to volatilization, an higher C:N ratio after drying was expected for the digested maize silage

2.3. Measurements

Cavity Ring-Down Spectroscopy technology (CRDS; Picarro G2201-i Analyzer with its leak free external vacuum pump), coupled with pots using tubes and bulkhead connectors through a lid, enabled to measure CO_2 and CH_4 concentrations and $\delta^{13}C(-CO_2$ and $-CH_4)$. $\delta^{13}C$ were expressed in standard notation relative to the international VPDB standard. The calibration of the instrument was checked using 403.3 ppm CO_2 standard (Air Liquide, France).

Measurements were made on 17 occasions over 178 days, daily at the beginning of the experiment to monthly at the end. During these discrete and repeated measurements, changes in CO_2, CH_4 concentrations and, $\delta^{13}C(-CO_2$ and $-CH_4)$ were monitored for 20 min into the chamber system (Midwood and Millard, 2011).

2.4. Calculations and statistics

Soil CO_2 and CH_4 productions were calculated from a linear increase in concentrations into chambers during measurements. During the experiment, CH_4 productions were below detection limit. Total CO_2 production is expressed in µg CO_2-C g_{DS}^{-1} h^{-1} according to the Eq. 1:

$$Total\ CO_2\ production\ (t) = \frac{a \times V}{W_{DS}} \quad (1)$$

where "a" is the slope of CO_2-C concentration linear increase with time during the monitoring (µg CO_2-C h^{-1}), "V" is the volume of the net headspace in the chamber (m^3) and "W_{DS}" is the weight of dry soil (g). The volume of the chamber system (without soil) was calculated from a linear increase in CH_4 concentration following injections of known amount. Soils volumes were estimated from their bulk densities in pots to calculate net headspace volume in the chamber system during the monitoring.

Total CO_2 productions were partitioned into CO_2 productions from EOM mineralization and CO_2 productions from SOM mineralization according to the Eqs. 2 and 3 (Cerri et al., 1985):

Table 2
Total CO_2 production (µg CO_2-C g_{DS}^{-1} h^{-1}), δ^{13}C-CO_2 signatures (‰) and Cumulative total CO_2 production throughout the experiment (mg CO_2-C g_{DS}^{-1}) in control, sucrose, undigested maize silage, digested maize silage. Data are mean (n = 4) with standard deviation. Capital letters referred to the comparison of treatments according to the Tukey test ($P < 0.05$).

Treatments	Daily weighted average values during the experiment		Maximum values during the experiment		Last measurement values		Cumulative total CO_2 production throughout the experiment (mg CO_2-C g_{DS}^{-1})
	Total CO_2 productions (µg CO_2-C g_{DS}^{-1} h^{-1})	δ^{13}C-CO_2 signatures (‰)	Total CO_2 productions (µg CO_2-C g_{DS}^{-1} h^{-1})	δ^{13}C-CO_2 signatures (‰)	Total CO_2 productions (µg CO_2-C g_{DS}^{-1} h^{-1})	δ^{13}C-CO_2 signatures (‰)	
Control	0.26 ± 0.01 A	−25.7 ± 0.1 A	–	–	0.15 ± 0.01 A	−25.5 ± 0.6 A	1.10 ± 0.06 A
Sucrose	1.97 ± 0.03 B	−19.6 ± 0.6 B	18.20 ± 1.20 A	−12.9 ± 0.3 A	0.22 ± 0.03 B	−22.2 ± 0.4 B	8.41 ± 0.06 B
Undigested maize	1.41 ± 0.05 C	−18.5 ± 0.2 C	10.90 ± 0.60 B	−12.1 ± 0.7 A	0.23 ± 0.04 B	−22.0 ± 0.9 B	6.04 ± 0.20 C
Digested maize	0.70 ± 0.02 D	−19.2 ± 0.2 B	3.70 ± 0.20 C	−14.3 ± 0.2 B	0.23 ± 0.01 B	−22.2 ± 0.5 B	2.98 ± 0.08 D

$$EOM\ CO_2\ production\ (t) = \left[\frac{\delta_C - \delta_T}{\delta_C - \delta_{EOM}}\right] \times Total\ CO_2\ production, \quad (2)$$

$$SOM\ CO_2\ production\ (t) = \left(1 - \left[\frac{\delta_C - \delta_T}{\delta_C - \delta_{EOM}}\right]\right) \times Total\ CO_2\ production \quad (3)$$

where: "δ_C "is the δ^{13}C-CO_2 average signature from control soils, "δ_T "is the δ^{13}C-CO_2 signature from amended soil, and "δ_{EOM} "is the $\delta^{13}C_{total}$ signature of EOM considered (Table 1). Keeling plots method was used to determine δ^{13}C-CO_2 signature of CO_2 emitted from a soil during a measurement (Keeling, 1958).

EOM stability was estimated according to Lashermes et al. (2009) method. Potential residual organic C from EOM in soil was estimated by simulating and extrapolating kinetics of $EOM_{cumulative\ residual\ C}$ (t) (Eq. 4) to a long-term end point determined when degradation rate of EOM reached a similar degradation rate to that of native SOM from controls. This endpoint was either reached during the incubation period or was extrapolated. The experimental kinetics of $EOM_{cumulative\ mineralized\ C}$ (t) were transformed in kinetics of $EOM_{cumulative\ residual\ C}$ (t) in soil by:

$$EOM_{cumulative\ residual\ C}\ (t) = 1 - EOM_{cumulative\ mineralized\ C}\ (t), \quad (4)$$

where "$EOM_{cumulative\ residual\ C}$ (t)" is residual CO_2-C organic at time t and $EOM_{cumulative\ mineralized\ C}$ (t) cumulated mineralized C at time t expressed as percentages of total C from applied EOMs.

A three organic C pools model (Lashermes et al., 2009) was used with a recalcitrant pool that is considered as non-degraded during the simulated period and two biodegradable pools that decompose following first-order kinetics with different degradation rate constants. This model is written as:

$$EOM_{cumulative\ residual\ C}\ (t) = C_1 \times e^{-k_1 t} + C_2 \times e^{-k_2 t} + (1 - C_1 - C_2), \quad (5)$$

where C_1 and C_2 are the two biodegradable pools (percentages of total C from applied EOMs) and k_1 and k_1 their respective mineralization rate constants (day^{-1}) and $(1 - C_1 - C_2)$ is the percentage of stable EOM (percentages of total C from applied EOMs). The model was fitted to experimental results using a non-linear regression programm and data analysis software: XLSTAT 2018 under MICROSOFT EXCEL 2016.

The CO_2 production resulting from the modification in native SOM mineralization was named "primed CO_2" (Kuzyakov et al., 2000). Primed CO_2 production were expressed in µg CO_2-C g_{DS}^{-1} h^{-1}. It was calculated from the Eq. 6:

$$Primed\ CO_2\ production\ (t) = SOM\ CO_2\ production\ (t) - Controls\ Total\ CO_2\ production\ (t), \quad (6)$$

Where "*SOM CO_2 production (t)*" results from Eq. 3 and "*Controls Total CO_2 production (t)*" is the average CO_2 production from controls. A positive priming effect is defined as an increased extra C loss from the native SOM mineralization and inversely for a negative priming effect. Cumulative C sequestration or loss in soil after treatments relative to controls throughout the experiment was estimated by subtracting stable EOM-C in soil and primed C.

Statistical analysis for comparison of the different treatments are based on anova followed by Tukey-HSD test at 95% level of probability using a statistical and data analysis software: XLSTAT 2018 under MICROSOFT EXCEL 2016.

3. Results

3.1. Total CO_2 productions, δ^{13}C-CO_2 signatures and EOM-derived CO_2 productions

Throughout of the experiment, total CO_2 productions from controls

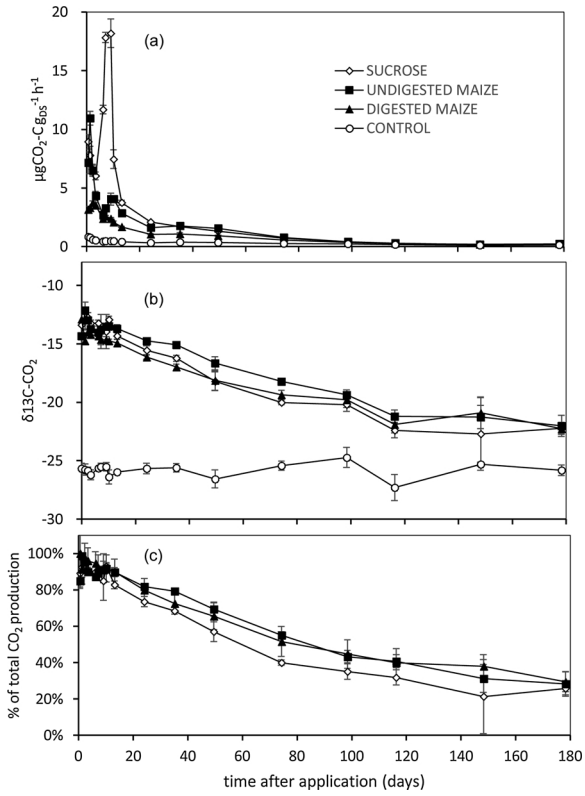


Fig. 1. (a) Kinetics of total CO_2 production (µg CO_2-C g_{DS}^{-1} h^{-1}). (b) δ^{13}C-CO_2 signature of CO_2 emitted from amended soils and controls. (c) % of EOM-CO_2 production represented as % of total CO_2 production. Data are mean (n = 4) with standard deviation. In some cases, deviation bars are smaller than the symbols.

were in average: 0.26 µg C g^{-1} h^{-1} and the cumulative total CO_2 productions from controls were 1.10 mg C g_{DS}^{-1} (Table 2). Total CO_2 productions from controls decreased during first 15 days of the experiment from 0.8 to 0.4 µg C g^{-1} h^{-1} (Fig. 1a). After these first 15 days, they followed a slight decrease until reaching 0.15 µg C g^{-1} h^{-1} at the end of the experiment (Fig. 1a).

All treatments resulted in a significant increase in daily weighted average total CO_2 productions throughout the experiment compared to controls. Sucrose, undigested and digested maize application led to daily weighted average total CO_2 productions during the experiment: 8, 5 and 3 times higher than controls respectively (Table 2, Fig. 1a).

Sucrose application led to a CO_2 production peak in the first day before that of the other applied EOMs and total CO_2 production was higher than other treatments at 8.9 µg C g^{-1} h^{-1} (Fig. 1a). This first peak was followed by a decrease of CO_2 production on second and third days after its application reaching 6.0 µg C g^{-1} h^{-1}. Then, there was a large CO2 production peak from the fourth day which was 36 times higher than average controls at 18.2 µg C g^{-1} h^{-1} (Fig. 1a, Table 2). Undigested and digested maize addition led to total CO_2 productions peaking between the first and the second day after their addition which were 14 and 6 times higher than average controls at 10.9 and 3.7 µg CO_2-C g^{-1} h^{-1} respectively (Fig. 1a, Table 2). After peaking, total CO_2 productions followed a sharp decrease for all treatments during 10 days (Fig. 1a). Afterwards total CO_2 productions decreased slowly. After 178 days, CO_2-C productions from all treatments were not significantly different to each other and 50% higher than controls (Table 2). The cumulative total CO_2 productions from sucrose, undigested and digested maize treatments throughout the experiment were respectively 8.41, 6.04 and 2.98 mg C g_{DS}^{-1} (Table 2).

During the experiment, average δ^{13}C-CO_2 signatures from control soils (Fig. 1b) remained stable. The δ^{13}C-CO_2 average signature during the experiment at: -25.7‰ (Table 2) was equal to SOM δ^{13}C value ($P <$ 0.05, Table 1), showing that no large fractionation occurred during microbial respiration (Nottingham et al., 2009). Regarding treatments with EOM incorporation, peaking values δ^{13}C-CO_2 signatures during the first 15 days (Fig. 1b, Table 2) were close from EOMs $\delta^{13}C_{total}$ (Table 1). After these first 15 days, δ^{13}C-CO_2 signatures from treatments followed a slight decrease (Fig. 1b). At the end of the experiment, δ^{13}C-CO_2 signatures from treatments were not significantly different to each other but still higher than controls (Table 2)

EOM-derived CO_2 production (Fig. 3c), represented as percentage of total CO_2 production (Fig. 3a), was calculated from Eq. 2 based on δ^{13}C-CO_2 signatures (Fig. 3b) and δ^{13}C values of SOM and EOM (Table 1). During the experiment, the percentage of EOM-derived CO_2 production follow a decrease from 91%, 91% and 94% for sucrose, undigested and digested maize respectively during the first tenth days to 26%, 28% and 30% at the end of the experiment (Fig. 3c). The percentage of EOM-derived in CO_2 production, expressed as percentage of total CO_2 production, throughout the experiment for sucrose was significantly lower ($P <$ 0,05) than for undigested and digested maize silage.

3.2. EOMs stability and induced priming effects in soil

Cumulative evolution from EOM-derived CO_2, represented as % of total C applied, revealed that after 178 days (1) sucrose was entirely mineralized (98% ± 2), (2) undigested maize mineralized at 91% and (3) digested maize silage mineralized at 41% (Fig. 2). After 40 days, 80% of sucrose was mineralized when it took 80 days for undigested maize (Fig. 2). Potential residual organic C from EOMs estimated from model (Eq. 5, data not shown) were not statistically different to those from experimental kinetics results (Fig. 2) which meant that remaining EOMs were stable at the end of the experiment.

Treatments showed different dynamics of primed soil-derived CO_2 production (Eq. 6, Fig. 3a) which affected their cumulative evolution (Fig. 3b). Immediately after sucrose addition, a small positive priming effect pulse was measured followed by a short period of negative priming effect (Fig. 3a). Between the fourth and tenth days after sucrose addition, primed C production followed a large pulse until reaching 2.1 µg C g_{DS}^{-1} h^{-1} on the 9th day (Fig. 3a). Afterwards, this large positive priming effect is dropping until to be negligible on the 10th day. From the 13th day, a smaller and persistent positive priming effect follow a slight decrease from 0.2 µg C g_{DS}^{-1} h^{-1} to become almost zero at the end of the experiment. Cumulate primed soil derived CO_2-C after sucrose addition throughout the experiment was 1.41 mg C g_{DS}^{-1} (Fig. 3b) which represent an increase of 129% of SOM mineralization in controls. Immediately after undigested maize addition, a small positive priming effect pulse was measured followed by a short period of negative priming effect (Fig. 3a). Afterwards, priming effect was slightly negative during first 20 days and then slightly positive during 60 days. Towards the end of the experiment, it became negligible. Cumulate

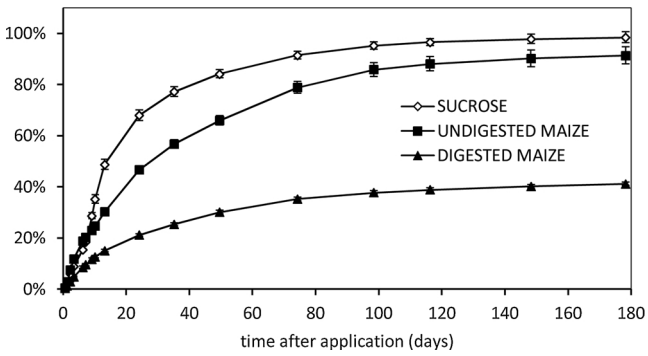


Fig. 2. Cumulative substrate-derived CO_2-C production represented as % of total C from applied organic materials. Data are mean (n = 4) with standard deviation. In some cases, deviation bars are smaller than the symbols.

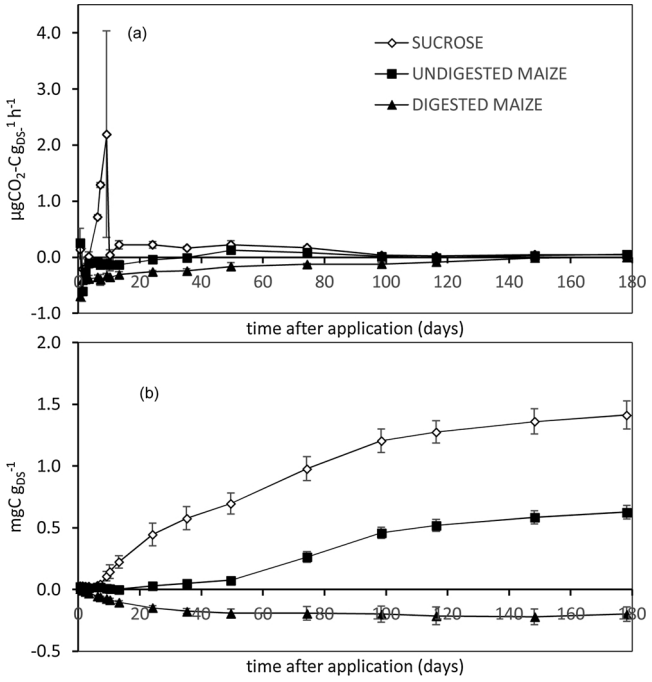


Fig. 3. (a) Primed soil-derived CO_2-C productions (μg CO_2-C $g_{DS}^{-1} h^{-1}$). (b) Cumulative primed soil-derived CO_2-C evolution (mg C g_{DS}^{-1}) for each of sucrose, maize silage, digested maize silage. Data are mean (n = 4) with standard deviation. In some cases, deviation bars are smaller than the symbols.

primed soil derived CO_2-C after undigested maize addition throughout the experiment was 0.63 mg C g_{DS}^{-1} (Fig. 3b) which represent an increase of 57% of SOM mineralization in controls. Immediately after digested maize silage incorporation, native organic matter mineralization was reduced with a negative priming effect of -0.7 μg C $g^{-1} h^{-1}$ at day 1 (Fig. 3a). Then, negative priming effect followed a linear increase until being negligible at the end of the experiment. Cumulate primed soil derived CO_2-C after undigested maize addition throughout the experiment was −0.20 mg C g_{DS}^{-1} (Fig. 3b) which represent a decrease of 18% of SOM mineralization in controls.

4. Discussion

4.1. C sequestration in soil after EOMs addition

Sucrose addition in soil enhanced CO_2 production compared to controls (Fig. 1a). The total amount of CO_2 production after sucrose addition was higher than the EOM-C amount added. 98% of the sucrose was emitted (Table 3) and the enhancement of native SOM mineralization due to priming effect represented 22% of added EOM-C (Table 3). Similar loss of C after labile EOM addition (cellulose) in soil was reported before in the literature (Fontaine et al., 2004) on a laboratory experiment. Heterotrophic microorganisms' activity was assumed to be not N-limited despite the absence of N in sucrose since the C:N ratio of soil was 9:1 (Table 1). The CO_2 production peaking after sucrose addition was delayed compared to undigested and digested maize addition (Fig. 1a). We guessed that a limiting factor has temporarily slowed microorganism's activity. One of controlling factor that could have been affected after sucrose addition was the oxygen. The biological demand was high for sucrose treatment as revealed by the high CO_2 production during the first day after its addition in soil. We hypothesised that for the next two days the soil was subtoxic which have affected the overall respiration as observed by the decrease of CO_2 production. However, during these two days or during the experiment, no methane production was observed. Since 98% of sucrose was ultimately mineralized (Fig. 2), the subtoxic event only delayed sucrose mineralization but did not affect our conclusions on sucrose stability and priming effects.

Table 3
Cumulate C sequestration or loss after EOM application relative to controls throughout the 178 days partitioned into: stable EOM and priming effects, represented as % of added C. Data are mean (n = 4) with standard deviation. Capital letters referred to the comparison of treatments according to the Tukey test ($P < 0.05$).

Treatments	Stable EOM	Priming effects*	C sequestration or loss in soil**
Sucrose	2 ± 2 A	+ 24 ± 2 A	−22 ± 2 A
Undigested maize	9 ± 3 B	+ 13 ± 1 B	−4 ± 4 B
Digested maize	59 ± 1 C	−4 ± 1 C	+ 63 ± 1 C

* + / -: represent an increase or a decrease in native SOM mineralization respectively.
** + / -: represent a C sequestration in soil or a C loss to the atmosphere respectively.

Undigested maize addition in soil enhanced CO_2 production compared to controls (Fig. 1a). The total amount of CO_2 production was not statistically different than the EOM-C amount added. The resulting neutral C sequestration was due to a low stability of its organic matter by 9% of EOM-C and a positive priming effect which accounted for 13% of EOM-C (Table 3). In a laboratory experiment reproducing mineralization of C after grain maize crop residues addition (without ears) in soil using ^{13}C natural abundance method, Stemmer et al. (1999) observed a stability of the EOM by 19% and a positive priming effect suggested but not quantified. In the present experiment, the lower stability may be due to a low proportion of recalcitrant organic matter in maize silage related to the green harvesting of the forage which included ears of corn and the fineness of the grinding that may have enhanced the lability of the organic matter. In a 57 days laboratory experiment measuring mineralization of C after maize addition in a sandy and a loamy soil by using ^{13}C natural abundance method, Rottmann et al. (2010) quantified induced positive priming effect which represented respectively 50% and 120% of SOM mineralization in controls. These results are in accordance with the present experiment where induced positive priming effect after undigested maize addition represented 57% of SOM mineralization in controls after 178 days.

Our data (Fig. 3a) showed that immediately after sucrose and undigested maize addition, a small positive priming effect pulse was measured followed by a short period of negative priming effect. These observations can be explained by the preferential substrate utilization, which suppose that the microorganisms use C sources according to their availability. The preferential substrate utilization implies that immediately and temporarily after the addition of labile EOM-C, the microorganisms switched from the decomposition of hardly utilizable SOM to the decomposition of easily utilizable EOM and reduces SOM mineralization (Kuzyakov and Bol, 2005, 2006).

Kinetics of priming effects measured after sucrose and maize addition (Fig. 3a and b) were similar to those described in the literature after labile organic matter addition (Blagodatskaya et al., 2007; Blagodatskaya and Kuzyakov, 2008; Blagodatsky et al., 2010; Kuzyakov, 2010). As reported, the overall initial increase in native SOM mineralization (Fig. 3a) can be attributed to an apparent priming effect defined as an increase in microbial biomass turnover without persistent effect on SOM extra-loss as SOM mineralization quickly returned to normality or decreased (Fig. 3a). Then, the positive priming effect throughout the experiment can be attributed to a real priming effect originate from SOM extra-mineralization. According to Kuzyakov (2010), availability of labile organic matter activates fast-growing microbial species (r-strategists) which accelerates the turnover of microorganisms triggering apparent positive priming effect. Then, slow-growing micro-organisms (K-strategists) benefit from r-strategists necro-biomass remaining after most of the labile organic matter was

exhausted. These K-strategists are specialized in accessing and degrading substrates that are poorly available such as SOM, triggering real positive priming effect.

Digested maize addition in soil enhanced CO_2 production compared to controls (Fig. 1a) but the cumulative amount of CO_2 production was lower than the EOM-C amount added (Table 3). The resulting C sequestration represented 63% of EOM-C (Table 3). This positive C balance between EOM input and CO_2 output relative to controls was due to a high stability of its organic matter by 59% and a negative priming effect by 4% of EOM-C added (Table 3).

Digested maize addition in soil increased C sequestration by 67% (Table 3, 63% minus -4%) in comparison with undigested maize throughout the experiment. This result on C sequestration differences between digested and undigested EOM is consistent with findings from other similar studies (Chen et al., 2012, 2014).This reduction can be explained by a reduction by 17% (Table 3, -4% minus 13%) of native soil mineralization and an increase by 50% (Table 3, 59% minus 9%) of EOM stability following digestion. In relative terms, changes in priming effects contributed for a quarter in C sequestration increase after digested maize addition in comparison with undigested maize and an increase in EOM stability for three-quarters.

Digested maize addition in soil led to a negative priming effect throughout the experiment (Fig. 3b). Since priming effects are described as interactions between living and dead organic matter (Kuzyakov, 2010), this negative priming effect can be considered as an inhibition of microorganisms activity or their enzymes on SOM mineralization. Two hypotheses may be proposed for this inhibition: the presence of toxic substances in digested EOM, or/and a decrease in SOM bioavailability. Since digested EOM application increased soil total microbial population and activity in comparison with an untreated control (Möller, 2015; Fig. 1a), the potential toxic substances must be specific to the microorganisms involved in native SOM mineralization. However, this hypothesis is unlikely considering the large biodiversity of heterotrophic microorganisms in soils (Nannipieri et al., 2003). As similarly found after biochar application, negative priming effect could be explained via labile SOM and/or extracellular enzymes sorption on digested EOM (Zimmerman et al., 2011) which may decrease SOM bioavailability. Beyond induced SOM negative priming effect, digested EOM and biochar have a similar chemical composition evolution during their treatment with an increased portion of recalcitrant and complex compounds (Wang et al., 2016). Besides the accumulation of recalcitrant organic matter during anaerobic digestion, Gómez et al. (2011) observed that the initial degradation of readily oxidised components is followed by posterior transformation into complex compounds. Tambone et al. (2013) associate these complex compounds with aliphatics, aromatics and phenols which are recognized recalcitrant organic compounds. These complex compounds may have explained both digested organic matter stability and its ability to stabilize native SOM via assumed sorption mechanisms (Ahmad et al., 2014). Processes inducing C sequestration, with a negative priming effect, may be similar after digested organic matter and biochar addition in soil. In order to sequestrate C in soil, EOMs which have been anaerobically or aerobically digested or pyrolyzed are more efficient than fresh organic matter.

4.2. Extrapolating from short-term laboratory incubation to long-term effects in the field

The decomposition of EOM is typically assessed during laboratory incubations, under reproductible controlled conditions (temperature, soil humidity) (Lashermes et al., 2009). In the present experiment, the cumulative total CO_2 productions from controls were 0.10 mg CO_2-C g_{DS} (Table 2), which represent 9% of the initial amount of SOM-C. The yearly soil organic carbon mineralization rate in the field was estimated at 1.5% $year^{-1}$ from an equation depending on soil clay and carbonate contents calibrated for the north of France with an average annual temperature of 10 °C and an annual pluviometry of 750 mm (Rémy and Marin-Laflèche, 1974). In the current experiment, the mineralization rate obtained in the laboratory was similar to about 6 years of organic carbon mineralization in the field.

Data from laboratory C mineralization are extensively extrapolated in models to evaluate the long-term potential soil carbon sequestration (Peltre et al., 2012; Noirot-Cosson et al., 2016). As done by Lashermes et al. (2009), we extrapolated our data according Eqs. 4 and 5 to evaluate the long-term potential EOM stability in the field. These extrapolations (data not shown) suggested that remaining EOMs (Fig. 2) were stable at the end of the experiment. The extrapolation of our estimate of EOMs stability to croplands may not be valid under other climatic zones since soils and climate differ widely.

To the best of our knowledge, no method is available in the literature for extrapolation of priming effects efficiency from the laboratory to the field. Thus, as highlighted by Kuzyakov (2010), priming effects studies (especially for native SOM after the addition of EOMs) are largely conducted under controlled laboratory conditions and there is a need to scale-up in field. However, for both in laboratory and field experiments, positive and negative priming effects on SOM mineralization were observed after labile EOMs (Fontaine et al., 2007; Campbell et al., 1991) and biochar (Wang et al., 2016) addition respectively. Thus, it is reasonable to assume that the induced negative priming after digested-EOM addition could be observed in the field as confirmed by preliminary results for field experiment (unpublished data).

4.3. CO_2 emissions into the atmosphere from anaerobic digestion of biomass and its mineralization in soil

When maize is used as intercropping, soil can be amended either with fresh residues or with anaerobic digestate after being processed for energy production. C balance of the two scenarii depends not only on carbon sequestration but also on CO_2 emissions resulting from energy production and CO_2 emissions after EOM incorporation in soil.

In case of anaerobic digestion of maize, we estimated by methanogenic potential measurements (data not shown) that 64% of the initial biomass was lost as biogas (primarily composed of CH_4 and CO_2) and converted to CO_2 during energy production (Fig. 4). Finally, 36% (100% - 64%) of the initial C amount was added to soil. According to the incubation results (Table 3), digested maize was partly mineralized and its addition in soil induced changes in native SOM mineralization. 37% of digested EOM returned to the atmosphere as CO_2 after respiration (Table 3, 100% - 63%). Consequently, 13% (Fig. 4, 36% × 37%) of the initial biomass was mineralized in soil. In total, 77% (Fig. 4, 64% + 13%) of initial C amount from maize was emitted in the atmosphere after anaerobic digestion and mineralization in soil. After silage incorporation in soil, CO_2 emissions represented 104% of EOM-C

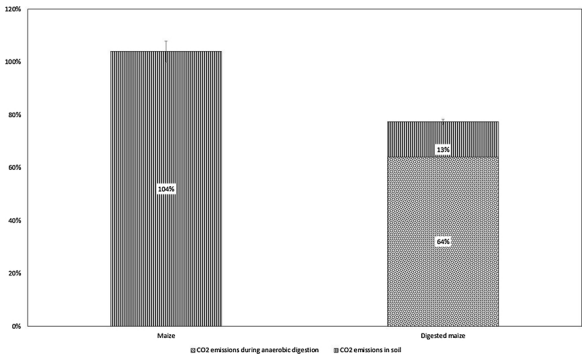


Fig. 4. CO_2 emissions into the atmosphere after maize silage addition in soil or after anaerobic digestion and its addition in soil (base 100 of initial EOM-C amount). Data are mean (n = 4) with standard deviation.

when considering both the stability of EOM in soil and the positive priming effect (Fig. 4, Table 3: 100% - (-4%)). Therefore, the scenario with maize used as a crop energy and its subsequent use as amendment led to carbon sequestration in soil and mitigate CO_2 emissions by 27% (Fig. 4, 104% - 77%) as compared to the incorporation of maize silage.

5. Conclusion

The ^{13}C natural abundance tracer technique, based on the difference in the ^{13}C isotope abundance of C3 and C4 plants, has been used to separate SOM-derived and EOM-derived CO_2 productions from soil in order to measure EOM stability and priming effects. CO_2 productions partitioning with ^{13}C natural abundance tracer technique showed that the fate of EOM in soil depends both on its stability and changes in native SOM mineralization. Sucrose addition led to a net C loss from soil to atmosphere resulting from complete mineralization of sucrose and a positive priming effect that enhanced native SOM respiration. Undigested-EOM addition did not lead to C sequestration due to a low stability of its organic matter and a positive priming effect that enhanced native SOM respiration. Digested-EOM addition in soil led to C sequestration due to inherent stability of EOM and to a negative priming effect which decreased native SOM respiration. According to the literature, the formation of aliphatics, aromatics and phenols compounds in anaerobic digested amendments could explain the enhancement of SOM and EOM stability. We evaluated carbon balance of both direct incorporation of maize silage in soil and anaerobic digestion following by digestate incorporation. Our broad estimation shows that the use of digestate amendment not only favour carbon sequestration but also reduce CO_2 emissions by 27% as compared to the incorporation of maize silage.

Acknowledgments

We thank S Bouillon at the Department of Earth & Environmental Sciences (KU Leuven) and I Moussa at Ecolab (Toulouse, France) for elemental and $\delta^{13}C$ analysis on solids and APESA laboratory for BMP measurements. We thank PlanET Biogastechnik GmbH for providing maize silage and digested maize silage used in this experiment. We thank Djamel ALI-HAIMOUD for the proofreading. This work was supported by the European Regional Development Fund [EASYNOV – ECOINNOV – ENERGY, 2015] and Purpan foundation [Thesis Grant, 2017]. This work benefited from the funding of the Picarro G2201-i by CNRS-INSU [Appel d'offre mi-lourds 2017].

References

Ahmad, M., Rajapaksha, A.U., Lim, J.E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., Vithanage, M., Lee, S.S., Ok, Y.S., 2014. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. Chemosphere 99, 19–33. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.071.

Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Machmüller, A., Hopfner-Sixt, K., Bodiroza, V., Hrbek, R., Friedel, J., Pötsch, E., Wagentristl, H., Schreiner, M., Zollitsch, W., 2007. Methane production through anaerobic digestion of various energy crops grown in sustainable crop rotations. Bioresour. Technol. 98, 3204–3212. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.007.

Bernal, M.P., Kirchmann, H., 1992. Carbon and nitrogen mineralization and ammonia volatilization from fresh, aerobically and anaerobically treated pig manure during incubation with soil. Biol. Fertil. Soils 13, 135–141. https://doi.org/10.1007/BF00336268.

Bertora, C., Alluvione, F., Zavattaro, L., van Groenigen, J.W., Velthof, G., Grignani, C., 2008. Pig slurry treatment modifies slurry composition, N2O, and CO2 emissions after soil incorporation. Soil Biol. Biochem. 40, 1999–2006. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.021.

Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2008. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. Biol. Fertil. Soils 45, 115–131. https://doi.org/10.1007/s00374-008-0334-y.

Blagodatskaya, E.V., Blagodatsky, S.A., Anderson, T.-H., Kuzyakov, Y., 2007. Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies. Appl. Soil Ecol. 37, 95–105. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.05.002.

Blagodatsky, S., Blagodatskaya, E., Yuyukina, T., Kuzyakov, Y., 2010. Model of apparent and real priming effects: linking microbial activity with soil organic matter decomposition. Soil Biol. Biochem. 42, 1275–1283. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.005.

Campbell, C.A., Lafond, G.P., Zentner, R.P., Biederbeck, V.O., 1991. Influence of fertilizer and straw baling on soil organic matter in a thin black chernozem in western Canada. Soil Biol. Biochem. 23, 443–446. https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90007-7.

Cayuela, M.L., Oenema, O., Kuikman, P.J., Bakker, R.R., Van GROENIGEN, J.W., 2010. Bioenergy by-products as soil amendments? Implications for carbon sequestration and greenhouse gas emissions. GCB Bioenergy 2, 201–213. https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01055.x.

Cerri, C., Feller, C., Balesdent, J., Victoria, R., Plenecassagne, A., 1985. Application du traçage isotopique naturel en 13C, à l'étude de la dynamique de la matière organique dans les sols. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences.Série 2. Mécanique 300, 423–428.

Chen, R., Blagodatskaya, E., Senbayram, M., Blagodatsky, S., Myachina, O., Dittert, K., Kuzyakov, Y., 2012. Decomposition of biogas residues in soil and their effects on microbial growth kinetics and enzyme activities. Biomass Bioenergy 45, 221–229. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.014.

Chen, R., Senbayram, M., Blagodatsky, S., Myachina, O., Dittert, K., Lin, X., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2014. Soil C and N availability determine the priming effect: microbial N mining and stoichiometric decomposition theories. Glob. Change Biol. 20, 2356–2367. https://doi.org/10.1111/gcb.12475.

Fontaine, S., Bardoux, G., Abbadie, L., Mariotti, A., 2004. Carbon input to soil may decrease soil carbon content. Ecol. Lett. 7, 314–320. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00579.x.

Fontaine, S., Barot, S., Barré, P., Bdioui, N., Mary, B., Rumpel, C., 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. Nature 450, 277–280. https://doi.org/10.1038/nature06275.

Franzluebbers, A.J., 1999. Microbial activity in response to water-filled pore space of variably eroded southern Piedmont soils. Appl. Soil Ecol. 11, 91–101. https://doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00128-0.

Fuente, C., de la Alburquerque, J.A., Clemente, R., Bernal, M.P., 2013. Soil C and N mineralisation and agricultural value of the products of an anaerobic digestion system. Biol. Fertil. Soils 49, 313–322. https://doi.org/10.1007/s00374-012-0719-9.

Gómez, X., Diaz, M.C., Cooper, M., Blanco, D., Morán, A., Snape, C.E., 2007. Study of biological stabilization processes of cattle and poultry manure by thermogravimetric analysis and 13C NMR. Chemosphere 68, 1889–1897. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.065.

Gómez, X., Blanco, D., Lobato, A., Calleja, A., Martínez-Núñez, F., Martin-Villacorta, J., 2011. Digestion of cattle manure under mesophilic and thermophilic conditions: characterization of organic matter applying thermal analysis and 1H NMR. Biodegradation 22, 623–635. https://doi.org/10.1007/s10532-010-9436-y.

IPCC, Core Writing Team, Pachauri, R.K., Meyer, L.A., 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland.

Johansen, A., Carter, M.S., Jensen, E.S., Hauggard-Nielsen, H., Ambus, P., 2013. Effects of digestate from anaerobically digested cattle slurry and plant materials on soil microbial community and emission of CO2 and N2O. Appl. Soil Ecol. 63, 36–44. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.09.003.

Keeling, C.D., 1958. The concentration and isotopic abundances of atmospheric carbon dioxide in rural areas. Geochim. Cosmochim. Acta 13, 322–334. https://doi.org/10.1016/0016-7037(58)90033-4.

Kirchmann, H., Bernal, M.P., 1997. Organic waste treatment and C stabilization efficiency. Soil Biol. Biochem. 29, 1747–1753. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00065-5.

Kuzyakov, Y., 2006. Sources of CO2 efflux from soil and review of partitioning methods. Soil Biol. Biochem. 38, 425–448. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.08.020.

Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: interactions between living and dead organic matter. Soil Biol. Biochem. 42, 1363–1371. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.003.

Kuzyakov, Y., Bol, R., 2005. Three sources of CO2 efflux from soil partitioned by 13C natural abundance in an incubation study. Rapid Commun. Mass Spectrom. 19, 1417–1423. https://doi.org/10.1002/rcm.1938.

Kuzyakov, Y., Bol, R., 2006. Sources and Mechanisms of Priming Effect Induced in Two Grassland Soils Amended with Slurry and Sugar. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.025.

Kuzyakov, Y., Friedel, J.K., Stahr, K., 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. Soil Biol. Biochem. 32, 1485–1498. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00084-5.

Lal, R., 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. Science 304, 1623–1627. https://doi.org/10.1126/science.1097396.

Lashermes, G., Nicolardot, B., Parnaudeau, V., Thuriès, L., Chaussod, R., Guillotin, M.L., Linères, M., Mary, B., Metzger, L., Morvan, T., Tricaud, A., Villette, C., Houot, S., 2009. Indicator of potential residual carbon in soils after exogenous organic matter application. Eur. J. Soil Sci. 60, 297–310. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01110.x.

Marcato, C.-E., Mohtar, R., Revel, J.-C., Pouech, P., Hafidi, M., Guiresse, M., 2009. Impact of anaerobic digestion on organic matter quality in pig slurry. Int. Biodeterior. Biodegradation 63, 260–266. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.10.001.

Midwood, A.J., Millard, P., 2011. Challenges in measuring the δ13C of the soil surface CO2 efflux. Rapid Commun. Mass Spectrom. 25, 232–242. https://doi.org/10.1002/rcm.4857.

Minasny, B., Malone, B.P., McBratney, A.B., Angers, D.A., Arrouays, D., Chambers, A., Chaplot, V., Chen, Z.-S., Cheng, K., Das, B.S., Field, D.J., Gimona, A., Hedley, C.B., Hong, S.Y., Mandal, B., Marchant, B.P., Martin, M., McConkey, B.G., Mulder, V.L., O'Rourke, S., Richer-de-Forges, A.C., Odeh, I., Padarian, J., Paustian, K., Pan, G.,

Poggio, L., Savin, I., Stolbovoy, V., Stockmann, U., Sulaeman, Y., Tsui, C.-C., Vågen, T.-G., van Wesemael, B., Winowiecki, L., 2017. Soil carbon 4 per mille. Geoderma 292, 59–86. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.01.002.

Möller, K., 2015. Effects of anaerobic digestion on soil carbon and nitrogen turnover, N emissions, and soil biological activity. A review. Agron. Sustain. Dev. 35, 1021–1041. https://doi.org/10.1007/s13593-015-0284-3.

Möller, K., Müller, T., 2012. Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: a review. Eng. Life Sci. 12, 242–257. https://doi.org/10.1002/elsc.201100085.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. Eur. J. Soil Sci. 54, 655–670. https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x.

Nottingham, A.T., Griffiths, H., Chamberlain, P.M., Stott, A.W., Tanner, E.V.J., 2009. Soil priming by sugar and leaf-litter substrates: a link to microbial groups. Appl. Soil Ecol. 42, 183–190. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.03.003.

O'Leary, M.H., 1981. Carbon isotope fractionation in plants. Phytochemistry 20, 553–567. https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85134-5.

Peltre, C., Thuriès, L., Barthès, B., Brunet, D., Morvan, T., Nicolardot, B., Parnaudeau, V., Houot, S., 2011. Near infrared reflectance spectroscopy: a tool to characterize the composition of different types of exogenous organic matter and their behaviour in soil. Soil Biol. Biochem. 43, 197–205. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.036.

Pognani, M., D'Imporzano, G., Scaglia, B., Adani, F., 2009. Substituting energy crops with organic fraction of municipal solid waste for biogas production at farm level: a full-scale plant study. Process. Biochem. 44, 817–821. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.03.014.

Rémy, J.C., Marin-Laflèche, A., 1974. Analyse de terre: Realisation d'un programme d'interpretation automatique. Annales agronomiques 25, 607–632.

Rottmann, N., Dyckmans, J., Joergensen, R.G., 2010. Microbial use and decomposition of maize leaf straw incubated in packed soil columns at different depths. Eur. J. Soil Biol. 46, 27–33. https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2009.09.004.

Scarlat, N., Dallemand, J.-F., Fahl, F., 2018. Biogas: developments and perspectives in Europe. Renew. Energy 129, 457–472. https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.006.

Schouten, S., van Groenigen, J.W., Oenema, O., Cayuela, M.L., 2012. Bioenergy from cattle manure? Implications of anaerobic digestion and subsequent pyrolysis for carbon and nitrogen dynamics in soil. Glob. Change Biol. Bioenergy 4, 751–760. https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2012.01163.x.

Stemmer, M., Lützow, M.V., Kandeler, E., Pichlmayer, F., Gerzabek, M.H., 1999. The effect of maize straw placement on mineralization of C and N in soil particle size fractions. Eur. J. Soil Sci. 50, 73–85. https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.1999.00204.x.

