



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



2013/2014

MASTER FAGE  
Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et  
l'Environnement

Spécialité Agro-écologie

Evaluation du potentiel méthanogène de différentes rations et des effets  
des digestats (fraction sèche et fraction liquide) sur des indicateurs de  
fonctionnement biologique du sol en lien avec le service de fertilité

Benjamin RAVARD

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 03/09/2014

Séverine PIUTTI, Maître de Conférences UMR Université de Lorraine (ENSAIA)-INRA  
Agronomie et Environnement, Nancy-Colmar

Sylvain Plantureux, Directeur adjoint UMR Université de Lorraine - INRA Agronomie et  
Environnement Nancy-Colmar ENSAIA

UMR Agronomie et Environnement UL-INRA 1121 Nancy Colmar – ENSAIA – 2 avenue de la  
forêt de Haye, 54600 Vandoeuvre lès Nancy

## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Présentation de la structure d'accueil</b> .....	1
<b>I) Synthèse bibliographique</b> .....	2
1.1) <u>Principe de la méthanisation</u> .....	3
1.1.1) Digestion en condition mésophile/thermophile .....	3
1.1.2) Digestion humide/sèche .....	3
1.2) <u>Typologie des digestats</u> .....	3
1.2.1) Caractérisation agronomique .....	3
1.2.2) Qualité sanitaire des digestats .....	3
1.3) <u>Intérêts agronomiques des digestats</u> .....	5
1.3.1) Impacts sur les rendements .....	5
1.3.2) Impacts sur la fertilité des sols .....	6
1.3.3) Les indicateurs potentiels de la fertilité .....	7
<b>II) Matériel et méthode</b> .....	9
2.1) <u>Mesure du potentiel méthanogène sur différentes rations</u> .....	9
2.2) <u>Cinétique de minéralisation de différents digestats</u> .....	9
2.3) <u>Caractéristiques de la ration (ingestat) et du digestat</u> .....	10
2.4) <u>Incubation des sols en conditions contrôlées</u> .....	10
2.5) <u>Respirométrie</u> .....	10
2.6) <u>Dosage de la biomasse microbienne du sol</u> .....	11
2.6.1) <u>Extraction de l'ADN du sol</u> .....	11
2.6.2) <u>Quantification de la taille de la communauté bactérienne et fongique par PCR quantitative</u> .....	12
2.7) <u>Dosage d'activités enzymatiques potentielles en lien avec les cycles biogéochimiques C, P et S</u> .....	12

<b>III) Résultats et discussions</b> .....	13
<u>3.1) Mesure du potentiel méthanogène</u> .....	14
<u>3.2) Minéralisation du carbone</u> .....	15
<u>3.3) Effet des amendements sur les biomasses microbiennes carbonée (BMC) et azotée (BMN)</u> .....	17
<u>3.4) Quantification de la taille de la communauté bactérienne et fongique par approche moléculaire</u> .....	19
<u>3.5) Evolution au cours du temps d'activités enzymatiques potentielles en lien avec les cycles biogéochimiques C, P et S et effets des différents amendements</u> .....	21
3.5.1) Activité arylsulfatase .....	21
3.5.2) Activité phosphatase .....	21
3.5.3) Activité bêta-glucosidase .....	22
<u>3.6) Corrélation entre les variables mesurées</u> .....	23
<b>IV) Discussion</b> .....	23
4.1) <u>Influence de la qualité de la ration sur le potentiel méthanogène</u> .....	23
4.2) <u>Influence de l'incorporation des digestats sur le fonctionnement biologique du sol</u>	
4.2.1) Minéralisation du carbone et biomasse microbienne carbonée et azotée	
4.2.2) Abondance des communautés bactériennes et fongiques .....	24
Conclusion .....	25
<b>Bibliographie</b> .....	26
Annexe .....	29

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma maitre de stage Séverine PIUTTI pour sa disponibilité, sa patience, sa gentillesse et aussi pour le rôle important qu'elle a joué dans mon avenir post master en me permettant d'intégrer un projet passionnant.

Ce stage m'a permis d'étoffer mon expérience au niveau des techniques et des connaissances sur les mesures opérées sur le sol ce qui sera à n'en pas douter d'une utilité importante dans mon avenir professionnel.

Je remercie Hugues CLIVOT pour le nombre important des conseils techniques ou méthodologiques qu'il m'a prodigué au cours de ces 6 mois de stage, mais également Nicolas ROMILLAC pour m'avoir expliqué avec beaucoup de clarté les extractions et amplification d'ADN.

Je remercie l'ensemble du personnel du LAE équipe agriculture durable et métabolites secondaires confondus pour leur accueil et l'aide qu'ils m'ont chacun apporté pendant ces 6 mois de stage.

Il m'est impossible de ne pas remercier mes collègues stagiaires Marc, Christelle, Manon, Angélique, Amalia, Cynthia, Edouard, Chloé avec qui j'ai passé de très bons moments et qui ont donné encore plus de saveur à ce stage qui n'en manquait pas.

Enfin je tiens à remercier mes parents et mon frère pour leurs soutiens et leurs encouragements tout au long de mon cursus. Je leur dédie mes réussites passées mais surtout à venir.

## Introduction

Ces dernières années l'augmentation des coûts de l'énergie sont à l'origine d'une prise de conscience collective sur la nécessité d'une plus grande autonomie de nos sociétés. Comme d'autres secteurs fortement dépendant des énergies fossiles, le monde agricole cherche à accroître son autonomie en intégrant dans les nouveaux modèles de production (i) des ateliers de production d'énergies (méthanisation, photovoltaïque...), (ii) des pratiques agricoles cohérentes avec la notion d'agriculture écologiquement intensive (c'est-à-dire une agriculture qui utilise intensivement les fonctionnalités des systèmes productifs en s'appuyant sur une agriculture durable dans un cadre d'écosystèmes eux aussi durable pour des sociétés économiquement et socialement viable). L'azote joue un rôle central dans les systèmes de production agricole. Pour l'azote par exemple les apports agricoles en France correspondent à 47% à des engrais de synthèse, 41% à des effluents d'élevage, 11% à la fixation symbiotique d'azote atmosphérique *via* les légumineuses et à 1% aux composts et boues de station d'épuration. A l'échelle de la France certaines zones du territoire sont excédentaires en azote organique (zones d'élevage) et d'autres s'appuient exclusivement sur des engrais minéraux. La méthanisation est une des solutions permettant d'assurer une meilleure valorisation de l'azote dans les systèmes agricoles. La mise en place d'unités de méthanisation soutenue par le plan Energie Méthanisation Autonomie Azote (EMAA) participe à cette volonté d'accroître l'indépendance des exploitations agricoles à la fois sur le volet énergie et azote. Ce plan vise à développer à l'horizon 2020 1000 méthaniseurs à la ferme sur tout le territoire quand ils n'étaient que de 90 en 2012.

La digestion anaérobie qui s'opère durant le processus de méthanisation transforme la matière organique en biogaz et permet la production par cogénération de chaleur et d'énergie. En France, les agriculteurs s'appuient sur les effluents d'élevage pour alimenter leurs méthaniseurs en complétant les apports avec du maïs, de l'herbe, des cultures intermédiaires à valorisation énergétique (CIVE) ou des résidus de cultures (type pailles, fanes,...) pour optimiser la production. A l'issue de cette digestion une matrice organique résiduelle appelé digestat est obtenue. Le digestat peut être utilisé en retour comme amendements/engrais organiques selon sa composition sur les parcelles agricoles.

Dans ce contexte favorable au développement de la méthanisation dans les exploitations agricoles françaises, deux grandes interrogations remontent du terrain :

- (i) Quel est le potentiel de production d'énergie à partir des effluents et autres produits disponibles sur leur exploitation ? En effet il existe une grande diversité de matières organiques (d'origine agricole, déchets des industries agro-alimentaires et des collectivités territoriales) susceptibles d'être valorisés en méthanisation avec des rendements différents.
- (ii) Quels sont les effets des digestats en substitution des apports d'effluents d'élevage sur la fertilité du sol (notamment la matière organique) et la limitation en intrants azotés d'origine chimique sur les exploitations ?

## Présentation de la structure d'accueil :

Le laboratoire agronomie et environnement (LAE) est une unité mixte de recherche INRA - Université de Lorraine (ENSAIA). Les thématiques de recherche abordées concernent la durabilité des systèmes agricoles avec le développement d'indicateurs agri-environnementaux et l'étude des interactions agriculture/biodiversité, mais aussi le métabolisme impliqué dans les processus de défense et d'adaptation aux stress environnementaux (métabolisme secondaire) chez les plantes.

Une des particularités de cette structure réside dans la double localisation de ces infrastructures sur deux zones géographiques distinctes. Un site se trouve à Nancy-Brabois alors que le second se situe à Colmar. Les échelles d'études vont du macroscopique (biodiversité en milieux agricoles, l'étude de systèmes de production agricole), jusqu'à l'étude moléculaire du métabolisme des plantes.

Mon stage de master 2 a été effectué dans l'équipe Agriculture durable (AD) avec pour objectif de mesurer la production de différentes rations de méthanisation et de mieux comprendre les effets de l'amendement de digestat agricole sur la fertilité des sols. L'équipe AD centre ses recherches sur la mise au point de méthodes d'évaluation de l'impact des techniques de production végétale sur l'environnement (air, eau, sol, biodiversité, paysage, énergie) pour en améliorer la durabilité environnementale.

## D) Synthèse bibliographique

### 1.1) Principe de la méthanisation

La méthanisation est un procédé biologique de décomposition de la matière organique (MO) grâce à l'action de différentes populations bactériennes (hydrolytiques, fermentatives, acétogènes et méthanogènes). Cette décomposition conduit à la formation de biogaz composé essentiellement de méthane. Les unités de méthanisation utilisent ce procédé et récupèrent le biogaz issu de cette réaction. Ce dernier est utilisé en général pour alimenter un moteur permettant de générer de l'électricité et de la chaleur. A l'issue de la réaction, en plus des biogaz produits, la méthanisation permet de produire du digestat qui selon les caractéristiques peut être utilisé comme un amendement ou un engrais.

La méthanisation se décline en trois réactions distinctes : (figure 1, <http://www.methaneva.eu/la-methanisation-3.html>)

#### 1) *L'hydrolyse et l'acidogénèse* (figure 1)

Lors de cette première étape, les macro-molécules sont hydrolysées en monomères. Les monomères ainsi formés sont fermentés en acides gras volatils (comme des acides acétiques, acides butyriques ou propioniques,...), en alcools et en acides organiques (comme l'acide lactique grâce à l'action des bactéries fermentatives).

#### 2) *L'acétogénèse* (figure 1)

L'acétogénèse consiste en la transformation des produits issus de l'acidogénèse en acétate, gaz carbonique et en hydrogène.

#### 3) *La méthanogénèse* (figure 1)

La dernière étape de la digestion anaérobie permet la formation de l'acétate et l'hydrogène formée lors de la réaction précédente (ie. acétogénèse) en méthane et CO<sub>2</sub>.

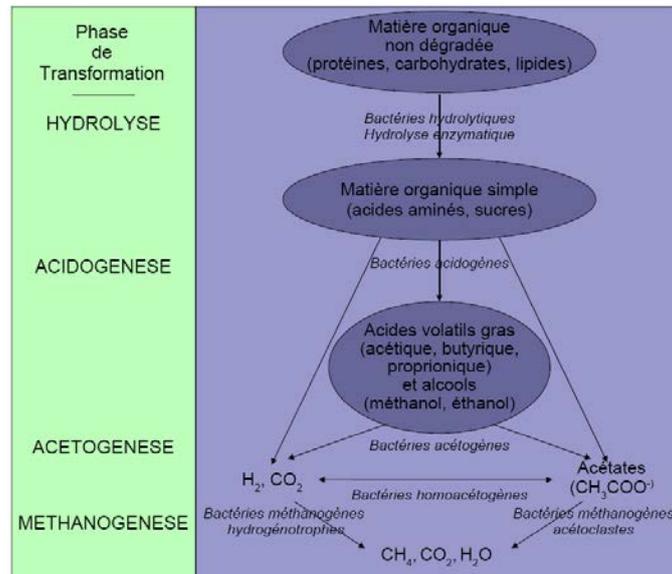


Figure 1 : Etapes de la digestion anaérobie

La composition de la ration influence le rendement de la réaction. Afin de maximiser la production de biogaz, des substrats riches en graisses, protéines et hydrates de carbone sont incorporées dans le digesteur tel que les déjections animales (fumier, lisier) ou les cultures (maïs, betteraves, ...), résidus de cultures (tourteaux, pulpes,..) ainsi que des co-substrats d'origines diverses (d'industries agro-alimentaire, de collectivités,...).

### 1.1.1) Digestion en condition mésophile/thermophile

Classiquement la méthanisation est opérée à une température comprise entre 35 et 37°C, en utilisant une partie du biogaz produit pour générer de la chaleur et réchauffer le substrat. Il s'agit du procédé mésophile.

La digestion peut aussi avoir lieu à une température de 55°C c'est-à-dire en conditions thermophiles. Cette température plus élevée permet une vitesse de croissance supérieure des populations microbiennes et une réduction des temps de séjour en digesteur qui passent à 10-15 jours (contre 3 semaines en conditions thermophile).

### 1.1.2) Digestion humide/sèche

En plus du choix de la température, il existe une multitude de procédés opérant la digestion anaérobie. Néanmoins deux grands types se dégagent avec la méthanisation en phase humide ou infiniment mélangé et celle en voie sèche.

Pour la digestion en phase humide, la teneur en eau de la ration est ajustée de manière à retrouver une teneur proche de 10-15 % de matière sèche.

La digestion « sèche » se caractérise elle par une teneur supérieure à 15-20 % de MS de la ration.

## 1.2) Typologie des digestats

### 1.2.1) Caractérisation agronomique

La qualité agronomique d'un digestat est définie par la composition en éléments fertilisants qu'il contient, par l'efficacité de ces éléments lorsque ils sont apportés au système sol/plante par le digestat et par ses propriétés d'amélioration potentielles des qualités physiques (porosité, capacité d'échange cationique, pH,...) et biologiques du sol. (Rapport ADEME, 2011)

Azote (N) : Le procédé de méthanisation a pour effet de convertir une grande partie de l'azote organique (protéines et urée principalement) en azote minéral. Cette minéralisation de l'azote est proportionnelle au taux de dégradation du carbone. En raison du milieu réducteur qui prévaut au sein du digesteur, cet azote minéral est sous forme ammoniacale (ion  $\text{NH}_4^{++}$  dissous) et représente alors entre 45 et 85 % de l'azote total du digestat final (rapport ADEME, 2011).

La fraction solide a une forte teneur en azote c'est-à-dire comprise entre 4,6 et 6,5 mg/ kg de matière fraîche (Möller et Müller, 2012). Mais la plus forte part d'azote se trouve dans la fraction liquide avec 7,7-9,2 % de la matière sèche (Möller et Stinner, 2010)

Carbone (C): Une grande partie du carbone est perdu sous forme de méthane et de dioxyde de carbone. La comparaison des rapports C/N des rations et des digestats permet d'observer cette diminution car il diminue d'environ 50% (rapport ADEME, 2011). Seuls les éléments les plus stables comme la lignine sont présent dans le digestat. La séparation de phase a pour effet de concentrer le carbone dans la phase solide du digestat. De ce fait le rapport C/N est important puisqu'il est compris entre 11,2 et 19,3 dans la fraction solide. De plus la teneur en carbone organique est comparable à un fumier avec des teneurs similaires (342 g/ kg de matière sèche contre 345 pour le fumier). La fraction solide constitue donc un excellent amendement organique en participant à l'amélioration du bilan humique des sols. Cependant, la forte teneur en fractions organiques récalcitrantes (comme la lignine présente entre 20 et 30% de la MO) peut engendrer une plus forte stabilité biologique (Tambone *et al*, 2013). En revanche la phase liquide présente un C/N faible (3,7-7,8) (Möller et Müller 2012).

Phosphore (P) : De même que pour l'azote, une partie du pool initial de phosphore organique (1/3 environ) est minéralisé pendant la digestion et solubilisée dans la fraction liquide pour ensuite former des substances minérales comme la struvite ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ ) et le phosphate de calcium (hydroxyapatite) (Couturier *et al*, 2001). Après séparation de phase, 70% du P total se retrouve dans la phase solide. Selon les MO utilisées en méthanisation, les concentrations sont différentes. Selon Gungor et Karthikeyan (2008), la fraction de P dissous dans le fumier non digéré qui est de l'ordre de 45% à 70% du P total, n'est plus que de 25-45% du P total après digestion. La digestion du fumier semble ainsi réduire la fraction de P qui est immédiatement disponible (ie. P soluble) en augmentant la stabilité des phases solides retenant le P.

La fraction solide présente des teneurs en P importantes (2-2,5 mg/kg de matière sèche) (Möller et Müller 2012 ; Tambone *et al*, 2013). Par contre la fraction liquide présente des teneurs plus faibles (0,7-1 mg/kg de la matière fraîche)

Potassium (K) : La digestion permet une meilleure biodisponibilité de cet élément pour les plantes puisqu'il sera en grande partie dissous. Après séparation de phase, la quasi-totalité du K se trouve dans la phase liquide du digestat. Il semble que la disponibilité à court terme du K dans le fumier solide est inférieure à la disponibilité dans le lisier digéré ou non digéré qui se trouve sous forme liquide (Rapport ADEME, 2011). Les teneurs en K dans la fraction liquide sont d'environ 3,9% de la matière sèche (Möller et Stinner 2010). Les fortes teneurs en K et en N permettent à la fraction liquide des apports adaptés aux besoins des cultures (Lied et Cummins 2006 ; Möller et Stinner 2010).

## 1.2.2) Qualité sanitaire des digestats

### Les polluants organiques

Les digestats d'origine agricole présentent des teneurs variables en polluants organiques, qui dépendent surtout des matières premières utilisées pour la digestion. Ces concentrations restent toutefois inférieures aux limites fixées par les normes NFU 44-051 et NFU 44-095, pour les concentrations en HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) ou en PCB (polychlorobiphényles) (Rapport ADEME, 2011).

### Les polluants métalliques

En ce qui concerne les ETM (Eléments Traces Métalliques), la méthanisation les concentre dans les digestats, de la même façon que les nutriments. Le facteur de concentration des ETM est en partie fonction du potentiel méthanogène (quantité maximale de méthane produit par litre d'effluent ou par kg de déchet lorsque ceux-ci sont traités dans un réacteur de digestion anaérobie) des matières premières. En effet, plus le carbone extrait sera sous forme de biogaz, plus les matières minérales, et donc les ETM seront concentrés dans le digestat. Les facteurs de concentration relevés sont de 1,3 pour le lisier de porc, de 4 pour le maïs et de 10 pour le seigle. (Rapport ADEME, 2011).

Cependant pour la grande majorité digestats testés, les teneurs en ETM issus des déchets agricoles et matières végétales, de quelque nature que ce soit (brut, liquide, solide) sont inférieures aux limites de la Norme NFU 44-051. (Rapport ADEME, 2011).

### Les agents pathogènes

La digestion anaérobie permet la réduction des concentrations en germes pathogènes, avec une efficacité beaucoup plus importante en conditions thermophiles qu'en conditions mésophiles. La digestion mésophile présente une diminution en agents pathogènes de l'ordre de 80% qui n'assure pas forcément une hygiénisation suffisante pour prévenir le développement ultérieur des microorganismes pathogènes lors du stockage. Certaines bactéries ne seront que peu affectées en termes de réduction de leur population, par la méthanisation thermophile du fait de leur passage en formes résistantes. La sporulation notamment leur permet de résister aux températures de 55°C.

## 1.3) Intérêts agronomiques des digestats

### 1.3.1) Impacts sur les rendements

Le digestat, épandu en l'état, garde le statut de déchet (<http://www.biogaz-energie renouvelable.info>). En fonction des matières premières, il sera soumis à un plan d'épandage (effluents d'élevage...). La réglementation de l'épandage du digestat varie en fonction des départements, du règlement sanitaire départemental, des arrêtés préfectoraux en rigueur, des décrets d'application départementaux de la directive nitrate. Sur prairies, la croissance et les rendements sont comparables entre des fertilisants NPK minéraux du commerce et du digestat liquide c'est-à-dire à 4,5 tonnes de MS/ha. (Walsh *et al.* 2010). L'utilisation du digestat liquide, du fait de la disponibilité immédiate en nutriments pour la plante, permet ainsi de maintenir les rendements des systèmes prairiaux tout en réduisant les pertes potentielles de nutriments par lessivage dans l'environnement.

L'utilisation de digestats sur avoine et orge en comparaison à l'effet d'engrais vert, permet une augmentation des rendements des cultures de 6 à 20% (Odlare, 2005). Sur le court terme la disponibilité en N pour les plantes augmente quand le digestat est incorporé directement dans le sol (Möller et Müller 2012). Des expérimentations au champ montrent une assimilation de l'N identique à des fertilisants azotés du commerce pour la phase liquide et le digestat brut (Liedl *et al.*, 2006 ; Chantigny *et al.*, 2008 ; Fouda, 2011).

Contrairement à la phase liquide, l'application du digestat solide montre des rendements significativement plus faibles comparativement aux valeurs observées pour des fertilisants azotés issus de la synthèse chimique. Ces rendements plus faibles seraient liés à une immobilisation sous forme de composé microbien de l'azote après l'application de la phase solide (Labosky *et al.*, 2010).

### 1.3.2) Impacts sur la fertilité des sols

#### Définition du service de fertilité des sols

En 1996, Soltner, la définit comme « l'aptitude d'un sol à produire toute la chaîne alimentaire allant des micro-organismes à l'homme, en passant par la plante et l'animal, et ceci pendant des générations ». En

matière de fertilité, le potentiel de production d'une parcelle est fonction des propriétés du sol (fertilité intrinsèque) mais également des conditions climatiques. La fertilité d'un sol englobe généralement trois types de composantes qui sont interdépendantes :

- La fertilité 'physique' déterminée par la texture et la structure du sol
- La fertilité 'biologique' déterminée par l'activité des communautés d'organismes du sol
- La fertilité 'minérale' déterminée par la disponibilité en éléments minéraux

Nous traiterons plus particulièrement de la fertilité minérale des sols.

### *Définition de la fonction*

La fertilité minérale des sols, à la base d'un service 'intransmissible' à la production, peut être défini comme la capacité d'un sol à fournir les éléments minéraux permettant d'assurer la productivité primaire d'un agro-écosystème (Trichet *et al*, 1999). La fertilité minérale peut se décliner en 3 niveaux d'un point de vue temporel (Tableau 1).

Composante	Définition	Échelle d'analyse
<b>Fertilité actuelle</b>	Stock d'éléments minéraux disponibles pour la végétation	Cycle de végétation
<b>Fertilité à moyen terme</b>	Réserves en minéraux mobilisables et étude de la dynamique de ces éléments (flux)	Rotation
<b>Fertilité à long terme</b>	Réserves totales du sol en éléments minéraux, indépendamment de leur forme chimique	

**Tableau 1 :** Définition des composantes de la fertilité des sols forestiers (d'après Trichet *et al*, 1999)

### *Les processus impliqués*

La fraction solide du sol est aussi composée de constituants organiques. Ces derniers issus de la décomposition de débris organiques (végétaux ou animaux) sont enfouis dans le sol et conduisent à l'apparition de matières humiques. Cette matière organique du sol est composée de produits frais ou peu transformés appelés MO fraîche et de produits évolués appelés matières humiques. Ces deux fractions ont des réactivités très différentes notamment du fait de la nature des composés présents.

La fertilité minérale du sol, pour des éléments présents majoritairement sous des formes organiques tel que l'N, dépend des réserves en MO dissoutes et extractibles (Sinsabaugh, 1994, Cookson *et al*, 2007). Ces réserves, qui résultent de la première étape de décomposition des MO complexes du sol, à savoir l'étape de dépolymérisation, seront mises à disposition de la plante après minéralisation (Figure 2). L'étape de dépolymérisation des MO, qui sont des polymères de formes chimiques complexes, est généralement considérée comme l'étape limitante dans la disponibilité des éléments nutritifs.

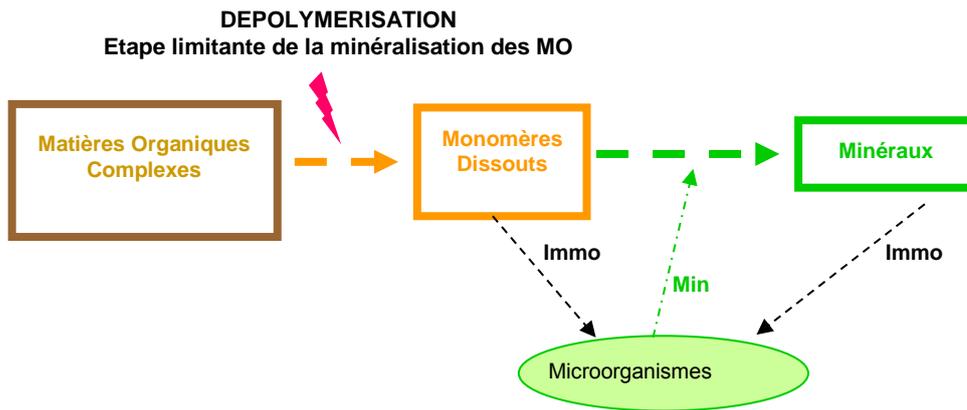


Figure 2 : Les différentes étapes de décomposition des MO (d'après Cookson *et al*, 2007) Min : minéralisation, Immo : immobilisation

La décomposition des matières organiques va être conditionnée par des facteurs édaphiques (Température, pH, teneur et qualité des matières organiques...) et des facteurs biologiques, au travers de la contribution des micro-organismes à la dynamique des MO (Stockdale *et al*, 2002; Marschner et Kalbitz, 2003). Les travaux de Fontaine et Barot (2005) mettent en évidence que les processus de décomposition dépendent fortement de la taille mais aussi de la diversité et de l'activité métabolique des communautés microbiennes du sol. En effet, la composition de la microflore active du sol influence le type et la nature des enzymes (en termes de spécificité de substrats) synthétisées et qui sont les effecteurs microbiens impliquées dans la dégradation des matières organiques (Sinsabaugh *et al*, 2008).

### 1.3.3) Les indicateurs potentiels de la fertilité

- Indicateurs concernant les éléments minéraux biodisponibles

#### *Cas de l'azote*

L'azote est un élément indispensable aux cultures. Dans les sols il est essentiellement présent sous forme organique. La transformation en forme minérale ( $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$ ) dépend du fonctionnement des micro-organismes du sol. Fort de ce constat des méthodes d'incubation des sols qui permettent de déterminer les quantités d'azote qui seront minéralisées si les conditions climatiques et agronomiques du champ sont identiques. Cette approche permet de fournir par excès des quantités d'azote qui pourra apparaître sous forme minérale dans le sol.

#### *Cas du potassium*

Le plus souvent pour examiner la taille du pool d'ions potassium du sol qui pourraient servir à nourrir la plante il suffit de « sortir » les cations  $\text{K}^+$  de leurs « caches » situées sur ou dans les constituants du sol avec d'autres cations, le plus souvent de l'ammonium. (Bosc, 1988). La simplicité technique de cette méthode permet l'obtention de résultats très reproductibles. Cependant son approche est légèrement discutable en termes de rapport avec le prélèvement par les plantes car les plantes en absorbant le potassium n'apporte pas de cations en quantité significative au sol. Cela veut donc dire que le potassium extrait est du potassium échangeable contre l'ion ammonium et non du potassium assimilable comme c'est souvent le cas. De plus cette méthode n'apporte aucune information concernant la vitesse de transfert des constituants solides du sol jusqu'à la racine comme c'est le cas pour le phosphate.

#### *Cas du phosphore*

Au même titre que l'azote et le potassium, le phosphore est un élément nutritif majeur pour les plantes. La méthode d'Olsen est un indicateur de routine, il est le plus susceptible de renseigner sur une éventuelle contrainte en phosphore originaire du sol pour satisfaire la demande végétale (Fardeau *et al* 1988). Le problème est que la nutrition des plantes est un processus qui dépend du temps. La croissance de la plante ne s'opère pas d'un seul coup. Cette indicateur n'informe que sur la quantité extraite actuellement et par conséquent ne rend pas compte de la cinétique de libération des ions phosphates. C'est en partant de ce constat que la méthode dite des échanges isotopiques est née. Elle renseigne sur la mobilité des ions phosphore du sol sans les déloger de leurs sites d'accueil, permettant de prendre le temps en compte mais aussi d'autres facteurs tels que la concentration, ....