Stockmann, U., Adams, M.A., Crawford, J.W., Field, D.J., Henakaarchchi, N., Jenkins, M., Minasny, B., Mcbratney, A.B., Courcelles, V.D.R.D., Singh, K., Wheeler, I., Abbott, L., Angers, D.A., Baldock, J., Bird, M., Brookes, P.C., Chenu, C., Jastrow, J.D., Lal, R., Lehmann, J., O'Donnell, T., Parton, W.J., Whitehead, D., Zimmermann, M., 2013. The knowns, known unknowns and unknowns of sequestration of soil organic carbon. Agric. Ecosyst. Environ. 164, 80–99. https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.10.001.

Stumpe, B., Werner, S., Jung, R., Heinze, S., Jüschke, E., Strippel, C., Marschner, B., 2012. Organic carbon dynamics and enzyme activities in agricultural soils amended with biogas slurry, liquid manure and sewage sludge. J. Environ. Qual. Abstr. – Org. Comp. Environ. 2012. https://doi.org/10.4236/as.2012.31014.

Tambone, F., Scaglia, B., D'Imporzano, G., Schievano, A., Orzi, V., Salati, S., Adani, F., 2010. Assessing amendment and fertilizing properties of digestates from anaerobic digestion through a comparative study with digested sludge and compost. Chemosphere 81, 577–583. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.034.

Tambone, F., Adani, F., Gigliotti, G., Volpe, D., Fabbri, C., Provenzano, M.R., 2013. Organic matter characterization during the anaerobic digestion of different biomasses by means of CPMAS 13C NMR spectroscopy. Biomass Bioenergy 48, 111–120. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.11.006.

Thomsen, I.K., Olesen, J.E., Møller, H.B., Sørensen, P., Christensen, B.T., 2013. Carbon dynamics and retention in soil after anaerobic digestion of dairy cattle feed and faeces. Soil Biol. Biochem. 58, 82–87. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.006.

Wang, J., Xiong, Z., Kuzyakov, Y., 2016. Biochar stability in soil: meta-analysis of decomposition and priming effects. GCB Bioenergy 8, 512–523. https://doi.org/10.1111/gcbb.12266.

Zimmerman, A.R., Gao, B., Ahn, M.-Y., 2011. Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. Soil Biol. Biochem. 43, 1169–1179. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.02.005.

4.3. Les résultats de l'incubation n°2 sont-ils particuliers ou généralisables ? Quelles sont les conséquences des apports en produits organiques sur les concentrations en C, N et P de la phase liquide des sols ?

4.3.1. Introduction

Deux incubations supplémentaires en conditions contrôlées ont été mises en place afin de déterminer si les résultats observés lors de l'incubation n°2 (présentés dans le paragraphe précédent) sont généralisables pour le digestat Wagner et/ou pour le Luvisol du Tarn.

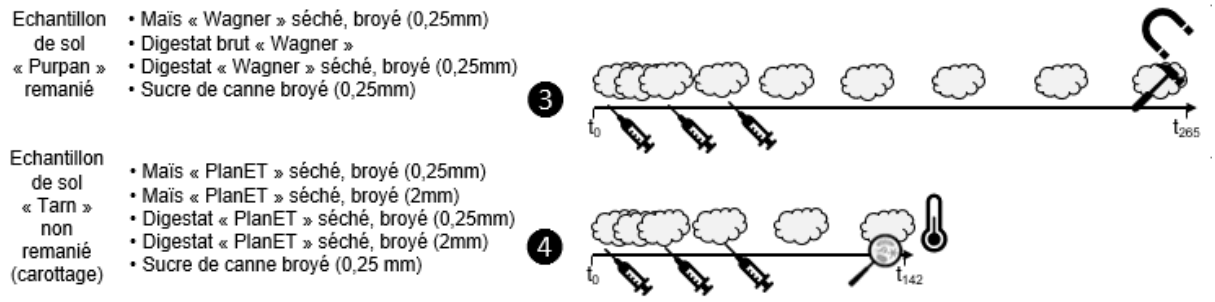


Figure 36 : Plan d'expériences des incubations n°3 et 4

- L'incubation n°3 a pour objectif de tester la reproductibilité des résultats de l'incubation n°2 avec le même sol mais avec les produits organiques avant et après digestion issus du digesteur à la ferme de la société Wagner GmbH malgré son $\delta^{13}C$ intermédiaire entre les plantes en C3 et C4 (Tableau 8).

- L'incubation n°4 a pour objectif de tester la reproductibilité des résultats de l'incubation n°2 (Béghin-Tanneau *et al.*, 2019) avec les même maïs et digestat de la société PlanET GmbH mais avec un échantillon non remanié de l'horizon de surface du Luvisol prélevé à proximité du Tarn (sol Tarn). L'absence de remaniement (tamisage) des échantillons de sol permet de conserver leur structure est ainsi de se rapprocher des conditions en champs.
    - Deux finesses de broyage (0,25 et 2 mm) du maïs et du digestat ont été ont été testées afin d'évaluer l'influence de la granulométrie sur la biodégradation des produits organiques.

Lors de ces deux incubations, des échantillons de la phase liquide des sols ont été prélevés afin de suivre l'évolution des teneurs en C, N et P après avoir apporté les produits organiques.

La conception expérimentale est identique aux incubations précédentes avec l'utilisation de la différence du $\delta^{13}C$ entre les produits organiques apportés et les matières organiques endogènes afin de tracer l'origine des productions de CO_2. Les mesures de la production de CO_2 sont réalisés avec le même appareil (CRDS; Picarro G2201-i Analyseur équipé d'une pompe externe étanche). L'humidité des sols progressivement ajustée (sur deux jours) puis maintenue à un taux de remplissage des pores compris entre 55 à 65%.

Pour l'incubation n°3, 5,3±0,5 $mgC.g_{sol\ sec}^{-1}$ de produits organiques ont été apportés. Les échantillons de produits organiques et de sol secs ont été intégralement mélangés. Les échantillons de sol « Purpan », remaniés, proviennent de la parcelle utilisée pour l'incubation au champ.

Pour l'incubation n°4, les apports en produits organiques ont été réalisés à hauteur de : 1,9 ± 0,4 $mgC.g_{sol\ sec}^{-1}$. La quantité de produits organiques apportés a été diminuée car lors des incubation n°1 et n°2, les produits organiques ont été mélangés avec l'intégralité des échantillons de sol remaniés et dans le cadre de cette expérience (incubation n°3) les échantillons de sol sont issus d'un prélèvement par carottage et les produits organiques sont incorporés sur le 3 premiers centimètres sur une hauteur totale d'environ 7 cm. Les apports en produits organiques pour l'incubation n°4 représentent une concentration de 4,4 $mgC.g_{sol\ sec}^{-1}$ sur les 3 premiers centimètres.

4.3.2. Résultats

4.3.2.1. Analyse des productions de CO_2 pour l'incubations n°3

L'humidification des sols de la modalité « témoin » a été suivie d'un pic de production de CO_2 (2,02 $\mu gCO_2\text{-}C.g_{sol}^{-1}.h^{-1}$, Figure 37a) associée à la déstabilisation des matières organiques lors de leur préparation (tamisage et séchage) et de l'humidification (Fuente *et al.*, 2013; Arias-Navarro *et al.*, 2017). La forte production initiale de CO_2 a rapidement diminué pour atteindre 0,37 $\mu gCO_2\text{-}C.g_{sol}^{-1}.h^{-1}$ lors du 23ème jour d'incubation. A partir du 23ème jour d'incubation, la production de CO_2 a faiblement diminué de manière linéaire jusqu'à atteindre 0,12 $\mu gCO_2\text{-}C.g_{sol}^{-1}.h^{-1}$ à la fin de l'incubation (265ème jours). Les apports de maïs, des digestats, ou du sucre puis l'humidification des sols ont induit une augmentation importante de la production de CO_2 par rapport aux témoins (Figure 37a). Le pic de production de CO_2 est atteint dès la première mesure réalisée, 18 heures après l'humidification des sols, pour les modalités : digestat Wagner séché et digestat Wagner brut ; et dès le 2ème jour pour la modalité maïs. Le pic de production de CO_2 de la modalité sucre a été atteint lors du 7ème jour de l'incubation. Les pics de production de CO_2 sont : 0, 1,9 et 6,7 et 11 fois plus importants que le pic de production des témoins, respectivement pour les modalités digestat brut, digestat

séché, maïs et sucre. Les productions de CO_2 ont ensuite rapidement diminué pour atteindre un niveau équivalent à celui des sols témoins entre 40 à 114 jours après le début de l'incubation en fonction des modalités. Les productions de CO_2 pour l'ensemble des modalités ont ensuite diminué de manière identique à celles des témoins jusqu'à atteindre leurs niveaux minimums à la fin de l'incubation (265 jours).

Durant l'expérience, la signature isotopique moyenne du CO_2 produit par les sols témoins a été de -25,42‰ avec un écart type moyen de 0,96‰ (Figure 37b). Cette valeur est proche de celle mesurée sur des échantillons de sol par spectroscopie de masse (-26,1‰, Tableau 6). L'apport de maïs et de sucre a entrainé une hausse du ratio isotopique du CO_2 produit par rapport au Témoin (Figure 37b). Les valeurs maximums ont été atteintes entre le 2ème et le 7ème jour de l'incubation avec un $\delta^{13}C\text{-}CO_2$ moyen de -13,4‰ et de 12,8‰ respectivement pour le maïs et le sucre. Ces valeurs traduisent une forte décomposition des matières organiques du maïs et du sucre ayant un ratio $\delta^{13}C$ de -12,2‰ et de -11,9‰ respectivement (Tableau 7). Les ratios isotopiques du CO_2 produit par les modalités maïs et sucre ont ensuite diminué linéairement jusqu'à atteindre un niveau statistiquement égal à celui des témoins à la fin de l'incubation (263ème jour). L'apport de digestat séché a entrainé une augmentation modérée mais persistante du $\delta^{13}C\text{-}CO_2$ par rapport aux témoins d'environ 3,5‰ (Figure 37b). Lors des 7 premiers jours de l'incubation, le $\delta^{13}C\text{-}CO_2$ de la modalité digestat séché est de -21,3‰ (Figure 37b). Celle valeur est statistiquement identique au $\delta^{13}C$ des matières organiques du digestat Wagner mesuré par spectroscopie de masse (Tableau 8) mettant en évidence que l'intégralité du CO_2 émis provient de sa biodégradation (Figure 37c). Les $\delta^{13}C\text{-}CO_2$ de la modalité digestat et témoins sont statistiquement identiques lors de la dernière mesure de l'incubation (263ème jours). Pour la modalité digestat brut, le $\delta^{13}C\text{-}CO_2$ mesuré est en moyenne de -17,8‰. Cette valeur est significativement inférieure à celle du $\delta^{13}C$ des matières organiques du digestat Wagner. Le constructeur (Picarro) précise que certains composés volatils dont notamment : l'ammoniac, l'éthane, l'éthylène ou des composés soufrés, peuvent interférer avec les mesures de l'analyseur G2201-i. La synthèse d'ammoniaque lors de la digestion anaérobie des matières organiques, mise en évidence dans le cadre de cette étude par l'analyse des digestats (Tableau 7), induit des émissions d'ammoniac lorsque le digestat est appliqué au sol (Whelan *et al.*, 2010). Les émissions d'ammoniac à la suite de l'apport en digestat brut ont probablement interféré avec les mesures du $\delta^{13}C\text{-}CO_2$ durant la première semaine. La perturbation du signal par l'ammoniac est privilégiée puisque lors de la digestion anaérobie, les composés organiques volatils sont biodégradés. Monard *et al.* (2019) ont observé que la digestion anaérobie diminue les émissions de DMS et de méthanol et n'augmente pas les émissions d'acétone, de 2-pentanone et de phénol.

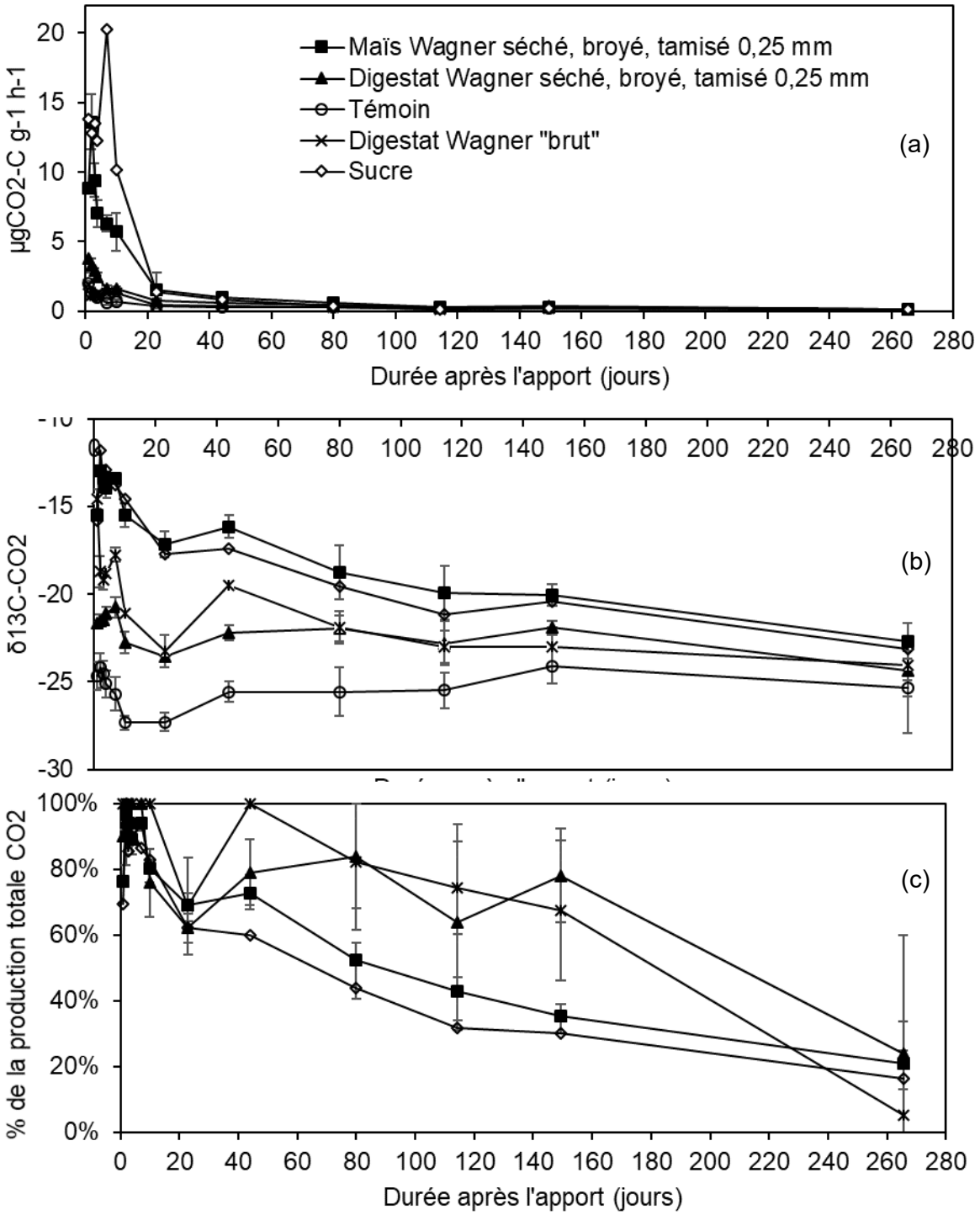


Figure 37 : Incubation n°3 (a) Cinétique de la production totale en CO_2 (μCO_2-C.g^{-1}.h^{-1}). (b) Signature isotopique du CO_2 émis par les sols amendés et témoins. (c) Proportion de la production totale de CO_2 issue de la minéralisation des produits apportés. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types.

Le cumul des productions de CO_2 attribuées à la décomposition des matières organiques apportées permet d'évaluer le taux de biodégradation du sucre, du maïs, du digestat et du digestat brut à 85%, 78%, 37% et à 28% respectivement à l'issue de l'incubation (Figure 38).

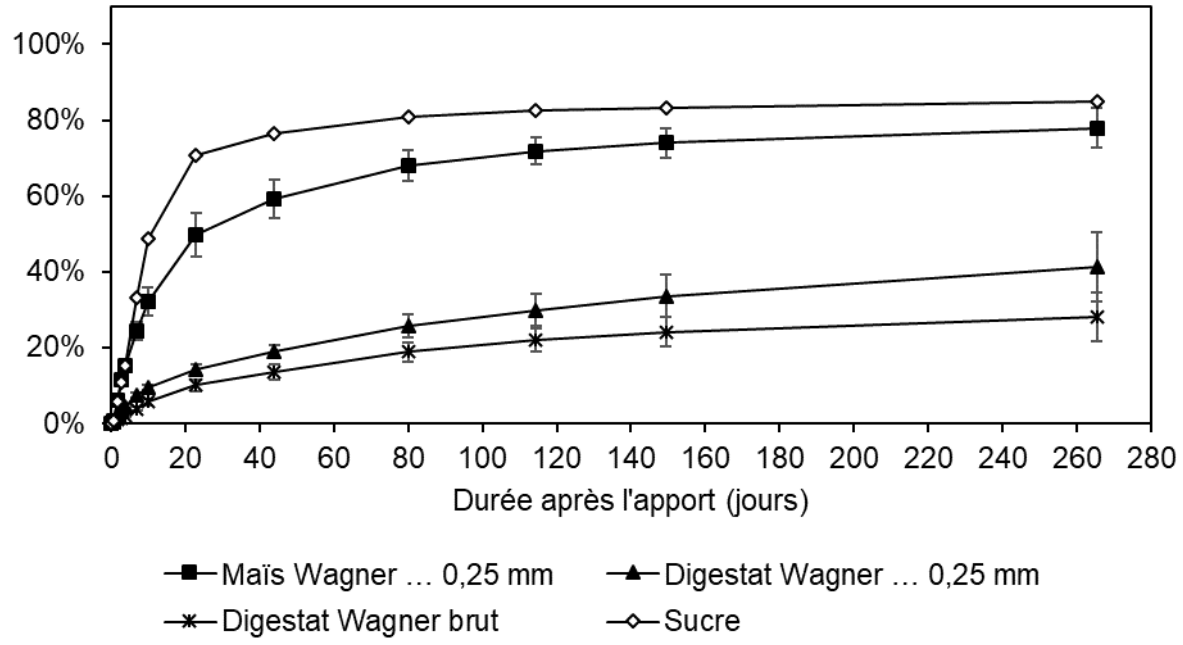


Figure 38 : Stabilité des produits organiques apportés (Incubation n°3). Production cumulée de CO_2-C attribuée à la minéralisation du produit organique apporté en pourcentage de la quantité de carbone apportée. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types.

L'apport de maïs ou de digestat ont entrainé des modifications de la décomposition des matières organiques endogènes des sols (Figure 39a). Dès le 2ème jour après l'apport de maïs, la décomposition des matières organiques endogènes a diminué durant 5 jours (Figure 39a). Entre le 10ème et le 23ème jours la décomposition des matières organiques endogènes des modalités maïs ont ensuite augmenté par rapport aux sols témoins (Figure 39a). Les effets « priming » négatif puis positifs se sont compensés comme en témoigne la production de CO_2 cumulée associée aux effets « priming » (Figure 39b). L'apport de digestat a entrainé un effet « priming » négatif intense dès le premier jour de l'incubation de -1,65 $\mu gCO_2\text{-}C.g^{-1}.h^{-1}$ (Figure 39a). Cet effet « priming » négatif correspond à une diminution de plus de 80% de la décomposition des matières organiques endogènes des sols par rapport aux témoins (Figure 39a). L'effet « priming » négatif à la suite de l'apport en digestat s'est ensuite fortement réduit à partir du 10ème jour (Figure 39a) puis s'est maintenu à un faible niveau jusqu'à la fin de l'incubation. L'effet « priming » négatif associé à l'apport de digestat a diminué de la décomposition de matières organiques endogènes de 0,80 $mgC.g_{solsec}^{-1}$ sur la durée de l'incubation (Figure 39b). Cet effet priming « négatif » correspond à une diminution de 95% de la décomposition des matières organiques endogènes durant l'incubation.

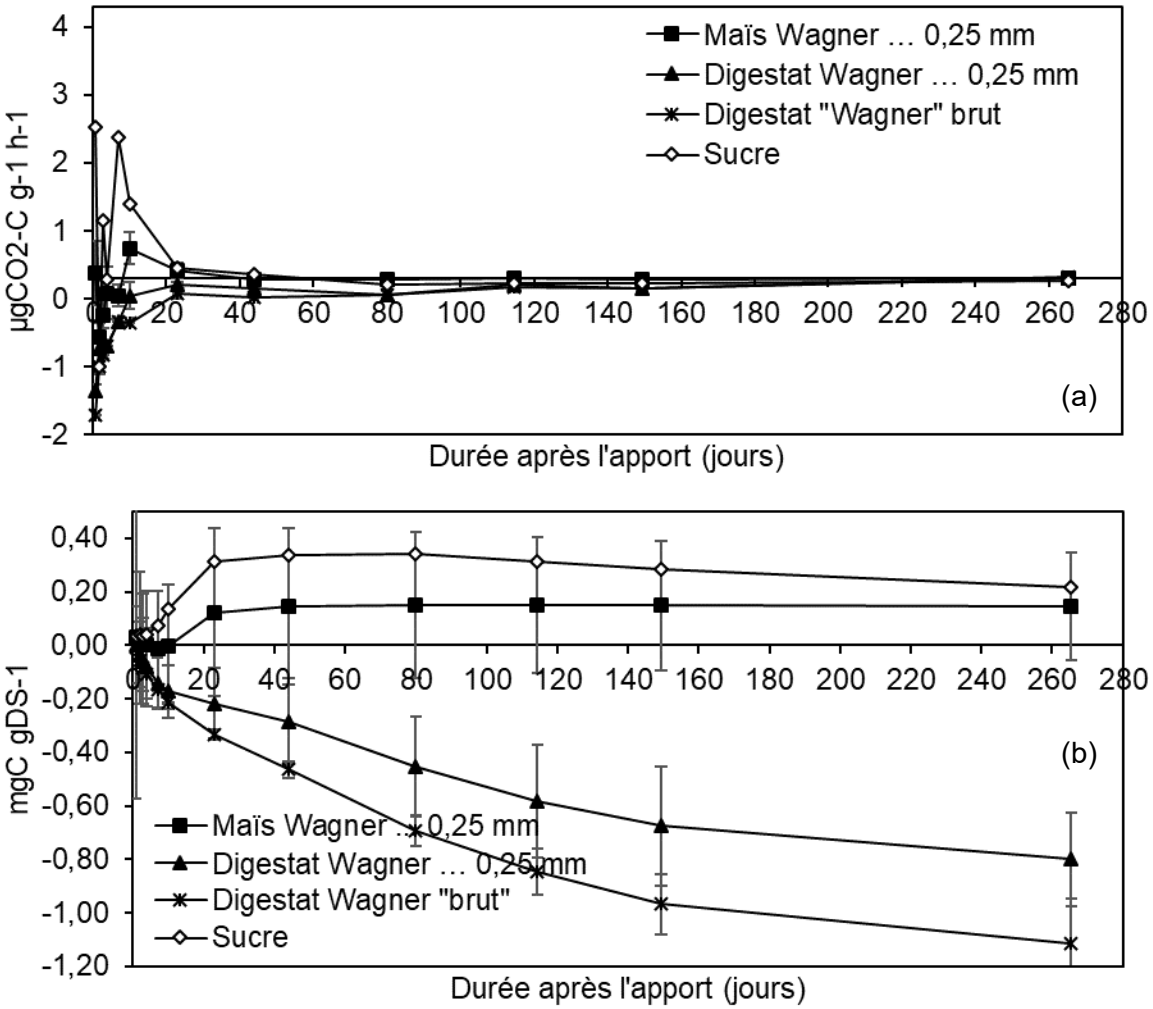


Figure 39 : Effets « priming » pour l'incubation n°3 (a) Production de CO_2-C associée aux effets « priming » (µg CO_2-C.$g_{sol\ sec}^{-1}.h^{-1}$). (b) Production de CO_2-C cumulée associée aux effet « priming » (mgC.$g_{sol\ sec}^{-1}$) pour le maïs ensilage et le digestat. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types.

Les résultats de l'incubation n°3 sont similaires à ceux observés lors de l'incubation n°2 avec notamment : une plus grande stabilité des matières organiques du digestat par rapport au maïs (Figure 38) et un effet « priming » négatif induit par l'apport de digestat (Figure 39).

4.3.2.2. Evolution des concentrations en C, N et P dans les solutions de sol

La concentration en C_{total} en solution dans les sols de la modalité Témoin diminue progressivement durant l'incubation passant de 112 mg.l^{-1} moins de 24h après l'incubation à 65 mg.l^{-1} lors du dernier prélèvement (Figure 40a). La différence de concentration entre le premier et le dernier prélèvement est statistiquement significative (donnée non montrée). Avec une humidité massique de 29%, la quantité totale de C_{total} en solution dans les sols incubés de la modalité Témoin est évaluée à 16800 mg C_{total} par pot. La quantité de C_{total} prélevé par les Rhizons durant l'expérience est évaluée 3,8 mg C_{total} par pot. Le taux de prélèvement est négligeable (0,02%) par rapport à la quantité initiale de C_{total} en solution. Le prélèvement de la solution des sols a probablement eu des effets négligeables sur l'évolution des concentrations en C_{total}.

La concentration en C_{total} en solution dans les sols de la modalité Sucre est plus de 200 fois supérieure à celle de la modalité Témoin moins de 24h après son apport. Cette forte concentration (23 700 mg.l^{-1}) est attribuée à la solubilité du sucre dans l'eau. Les concentrations en C_{total} en solution pour les modalités : Maïs, Digestat et Digestat brut sont respectivement 27, 6, et 4 fois plus importantes par rapport à la modalité Témoin, moins de 24h apprès l'apport en produits organiques. En faisant l'hypothèse que l'intégralité du sucre est solubilisée, la proportion de matières organiques solubles dans les sols est évaluée à 13%, 3% et 2% de la quantité de maïs, de digestat et de digestat brut apportés respectivement. Les concentrations en C_{total} ont diminuées de manière exponentielle durant l'incubation. Lors du dernier prélèvement (43ème jours après l'apport), les concentrations en C_{total} ne sont pas statistiquement différentes pour les modalités Témoin, Digestat, Digestat brut et Maïs. En revanche, la concentration en C_{total} de la modalité Sucre (177 mg.l^{-1}) est statistiquement différente des autres modalités.

Les concentrations en N_{total} pour les différentes modalités incubées sont pas statistiquement différentes lors du 1er prélèvement, 19 heures après le début de l'incubation (Figure 40b). Pour les modalités Témoin, Digestat et Digestat brut, la concentration en N_{total} dans la solution du sol augmente progressivement durant l'incubation. Lors du dernier prélèvement (43ème jours d'incubation), les concentrations en N_{total} sont statistiquement identiques pour les modalités Témoin et Digestat. En revanche, la concentration en N_{total} de la modalité Digestat brut est plus de 3 fois supérieure à celle de la modalité Témoin. Cette différence est statistiquement significative. Pour la modalité Maïs, les concentrations en N_{total} sont élevées lors du premier prélèvement puis diminuent fortement ; passant de 299 à 46 mg.l^{-1} trois jours après le début de l'incubation. Les concentrations en N_{total} restent faibles pour la modalité Maïs durant l'incubation. Lors du dernier prélèvement, la concentration en N_{total} de la

modalité Maïs (50 mg.l^{-1}) est statistiquement plus faible que celle de la modalité Témoin (181 mg.l^{-1}). Pour la modalité Sucre, la concentration en N_{total} est initialement importante puis diminue progressivement durant les 25 premiers jours de l'incubation ; passant de 298 à 118 mg.l^{-1}. Les diminutions des concentrations en N_{total} dans la phase liquide sont associées à l'immobilisation de l'N en raison de la forte activité biologique provoquée par la biodégradation du Sucre et des matières organiques du Maïs. Lors du dernier prélèvement, la concentration en N_{total} a augmenté par rapport aux prélèvements précédents atteignant un niveau équivalent à celui du début de l'incubation (339 mg l^{-1}). Cette augmentation est associée à la mort et à la biodégradation des micro-organismes à croissance rapide en raison de l'épuisement du stock de Sucre apporté dans le sol ; libérant ainsi l'N immobilisé.

Lors du 1er prélèvement, les concentrations en P_{total} sont relativement faibles et ne sont pas statistiquement différentes pour les modalités Témoin et Digestat Brut (1940 et 3208 µg.l^{-1}, Figure 40c). Lors du 1er prélèvement, les concentrations moyennes en P_{total} des modalités Digestat et Maïs sont respectivement 9 et 8 fois plus importantes (18 179 et 15 612 µg.l^{-1} respectivement) que celle de la modalité Témoin. La concentration moyenne en P_{total} pour la modalité Témoin reste constante (statistiquement non différente) durant l'incubation. La concentration moyenne en P_{total} pour la modalité Maïs diminue rapidement entre le 1er et le 4ème jour de l'incubation jusqu'à atteindre une concentration proche et statistiquement identique à celle de la modalité Témoin. La concentration moyenne en P_{total} pour la modalité Digestat diminue également jusqu'à devenir statistiquement identique ($P < 0,07$) à celle de la modalité Témoin après le 10ème jour d'incubation. La concentration en P_{total} de la modalité Digestat brut reste statistiquement constante durant l'incubation. Les quantités de solution prélevées ont été insuffisantes pour réaliser l'analyse de la concentration du P_{total} au début de l'incubation pour la modalité Sucre. Les concentrations mesurées lors de deux derniers prélèvements ne mettent pas en évidence de différences significative avec la modalité Témoin.

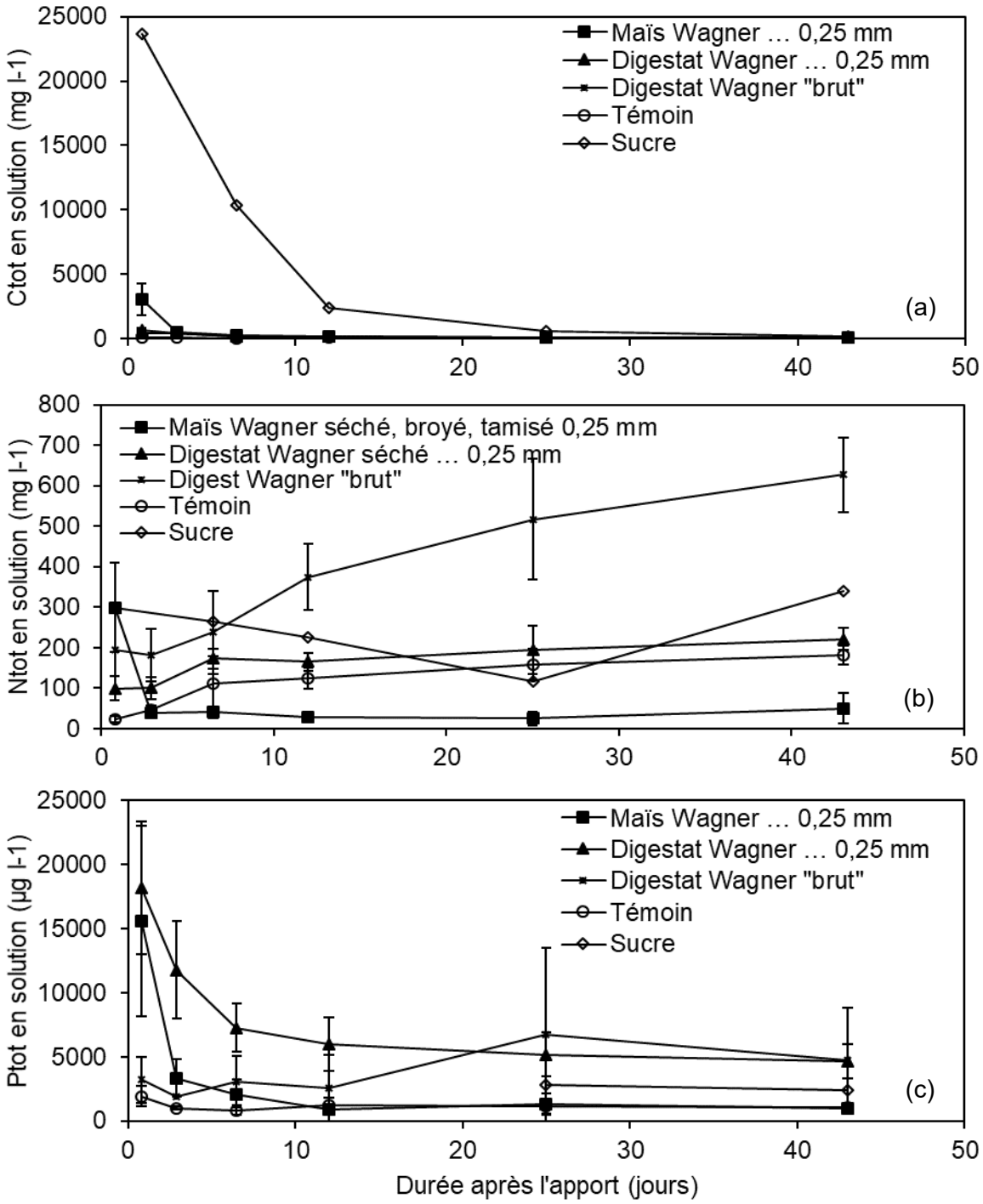


Figure 40 : Evolution des concentrations en C total (a), en N total (b), en P total (c) dans les solutions des sols incubés, prélevées à l'aide de rhizons lors de l'incubation n°3. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types.

4.3.2.1. Analyse des productions de CO_2 pour l'incubation n°4

La Figure 41a présente l'évolution de la production en CO_2 des différentes modalités incubées. L'humidification des sols témoins de la modalité Témoin a été suivie d'un faible pic de production de CO_2 contrairement aux incubations n°2 et 3. Pour l'incubation n°4, la production de CO_2 pour la modalité Témoin lors des 24 premières heures de l'incubation est 1,4 fois supérieure à la production de CO_2 lors du 140ème jours d'incubation (Figure 41a) alors que pour l'incubation n°3, la production de CO_2 lors des premières 24h est 9 fois supérieure à celle après 140 jours d'incubation (Figure 37a). Ce faible pic de production est associé à la faible déstabilisation des matières organiques lors du prélèvement des échantillons de sol par carottage (Arias-Navarro *et al.*, 2017).

Les apports en maïs, en digestat, ou en sucre puis l'humidification des sols ont induit une augmentation importante de la production de CO_2 par rapport aux témoins (Figure 41a). Le pic de production de CO_2 est atteint dès la 2nd mesure réalisée 43 heures après l'humidification des sols pour la modalité Sucre ; et dès le 4ème jour pour les modalités Maïs et Digestats. Les productions de CO_2 sont très similaires pour les différentes granulométries testées : 0,25 et 2 mm. Les pics de production de CO_2 représentent 4,2, 4,6, 9,8, 12,4 et 26,0 fois la production moyenne de CO_2 des Témoins respectivement pour les modalités : digestat (0,25mm), digestat (2mm), maïs (0,25mm), maïs (2mm) et sucre. Les productions de CO_2 ont ensuite diminué de manière logarithmique pour atteindre un niveau équivalent à celui des sols témoins entre 40 à 80 jours après le début de l'incubation en fonction des modalités. Les productions de CO_2 pour l'ensemble des modalités ont ensuite faiblement diminué de manière identique que celle des témoins jusqu'à atteindre leurs niveaux minimums à la fin de l'incubation (140 jours).

Durant l'expérience, la signature isotopique moyenne du CO_2 produit par les sols témoins (Figure 41b) a été de -26,2 ‰ avec un écart type moyen de 1,10‰. Cette valeur est identique à celle mesurée sur des échantillons de sol par spectroscopie de masse (-26,1‰, Tableau 12). L'apport du sucre, des maïs et des digestats a entrainé une hausse du $\delta^{13}C$-CO_2 par rapport au Témoin (Figure 41b). Les valeurs maximums ont été atteintes entre le 2ème et le 7ème jour de l'incubation avec un $\delta^{13}C$-CO_2 moyen de -13,0‰, -13,2‰ et -12,3‰ respectivement pour le sucre, les maïs et les digestats. Ces valeurs traduisent une forte décomposition des matières organiques apportées ayant un ratio $\delta^{13}C$ de -11,9‰, -12,2‰ et de -13,9 respectivement (Tableau 7) (Figure 41c). Les ratios isotopiques du CO_2 produit par les modalités amendées diminuent ensuite de manière linéaire jusqu'à atteindre un plateau à partir du 70ème jour d'incubation. Lors de la dernière mesure, les $\delta^{13}C$-CO_2 des sols amendés sont statistiquement différents de celui des sols de la modalité Témoin (-26,6‰) avec des

valeurs de -25,0‰ pour le Sucre, -23,3‰ et -22,9‰ respectivement pour les modalités maïs 0,25 et 2 mm respectivement, -21,2‰ et -21,8‰ respectivement pour les modalités digestat 0,25 et 2 mm respectivement.

Le cumul des productions de CO_2 attribuées à la décomposition des matières organiques apportées permet d'évaluer le taux de biodégradation du sucre, des maïs 0,25 et 2 mm, des digestats 0,25 et 2 mm à 73%, 66%, 37% et à 38% respectivement à l'issue de l'incubation (Figure 42). Les différentes granulométries testées n'ont pas eu d'influence statistiquement significative sur le taux de biodégradation des matières organiques apportées.

La Figure 43 illustre l'évolution des effets « priming » durant l'incubation (a) et le cumul des effets « priming » durant l'incubation (b). L'ajout de sucre a entrainé un effet « priming » positif d'intensité variable (0 à 0,30 $\mu gCO_2\text{-}C.g^{-1}.h^{-1}$) persistant sur la durée de l'incubation ; sauf lors du 4ème jour d'incubation ou un épisode d'effet priming négatif est observé (-0,90 $\mu gCO_2\text{-}C.g^{-1}.h^{-1}$, Figure 43a). A l'issue de l'incubation, le cumul des effets « priming » conduit à une augmentation statistiquement significative de la biodégradation des matières organiques endogènes par rapport au témoin de 0,14 $mgC.g_{sol\ sec}^{-1}$ (Figure 43b). L'ajout de maïs (avec une granulométrie de 0,25 ou de 2 mm) a entrainé un épisode d'effets « priming » négatifs lors des 40 premiers jours de l'incubation puis positifs ensuite (Figure 43a). A l'issue de l'incubation, l'ajout de maïs n'a pas entrainé de modification significative de la biodégradation des matières organique endogènes par rapport au témoin (Figure 43b). L'ajout de digestat (avec une granulométrie de 0,25 et de 2 mm) a entrainé un épisode d'effets « priming » négatifs lors des 60 premiers jours de l'incubation (-0,82 $\mu gCO_2\text{-}C.g^{-1}.h^{-1}$ en moyenne) puis un faible effet priming négatif jusqu'à la fin de l'incubation (-0,17 $\mu gCO_2\text{-}C.g^{-1}.h^{-1}$ en moyenne, Figure 43a) A l'issue de l'incubation, l'ajout de maïs a entrainé un modification significative de la biodégradation des matières organique endogènes par rapport au témoin de -0,31 $mgC.g_{sol\ sec}^{-1}$ (Figure 43b).

Les résultats de l'incubation n°4 sont similaires à ceux observés lors des incubations n°2 et 3 avec notamment : une plus grande stabilité des matières organiques du digestat par rapport au maïs (Figure 42) et un effet « priming » négatif induit par l'apport de digestat (Figure 43). Ces résultats sont similaires pour différents digestats (« PlanET » et « Wagner »), pour différents sols (« Purpan » et « Tarn ») et pour différents modes d'incubation : au champ, en conditions contrôlées avec des échantillons de sols remaniés ou non.

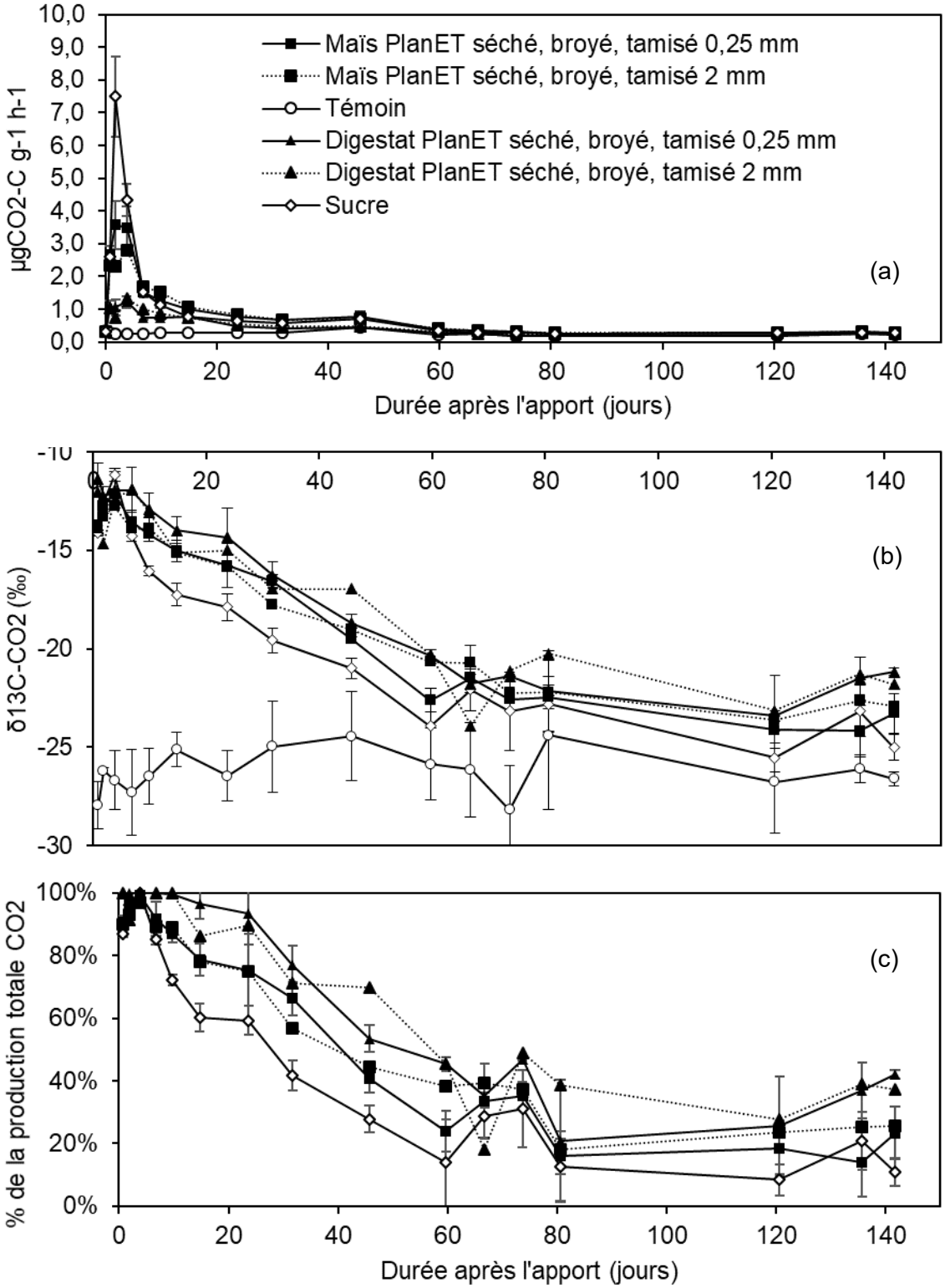


Figure 41 : Incubation n°4 (a) Cinétique de la production totale en CO_2 (μCO_2-C.$g^{-1}h^{-1}$). (b) Signature isotopique du CO2 émis par les sols amendés et témoins. (c) Proportion de la production totale de CO2 issue de la minéralisation des produits apportés. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types.