- Indicateurs biologiques

Pour caractériser les organismes du sol, les indicateurs le plus souvent utilisés dans la littérature francophone sont les vers de terres et la biomasse microbienne. Ces organismes sont classés selon leur taille (Blair *et al*, 1996) selon trois classes ; la microflore et microfaune (bactéries, champignons, ...) de taille comprise entre 0,05 µm et 100 µm, la mésofaune (acariens, araignées, ...) de taille comprise entre 100 µm et 2 mm et la macrofaune et mégafaune (vers de terre, taupe, lapins, ...) de taille supérieure à 2 mm.

#### *Indicateurs de biomasse microbienne*

Les indicateurs de biomasse microbienne sont la quantité d'azote ou de carbone présent dans la biomasse microbienne d'une part (Chaussod, 1996) et d'autre part les actions mises en œuvre par la biomasse c'est-à-dire classiquement soit l'activité de dégradation de la matière organique estimée par le dégagement de CO<sub>2</sub>, soit des activités enzymatiques. Il existe deux manières de quantifier la biomasse microbienne :

- par extraction du C ou N microbien après fumigation du sol au chloroforme
- par extraction de l'ADN total du sol et quantification de cet ADN qui ensuite peut être utilisé pour quantification d'une part de la biomasse bactérienne et d'autre part de la biomasse fongique. La biomasse moléculaire microbienne est un facteur déterminant dans la qualité biologique des sols. Ceci est dû à son rôle dans la régulation, la transformation et le stockage des nutriments. Cette quantité de biomasse microbienne est démontrée comme étant un indicateur sensible, robuste et précoce des perturbations d'un sol liées à des modifications de pratiques agricoles, des contaminations, des changements de statut organique (Ranjard *et al*, 2006). La mesure de la Biomasse Moléculaire microbienne correspond au rendement d'extraction d'ADN du sol. La biomasse microbienne extraite d'un gramme de sol agricole en rotation est de l'ordre de 9-10 µg d'ADN/ g de sol.

#### *Les enzymes du sol*

Un ensemble d'enzymes microbiennes ont été décrites pour leur rôle dans la décomposition des MO. Depuis quelques années, des travaux ont visé à développer des indicateurs microbiens tenant compte de la contribution des communautés microbiennes aux cycles biogéochimiques des éléments. Ces enzymes jouent un rôle important dans la décomposition des matières organiques et le recyclage des nutriments. Certaines comme la bêta-glucosidase facilite la rupture des matières organiques complexes tandis que d'autres sont impliquées dans la décomposition / minéralisation des formes organiques de N, P et soufre (S) dans les sols. Ces enzymes, d'origine microbienne, en lien avec les grands cycles biogéochimiques, N, P, C et S peuvent constituer des indicateurs potentiels de la fertilité des sols. Les enzymes les plus étudiées sont ainsi la bêta-glucosidase (cycle du C), les protéases et l'uréase (cycle de N), les phosphatases (cycle de P), l'arylsulfatase (cycle du S). Les enzymes du sol sont fortement influencées par les conditions physico-chimiques. Ainsi, le niveau d'activité arylsulfatase des sols par exemple est ainsi corrélé significativement avec la teneur en C organique des sols (Deng et Tabatabai, 1997). La majorité

de ces activités enzymatiques sont fortement corrélées au pH du sol (Sinsabaugh *et al*, 2008). Les phosphatases sont considérées comme des enzymes clés du cycle du phosphore dans le sol (Dick et Tabatabai 1984). Les phosphatases alcalines sont considérées d'origines exclusivement microbiennes alors que les phosphatases acides peuvent provenir des populations microbiennes ou des plantes (Chondar et Tarafdar, 1981).

## II) Matériel et méthode

### 2.1) Mesure du potentiel méthanogène sur différentes rations

Le potentiel méthanogène consiste en une mesure du volume de biogaz produit lors de l'incubation d'une ration donnée. Cette méthode simple est un bon indicateur de production d'énergie.

La méthode consiste à incuber des rations fumiers/lisiers provenant de fermes lorraine (apport équivalent à 5 g de matière organique) dans des flacons plasma (deux répliques par ration) en présence de 215 ml d'inoculum possédant l'ensemble des micro-organismes nécessaires à la digestion anaérobie et 535 ml d'eau afin de maintenir une humidité suffisante pour une activité optimale de l'ensemble des bactéries. Les bouteilles sont placés ensuite à 37°C pendant 38 jours. Les deux premières semaines la production de biogaz est mesurée quotidiennement grâce à un compteur de gaz à tambour Ritter, puis les mesures peuvent être réalisées tous les deux ou trois jours.

### 2.2) Cinétique de minéralisation de différents digestats

*Caractéristiques du sol :*

Le sol utilisé lors du second volet de cette étude a été prélevé sur la ferme expérimentale de La Bouzule situé à Champenoux (Lorraine). Ce dernier a été prélevé dans l'horizon supérieur (20cm) puis tamisé à 5 mm. Les caractéristiques du sol sont présentées dans le tableau 2.

Humidité équivalente	20,8 g/100g
Argile (<2 µm)	285 g/kg
Limons fins (2/20 µm)	261 g/kg
Limons grossiers (20/50 µm)	91 g/kg
Sables fins (50/200 µm)	115 g/kg
Sables grossiers (200/200 µm)	248 g/kg
Carbone organique	20,1 g/kg
Azote organique	1,74 g/kg
C/N	11,6
Matière organique	34,8 g/kg
pH	8,33
Soufre	6,84 mg/kg

Tableau 2 : Caractéristiques du sol de La Bouzule

### 2.3) Caractéristiques de la ration (ingestat) et du digestat

Le digestat et la ration proviennent du méthaniseur mis en place sur la ferme de La Bouzule. Le méthaniseur fonctionne avec la ration suivante lisier (60%) et fumier (40%) de bovin. A l'issue de 3 mois de temps de séjour dans le méthaniseur, le digestat a été récupéré et envoyé ainsi que la ration pour caractérisation biochimique de la matière organique au laboratoire SADEF. Sur le digestat brut, une étape

de séparation de phase a été réalisée (par centrifugation) de façon à pouvoir tester les effets des fractions solides et liquides sur le fonctionnement du sol en comparaison avec le digestat brut.

## 2.4) Incubation des sols en conditions contrôlées

L'incubation des échantillons de sol est réalisé dans des bocaux type le Parfait de 0,5 l dans lesquelles sont placés un pilulier en verre contenant 40g de sol frais. Un pilulier d'eau sert à la saturation de l'atmosphère du bocal en eau et un pilulier contenant 10 ml de soude (0,2M) pour piéger le dégagement de CO<sub>2</sub> inhérent à la respiration du sol. L'incubation a été réalisée à 20°C à une humidité constante proche de 28% sur 56 jours avec 6 dates de prélèvement en jours (t0, t3, t7, t14, t28, t56), 5 modalités ont été testées avec 4 répétitions.

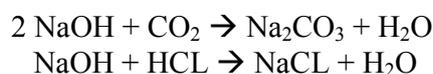
- 1) sol témoin non amendé (T)
- 2) sol amendé avec la ration (R)
- 3) sol amendé avec le digestat brut (DB)
- 4) sol amendé avec la fraction solide du digestat brut (FS)
- 5) sol amendé avec la fraction liquide du digestat brut (FL)

La quantité d'amendement a été établie en respectant les préconisations données aux agriculteurs pour l'application de fumier (cette préconisation est appliquée dans notre cas pour la ration, le digestat brut et la fraction solide) et de lisier (appliquée pour la fraction liquide). Ces préconisations font état de 35 tonnes/ha pour le fumier et 30 m<sup>3</sup>/ha pour le lisier. L'équivalent dans nos sols représente 440 mg pour les amendements solides et 40 µL par pot pour la fraction liquide.

L'ensemble des variables biologiques mesurées sur le sol sont exprimées relativement à une masse de sol sec afin de rendre comparables les valeurs obtenues sur chaque échantillon, n'ayant pas forcément une humidité initiale identique.

## 2.5) Respirométrie

L'objectif est de mesurer le dégagement de CO<sub>2</sub>. Le dégagement de CO<sub>2</sub> dans le bocal est piégé grâce à la soude (0,2 M) présente dans un pilulier. A chaque mesure (tous les 7 jours), ce pilulier est remplacé et titré afin d'éviter une saturation en CO<sub>2</sub> qui biaiserait les mesures. Peu avant le titrage, 2 ml de BaCl<sub>2</sub> à 20% (précipitation du carbonate de soude en carbonate de baryum permettant d'éviter la fixation par la soude du CO<sub>2</sub> atmosphérique) est ajouté à la soude et 2-3 gouttes de thymol-phtaléine à 1% donnant à la solution une coloration bleue. Le titrage est effectué en versant de l'acide chlorhydrique (0,2M) dans le mélange jusqu'à disparition de la coloration dans le flacon. L'estimation du carbone respiré (mg) dans le bocal est calculée en utilisant les équations de réaction:



CO<sub>2</sub> piégé (en mg de C) = 0.5\* (Volume blanc – Volume échantillon)\*12

La mesure de respiration permet ainsi de calculer le taux de minéralisation du C du sol (en mg de C /g de sol/ h

## 2.6) Dosage de la biomasse microbienne du sol:

La notion de biomasse microbienne recouvre l'ensemble des micro-organismes du sol (bactéries, champignons...). La méthode utilisée pour le dosage de la biomasse microbienne présente dans le sol est celle de la fumigation-extraction (Vance *et al*, 1987) qui permet de déterminer le carbone organique extractible suite à un traitement biocide, une fumigation du sol avec des vapeurs de chloroforme pendant 16 heures. Les vapeurs de chloroforme vont dissoudre les membranes des microorganismes du sol et

entraîner la libération du contenu intracellulaire (carbone et azote) dans le sol. La fumigation a été réalisée sur des échantillons de sol de 10 g frais placés dans un incubateur en verre avec du chloroforme. La mise sous vide entraîne le dégagement des vapeurs de chloroforme.

Après 16 heures de traitement, les vapeurs de chloroforme ont été éliminées par des mises sous vide successives. Parallèlement à cela, des échantillons témoins c'est à dire non fumigés ont été préparés (10 g frais). L'ensemble des échantillons (fumigés et témoins) subissent ensuite une extraction dans 40 ml d'une solution de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5M) pendant 45 minutes dans un agitateur à révolution. A l'issue de cette extraction, les échantillons sont filtrés sur Whatman 42 (filtre sans cendre) puis dilués au 1/10<sup>ème</sup> et stockés au congélateur à -20°C. La détermination des quantités de carbone et d'azote totales extractibles présentes dans les échantillons de sol, est effectuée par passage à l'analyseur TOC (Carbone Organique Total) et TN (Azote Total). Les résultats (en milligrammes de carbone et azote par litre) obtenus à partir des échantillons non fumigés ont été retranchés de ceux des échantillons fumigés puis divisées pour le carbone et l'azote par les coefficients d'extractibilité respectifs de 0,45 et 0,54.

### 2.6.1) Extraction de l'ADN du sol

Pour l'extraction d'ADN, 0,25g de sol sont mis en présence de 0,5g de billes de 106 µm et 2 billes de 2mm dans 1 ml de tampon (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 100 mM pH 8, NaCl 100 mM, 1% PVP, 2% SDS). Chaque échantillon est placé dans un broyeur à une fréquence de 30 coups s-1 pendant 2min puis en incubation au bain marie à 70°C pendant 10 min. Les échantillons sont centrifugés pendant 1min à 13200 rpm et sur le volume de surnageant récupéré, de l'acétate de sodium à 5M pH 5,5 (1/10 du volume) est ajouté pour précipiter les protéines 10 min sur la glace.

Le surnageant récupéré à l'issue d'une étape de centrifugation de 5 min à 13200 rpm subit une précipitation à l'isopropanol (15 min à -20°C) puis un lavage à l'éthanol froid à 70%. Après centrifugation, le culot est placé 15min à 37°C pour éliminer toute trace d'éthanol puis est à nouveau suspendu dans 100µL de TE à pH 8. L'ADN de chaque échantillon est déposé sur gel d'agarose à 1% afin d'évaluer leur qualité. Il est ensuite dosé à 260 nm à l'aide d'un BioPhotomètre (Eppendorf, Hambourg, Germany).

### 2.6.2) Quantification de la taille de la communauté bactérienne et fongique par PCR quantitative

Le principe de la PCR quantitative se base sur l'incorporation à chaque cycle d'amplification d'un fluorochrome (SYBR green) entre deux brins d'ADN néo-synthétisés. Cette incorporation conduit à l'émission d'une fluorescence qui sera proportionnelle aux nombres de brins d'ADN synthétisés au sein d'un échantillon. Le nombre de cycles d'amplification minimum pour que la fluorescence augmente linéairement dans un échantillon est alors déterminée et correspond à une valeur seuil appelée « Cycle Threshold » (CT). A partir d'une gamme étalon contenant des nombres connus de copies d'ADN, il est possible de convertir le CT des échantillons en une unité choisie.

La PCR quantitative est réalisée afin d'estimer la « taille » de la communauté bactérienne (amorces ciblant une portion de l'ADNr 16S) et fongique (amorces ciblant une portion de l'ADNr18S) totale du sol.

Le mélange réactionnel est le suivant :

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale
Amorce F	10µM	1µM
Amorce R	10µM	1µM
T4GP32	5µg	250ng
SYBR Green	2X	1X
ADN	5ng/µL	10ng

Tableau 3 : Mélange réactionnel d'extraction d'ADN

La PCR quantitative est réalisée sur une plaque 96 puits. Sur chaque plaque est déposée une gamme étalon. Les échantillons et les points de gamme sont déposés en triplicats.

## 2.7) Dosage d'activités enzymatiques potentielles en lien avec les cycles biogéochimiques C, P et S

- **Principe**

Les micro-organismes tels que les bactéries et les champignons sont capables d'obtenir du carbone et des nutriments à partir de composés organiques complexes, grâce à la production d'enzymes extracellulaires. Le type d'enzymes et la nature des enzymes (en terme de spécificité de substrats) synthétisées dépendent de l'activité des communautés microbiennes des sols (Gianfreda et Ruggiero, 2006 ; Sinsabaugh *et al.*, 2008). La mesure de l'activité de ces enzymes extracellulaires en lien avec les cycles biogéochimiques peut constituer un indicateur des processus de décomposition de la MO et de minéralisation de l'azote, du phosphore et du soufre dans les écosystèmes. Les dosages de l'activité enzymatique potentielle sur des échantillons de sol impliquent l'utilisation de substrats colorimétriques artificiels et expriment l'activité selon le taux d'hydrolyse du substrat à une température optimale proche de 37°C.

Des mesures d'activités enzymatiques ont été réalisées en lien avec les cycles biogéochimiques du carbone, du phosphate et du soufre, respectivement la bêta-glucosidase, la phosphatase acide et l'arylsulfatase.

- **Protocole**

Pour les enzymes en lien avec les cycles du carbone ( $\beta$ glucosidase) du phosphore (phosphatase acide) et du soufre (arylsulfatase), le substrat utilisé est un substrat colorimétrique de type p-nitrophényl spécifique de chaque enzyme mis en présence d'un tampon différent selon l'enzyme mesuré (tableau 4).

Cycle biogéochimique	Enzyme	Tampon d'incubation	Substrat (25 mM)	Référence bibliographique
<b>Carbone</b>	betaglucoisidase	MUB pH 6	PNG	Eivazi et Tabatabai (1988)
<b>Soufre</b>	arylsulfatase	Acétate pH 5,8	PNS	Tabatabai et Bremner (1970)
<b>Phosphore</b>	Phosphatase acide	MUB pH 6,5	PNP	Eivazi et Tabatabai (1977)

Tableau 4 : Les tampons d'incubation et de substrats pour chaque activité enzymatique

Les dosages sont effectués sur 1 g de sol sur lequel pour chaque enzyme du toluène est ajouté (0,25 ml). Le toluène est un solvant qui inhibe la croissance et le métabolisme microbiens lors de l'incubation (Dick et Kandeler, 2005). Il dissout également les composants lipidiques des membranes des cellules microbiennes, ce qui permet la libération d'enzymes intracellulaires (Klose et Tabatabai, 1999). Le sol est ensuite incubé en présence de 4mL de tampon et 25 mM de substrat spécifiques à 37°C. Au bout d'une heure, la réaction est stoppée par ajout d'1mL de CaCl<sub>2</sub> (0,5M), 4mL de NaOH (0,5M) pour l'arylsulfatase et les phosphatases et 4mL de tampon Tris à 0,1M pH 12 pour la betaglucoisidase.

Les tubes sont ensuite agités et passés sur filtre Whatman 2V avant lecture de la DO à 400nm. La méthode utilisée repose sur la mesure de l'activité au moyen d'une extrapolation entre la mesure de l'absorbance à 400 nm et la concentration en p-nitrophénol, produit formé à partir de l'hydrolyse des différents substrats. Pour chacun des échantillons, des échantillons « blancs » sont réalisés afin de permettre de soustraire l'absorbance parasite qui serait générée notamment par les phénols susceptibles d'être contenus dans la MO des sols. Les activités sont exprimées en  $\mu\text{g}$  de p-nitrophénol libéré  $\text{h}^{-1}$  g sol  $\text{sec}^{-1}$ .

### III) Résultats et discussions

#### Caractérisation du digestat

Les caractéristiques du digestat (exprimées selon la matière brute MB) utilisé lors de cette étude sont présentées dans le tableau 5.

	ration	digestat	Référence
cellulose (%/MB)	4,3	3	
lignine-cutine (%/MB)	2	2,6	
total MO (%/MB)	13,2	10,1	
Teneur en N total (g N/kg MB)		5,99	16
Teneur en C organique (g/kg MB)		64	36-620
Teneur en N-NH4 (mg/kg MB)		1949	34
C/N		10,7	16,4
ISB	0,23	0,26	0,2-0,8

Tableau 5 : Caractéristiques du digestat

#### 3.1) Mesure du potentiel méthanogène :

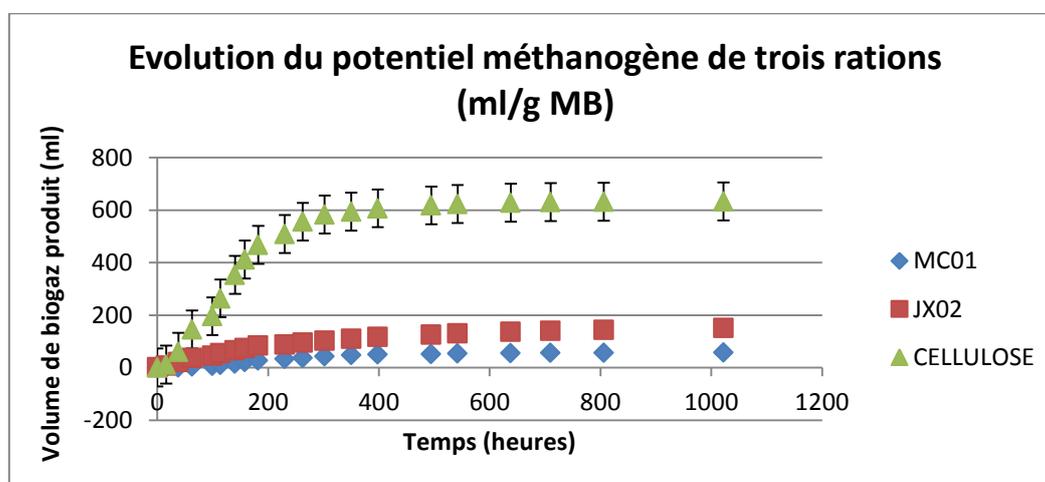


Figure 3 : Potentiel méthanogène d'une ration idéale (cellulose) et de deux rations de types lisier/fumier

Le potentiel méthanogène de 16 rations a été évalué suite à une demande de la chambre régionale d'agriculture de Lorraine. L'objectif est de renseigner les agriculteurs sur le potentiel de production de biogaz d'effluents d'élevage de type fumier/ lisier provenant de leurs structures. La figure 3 montre l'évolution au cours du temps du potentiel pour deux rations provenant de deux exploitations agricoles et une ration dite « idéale » constituée de 5 g de cellulose. Cette ration, constituée du substrat préférentiellement utilisé par les bactéries impliquées dans le processus de digestion anaérobie, permet d'accéder au potentiel méthanogène maximal (633 ml de biogaz après 1022 heures) et de servir de référence pour l'évaluation du potentiel méthanogène des rations à tester. Les deux rations agricoles présentées sur la figure 1 présentent un potentiel méthanogène (exprimé en ml de biogaz produit par g de matière brute) significativement plus faible que le témoin cellulose. Les deux rations testées correspondant à des rations fumier/lisier atteignent après 1022 heures 57 ml de biogaz et 151 ml

respectivement pour MC01 et JX02. La ration MC01 qui atteint une valeur de production de biogaz 11 fois plus faible que le témoin cellulose correspond au potentiel méthanogène minimal des rations testées. JX02 qui a un potentiel méthanogène 4 fois inférieur au témoin cellulose correspond à la valeur maximale des rations testées. Les 14 autres rations testées lors de cette étude (tableau 6) ont des potentiels méthanogènes compris entre ces deux valeurs.

Ration	Potentiel méthanogène final (ml/g de MB)	Ecart- type	Ration	Potentiel méthanogène final (ml/g de MB)	Ecart type
cellulose	572	84,85	VA01	115,92	5,89
	692			124,27	
DB01	54,26	3,55E-14	JMV01	92,07	27,86
	54,26			131,47	
JX01	46,81	16,4	GR02	126,92	19,11
	70,01			99,88	
MC01	57,8	0,89	SSP02	98,43	3,98
	56,54			104,06	
DA01	46,22	2,94	SSP01	117,61	9,82
	50,39			131,5	
GR01	49,6	21,51	JX02	147,86	4,67
	80,03			141,26	
FN01	38,51	4,28	CEYM01	109,89	4,47
	44,57			103,56	
VJCP01	54,37	35,75	CEYM03	18,98	18,08
	104,94		CP03	44,55	

Tableau 6 : Potentiel méthanogène final des 16 rations testées

### 3.2) Minéralisation du carbone :

- Cinétique de minéralisation du carbone

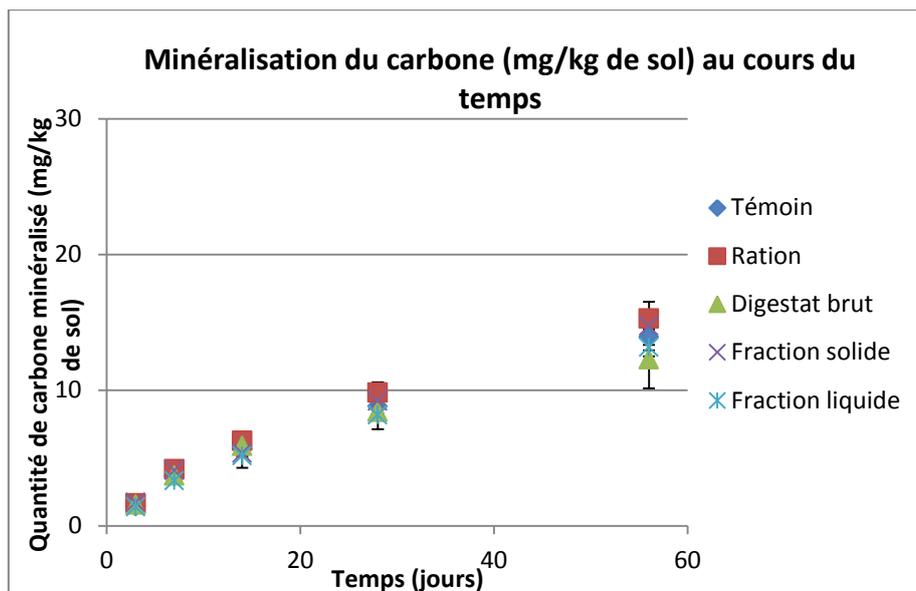


Figure 4 Cumul de minéralisation du carbone au cours du temps

La quantité de carbone minéralisé croît tout au long de la cinétique. Au bout de 56 jours la quantité de carbone moyenne est de 13,9 mg/kg de sol sec. La figure 4 ne permet pas de mettre en évidence de différences entre les traitements testés. En effet le traitement sans amendement organique (Témoin) qui correspond à la minéralisation de la MO initialement présente une évolution identique aux autres traitements.

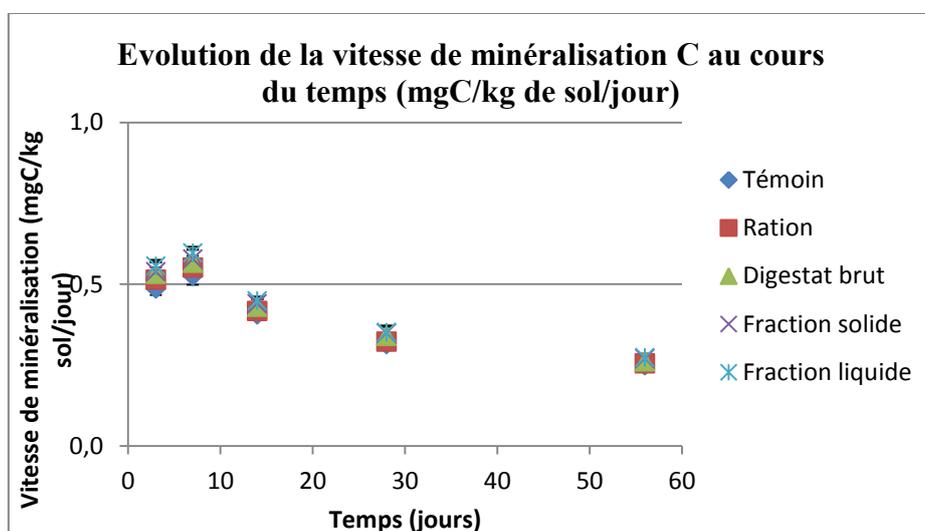


Figure 5 : Vitesse de minéralisation du carbone au cours de la cinétique

La vitesse de minéralisation du carbone décroît au cours du temps puisqu'elle passe de 0,53 mg C/ kg de sol/ jour à 0,26 mg C/ kg de sol/ jour entre 3 et 56 jours. Le pic de minéralisation est atteint à 7 jours pour l'ensemble des traitements avec des valeurs extrêmes comprises entre 0,53 pour le témoin et 0,60 pour la fraction liquide.

- Effets des différents amendements sur la vitesse de minéralisation

	Vitesse moyenne de minéralisation du C (mg/kg de sol/ jour)	Ecart-type	Test t
Témoin	0,40	0,01	NS
Ration	0,41	0,02	NS
Digestat Brut	0,43	0,03	NS
Fraction Solide	0,43	0,03	NS
Fraction Liquide	0,44	0,01	NS

Tableau 7: Vitesses moyennes de minéralisation du carbone pour chaque traitement (NS : test ANOVA à un facteur non significatif)

L'ANOVA à un facteur ne montre pas de différences significatives entre les traitements (tableau 7).