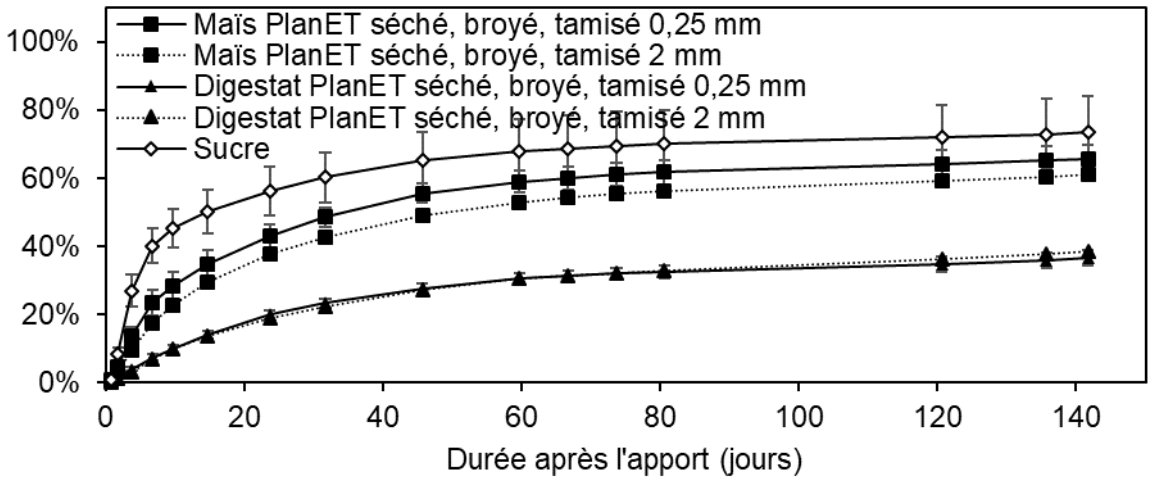


Figure 42 : Stabilité des produits organiques apportés (Incubation n°4). Production cumulée de CO_2-C attribuée à la minéralisation du produit organique apporté en pourcentage de la quantité de carbone apportée. Les valeurs sont moyennées.

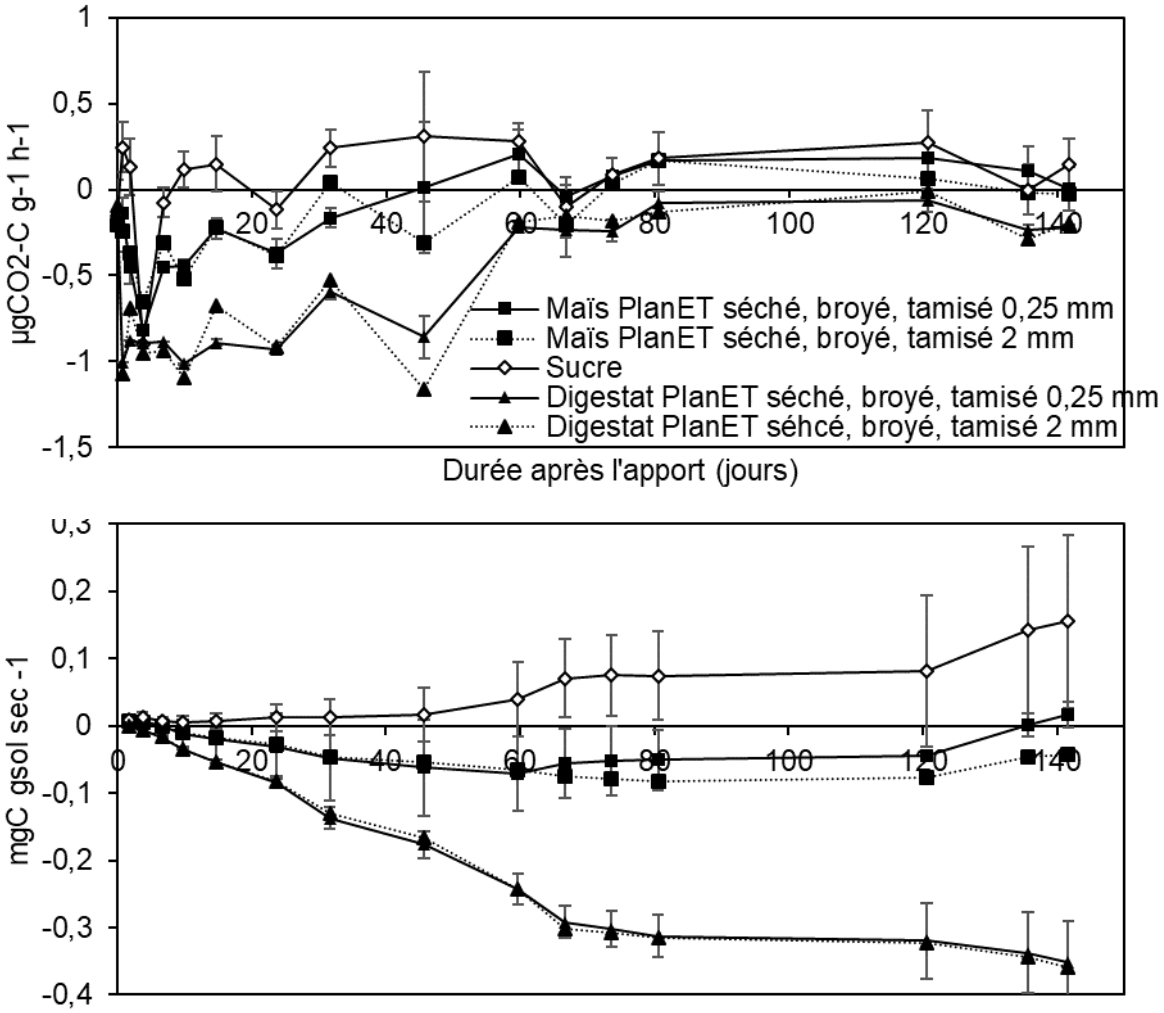


Figure 43 : Effets « priming » pour l'incubation n°4 (a) Production de CO_2-C associée aux effets « priming » (µg CO_2-C.$g_{sol\ sec}^{-1}$.h^{-1}). (b) Production de CO_2-C cumulée associée aux effet « priming » (mgC.$g_{sol\ sec}^{-1}$). Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types.

4.3.2.1. Evolution des concentrations en C total, N total, $N\text{-}NH_4^+$ et $N\text{-}NO_3^-$ dans les solutions de sol prélevées à l'aide de « Rhizons » lors de l'incubation n°4

Les concentrations en C_{total} restent constantes entre le 10ème et le 75ème jours de l'incubation pour les modalités : Témoin, Maïs (0,25 et 2 mm), Digestat (0,25 mm) et Sucre (Figure 44a). Leurs concentrations moyennes pour les 4 prélèvements ne sont pas statistiquement différentes entre les différentes modalités (anova, non montrées) : 59,9 $mgC.l^{-1}$ pour le Témoin, 56,0 et 63,5 $mgC.l^{-1}$ pour les maïs 0,25 et 2 mm respectivement, 67,3 $mgC.l^{-1}$ pour le digestat 0,25 mm et 61,3 $mgC.l^{-1}$ pour le sucre. La concentration moyenne pour les 4 prélèvements de la modalité Digestat 2 mm est statistiquement supérieure (89,9 $mgC.l^{-1}$) aux autres modalités avec notamment une concentration relativement importante lors du 10ème jour d'incubation (144 $mgC.l^{-1}$).

Les concentrations en N_{total} restent constantes entre le 10ème et le 75ème jours de l'incubation pour l'ensemble des modalités (Figure 44b). Les concentrations moyennes pour les 4 prélèvements des modalités Ensilage 0,25 mm (262 $mgN.l^{-1}$), Ensilage 2 mm (258 $mgN.l^{-1}$) et Sucre (224 $mgN.l^{-1}$) sont statistiquement inférieures à la modalité Témoin (451 $mgN.l^{-1}$). Les concentrations moyennes pour les 4 prélèvements des modalités Digestat 0,25 mm (400 $mgN.l^{-1}$) et 2 mm (379 $mgN.l^{-1}$) ne sont pas statistiquement différentes de celle du Témoin.

Les concentrations en $N\text{-}NO_3^-$ dans les solutions prélevées évoluent de manières très similaires aux concentrations en N_{total} (Figure 44c). La relation entre ces deux concentrations sera abordée dans la discussion.

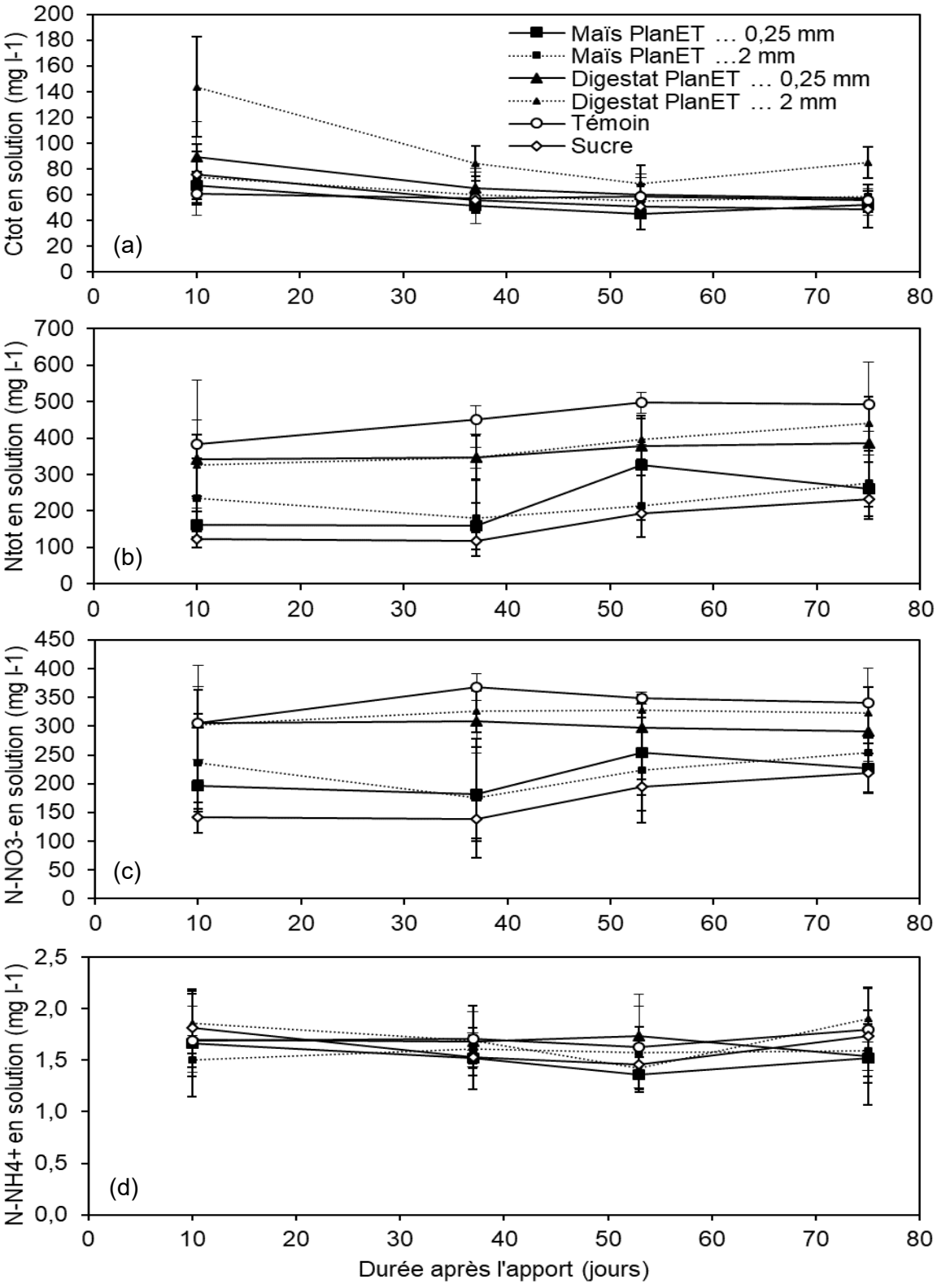


Figure 44 : Evolution des concentrations en C total, N-NO_3^-, NH_4^+ dans les solutions, des sols incubés, prélevées à l'aide de rhizons lors de l'incubation n°4. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types.

4.3.3. Discussion

4.3.3.1. Est-ce que les résultats concernant l'origine du stockage du carbone dans les sols à la suite de l'apport en produits organiques sont généralisables ?

L'incubation n°2, dont les résultats sont repris dans le Tableau 17, a permis de mettre en évidence que le stockage de C induit par l'apport de digestat est plus important que celui induit par l'apport de maïs pour une quantité de C identique apportée au sol. Le stockage de C induit par l'apport du digestat est expliqué par la stabilité des matières organiques apportées au sol (59% du C apporté) et par le ralentissement de la biodégradation des matières organiques endogènes (effet « priming » négatif représentant -4% du C apporté). Au contraire, l'absence de stockage de C induit par l'apport de mais non digéré est expliqué par sa forte labilité (91% du C apporté a été minéralisé) et par l'augmentation de la biodégradation des matières organiques endogènes (effet « priming » positif représentant +13% du C apporté). Dans le cadre de l'incubation n°2, le plus grand stockage de C dans les sols induit par l'apport de digestat en comparaison avec le maïs non digérés permet de compenser l'émission de CO_2 associée à la digestion anaérobie lors de la combustion du biogaz. L'incubation n°2 a mis en évidence que la digestion anaérobie du maïs (avec une minéralisation estimée à 64%) puis l'apport au sol du digestat de maïs permet de réduire les émissions de C dans l'atmosphère de 27% par rapport à un scénario avec un retour au sol direct du maïs.

Comme pour l'incubation n°2, les incubations n°3 et 4 mettent en évidence la plus grande stabilité des matières organiques apportées issues des digestats par rapport à celles issues du maïs (Tableau 17). Comme pour l'incubation n°2, les incubations n°3 et 4 mettent en évidence un effet « priming » négatif induit par l'apport des digestats et un effet « priming » nul à positif induit par l'apport des matières organiques labiles (maïs et sucre, Tableau 17). Ainsi, l'apport de digestat induit un stockage de C dans les sols significativement plus important en comparaison avec l'apport de maïs (Tableau 17). Ces constatations sont généralisables dans les différentes conditions testées : en modifiant l'origine (PlanET ou Wagner, Purpan ou Tarn) et le conditionnement (avec ou sans séchage, finesse de broyage) des produits organiques et des sols. Les valeurs absolues obtenues à la suite des apports en Digestats lors des incubations n°2, 3 et 4 sont très similaires (Tableau 17). Cependant, les valeurs absolues obtenues lors des incubations n°2, 3 et 4 diffèrent fortement pour les produits organiques les plus labiles (maïs et sucre). Plusieurs hypothèses ont été explorées afin d'expliquer les différences des valeurs obtenues pour les modalités les plus labiles (maïs et sucre).

Tableau 17 : Stockage ou déstockage de carbone induit par l'apport de différents produits organiques lors des incubations n°3 et n°4, exprimé en % du Carbone apporté initialement. Les données sont moyennées (n=4) avec l'écart type associé. Les lettres en capitales réfèrent à la comparaison des traitements (au sein d'une même incubation) d'après le test Tukey (P < 0,05). Le (dé)stockage est décomposé en fonction de la stabilité des Matières Organiques (MO) apportées et des effet « priming », qui sont également exprimé en % du Carbone apporté.

Incubation	Modalité	Stabilité des MO apportées (1)	Effets « priming »* (2)	(Dé)Stockage de C dans le sol (3) = (1) - (2)
n°2	Digestat PlanET 0,25 mm	59 ± 1 A	- 4 ± 1 A	+ 63 ± 1 A
	Maïs PlanET 0,25 mm	9 ± 3 B	+ 13 ± 1 B	- 4 ± 4 B
	Sucre	2 ± 2 C	+ 24 ± 2 C	- 22 ± 2 C
n°3	Digestat brut Wagner	68 ± 10 A	- 21 ± 3 A	+ 89 ± 9 A
	Digestat Wagner 0,25 mm	55 ± 10 A	- 15 ± 10 A	+ 70 ± 9 A
	Maïs Wagner 0,25 mm	20 ± 7 B	+ 3 ± 7 B	+ 17 ± 12 B
	Sucre	9 ± absence B	+ 14 ± absence B	- 5 ± absence B
n°4	Digestat PlanET 0,25 mm	62 ± 5 A	- 17 ± 3 A	+ 79 ± 6 A
	Digestat PlanET 2 mm	59 ± 8 A	- 16 ± 2 A	+ 76 ± 7 A
	Maïs PlanET 0,25 mm	30 ± 5 B	+ 1 ± 6 AB	+ 28 ± 8 BC
	Maïs PlanET 2 mm	35 ± 10 B	- 2 ± 6 BC	+ 37 ± 10 B
	Sucre	26 ± 7 B	+ 11 ± 9 C	+ 15 ± 14 C

* + / - : représente respectivement une augmentation ou une diminution de la minéralisation des matières organiques endogènes (effets « priming » positifs ou négatifs).

* + / - : représente respectivement un stockage de C dans le sol ou une perte de C-CO_2 depuis le sol vers l'atmosphère (déstockage)

La forte reproductibilité des résultats obtenus à la suite de l'apport des différents digestats testés lors des incubations permet d'exclure l'hypothèse d'une erreur de mesure ou de calcul et met en évidence la faible incidence des conditions testées (sol « Tarn » ou « Purpan », échantillons de sol remanié ou non remanié) sur le devenir des matières organiques apportées dans les sols.

Un plus grand stockage de C pour des modalités maïs et sucre est observé pour les incubations n°3 et 4 par rapport l'incubation n°2 ; associé à la fois à une plus grande stabilité des matières organiques apportées et à la réduction de l'effet « priming » positif (Tableau 17). Ces résultats peuvent s'expliquer par une faible production de CO_2 par rapport à la quantité de C théoriquement apporté. L'hypothèse qui semble la plus probable afin d'expliquer la faible production de CO_2 par rapport à celle attendue est l'exportation des matières organiques labiles, dissoutes dans l'eau lors des prélèvements via les rhizons. Cette hypothèse n'a toutefois pas pu être pleinement prouvée puisque les sommes des quantités de C extrait via les rhizons sont relativement faibles (données non montrées) : 0,5%, 1,2% et 11% du C apporté initialement respectivement pour les modalités digestat, maïs et sucre lors de l'incubation n°3 et de l'ordre de 0,1% lors de l'incubation n°4. Il est cependant possible qu'une partie de la matières organiques dissoutes ai été minéralisées lors du délai entre le prélèvement et la congélation des échantillons (environ 1h pour l'incubation n°3 et 24h lors de l'incubation n°4).

Les incertitudes associées au bilan de C pour les incubations n°3 et 4 ne permettent pas d'extrapoler les résultats obtenus pour comparer des émissions de CO_2 entre un scénario avec ou sans digestion anaérobie du maïs préalablement à son retour au sol.

4.3.3.2. En quoi l'évolution des concentrations en Ctotal, Ntot, NH_4^+, NO_3^-, et Ptot mesurées donnent des informations sur le devenir des produits organiques apportés et sur leur influence sur la fertilité des sols ?

Les concentrations en Ctotal des solutions des sols issues des prélèvements réalisés lors de l'incubation n°4 sont faibles pour l'ensemble des modalités (66 mg l^{-1}, Figure 44) et constantes ; et non corrélées avec la production de CO_2 des sols (données non montrées). Le long délai entre leur prélèvement et leur congélation (>24h) a probablement été suffisant pour entrainer une minéralisation d'une part importante des matières organiques des solutions. Les concentrations en Ntot dans les solutions de l'incubation n°4 sont plus importantes que celles de l'incubation n°3 pour l'ensemble des modalités. Elles sont environ 2 fois plus importantes que celles de l'incubation n°3 pour les modalités Témoin (données non montrées). Les fortes concentrations en Ntot observées sont associées à la minéralisation des matières organiques

lors du délai entre leur prélèvement et leur congélation. Cette hypothèse est consolidée par la plus faible concentration en Ntot de la modalité Sucre par rapport à la modalité Témoin. L'Ntot des solutions de l'incubation n°4 est en moyenne à 90% sous forme de NO_3^- et à 1% sous forme de NH_4^+.

La Figure 45 présente les corrélations entre les teneurs en Ctotal des solutions des sols prélevés à l'aide des rhizons et les mesures des productions de CO_2 à un même moment lors de l'incubation n°3 ; sur l'ensemble de la gamme de concentration en Ctotal analysée (a) et sur une gamme de concentration en Ctotal inférieure à 5000 mg l^{-1} (b). Il existe une corrélation très forte entre la concentration du Ctotal en solution et la production de CO_2 avec (R^2 = 0,77, Figure 45a) où sans (R^2 = 0,93, Figure 45b) les valeurs extrêmes (> 5 000 mg Ctotal l-1). Ces résultats mettent en évidence la labilité des matières organiques les plus solubles. La biodégradation des matières organiques n'est possible que si une enzyme et un substrat entrent en contact (Calvet *et al.*, 2015). Pour qu'ils entrent en contact il est nécessaire qu'ils soient mobiles, c.à.d en solution dans la phase liquide du sol. Les transformations d'un substrat peuvent être dues aux enzymes endocellulaires et/ou exocellulaires. Dans le premier cas, le substrat doit pénétrer dans le corps microbien par diffusion moléculaire à travers un pore ; ce qui implique qu'il soit en solution et de petite taille (< 600 Da, Lehmann & Kleber, 2015)). Dans le deuxième cas, les enzymes exocellulaires sont en majorité fixées sur les surfaces de la phase solide du sol. Pour que les réactions aient lieu, les molécules de substrat doivent être présentes en solution dans la phase liquide ou absorbées sur les surfaces de la phase solide afin de rencontrer les enzymes extracellulaires. Trinsoutrot *et al.* (2000) ont par exemple montré, lors d'une incubation de 7 jours en laboratoire à 20°C à partir de 47 résidus de végétaux, que la quantité de C minéralisé est presque proportionnelle à la quantité de composés hydrosolubles apportés.

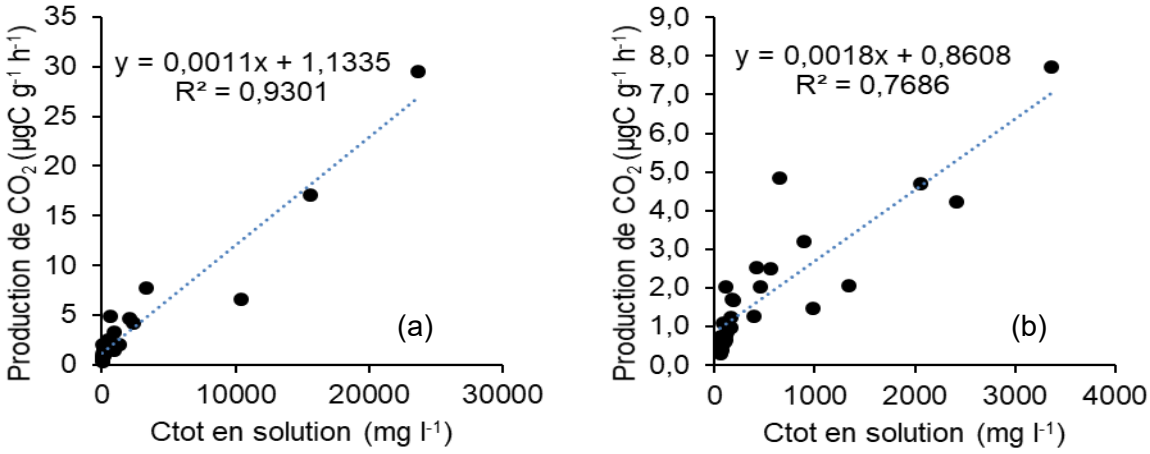


Figure 45 : Incubation n°3 - Corrélation entre les teneurs en Ctotal des solutions prélevées (Rhizon) et la production de CO2 mesurée (Picarro). (a) : Pour l'ensemble des mesures. (b) : Pour des concentrations en Ctotal inférieures à 5000 mg l-1

La Figure 46 présente les corrélations entre les productions cumulées de CO_2 et les teneurs en N_{total} des solutions du sol durant l'incubation n°3 pour l'ensemble des modalités. Pour la modalité Témoin, la production cumulée de CO_2 est fortement corrélée ($R^2 = 0,98$), de manière logarithmique, avec l'augmentation de la concentration en N_{total} en solution dans les sols. Cette corrélation illustre la libération de N_{total} en solution associée à la minéralisation des matières organiques endogènes des sols. L'étanchéité du dispositif ne permet pas de pertes par lessivage et induit une accumulation de N_{total} dans la phase liquide. Les pertes gazeuses d'N par dénitrification sont considérées comme négligeables car les sols ne sont pas saturés en eau lors des incubations (Havlin, 2005). La forme logarithmique de la corrélation pour la modalité Témoin (Figure 46) est associée aux différences de C/N entre les matières organiques fortement labiles et celles peu labiles. Huang *et al.* (2011) ont montré que le C/N des matières organiques augmentent avec leur temps moyen de résidence évalué à partir d'analyses de leurs âges au ^{14}C. Lors de l'incubation, les matières organiques minéralisées sont d'abord celles les plus labiles, ayant un ratio C/N faible entrainant une libération importante d'azote ; puis graduellement les matières organiques minéralisées sont celles les plus récalcitrantes, ayant un C/N plus important, entrainant une libération moindre d'azote. Pour la modalité Digestat 0,25 mm (Figure 46), la corrélation entre la production de CO_2 et la concentration en N_{total} est forte ($R^2 = 0,89$, Figure 46). Les évolutions des concentrations en N_{total} en solution en fonction de la production cumulée de CO_2 sont très similaires pour les modalités Témoin et Digestat. Par exemple, d'après les équations des corrélations, une production cumulée de CO_2 de 0,2 $mgC.g_{sol\ sec}^{-1}$ entraine une concentration en N_{total} de 196 $mg.l^{-1}$ pour la modalité Témoin et de 187 $mg.l^{-1}$ pour la modalité Digestat 0,25 mm. En revanche, pour la modalité Digestat « brut » (Figure 46), la libération d'N en fonction de la production de CO_2 est proportionnellement plus importante en comparaison avec les modalités Digestat 0,25 mm et Témoin. La libération d'azote, en solution dans la phase liquide du sol, est associée à la nitrification de l'azote sous forme ammoniacale contenue dans le digestat « brut » (Tableau 7).

L'apport de Maïs et de Sucre induit une forte augmentation de la concentration d'N_{total} en solution dans la phase liquide du sol par rapport au Témoin lors du premier prélèvement (299, 298 et 24 $mg.l^{-1}$ respectivement, Figure 46). La première hypothèse envisagée explique cette libération d'N sous forme soluble par la biodégradation des matières organiques apportées et endogènes pour la modalité Maïs et uniquement à la biodégradation des matières organiques endogènes (effet « priming » positif, Figure 39) pour la modalité Sucre. Cette hypothèse reste toutefois incertaine puisque d'après la régression de la Figure 46 pour la modalité Témoin, une concentration de 300 $mg.l^{-1}$ N_{total} en solution devrait être accompagnée d'une production de CO_2 de 1 $mgC.g_{sol\ sec}^{-1}$; ce qui n'est pas le cas lors du 1er prélèvement

(Figure 46). Une seconde hypothèse est donc émise. L'apport de Maïs et de Sucre a pu entrainer une déstabilisation des matières organiques endogènes et une solubilisation de celles-ci en raison d'une diminution temporaire du pH du sol associée à une forte activité biologique (Andersson *et al.*, 2000). Ainsi, l'N_{total} en solution mesurée lors du premier prélèvement serait de l'N_{total} sous forme organique associée aux matières organiques soluble. Cette hypothèse permet d'expliquer l'augmentation des concentrations en N_{total} soluble (Figure 46) et l'effet « priming » positif observé pour les modalités Maïs et Sucre (Figure 39) car les matières organiques en solution sont potentiellement biodégradables (Figure 45). Afin de tester cette hypothèse, l'analyse de l'N_{total} sous forme organique et minérale a été réalisée pour les prélèvements de l'incubation n°4. Cependant, ces résultats ne sont pas exploitables car la durée entre le prélèvement des échantillons s'est révélée trop longue et a permis la minéralisation des matières organiques en solution prélevées (Figure 44). D'autres incubations avec des dispositif permettant de mesurer la production de CO_2, l'évolution du pH du sol et des teneurs en C (et éventuellement de son $\delta^{13}C$), en N total et en N minéral de la phase liquide pourraient permettre de tester cette hypothèse.

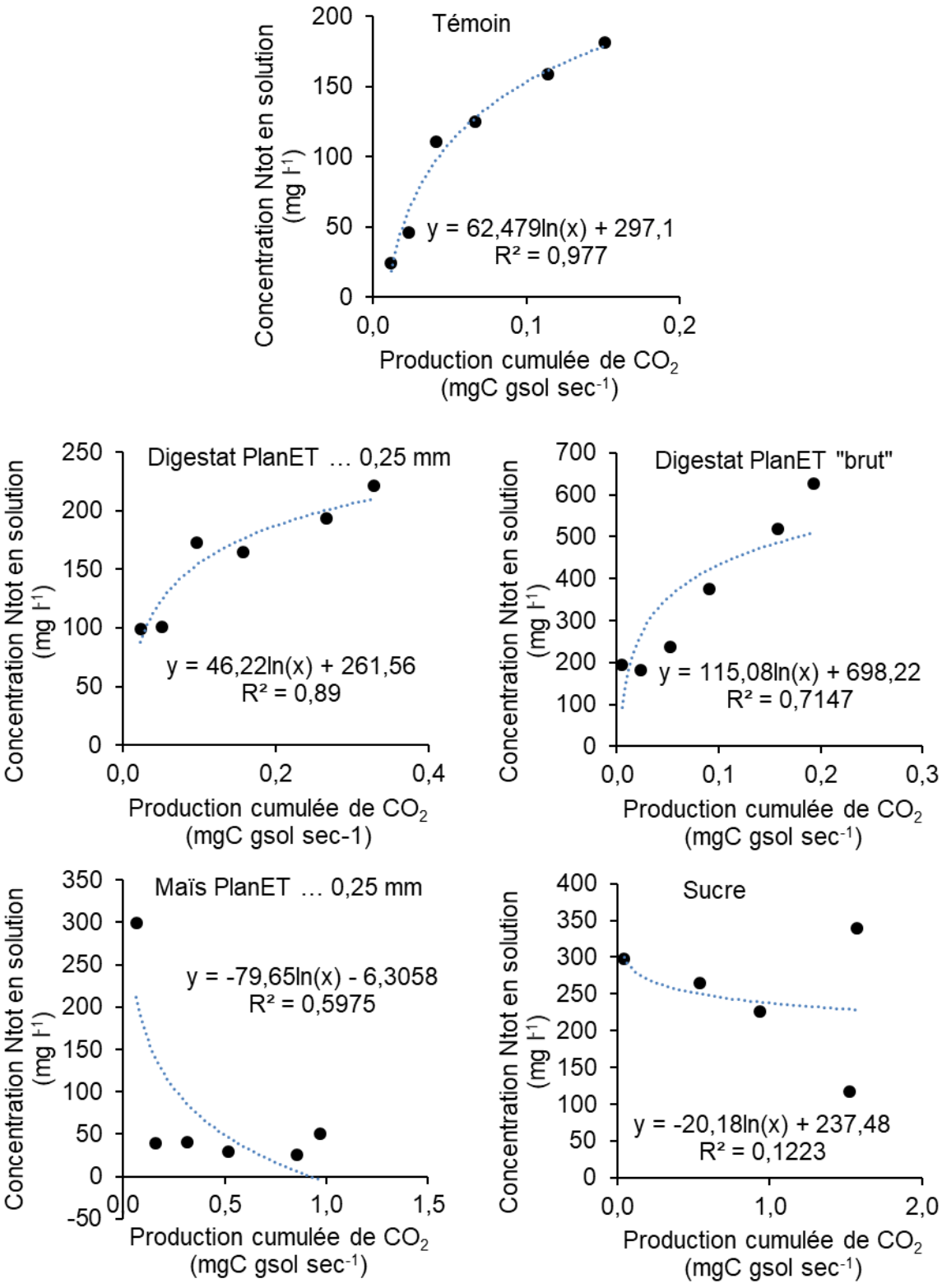


Figure 46 : Corrélation entre la production cumulée de CO_2 et la concentration en Ntot des solutions prélevées avec les rhizons durant l'incubation n°3 pour les modalités : Témoin, Digestat, Digestat brut, Maïs et Sucre

Le Digestat PlanET est 4,9 fois plus concentré en P que le Maïs PlanET par unité de C (Tableau 7). Ainsi, lors de l'incubation n°3, 0,13, 0,03, 0,00, et 0,12 mgP $g_{sol\ sec}^{-1}$ ont été apportés au sol par les modalités Digestat (0,25mm), Maïs (0,25 mm), Sucre et Digestat Brut respectivement. Pourtant, les concentrations en Ptotal dans les échantillons de phases liquides des sols ont augmenté dans des proportions similaires pour les modalités Maïs et Digestat par rapport à la modalité Témoin (Figure 40). Le phosphore du maïs est essentiellement contenu au sein des tissus sous forme organique. Lors de la digestion anaérobie, le phosphore organique est minéralisé sous forme d'ions phosphates solubles ($H_2PO_4^-$ et HPO_4^{2-}) (Möller & Müller, 2012). L'augmentation du pH lors de la digestion anaérobie déplace l'équilibre chimique vers la formation de phosphate ($H_2PO_4^- \rightarrow PO_4^{3-}$) et sa précipitation avec du calcium (Ca)-, du magnésium (Mg)-, du Fer (Fe)-, ou sous forme de struvite ($MgNH_4PO_4$) (Suzuki *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2009; Marcato *et al.*, 2009; Hjorth *et al.*, 2011). La forme précipitée du phosphore dans les digestats peut expliquer les teneurs identiques mesurées dans les phases liquides pour les modalités Témoin et Digestat brut (Figure 40c). Les plus fortes teneurs en Ptotal observées dans les échantillons de solution du sol pour la modalité Digestat (0,25 mm) par rapport au Témoin (Figure 40c) sont attribuées au phénomène de solvatation du phosphore précipité lors de l'humidification des sols. Les molécules des P-(Ca), -(Fe), -(Mg) sont ensuite adsorbées par les argiles et les matières organiques des sols expliquant ainsi la diminution des teneurs en Ptotal (Figure 40c). La forte augmentation de la teneur en P dans la phase liquide des sols amendés avec du Maïs par rapport au Témoin (Figure 40c) est attribuée à son acidité (Tableau 7) qui a potentiellement pu dissoudre des minéraux contenant du P. Les teneurs en P dans la phase liquide des sols amendés sont rapidement (entre 10 à 40 jours) identiques à celles du sol Témoin non amendé consolidant ainsi les résultats d'autres expériences ayant conclues à l'absence de différence d'effet fertilisant P court terme avant et après la digestion anaérobie (Loria *et al.*, 2007; Möller & Stinner, 2010; Bachmann *et al.*, 2011, 2014). L'absence de différence sur la valeur fertilisante P avant et après méthanisation peut s'expliquer par la conservation du P durant la digestion anaérobie et par le phénomène de dissolution progressive des stocks en P dans les sols en fonction des conditions pédoclimatiques.

4.3.4. Conclusion

En ce qui concerne le devenir des matières organiques dans les sols, les tendances observées lors de l'incubation n°2 ont été confirmées lors des incubations n°3 et 4 avec :

- Un stockage de C induit par l'apport de digestat de maïs plus important que celui induit par l'apport de maïs non digéré pour une quantité identique de C apporté au sol ;
    - Pour le digestat, l'important stockage de C est expliqué par une forte stabilité des matières organiques apportées et un effet priming « négatif » ;
    - Pour le maïs, le stockage de C moins important est expliqué par une faible stabilité des matières organiques apportées et un effet priming « nulle » à faiblement « positif ».

Cependant, les prélèvements d'échantillons de la phase liquide des sols lors des incubations n°3 et 4 ont conduit à l'exportation de matières organiques dissoutes faussant ainsi le bilan de matière du cycle du carbone entre l'atmosphère et la pédosphère. Ce biais n'a pas permis de valider la reproductibilité des résultats de l'incubation n°2 d'un point de vue quantitatif. L'incubation n°2 avait permis de conclure que l'augmentation du stockage de C dans les sols amendés avec des digestats de maïs par rapport aux sols amendés avec du maïs permet à minima de compenser les émissions de CO_2 induites par la méthanisation. Cependant, les biais méthodologiques des incubations n°3 et 4 n'ont pas permis de valider ce résultat.

Les prélèvements d'échantillons de la phase liquide des sols ont permis de mettre en évidence :

- La relation forte entre la solubilité des matières organiques apportées et leur biodégradabilité. La faible biodégradabilité des matières organiques des digestats peut être associée à leur faible solubilité (Figure 42).
- Le lien entre l'activité microbienne et l'évolution des teneurs en N dissous à la suite de l'apport en matières organiques. L'apport de digestat induit une faible augmentation de l'activité microbienne et une augmentation progressive des concentrations en N_{total} en solution dans les sols. Au contraire, l'apport de maïs non digéré induit une forte solubilisation initiale d'N dissous puis une forte immobilisation associée à l'importante activité microbienne.
- Les concentrations en P dans la solution des sols est identique à court terme (environ 10 jours) à la suite de l'apport en digestat et en maïs.

4.4. L'analyse des communautés de micro-organismes des sols après l'apport en produits organiques et leur lien avec les effets « priming » observés

4.4.1. Introduction

L'acquisition de connaissances sur les facteurs déterminant le devenir des matières organiques dans les sols est un axe de recherche important en agronomie afin d'améliorer les services écosystémiques du retour au sol des produits organiques. La compréhension des interactions entre les microorganismes, les matières organiques et les pratiques culturales sont indispensables afin de répondre à cette problématique. Ainsi, de nombreuses études ont été réalisées afin d'élucider l'influence des nombreux facteurs sur les processus microbiens impliqués dans le cycle du carbone dont notamment : la composition biochimique des produits organiques (Gaillard *et al.*, 2003), la biodisponibilité du C et de l'N (Nicolardot *et al.*, 1994; Lundquist *et al.*, 1999), la biodisponibilité du P (Kwabiah *et al.*, 2003), le travail du sol (Pankhurst *et al.*, 2002), le chaulage (Rangel-Castro *et al.*, 2005) etc. Ces travaux permettent d'estimer et de modéliser le cycle du carbone à partir de l'activité microbienne globale dépendant des paramètres du milieu tel que le type de sol, les caractéristiques biochimiques des matières organiques, les pratiques culturales, le climat etc. (Andriulo *et al.*, 1999; Balesdent *et al.*, 2000). Toutefois, la majorité des études sont basées sur une évaluation quantitative globale comme : la biomasse microbienne, le taux de respiration, l'activité enzymatique ou les émissions de C et/ou d'N, considérant ainsi les communautés microbiennes comme une « boite noire » fonctionnelle. L'implication des différentes communautés microbiennes dans le devenir des matières organiques et l'influence de l'environnement sur celles-ci reste assez peu connue ; notamment en raison de la très grande diversité des communautés, de leurs nombreuses interactions réciproques avec le milieu et de la difficulté de mesurer quantitativement et qualitativement ces communautés. Le développement des techniques d'analyses des différents taxons de microorganismes par les approches moléculaires basées sur l'ADN (ou ARN) extrait du sol (Pascault *et al.*, 2010, 2013) et sur l'analyses des PLFA ; parfois couplées aux méthodes de marquage isotopique (Nottingham *et al.*, 2009) permettent de mieux comprendre leurs rôles.

L'objectif de l'analyse des communautés de micro-organismes des sols à l'issue des incubations est de déterminer si l'apport de différents produits organiques induit une pression de sélection persistante malgré le retour de l'activité microbienne au niveau du sol non amendé. La modification des communautés microbiennes actives à l'issue des incubations pourra être mise en relation avec les effets « primings » réels observés.

Les échantillons de sol ont été prélevés (puis congelés à -80°C avant d'être analysés) à l'issue des incubations n°2 et 4 ; 178 et 142 jours après l'apport des produits organiques respectivement (Figure 47). La méthode d'analyse des phospholipides (PLFA) est présentée dans le chapitre : « Matériel et méthodes ».

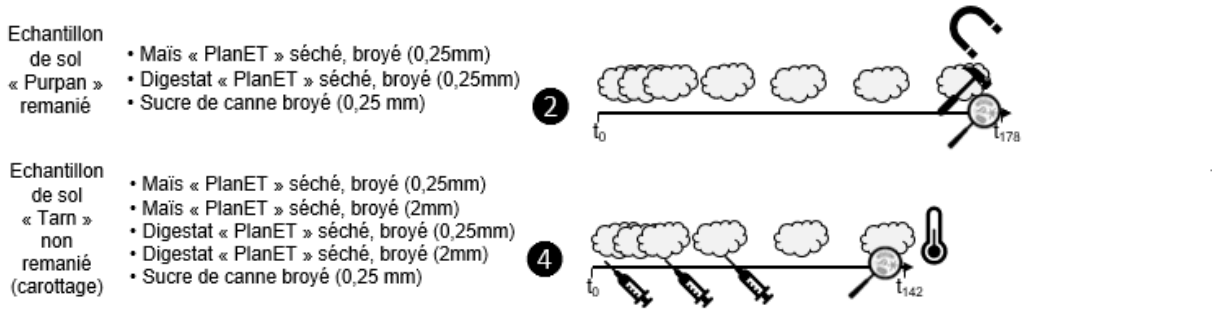


Figure 47 : Plan d'expériences des incubations n°2 et 4

4.4.2. Résultats

4.4.2.1. La biomasse microbienne des sols

La Figure 45 illustre le cumul des PLFA attribués aux microorganismes des sols. Ce cumul est un indicateur de la biomasse microbienne des sols relatif aux modalités testées. Les biomasses microbiennes pour les sols Témoins, non amendés, sont statistiquement identiques avec en moyenne 1693 et 1132 nmol.$g_{sol\ sec}^{-1}$ pour les incubations n°2 et 4 respectivement. Les biomasses microbiennes sont identiques pour l'ensemble des modalités à l'issue de l'incubation n°2 (Figure 45). A l'issue de l'incubation n°4, seule la biomasse microbienne pour la modalité Digestat (0,25mm), évaluée à 2293 nmol.$g_{sol\ sec}^{-1}$, est statistiquement plus élevée que celle de la modalité Témoin. L'absence de différences dans les quantités de biomasses microbiennes peuvent s'expliquer par le faible niveau de production de CO_2 à l'issue des incubations (Béghin-Tanneau *et al.*, 2019), Figure 41), témoignant d'une faible activité microbienne et donc de populations potentiellement réduites.

L'ordre de grandeur des cumuls obtenus sont similaires à ceux obtenus par Quideau *et al.* (2016) dont la méthode d'extraction a été utilisée. Les valeurs observées dans la littérature sont extrêmement variables ; jusqu'à un facteur 1000 (Patra *et al.*, 2008; Johansen *et al.*, 2013; Pezzolla *et al.*, 2015). Cette variabilité peut s'expliquer par la diversité des sols étudiés et de leur traitement et par l'absence de norme pour l'analyse des phospholipides. Par exemple, les auteurs ne précisent pas s'ils ont utilisé un standard afin d'évaluer le rendement d'extraction.

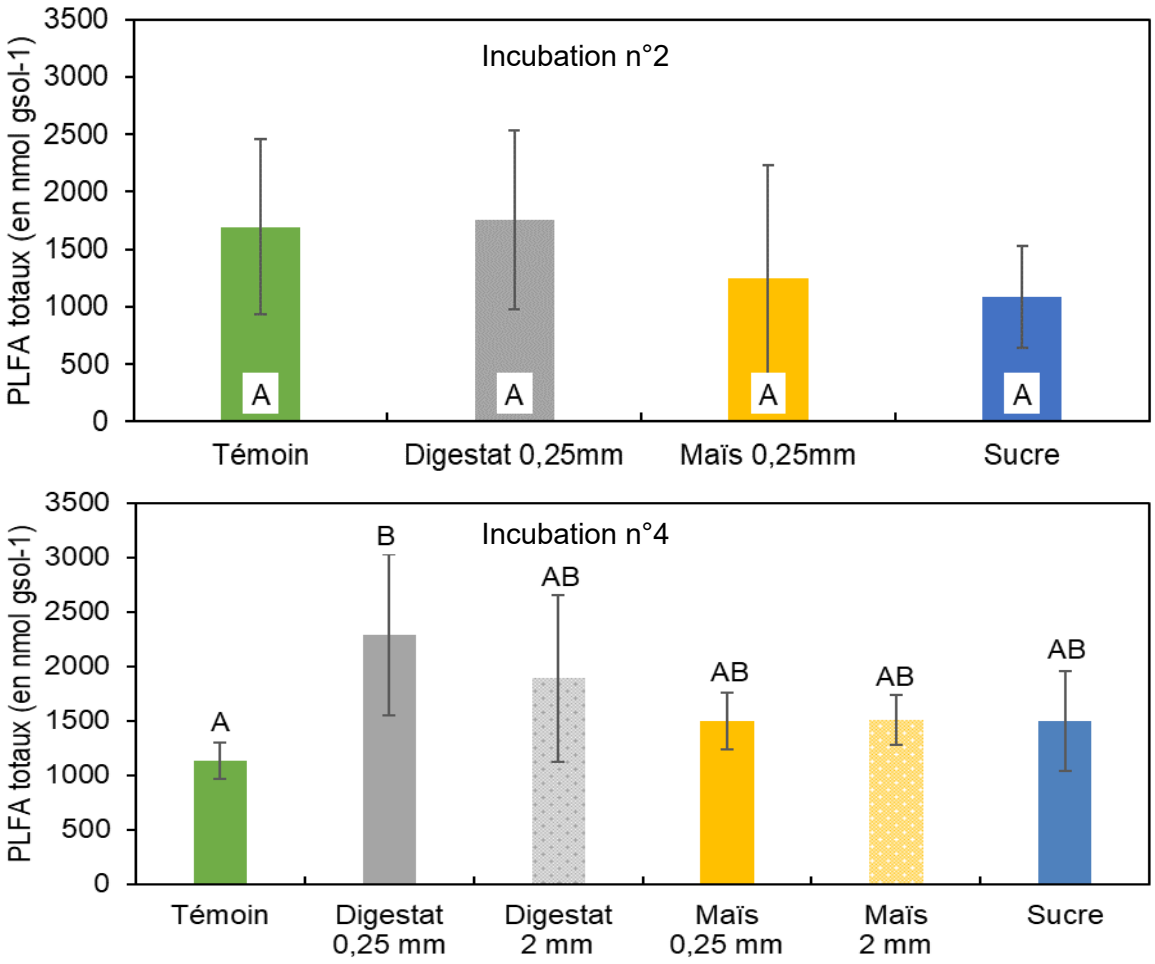


Figure 48 : Cumul des PLFA (nmol.g^{-1} de sol sec) pour chacune des modalités à l'issue des incubations n°2 et n°4. Les données non moyennées (n=4) avec l'écart type associé. Les lettres en capitales référent à la comparaison des traitements d'après le test Tukey (P < 0,05).

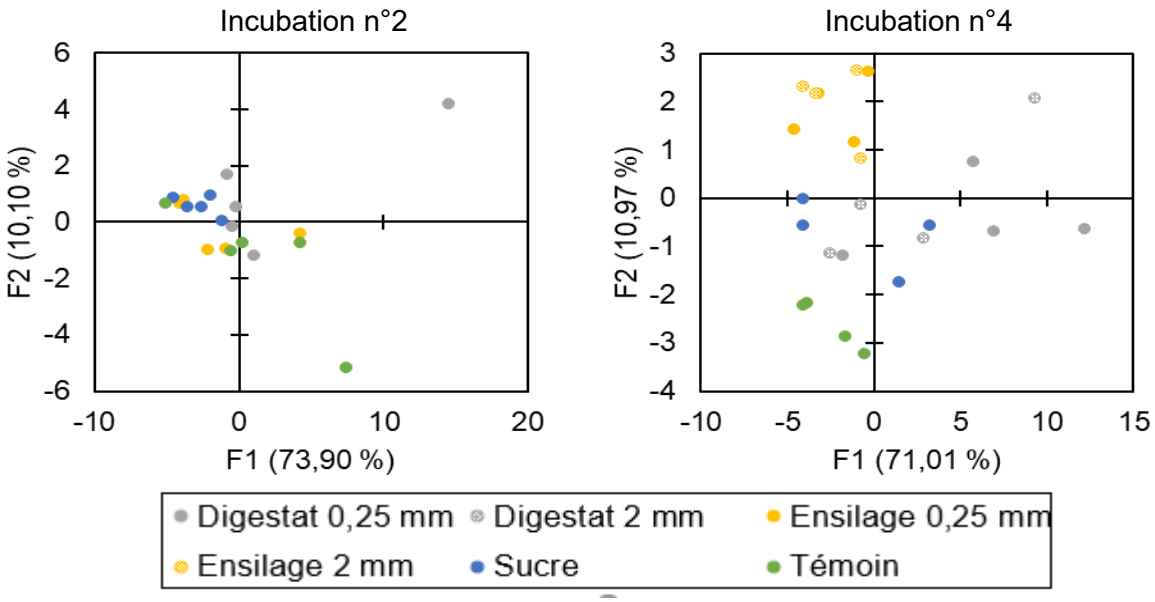


Figure 49 : Analyse en Composantes Principales (ACP) des teneurs en PLFA extraits qui ont été attribués aux microorganismes du sol pour chacun des individus incubations n°2 et 4

4.4.2.2. La structure des PLFA attribués aux microorganismes du sol

La Figure 49 présente les graphiques des Analyses en Composantes Principales (ACP) des teneurs en PLFA pour les différentes modalités à l'issue des incubations n°2 et 4. La somme des axes F1 et F2 représentent 84% et 82% de la variabilité totale du jeu de données respectivement pour les incubations n°2 et 4. Etant donné le nombre important de variables explicatives, il n'est pas possible de définir clairement un axe d'après les variables qui le caractérisent. Pour les axes F1 des deux incubations, les cosinus carrés sont supérieurs à 0,70 pour plus de la moitié des variables. Ces ACP ne permettent pas de segmenter clairement les différentes modalités en fonction des PLFA. Pour l'incubation n°4, des groupes assez homogènes semblent toutefois se dessiner pour les individus appartenant à une même modalité.

4.4.2.3. La structure taxonomique des communautés microbiennes des sols

La Figure 50 présente, pour chacune des modalités à l'issue des incubations n°2 et 4, l'abondance relative des différents taxons de microorganismes déterminés à partir des PLFA bioindicateurs. La variabilité par modalité est faible avec un coefficient de variation moyen pour l'ensemble des taxons de microorganismes et sur les deux incubations de 8% (donnée non montrée). L'abondance relative des différents taxons de microorganismes pour les modalités Témoins pour les incubations n°2 et 4 est proche avec une différences moyenne de 17% (donnée non montrée). Ces éléments conforte l'hypothèse de la robustesse de la méthode d'extraction et d'analyse ainsi que le choix des PLFA bio-indicateurs.

Les différences inter-modalités et notamment par rapport au témoin sont plus marquées pour l'incubation n°4 par rapport à l'incubation n°2 (Figure 50). Ces différentes plus marquées sont attribuées aux durées d'incubations différentes. L'incubation n°2 a durée presque 40 jours de plus soit 25% plus longtemps ; ce qui a été potentiellement été suffisant pour un retour des communautés microbiennes proche de la normale.

La structure des communautés microbiennes des modalités Digestat (0,25 et 2 mm) à l'issue des incubations n°2 et 4 sont très proches de la modalité Témoin sauf pour les Actinobactéries où leur abondance sont significativement moindre. En revanche, à l'issue de l'incubation n°4, la structure des communautés microbiennes des modalités Maïs sont différentes de la modalité Témoin. L'abondance des protozoaires et des champignons est significativement plus élevée dans les sols des modalités Maïs par rapport aux sols de la modalité Témoin. Au contraire, l'abondance des actinobactéries et des bactéries à G+ sont significativement plus élévées dans les sols des modalités Maïs par rapport au Témoin. L'abondance des microorganismes de la modalité Sucre suit les même tendance que les modalités Maïs mais dans des proportions moindres.

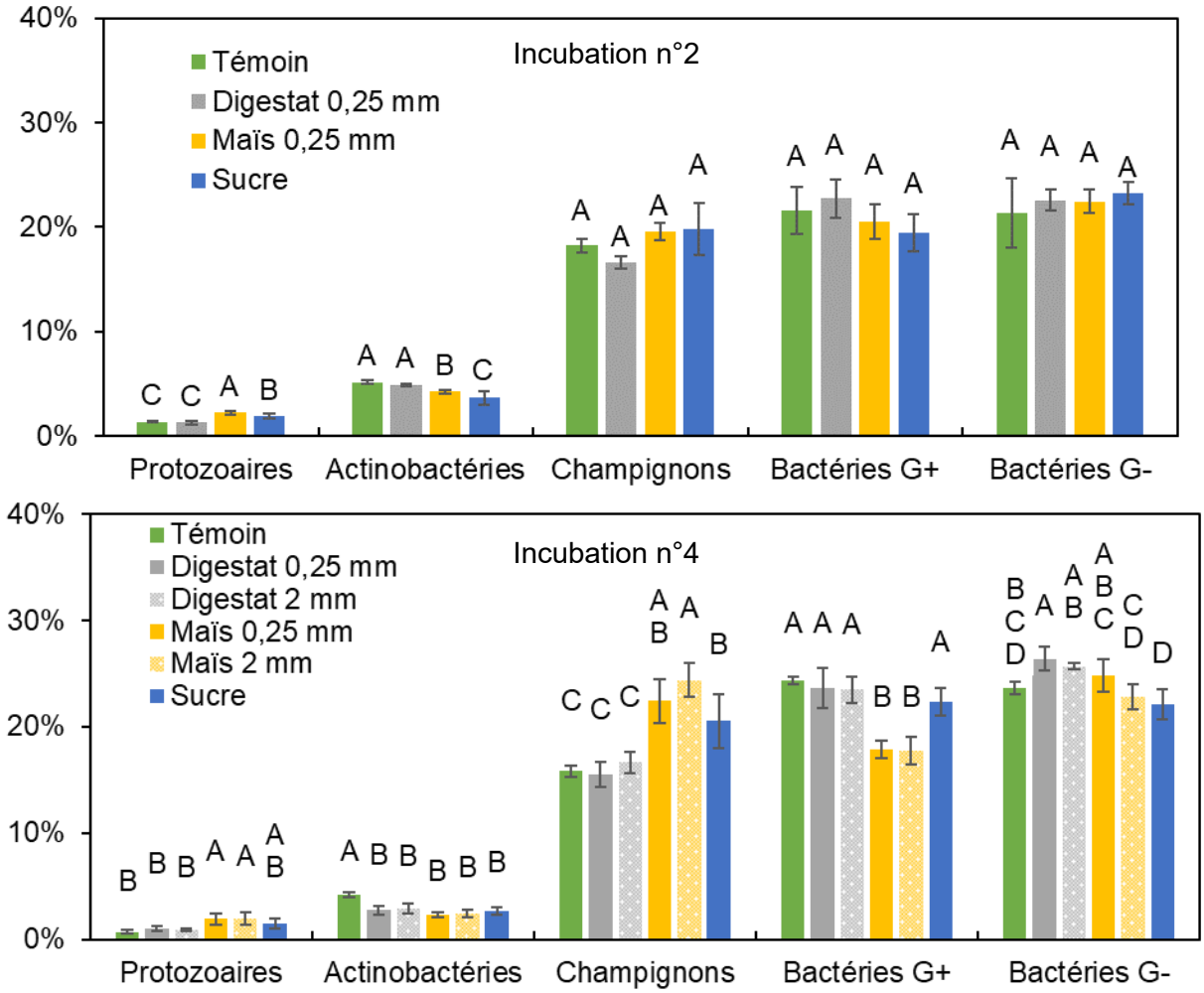


Figure 50 : Abondance relative des différents groupes de microorganismes (en % du cumul des PLFA attribués aux microorganismes du sol)

4.4.3. Discussion

Les protozoaires, communément associés d'un point de vue fonctionnel à la prédation de la bactériomasse des sols (Gobat *et al.*, 2003), sont signifitivement plus représentés dans les modalités Maïs (0,25 et 2 mm) par rapport au Témoin à l'issue des incubations n°2 et 4 (Figure 50). Cette surreprésentation peut être mise en relation avec la forte activité biologique induite par l'apport de maïs ayant certainement augmentée la bactériomasse lors des premières semaines d'incubation. L'augmentation de la bactériomasse a probablement induit un développement des microorganismes bactériophages tels que les protozoaires. Une tendance similaire d'augmentation de l'abondance des bactériophages, mais dans des proportions moindres, est observée pour la modalité Sucre. Cette moindre proportion peut s'expliquer par un épuisement plus rapide de la resource carbonée entrainant un développement plus précoce des bactériophages.

Les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses à Gram+ historiquement qualifiées d'Actinomycétes en raison de leurs filaments ramifiés évoquant un mycélium (Gobat *et al.*, 2003). Les actinobactéries sont notamment impliquées dans la dégradation des matières organiques complexes de type lignocellulosique (Suela Silva *et al.*, 2013; Větrovský *et al.*, 2014). Les actinobactéries sont significativement plus représentées dans les sols de la modalités Témoin et dans les sols de la modalité Digestat pour l'incubation n°2 uniquement (Figure 50). Cette surreprésentation est probablement en lien avec leur capacité à biodégrader les matières organiques les plus récalcitrantes (Větrovský *et al.*, 2014). Il est également possible d'associer la moindre représentation des actinobactéries pour les modalités Maïs et Sucre à un phénomène de compétition avec les champignons comme observé par (Nuccio *et al.*, 2013).

Les champignons des modalités Maïs et Sucre sont significativement sur-représentés par rapport aux autres modalités à l'issue de l'incubation n°4. A l'issue de l'incubation n°2, cette tendance n'est pas significative. Ces observations peuvent être mises en relations avec l'effet « priming » réel observé pour ces modalités (Figure 43) ; car les processus à son origine font intervenir la stimulation des microorganismes oligotrophiques ayant une stratégie à croissance lente (K) tels que les champignons (Figure 9, Kuzyakov, 2010). Lors d'une incubation destinée à mesurer les effets «priming » induit par l'apport de paille de blé (marquée au 14C), Bell *et al.* (2003) ont associé l'effet « priming » positif observé au développement des champignons et plus particulièrement à l'augmentation du ratio champignons sur bactéries après 31 jours. De la même manière, une augmentation significative du ratio Champignons/Bactérires est observée pour les modalités Maïs et Sucre à l'issue de l'incubation n°4 (Figure 51). Cette augmentation n'est pas présente à l'issue de l'incubation n°2. L'influence du développement des champignons sur l'effet « priming » réel est expliqué par la croissance de leurs filaments permettant aux hyphes mycéliens d'augmenter le volume de sol colonisé et ainsi de favoriser la biodégradation des matières organiques endogènes (Fontaine *et al.*, 2011).

Les bactéries à Gram- sont plutôt associées à une stratégie de croissance rapide (r) et à la consommation des matières organiques les plus labiles (Bastian *et al.*, 2009; Nottingham *et al.*, 2009; Fanin *et al.*, 2014; Blagodatskaya *et al.*, 2014). Les prélévements de sol sont probablement trop tardifs (178 et 142 jours après l'apport en produits organiques respectivement pour les incubations n°2 et 4) pour pouvoir mettre en évidence des différences significatives entre les modalités. La modification d'abondance de ce taxon est probablement intervenu lors des première semaines de l'incubation comme mesuré par Nottingham *et al.* (2009) après l'apport de maïs, par Blagodatskaya *et al.* (2014) après l'apport de cellulose et par Pezzolla *et al.* (2015) après l'apport de digestat.

Les bactéries à Gram+ sont plutôt associées à la décomposition des matières organiques les moins labiles (Fierer *et al.*, 2003; Kramer & Gleixner, 2008; Blagodatskaya *et al.*, 2014). Ainsi, le ratio entre l'abondance des bactéries à Gram+ et des bactéries à Gram- peut être interprété comme un indicateur de la biodisponibilité des matières organiques des sols (Figure 51). Le faible ratio G+/G- observé pour les modalités Maïs est plutôt synonyme d'une plus grande biodisponibilité des matières organiques. Ce résultat peut être mis en relation avec l'effet « priming » positif réel observé pour la modalité Maïs.

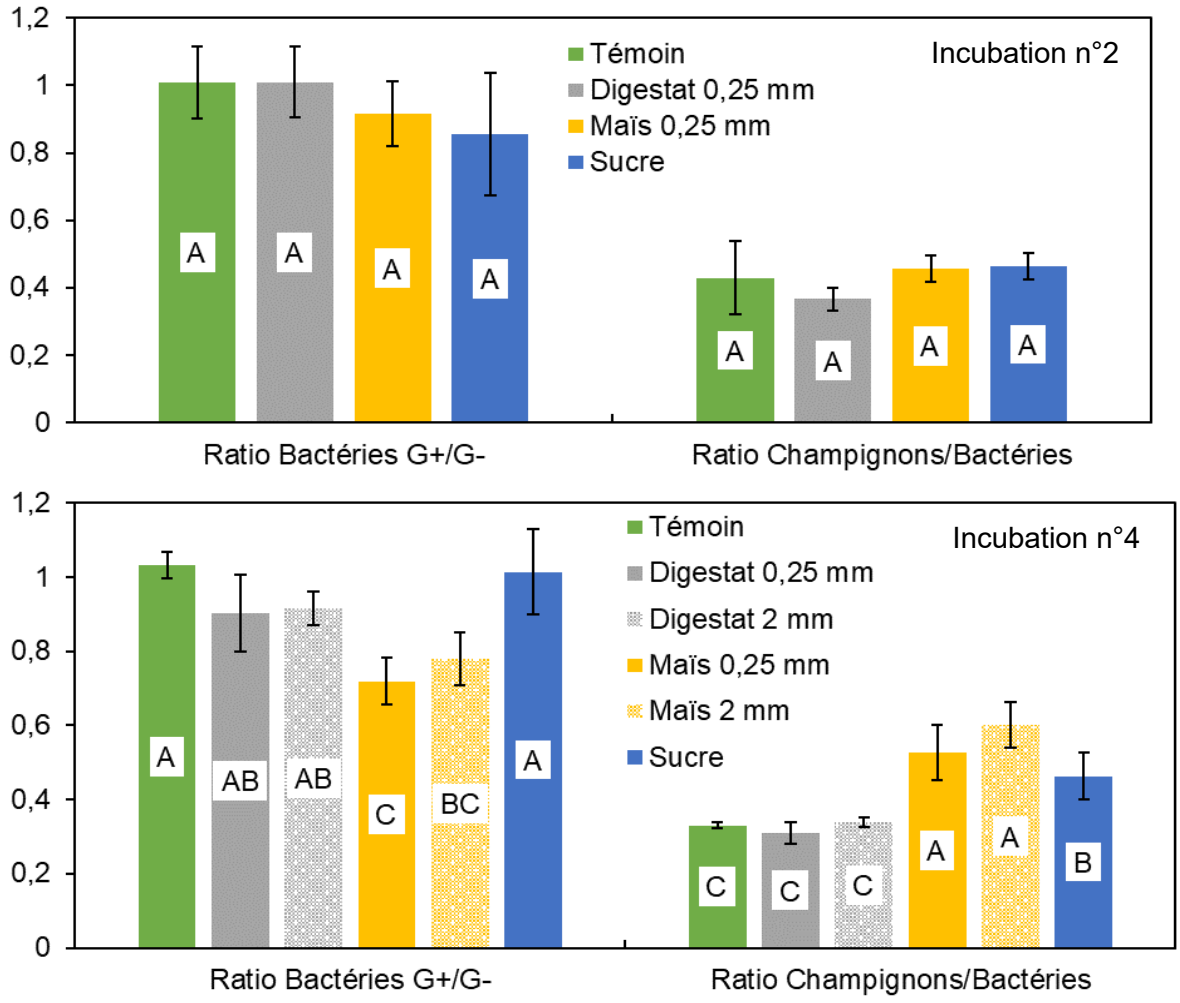


Figure 51 : Ratios Bactéries G+/G- et Champignons/Bactéries à l'issue des incubations n°2 et 4

Au-delà de la comparaison des moyennes de l'abondance relative des différents taxons, la Figure 52 présente l'Analyse en Composantes Principales (ACP) pour chacun des individus (sols). L'ACP permet de mettre en évidence l'influence de l'apport de différents produits organiques sur les groupes taxonomiques des microorganismes des sols. Les individus appartement aux sols non amendés (Témoin) sont caractérisés par leurs abondances en actinobactéries et en bactéries à Gram+. Les individus appartenant aux sols ayant été amendés avec des digestats ont une composition taxonomique très proche de celle

des sols non amendés avec toutefois une plus grande l'abondance des Bactéries à Gram-. Les sols amendés avec des matières organiques labiles comme l'ensilage de maïs ou du sucre voient leurs abondances en champignons et en protozoaires augmenter par rapport aux sols non amendés. L'abondance en champignons et en protozoaires est associée à la l'augmentation des communautés microbiennes ayant une stratégie de croissance rapide lors des premières semaines des incubations (Kuzyakov, 2010). Cette sucession de différents types de microorganismes permet de mettre en évidence l'aspect dynamique de la notion de biodiversité.

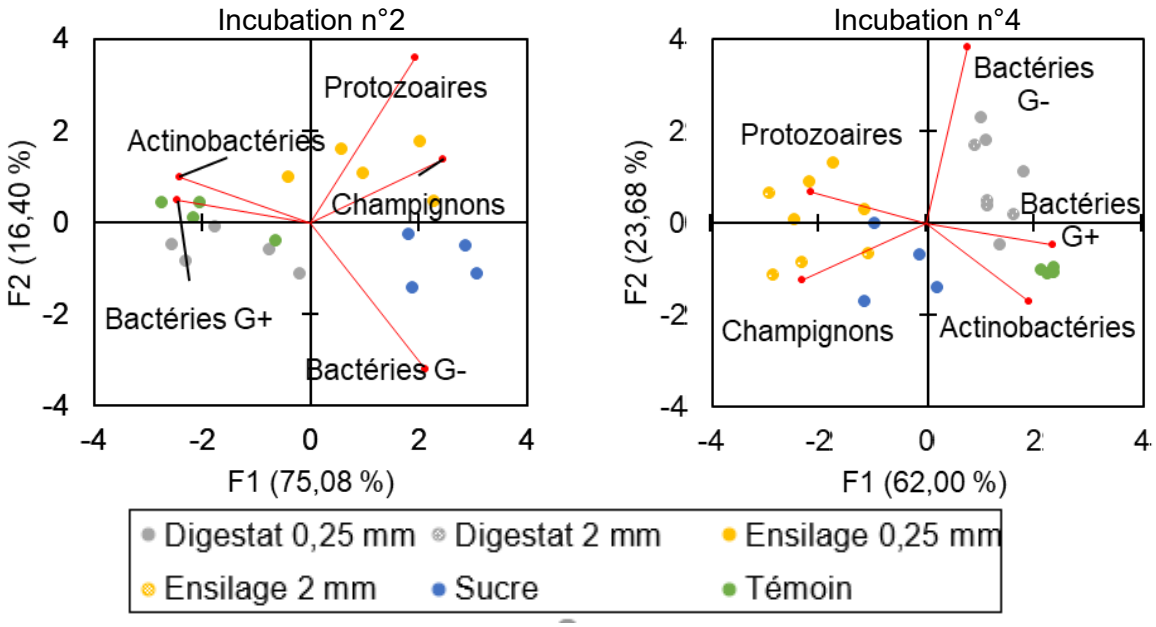


Figure 52 : Analyse en Composantes Principales (ACP) des abondances des différents groupes de microorganismes par modalités pour les incubations n°2 et 4

4.4.4. Conclusion

Ces résultats mettent en évidence que les apports en matières organiques influencent à court et à moyen terme (jusqu'à 6 mois après un apport) la composition des communautés microbiennes du sol. La modification de la composition des communautés microbiennes a pu être mise en relation avec la modification du cycle du carbone dans les sols à travers les effets « priming » mesurés. Malgré sa résolution taxonomique limitée, la méthode de mesure des communautés microbiennes par extraction des PLFA est particulièrement adaptée pour étudier les communautés microbiennes actives lors du prélèvement. Il serait intéressant d'analyser l'évolution des PLFA au cours du temps lors des incubations.

Chapitre V

5. Caractéristiques des matières organiques des produits apportés et des sols amendés (méthode d'analyse Rock Eval 6)

Les analyses des matières organiques ont eu pour objectif d''évaluer le déterminisme pouvant exister entre les caractéristiques des produits organiques et : la stabilité de leurs matières organiques dans les sols, et les caractéristiques des matières organiques des sols à l'issue des incubations.

Les matières organiques ont été caractérisées en fonction : de leur teneur en carbone organique total (TOC), de leurs Indices Hydrogène (IH) et Oxygène (IO) et des Index I et R correspondant à la proportion de matières organiques labiles et récalcitrantes respectivement.

Une modalité « Biochar » consistant à l'apport de maïs ensilage pyrolysé a été ajoutée lors de l'incubation n°5 afin d'élargir la diversité des produits organiques étudiés. Les matières organiques du biochar se sont révélées très peu biodégradables (0,36% des matières organiques apportées biodégradées après 56 jours d'incubation, données non montrées), stimulant peu l'activité microbienne (absence d'effet « priming » après 56 jours d'incubation, données non montrées) et augmentant fortement le stock en carbone.

5.1. Les effets de la digestion anaérobie et de la pyrolyse sur les caractéristiques des matières organiques apportées

5.1.1. Les teneurs en TOC des produits organiques

Les teneurs en TOC calculées à partir de l'analyse Rock Eval 6 (Tableau 18) sont similaires à celles obtenues par l'analyse élémentaire sauf pour le biochar de maïs (Tableau 8). Elles sont inférieures de : -14%, -17%, -5%, -1%, -51% par rapport aux résultats des analyses élémentaires respectivement pour les modalités Maïs PlanET, Maïs Wagner, Digestat PlanET, Digestat Wagner, Biochar de maïs. Cette sous-estimation de l'analyse Rock Eval, comme également observée par Disnar *et al.* (2003) et Saenger *et al.* (2013), est associée à la moins bonne performance du détecteur FID pour la mesure des composés hydrocarbonés lors de l'analyse Rock Eval par rapport au système LECO (cellule infrarouge) utilisé lors de l'analyse élémentaire. Plus spécifiquement, pour le biochar de maïs, la différence importante peut provenir de la surestimation de la proportion de composés minéraux lors des calculs. A partir d'une certaine température, les composés carbonés émis sont associés

notamment à la décomposition des carbonates (Figure 21). Dans le cas des biochar, la quantité de carbonate est négligeable et les composés carbonés émis à hautes températures sont potentiellement issus de la décomposition de matières organiques très stables thermiquement. Enfin, il est également probable que les matières organiques pyrogéniques ne se décomposent qu'à des températures supérieures à 700°C.

5.1.2. Les indices hydrogènes et oxygènes des produits organiques

Les indices hydrogènes (IH) et oxygènes (IO) sont proches pour les Maïs PlanET et Wagner (442 et 456 mgHC.gTOC^{-1}, 207 et 213 mgCO_2.gTOC^{-1} respectivement). Les indices hydrogènes dépendent de la nature des composés organiques constituant le produit. Par exemple, une indice hydrogène élevé implique une forte proportion de composés riches en hydrogènes tels que les longues chaines alkyl comme les lipides ou les composés « O-alkyl-C » comme la cellulose. Au contraire, des faibles indices hydrogènes impliquent la présence de composés pauvres en hydrogène ; comme les composés aromatiques par exemple (Saenger *et al.*, 2013). Ainsi, l'IH et l'OI des maïs mesurés peut s'expliquer par la proportion de différents constituants tel que : des hydrates de carbone, des protéines et des lipides. La cellulose a par exemple des ratios IH et OI de 589 mgHC.gTOC^{-1} et de 168 mgCO_2.gTOC^{-1} respectivement (Carrie *et al.*, 2012). Au contraire, le sucrose a des ratios IH et OI de 144 mgHC.gTOC^{-1} et de 245 mgCO_2.gTOC^{-1} (Carrie *et al.*, 2012). La diversité des constituants d'un végétal étant très importante, il n'est pas possible de définir sa composition à partir seulement des deux indices IH et IO.

Au-delà de discriminer les matières organiques en fonction de leurs sources, ces indices sont également utilisés pour caractériser la fraction organique des sédiments récents et des tourbes ; notamment concernant leur stabilité biologique (Gasse *et al.*, 1994; Patience *et al.*, 1996; di-Giovanni *et al.*, 1998; Marchand *et al.*, 2003; Sanei *et al.*, 2005; Hare *et al.*, 2014). Conformément aux tendances de la littérature, l'IH diminue en fonction du degré de maturation. Les IH des matières organiques digérées (351 et 354 mgHC/gTOC respectivement pour les digestats PlanET et Wagner) sont plus faibles que ceux des maïs. L'IH du biochar de maïs, potentiellement très stable biologiquement, est très faible (15 mgHC/gTOC). Les IH des matières organiques des sols Purpan et Tarn (168 et 208 mgHC/gTOC respectivement) sont intermédiaires entre ceux des végétaux frais ou digérés et celui d'une matière pyrolysée, témoignant d'un mélange de tissus végétaux et de matières organiques plus ou moins stabilisées. Les IO suivent globalement la même tendance à l'exception du Digestat PlanET (238 mgHC/gTOC) ayant un IO plus élevé que celui du Maïs PlanET (207 mgHC/gTOC). L'IO est plus difficile à corréler avec la stabilisation des matières organiques car certains processus de maturation impliquent une oxydation lente entrainant un enrichissement en matières

organiques avec des groupes fonctionnels oxygénés, en particuliers des groupes -COOH et -OH (Zech *et al.*, 1997; Lützow & Kögel-Knabner, 2010).

5.1.3. Les Index-I et -R des produits organiques

En complément des indices IH et IO, Sebag *et al.* (2016) ont proposé les Index-I et -R destiné à caractériser les matières organiques en fonction de leurs stabilités thermiques. L'Index-I représente la proportion de matières organiques labiles thermiquement et l'Index-R représente la proportion de matières organiques récalcitrants thermiquement. Les Index-I des maïs PlanET et Wagner sont élevés : 0,83 et 0,88 respectivement et les Index-R sont faibles (0,21 et 0,19). Ces valeurs sont caractéristiques des tissus de végétaux (Sebag *et al.*, 2016). Les valeurs des Index-I et -R des digestats sont quant à elles caractéristiques des litières et des horizons organiques (Sebag *et al.*, 2016). Les valeurs des Index-I et -R du biochar sont caractéristiques des charbons (Sebag *et al.*, 2016).

Modalité		TOC (‰MS)	Caractérisation globale des matières organiques		Caractérisation de la stabilité thermique	
			Indice Hydrogène (IH) en $mgHC.g^{-1}$ TOC	Indice Oxygène (IO) en $mgCO_2.g^{-1}$ TOC	Index I	Index R
Produits organiques apportés	Maïs PlanET… 0,25 mm	371	442	207	0,83	0,21
	Maïs Wagner… 0,25 mm	365	456	213	0,88	0,19
	Digestat PlanET … 0,25 mm	373	351	238	0,51	0,36
	Digestat Wagner … 0,25 mm	395	354	169	0,50	0,34
	Biochar de maïs	371	15	41	0,27	0,96

Tableau 18 : Caractéristiques des matières organiques apportées d'après les paramètres issus de l'analyse Rock Eval 6

Les matières organiques avant digestion sont moins stables thermiquement que les matières organiques après digestion et le classement des produits organiques en fonction de leur index R (Tableau 18) : Biochar > Digestat > Maïs est le même qu'en fonction de leur stabilité dans les sols (Tableau 17). Ces résultats mettent en évidence la potentielle utilisation de l'index R des matières organiques apportées pour prédire leur stabilité dans les sols. Cependant, le nombre de produits organiques testés dans le cadre de cette étude n'est pas suffisant pour modéliser la relation entre l'index -R et la stabilité des matières organiques apportées dans les sols.

5.2. L'analyse des caractéristiques des matières organiques des Luvisols

Des échantillons de sols ont été prélevés à l'issue des incubations n°4 et 5 afin de déterminer si l'apport de produits organiques a modifié leur statut organique.

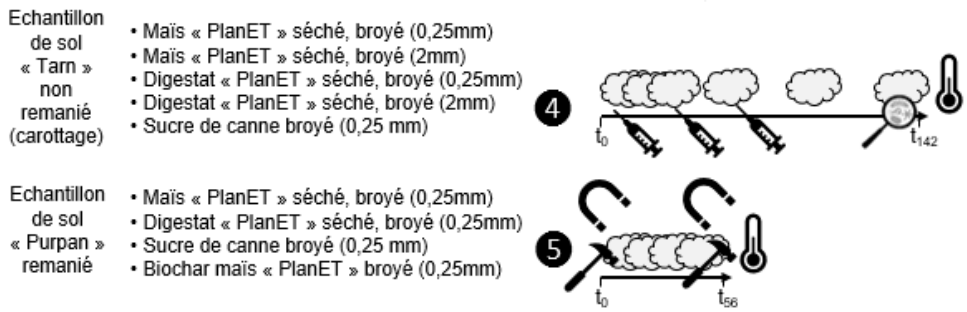


Figure 53 : Plan d'expérience des incubations n°4 et 5

5.2.1. Comparaison des teneurs en C organique (TOC) des sols à l'issue des incubations

A l'issue des incubations n°4 et 5 (Figure 53), après 142 et 56 jours d'incubation respectivement, les teneurs en C organique (TOC) ne sont pas statistiquement différentes pour les modalités : Témoin, Sucre et Maïs (Figure 54). L'apport de sucre ou de maïs n'a pas conduit à une augmentation significative des teneurs en C dans les sols. L'apport de Digestat ou de Biochar a conduit à une augmentation significative des teneurs en TOC (Figure 54). La variabilité des teneurs observée pour les modalités Maïs et Digestat de l'incubation n°4 est attribuée au manque d'homogénéité du mélange sol/produit organique associée au dispositif d'incubation par carottage avec une incorporation des produits organiques seulement sur les trois premiers centimètres.

La Figure 55 présente les corrélations entre les teneurs en C organique à (TOC, évaluées par Rock Eval 6) à l'issue des incubations et les teneurs en C estimées à partir de l'analyse élémentaire (Tableau 13) et des mesures du CO_2 produit durant les incubations permettant d'évaluer la quantité de C stockée ou déstockée des sols (Tableau 17). Les corrélations sont élevées (R^2 = 0,90) et confirment les bilans de masse du C réalisés à partir des productions de CO_2 mesurés.

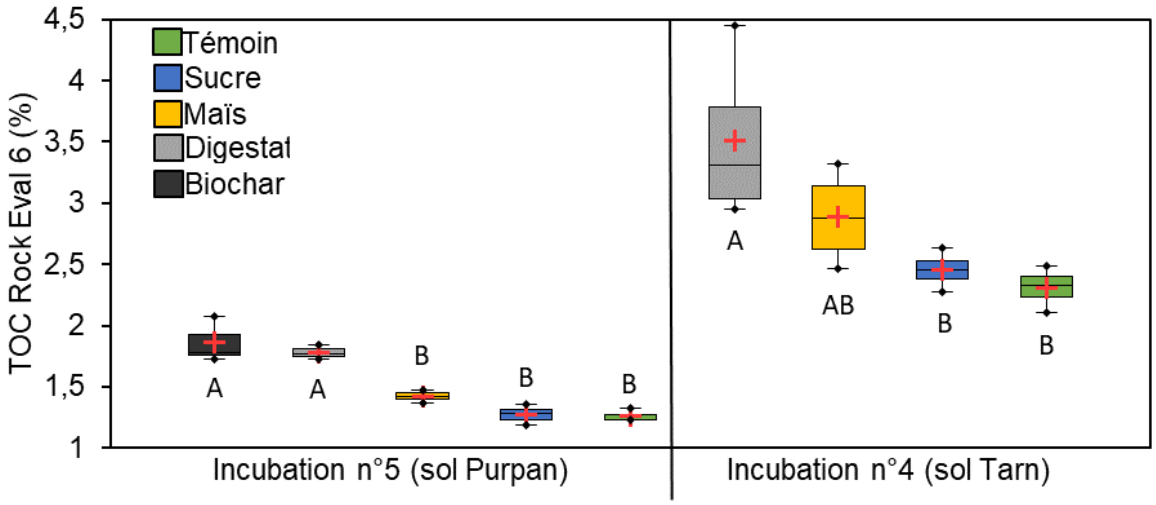


Figure 54 : Distribution en boite à moustache des teneurs en C organique (TOC) des sols à l'issue des incubations n°4 et 5, évaluées par l'analyse Rock Eval 6

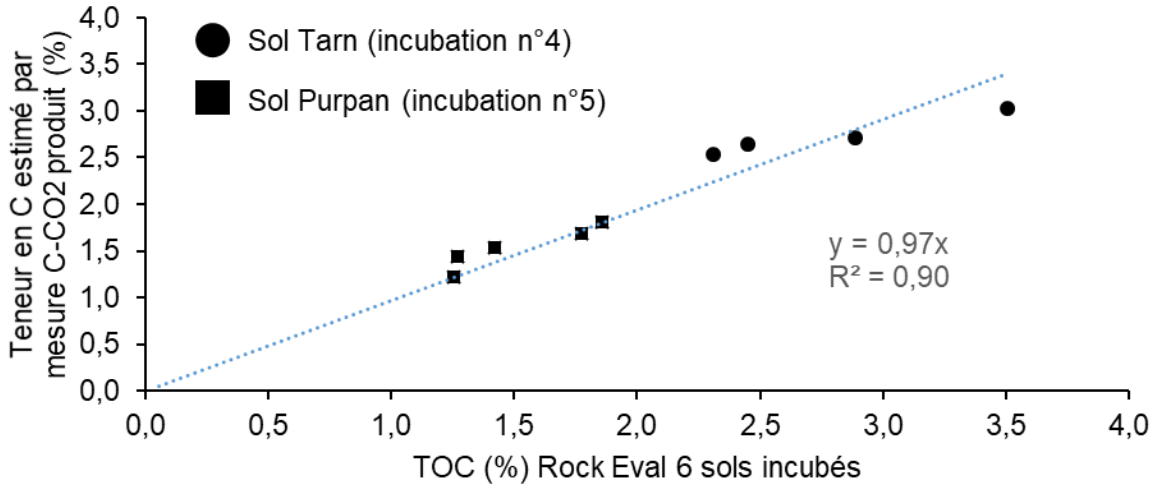


Figure 55 : Corrélations entre les teneurs en C organique (TOC, évaluées par Rock Eval 6) est les teneurs en C estimées à partir des mesures du CO_2 produit durant les incubations permettant de quantifier le stockage de C dans les sols.