### 3.3) Effet des amendements sur les biomasses microbiennes carbonée (BMC) et azotée (BMN)

- Evolution au cours du temps de la BMC dans les différents sols amendés

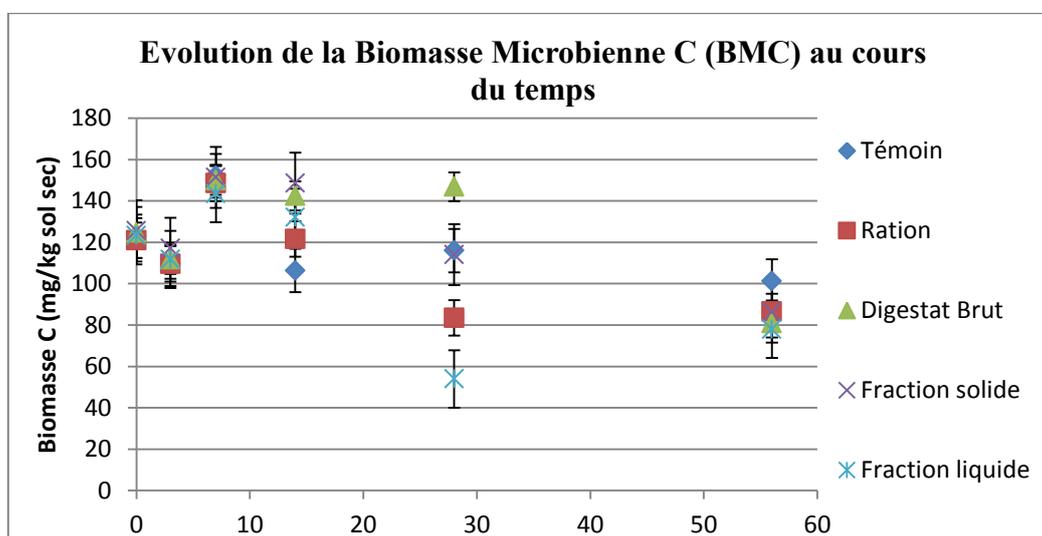


Figure 6 : Evolution au cours du temps de la BMC dans les différents sols

La figure 6 met en évidence des valeurs de BMC initiale (Temps 0) dans les différents sols, témoin et amendés, suggérant que les apports de produits organiques n'influencent pas significativement la quantité de C microbien initialement présent. Le C microbien évolue au cours du temps pour atteindre une valeur moyenne maximale de 150 mg/kg sol sec au 7<sup>ème</sup> jour dans les différents sols amendés et dans le témoin. Après 14 jours d'incubation, les biomasses C tendent à diminuer avec les diminutions les plus importantes chez le témoin et la ration qui atteignent des valeurs proches de celle de T0 (entre 110 et 120 mg/g sol sec). Le digestat brut semble permettre jusqu'à 28 jours de subvenir aux besoins de la biomasse microbienne formée d'où un maintien de cette dernière à des valeurs proches de celles du pic du temps 7. Après 56 jours d'incubation, les différences entre les différents sols amendés et témoin s'estompent et les valeurs finales de BMC se stabilisent en moyenne à 86,6 mg de C/kg de sol sec contre 150 mg C/kg de sol sec à 7 jours. L'ANOVA a deux facteurs met en évidence un effet significatif du temps sur la BMC ( $p < 0,05$ ).

- Evolution au cours du temps de la BMN dans les différents sols amendés

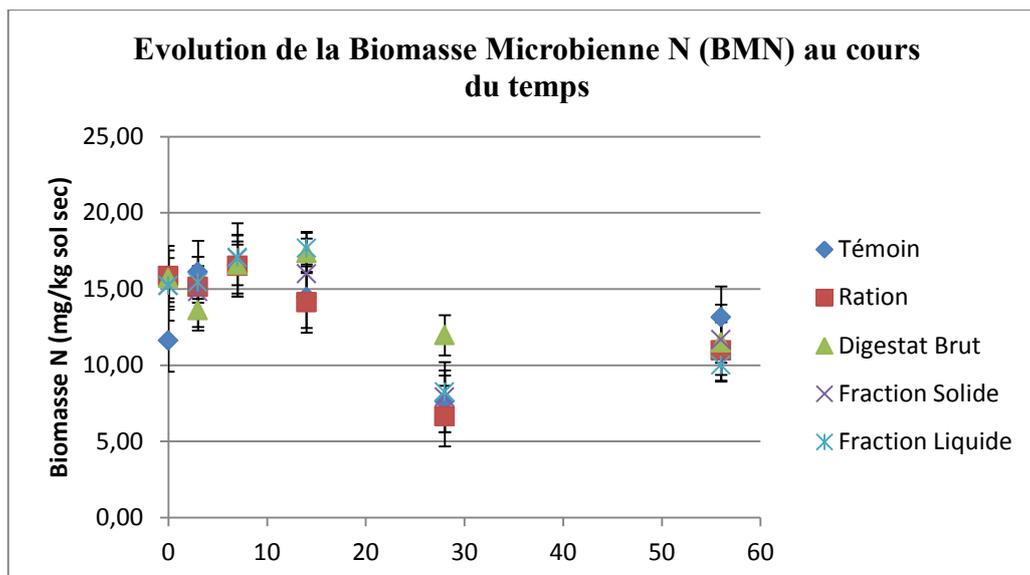


Figure 7: Evolution au cours du temps de la BMN dans les différents sols

La BMN évolue peu pour la plupart des traitements au cours des 7 premiers jours en restant autour 8 mg N/kg de sol sec (figure 7). La BMN diminue dans tous les traitements au 28<sup>ème</sup> jour avec des valeurs inférieures à 10 mg N/kg de sol sec sauf pour le digestat brut pour lequel la diminution de biomasse est moins importante. Entre 28 et 56 jours, la BMN se stabilise (moyenne de 11 mg N/kg de sol sec) comme pour la BMC. L'ANOVA à deux facteurs ne met pas en évidence d'effet significatif du temps sur la BMN.

- Effet des différents amendements sur la BMC, BMN et le rapport BMC/BMN

	BMC	Ecart-type	Test t	BMN	Ecart-type	Test t	BMC/BMN	Ecart-type	Test t
Témoïn	118,01	10,51	NS	14,12	2,02	NS	8,82	1,71	NS
Ration	111,81	8,58	NS	13,53	1,99	NS	8,57	2,28	NS
Digestat Brut	126,10	6,98	NS	15,13	1,32	NS	8,43	1,16	NS
Fraction Solide	123,83	14,78	NS	14,20	2,30	NS	8,85	1,37	NS
Fraction Liquide	111,63	13,83	NS	14,98	1,07	NS	7,52	1,43	NS

Tableau 8 : Valeurs moyennes BMC, BMN et BMC/BMN pour les différents amendements testés (NS : test ANOVA à un facteur non significatif)

L'ANOVA à un facteur ne montre aucune différence significative (à 5%) entre les traitements indiquant que les valeurs moyennes de BMC ne sont pas significativement différentes entre les traitements testés. Comme pour la BMC il existe de faibles différences entre les traitements. L'ANOVA à un facteur n'a décelé aucune différence significative (à 5%) entre les différents traitements pour la BMN. Le rapport BMC/BMN, qui donne une indication du ratio bactéries/champignons du sol, a des valeurs moyennes comprises entre 7,5 et 8,8 (tableau 8). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les traitements (test ANOVA au seuil de 5%).

### 3.4) Quantification de la taille de la communauté bactérienne et fongique par approche moléculaire

- Evolution des nombre de copies d'ADN bactérien (biomasse moléculaire bactérienne) et fongique (biomasse moléculaire fongique)

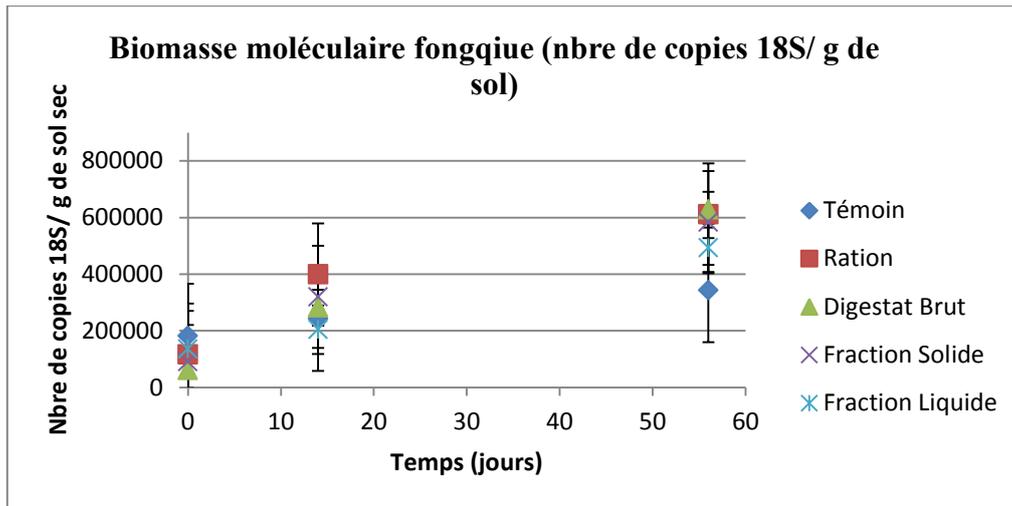


Figure 8: Evolution de la biomasse moléculaire fongique au cours du temps

La figure 8 met en évidence des valeurs initiales (temps 0) identiques (entre 90 000 et 130 000 copies/g sol sec) entre les différents traitements. Après 14 jours le nombre de copies a augmenté puisque le nombre moyen de copies est de 290 000 avec une valeur maximale pour la ration qui présente un nombre de copies de 400 000. Sur les 56 jours d'incubation, la figure montre une augmentation de la biomasse moléculaire fongique. Cette augmentation est de l'ordre d'un facteur 1,8 pour le sol témoin non amendé et de 10 pour le traitement sol amendé avec du digestat brut. Cependant aucune différence significative entre les traitements n'est montrée avec l'ANOVA au bout de 56 jours.

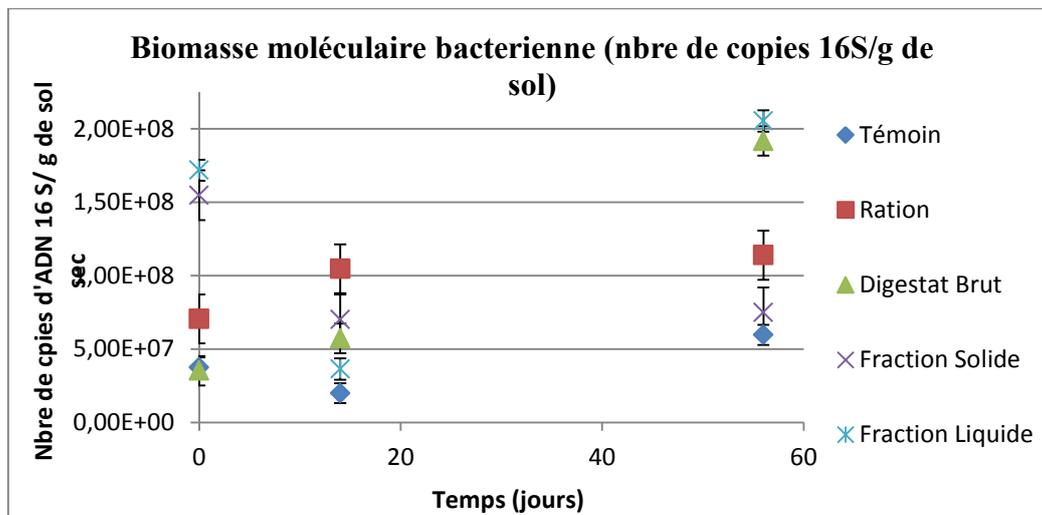


Figure 9: Evolution de la biomasse moléculaire bactérienne au cours du temps

La figure 9 met en évidence que les fractions solide et liquide présentent des valeurs de biomasse moléculaire bactérienne au temps 0 significativement plus élevées (respectivement  $1,54 \cdot 10^8$  et  $1,71 \cdot 10^8$ ) que dans le sol témoin non amendé ( $3,34 \cdot 10^7$ ). Pour le témoin la biomasse moléculaire bactérienne diminue lors des 14 premiers jours puis s'accroît jusqu'au 56<sup>ème</sup> jour pour dépasser  $5 \cdot 10^7$  copies/g de sol sec. La fraction liquide présente les mêmes tendances que le témoin à savoir une diminution les 14 premiers jours puis un accroissement entre le 14 et le 56<sup>ème</sup> jour. Cependant les fluctuations sont beaucoup plus importantes puisque le nombre de copies au départ est supérieur à  $1,7 \cdot 10^8$  copies/g de sol sec à T0 pour décroître à  $3,6 \cdot 10^7$  au jour 14 et augmenter pour atteindre une valeur de  $2 \cdot 10^8$  à 56 jours. Comme la fraction liquide, la fraction solide présente un nombre de copies élevé au départ mais une diminution marquée au 14<sup>ème</sup> jour et une augmentation plus faible (valeur à 56 jours  $7 \cdot 10^7$  copies/g de sol sec). Des traitements testés seuls la ration et le digestat brut ont un nombre de copies qui ne diminue pas

dans le temps. Le digestat brut présente une croissance tout au long de la cinétique alors que la ration à un nombre de copies d'ADN qui plafonne mais ne diminue pas entre le 14<sup>ème</sup> et le 56<sup>ème</sup> jour.

- Effet des différents amendements sur les biomasses moléculaire fongique, bactérienne et le rapport bactéries/champignons

	Biomasse moléculaire fongique	Ecart-type	Test t	Biomasse moléculaire bactérienne	Ecart-type	Test t	Ratio 16S/18S	Ecart-type	Test t
<b>Témoin</b>	2,56E+05	1,84E+05	NS	3,90E+07	2,78E+07	NS	152,48	64,15	NS
<b>Ration</b>	3,76E+05	1,80E+05	NS	9,64E+07	5,53E+07	*	256,49	224,10	NS
<b>Digestat Brut</b>	3,24E+05	6,30E+04	NS	9,47E+07	3,10E+07	NS	292,79	194,09	NS
<b>Fraction Solide</b>	3,31E+05	1,81E+05	NS	9,99E+07	5,47E+07	NS	301,67	890,69	NS
<b>Fraction Liquide</b>	2,77E+05	8,56E+04	NS	1,38E+08	5,01E+07	NS	496,66	573,40	NS

Tableau 9: Nombre moyen de copies d'ADN 18S (biomasse moléculaire fongique) et 16S (biomasse moléculaire bactérienne) par gramme de sol sec et ratio 16S/18S pour les différents traitements testés (NS : test ANOVA à un facteur non significatif, \* significatif au seuil de 5%)

Concernant la biomasse moléculaire fongique, l'ANOVA à un facteur ne révèle aucune différence significative entre le sol témoin et les sols amendés quel que soit le type d'amendement.

Les valeurs moyennes de biomasse moléculaire bactérienne sont présentées dans le tableau 9. L'ANOVA à un facteur met en évidence des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre le sol témoin et la ration. Les autres traitements même avec des valeurs éloignées de celle du témoin ne présentent pas de différences significatives à cause de grosses variations autour de la moyenne. Par exemple la fraction liquide, qui pourtant présente la valeur moyenne la plus élevée ( $1,4 \cdot 10^8$ ), ne présente pas de différence significative avec le témoin. Cette valeur moyenne importante pour la FL est liée à un nombre important de copies au temps 0.