5.2.2. Comparaison des indices hydrogène (IH) et oxygène (IO) des sols à l'issue des incubations

Les résultats des deux paramètres Rock Eval 6 associés à la composition chimique des matières organiques (IH et IO) sont présentés par la Figure 56 pour les échantillons de produits organiques et de sols analysés. Des études ont montré que les indices IH et IO sont bien corrélés avec les ratios atomique H/C et O/C, et par conséquent qu'un diagramme IH :IO est comparable à un diagramme : « van Krevelen » (Espitalié *et al.*, 1977; Vandenbroucke & Largeau, 2007). Un diagramme de type « van Krevelen » permet d'illustrer la transformation progressive des composés organiques ; associée aux phénomènes et déshydrogénation et

d'oxydation (Lützow *et al.*, 2006, Figure 56). D'après les résultats obtenus par Matteodo *et al.* (2018), placés sur la Figure 56, les valeurs d'IH des matières organiques des sols diminuent progressivement depuis des valeurs élevées (supérieures à 350 mg HC/gTOC) pour les tissus des plantes et les litières de surface jusqu'à des valeurs faibles (inférieures à 250 mg HC/gTOC) pour les horizons les plus profonds (supérieurs à 30 cm de profondeurs). Les valeurs d'OI augmentent progressivement depuis les litières jusqu'aux horizons les plus profonds (Figure 56).

A l'issue de l'incubation n°4 (sol/site Tarn), les valeurs des indices hydrogènes (IH) sont significativement différentes pour toutes les modalités (Figure 56 et Figure 57). Les sols ayant reçu un produit organique ont des valeurs d'IH plus élevées par rapport aux Témoin (208 mg HC/gTOC) avec des valeurs moyennes de 283, 263 et 245 respectivement pour les modalités Digestat, Ensilage de Maïs et Sucre. Ces résultats sont similaires avec ceux de l'incubation n°5 (Figure 56 et Figure 57) à l'exception de la modalité Biochar qui présente un IH significativement plus faible que celui de la modalité Témoin.

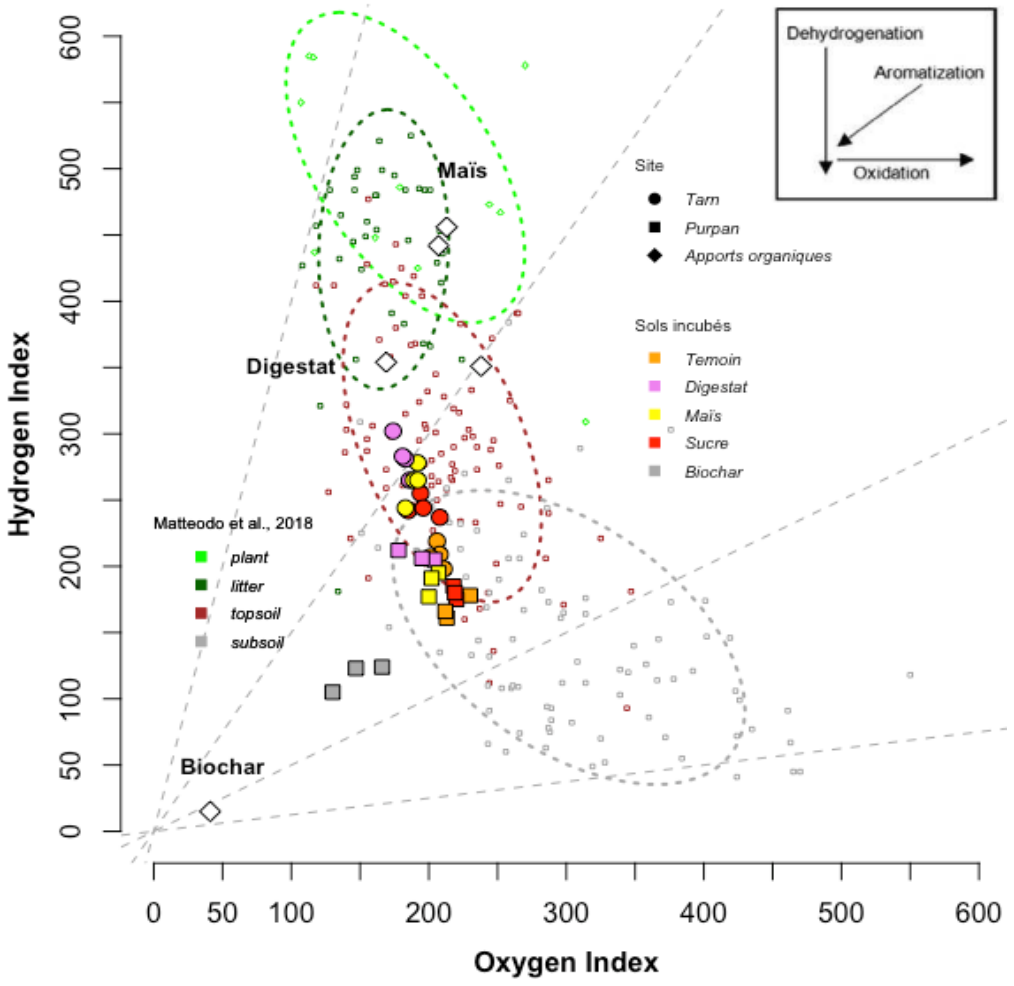


Figure 56 : Positionnement des produits organiques et des sols au sein du pseudo-van Krevelen diagramme, en fonction des Indice Hydrogènes (IH) en mg HC/gTOC et Oxygènes (IO) en mgCO2/gTOC, relativement aux mesures réalisées par (Matteodo et al.*, 2018)*

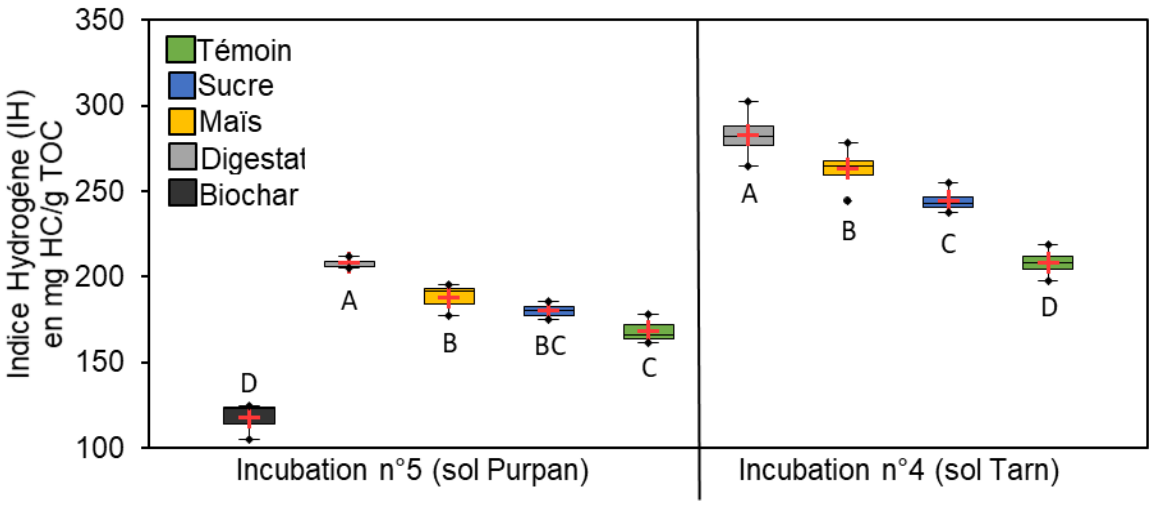


Figure 57 : Distribution en boite à moustache des Indices Hydrogène (IH) des échantillons de sols prélevés à l'issue des incubations n°4 et 5. Les lettres en capitale illustre les résultats des tests de comparaison des moyennes Tukey (P < 0,05).

Deux aspects peuvent expliquer les valeurs IH plus importantes des sols ayant reçu des produits organiques : la quantité des matières organiques apportées restant dans les sols à l'issue de l'incubation et la valeur IH des matières organiques apportées. La bonne corrélation entre les teneurs en C organique (TOC, évaluées par Rock Eval 6) et les indices hydrogènes (IH) (en l'absence de la modalité Biochar, Figure 58) permet de mettre en évidence l'importance de la stabilité des matières organiques apportées dans la modification des valeurs IH par rapport au Témoin. Comme les matières organiques des digestats, des ensilage de maïs et du sucre ont des valeurs d'IH plus élevées que celles des matières organiques endogènes des sols (Figure 56) leur stockage entraine une augmentation des valeurs IH des sols amendés. A l'inverse comme la valeur IH du biochar est plus faible que celle des matières organiques endogènes du sol (Figure 56), son apport et son stockage entraine une diminution de la valeur moyenne IH des sols amendés avec du biochar (Figure 58). Malgré des valeurs d'IH des digestats plus faibles que celles des ensilage de maïs (Figure 56), les valeurs d'IH des sols amendés avec des digestats sont significativement plus importantes par rapport aux sols amendés avec du maïs ensilage (Figure 57) mettant en évidence une stabilité bien plus importante des matières organiques des digestats par rapport aux maïs ensilages. Les valeurs d'IH des matières organiques étant susceptibles d'évoluer durant leur évolution dans le sol, il n'est pas possible d'évaluer la proportion des matières organiques apportées stockées dans les sols. La double origine (héritée et acquise) des valeurs IH et IO rend difficile une analyse plus poussée des résultats obtenus par rapport aux valeurs obtenues par Matteodo *et al.* (2018) présentées dans la Figure 56. Par exemple, les indices IH des Témoin des sols Purpan et Tarn sont plutôt faibles pour des échantillons prélevés sur une profondeur de 10 cm (Figure 56). Il est difficile d'attribuer ce résultat aux

différences de végétation entre les sols de cette étude et ceux de Matteodo *et al.* (2018) et/ou à un travail du sol en profondeur ayant mélangé les horizons et/ou à des processus d'évolution des matières organiques différents.

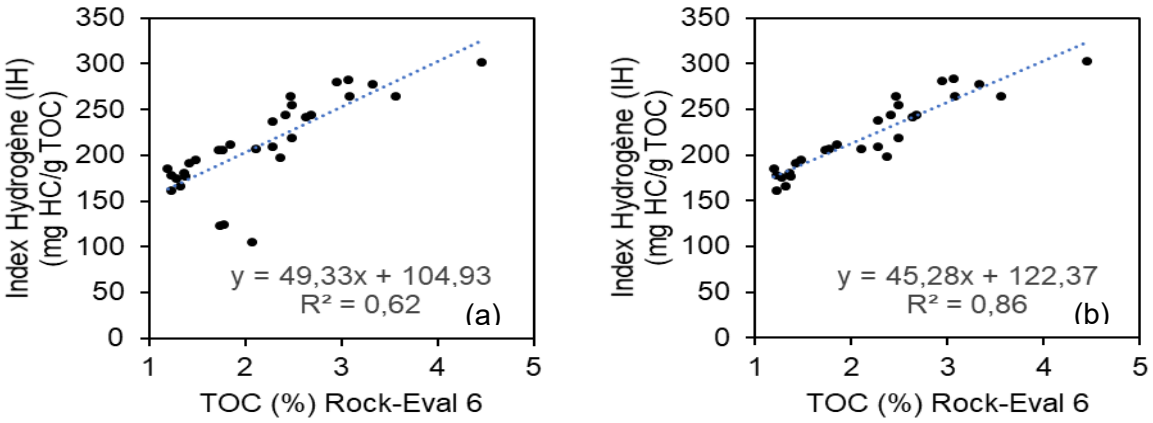


Figure 58 : Corrélations entre les teneurs en C organique (TOC, évaluées par Rock Eval 6) est les indices hydrogènes (IH) pour les incubations n°4 et 5 en l'absence (b) ou en présence (a) de la modalité Biochar.

5.2.3. Comparaison des index -I et -R des sols à l'issue des incubations

L'Index-I représente la proportion de matières organiques labiles thermiquement et l'Index-R représente la proportion de matières organiques récalcitrantes thermiquement. Relativement aux mesures réalisées par Matteodo *et al.* (2018) intégrées dans la Figure 59, les valeurs des index -I et -R des sols de la modalité Témoin se situent à l'intermédiaire entre l'horizon de surface « topsoil » (0 à 30 cm) et l'horizon profond subsoil (30 à 60 cm). Ces observations, cohérentes avec les valeurs IH et IO (Figure 56), confortent l'hypothèse d'un travail du sol ayant mélangé les horizons organiques (O) et arable (A). Ce mélange des horizons est ancien pour la parcelle du sol Purpan, prairie naturelle depuis plus de 40 ans, et plus récent pour la parcelle du sol Tarn qui est conduite en semis direct depuis 10 ans.

A l'issue des incubations, les index-I et R des matières organiques des sols sont statistiquement identiques à la modalité Témoin pour les modalités Sucre et Biochar et statistiquement différents pour les modalités Maïs et Digestat (Figure 60 et Figure 60). Les matières organiques des sols amendés avec du maïs et du digestat sont caractérisées par un Index-I plus fort et un Index-R plus faible par rapport aux sols de la modalité Témoin. Cette observation peut s'expliquer par la présence des matières organiques apportées résiduelles dans les sols amendés. Les index I des matières organiques apportées sont plus élevés que celui des matières organiques endogènes des sols et vice versa pour les index R (Figure 59). L'absence de différence significative des index I et R entre les sols des modalités Maïs et Digestat peuvent s'expliquer par : les différences de stabilité des matières organiques apportées et les différences des index I et R. Les matières organiques des Digestats sont biologiquement très stables dans les sols (Tableau 17) et leurs index I et R sont peu différents de ceux d'un sol non amendé. Au contraire, les matières organiques des Maïs sont biologiquement peu stables dans les sols (Tableau 17) mais leurs index I et R sont très différents de ceux d'un sol amendé. Au total, l'influence de leurs apports sur les index I et R des matières organiques des sols amendés sont similaires (Figure 60).

L'ajout de biochar n'a pas entrainé de modification significative des Index -I et -R malgré sa forte stabilité et des Index -I et -R très différents de ceux des sols Témoins (Figure 60). Ce résultat peut s'expliquer par la stabilité thermique très importante du biochar ne permettant pas la caractérisation de l'ensemble de sa matière organique par la méthode Rock Eval 6 sur des gammes de températures inférieures à 750°C (Tableau 18).

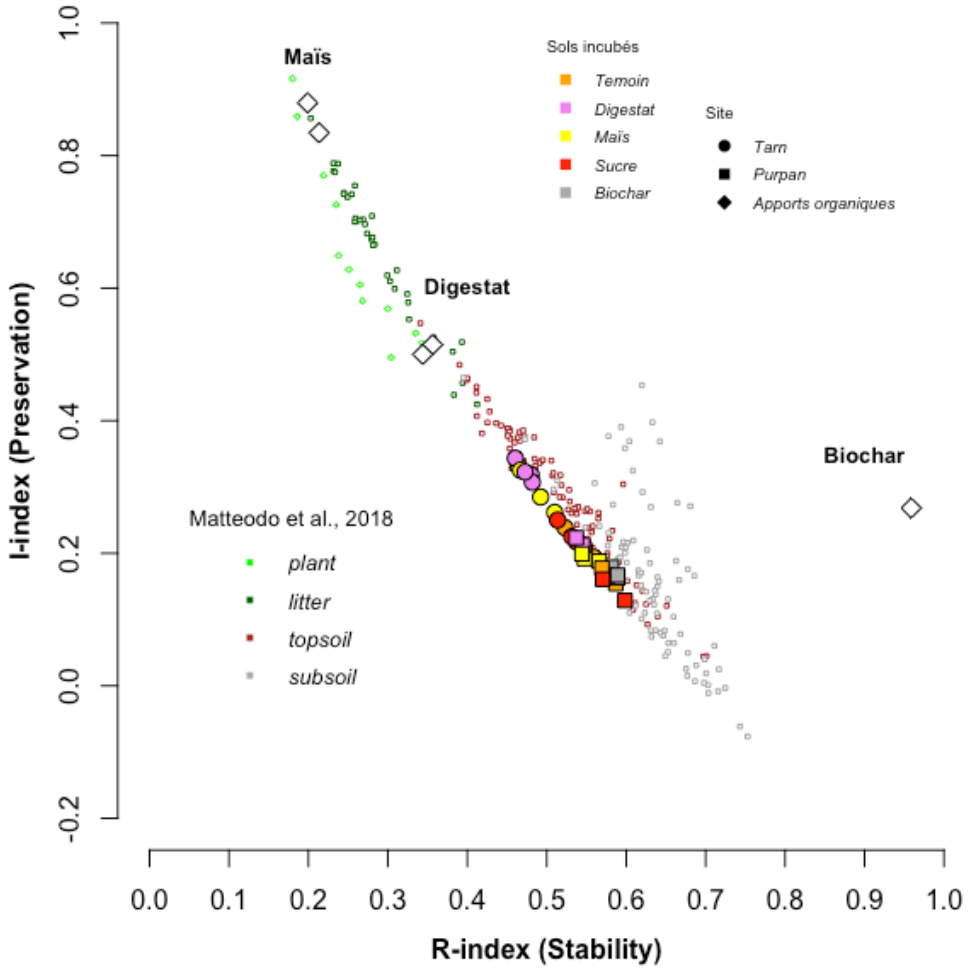


Figure 59 : Diagramme des Index-I et -R des produits organiques et des sols à l'issue des incubations n°4 et 5, relativement aux mesures réalisées par (Matteodo et al.*, 2018)*

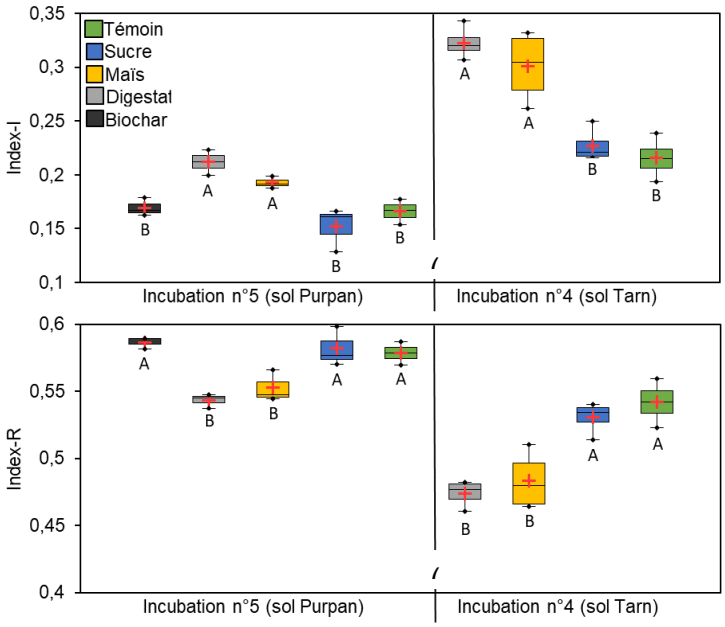


Figure 60 : Distribution en boite à moustache des Index-I (a) et -R (b) des échantillons de sols prélevés à l'issue des incubations n°4 et 5. Les lettres en capitale illustre les résultats des tests de comparaison des moyennes Tukey (P < 0,05).

Chapitre VI

6. Les effets de la digestion anaérobie des produits organiques apportés sur le complexe adsorbant et la structure des Luvisols

La stabilité des agrégats et la Capacité d'Echange en Cations Effective (CECE) des sols incubés ont été mesurées à l'issue des incubations 2 et 3 après 178 et 265 jours d'incubation respectivement et sur des réplicas lors de l'incubation 5 après 12 et 55 jours d'incubation (Figure 61). Les échantillons de sol qui ont été incubés proviennent du même lot du sol Purpan.

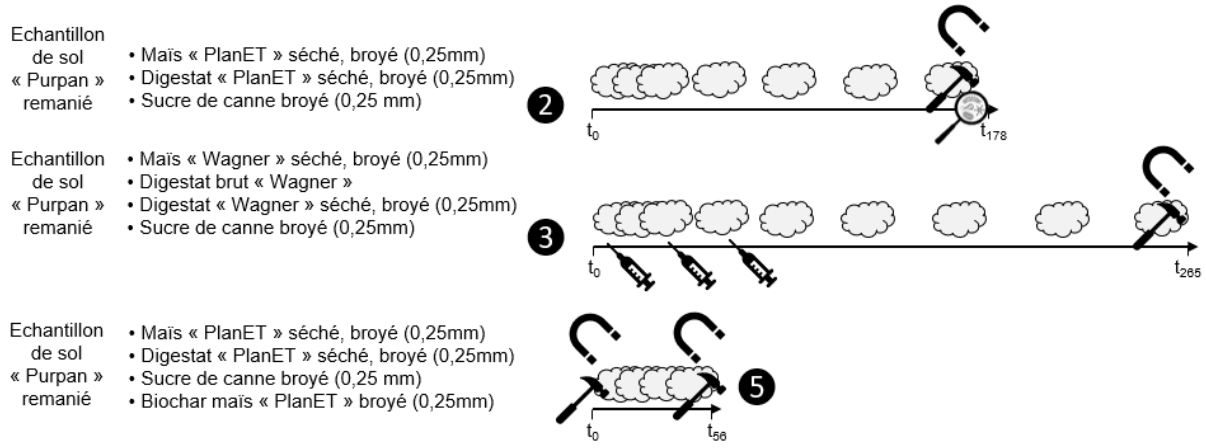


Figure 61 : Plan d'expériences des incubations n°2, 3 et 5

Lors de l'incubation n°5, une modalité avec l'apport de biochar de maïs a été introduite. Cette modalité a pour objectif d'évaluer l'effet de l'apport d'un produit organique très peu biodégradable (0,36% des matières organiques apportées biodégradées après 56 jours d'incubation, données non montrées), stimulant peu l'activité microbienne (absence d'effet « priming » après 56 jours d'incubation, données non montrées) mais augmentant fortement le stock en carbone, sur la structure et le complexe adsorbant des Luvisols.

6.1. Les effets des apports en produits organiques sur le complexe adsorbant des sols

L'étude bibliographique a souligné l'absence de référence concernant l'effet de l'apport de digestat sur le complexe d'adsorption des sols. La CECE des sols amendés par l'apport de digestat pourrait être augmentée en raison :

- Du stockage en matières organiques dans les sols à la suite de l'apport en digestats ;
- De la CECE des matières organiques des digestats.

6.1.1. Résultats

6.1.1.1. Effet des apports en produits organiques sur la Capacité d'Echange en Cations Effective (CECE) des sols

L'apport de maïs, de digestat et de sucre induit une augmentation de la CECE des sols comparativement à la modalité Témoin (Tableau 19). L'augmentation croît, en fonction des modalités, dans l'ordre suivant : Sucre = Maïs < Digestat. L'augmentation des CECE pour les modalités Digestat PlanET et Wagner sont durables puisqu'elles sont supérieures respectivement de 44%, 44%, 44% et 30% par rapport aux Témoins, 11, 55, 178 et 265 jours après l'apport. Les augmentations des CECE qu'entraine l'apport de maïs ou de sucre ne sont pas durables puisque leurs valeurs sont statistiquement identiques à celles des Témoins à l'issue des incubations n°2 et 3. L'apport de biochar ne modifie pas la CECE du sol comparativement au Témoin (Tableau 19).

Pour la modalité Témoin, correspondant au sol Purpan non amendé, la CECE moyenne mesurée lors de l'incubation n°5 (11ème jour d'incubation) est significativement supérieure de 24% aux CECE mesurées lors pour les incubations n°5, 2 et 3 correspondants à des durées d'incubation de 55, 178 et 265 jours respectivement (Tableau 19, résultat du test Tukey non montré). Une tendance similaire est observée pour les autres modalités.

n° incubation	Durée incubation (Jours)	Modalité (mélange sol/produit organique)						
		Témoin	Digestat		Maïs		Sucre	Biochar
			PlanET	Wagner	PlanET	Wagner		
5	11	7,1 C	10,3 A	-	8,0 B	-	8,2 B	7,3 C
	55	5,7 C	8,1 A	-	6,6 B	-	6,3 B	5,7 C
2	178	5,8 B	8,3 A	-	5,9 B	-	6,2 B	-
3	265	5,9 B	-	7,7 A	-	6,3 AB	-	-

Tableau 19 : Capacité d'Echange en Cations Effective au pH du sol à l'issue des incubations n°5, 2 et 3 (CECE, en cmolc+.kg_{solsec}^{-1}). Les lettres en capitales référent à la comparaison des traitements d'une même incubation d'après le test Tukey (P<0,05).

n° et durée incubation (Jours)	Modalité (mélange sol/produit organique)	Ca	Mg	K	Na	Taux de saturation CECE (Ca + Mg + K + Na)
n°5 (11 jours)	Témoin	74,5 A	12,5 A	3,7 D	0,9 B	91,6 A
	Digestat PlanET	53,8 B	11,9 A	11,4 A	11,7 A	88,8 A
	Maïs PlanET	74,8 A	13,8 A	6,2 C	1,4 B	96,1 A
	Sucre	56,3 B	10,0 B	3,0 D	0,8 B	70,2 B
	Biochar	70,88 A	13,0 A	7,9 B	1,0 B	92,7 A
n°2 (178 jours)	Témoin	82,2 A	13,9 A	4,9 C	0,9 B	101,9 A
	Digestat PlanET	73,3 A	15,7 A	13,3 A	15,0 A	117,3 A
	Maïs PlanET	81,4 A	14,0 A	9,4 B	0,9 B	105,2 A
	Sucre	87,8 A	13,0 A	4,6 C	0,8 B	106,3 A
n°3 (265 jours)	Témoin	95,5 A	15,4 A	6,2 B	0,8 A	117,9 A
	Digestat Wagner	82,6 A	18,4 A	16,6 A	0,9 A	117,9 A
	Maïs Wagner	91,8 A	16,5 A	8,2 B	0,8 A	112,4 A

Tableau 20 : Cations basiques échangeables (en % de la CECE) et Taux de saturation (Somme de Ca, Mg, K et Na en % de la CECE) au pH des sols à l'issue des incubations n°5, 2 et 3. Les lettres en capitales référent à la comparaison des traitements d'une même incubation d'après le test Tukey (P<0,05).

6.1.1.2. Effet des apports en produits organiques sur les cations échangeables et sur le taux de saturation

Pour la modalité Témoin, le complexe adsorbant est considéré comme saturé à l'issue des incubations n°5, 2 et 3, soit après 11, 178 et 265 jours d'incubation car le taux de saturation est proche de 100% (Tableau 20). Les différents taux de saturation mesurés à l'issue des incubations n°5, 2 et 3 : 91,6%, 101,9%, 117,9% ne sont pas statistiquement différents (résultat du test Tukey non montré). La saturation du complexe adsorbant est cohérente avec la faible acidité du pH (6,7) des échantillons du sol Purpan (Tableau 5, Duchaufour, 2001). Le complexe adsorbant est majoritairement saturé par les cations bivalents calcium. Les cations monovalents potassium et sodium sont très minoritaires.

Le taux de saturation du complexe adsorbant est identique pour les modalités Maïs et Digestat à l'issue des incubations n°5, 2 et 3 (Tableau 20).

L'apport de sucre diminue ponctuellement le taux de saturation lors de l'incubation n°5, à l'issue du 11ème jour d'incubation (Tableau 20). Cette diminution du taux de saturation (de 24% par rapport au témoin) est accompagnée par une diminution des proportions des charges cationiques échangeables de 24%, 20%, 19% et 11% par rapport au Témoin respectivement pour le calcium, le magnésium, le potassium et le sodium.

L'apport de digestat Wagner (incubation 3) modifie la composition du complexe adsorbant en multipliant par 2,7 la proportion de potassium échangeable observée sur le Témoin (Tableau 20). Ce résultat est confirmé par les incubations n°2 et 5, avec l'apport de digestat PlanET, à l'issue desquelles les proportions en potassium échangeable sont respectivement 3,1 et 2,7 fois plus importantes que celles des Témoins. On peut noter qu'avec l'apport du digestat PlanET, les proportions de sodium échangeable ont été largement augmentées en multipliant par 12 et 15 respectivement celles observées sur les Témoins à l'issue des incubations n°2 et 5.

6.1.2. Discussion

Les apports de digestat, de maïs ou de sucre ont induit une augmentation de la CECE des sols amendés par rapport aux sols non amendés. En revanche, l'apport de biochar n'entraine pas de modification de la CECE.

L'augmentation de la CECE des sols, entrainée par l'apport des digestats PlanET et Wagner est attribuée à la CECE intrinsèque de leurs matières organiques (Tableau 21). Les CECE des digestats PlanET et Wagner sont de 89,9 et de 103,2 $cmol_{c+}.kg^{-1}$ respectivement (Tableau 21). A titre de comparaison, les CEC des matières organiques stables des sols sont

estimées entre 200 à 500 $cmol_{c+}.kg^{-1}$ (Duchaufour, 2001). L'apport de digestat PlanET a été de 15,3 $g.kg_{sol}^{-1}$ lors de l'incubation n°2, soit une augmentation potentielle de la CECE du sol amendé de 1,4 $cmol_{c+}/kg_{sol}^{-1}$. Cette valeur est proche de l'augmentation de la CECE observée (+3,2 $cmol_{c+}/kg_{sol}^{-1}$, Tableau 19) 11 jours après l'apport du digestat PlanET en comparaison de la modalité Témoin. La CECE intrinsèque des digestats est attribuée à la création, durant la digestion anaérobie, de charges électriques négatives portées par les matières organiques oxydées (Calvet *et al.*, 2015). Le complexe d'absorption créé durant la digestion est insaturé avec des taux de saturation de 51 et de 29% de la CECE respectivement pour les digestats PlanET et Wagner. Deux hypothèses peuvent expliquer cette insaturation de la CECE des digestats : la CECE créée est plus importante que la quantité de cations libérés lors de la minéralisation des matières organiques et/ou le taux de saturation calculé est faussé par la non prise en compte des ions NH_4^+ présents dans le digesteur (Möller & Müller, 2012) et potentiellement fixés sur le complexe adsorbant.

La composition du complexe adsorbant du digestat PlanET est caractérisé par une forte proportion de sodium (22% de la CECE). Cette forte proportion de sodium est attribuée à l'utilisation de soude afin de compenser l'acidogenèse au sein du digesteur induite par la digestion d'une ration uniquement composée de maïs. La présence de soude dans le digestat PlanET est artificielle et ne reflète pas le fonctionnement normal d'un digesteur à la ferme. Le complexe adsorbant du digestat Wagner, issu d'une installation à la ferme, n'a pas de sodium (Tableau 21). La conduite du digesteur Wagner ne nécessite pas l'utilisation de soude puisque son pH est tamponné par l'ajout de fumier dans sa ration. L'importante proportion de potassium au sein des complexes adsorbants des digestats PlanET et Wagner (23 et 22% de la CECE respectivement) est attribuée à la forte proportion de potassium au sein des maïs utilisés pour le rationnement des digesteurs (Tableau 7). L'addition de la CECE des digestats à la CECE des sols Témoins permet d'expliquer l'augmentation des proportions en potassium (et en sodium pour la modalité PlanET) au sein des complexes adsorbants des sols amendés (Tableau 20). A l'inverse, l'augmentation de la CECE induite par l'apport de sucre (Tableau 19) et la faible quantité de cations apportés (Tableau 7) conduit à une diminution du taux de saturation du complexe adsorbant (Tableau 20).

Les CECE des matières organiques des maïs et du sucre sont nulles (Tableau 21). L'augmentation transitoire de la CECE induite par l'apport dans les sols de maïs et de sucre est attribuée à la création, durant la biodégradation des matières organiques dans le sol, de charges électriques négatives portées par les matières organiques oxydées (Calvet *et al.*, 2015). Cette augmentation de CECE est transitoire en raison de la faible stabilité des matières organiques apportées par le maïs et le sucre (Tableau 17).

La valeur négative pour la modalité biochar est attribuée à un biais méthodologique (Tableau 21). La centrifugation appliquée à la solution d'extraction n'a pas permis de précipiter l'ensemble des particules de matières organiques faussant ainsi la mesure de la concentration en cobalthexamine par spectroscopie d'adsorption. Il est probable que la CECE du biochar soit nulle, en cohérence avec l'absence de différence de la CECE entre les sols amendés avec le biochar et les sols non amendés (Tableau 19). L'absence de biodégradation des matières organiques du biochar dans les sols ne permet pas la création de charges électriques négatives. La CEC des biochars récemment produits est en général faible (Slavich *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2014) mais augmente une fois qu'ils sont amendés au sol en raison de l'augmentation des groupes fonctionnels oxygénés sur leur surface associés à des processus biotiques et abiotiques (Liang *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2006). La durée d'incubation des sols a été probablement trop courte pour observer une modification de la CEC du sol à la suite de l'apport de biochar.

Produit organique		CECE	Ca	Mg	K	Na	Taux de saturation CECE (Ca + Mg + K + Na)
Digestat	PlanET	89,9 A	2 A	4 A	23 A	22 A	51 A
	Wagner	103,2 A	2 A	6 A	20 A	0 B	29 B
Maïs	PlanET	1,4 B	-				
	Wagner	-0,3 B					
Sucre		1,9 B					
Biochar		-24,3 C					

Tableau 21 : Cations échangeables (en % de la CECE), cations basiques échangeables (en % de la CECE) et taux de saturation (Somme de Ca, Mg, K et Na en % de la CECE) au pH des produits organiques apportés (séchés, broyés, tamisés). Les lettres en capitales réfèrent à la comparaison des modalités d'après le test Tukey (P<0,05). Les cations basiques échangeables dosés n'ont pas pu être exprimés en % de la CECE pour les produits organiques dont la CECE est inférieure ou égale à zéro (valeurs aberrantes).

6.2. Evolution de la stabilité structurale au cours de la décomposition des produits organiques

L'objectif est de comparer l'effet améliorant sur la stabilité structurale de l'apport de digestats de maïs par rapport à l'apport de maïs. Cet effet améliorant serait potentiellement moins élevé pour les digestats en raison :

- de la plus faible biodégradabilité des matières organiques résiduelles de la digestion anaérobie entrainant une plus faible activité microbienne ;
- de la présence de cations monovalents dans les digestats.

6.2.1. Résultats

La présentation des résultats est scindée en deux parties. La première partie a pour objectif de préciser la signification des différents tests de stabilité structurale utilisés à travers l'interprétation des résultats pour les sols non amendés. La seconde partie présente les résultats obtenus pour les sols amendés.

6.2.1.1. Evolution de la stabilité structurale des sols de la modalité contrôle

Trois tests ont été appliqués afin de rendre compte du comportement des agrégats du sol dans les différentes conditions climatiques et hydriques que l'on peut rencontrer à la surface du sol (Figure 62):

- par désagrégation mécanique (agitation dans l'eau d'agrégats préalablement humectés dans l'éthanol) ;
- par humectation lente (à l'eau par capillarité) ;
- par humectation rapide (immersion d'agrégats secs dans l'eau).

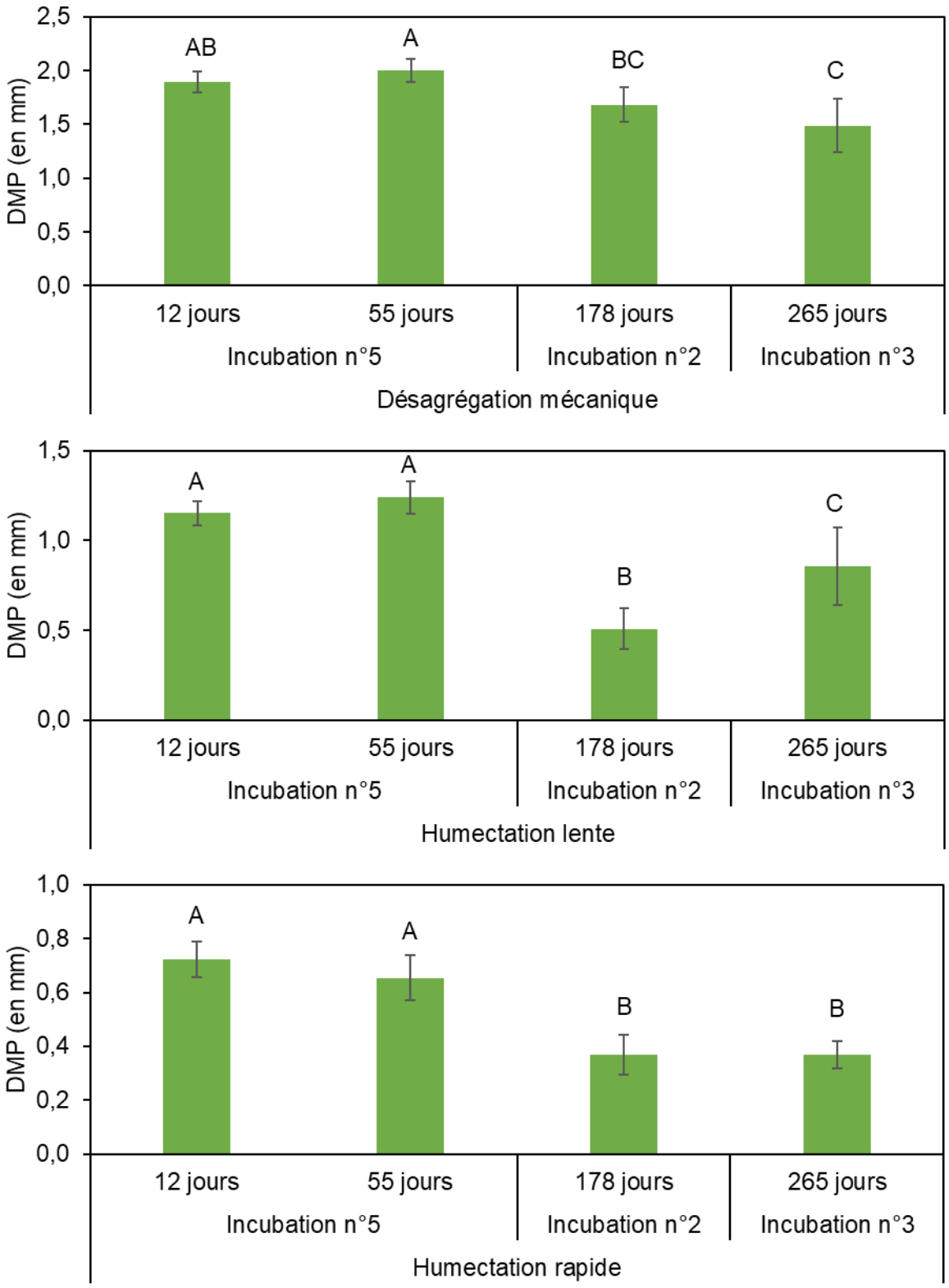


Figure 62 : Evolution de la stabilité des agrégats pour la modalité Témoin, en l'absence d'apport de produit organique, pour le sol Purpan lors des incubations n°5, 2 et 3 après 12, 55, 188 et 265 jours d'incubations ; exprimée d'après le Diamètre Moyen Pondéral après désagrégation (DMP). Les données sont moyennées. Les barres d'erreur illustrent les écart-types. Les lettres en capital indiquent le résultat du Test Tukey (P < 0,05)

Sur l'ensemble des mesures de la stabilité réalisées pour les échantillons de sols non amendés (Témoin, Figure 62), le diamètre moyen pondéré à la suite du test d'humectation lente est significativement 1,8 fois plus important par rapport au test de l'humectation rapide. Le principal mécanisme de désagrégation associé à l'humectation des agrégats est l'éclatement provoqué par l'augmentation de la pression interne de l'air piégé (Le Bissonnais, 1996). L'immersion des agrégats secs dans l'eau est un test permettant d'évaluer le comportement de la structure des sols secs en cas d'une humidification rapide lors d'un orage d'été par exemple (Le Bissonnais, 1996). L'humectation lente par capillarité permet de tester le comportement de matériaux secs soumis à des pluies modérées. Lorsque la vitesse d'humectation est lente, l'éclatement des agrégats est partiel. Il est moins destructif que l'humectation rapide et permet donc de discrimer les sols très peu stables.

Sur l'ensemble des mesures de la stabilité réalisées pour la modalité Témoin (Figure 62), le diamètre moyen pondéré à la suite du test de désagrégation mécanique est significativement 3,3 fois plus important que celui observé lors du test de l'humectation rapide. L'immersion des agrégats dans un liquide moins polaire que l'eau, et miscible à l'eau, tel que l'éthanol permet d'évacuer l'air des micropores et ainsi d'éviter le phénomène d'éclatement lors de la réhumectation. Ce traitement est moins destructif que les deux premiers car il ne fait pas intervenir le mécanisme d'éclatement. Le traitement par désagrégation permet de tester la cohésion mécanique des matériaux humides.

Un classement permettant de qualifier la stabilité des agrégats et par extension leur sensibilité à la battance et à l'érosion en fonction de la moyenne des trois tests a été proposé par Le Bissonnais et Arrouays (1997). Sur l'ensemble des mesures de la stabilité réalisées pour la modalité Témoin (Figure 62), le diamètre moyen pondéré pour les trois tests est de : 1,26, 1,30, 0,90 et 0,95 respectivement après des durées d'incubation de 12, 55, 178 et 265 jours. Ces valeurs placent l'horizon de surface du sol Purpan (préalablement tamisé à 5 mm) dans la catégorie des sols moyennement stables, avec une apparition potentiellement fréquente d'une croute de battance et un risque variable d'érosion en fonction des paramètres climatiques et topographiques. Les diamètres moyens pondérés des trois tests permettent de mettre en évidence une diminution significative ($P < 0,05$) de la stabilité des agrégats après plus de 5 mois d'incubation (Figure 62). Le test de désagrégation mécanique est moyennement corrélé avec les tests d'humectation lente et rapide ($R^2 = 0,53$ et 0,45 respectivement, Tableau 22) alors que les deux tests par humectation sont bien corrélés entre eux ($R^2 = 0,77$, Tableau 22). Ces résultats illustrent l'effet seuil et notamment plafond du test de désagrégation mécanique. Une stabilité maximum a été atteinte durant les incubations en ce qui concerne le test de désagrégation mécanique ; ne permettant pas une bonne

discrimination. Pour cette raison, les résultats des trois tests ne seront pas moyennés dans les paragraphes à suivre.

Tableau 22 : Coefficients de détermination (R^2) des régressions linéaires réalisées entre les trois tests pour l'ensemble des mesures et des modalités de l'étude

R^2	Désagrégation mécanique	Humectation lente	Humectation rapide
Désagrégation mécanique		0,53	0,45
Humectation lente			0,77
Humectation rapide			

6.2.1.2. Evolution de la stabilité structurale des sols amendés

Les résultats de la mesure de la stabilité des agrégats pour les incubations n°5, 2 et 3 à des durées différentes après l'apport en produits organiques (5, 55, 178 et 265 jours respectivement) sont présentés par la Figure 63. Dès le 12ème jour après l'apport des produits organiques, l'augmentation de la stabilité des agrégats est significative par rapport aux sols Témoin. La stabilité des agrégats pour les modalités Maïs et Sucre augmente fortement pour atteindre un Diamètre Moyen Pondéral (DMP) pour les trois tests de 2,3 et 2,5 mm respectivement. D'après Le Bissonnais (1996), un DMP moyen sur les trois tests supérieur à 2,0 mm correspond à des agrégats très stables rendant le risque de battance très faible. L'apport de digestat augmente le DMP moyen sur les trois tests de 19% par rapport au Témoin. Cette augmentation est significative pour les tests d'humectation lente et rapide qui permettent une meilleure discrimination (Le Bissonnais, 1996). L'apport de biochar augmente le DMP moyen sur les trois tests de 10% par rapport au Témoin. Cette différence est significative seulement pour le test d'humectation lente.

Lors du 55ème jour d'incubation, les DMP pour les modalités Maïs et Sucre diminuent par rapport au 12ème jour atteignant en moyenne 2,1 et 2,5 mm. La diminution du DMP pour ces modalités est particulièrement marquée pour les tests par humectation. La modalité Digestat voit le DMP de ses agrégats augmenter par rapport à la précédente mesure ; atteignant une valeur 33% supérieure à celle du Témoin. La différence entre les modalités Témoin et Digestats est significative pour les trois tests ($P < 0,05$). Le DMP des agrégats de la modalité Biochar évolue peu par rapport au Témoin. Il est en moyenne, sur les trois tests, supérieure de 6% à celui des Témoins.

Les mesures des stabilités à l'issue des incubations n°2 et 3, après 178 et 265 jours respectivement, montrent des résultats similaires. La stabilité des agrégats des modalités Maïs et Sucre reste significativement supérieure à celle des Témoin. La stabilité des agrégats de la modalité Digestat reste intermédiaire entre celle des Témoins et des Maïs et Sucre.

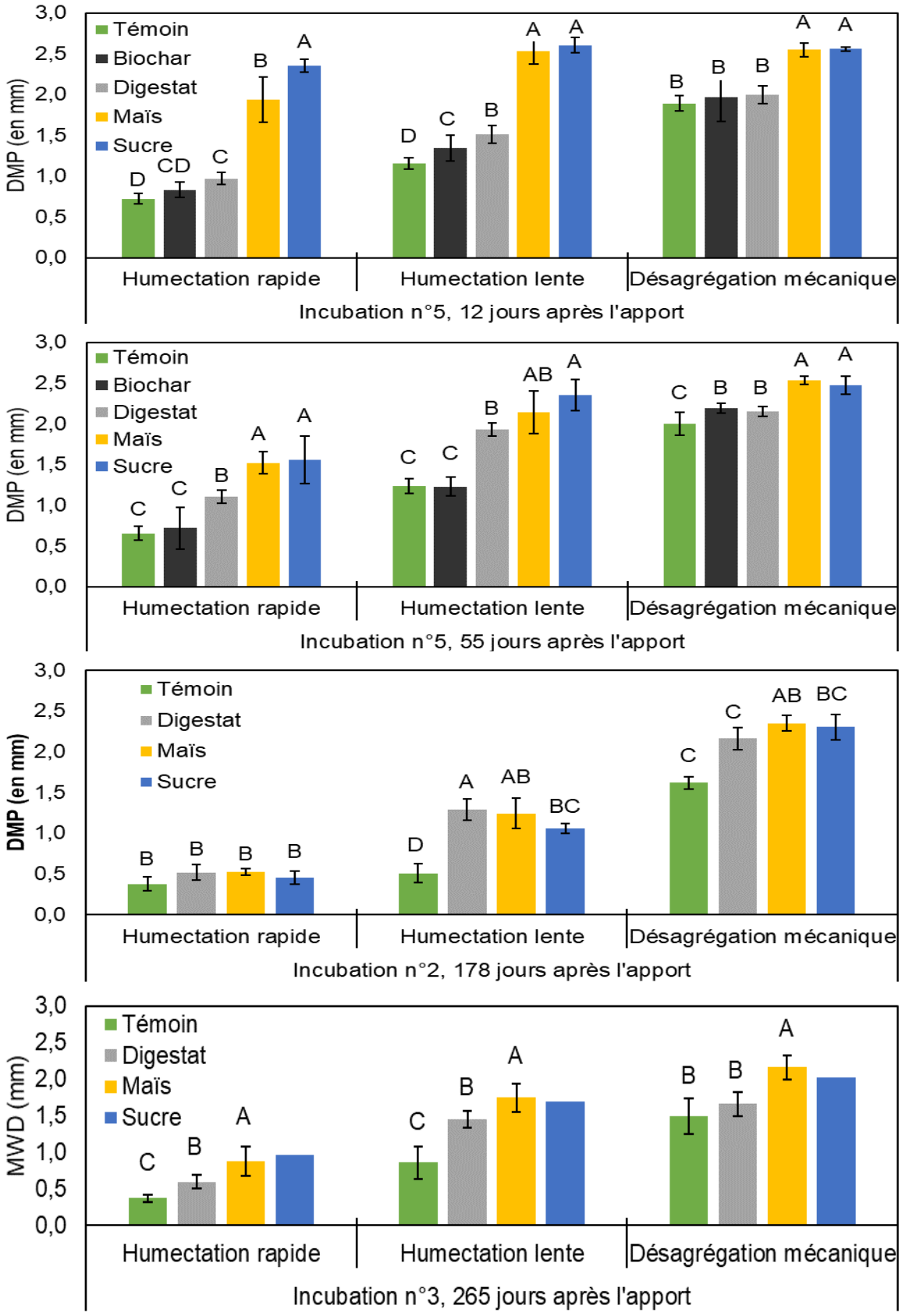


Figure 63 : Evolution de la stabilité des agrégats pour l'ensemble des modalités testées, pour le sol Purpan lors des incubations n°5, 2 et 3 après 12, 55, 188 et 265 jours d'incubations ; exprimée d'après le Diamètre Moyen Pondéral après désagrégation (DMP). Les données sont moyennées. Les barres d'erreur illustrent les écart-types. Les lettres en capital indiquent le résultat du Test Tukey (P < 0,05)

6.2.2. Discussion

6.2.2.1. L'augmentation de l'activité biologique à la suite des apports en produits organiques induit l'augmentation de la stabilité des agrégats des sols

L'augmentation de la stabilité des agrégats semble corrélée avec la labilité des produits organiques apportés (Figure 63). La mesure des coefficients de détermination (R^2) et les coefficients directeurs (a) des régressions linéaires réalisées entre la stabilité des agrégats et la production cumulée de CO_2 sur les 10 jours précédant l'issue des incubations (x) permet de tester cette hypothèse (Tableau 23). Lors de l'incubation n°5, après 12 jours d'incubation, la stabilité des agrégats est fortement corrélée avec l'activité biologique. Les valeurs des coefficients de détermination (R^2) sont de 0,9, 0,9 et 0,7 respectivement pour les humectations rapide et lente et pour la désagrégation mécanique (Tableau 23). La moins bonne corrélation pour le test de désagrégation mécanique s'explique par « l'effet plafond » avec une stabilité structurale maximum atteinte (Le Bissonnais, 1996). Après 55 jours d'incubation, les valeurs des coefficients de détermination (R^2) restent élevées avec : 0,9, 0,8 et 0,6 respectivement pour les humectations rapide et lente et pour la désagrégation mécanique (Tableau 23). Cependant, les valeurs des coefficients directeurs sont environ 6 fois plus élevés après 55 jours d'incubation par rapport au 12ème jour traduisant la persistance de la stabilité des agrégats malgré la diminution de l'activité microbienne. Cette observation est confirmée à l'issue des incubations n°2 et 3 où les coefficients de détermination sont quasi nuls et le plus souvent les coefficients directeurs très élevés (Tableau 23).

L'augmentation de la proportion des cations monovalents potassium (et du sodium pour le digestat PlanET) dans le complexe d'adsorption des sols amendés par les digestats (Tableau 20), restant minoritaires par rapport au calcium, a probablement peu influencé la structure.

Incubation	Durée après l'apport en produits organiques (jours)	f(x) : Stabilité des agrégats					
		Humectation rapide (DMP en mm)		Humectation lente (DMP en mm)		Désagrégation mécanique (DMP en mm)	
		R^{2*}	a**	R^{2*}	a**	R^{2*}	a**
n°5	12	0,9	1,0	0,9	0,9	0,7	0,4
	55	0,9	5,6	0,8	5,9	0,6	2,3
n°2	178	0,0	0,2	0,0	1,6	0,3	5,9
n°3	265	0,4	16,1	0,6	33,6	0,3	19,0

*Coefficient de détermination (R^2)

**Coefficient directeur (a)

Tableau 23 : Coefficients de détermination (R^2) et coefficients directeurs (a) des régressions linéaires réalisées entre la production cumulée de C sur les 10 jours l'issue des incubations (en mgC/gsol sec) (x) et la stabilité des agrégats déterminée à l'issue des incubations d'après les tests d'humectations rapide et lente et de désagrégation mécanique.

6.2.2.2. Les agents agrégeants générés par l'activité biologique expliquent la persistante de la stabilité structurale des sols amendés

D'après Abiven (2004), l'activité biologique est à l'origine de l'amélioration de la stabilité structurale à la suite de l'apport en produits organiques (Figure 63 et Tableau 23) mais ce sont les facteurs agrégeants qui expliquent la persistance de cette amélioration dans le temps. Un modèle en trois phases permet d'expliquer cet persistance. Lors de la première phase, l'activité biologique induite par les différents produits organiques pouvant être apportés va générer des agents agrégeants. Les agents agrégeants identifiés sont les polysaccharides extraits à l'eau chaude, la longueur des hyphes mycéliens, et la biomasse microbienne. La quantité de facteurs agrégeants et le volume de sol concerné vont être plus importants lorsque l'activité biologique est forte. Les champignons se développant lors de cette première phase sont particulièrement efficaces pour produire des polysaccharides dont l'action est peu durable en raison de leur biodégradabilité. La phase 2 correspond au développement d'hyphes mycéliens sur des substrats particuliers comme la cellulose. Le turn-over de la microflore est moins rapide que lors de la phase 1 et les hyphes restent en place plus longtemps. Ces champignons créent un maillage qui rend stable les particules lors de l'application de contraintes fortes. Les polysaccharides toujours présents dans le sol ou récemment excrétés stabilisent les agrégats sous des contraintes d'intensité faible. La phase 3 correspond à l'état final de la stabilité des agrégats, dont la durabilité et l'intensité dépend du nombre, de l'efficacité et de la sensibilité à la biodégradation des facteurs agrégeants présents dans les sols amendés.

La corrélation positive entre les teneurs en polysaccharides et la stabilité des agrégats à l'issue de l'incubation n°2, 178 jours après l'apport en produits organiques, (Figure 64) valide l'existence de la relation entre la stabilité structurale et les facteurs agrégeants de le cadre de notre étude. Toutefois, la relation entre la stabilité structurale et la longueur des hyphes mycéliens n'a pas pu être testée via la méthode utilisée par Abiven (2004) et les corrélations sont faibles à nulles entre les teneurs en PLFA associés au taxon des champignons à l'issue de l'incubation n°2 et la stabilité des agrégats (Figure 65). Il serait pertinent de déterminer si l'abondance en champignon évaluée par la mesure des PLFA est corrélée avec la longueur des hyphes mycéliens.

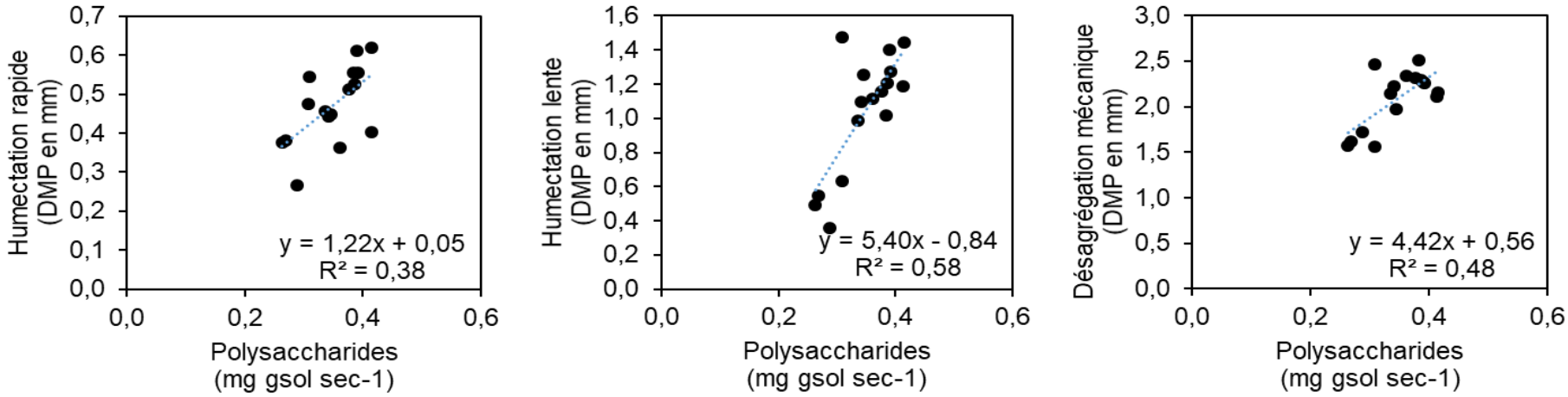


Figure 64 : Corrélations entre les teneurs en polysaccharides des sols à l'issue de l'incubation n°2 et la stabilité des agrégats

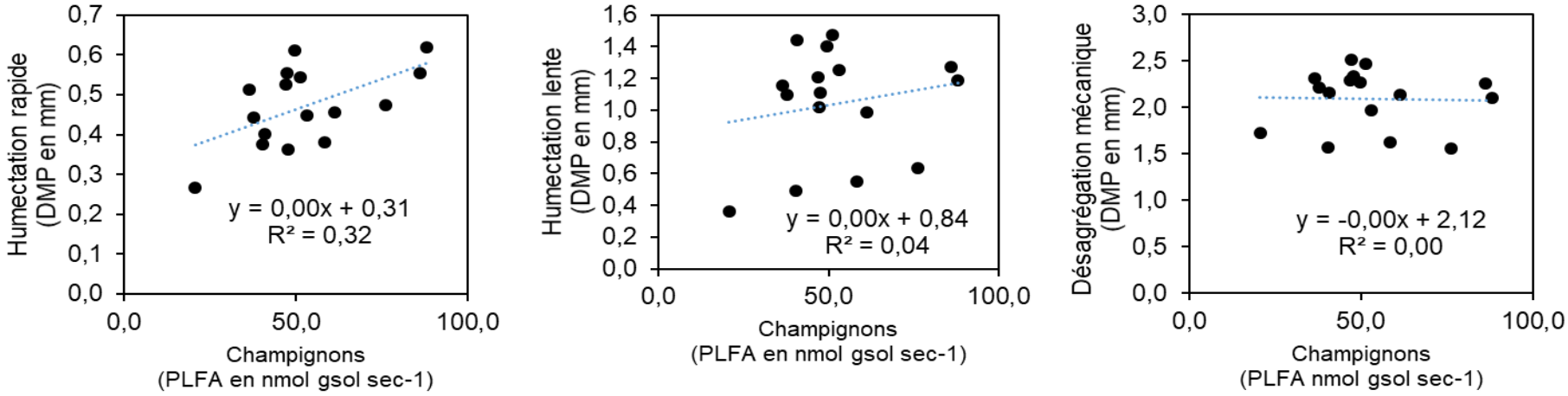


Figure 65 : Corrélations entre les teneurs en PLFA associés au taxon des champignons à l'issue de l'incubation n°2 et la stabilité des agrégats

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de ce travail était d'évaluer les conséquences de la digestion anaérobie d'un produit organique sur différentes propriétés de l'horizon de surface de Luvisols cultivés. Cet objectif s'inscrit dans le cadre du développement de la filière méthanisation en Europe et de l'enjeu du maintien de la fertilité des Luvisols cultivés dans un contexte de changement climatique.

6.3. Principaux résultats de cette étude

L'étude bibliographique a mis en lumière un manque de connaissances concernant les effets de la digestion anaérobie sur les propriétés amendantes des produits organiques. Ces dernières sont définies comme leurs capacités à améliorer les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols. Elles ont été évaluées plus spécifiquement pour le maïs et le digestat de maïs dans notre étude par :

- L'activité microbienne ;
- Le stockage du carbone ;
- La stabilité biologique des matières organiques apportées ;
- Les effets « priming » ;
- La structure des communautés microbiennes ;
- Les teneurs en azote et phosphore dans la phase liquide ;
- La stabilité structurale des agrégats ;
- Le complexe adsorbant.

Au terme de notre travail, la synthèse qui suit propose une mise en relation des différents effets des apports en produits organiques sur les propriétés des sols (Figure 66).

L'activité microbienne a été évaluée par la production de CO_2 des sols. Les apports de maïs ont induit une activité microbienne plus importante par rapport aux apports de digestats de maïs, notamment lors des premières semaines d'incubation. La mesure du potentiel méthanogène du maïs a permis de conclure que les émissions de CO_2 induites lors de la méthanisation sont compensées par la plus faible production de CO_2 des sols amendés par le digestat de maïs par rapport aux sols amendés par le maïs (incubation n°2). Cependant, ce résultat n'a pas pu être confirmé pour les incubations n°3 et 4 car le prélèvement d'échantillons de la phase liquide des sols a conduit à l'exportation de matières organiques dissoutes faussant ainsi le bilan de matière du cycle du carbone. La durée de l'incubation n°5 n'a pas

été suffisante pour évaluer la différence de production de CO_2 entre les sols amendés avec le digestat de maïs et ceux avec le maïs.

La partition de la production de CO_2 issue de la biodégradation des matières organiques endogènes et apportées, évaluée grâce à leur $\delta^{13}C$, a permis de rendre compte des effets « priming » et de la stabilité biologique des matières organiques apportées.

La stabilité biologique des matières organiques des digestats de maïs dans les sols est supérieure à celle des maïs. Ce résultat s'est révélé reproductible pour différentes conditions d'incubation avec : deux maïs et digestats de maïs différents testés, avec deux Luvisols différents testés, au champ et en conditions contrôlées. Le déterminisme existant entre les caractéristiques des produits organiques et la stabilité des matières organiques dans les sols a été confirmé par l'analyse de la stabilité thermique par pyrolyse Rock Eval. L'analyse Rock Eval s'est révélée être un outil potentiellement pertinent pour la prédiction de la stabilité des matières organiques dans les sols.

Les apports de digestats de maïs ont induit un important effet « priming » négatif. Cet effet « priming » négatif explique, selon les incubations, entre 6 à 24% du stockage du carbone induit par leur apport par rapport à un sol non amendé. Par analogie avec l'effet « priming » négatif parfois décrit dans la littérature après l'apport de biochar, nous supposons que la diminution de la minéralisation des matières organiques natives est expliquée par la capacité des matières organiques des digestats à adsorber les enzymes extra-cellulaires des micro-organismes et/ou à adsorber les matières organiques natives favorisant ainsi leur stabilité. Ces hypothèses n'ont pas été directement vérifiées dans le cadre de notre étude et aucun effet « priming » n'a été observé après l'apport du biochar de maïs ne permettant pas d'étudier le phénomène en raisonnant par analogie. Les caractéristiques des biochars semblent évoluer dans le sol après leur apport et il est possible que la durée d'incubation ait été trop courte pour observer un effet « priming » à la suite de l'apport du biochar de maïs.

Les structures des communautés microbiennes ont été déterminées à l'issue des incubations n°2 et 4 (après 142 et 178 jours) par l'analyse des phospholipides des membranes des microorganismes des sols. Il n'a pas été observé d'effet de l'apport du digestat de maïs sur les groupes taxonomiques microbiens alors que les apports de maïs et de sucre ont influencé la composition des communautés microbiennes du sol avec une surreprésentation des phopholipides associés aux taxons des champignons et des protozoaires. Cette surreprésentation a été mise en relation avec la forte activité biologique induite par l'apport de maïs et de sucre ayant probablement augmentée la bactériomasse lors des premières semaines d'incubation. L'augmentation de la bactériomasse a pu induire un développement des microorganismes bactériophages tels que les protozoaires et une stimulation des

champignons à partir de la nécrobactériomasse (Figure 9). Cette modification des communautés microbiennes favorisant le développement des champignons est associée aux effets « priming » positif après l'apport de sucre et neutre (incubation n°3 et 4) à positif (incubation n°2) après l'apport de maïs. L'influence du développement des champignons sur l'effet « priming » réel est probablement expliqué par la croissance de leurs filaments permettant aux hyphes mycéliens d'augmenter le volume de sol colonisé et ainsi de favoriser la biodégradation des matières organiques endogènes.

L'apport des digestats de maïs a induit une augmentation de la Capacité d'Echange en Cations Effective (CECE) des sols expliquée par la CECE intrinsèque des digestats et la stabilité de leurs matières organiques. On peut penser que la digestion anaérobie aurait induit une ionisation des matières organiques des maïs. Dans le cas de l'apport des maïs, nous avons mesurés une faible et ponctuelle augmentation de la CECE des sols probablement expliquée par l'ionisation des matières organiques lors de leur oxydation et leur forte biodégradabilité.

La modification de l'activité microbienne à la suite de l'apport des produits organiques a été associée à l'évolution de la stabilité des agrégats. L'apport de matières organiques labiles a fortement et durablement (au moins jusqu'à 265 jours après l'apport) augmenté la stabilité des agrégats des sols. L'apport des digestat de maïs a moins amélioré la stabilité structurale des agrégats que l'apport des maïs sans doute en raison de la moindre stimulation de l'activité microbienne. La présence de cations monovalents potassium dans les digestats (et sodium pour le digestat PlanET) semble avoir peu influencée la stabilité structurale des sols.

La forte activité biologique à la suite de l'apport de maïs a entrainé une immobilisation attendue de l'N total dissous dans la phase liquide des sols. Au contraire, l'apport de digestat de maïs a induit une augmentation des teneurs en N total dissous dans la phase liquide des sols, associée à la minéralisation progressive des matières organiques apportées. Aucune différence significative n'a été mise en évidence dans les teneurs en P total dissous dans la phase liquide des sols.

L'analyse des matières organiques des sols par pyrolyse Rock Eval, à l'issue des incubations, confirme les résultats de la mesure des productions de CO_2 concernant la quantité de carbone stockée dans les sols après l'apport des produits organiques. Les différents paramètres de l'analyse Rock Eval (indices hydrogènes, oxygènes et les index -I, -R) se sont révélés pertinents pour évaluer l'effet de l'apport de produits organiques sur les caractéristiques des matières organiques des sols.

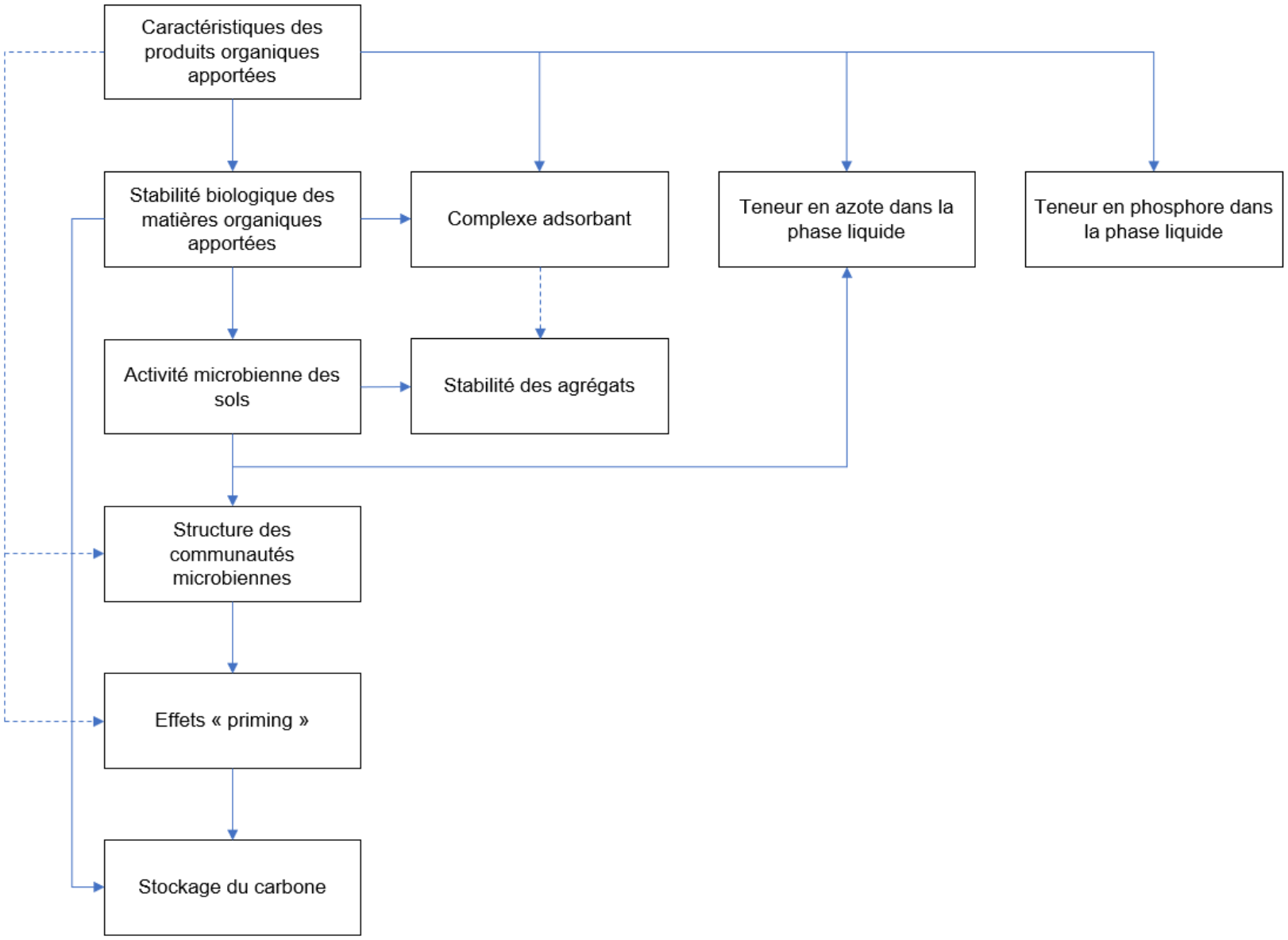


Figure 66 : Illustration des relations entre les propriétés des sols étudiées, modifiées à la suite des apports en produits organiques. Les traits pleins représentent les relations observées et les traits en pointillées représentent les relations supposées.

6.4. Implications agronomiques de cette étude

Au terme de cette étude, il apparait que les digestats de maïs favorisent le stockage de carbone dans les sols et permettent d'augmenter la CECE des sols. Ces qualités s'expliquent notamment par la forte stabilité biologique d'une partie des matières organiques des digestats de maïs. En revanche, cette stabilité implique une stimulation moindre de la vie microbienne des sols par rapport à l'apport de maïs non digéré expliquant une augmentation moindre la stabilité structurale. En conséquence, des préconisations pour la valorisation des digestats de méthanisation sur les Boulbènes dans un contexte d'utilisation agricole peuvent être formulées avec notamment l'apport d'un produit organique, en complément des digestats de méthanisation, contenant des matières organiques labiles afin de fortement stimuler l'activité microbienne des sols et de maximiser ainsi la stabilité des agrégats. Cet apport pourra être réalisé avant les semis de printemps afin de limiter le phénomène de croute de battance. Il pourra s'agir par exemple de la destruction d'un couvert végétal ayant idéalement, un ratio C/N faible pour éviter le phénomène d'immobilisation de l'N et/ou sera accompagné de l'apport d'un digestat brut ou de sa phase liquide. La séparation de phase des digestats de méthanisation peut s'avérer être un outil pertinent pour leur valorisation avec l'obtention d'une phase solide, concentrée en matières organiques, à épandre préférentiellement à l'automne et pouvant augmenter la teneur en matières organiques et la CECE des sols ; et une phase liquide, concentrée en azote soluble, à épandre sur les cultures en tant qu'engrais organique au printemps et à la sortie de l'hiver lorsque cela est techniquement réalisable.

6.5. Limites et perspectives à cette étude

Cette étude présente un certain nombre de limites permettant de proposer des perspectives à ce travail.

La première conclusion majeure de ce travail est le rôle significatif que peut jouer la méthanisation dans la séquestration de carbone dans les sols. Ce résultat a pu être quantifié seulement pour une incubation (n°2) ; lors des autres incubations (n°1, 3, 4 et 5) des biais méthodologiques n'ont pas permis de quantifier la séquestration du C. Il convient donc dans de futures études de consolider la généricité de ce résultat en testant d'autres types de digestats, de sols. La justesse de la quantification de la séquestration de carbone pourrait également être améliorée en maitrisant l'étape de la méthanisation. Ainsi, il serait possible de mesurer directement les émissions de CO_2 (incluant l'oxydation du CH_4) lors la méthanisation plutôt que de les estimer à partir du potentiel méthanogène de la biomasse primaire testée.

La séquestration de carbone dans le cadre du scénario avec la méthanisation est en partie expliquée par l'effet « priming » négatif induit par l'apport des digestats de méthanisation. Les mécanismes de l'effet « priming » négatif restent aujourd'hui assez méconnus (Maestrini *et al.*, 2015) et seulement expliqués dans le cadre de l'apport de biochars (Zimmerman *et al.*, 2011; DeCiucies *et al.*, 2018). Ainsi, une des perspectives de recherche de ces travaux consiste à utiliser les digestats de méthanisation comme modèle pour étudier les mécanismes de l'effet « priming » négatif ; en référence avec les biochars.

La séquestration de carbone dans le cadre du scénario avec la méthanisation est largement expliquée par la stabilité des matières organiques des digestats de méthanisation vis-à-vis de la biodégradation. La méthode d'analyse Rock Eval des matières organiques, testée dans le cadre de ce travaux, pourrait s'avérer être un outil efficace pour évaluer la biodégradabilité des matières organiques apportées. L'étude de la faisabilité d'utiliser cet outil pour prédire la biodégradabilité des matières organiques apportées est une perspective de recherche importante. Cet outil pourrait également permettre de caractériser fonctionnellement les matières organiques des sols en fonction de leur stabilité et de leur labilité.

Les travaux de thèse ont mis en évidence une capacité d'échange en cations intrinsèque des digestats de méthanisation qui, à notre connaissance, n'a jamais été rapportée auparavant. Etant donné son implication concernant la fertilité chimique des sols, il serait intéressant de tester la généricité de ce résultat pour d'autres type de digestats puis, le cas échéant d'identifier les mécanismes chimiques associés à l'augmentation de la capacité d'adsorption des digestats.

Cette étude n'a pas pris en compte d'éventuelles modifications du système d'exploitation induite par l'implantation d'une installation de méthanisation (modification des rotations, introduction de couverts intermédiaires à vocation énergétique etc.) sur les aspects de la fertilité des sols en lien avec le cycle du carbone organique. Des études complémentaires pourraient permettre de les intégrer.

Bibliographie

Bibliographie

Abbasi, T., Tauseef, S.M. & Abbasi, S.A. 2012. A Brief History of Anaerobic Digestion and "Biogas." In: *Biogas Energy* (eds. Abbasi, T., Tauseef, S.M. & Abbasi, S.A.), pp. 11–23. Springer New York, New York, NY.

Abiven, S. 2004. *Relations entre caractéristiques des matières organiques apportées, dynamique de leur décomposition et évolution de la stabilité structurale du sol*. Agrocampus - Ecole nationale supérieure d'agronomie des Rennes.

Abiven, S., Menasseri, S. & Chenu, C. 2009. The effects of organic inputs over time on soil aggregate stability – A literature analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, **41**, 1–12.

Adani, F., Genevini, P., Tambone, F. & Montoneri, E. 2006. Compost effect on soil humic acid: A NMR study. *Chemosphere*, **65**, 1414–1418.

Adhya, T.K., Rath, A.K., Gupta, P.K., Rao, V.R., Das, S.N., Parida, K.M., Parashar, D.C. & Sethunathan, N. 1994. Methane emission from flooded rice fields under irrigated conditions. *Biology and Fertility of Soils*, **18**, 245–248.

AFNOR, N. 1992. X31-501, 1992. *Mesure de la masse volumique apparente d'un échantillon de sol non remanié-Méthode du cylindre*.

AFNOR, N. 1994. NF ISO 11465, 1994. *Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau d'échantillons de sol*.

AFNOR, N. 1996. X31-130, 1993. *Détermination de la capacité d'échange cationique et des cations extractibles. Qualité des sols*, 103–106.

AFNOR. 2005. Norme NF X31-515–Qualité du sol. Mesure de la stabilité d'agrégats de sols pour l'évaluation de la sensibilité à la battance et à l'érosion hydrique.

Ahmad, M., Rajapaksha, A.U., Lim, J.E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., Vithanage, M., Lee, S.S. & Ok, Y.S. 2014. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere*, **99**, 19–33.

Alburquerque, J.A., de la Fuente, C., Ferrer-Costa, A., Carrasco, L., Cegarra, J., Abad, M. & Bernal, M.P. 2012. Assessment of the fertiliser potential of digestates from farm and agroindustrial residues. *Biomass and Bioenergy*, **40**, 181–189.

Alvarez, R. & Alvarez, C.R. 2000. Soil Organic Matter Pools and Their Associations with Carbon Mineralization Kinetics. *Soil Science Society of America Journal*, **64**, 184–189.

Alvarez, R., Díaz, R.A., Barbero, N., Santanatoglia, O.J. & Blotta, L. 1995. Soil organic carbon, microbial biomass and CO2-C production from three tillage systems. *Soil and Tillage Research*, **33**, 17–28.

Alvarez, R. & Lavado, R.S. 1998. Climate, organic matter and clay content relationships in the Pampa and Chaco soils, Argentina. *Geoderma*, **83**, 127–141.

Amelung, W., Brodowski, S., Sandhage-Hofmann, A. & Bol, R. 2008. Chapter 6 Combining Biomarker with Stable Isotope Analyses for Assessing the Transformation and

Turnover of Soil Organic Matter. In: (ed. Agronomy, B.-A. in), pp. 155–250. Academic Press.

Andersson, S., Nilsson, S.I. & Saetre, P. 2000. Leaching of dissolved organic carbon (DOC) and dissolved organic nitrogen (DON) in mor humus as affected by temperature and pH. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**, 1–10.

Andriulo, A., Guérif, J. & Mary, B. 1999. Evolution of soil carbon with various cropping sequences on the rolling pampas. Determination of carbon origin using variations in natural 13C abundance. *Agronomie*, **19**, 349–364.

Arias-Navarro, C., Díaz-Pinés, E., Zuazo, P., Rufino, M.C., Verchot, L.V. & Butterbach-Bahl, K. 2017. Quantifying the contribution of land use to N2O, NO and CO2 fluxes in a montane forest ecosystem of Kenya. *Biogeochemistry*, **134**, 95–114.

Arrêté du 8 août 2019 approuvant deux cahiers des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de digestats de méthanisation agricole en tant que matières fertilisantes | Legifrance. 2019. (At: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2019/8/8/AGRG1926797A/jo/texte. Accessed: 26/9/2019).

Arrouays, D., Deslais, W. & Badeau, V. 2001. The carbon content of topsoil and its geographical distribution in France. *Soil Use and Management*, **17**, 7–11.

Askri, A. 2015. *Valorisation des digestats de méthanisation : Effet sur les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote*. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. (At: http://prodinra.inra.fr/?locale=fr#!ConsultNotice:331883. Accessed: 30/3/2017).

Bååth, E. 2003. The Use of Neutral Lipid Fatty Acids to Indicate the Physiological Conditions of Soil Fungi. *Microbial Ecology*, **45**, 373–383.

Bachmann, S., Gropp, M. & Eichler-Löbermann, B. 2014. Phosphorus availability and soil microbial activity in a 3 year field experiment amended with digested dairy slurry. *Biomass and Bioenergy*, **70**, 429–439.

Bachmann, S., Wentzel, S. & Eichler-Löbermann, B. 2011. Codigested dairy slurry as a phosphorus and nitrogen source for Zea mays L. and Amaranthus cruentus L. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **174**, 908–915.

Baffi, C., Dell'Abate, M.T., Nassisi, A., Silva, S., Benedetti, A., Genevini, P.L. & Adani, F. 2007. Determination of biological stability in compost: A comparison of methodologies. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**, 1284–1293.

Baize, D. & Girard, M.-C. 2008. *Référentiel Pédologique*. Quae. Association française pour l'étude du sol (AFES). (At: https://www.afes.fr/referentiel-pedologique/. Accessed: 23/7/2019).

Balesdent, J., Chenu, C. & Balabane, M. 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil and Tillage Research*, **53**, 215–230.

Barré, P., Plante, A.F., Cécillon, L., Lutfalla, S., Baudin, F., Bernard, S., Christensen, B.T., Eglin, T., Fernandez, J.M., Houot, S., Kätterer, T., Le Guillou, C., Macdonald, A., van Oort, F. & Chenu, C. 2016. The energetic and chemical signatures of persistent soil organic matter. *Biogeochemistry*, **130**, 1–12.

Bastian, F., Bouziri, L., Nicolardot, B. & Ranjard, L. 2009. Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry*, **41**, 262–275.

Bastide, G. 2013. *Estimation des gisements potentiels de substrats utilisables en méthanisation*. ADEME. (At: https://www.ademe.fr/estimation-gisements-potentiels-substrats-utilisables-methanisation. Accessed: 26/9/2019).

B. Atkinson, D. 2003. Solving chemical problems of environmental importance using cavity ring-down spectroscopy. *Analyst*, **128**, 117–125.

Battistuzzi, F.U., Feijao, A. & Hedges, S.B. 2004. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evolutionary Biology*, **4**, 44.

Béghin-Tanneau, R., Guérin, F., Guiresse, M., Kleiber, D. & Scheiner, J.D. 2019. Carbon sequestration in soil amended with anaerobic digested matter. *Soil and Tillage Research*, **192**, 87–94.

Behar, F., Beaumont, V. & Penteado, H.L.D.B. 2001. Rock-Eval 6 Technology: Performances and Developments. *Oil & Gas Science and Technology*, **56**, 111–134.

Bell, J.M., Smith, J.L., Bailey, V.L. & Bolton, H. 2003. Priming effect and C storage in semi-arid no-till spring crop rotations. *Biology and Fertility of Soils*, **37**, 237–244.

Beni, C., Servadio, P., Marconi, S., Neri, U., Aromolo, R. & Diana, G. 2012. Anaerobic Digestate Administration: Effect on Soil Physical and Mechanical Behavior. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **43**, 821–834.

Bernal, M.P., Alburquerque, J.A. & Moral, R. 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*, **100**, 5444–5453.

Bernal, M.P. & Kirchmann, H. 1992. Carbon and nitrogen mineralization and ammonia volatilization from fresh, aerobically and anaerobically treated pig manure during incubation with soil. *Biology and Fertility of Soils*, **13**, 135–141.

Bertora, C., Alluvione, F., Zavattaro, L., van Groenigen, J.W., Velthof, G. & Grignani, C. 2008. Pig slurry treatment modifies slurry composition, N2O, and CO2 emissions after soil incorporation. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 1999–2006.

Blagodatskaya, E.V., Blagodatsky, S.A., Anderson, T.-H. & Kuzyakov, Y. 2009. Contrasting effects of glucose, living roots and maize straw on microbial growth kinetics and substrate availability in soil. *European Journal of Soil Science*, **60**, 186–197.

Blagodatskaya, E., Khomyakov, N., Myachina, O., Bogomolova, I., Blagodatsky, S. & Kuzyakov, Y. 2014. Microbial interactions affect sources of priming induced by cellulose. *Soil Biology and Biochemistry*, **74**, 39–49.

Blagodatskaya, E. & Kuzyakov, Y. 2008. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biology and Fertility of Soils*, **45**, 115–131.

Blagodatsky, S.A., Heinemeyer, O. & Richter, J. 2000. Estimating the active and total soil microbial biomass by kinetic respiration analysis. *Biology and Fertility of Soils*, **32**, 73–81.

Blanco-Canqui, H., Lal, R., Post, W.M., Izaurralde, R.C. & Shipitalo, M.J. 2006. Organic Carbon Influences on Soil Particle Density and Rheological Properties. *Soil Science Society of America Journal*, **70**, 1407–1414.

Bligh, E.G. & Dyer, W.J. 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911–917.

Bosatta, E. & Ågren, G.I. 1999. Soil organic matter quality interpreted thermodynamically. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 1889–1891.