L'ANOVA réalisé sur les biomasses moléculaires bactérienne et fongique moyennes ne montre aucune différence significative entre les traitements malgré la valeur moyenne de la fraction liquide plus élevée que celle des autres traitements. On peut remarquer des écarts types très grands pour toutes les variables du traitement. Ces fortes valeurs sont liées aux grandes différences de ratio qui existe entre le jour 0 et 56 avec une diminution du ratio.

### [3.5\) Evolution au cours du temps d'activités enzymatiques potentielles en lien avec les cycles biogéochimiques C, P et S et effets des différents amendements :](#)

#### [3.5.1\) Activité arylsulfatase](#)

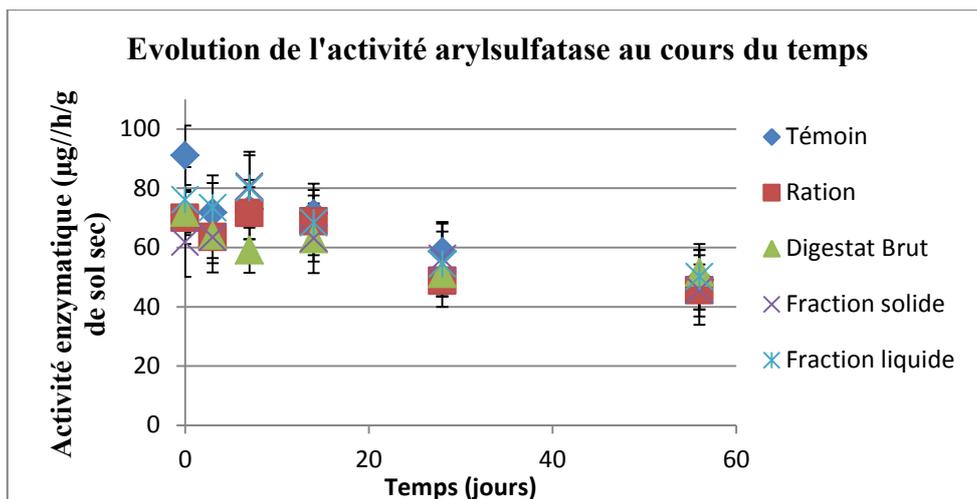


Figure 10: Evolution de l'activité enzymatique arylsulfatase au cours du temps

L'arylsulfatase permet l'hydrolyse des esters de sulfates, principale forme de soufre organique des sols. La figure 10 met en évidence une diminution de l'activité arylsulfatase au cours de l'incubation puisqu'elle est en moyenne de 70 µg/h/g sol sec au début de l'incubation et en moyenne à 45 µg/h/g sol sec après 56 jours.

	ARS (µg/h/g de sol sec)	Ecart-type	Test t
Témoïn	69,04	10,03	NS
Ration	61,326	8,79	NS
Digestat Brut	60,09	7,59	NS
Fraction Solide	60,76	11,75	NS
Fraction Liquide	67,09	11,02	NS

Tableau 10 : Valeurs moyennes d'activité arylsulfatase pour les différents amendements testés (NS : test ANOVA à un facteur non significatif)

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différents amendements (tableau 10).

### 3.5.2) Activité phosphatase

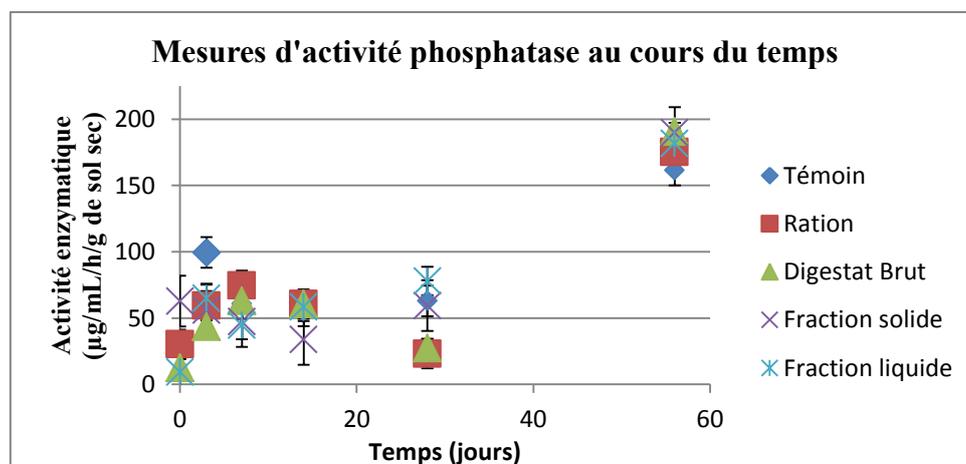


Figure 11: Evolution de l'activité phosphatase au cours du temps

Cette enzyme est impliquée le cycle du phosphore dans le sol. Comme le montre la figure 11, l'activité de cette enzyme les 7 premiers jours augmente puis a tendance à décroître pour les 2 autres points de

cinétiques puisque l'activité passe de 60  $\mu\text{g/h/g}$  de sol sec en moyenne à 48  $\mu\text{g/h/g}$  de sol sec en moyenne au 28<sup>ème</sup> jour. En revanche l'activité décroît plus fortement pour les traitements ration et digestat brut au 28<sup>ème</sup> jour alors que les autres restent à des valeurs proches de celles du point précédent. Mais le changement le plus important intervient au 56<sup>ème</sup> jour avec une activité significativement plus importante (x3) pour l'ensemble des traitements (même pour la ration et le digestat brut qui ont des valeurs à nouveau similaires à celles des autres traitements).

	Phosphatase ( $\mu\text{g/h/g}$ de sol sec)	Ecart-type	Test t
Témoin	77,80	11,55	NS
Ration	69,54	11,11	NS
Digestat Brut	61,70	6,75	NS
Fraction Solide	75,94	19,14	NS
Fraction Liquide	77,48	10,77	NS

Tableau 11: Valeurs moyennes de l'activité phosphatase pour les différents traitements testés (NS : test ANOVA à un facteur non significatif)

L'ANOVA à un facteur réalisée sur les activités enzymatiques ne montre pas de différences significatives entre les différents traitements (tableau 11).

### 3.5.3) Activité bêta-glucosidase

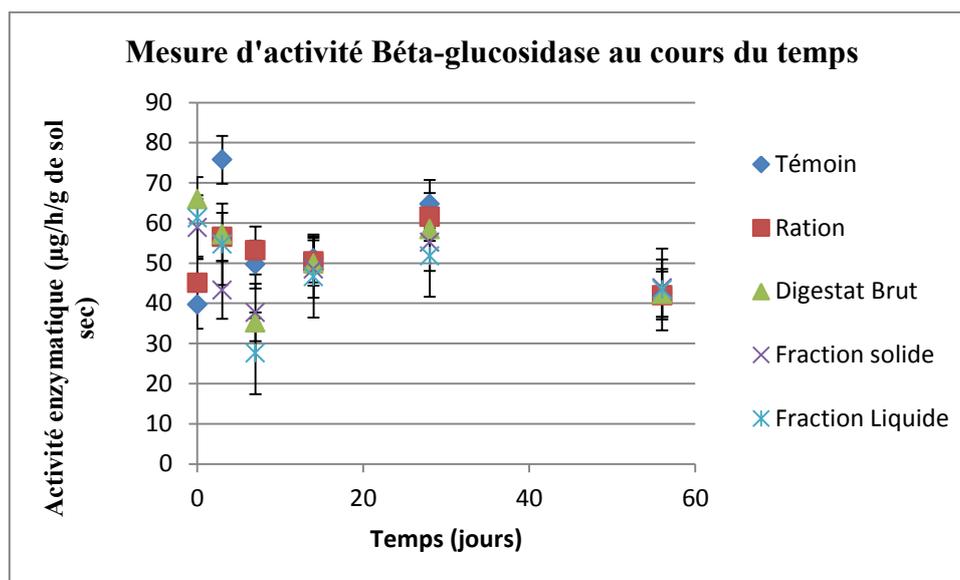


Figure 12: Evolution de l'activité bêta-glucosidase au cours du temps

La Bêta-glucosidase est l'enzyme responsable de la dégradation de la cellulose en glucose. La cinétique sur 56 jours (figure 12) montre que l'activité de cette enzyme à peu évolué au cours du temps et en fonction des traitements. Les valeurs initiales d'activité (temps 0) sont comprises entre 39 et 64  $\mu\text{g/h/g}$  sol sec pour les différents traitements avec les valeurs les plus faibles pour le témoin et la ration. Au bout de 3 jours, l'activité augmente pour la ration et le témoin (respectivement l'activité passe à 69  $\mu\text{g/h/g}$  de sol sec pour le témoin et 56  $\mu\text{g/h/g}$  de sol sec) mais semble décroître pour les trois autres traitements. A l'issue de la première semaine de cinétique, le témoin et R présentent des valeurs d'activité respectivement de 49 et 53  $\mu\text{g/h/g}$  sol sec alors que les valeurs d'activité du digestat brut, et des fractions liquide et solide sont comprises entre 27 et 37  $\mu\text{g/h/g}$  sol sec. La deuxième semaine de cinétique montre un changement de tendance avec des activités équivalentes pour l'ensemble des traitements (50  $\mu\text{g/h/g}$  de sol sec) et une stabilisation de l'évolution pour arriver à des valeurs équivalentes pour les différents traitements après 56 jours (40  $\mu\text{g/h/g}$  de sol sec).

	Béta-glucosidase ( $\mu\text{g/h/g}$ de sol sec)	Ecart-type	Test t
Témoin	52,97	5,97	NS
Ration	50,21	6,49	NS
Digestat Brut	49,56	6,80	NS
Fraction Solide	47,77	7,14	NS
Fraction Liquide	46,22	10,16	NS

Tableau 12 : Valeurs moyennes d'activité béta-glucosidase des traitements testés (NS : test ANOVA à un facteur non significatif)

Le calcul de la moyenne des valeurs pour chaque traitement illustré ci-dessus, présente la particularité d'avoir une activité enzymatique moyenne sur l'ensemble des 56 jours plus importantes chez le témoin que chez les sols traités. L'activité moyenne est en effet de  $53 \mu\text{g/h/g}$  de sol sec. Seule la ration présente une activité moyenne supérieure à  $50 \mu\text{g/h/g}$  de sol sec même si l'activité du digestat brut est proche de ce dernier ( $49,6 \mu\text{g/h/g}$  de sol sec). Les deux fractions issues du digestat ont des activités plus faibles que le digestat brut avec la valeur la plus faible obtenue par la fraction liquide. Du fait de la variabilité importante entre les répétitions, le test ANOVA à un facteur sur les valeurs moyennes ne met pas en évidence de différence significative entre les traitements.

### 3.6) Synthèse des résultats et corrélation entre les variables mesurées

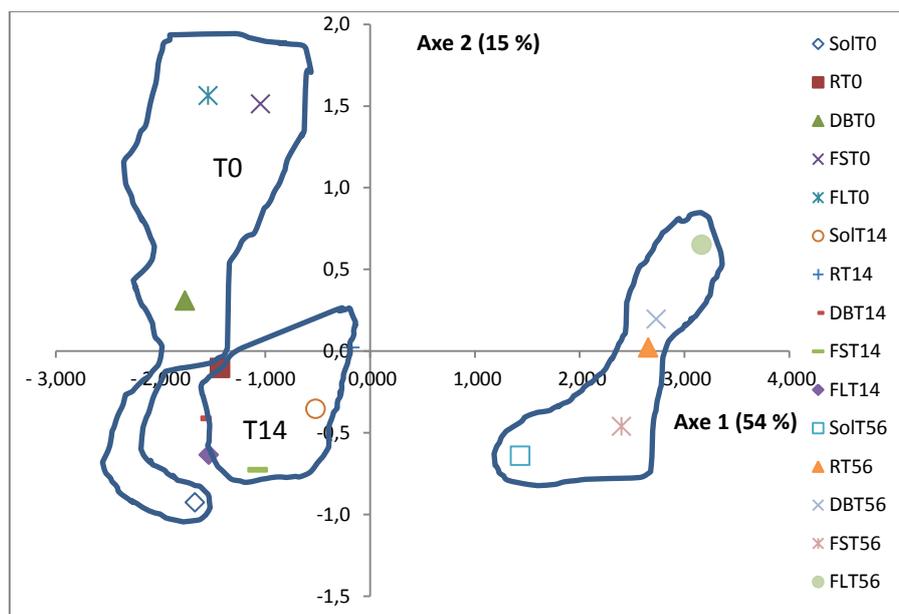


Figure 13 : Analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les différentes variables microbiennes mesurées à 0, 14 et 56 jours pour les 5 modalités d'amendements (témoin, ration, digestat brut, fraction solide, fraction liquide)

Le plan factoriel F1 et F2 explique 69% de la variabilité avec respectivement 54% pour l'axe 1 et 15% pour l'axe 2 (figure 13). L'axe 1 semble discriminer les individus en fonction du temps avec les 5 points correspondant aux échantillons 56 jours présentant des coordonnées positives (individus caractérisés par des fortes valeurs d'activité phosphatase d'abondances de champignons) et les échantillons 0 et 14 jours présentant des coordonnées négatives. L'analyse met ainsi en évidence une opposition nette des individus suggérant un gradient temporel.

	ARS	Phosphatase	Beta	Biomasse C	Biomasse N	ADN 18S	ADN 16 S
ARS	1,0	- 0,685	0,327	0,502	0,426	- 0,465	- 0,230
Phosphatase	<b>- 0,685</b>	1,0	- 0,423	- 0,763	- 0,711	0,679	0,255
Beta	0,327	<b>- 0,423</b>	1,0	0,316	0,287	- 0,373	0,031
Biomasse C	0,502	<b>- 0,763</b>	0,316	1,0	0,800	- 0,514	- 0,253
Biomasse N	0,426	<b>- 0,711</b>	0,287	0,800	1,0	- 0,585	- 0,267
ADN 18S	<b>- 0,465</b>	0,679	<b>- 0,373</b>	<b>- 0,514</b>	<b>- 0,585</b>	1,0	0,206
ADN 16 S	<b>- 0,230</b>	0,255	0,031	- 0,253	<b>- 0,267</b>	0,206	1,0

Tableau 13 : Coefficients de corrélation de Pearson pour les variables testées (en gras : valeurs significatives au seuil alpha= 0,05 (test bilatéral))

Les coefficients de Pearson présentés dans le tableau 13 indiquent les corrélations significatives entre les différentes variables utilisées pour l'ACP.