Bossio, D.A., Girvan, M.S., Verchot, L., Bullimore, J., Borelli, T., Albrecht, A., Scow, K.M., Ball, A.S., Pretty, J.N. & Osborn, A.M. 2005. Soil Microbial Community Response to Land Use Change in an Agricultural Landscape of Western Kenya. *Microbial Ecology*, **49**, 50–62.

Bronick, C.J. & Lal, R. 2005. Soil structure and management: a review. *Geoderma*, **124**, 3–22.

Brown, R., Campo, B. del, Boateng, A.A. & And, M.G.-P. 2015. Fundamentals of biochar production Ondrˇej Mašek. *Biochar for Environmental Management*, (At: https://www.taylorfrancis.com/. Accessed: 20/11/2019).

Calderón, F.J., Jackson, L.E., Scow, K.M. & Rolston, D.E. 2001. Short-Term Dynamics of Nitrogen, Microbial Activity, and Phospholipid Fatty Acids after Tillage. *Soil Science Society of America Journal*, **65**, 118–126.

Calvet, R., Chenu, C. & Houot, S. 2015. *Les matières organiques des sols*. Éditions France Agricole. (At: http://excerpts.numilog.com/books/9782855573793.pdf. Accessed: 5/4/2017).

Campbell, C.A., Paul, E.A., Rennie, D.A. & McCallum, K.J. 1967. Applicability of the Carbon-Dating Method of Analysis to Soil Humus Studies. *Soil Science*, **104**, 217–224.

Carrie, J., Sanei, H. & Stern, G. 2012. Standardisation of Rock–Eval pyrolysis for the analysis of recent sediments and soils. *Organic Geochemistry*, **46**, 38–53.

Carter, M.R. & Gregorich, E.G. 2007. *Soil Sampling and Methods of Analysis, Second Edition*. CRC Press.

Cavalli, D., Cabassi, G., Borrelli, L., Geromel, G., Bechini, L., Degano, L. & Marino Gallina, P. 2016. Nitrogen fertilizer replacement value of undigested liquid cattle manure and digestates. *European Journal of Agronomy*, **73**, 34–41.

Cayuela, M.L., Oenema, O., Kuikman, P.J., Bakker, R.R. & Van GROENIGEN, J.W. 2010. Bioenergy by-products as soil amendments? Implications for carbon sequestration and greenhouse gas emissions. *GCB Bioenergy*, **2**, 201–213.

Chapman, S.J. 1997. Barley straw decomposition and S immobilization. *Soil Biology and Biochemistry*, **29**, 109–114.

Chen, R., Blagodatskaya, E., Senbayram, M., Blagodatsky, S., Myachina, O., Dittert, K. & Kuzyakov, Y. 2012. Decomposition of biogas residues in soil and their effects on microbial growth kinetics and enzyme activities. *Biomass and Bioenergy*, **45**, 221–229.

Chen, R., Senbayram, M., Blagodatsky, S., Myachina, O., Dittert, K., Lin, X., Blagodatskaya, E. & Kuzyakov, Y. 2014. Soil C and N availability determine the priming effect: microbial

N mining and stoichiometric decomposition theories. *Global Change Biology*, **20**, 2356–2367.

Chen, R., Senbayram, M., Lin, X. & Dittert, K. 2011. Origin of positive δ13C of emitted CO2 from soils after application of biogas residues. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 2194–2199.

Cheng, C.-H., Lehmann, J., Thies, J.E., Burton, S.D. & Engelhard, M.H. 2006. Oxidation of black carbon by biotic and abiotic processes. *Organic Geochemistry*, **37**, 1477–1488.

Chenu, C., Angers, D.A., Barré, P., Derrien, D., Arrouays, D. & Balesdent, J. 2019. Increasing organic stocks in agricultural soils: Knowledge gaps and potential innovations. *Soil and Tillage Research*, **188**, 41–52.

Chenu, C., Le Bissonnais, Y. & Arrouays, D. 2000. Organic Matter Influence on Clay Wettability and Soil Aggregate Stability. *Soil Science Society of America Journal*, **64**, 1479–1486.

Christensen, M.L., Hjorth, M. & Keiding, K. 2009. Characterization of pig slurry with reference to flocculation and separation. *Water research*, **43**, 773–783.

Ciesielski, H., Sterckeman, T., Santerne, M. & Willery, J.P. 1997. Determination of cation exchange capacity and exchangeable cations in soils by means of cobalt hexamine trichloride. Effects of experimental conditions. *Agronomie*, **17**, 1–7.

Coleman, K. & Jenkinson, D.S. 1996. RothC-26.3-A Model for the turnover of carbon in soil. In: *Evaluation of soil organic matter models*, pp. 237–246. Springer.

Cottes, J., Saquet, A., Palayret, L., Husson, O., Beghin, R., Allen, D., Scheiner, J., Cabanes, C. & Guiresse, M. 2019. Effects of soil redox potential (Eh) and pH on growth of sunflower and wheat. *Archives of Agronomy and Soil Science*, **0**, 1–15.

Couëdel, A., Alletto, L., Tribouillois, H. & Justes, É. 2018. Cover crop crucifer-legume mixtures provide effective nitrate catch crop and nitrogen green manure ecosystem services. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **254**, 50–59.

Cross, A. & Sohi, S.P. 2011. The priming potential of biochar products in relation to labile carbon contents and soil organic matter status. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 2127–2134.

Crow, S.E., Sulzman, E.W., Rugh, W.D., Bowden, R.D. & Lajtha, K. 2006. Isotopic analysis of respired CO2 during decomposition of separated soil organic matter pools. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 3279–3291.

Curtis, T.P. & Sloan, W.T. 2005. Exploring Microbial Diversity--A Vast Below. *Science*, **309**, 1331–1333.

Dai, H., Chen, Y., Liu, K., Li, Z., Qian, X., Zang, H., Yang, X., Zhao, Y., Shen, Y., Li, Z. & Sui, P. 2019. Water-stable aggregates and carbon accumulation in barren sandy soil depend on organic amendment method: A three-year field study. *Journal of Cleaner Production*, **212**, 393–400.

Davidson, E.A., Savage, K., Verchot, L.V. & Navarro, R. 2002. Minimizing artifacts and biases in chamber-based measurements of soil respiration. *Agricultural and Forest Meteorology*, **113**, 21–37.

Decaëns, T. 2010. Macroecological patterns in soil communities. *Global Ecology and Biogeography*, **19**, 287–302.

DeCiucies, S., Whitman, T., Woolf, D., Enders, A. & Lehmann, J. 2018. Priming mechanisms with additions of pyrogenic organic matter to soil. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **238**, 329–342.

Dell'Abate, M.T., Canali, S., Trinchera, A., Benedetti, A. & Sequi, P. 1998. Thermal analysis in the evaluation of compost stability: a comparison with humification parameters. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, **51**, 217–224.

Dexter, A.R. 1988. Advances in characterization of soil structure. *Soil and tillage research*, **11**, 199–238.

D'Hose, T., Molendijk, L., Van Vooren, L., van den Berg, W., Hoek, H., Runia, W., van Evert, F., ten Berge, H., Spiegel, H., Sandèn, T., Grignani, C. & Ruysschaert, G. 2018. Responses of soil biota to non-inversion tillage and organic amendments: An analysis on European multiyear field experiments. *Pedobiologia*, **66**, 18–28.

Dimassi, B., Mary, B., Wylleman, R., Labreuche, J., Couture, D., Piraux, F. & Cohan, J.-P. 2014. Long-term effect of contrasted tillage and crop management on soil carbon dynamics during 41 years. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **188**, 134–146.

Ding, W., Dong, X., Ime, I.M., Gao, B. & Ma, L.Q. 2014. Pyrolytic temperatures impact lead sorption mechanisms by bagasse biochars. *Chemosphere*, **105**, 68–74.

Disnar, J.R., Guillet, B., Keravis, D., Di-Giovanni, C. & Sebag, D. 2003. Soil organic matter (SOM) characterization by Rock-Eval pyrolysis: scope and limitations. *Organic Geochemistry*, **34**, 327–343.

DuBois, Michel., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, Fred. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350–356.

Duchaufour, P. 2001. Introduction à la science du sol. 6ème édition de l'Abrégé de pédologie. *Dunod. Ed. Masso, Paris*, 31–32.

Duparque, A., Tomis, V. & Desheulles, F. 2016. *Gérer l'état organique des sols dans les exploitations agricoles*. AGRO TRANSFERT.

Ellert, B.H. & Bettany, J.R. 1992. Temperature Dependence of Net Nitrogen and Sulfur Mineralization. *Soil Science Society of America Journal*, **56**, 1133–1141.

Ernst, G., Müller, A., Göhler, H. & Emmerling, C. 2008. C and N turnover of fermented residues from biogas plants in soil in the presence of three different earthworm species (Lumbricus terrestris, Aporrectodea longa, Aporrectodea caliginosa). *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 1413–1420.

Escudie, R. & Cresson, R. 2017. Méthanisation de la biomasse. *Ref : TIP140WEB - "Bioprocédés,"* (At: https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/42161210-bioprocedes-dans-les-domaines-de-l-energie-et-de-l-environnement/download/bio5100/methanisation-de-la-biomasse.html. Accessed: 25/9/2019).

Espitalié, J., Laporte, J.L., Madec, M., Marquis, F., Leplat, P., Paulet, J. & Boutefeu, A. 1977. Méthode rapide de caractérisation des roches mètres, de leur potentiel pétrolier et de leur degré d'évolution. *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, **32**, 23–42.

Fanin, N., Hättenschwiler, S. & Fromin, N. 2014. Litter fingerprint on microbial biomass, activity, and community structure in the underlying soil. *Plant and Soil*, **379**, 79–91.

Favrot, J.C., Bouzigues, R., Tessier, D. & Valles, V. 1992. Contrasting structures in the subsoil of the boulbènes of the Garonne basin, France. *Geoderma*, **53**, 125–137.

Fernández, J.M., Plaza, C., Polo, A. & Plante, A.F. 2012. Use of thermal analysis techniques (TG–DSC) for the characterization of diverse organic municipal waste streams to predict biological stability prior to land application. *Waste Management*, **32**, 158–164.

Fierer, N., Schimel, J.P. & Holden, P.A. 2003. Influence of Drying–Rewetting Frequency on Soil Bacterial Community Structure. *Microbial Ecology*, **45**, 63–71.

Fontaine, S., Barot, S., Barré, P., Bdioui, N., Mary, B. & Rumpel, C. 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature*, **450**, 277.

Fontaine, S., Henault, C., Aamor, A., Bdioui, N., Bloor, J.M.G., Maire, V., Mary, B., Revaillot, S. & Maron, P.A. 2011. Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 86–96.

Fontaine, S., Mariotti, A. & Abbadie, L. 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 837–843.

Fouda, S., von Tucher, S., Lichti, F. & Schmidhalter, U. 2013. Nitrogen availability of various biogas residues applied to ryegrass. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **176**, 572–584.

Frøseth, R.B., Bakken, A.K., Bleken, M.A., Riley, H., Pommeresche, R., Thorup-Kristensen, K. & Hansen, S. 2014. Effects of green manure herbage management and its digestate from biogas production on barley yield, N recovery, soil structure and earthworm populations. *European Journal of Agronomy*, **52, Part B**, 90–102.

Frostegård, A. & Bååth, E. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*, **22**, 59–65.

Fuente, C. de la, Alburquerque, J.A., Clemente, R. & Bernal, M.P. 2013. Soil C and N mineralisation and agricultural value of the products of an anaerobic digestion system. *Biology and Fertility of Soils*, **49**, 313–322.

Gaillard, V., Chenu, C. & Recous, S. 2003. Carbon mineralisation in soil adjacent to plant residues of contrasting biochemical quality. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 93–99.

Gans, J., Wolinsky, M. & Dunbar, J. 2005. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. *Science*, **309**, 1387–1390.

García, C., Hernandez, T. & Costa, F. 1991. The influence of composting on the fertilizing value of an aerobic sewage sludge. *Plant and Soil*, **136**, 269–272.

Garg, R.N., Pathak, H., Das, D.K. & Tomar, R.K. 2005. Use of Flyash and Biogas Slurry for Improving Wheat Yield and Physical Properties of Soil. *Environmental Monitoring and Assessment*, **107**, 1–9.

Gasse, F., Disnar, J.-R., Ferry, L., Gibert, E., Kissel, C., Laggouin-defarge, F., Lallier-Verges, E., Miskovsky, J.-C., Ratsimbazafy, B. & Ranaivo, F. 1994. A 36 ka environmental record in the southern tropics: Lake Tritrivakely (Madgascar). *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 2. Sciences de la terre et des planètes*, **318**, 1513–1519.

Gavalda, D. 2001. *Devenir des éléments traces métalliques dans les boulbènes (luvi-redoxisol) après épandage de boues granulées*. Thesis, Toulouse, INPT. (At: http://www.theses.fr/2001INPT007A. Accessed: 18/10/2019).

Gavalda, D., Scheiner, J.D., Revel, J.C., Merlina, G., Kaemmerer, M., Pinelli, E. & Guiresse, M. 2005. Agronomic and environmental impacts of a single application of heat-dried sludge on an Alfisol. *Science of The Total Environment*, **343**, 97–109.

Gillespie, A.W., Sanei, H., Diochon, A., Ellert, B.H., Regier, T.Z., Chevrier, D., Dynes, J.J., Tarnocai, C. & Gregorich, E.G. 2014. Perennially and annually frozen soil carbon differ in their susceptibility to decomposition: Analysis of Subarctic earth hummocks by bioassay, XANES and pyrolysis. *Soil Biology and Biochemistry*, **68**, 106–116.

di-Giovanni, C., Disnar, J.R., Bichet, V., Campy, M. & Guillet, B. 1998. Geochemical characterization of soil organic matter and variability of a postglacial detrital organic supply (chaillexon lake, france). *Earth Surface Processes and Landforms*, **23**, 1057–1069.

Girard, M.-C., Walter, C., Rémy, J.-C., Berthelin, J. & Morel, J.-L. 2011. *Sols et environnement-2e édition-Cours, exercices et études de cas-Livre+ compléments en ligne: Cours, exercices corrigés et études de cas*. Dunod.

Glaser, B. & Birk, J.J. 2012. State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (terra preta de Índio). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **82**, 39–51.

Gobat, J.M., Aragno, M. & Matthey, W. 2003. Le sol vivant. Bases de pédologie - Biologie des sols. *Biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne Coll Gérer l'environnement*, **14**, 569.

Goberna, M., Podmirseg, S.M., Waldhuber, S., Knapp, B.A., García, C. & Insam, H. 2011. Pathogenic bacteria and mineral N in soils following the land spreading of biogas digestates and fresh manure. *Applied Soil Ecology*, **49**, 18–25.

Gollany, H.T., Schumacher, T.E., Evenson, P.D., Lindstrom, M.J. & Lemme, G.D. 1991. Aggregate Stability of an Eroded and Desurfaced Typic Argiustoll. *Soil Science Society of America Journal*, **55**, 811–816.

Gómez, X., Blanco, D., Lobato, A., Calleja, A., Martínez-Núñez, F. & Martin-Villacorta, J. 2011. Digestion of cattle manure under mesophilic and thermophilic conditions: characterization of organic matter applying thermal analysis and 1H NMR. *Biodegradation*, **22**, 623–635.

Gómez, X., Cuetos, M.J., García, A.I. & Morán, A. 2005. Evaluation of digestate stability from anaerobic process by thermogravimetric analysis. *Thermochimica Acta*, **426**, 179–184.

Gómez, X., Cuetos, M.J., García, A.I. & Morán, A. 2007a. An evaluation of stability by thermogravimetric analysis of digestate obtained from different biowastes. *Journal of Hazardous Materials*, **149**, 97–105.

Gómez, X., Diaz, M.C., Cooper, M., Blanco, D., Morán, A. & Snape, C.E. 2007b. Study of biological stabilization processes of cattle and poultry manure by thermogravimetric analysis and 13C NMR. *Chemosphere*, **68**, 1889–1897.

Grenet, J. & Legendre, B. 2010. Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC). *Ref : TIP630WEB - "Techniques d'analyse,"* (At: https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/42384210-methodes-thermiques-d-analyse/download/p1205/analyse-calorimetrique-differentielle-a-balayage-dsc.html. Accessed: 25/10/2019).

Guilayn, F., Jimenez, J., Martel, J.-L., Rouez, M., Crest, M. & Patureau, D. 2019. First fertilizing-value typology of digestates: A decision-making tool for regulation. *Waste Management*, **86**, 67–79.

Gunnarsson, A., Bengtsson, F. & Caspersen, S. 2010. Use efficiency of nitrogen from biodigested plant material by ryegrass. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **173**, 113–119.

Gutser, R., Ebertseder, Th., Weber, A., Schraml, M. & Schmidhalter, U. 2005. Short-term and residual availability of nitrogen after long-term application of organic fertilizers on arable land. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **168**, 439–446.

Hackstein, J.H. & Stumm, C.K. 1994. Methane production in terrestrial arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 5441–5445.

Hanser, O. 2015. *La matière organique dissoute issue de sols contaminés par des goudrons de houille: vers une meilleure compréhension de sa nature et de sa réactivité*. PhD Thesis, Université de Lorraine.

Harada, Y. & Inoko, A. 1980. The measurement of the cation-exchange capacity of composts for the estimation of the degree of maturity. *Soil Science and Plant Nutrition*, **26**, 127–134.

Hare, A.A., Kuzyk, Z.Z.A., Macdonald, R.W., Sanei, H., Barber, D., Stern, G.A. & Wang, F. 2014. Characterization of sedimentary organic matter in recent marine sediments from Hudson Bay, Canada, by Rock-Eval pyrolysis. *Organic Geochemistry*, **68**, 52–60.

Havlin, J. 2005. *Soil Fertility and Fertilizers: An Introduction to Nutrient Management*. Pearson Prentice Hall.

Hénin, S. & Dupuis, M. 1945. *Essai de bilan de la matière organique du sol*. Dudod.

Hermawan, B. & Bomke, A.A. 1997. Effects of winter cover crops and successive spring tillage on soil aggregation. *Soil and Tillage Research*, **44**, 109–120.

Hjorth, M., Christensen, K.V., Christensen, M.L. & Sommer, S.G. 2011. Solid-Liquid Separation of Animal Slurry in Theory and Practise: A Review. In: *Sustainable Agriculture*, pp. 953–986. Springer.

Huang, Z., Davis, M.R., Condron, L.M. & Clinton, P.W. 2011. Soil carbon pools, plant biomarkers and mean carbon residence time after afforestation of grassland with three tree species. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 1341–1349.

Iglesias Jiménez, E. & Pérez García, V. 1991. Composting of domestic refuse and sewage sludge. I. Evolution of temperature, pH, C/N ratio and cation-exchange capacity. *Resources, Conservation and Recycling*, **6**, 45–60.

IPCC, Core Writing Team, Pachauri, R.K. & Meyer, L.A. 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC, Geneva, Switzerland. (At: https://www.ipcc.ch/report/ar5/syr/. Accessed: 30/11/2018).

Ippolito, J.A., Spokas, K.A., Novak, J.M., Lentz, R.D., Cantrell, K.B., Spokas, K.A., Novak, J.M., Lentz, R.D. & Cantrell, K.B. 2015. Biochar elemental composition and factors infl uencing nutrient retention. In: *Biochar for Environmental Management*, pp. 137–161. New York, NY : Routledge.

Jastrow, J.D., Miller, R.M. & Boutton, T.W. 1996. Carbon Dynamics of Aggregate-Associated Organic Matter Estimated by Carbon-13 Natural Abundance. *Soil Science Society of America Journal*, **60**, 801–807.

Jastrow, J.D., Miller, R.M. & Miller, R.M. 1997. Soil Aggregate Stabilization and Carbon Sequestration: Feedbacks through Organomineral Associations. In: *Soil Processes and the Carbon Cycle*. CRC Press. R. Lal et al.

Jenkinson, D.S., Fox, R.H. & Rayner, J.H. 1985. Interactions between fertilizer nitrogen and soil nitrogen—the so-called 'priming' effect. *Journal of Soil Science*, **36**, 425–444.

Jenkinson, D.S. & Powlson, D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V: A method for measuring soil biomass. *Soil biology and Biochemistry*, **8**, 209–213.

Jimenez, J., Aemig, Q., Doussiet, N., Steyer, J.-P., Houot, S. & Patureau, D. 2015. A new organic matter fractionation methodology for organic wastes: Bioaccessibility and complexity characterization for treatment optimization. *Bioresource Technology*, **194**, 344–353.

Jimenez, J., Lei, H., Steyer, J.-P., Houot, S. & Patureau, D. 2017. Methane production and fertilizing value of organic waste: Organic matter characterization for a better prediction of valorization pathways. *Bioresource Technology*, **241**, 1012–1021.

Johansen, A., Carter, M.S., Jensen, E.S., Hauggard-Nielsen, H. & Ambus, P. 2013. Effects of digestate from anaerobically digested cattle slurry and plant materials on soil microbial community and emission of CO2 and N2O. *Applied Soil Ecology*, **63**, 36–44.

Johnson, Kristen., Huyler, Mark., Westberg, Hal., Lamb, Brian. & Zimmerman, Pat. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. *Environmental Science & Technology*, **28**, 359–362.

Kay, B.D. 1990. Rates of Change of Soil Structure Under Different Cropping Systems. In: *Advances in Soil Science 12: Volume 12* (ed. Stewart, B.A.), pp. 1–52. Springer New York, New York, NY.

Kay, B.D., Silva, A.P. da & Baldock, J.A. 1997. Sensitivity of soil structure to changes in organic carbon content: Predictions using pedotransfer functions. *Canadian Journal of Soil Science*, **77**, 655–667.

Keeling, C.D. 1958. The concentration and isotopic abundances of atmospheric carbon dioxide in rural areas. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **13**, 322–334.

Kirchmann, H. & Bernal, M.P. 1997. Organic waste treatment and C stabilization efficiency. *Soil Biology and Biochemistry*, **29**, 1747–1753.

Kleber, M. & Johnson, M.G. 2010. Chapter 3 - Advances in Understanding the Molecular Structure of Soil Organic Matter: Implications for Interactions in the Environment. In: *Advances in Agronomy* (ed. Sparks, D.L.), pp. 77–142. Academic Press.

Kögel-Knabner, I. 2017. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter: Fourteen years on. *Soil Biology and Biochemistry*, **105**, A3–A8.

Kopittke, P.M., Dalal, R.C., Hoeschen, C., Li, C., Menzies, N.W. & Mueller, C.W. 2020. Soil organic matter is stabilized by organo-mineral associations through two key processes: The role of the carbon to nitrogen ratio. *Geoderma*, **357**, 113974.

Kramer, C. & Gleixner, G. 2008. Soil organic matter in soil depth profiles: Distinct carbon preferences of microbial groups during carbon transformation. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 425–433.

Kumar, A., Kuzyakov, Y. & Pausch, J. 2016. Maize rhizosphere priming: field estimates using 13C natural abundance. *Plant and Soil*, **409**, 87–97.

Kuzyakov, Y. 2006. Sources of CO2 efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 425–448.

Kuzyakov, Y. 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**, 1363–1371.

Kuzyakov, Y. & Bol, R. 2006. Sources and mechanisms of priming effect induced in two grassland soils amended with slurry and sugar. (At: http://cadair.aber.ac.uk/dspace/handle/2160/2841. Accessed: 25/4/2017).

Kuzyakov, Y., Friedel, J.K. & Stahr, K. 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**, 1485–1498.

Kwabiah, A.B., Palm, C.A., Stoskopf, N.C. & Voroney, R.P. 2003. Response of soil microbial biomass dynamics to quality of plant materials with emphasis on P availability. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 207–216.

Lafargue, E., Marquis, F. & Pillot, D. 1998. Rock-Eval 6 Applications in Hydrocarbon Exploration, Production, and Soil Contamination Studies. *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, **53**, 421–437.

Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma*, **123**, 1–22.

Lashermes, G., Nicolardot, B., Parnaudeau, V., Thuriès, L., Chaussod, R., Guillotin, M.L., Linères, M., Mary, B., Metzger, L., Morvan, T., Tricaud, A., Villette, C. & Houot, S. 2009. Indicator of potential residual carbon in soils after exogenous organic matter application. *European Journal of Soil Science*, **60**, 297–310.

Lavelle, P., Blanchart, E., Martin, A., Martin, S. & Spain, A. 1993. A Hierarchical Model for Decomposition in Terrestrial Ecosystems: Application to Soils of the Humid Tropics. *Biotropica*, **25**, 130–150.

Le Bissonnais, Y. 1996. Aggregate stability and assessment of soil crustability and erodibility: I. Theory and methodology. *European Journal of Soil Science*, **47**, 425–437.

Le Bissonnais, Y. & Arrouays, D. 1997. Aggregate stability and assessment of soil crustability and erodibility: II. Application to humic loamy soils with various organic carbon contents. *European Journal of Soil Science*, **48**, 39–48.

Le Quéré, C., Moriarty, R., Andrew, R.M., Canadell, J.G., Sitch, S., Korsbakken, J.I., Friedlingstein, P., Peters, G.P., Andres, R.J., Boden, T.A., Houghton, R.A., House, J.I., Keeling, R.F., Tans, P., Arneth, A., Bakker, D.C.E., Barbero, L., Bopp, L., Chang, J., Chevallier, F., Chini, L.P., Ciais, P., Fader, M., Feely, R.A., Gkritzalis, T., Harris, I., Hauck, J., Ilyina, T., Jain, A.K., Kato, E., Kitidis, V., Klein Goldewijk, K., Koven, C., Landschützer, P., Lauvset, S.K., Lefèvre, N., Lenton, A., Lima, I.D., Metzl, N., Millero, F., Munro, D.R., Murata, A., Nabel, J.E.M.S., Nakaoka, S., Nojiri, Y., O'Brien, K., Olsen, A., Ono, T., Pérez, F.F., Pfeil, B., Pierrot, D., Poulter, B., Rehder, G., Rödenbeck, C., Saito, S., Schuster, U., Schwinger, J., Séférian, R., Steinhoff, T., Stocker, B.D., Sutton, A.J., Takahashi, T., Tilbrook, B., van der Laan-Luijkx, I.T., van der Werf, G.R., van Heuven, S., Vandemark, D., Viovy, N., Wiltshire, A., Zaehle, S. & Zeng, N. 2015. Global Carbon Budget 2015. *Earth System Science Data*, **7**, 349–396.

Lehmann, J. & Joseph, S. 2015. *Biochar for Environmental Management | Science, Technology and Implementation*. Second. Routledge. (At: https://www.taylorfrancis.com/books/e/9780203762264. Accessed: 18/9/2019).

Lehmann, J. & Kleber, M. 2015. The contentious nature of soil organic matter. *Nature*, **528**, 60–68.

Li, X., Mei, Q., Dai, X. & Ding, G. 2017. Effect of anaerobic digestion on sequential pyrolysis kinetics of organic solid wastes using thermogravimetric analysis and distributed activation energy model. *Bioresource Technology*, **227**, 297–307.

Liang, B., Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Grossman, J., O'Neill, B., Skjemstad, J.O., Thies, J., Luizão, F.J., Petersen, J. & Neves, E.G. 2006. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Science Society of America Journal*, **70**, 1719–1730.

Linden, D.R., Hendrix, P.F., Coleman, D.C. & van Vliet, P.C.J. 1994. Faunal Indicators of Soil Quality 1. *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*, **sssaspecialpubl**, 91–106.

Linn, D.M. & Doran, J.W. 1984. Effect of Water-Filled Pore Space on Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Production in Tilled and Nontilled Soils 1. *Soil Science Society of America Journal*, **48**, 1267–1272.

Liu, J., Schulz, H., Brandl, S., Miehtke, H., Huwe, B. & Glaser, B. 2012. Short-term effect of biochar and compost on soil fertility and water status of a Dystric Cambisol in NE Germany under field conditions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **175**, 698–707.

Loria, E.R., Sawyer, J.E., Barker, D.W., Lundvall, J.P. & Lorimor, J.C. 2007. Use of Anaerobically Digested Swine Manure as a Nitrogen Source in Corn Production. *Agronomy Journal*, **99**, 1119–1129.

Lundquist, E.J., Jackson, L.E., Scow, K.M. & Hsu, C. 1999. Changes in microbial biomass and community composition, and soil carbon and nitrogen pools after incorporation of rye into three California agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 221–236.

Lützow, M. von & Kögel-Knabner, I. 2010. Response to the Concept paper: “What is recalcitrant soil organic matter?” by Markus Kleber. *Environmental Chemistry*, **7**, 333–335.

Lützow, M. v., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B. & Flessa, H. 2006. Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions – a review. *European Journal of Soil Science*, **57**, 426–445.

Lynch, J.M. & Bragg, E. 1985. Microorganisms and Soil Aggregate Stability. In: *Advances in Soil Science* (ed. Stewart, B.A.), pp. 133–171. Springer New York.

Macduff, J.H. & White, R.E. 1985. Net mineralization and nitrification rates in a clay soil measured and predicted in permanent grassland from soil temperature and moisture content. *Plant and Soil*, **86**, 151–172.

Maestrini, B., Nannipieri, P. & Abiven, S. 2015. A meta-analysis on pyrogenic organic matter induced priming effect. *GCB Bioenergy*, **7**, 577–590.

Manlay, R.J., Feller, C. & Swift, M.J. 2007. Historical evolution of soil organic matter concepts and their relationships with the fertility and sustainability of cropping systems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **119**, 217–233.

Marcato, C.-E., Mohtar, R., Revel, J.-C., Pouech, P., Hafidi, M. & Guiresse, M. 2009. Impact of anaerobic digestion on organic matter quality in pig slurry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **63**, 260–266.

Marchand, C., Lallier-Verges, E. & Baltzer, F. 2003. The composition of sedimentary organic matter in relation to the dynamic features of a mangrove-fringed coast in French Guiana. *Estuarine, coastal and shelf science*, **56**, 119–130.

Marenya, P.P. & Barrett, C.B. 2009. State-conditional Fertilizer Yield Response on Western Kenyan Farms. *American Journal of Agricultural Economics*, **91**, 991–1006.

Martin, J.P. & Waksman, S.A. 1940. INFLUENCE OF MICROORGANISMS ON SOIL AGGREGATION AND EROSION. *Soil Science*, **50**, 29.

Matteodo, M., Grand, S., Sebag, D., Rowley, M.C., Vittoz, P. & Verrecchia, E.P. 2018. Decoupling of topsoil and subsoil controls on organic matter dynamics in the Swiss Alps. *Geoderma*, **330**, 41–51.

Mendes, I.C., Bandick, A.K., Dick, R.P. & Bottomley, P.J. 1999. Microbial Biomass and Activities in Soil Aggregates Affected by Winter Cover Crops. *Soil Science Society of America Journal*, **63**, 873–881.

Metzger, L., Levanon, D. & Mingelgrin, U. 1987. The Effect of Sewage Sludge on Soil Structural Stability: Microbiological Aspects 1. *Soil Science Society of America Journal*, **51**, 346–351.

Michel, J.C., Tessier, D. & Favrot, J.C. Comportement et organisation de sols de Boulbène dans le Tarn.

Miller, R.D. & Johnson, D.D. 1964. The Effect of Soil Moisture Tension on Carbon Dioxide Evolution, Nitrification, and Nitrogen Mineralization 1. *Soil Science Society of America Journal*, **28**, 644–647.

Minasny, B., Malone, B.P., McBratney, A.B., Angers, D.A., Arrouays, D., Chambers, A., Chaplot, V., Chen, Z.-S., Cheng, K., Das, B.S., Field, D.J., Gimona, A., Hedley, C.B., Hong, S.Y., Mandal, B., Marchant, B.P., Martin, M., McConkey, B.G., Mulder, V.L., O'Rourke, S., Richer-de-Forges, A.C., Odeh, I., Padarian, J., Paustian, K., Pan, G., Poggio, L., Savin, I., Stolbovoy, V., Stockmann, U., Sulaeman, Y., Tsui, C.-C., Vågen, T.-G., van Wesemael, B. & Winowiecki, L. 2017. Soil carbon 4 per mille. *Geoderma*, **292**, 59–86.

Minasny, B., Sulaeman, Y. & Mcbratney, A.B. 2011. Is soil carbon disappearing? The dynamics of soil organic carbon in Java. *Global Change Biology*, **17**, 1917–1924.

Moeskops, B., Buchan, D., Van Beneden, S., Fievez, V., Sleutel, S., Gasper, M.S., D'Hose, T. & De Neve, S. 2012. The impact of exogenous organic matter on SOM contents and microbial soil quality. *Pedobiologia*, **55**, 175–184.

Moletta, R. 2015. *La méthanisation*. 3e édition. Tec & Doc : Lavoisier, Paris.

Möller, K. 2015. Effects of anaerobic digestion on soil carbon and nitrogen turnover, N emissions, and soil biological activity. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **35**, 1021–1041.

Möller, K. & Müller, T. 2012. Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. *Engineering in Life Sciences*, **12**, 242–257.

Möller, K. & Stinner, W. 2010. Effects of organic wastes digestion for biogas production on mineral nutrient availability of biogas effluents. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, **87**, 395–413.

Monard, C., Jeanneau, L., Le Garrec, J.-L., Le Bris, N. & Binet, F. 2019. Short-term effect of pig slurry and its digestate application on biochemical properties of soils and emissions of volatile organic compounds. *Applied Soil Ecology*, 103376.

Mondini, C., Dell'Abate, M.T., Leita, L. & Benedetti, A. 2003. An Integrated Chemical, Thermal, and Microbiological Approach to Compost Stability Evaluation. *Journal of Environmental Quality*, **32**, 2379–2386.

Monnier, G. 1965. *Action des matieres organiques sur la stabilite structurale de sols : 1ere these. Le concept de sol et son evolution : 2eme these*. Faculté des sciences de l'université de Paris. (At: http://prodinra.inra.fr/?locale=fr#!ConsultNotice:109671. Accessed: 27/2/2017).

Moore-Kucera, J. & Dick, R.P. 2008. PLFA Profiling of Microbial Community Structure and Seasonal Shifts in Soils of a Douglas-fir Chronosequence. *Microbial Ecology*, **55**, 500–511.

Mottet, A., François, E., Latrille, E., Steyer, J.P., Déléris, S., Vedrenne, F. & Carrère, H. 2010. Estimating anaerobic biodegradability indicators for waste activated sludge. *Chemical Engineering Journal*, **160**, 488–496.

Nelson, N.O., Mikkelsen, R.L. & Hesterberg, D.L. 2003. Struvite precipitation in anaerobic swine lagoon liquid: effect of pH and Mg: P ratio and determination of rate constant. *Bioresource Technology*, **89**, 229–236.

Nicolardot, B., Fauvet, G. & Cheneby, D. 1994. Carbon and nitrogen cycling through soil microbial biomass at various temperatures. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**, 253–261.

Nicolardot, B., Recous, S. & Mary, B. 2001. Simulation of C and N mineralisation during crop residue decomposition: a simple dynamic model based on the C: N ratio of the residues. *Plant and Soil*, **228**, 83–103.

Nottingham, A.T., Griffiths, H., Chamberlain, P.M., Stott, A.W. & Tanner, E.V.J. 2009. Soil priming by sugar and leaf-litter substrates: A link to microbial groups. *Applied Soil Ecology*, **42**, 183–190.

Nuccio, E.E., Hodge, A., Pett-Ridge, J., Herman, D.J., Weber, P.K. & Firestone, M.K. 2013. An arbuscular mycorrhizal fungus significantly modifies the soil bacterial community and nitrogen cycling during litter decomposition. *Environmental Microbiology*, **15**, 1870–1881.

Observ'ER. 2014. *Etat des énergies renouvelables en Europe*.

Observ'ER. 2018. *Le baromètre des énergies renouvelables*. (At: http://www.energies-renouvelables.org/observ-er/html/barosom.asp#bilan. Accessed: 26/9/2019).

O'donnell, A.G., Wu, J. & Syers, J.K. 1994. Sulphate-S amendments in soil and their effects on the transformation of soil sulphur. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**, 1507–1514.

Oertel, C., Matschullat, J., Zurba, K., Zimmermann, F. & Erasmi, S. 2016. Greenhouse gas emissions from soils—A review. *Chemie der Erde - Geochemistry*, **76**, 327–352.

O'Leary, M.H. 1981. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, **20**, 553–567.

O'leary, W.M. 1988. Gram-positive bacteria. *Microbial lipids*, **1**, 117–201.

Olson, K.R., Al-Kaisi, M.M., Lal, R. & Lowery, B. 2014. Experimental Consideration, Treatments, and Methods in Determining Soil Organic Carbon Sequestration Rates. *Soil Science Society of America Journal*, **78**, 348–360.

Otten, W., Hall, D., Harris, K., Ritz, K., Young, I.M. & Gilligan, C.A. 2001. Soil physics, fungal epidemiology and the spread of Rhizoctonia solani. *New Phytologist*, **151**, 459–468.

Pagliai, M., Guidi, G., La Marca, M., Giachetti, M. & Lucamante, G. 1981. Effects of Sewage Sludges and Composts on Soil Porosity and Aggregation 1. *Journal of Environmental Quality*, **10**, 556–561.

Panikov, N.S. & Sizova, M.V. 1996. A kinetic method for estimating the biomass of microbial functional groups in soil. *Journal of Microbiological Methods*, **24**, 219–230.

Pankhurst, C., Kirkby, C., Hawke, B. & Harch, B. 2002. Impact of a change in tillage and crop residue management practice on soil chemical and microbiological properties in a cereal-producing red duplex soil in NSW, Australia. *Biology and Fertility of Soils*, **35**, 189–196.

Parfitt, R.L., Giltrap, D.J. & Whitton, J.S. 2008. Contribution of organic matter and clay minerals to the cation exchange capacity of soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, (At: https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00103629509369376?needAccess=true . Accessed: 18/9/2019).

Parr, J.F. & Hornick, S.B. 1992. Agricultural use of organic amendments: A historical perspective. *American Journal of Alternative Agriculture*, **7**, 181–189.

Parton, W.J., Schimel, D.S., Cole, C.V. & Ojima, D.S. 1987. Analysis of factors controlling soil organic matter levels in Great Plains Grasslands 1. *Soil Science Society of America Journal*, **51**, 1173–1179.

Parton, W.J., Scurlock, J.M.O., Ojima, D.S., Gilmanov, T.G., Scholes, R.J., Schimel, D.S., Kirchner, T., Menaut, J.-C., Seastedt, T. & Garcia Moya, E. 1993. Observations and modeling of biomass and soil organic matter dynamics for the grassland biome worldwide. *Global biogeochemical cycles*, **7**, 785–809.

Pascault, N. 2010. *Réponse des communautés microbiennes du sol à l'apport de résidus de culture : influence des pratiques agricoles et lien avec le fonctionnement biologique du sol*. Thesis, Dijon. (At: http://www.theses.fr/2010DIJOS020. Accessed: 29/10/2019).

Pascault, N., Nicolardot, B., Bastian, F., Thiébeau, P., Ranjard, L. & Maron, P.-A. 2010. In Situ Dynamics and Spatial Heterogeneity of Soil Bacterial Communities Under Different Crop Residue Management. *Microbial Ecology*, **60**, 291–303.

Pascault, N., Ranjard, L., Kaisermann, A., Bachar, D., Christen, R., Terrat, S., Mathieu, O., Lévêque, J., Mougel, C., Henault, C., Lemanceau, P., Péan, M., Boiry, S., Fontaine, S. & Maron, P.-A. 2013. Stimulation of Different Functional Groups of Bacteria by Various Plant Residues as a Driver of Soil Priming Effect. *Ecosystems*, **16**, 810–822.

Paterson, E., Gebbing, T., Abel, C., Sim, A. & Telfer, G. 2009. Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. *New Phytologist*, 600–610.

Patience, A.J., Lallier-Verges, E., Alberic, P., Desprairies, A. & Tribovillard, N. 1996. Relationships between organo-mineral supply and early diagenesis in the lacustrine environment: A study of surficial sediments from the Lac du Bouchet (Haute Loire, France). *Quaternary Science Reviews*, **15**, 213–221.

Patra, A.K., Le Roux, X., Grayston, S.J., Loiseau, P. & Louault, F. 2008. Unraveling the effects of management regime and plant species on soil organic carbon and microbial phospholipid fatty acid profiles in grassland soils. *Bioresource Technology*, **99**, 3545–3551.

Paustian, K., Lehmann, J., Ogle, S., Reay, D., Robertson, G.P. & Smith, P. 2016. Climate-smart soils. *Nature*, **532**, 49–57.

Peltre, C., Thuriès, L., Barthès, B., Brunet, D., Morvan, T., Nicolardot, B., Parnaudeau, V. & Houot, S. 2011. Near infrared reflectance spectroscopy: A tool to characterize the composition of different types of exogenous organic matter and their behaviour in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 197–205.

Petersen, R.G. 1994. *Agricultural field experiments: design and analysis*. CRC Press.

Pezzolla, D., Marconi, G., Turchetti, B., Zadra, C., Agnelli, A., Veronesi, F., Onofri, A., Benucci, G.M.N., Buzzini, P., Albertini, E. & Gigliotti, G. 2015. Influence of exogenous organic matter on prokaryotic and eukaryotic microbiota in an agricultural soil. A multidisciplinary approach. *Soil Biology and Biochemistry*, **82**, 9–20.

Plante, A.F., Fernández, J.M., Haddix, M.L., Steinweg, J.M. & Conant, R.T. 2011. Biological, chemical and thermal indices of soil organic matter stability in four grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 1051–1058.

Poeplau, C. & Don, A. 2015. Carbon sequestration in agricultural soils via cultivation of cover crops – A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **200**, 33–41.

Pognani, M., D'Imporzano, G., Scaglia, B. & Adani, F. 2009. Substituting energy crops with organic fraction of municipal solid waste for biogas production at farm level: A full-scale plant study. *Process Biochemistry*, **44**, 817–821.

Priemé, A. & Christensen, S. 2001. Natural perturbations, drying–wetting and freezing–thawing cycles, and the emission of nitrous oxide, carbon dioxide and methane from farmed organic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**, 2083–2091.