## IV) Discussion

### 4.1) Influence de la qualité de la ration sur le potentiel méthanogène

Le potentiel méthanogène mesuré représente la quantité maximale de biogaz pouvant être produite par un substrat organique donné. Seize rations ont été testées lors de ce travail. Le témoin utilisé pour la mesure du potentiel méthanogène est une ration à base de cellulose qui permet de vérifier que les conditions de mesure sont optimales. En effet la cellulose, dont le potentiel méthanogène est de 633 ml de biogaz/g MB, est rapidement dégradée par les micro-organismes lors de la première étape de la digestion anaérobie. Le potentiel méthanogène moyen des rations testées est de 87,68 ml de biogaz/g MB ce qui est supérieur à la production moyenne des rations fumier/lisier qui est de 40 ml/g MB (GAC *et al*, 2007). Ce résultat indique que le potentiel de production des effluents des exploitations agricoles étudiées peut permettre la production de biogaz en quantité suffisante pour une possible implantation d'unité de méthanisation (en ne prenant en compte que la ration). Parmi les rations testées, seule CEYM 03 présente un potentiel méthanogène inférieur à la moyenne de référence de 40 ml/g MB (GAC *et al*, 2007). La faible production de cette ration semble liée à une qualité de matière organique inférieure aux autres rations notamment parce que le mélange qui constituait cette ration était particulièrement pailleux et pauvre en déjections animales. La paille est en effet constituée en moyenne de 44% de cellulose et de 8,5% de lignine (Chaudhry et Miller, 1996) alors que les teneurs sont respectivement de 14% et 1,3% dans du lisier (Castaing *et al*, 2002). Il est intéressant aussi de voir que malgré l'utilisation en proportions équivalentes de fumier et lisier ainsi qu'un apport de matière organique équivalent des écarts important subsiste entre les rations. Cela illustre bien que la qualité des substrats employés (notamment de la MO) joue un rôle essentiel dans la production de biogaz (rapport ADEME, 2011). Actuellement la spectrométrie proche infrarouge (NIRS) permet de caractériser très rapidement les déchets organiques et devrait dans les années à venir permettre de calculer le potentiel méthanogène sans avoir à passer par des méthodes d'incubation sur un mois des rations en conditions contrôlées (Triolo *et al*, 2014).

### 4.2) Influence de l'incorporation des digestats sur le fonctionnement biologique du sol

#### 4.2.1) Minéralisation du carbone et biomasse microbienne carbonée et azotée

La minéralisation cumulée du carbone au cours du temps permet de mettre en évidence que le sol non amendé qui sert de témoin présente une cinétique de minéralisation identique aux différents sols amendés et ce quel que soit le type de composés organiques apportés (ration, digestat brut, fractions solide ou liquide du digestat). De plus les différents composés organiques n'influencent pas significativement la

minéralisation du C du sol suggérant que les quantités et ou la qualité de la MO présente dans ces composés ne stimule pas l'activité microbienne des sols et donc la respiration. Les teneurs en MO obtenues sur la ration et le digestat brut sont faibles et respectivement de 13,2 et 9,5% MB. Cette faible proportion de MO de la ration est liée à une proportion trop importante dans le mélange de lisier (60%) qui entraîne une forte dilution de la MO du fumier (40%). Par rapport au carbone du sol, la ration et le digestat ont été analysés de façon à apprécier l'indice de stabilité biochimique ou ISB (Linères et Djakovitch, 1993) des MO. L'ISB reflète la proportion de MO la plus résistante à la dégradation microbienne et donc la plus susceptible de se stabiliser dans le sol. Les valeurs d'ISB sont de 0,23 pour la ration et 0,26 pour le digestat (Annexe 1). Dans la littérature les valeurs d'ISB sont comprises entre 0,2 et 0,8 pour les fumiers bovins (Linères et Djakovitch, 1993). Pour les digestats peu de références sont actuellement disponibles mais les digestats obtenus sur l'unité de méthanisation du Bois Joly en Vendée présentent un ISB de l'ordre de 60% (rapport ADEME 2010). Il apparaît donc que la ration et le digestat utilisés dans cette étude contiennent trop peu de MO pour engendrer des différences de minéralisation du carbone du sol. Concernant le comportement du témoin sol, la mise en évidence d'une vitesse de minéralisation plus élevée dans les 7 premiers jours de l'incubation, peut être expliquée par le fait que ce sol a été incubé à 20°C dans des conditions d'humidité constante après avoir été stocké au préalable à 4°C. Ces conditions ont ainsi favorisé une reprise d'activité des micro-organismes et de ce fait une respiration accrue. La vitesse de minéralisation du sol est faible en comparaison à d'autres sols (Niknahad-Gharmakher *et al.*, 2012). Ceci est certainement lié aux caractéristiques du sol et notamment à un pH élevé (8,2) et une teneur en calcaire actif conséquente pouvant bloquer l'activité des micro-organismes et de ce fait limiter la minéralisation de la MO.

La cinétique de minéralisation des différents sols amendés avec des composés organiques est caractérisée par une première étape (lors des 7 premiers jours) présentant une vitesse de minéralisation deux fois plus élevée que lors de la seconde étape (entre 7 et 56 jours). Cette dynamique de minéralisation du carbone pour les digestats suggère la présence de 2 sources différentes de MO présentant différentes dégradabilités. Une source labile qui se décompose rapidement pendant la phase initiale et intense de respiration microbienne après application des digestats, et une autre plus résistante à la dégradation avec une minéralisation plus lente et constante dans le temps (Albuquerque *et al.*, 2012). La caractérisation chimique réalisée sur les produits organiques ayant servi d'amendement va dans ce sens (Annexe 1). En effet la ration a une composition de la matière organique semblable à celle d'un fumier frais rendant donc cette matrice organique plus difficilement attaquable par les micro-organismes. En ce qui concerne le digestat (Annexe 1), le fractionnement de la matière organique met en évidence une proportion de la fraction soluble et de la cellulose plus faible que la ration et des teneurs en hémicellulose et en lignines/cutines plus importantes (respectivement 16,2% et 26,6%). Tout cela le rend aussi stable que la ration expliquant le comportement similaire observé entre le traitement ration, digestat brut et la fraction solide. La fraction liquide présente une valeur faible à cause de sa faible composition en carbone qui est essentiellement présent dans la fraction solide.

L'apport de produits organiques digérés ou non n'a pas eu d'influence sur la minéralisation du C du sol ce qui laisse présager d'un impact mineur de ces composés sur la taille du compartiment microbien susceptible de dégrader le C du sol. Les biomasses microbiennes C et N n'ont pas été significativement stimulées par l'apport de composés organiques. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Rochette et Gregorich (1998) qui montrent un effet de l'application de fumier sur la respiration du sol avec une augmentation d'un facteur 2 à 3 de la biomasse microbienne C. La forte disponibilité en C dissous notamment de la fraction liquide aurait dû soutenir la croissance et l'activité des micro-organismes du sol, notamment les bactéries (Walsh *et al.*, 2012). L'analyse conduite sur le digestat (tableau 5) montre que (i) le rapport C/N est de 10,7 c'est-à-dire 2 fois plus faible que les valeurs de référence (rapport ADEME 2011) (ii) et de faibles teneurs en azote  $\text{NH}_4^+$  de l'ordre de 8 g N/Kg MS c'est-à-dire deux fois moins que les teneurs moyennes de la plupart des digestats (16 g N/Kg MS) (Rapport ADEME 2011). Ces faibles teneurs en azote minéral semblent être à l'origine du faible développement des biomasses C et N. De façon générale, l'apport de composés organiques à forte teneur en azote minéral stimule la

croissance microbienne et favorise l'immobilisation de N dans la biomasse microbienne (Thomsen *et al*, 2003).

#### 4.2.2) Abondance des communautés bactériennes et fongiques

La comparaison aux nombres de copies fongiques moyennes présentes dans la littérature d'un sol agricole montre que le nombre de copies dans notre étude est plus faible (Chemidlin *et al*, 2011). La biomasse microbienne C du sol utilisé dans cette étude est faible en comparaison à d'autres sols prélevés sur le domaine de la Bouzule (Marchand *et al*, 2002). De plus, les conditions sèches du sol lors de son prélèvement puis son stockage quelques semaines à 4°C auront peut-être fait décroître les populations microbiennes présentes dans ce sol. L'incubation à 20°C du sol a permis une augmentation du nombre de copies d'ADN fongique au cours du temps notamment pour les sols amendés. Le nombre de copies d'ADN bactérien est plus faible ( $10^8$  dans notre étude) que celui qui est en général obtenu pour les sols prélevés sur le domaine de La Bouzule (de l'ordre de  $10^{11}$ ) (Lopez-Gutierrez *et al*, 2004)

L'apport de matières organiques ne permet pas le maintien des populations bactériennes et fongiques dans le temps comme en témoigne les écarts non significatifs au seuil de 5% entre les traitements et le témoin. Seul l'amendement ration permet un développement des populations bactériennes. Les fortes valeurs observées au jour 0 pour la fraction liquide et solide pourraient être dû à un apport de bactéries provenant du méthaniseur lors de l'amendement. Ce phénomène semble lié à la centrifugation puisque le digestat brut ne présente pas de valeurs aussi importantes en T0.

Comme pour la biomasse microbienne C et N, les apports de digestats n'ont pas stimulé significativement les populations bactériennes et fongiques par rapport au témoin. Cela semble donc indiquer que les amendements utilisés lors de cette étude ont une richesse en ressources insuffisante pour créer des conditions favorables aux populations bactériennes mais trop importante pour favoriser les populations fongiques. En effet Rousk et Baath (2001) ont montré que lorsque les conditions sont défavorables (c'est-à-dire une richesse en ressources faibles) la croissance des populations fongiques est supérieure à celle des populations bactériennes.

Concernant les activités enzymatiques, ces dernières évoluent au cours de l'incubation mais aucun effet significatif des amendements testés n'a pu être mis en évidence. Cela suggère néanmoins que ces enzymes sont sensibles aux évolutions de modifications d'abondance et d'activité microbienne qui ont lieu au cours de l'incubation et qui sont liées à la minéralisation de la MO du sol. Les enzymes peuvent être induites par la présence de leur substrat (composés organiques) ou la limitation en éléments minéraux comme le phosphate dans le cas des phosphatases (Schinner *et al*, 1996). Les trois activités enzymatiques mesurées sont corrélées aux biomasses microbiennes carbonée et azotée ce qui semble logique puisque ces activités sont d'origine microbienne (Sinsabaugh *et al*, 2008).

## Conclusion

Les mesures du potentiel méthanogène des 16 rations testés a permis de montrer le potentiel très intéressant de production énergétique de ces exploitations agricoles qui pour la plupart possèdent des effluents d'élevage permettant en conditions idéales de produire 2 fois plus de biogaz que la moyenne pour un même type de ration. Ces mesures ont aussi mis en lumière l'importance de la qualité des substrats en méthanisation puisque pour un même apport de matière organique et des proportions en fumier/ lisier équivalentes, de gros écarts de production apparaissent.

Le second volet de cette étude portant sur les effets des digestats sur la fertilité des sols a donné des résultats surprenants. L'apport de ration ou de digestat (sous sa forme brut, solide ou liquide) n'a eu que

peu d'effet sur les micro-organismes (biomasses C, N et biomasses moléculaires bactérienne et fongique) et le fonctionnement du sol, en lien avec les cycles bio-géochimiques et le service de fertilité des sols (minéralisation du carbone et activité enzymatiques). Les caractéristiques de la ration et du digestat employés semblent en partie expliquer cette tendance. Les faibles teneurs en matières organiques, en azote et en carbone de la ration et du digestat ont limité la croissance des micro-organismes et leur activité. Ces résultats vont permettre de modifier notamment le temps de séjour dans le digesteur de la Bouzule de façon à améliorer la digestion du carbone. De plus, ce résultat met en évidence que la ration de part des caractéristiques faibles en termes de teneur en MO ne peut pas permettre de générer un digestat à même d'enrichir en C le pool organique du sol (effet amendement limité). Néanmoins la fraction liquide au vu de sa richesse plus importante en N minéral que la ration devrait permettre d'augmenter la biodisponibilité en azote du sol. Au cours de l'incubation, à chaque point de cinétique un échantillon de sol a été extrait afin d'analyser en chromatographie ionique les éléments minéraux (nitrates, ammonium, sulfates et phosphates). Les résultats non disponibles au moment de la rédaction de ce mémoire n'ont pas permis de tracer les cinétiques de minéralisation nette de ces éléments dans les différents traitements. Mais d'autres particularités liées au sol utilisé dans cette étude (pH élevé et forte proportion de calcaire actif), à son état lors du prélèvement et au temps de stockage de ce dernier ont certainement participé aux résultats obtenus. La réalisation d'une étude similaire avec le même sol en limitant le temps de stockage à 4°C et en réalisant une pré-incubation de façon à réactiver les micro-organismes et à limiter la disponibilité en éléments minéraux avant l'apport des amendements permettrait certainement de discriminer le témoin des sols amendés. De la même manière l'amendement de ce digestat sur un sol moins basique permettrait d'être dans des conditions de fonctionnement microbien plus intense et conduirait à une comparaison de cette matrice organique résiduelle par rapport aux valeurs que l'on retrouve dans la littérature de façon à évaluer l'impact de ce digestat sur la fertilité. Cette étude illustre la différence qui peut exister les digestats et sur l'effet qu'ils peuvent engendrer sur les sols. La multiplication des études de ce type avec des digestats d'origines différentes et sur une multitude de sol permettrait de mieux cerner les avantages et inconvénients que présentent ces amendements par rapport à des apports organiques ou minéraux plus classiques pour une utilisation optimale.