Provenzano, M.R., Cavallo, O., Malerba, A.D., Fabbri, C. & Zaccone, C. 2018. Unravelling (maize silage) digestate features throughout a full-scale plant: A spectroscopic and thermal approach. *Journal of Cleaner Production*, **193**, 372–378.

Puget, P., Angers, D.A. & Chenu, C. 1998. Nature of carbohydrates associated with water-stable aggregates of two cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 55–63.

Qiao, N., Xu, X., Hu, Y., Blagodatskaya, E., Liu, Y., Schaefer, D. & Kuzyakov, Y. 2016. Carbon and nitrogen additions induce distinct priming effects along an organic-matter decay continuum. *Scientific Reports*, **6**, 19865.

Quideau, S.A., McIntosh, A.C.S., Norris, C.E., Lloret, E., Swallow, M.J.B. & Hannam, K. 2016. Extraction and Analysis of Microbial Phospholipid Fatty Acids in Soils. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (At: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5091956/.).

Rangel-Castro, J.I., Killham, K., Ostle, N., Nicol, G.W., Anderson, I.C., Scrimgeour, C.M., Ineson, P., Meharg, A. & Prosser, J.I. 2005. Stable isotope probing analysis of the influence of liming on root exudate utilization by soil microorganisms. *Environmental Microbiology*, **7**, 828–838.

Riva, C., Orzi, V., Carozzi, M., Acutis, M., Boccasile, G., Lonati, S., Tambone, F., D'Imporzano, G. & Adani, F. 2016. Short-term experiments in using digestate products as substitutes for mineral (N) fertilizer: Agronomic performance, odours, and ammonia emission impacts. *Science of The Total Environment*, **547**, 206–214.

Rodrigo, A., Recous, S., Neel, C. & Mary, B. 1997. Modelling temperature and moisture effects on C–N transformations in soils: comparison of nine models. *Ecological Modelling*, **102**, 325–339.

Roger-Estrade, J. 1995. Modélisation de l'évolution à long terme de l'état structural des parcelles labourées. Contribution à l'analyse des effets des systèmes de culture.

Rovira, P., Kurz-Besson, C., Coûteaux, M.-M. & Ramón Vallejo, V. 2008. Changes in litter properties during decomposition: A study by differential thermogravimetry and scanning calorimetry. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 172–185.

Ruddiman, W.F. 2003. The Anthropogenic Greenhouse Era Began Thousands of Years Ago. *Climatic Change*, **61**, 261–293.

Saenger, A. 2013. *Caractérisation et stabilité de la matière organique du sol en contexte montagnard calcaire: proposition d'indicateurs pour le suivi de la qualité des sols à l'échelle du paysage*. Université de Grenoble. (At: https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00949074/. Accessed: 28/3/2017).

Saenger, A., Cécillon, L., Sebag, D. & Brun, J.-J. 2013. Soil organic carbon quantity, chemistry and thermal stability in a mountainous landscape: A Rock–Eval pyrolysis survey. *Organic Geochemistry*, **54**, 101–114.

Saharinen, M.H., Vuorinen, A.H. & Hostikka, M. 1996. Effective cation exchange capacity of manure compost of varying maturity stages determined by the saturation-displacement method. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **27**, 2917–2923.

Sánchez, M., Gomez, X., Barriocanal, G., Cuetos, M.J. & Morán, A. 2008. Assessment of the stability of livestock farm wastes treated by anaerobic digestion. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **62**, 421–426.

Sanei, H., Stasiuk, L. & Goodarzi, F. 2005. Petrological changes occurring in organic matter from Recent lacustrine sediments during thermal alteration by Rock-Eval pyrolysis. *Organic geochemistry*, **36**, 1190–1203.

Scarlat, N., Dallemand, J.-F. & Fahl, F. 2018. Biogas: Developments and perspectives in Europe. *Renewable Energy*, **129**, 457–472.

Schouten, S., van Groenigen, J.W., Oenema, O. & Cayuela, M.L. 2012. 'Bioenergy from cattle manure? Implications of anaerobic digestion and subsequent pyrolysis for carbon and nitrogen dynamics in soil.' *GCB Bioenergy*, **4**, 751–760.

Schröder, J.J. 2014. The Position of Mineral Nitrogen Fertilizer in Efficient Use of Nitrogen and Land: A Review. *Natural Resources*, **5**, 936–948.

Sebag, D., Verrecchia, E.P., Cécillon, L., Adatte, T., Albrecht, R., Aubert, M., Bureau, F., Cailleau, G., Copard, Y., Decaens, T., Disnar, J.-R., Hetényi, M., Nyilas, T. & Trombino, L. 2016. Dynamics of soil organic matter based on new Rock-Eval indices. *Geoderma*, **284**, 185–203.

Séguy, L., Husson, O., Charpentier, H., Bouzinac, S., Michellon, R., Chabanne, A., Boulakia, S., Tivet, F., Naudin, K. & Enjalric, F. 2012. Principles, functioning and management of ecosystems cultivated under Direct seeding Mulch. based Cropping systems (DMC).

Shahzad, T., Chenu, C., Genet, P., Barot, S., Perveen, N., Mougin, C. & Fontaine, S. 2015. Contribution of exudates, arbuscular mycorrhizal fungi and litter depositions to the rhizosphere priming effect induced by grassland species. *Soil Biology and Biochemistry*, **80**, 146–155.

Shiralipour, A., McConnell, D.B. & Smith, W.H. 1992. Physical and chemical properties of soils as affected by municipal solid waste compost application. *Biomass and Bioenergy*, **3**, 261–266.

Singh, B.P., Cowie, A.L. & Smernik, R.J. 2012. Biochar Carbon Stability in a Clayey Soil As a Function of Feedstock and Pyrolysis Temperature. *Environmental Science & Technology*, **46**, 11770–11778.

Six, J., Conant, R.T., Paul, E.A. & Paustian, K. 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil*, **241**, 155–176.

Six, J., Frey, S.D., Thiet, R.K. & Batten, K.M. 2006. Bacterial and Fungal Contributions to Carbon Sequestration in Agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, **70**, 555–569.

Slavich, P.G., Sinclair, K., Morris, S.G., Kimber, S.W.L., Downie, A. & Van Zwieten, L. 2013. Contrasting effects of manure and green waste biochars on the properties of an acidic ferralsol and productivity of a subtropical pasture. *Plant and Soil*, **366**, 213–227.

Smith, K.A., Ball, T., Conen, F., Dobbie, K.E., Massheder, J. & Rey, A. 2003. Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *European Journal of Soil Science*, **54**, 779–791.

Sollins, P., Homann, P. & Caldwell, B.A. 1996. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma*, **74**, 65–105.

Som, M.-P., Lemée, L. & Amblès, A. 2009. Stability and maturity of a green waste and biowaste compost assessed on the basis of a molecular study using spectroscopy, thermal analysis, thermodesorption and thermochemolysis. *Bioresource Technology*, **100**, 4404–4416.

Stinner, W., Möller, K. & Leithold, G. 2008. Effects of biogas digestion of clover/grass-leys, cover crops and crop residues on nitrogen cycle and crop yield in organic stockless farming systems. *European Journal of Agronomy*, **29**, 125–134.

Stumpe, B., Werner, S., Jung, R., Heinze, S., Jüschke, E., Strippel, C. & Marschner, B. 2012. Organic carbon dynamics and enzyme activities in agricultural soils amended with biogas slurry, liquid manure and sewage sludge. **2012**, (At: http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=16841. Accessed: 6/4/2017).

Suela Silva, M., Naves Sales, A., Teixeira Magalhães-Guedes, K., Ribeiro Dias, D. & Schwan, R.F. 2013. Brazilian Cerrado Soil Actinobacteria Ecology. *BioMed Research International*, **2013**, (At: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3595109/. Accessed: 11/12/2019).

Sullivan, T.S., Stromberger, M.E. & Paschke, M.W. 2006. Parallel shifts in plant and soil microbial communities in response to biosolids in a semi-arid grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 449–459.

Sutton, R. & Sposito, G. 2005. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environmental Science & Technology*, **39**, 9009–9015.

Suzuki, K., Tanaka, Y., Osada, T. & Waki, M. 2002. Removal of phosphate, magnesium and calcium from swine wastewater through crystallization enhanced by aeration. *Water research*, **36**, 2991–2998.

Swift, R.S. 1996. Organic Matter Characterization. *Methods of Soil Analysis Part 3—Chemical Methods*, **sssabookseries**, 1011–1069.

Swift, M.J., Heal, O.W. & Anderson, J.M. 1979. Decomposition in terrestrial ecosystems. *Decomposition in terrestrial ecosystems.*, (At: https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19811959940. Accessed: 7/10/2019).

Tambone, F., Genevini, P., D'Imporzano, G. & Adani, F. 2009. Assessing amendment properties of digestate by studying the organic matter composition and the degree of biological stability during the anaerobic digestion of the organic fraction of MSW. *Bioresource Technology*, **100**, 3140–3142.

Tambone, F., Scaglia, B., D'Imporzano, G., Schievano, A., Orzi, V., Salati, S. & Adani, F. 2010. Assessing amendment and fertilizing properties of digestates from anaerobic digestion through a comparative study with digested sludge and compost. *Chemosphere*, **81**, 577–583.

Terhoeven-Urselmans, T., Scheller, E., Raubuch, M., Ludwig, B. & Joergensen, R.G. 2009. CO2 evolution and N mineralization after biogas slurry application in the field and its yield effects on spring barley. *Applied Soil Ecology*, **42**, 297–302.

Thomsen, I.K., Olesen, J.E., Møller, H.B., Sørensen, P. & Christensen, B.T. 2013. Carbon dynamics and retention in soil after anaerobic digestion of dairy cattle feed and faeces. *Soil Biology and Biochemistry*, **58**, 82–87.

Thomsen, I.K., Schjønning, P., Jensen, B., Kristensen, K. & Christensen, B.T. 1999. Turnover of organic matter in differently textured soils: II. Microbial activity as influenced by soil water regimes. *Geoderma*, **89**, 199–218.

Thuriès, L., Pansu, M., Larré-Larrouy, M.-C. & Feller, C. 2002. Biochemical composition and mineralization kinetics of organic inputs in a sandy soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**, 239–250.

Trap, J., Bonkowski, M., Plassard, C., Villenave, C. & Blanchart, E. 2016. Ecological importance of soil bacterivores for ecosystem functions. *Plant and Soil*, **398**, 1–24.

Trinsoutrot, I., Recous, S., Bentz, B., Line`res, M., Che`neby, D. & Nicolardot, B. 2000. Biochemical Quality of Crop Residues and Carbon and Nitrogen Mineralization Kinetics under Nonlimiting Nitrogen Conditions. **64**, 918–926.

Van Soest, P.J. & Wine, R.H. 1967. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **50**, 50–55.

Vandenbroucke, M. & Largeau, C. 2007. Kerogen origin, evolution and structure. *Organic Geochemistry*, **38**, 719–833.

Vanlauwe, B., Nwoke, O.C., Sanginga, N. & Merckx, R. 1996. Impact of residue quality on the C and N mineralization of leaf and root residues of three agroforestry species. *Plant and Soil*, **183**, 221–231.

Větrovský, T., Steffen, K.T. & Baldrian, P. 2014. Potential of Cometabolic Transformation of Polysaccharides and Lignin in Lignocellulose by Soil Actinobacteria. *PLOS ONE*, **9**, e89108.

Vidal, A., Quenea, K., Alexis, M., Nguyen Tu, T.T., Mathieu, J., Vaury, V. & Derenne, S. 2017. Fate of 13C labelled root and shoot residues in soil and anecic earthworm casts: A mesocosm experiment. *Geoderma*, **285**, 9–18.

Voelkner, A., Holthusen, D. & Horn, R. 2015. Determination of soil dispersion caused by anaerobic digestates: interferences of pH and soil charge with regard to soil texture and water content. *Journal of Soils and Sediments*, **15**, 1491–1499.

Wallace, A. 1994. Soil organic matter is essential to solving soil and environmental problems. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **25**, 15–28.

Wang, Q., Li, Y. & Alva, A. 2010. Growing Cover Crops Improve Biomass Accumulation and Carbon Sequestration: A Phytotron Study. *Journal of Environmental Protection*, **1**, 73–84.

Wang, J., Xiong, Z. & Kuzyakov, Y. 2016. Biochar stability in soil: meta-analysis of decomposition and priming effects. *GCB Bioenergy*, **8**, 512–523.

Warman, P.R. 2005. Soil Fertility, Yield and Nutrient Contents of Vegetable Crops after 12 Years of Compost or Fertilizer Amendments. *Biological Agriculture & Horticulture*, **23**, 85–96.

Webb, J., Sørensen, P., Velthof, G., Amon, B., Pinto, M., Rodhe, L., Salomon, E., Hutchings, N., Burczyk, P. & Reid, J. 2013. An Assessment of the Variation of Manure Nitrogen Efficiency throughout Europe and an Appraisal of Means to Increase Manure-N Efficiency (DL Sparks, Ed.). *Advances in Agronomy*, **119**, 371–442.

Weiland, P. 2006. Biomass Digestion in Agriculture: A Successful Pathway for the Energy Production and Waste Treatment in Germany. *Engineering in Life Sciences*, **6**, 302–309.

Whelan, M.J., Everitt, T. & Villa, R. 2010. A mass transfer model of ammonia volatilisation from anaerobic digestate. *Waste Management*, **30**, 1808–1812.

White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D. & Bobbie, R.J. 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. *Oecologia*, **40**, 51–62.

Winding, A., Rønn, R. & Hendriksen, N.B. 1997. Bacteria and protozoa in soil microhabitats as affected by earthworms. *Biology and Fertility of Soils*, **24**, 133–140.

Wirth, E., Guitteny, F. & Mathonat, C. 2014. Thermogravimétrie. 29.

Wolters, V. 2000. Invertebrate control of soil organic matter stability. *Biology and Fertility of Soils*, **31**, 1–19.

Wu, J., O'donnell, A.G., He, Z.L. & Syers, J.K. 1994. Fumigation-extraction method for the measurement of soil microbial biomass-S. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**, 117–125.

Young, I.M. & Crawford, J.W. 2004. Interactions and Self-Organization in the Soil-Microbe Complex. *Science*, **304**, 1634–1637.

Zech, W., Senesi, N., Guggenberger, G., Kaiser, K., Lehmann, J., Miano, T.M., Miltner, A. & Schroth, G. 1997. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, **79**, 117–161.

Zeikus, J.G. 1980. Chemical and Fuel Production by Anaerobic Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **34**, 423–464.

Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, **29**, 111–129.

Zelles, L. & Bai, Q.Y. 1993. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. *Soil Biology and Biochemistry*, **25**, 495–507.

Zimmer, D., Bouzigues, R., Chossat, J.-C., Favrot, J.-C. & Guiresse, A.M. 1991. Importance et déterminisme des infiltrations profondes en luvisols-redoxisols drainés. Incidence sur les modalités de drainage. *Science du sol*, **29**, 321–338.

Zimmerman, A.R., Gao, B. & Ahn, M.-Y. 2011. Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 1169–1179.

Annexes

Annexe 1 : Protocole du prélèvement par carottage

Annexe 1 : Protocole du prélèvement par carottage

- Identifier une zone homogène visuellement au sein de la parcelle ;
- Délimiter au moins autant de micro-parcelles (30x30 cm) que de prélèvements prévus à l'aide des jalons et du ruban (Figure 67) ;



Figure 67 : Délimitation des micro-parcelles pour les prélèvements de sol par carottage (à gauche sol PURPAN, à droite sol TARN). Les deux photos ont été prises fin août 2017.

- Désherber grossièrement à la main (à l'aide de gants) ;
- Désherber finement (en enlevant les racines à l'aide d'une pince si nécessaire) ;
- Enlever les résidus non décomposés de la surface du sol (feuille etc.) ;
- Equiper la carotte de la capsule perforée (afin de laisser s'échapper l'air) et surmontée d'une planche.
- Enfoncer la carotte à l'aide du maillet en caoutchouc jusqu'à atteindre la marque signalant que les 8 cm de profondeur ont été atteints ;
- Creuser autour de la carotte à l'aide d'une pioche (si possible plus profondément que la carotte) ;
- Faire basculer la carotte sur le côté en passant la lame d'une truelle plate dessous afin d'éviter de perdre du sol ;
- Ecarter de l'échantillonnage les carottes déformées par la rencontre avec un caillou ;
- Lorsque la carotte est extraite (et à l'horizontale), sceller le fond de la carotte à l'aide d'une capsule. Remettre la carotte à la verticale puis retirer la capsule perforée ;
- Stocker la carotte dans le récipient prévu pour le transport ;
- Renseigner la feuille d'informations précisant le numéro de la carotte, la micro-parcelle de prélèvement et la hauteur de sol prélevé (par différence entre la surface du sol prélevé et le bord de la carotte) ;
- Répéter l'opération pour les autres micro-parcelles ;

- Transporter les échantillons jusqu'au laboratoire puis les stocker à température ambiante lorsque le sol est relativement sec (prélèvement en été) ; en chambre froide lorsque le sol est plutôt humide.

Le matériel nécessaire est le suivant :

- Jalons et ruban
- Une paire de gants
- Une capsule « Le Parfait » (11 cm de diamètre interne) préalablement perforée
- Une planche en bois
- Un maillet en caoutchouc
- Une pioche
- Des carottes en inox (11 cm de diamètre interne et de 10 cm de hauteur) et capsules « Le Parfait » (11 cm de diamètre interne) préalablement numérotées. Les carottes en inox peuvent être auto-construites à l'aide de tuyaux de cheminée sectionnées.
- Feuille d'informations
- Récipient pour le transport des carottes
- Un mètre

Liste des figures

Figure 1 : Schéma conceptuel des interactions entre les propriétés du sol (non exhaustif) (Duchaufour, 2001; Gobat et al., 2003) 22

Figure 2 : Schéma des échanges en ions entre la solution des sols, les racines (root) les matières organiques (organic matter), les particules d'argiles (clay) et de calcaire (limestone) (Duchaufour, 2001). 24

Figure 3 : Représentation schématique des perturbations du cycle du carbone à l'échelle planétaire en raison des activités anthropiques, moyennées pour la décennie 2005-2014. (Le Quéré et al., 2015).....29

Figure 4 : Proportions approximatives en masse des constituants organiques dans les sols cultivés (Calvet et al., 2015) 32

Figure 5 : Présentation schématique des effets des apports en produits organiques sur la stabilité structurale en fonction de la biodégradabilité de leurs matières organiques (Abiven, 2004).....40

Figure 6 : Principe du bilan entre les entrées et les sorties en matières organiques dans les sols agricoles. (Duparque et al., 2016).....44

Figure 7 : Modèle conceptuel de la transformation continuelle du continuum des matières organiques mortes dans les sols (Lehmann & Kleber, 2015). Les flèches en pointillés de la Figure 7 représentent plutôt des transferts abiotiques et les flèches unies des transferts sous l'effet de processus biotiques. La stabilité des matières organiques dans les sols dépend de mécanismes biotiques : désignés par la récalcitrance et par des mécanismes abiotiques comme la formation d'agrégats et l'adsorption par surfaces minérales. Au-delà, de la résistance intrinsèque de certains composés organiques à la biodégradation, ce modèle envisage la décomposition des matières organiques comme un problème logistique dont les modalités clefs sont : l'écologie microbienne, l'activité enzymatique, des facteurs environnementaux et des matrices de protection. Ce modèle prend en compte à la fois l'influence du milieu (type de sol, climat, vie microbienne) et celle de la composition des matières organiques apportées sur leur devenir dans les sols.....49

Figure 8 : Schéma des effets "priming" à la suite de l'apport en matière organique. (a) Effet « priming » positif : accélération de la décomposition de la matière organique endogène (i.e. native). (b) Effet « priming » négatif : ralentissement de la décomposition de la matière organique endogène (i.e. native). D'après (Kuzyakov et al., 2000).....51

Figure 9 : Schéma conceptuel des processus à l'origine des effets « priming » apparent (PEa) et réel (PEr) associés à l'exsudation racinaire. 1. Apport par les racines de matières organiques labiles par rhizodéposition. 2. Stimulation des microorganismes ayant une

stratégie de croissance rapide (r). 3. Stimulation des microorganismes ayant une stratégie de croissance lente (K). 4. et 5. Déstabilisation puis décomposition des matières organiques endogènes des sols. 6. Absorption par les racines des éléments minéraux issus de la décomposition des matières organiques apportées et endogènes. D'après (Kuzyakov, 2010) 54

Figure 10 : Représentation schématique de la digestion anaérobie des matières organiques (Escudie & Cresson, 2017) 65

Figure 11 : Potentiel méthanogène de différents substrats organiques d'après (Moletta, 2015).....68

Figure 12 : Composition des produits organiques avant et après méthanisation d'après la méthode de fractionnement (Van Soest & Wine, 1967) 76

Figure 13 : Distribution des valeurs de l'indicateur de stabilité des matières organiques (ISMO), calculé pour différents types de produits organiques. La limite gauche de la boite est définie par le 1er quartile, la limite droite par le 3ème quartile, la médiane est représentée par le trait fin qui partage la boite. (Lashermes et al., 2009) 76

Figure 14 : Caractéristiques des produits organiques (mélange d'effluents d'élevage) avant ("Feed PS"), pendant ("In PS") et après ("Dig PS") digestion anaérobie par l'analyse thermique différentielle (Gómez et al., 2005) 78

Figure 15 : Scenarii de l'effet de la digestion anaérobie sur le bilan de matière du cycle du carbone entre l'atmosphère et la pédosphère.....80

Figure 16 : Plan d'expériences des incubations mises en place et paramètres mesurés dans le cadre de l'étude 89

Figure 17 : Unité de méthanisation agricole de la société Wagner GmbH à Steinweiler en Allemagne (https://wagner-steinweiler.com/) 90

Figure 18 : Localisation et contexte géologique des sols utilisés (fonds de carte : www.géoportail.gouv.fr).....92

Figure 19 : Diagramme triangulaire des textures (GEPPA, 1963). Textures déterminées sur les échantillons de sol prélevés par carottage sur l'horizon A (SADEF, accréditation COFRAC n°1-0751) 95

Figure 20 : Facteurs influençant la valeur du pH des digestats (Möller & Müller, 2012) 102

Figure 21 : Principales étapes et pyrogrammes de la procédure de pyrolyse Rock-Eval 6 (Saenger, 2013) 104

Figure 22 : Couplage d'un dispositif d'incubation au champ (a) et en conditions contrôlées (b) avec l'appareil de mesure Picarro G2201-i.....107

Figure 23 : Principe de fonctionnement de la spectroscopie par adsorption laser dans un résonateur optique en anneau (B. Atkinson, 2003). 110

Figure 24 : Dispositifs pour le prélèvement des échantillons de solution d'eau du sol 113
Figure 25 : Interventions réalisées sur la zone de l'expérience au champ.....128
Figure 26 : Schéma du dispositif expérimental au champ 128
Figure 27 : (a) Cinétique de la production de CO2 des sols (mg CO2 m-2 s-1). (b) Signature isotopique d13C-CO2 du CO2 émis par les sols amendés et témoins. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types.....131
Figure 28 : Production cumulée de C-CO2 issue de la décomposition des produits organiques apportés exprimées en % de la quantité totale de C apportée. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types. 132
Figure 29 : Cumul des effets « priming » (gC m^{-2}) induits par l'apport de maïs ensilage ou de digestat brut ; c.à.d. de la différence entre les productions de CO_2 attribuées à la décomposition des matières organiques endogènes des sols amendés et des productions en CO_2 des sols témoins. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types. 132
Figure 30 : Corrélations entre l'évolution de la production de CO_2 des sols témoins et leur niveau d'humidité.....134
Figure 31 : Plan d'expériences des Incubations en conditions contrôlées mises en place pour l'étude de l'influence de la digestion anaérobie sur le stockage du carbone dans les sols.....138
Figure 32 : Productions de CO_2 en fonction des taux de remplissage en eau des porosités (en %) pour le sol Tarn, 11, 14 et 25 jours après le début de l'humidification et pour le sol Purpan 20 jours après le début de l'humification. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types. Les lettres en capitale dans les étiquettes figurent les résultats des comparaisons multiples par paires des différents niveaux d'humidité pour chacune des durées d'incubation (test Tukey HSD) 141
Figure 33 : Corrélations entre les productions de CO_2 des sols relatives au maximum pour chaque série de mesure (%) et du taux de remplissage en eau des porosités (a) ou de la teneur massique en eau (b).....142
Figure 34 : Corrélations entre l'évolution des productions de CO_2 des sols relatives et l'évolution du taux de remplissage en eau des porosités lors du séchage des sols incubés 143
Figure 35 : Incubation n°2.....144
Figure 36 : Plan d'expériences des incubations n°3 et 4 153
Figure 37 : Incubation n°3 (a) Cinétique de la production totale en CO_2 ($\mu CO_2\text{-}C.g^{-1}.h^{-1}$). (b) Signature isotopique du CO_2 émis par les sols amendés et témoins. (c) Proportion de la

production totale de CO_2 issue de la minéralisation des produits apportés. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types. 156

Figure 38 : Stabilité des produits organiques apportés (Incubation n°3). Production cumulée de CO_2-C attribuée à la minéralisation du produit organique apporté en pourcentage de la quantité de carbone apportée. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types. 157

Figure 39 : Effets « priming » pour l'incubation n°3 (a) Production de CO_2-C associée aux effets « priming » (µg CO_2-C.$g_{sol\ sec}^{-1}$.h^{-1}). (b) Production de CO_2-C cumulée associée aux effet « priming » (mgC.$g_{sol\ sec}^{-1}$) pour le maïs ensilage et le digestat. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types. 158

Figure 40 : Evolution des concentrations en C total (a), en N total (b), en P total (c) dans les solutions des sols incubés, prélevées à l'aide de rhizons lors de l'incubation n°3. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types. 161

Figure 41 : Incubation n°4 (a) Cinétique de la production totale en CO_2 (µCO_2-C.$g^{-1}h^{-1}$). (b) Signature isotopique du CO2 émis par les sols amendés et témoins. (c) Proportion de la production totale de CO2 issue de la minéralisation des produits apportés. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types.....164

Figure 42 : Stabilité des produits organiques apportés (Incubation n°4). Production cumulée de CO_2-C attribuée à la minéralisation du produit organique apporté en pourcentage de la quantité de carbone apportée. Les valeurs sont moyennées. 165

Figure 43 : Effets « priming » pour l'incubation n°4 (a) Production de CO_2-C associée aux effets « priming » (µg CO_2-C.$g_{sol\ sec}^{-1}$.h^{-1}). (b) Production de CO_2-C cumulée associée aux effet « priming » (mgC.$g_{sol\ sec}^{-1}$). Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types. 165

Figure 44 : Evolution des concentrations en C total, N-NO_3^-, NH_4^+ dans les solutions, des sols incubés, prélevées à l'aide de rhizons lors de l'incubation n°4. Les données sont moyennées. Les barres d'erreur figurent les écart-types. 167

Figure 45 : Incubation n°3 - Corrélation entre les teneurs en Ctotal des solutions prélevées (Rhizon) et la production de CO2 mesurée (Picarro). (a) : Pour l'ensemble des mesures. (b) : Pour des concentrations en Ctotal inférieures à 5000 mg l-1 171

Figure 46 : Corrélation entre la production cumulée de CO_2 et la concentration en Ntot des solutions prélevées avec les rhizons durant l'incubation n°3 pour les modalités : Témoin, Digestat, Digestat brut, Maïs et Sucre 174

Figure 47 : Plan d'expériences des incubations n°2 et 4 178

Figure 48 : Cumul des PLFA (nmol.g^{-1} de sol sec) pour chacune des modalités à l'issue des incubations n°2 et n°4. Les données non moyennées (n=4) avec l'écart type associé. Les

lettres en capitales référent à la comparaison des traitements d'après le test Tukey (P < 0,05). 179
Figure 49 : Analyse en Composantes Principales (ACP) des teneurs en PLFA extraits qui ont été attribués aux microorganismes du sol pour chacun des individus incubations n°2 et 4 179
Figure 50 : Abondance relative des différents groupes de microorganismes (en % du cumul des PLFA attribués aux microorganismes du sol) 181
Figure 51 : Ratios Bactéries G+/G- et Champignons/Bactéries à l'issue des incubations n°2 et 4.....183
Figure 52 : Analyse en Composantes Principales (ACP) des abondances des différents groupes de microorganismes par modalités pour les incubations n°2 et 4.....184
Figure 53 : Plan d'expérience des incubations n°4 et 5.....191
Figure 54 : Distribution en boite à moustache des teneurs en C organique (TOC) des sols à l'issue des incubations n°4 et 5, évaluées par l'analyse Rock Eval 6.....192
Figure 55 : Corrélations entre les teneurs en C organique (TOC, évaluées par Rock Eval 6) est les teneurs en C estimées à partir des mesures du CO_2 produit durant les incubations permettant de quantifier le stockage de C dans les sols. 192
Figure 56 : Positionnement des produits organiques et des sols au sein du pseudo-van Krevelen diagramme, en fonction des Indice Hydrogènes (IH) en mg HC/gTOC et Oxygènes (IO) en mgCO2/gTOC, relativement aux mesures réalisées par (Matteodo et al., 2018) 193
Figure 57 : Distribution en boite à moustache des Indices Hydrogène (IH) des échantillons de sols prélevés à l'issue des incubations n°4 et 5. Les lettres en capitale illustre les résultats des tests de comparaison des moyennes Tukey (P < 0,05). 194
Figure 58 : Corrélations entre les teneurs en C organique (TOC, évaluées par Rock Eval 6) est les indices hydrogènes (IH) pour les incubations n°4 et 5 en l'absence (b) ou en présence (a) de la modalité Biochar. 195
Figure 59 : Diagramme des Index-I et -R des produits organiques et des sols à l'issue des incubations n°4 et 5, relativement aux mesures réalisées par (Matteodo et al., 2018) .197
Figure 60 : Distribution en boite à moustache des Index-I (a) et -R (b) des échantillons de sols prélevés à l'issue des incubations n°4 et 5. Les lettres en capitale illustre les résultats des tests de comparaison des moyennes Tukey (P < 0,05).....197
Figure 61 : Plan d'expériences des incubations n°2, 3 et 5 201
Figure 62 : Evolution de la stabilité des agrégats pour la modalité Témoin, en l'absence d'apport de produit organique, pour le sol Purpan lors des incubations n°5, 2 et 3 après 12, 55, 188 et 265 jours d'incubations ; exprimée d'après le Diamètre Moyen Pondéral après désagrégation (DMP). Les données sont moyennées. Les barres d'erreur illustrent les écart-types. Les lettres en capital indiquent le résultat du Test Tukey (P < 0,05).....208

Figure 63 : Evolution de la stabilité des agrégats pour l'ensemble des modalités testées, pour le sol Purpan lors des incubations n°5, 2 et 3 après 12, 55, 188 et 265 jours d'incubations ; exprimée d'après le Diamètre Moyen Pondéral après désagrégation (DMP). Les données sont moyennées. Les barres d'erreur illustrent les écart-types. Les lettres en capital indiquent le résultat du Test Tukey (P < 0,05) 212

Figure 64 : Corrélations entre les teneurs en polysaccharides des sols à l'issue de l'incubation n°2 et la stabilité des agrégats 216

Figure 65 : Corrélations entre les teneurs en PLFA associés au taxon des champignons à l'issue de l'incubation n°2 et la stabilité des agrégats 216

Figure 66 : Illustration des relations entre les propriétés des sols étudiées, modifiées à la suite des apports en produits organiques. Les traits pleins représentent les relations observées et les traits en pointillées représentent les relations supposées. 222

Figure 67 : Délimitation des micro-parcelles pour les prélèvements de sol par carottage (à gauche sol PURPAN, à droite sol TARN). Les deux photos ont été prises fin août 2017. 250

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste non exhaustive des différentes approches méthodologiques pour l'étude de la vie microbienne des sols d'après (Pascault, 2010) 36

Tableau 2 : Capacités d'échange en cations de différents éléments des sols (Duchaufour, 2001) 41

Tableau 3 : Principales méthodes pour la prédiction de la stabilité des matières organiques apportés.....61

Tableau 4 : Taux de dégradation des matières organiques en digesteur (Moletta, 2015) 67

Tableau 5 : Caractéristiques granulométriques et physico-chimiques des sols étudiés prélevés par carottage (SADEF, accréditation COFRAC n°1-0751).....96

Tableau 6 : Caractéristiques élémentaires des échantillons de sol remanié. Analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (Thermo FlashHT with DeltaV Advantage) au sein de la : « Division of Soil and Water management » de l'université de KU Leuven 96

Tableau 7 : Caractéristiques chimiques et compositions élémentaires des produits organiques après congélation (SADEF, accréditation COFRAC n°1-0751) 98

Tableau 8 : Compositions élémentaires des produits organiques après séchage, broyage et tamisage. Analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (Thermo FlashHT with DeltaV Advantage) au sein de la : « Division of Soil and Water management » de l'université de KU Leuven 98

Tableau 9 : Résultats du test de potentiel méthanogène sur le maïs ensilage PlanET. Le test a été réalisé par le laboratoire APESA (Technopole Hélioparc, Pau) d'après la mesure de la production de biogaz dans un réacteur en conditions anaérobies, dans lequel sont mis en contact une quantité connue de l'échantillon à tester et une quantité connue de microorganismes anaérobies (inoculum) actifs et adaptés aux conditions de la mesure, ces derniers étant placés dans des conditions optimales de fermentation. Le potentiel méthanogène est le volume de méthane produit lors de la dégradation de l'échantillon, rapporté à la quantité de matière organique initialement présente dans l'échantillon utilisé pour le test. Ce volume de gaz est exprimé dans les conditions normales de température (0°C, 273 K) et de pression, (1atm ~ 1bar). A ce jour aucune norme internationale ne précise les conditions de réalisation de cette mesure. La mesure a été réalisée sur une durée de 24 jours (permettant d'atteindre l'asymptote de la production de biogaz cumulée) à une température de 38°C. Ce dispositif est comparable aux procédés de méthanisation en voie liquide infiniment mélangé d'où proviennent les digestats prélevés. 100

Tableau 10 : Teneur sur matières sèches en éléments non exportés via le biogaz (d'après analyses SADEF) et coefficients d'augmentation de leur concentration à la suite de la digestion anaérobie 100

- Tableau 11 : Calcul des principaux paramètres Rock-Eval pour la caractérisation des matières organiques. D'après Saenger (2013) à partir des notes techniques des équipes de l'Institut Français du Pétrole (IFP) et de Sebag et al. (2016).....106

Tableau 12 : Référence des équipements utilisés pour le prélèvement d'eau des sols incubations fournis par « Rhizosphère Research Products » (Agro Business Park 7N, 6708 PV Wageningen, Netherlands).....113

Tableau 13 : Couples masse de prise d'essai et solution de cobalthexamine pour chacun des substrats testés 119

Tableau 14 : Masses apportées lors de l'incubation au champ (calculs à partir des teneurs en éléments présentés par le Tableau 7).....129

Tableau 15 : Stockage de carbone (C) induit par l'apport de maïs ou de digestat de maïs, exprimé en % du C apporté initialement. Le stockage est décomposé en fonction de la stabilité des matières organiques (MO) apportées et des effets « priming », qui sont également exprimés en % du C apporté. Les données sont moyennées (n=4) avec l'écart type associé. Les lettres en capitales réfèrent à la comparaison des traitements (au sein d'une même incubation) d'après le test Tukey (P<0,05). 134

Tableau 16 : Niveaux d'humidité appliqués des sols « Purpan » et « Tarn » lors des incubations préliminaires 140

Tableau 17 : Stockage ou déstockage de carbone induit par l'apport de différents produits organiques lors des incubations n°3 et n°4, exprimé en % du Carbone apporté initialement. Les données sont moyennées (n=4) avec l'écart type associé. Les lettres en capitales réfèrent à la comparaison des traitements (au sein d'une même incubation) d'après le test Tukey (P < 0,05). Le (dé)stockage est décomposé en fonction de la stabilité des Matières Organiques (MO) apportées et des effet « priming », qui sont également exprimé en % du Carbone apporté. 169

Tableau 18 : Caractéristiques des matières organiques apportées d'après les paramètres issus de l'analyse Rock Eval 6.....189

Tableau 19 : Capacité d'Echange en Cations Effective au pH du sol à l'issue des incubations n°5, 2 et 3 (CECE, en cmolc+.kg_{solsec}^{-1}). Les lettres en capitales réfèrent à la comparaison des traitements d'une même incubation d'après le test Tukey (P<0,05). 203

Tableau 20 : Cations échangeables (en % de la CECE), Cations basiques échangeables (en % de la CECE) et Taux de saturation (Somme de Ca, Mg, K et Na en % de la CECE) au pH des sols à l'issue des incubations n°5, 2 et 3. Les lettres en capitales réfèrent à la comparaison des traitements d'une même incubation d'après le test Tukey (P<0,05). 203

Tableau 21 : Cations échangeables (en % de la CECE), cations basiques échangeables (en % de la CECE) et taux de saturation (Somme de Ca, Mg, K et Na en % de la CECE) au pH des produits organiques apportés (séchés, broyés, tamisés). Les lettres en capitales réfèrent à la comparaison des modalités d'après le test Tukey (P<0,05). Les cations basiques échangeables dosés n'ont pas pu être exprimés en % de la CECE pour les produits organiques dont la CECE est inférieure ou égale à zéro (valeurs aberrantes). 206

Tableau 22 : Coefficients de détermination (R^2) des régressions linéaires réalisées entre les trois tests pour l'ensemble des mesures et des modalités de l'étude 210

Tableau 23 : Coefficients de détermination (R^2) et coefficients directeurs (a) des régressions linéaires réalisées entre la production cumulée de C sur les 10 jours l'issue des incubations (en mgC/gsol sec) (x) et la stabilité des agrégats déterminée à l'issue des incubations d'après les tests d'humectations rapide et lente et de désagrégation mécanique. 214

Résumé

La filière biogaz est en développement en France et dans plusieurs pays Européen. En conséquence, une part croissante des produits organiques sont digérés en milieu anaérobie avant d'être valorisés agronomiquement. Les effets de la digestion des produits organiques sur leurs propriétés amendantes restent méconnues. Les propriétés amendantes des produits organiques apportés représentent un enjeu important pour la fertilité des Luvisols étudiés qui sont particulièrement dépendants d'une bonne teneur et des flux en matières organiques afin de maintenir leurs qualités chimiques, physiques et biologiques. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'évaluer les conséquences des modifications des caractéristiques des produits organiques lors de la digestion anaérobie sur : la vie microbienne, le stockage de carbone, le devenir des matières organiques, la stabilité des agrégats et la capacité d'adsorption de l'horizon de surface de Luvisols cultivés.

Durant les incubations, réalisées au champ et en conditions contrôlées, la biodégradation des matières organiques apportées et endogènes par les micro-organismes ont été suivies par la mesure de la production du dioxyde de carbone (CO_2) des sols amendés et non amendés puis son traçage grâce aux différences naturelles de l'abondance en isotope du carbone 13 (^{13}C) entre les plantes en C4 et en C3. Ces mesures ont permis de déterminer dans quelles proportions le stockage de C dans les sols induit par l'apport d'un produit organique est induit par la stabilité des matières organiques apportées et par les effets « priming ».

A l'issue des incubations, l'analyse de la structure taxonomique des communautés microbiennes actives à partir des composés membranaires phospholipidiques microbiens extraits des sols a été mise en relation avec les effets « priming » observés. Les mesures des teneurs en azote (N) et en phosphore (P) dissous, de la stabilité structurale des agrégats et de la Capacité d'Echange en Cations (CEC) ont permis d'étudier les conséquences agronomiques de l'apport des produits organiques.

Ce travail a permis de mieux appréhender la valeur agronomique des digestats de méthanisation en lien avec le devenir des matières organiques dans les sols et de formuler quelques préconisations concernant leur valorisation. Il a également permis de tester l'analyse par pyrolyse Rock Eval des matières organiques apportées et des sols amendés afin d'évaluer la stabilité potentielle des matières organiques apportées et les conséquences de leurs apports sur les caractéristiques des matières organiques des sols.

Mots clés : Digestion anaérobie, Matières organiques, Effets « priming », Stabilité structurale, Complexe adsorbant, Pyrolyse Rock Eval

Abstract

The biogas sector is developing in France and in several European countries. As a result, a growing proportion of organic products are digested in an anaerobic environment before being used for agricultural purposes. The effects of the anaerobic digestion of organic products on their amending properties remain unclear. The amending properties of the organic products brought in represent an important issue for the fertility of the Luvisols studied, which are particularly dependent on a good content and flow of organic matter in order to maintain their chemical, physical and biological qualities. Thus, the objective of this study is to evaluate the consequences of the modifications of the characteristics of organic products during anaerobic digestion on: microbial life, carbon storage, fate of organic matter, stability of aggregates and adsorption capacity of the surface horizon of cultivated Luvisols.

During incubations, carried out in the field and under controlled conditions, the biodegradation of brought and endogenous organic matter by the microorganisms was followed by measuring the production of carbon dioxide (CO_2) from amended and unamended soils and then tracing it through natural differences in the abundance of the carbon 13 isotope (^{13}C) between C4 and C3 plants. These measurements determined the extent to which C storage in soils induced by the input of an organic product is induced by the stability of the organic matter input and by priming effects.

At the end of the incubations, the analysis of the taxonomic structure of the active microbial communities from the microbial phospholipid membrane compounds extracted from the soils was related to the observed priming effects. Measurements of dissolved nitrogen (N) and phosphorus (P) content, stability of aggregates and Cation Exchange Capacity (CEC) made it possible to study the agronomic consequences of the input of organic products.

This work provided a better understanding of the agronomic value of digestates in relation to the fate of organic matter in soils and made it possible to formulate some recommendations concerning their use. It also made it possible to test the Rock Eval pyrolysis analysis of organic matter input and amended soils in order to assess the potential stability of the organic matter input and the consequences of their input on the characteristics of soil organic matter.

Keywords: Anaerobic digestion, Organic matter, priming effects, structural stability, ion exchange capacity, Rock Eval pyrolysis