## Bibliographie:

- Albuquerque JA, de la Fuente C, Pilar Bernal M, Chemical properties of anaerobic digestates affecting C and N dynamics in amended soils, *Agriculture ecosystems and environment*, 160, 2012, 15-22
- Blair JM, Bohlen PJ, Freckman DW, Soil invertebrates as indicators of soil quality, Doran JW and Jones AJ (eds), *Methods for assessing soil quality, special publications 49*, 1996, p191-273.
- Bosc M, Enseignements fournis par des essais de longue durée. Essais sur la fertilisation potassique, Gachon L (ed), *Phosphore et potassium dans les relations sol-plante : conséquence sur la fertilisation*, 1988, INRA Paris, 403-466
- CASTAING Julien, POUÉCH Philippe, COUDURE Régis *Digestion anaérobie de lisiers de porcs en mélange avec des déchets agro-industriels. Journées de la Recherche Porcine*, 34, 2002, 195-202
- Chaudhry, A. S., et E. L. Miller, The effect of sodium hydroxide and alkaline hydrogen peroxide on chemical composition of wheat straw and voluntary intake, growth and digestat kinetics in store lambs, *Animal Feed Science and Technology*, 60, 1996, 69-86
- Chantigny M H, Angers D A, Rochette Ph, Belanger G, Yield and nutrient export of grain corn fertilizer with raw and treated liquid swine manure, *agron J*, 100, 2008, 1303-1309
- Chaussod R, La qualité biologique des sol : évaluation et implications, *Etude et gestion des sols*, 3-4, 1996, 261-278
- Chemidlin Prévost-Bouré Nicolas, Christen Richard, Dequiedt Samuel, Mougél Christophe, Lelièvre Mélanie, Jolivet Claudy, Reza Shahbazkia Hamid, Guillou Laure, Arrouays Dominique, Ranjard Lionel, Validation and Application of a PCR Primer Set to Quantify Fungal Communities in the Soil Environment by Real-Time Quantitative PCR, *Plos one*, 6, 2011, 1-13
- Chen Ruirui, Blagodatskaya Evgenia , Senbayram Mehmet, Blagodatsky Sergey, Myachina Olga, Dittert Klaus, Kuzyakov Yakov, Decomposition of biogas residues in soil and their effects on microbial growth kinetics and enzyme activities, *biomass and bioenergy* 45, 2012, 221-229
- Chonkar, P.K, Tarafdar, J.C, Characteristics and location of phosphatases in soil plant

- System, *Journal of Indian Society of Soil Sciences*, 29, 1981, 215-219.
- Cookson WR, Ford DJ, Adams MA, Grierson PF, Role of soil drying in nitrogen mineralization and microbial community function in semi-arid grasslands of north-west Australia, *Soil biology and biochemistry*, 39, 2007, 1557-1569
  - Couturier C, Berger S, Meiffren I, La digestion anaérobie des boues urbaines, état des lieux, état de l'art, SOLAGRO, 2001
  - Dick, W. A, Tabatabai, M. A, Significance and potential uses of soil enzymes. In *Soil Microbial Ecology. Application in Agricultural and Environmental Management*, 1993, 95-127
  - Eivazi, F, Tabatabai, M.A, Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 9, 1977, 167-172
  - Eivazi, F, Tabatabai M.A, Glucosidases and agalactosidases in soils, *Soil Biol. Biochem*, 20, 1988, 601-606
  - Fardeau JC, Morel C, Boniface R, Pourquoi choisir la méthode Olsen pour estimer le phosphore assimilable des sols, *Agronomie*, 8, 1988, 577-584
  - Fontaine S, Barot S, Size and functional diversity of microbe populations control plant persistence and long-term soil carbon accumulation, *Ecology letters*, 8, 2005, 2-13
  - Fouda S, Nitrogen availability of biogas residues, PhD thesis, Technische Universität München, 2011
  - Gac A, Beline F, Bioteau T, Digestion anaérobie et gaz à effet de serre. Application pour le calcul du bilan des émissions de gaz à effet de serre des installations de digestion anaérobie. Version 1.0 Guide méthodologique, étude réalisée par le CEMAGREF, 2007
  - Gungor, K., Karthikeyan, K.G, phosphorus forms and extractability in dairy manure: a case study for Wisconsin on-farm anaerobic digesters, *Bioresource Technology*, 99, 2008, 425-36
  - Labosky C A M, Earhart S M, Baxter C A, Evaluation of nitrogen availability from raw and treated dairy manures, 19th world congress of soil science, soil solutions for changing world, Brisbane Australia, 2010
  - Liedl B E, Cummins M et al, Fertilizer potential of liquid and solid effluent from thermophilic anaerobic digestion of poultry waste, *water sci technl* 53, 2006, 69-79
  - Linères M et Djakovitch JL, Caractérisation de la stabilité biologique des apports organiques par l'analyse biochimique. Matières organiques et agriculture, quatrième journées de l'analyse de terre (Gemmas). Cinquième forum de la fertilisation raisonnée (Comifer). 16-18 novembre 1993, 159-168
  - Lopez-Gutierrez Juan C., Henry Sonia, Hallet Stephanie, Martin-Laurent Fabrice, Catroux Gérard, Philippot Laurent, Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR, *Journal of Microbiological Methods*, 57, 2004, 399- 407
  - Marchand A.L., Piutti S., Lagacherie B., Soulas G. Atrazine mineralisation in bulk and maize rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*. 35, 2002, 288-292.
  - Marschner B, Kalbitz K, Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils, *Geoderma*, 113, 2003, 211-235
  - Möller K, Müller T Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth : a review, *Eng life sci* 3, 2012, 242-257.
  - Moller K and Stinner W, Effects of organic wastes digestion for biogas production on mineral nutrient availability of biogas effluents, *Nutr Cycl Agroecosyst*, 87 2010,395-413, 2010
  - Niknahad-Gharmakher H, Piutti S, Machet J-M, Benizri E, Recous S Mineralization-immobilization of sulphur in a soil during decomposition of plant residues of varied chemical composition and S content. *Plant Soil*, 360, 2012, 391-404.
  - Odlare M, Organic residues : a ressource for arable soils, PhD thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2005
  - Qualité agronomique et sanitaire des digestats, étude réalisée pour le compte de l'ADEME et le Ministère de l'Agriculture par RITMO Agroenvironnement, Uteam, Octobre 2011
  - Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, Margesin R, *Methods in soil biology*. Springer-Verlag, Berlin, 1996, 426
  - Ranjard L., Echairi A., Nowak V., Lejon D.P.H., Nouaïm R. & Chaussod R., - Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural copper treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 58, 2006, 303-315
  - Rochette P, Gregorich EG, Dynamics of soil microbial biomass C, soluble organic C and CO<sub>2</sub> evolution after three years of manure application, *CANADIAN JOURNAL OF SOIL SCIENCE*, 78, Issue: 2, 1998, 283-290
  - Sinsabaugh R.L, Enzymatic analysis of microbial pattern and process, *Biol fertil soils*, 17, 1994, 69-74
  - Sinsabaugh RL, Lauber CL, Weintraub MN, Ahmed B, Allison SD, Crenshaw C, Contosta AR, Cusack D, Frey S, Gallo ME, Gartner TB, Hobbie SE, Holland K, Keeler BL, Powers JS, Stursova M, Takacs-Vesbach C, Waldrop MP, Wallenstein MD, Zak DR, Zeglin LH, Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale, *Ecology letters*, 11, 2008, 1252-1264
  - Stockdale EA, Shepherd MA, Fortune S, Cuttle SP, Soil fertility in organic farming systems fundamentally different, *Soil use and management*, 18, 2002, 301-308
  - Tabatabai I M. A, Bremner J.M. Arylsulfatase activity of soils. *Proceedings. Soil Science Society of America*. 34, 1970, 225-229
  - Tambone F, Adani F, Gigliotti G, Volpe D, Fabbri C, Provenzano M.R, Organic matter characterization during the anaerobic digestion of different biomasses by means of CPMAS13C NMR spectroscopy. *Biomass and bioenergy*, 48, 2013, p 111-120

- Thomsen, IK; Schjonning, P; Chirstensen, BT, Mineralisation of N-15-labelled sheep manure in soils of different texture and water contents, BIOLOGY AND FERTILITY OF SOILS, 37, Issue: 5, 2003, 295-301
- Trichet P, Jolivet Cl, Arrouays D, Loustau D, Bert D, Ranger J, Le maintien de la fertilité des sols forestiers landais dans le cadre de la sylviculture intensive du pin maritime, Étude et Gestion des Sols, 6, 1999, 197- 214
- Suivi expérimental de l'installation de méthanisation du GAEC du Bois Joly, Bilan global, document ADEME, Biomasse Normandie, APESA, 2010
- Wawrzyniak Virginie et Viard Nathalie, Synthèse de l'étude bibliographique sur la méthanisation en voie
- Triolo Jin M, Ward Alastair J, Pedersen Lene , Løkke Mette M, Qu Haiyan, Sommer Sven G Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) for rapid determination of biochemical methane potential of plant biomass, Applied Energy, 116 , 2014, 52–57
- Walsh John J, Jones Davey L, Edwards-Jones Gareth, Williams Prysor, Replacing inorganic fertilizer with anaerobic digestate may maintain agricultural productivity at less environmental cost; A, J Plant Nutr soil sci 175, 2012, 840-845
- sèche. Projet Interreg IIIA WLL: Agricométhane,TRAME, 2007

Dossier : **LAB14-4161-1**Numéro Laboratoire : **D-01895-14**

Référence Echantillon :

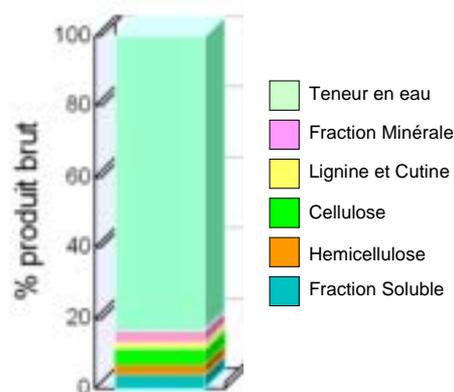
**RATION SUBSTRAT - NANCY -  
54547.SA003.2.1**

Arrivée labo : 28/02/14

Edité le :10/03/2014

**ENSAIA****2 Avenue de la Forêt de Haye****54 505 VANDOEUVRE LES NANCY****CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA MATIERE ORGANIQUE***XP U44-162*

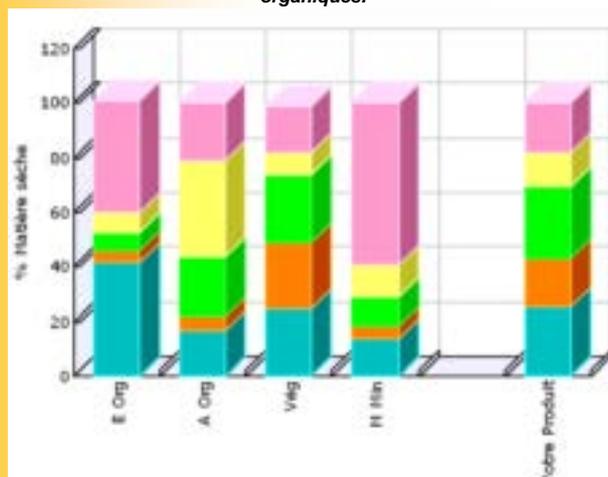
	Composition	
	(en % de la matière brute)	(en % de la matière organique)
Fraction Soluble <b>SOL</b>	4.2	31.6
Hémicellulose <b>HEM</b>	2.8	20.9
Cellulose <b>CEL</b>	4.3	32.2
Lignine et Cutine <b>LIC</b>	2.0	15.2
<b>Cellulose Wende</b>		<b>39.6</b>
<b>Total matière organique</b>	<b>13.2</b>	
Matières minérales	2.9	
Eau	83.8	



Composition du produit en %

**COMPARAISON DE VOTRE PRODUIT AVEC DES PRODUITS ORGANIQUES DE REFERENCE**

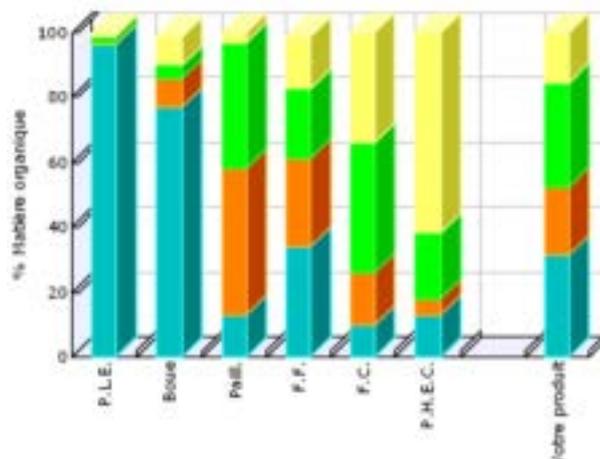
Comparaison de la composition de la matière sèche du produit étudié avec la composition moyenne de différents types de produits organiques.



E Org : Engrais Organique  
A Org : Amendement Organique

M Min : Produit riche en matières minérales  
Vég : Produit de type résidus végétaux

Comparaison de la partie organique du produit à des produits organiques utilisés en agriculture.



P.L.E. : Produits Labiles à base d'Excréments  
Paille. : Pailles de céréales

P.H.E.C. : Produit Humifère à base d'Ecorces Compostées

F.F. : Fumier Frais  
F.C. : Fumier Composté

Selon la classification proposée par ROBIN (1997), la matière sèche du produit est de type :

**AMENDEMENT ORGANIQUE**

## BUT DE L'ANALYSE

Outre les éléments nutritifs apportés ou libérés, certains produits organiques apportent des quantités importantes de composés organiques qui, après transformation dans le sol, reconstituent le stock humique du sol.

La Caractérisation Biochimique de la Matière organique permet de classer votre produit en termes d'usage agronomique (engrais, amendements,...) et d'en estimer son potentiel humique, c'est à dire la quantité potentielle d'**humus stable** restant après sa décomposition dans le sol.

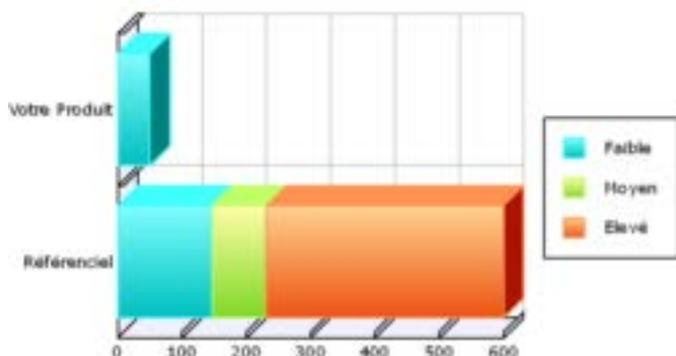
## ESTIMATION DU POTENTIEL HUMIQUE

<b>K1 (coefficient iso humique - indice CBM) :</b>	<b>0.31</b>	<b>(exprimé par rapport à la MS)</b>
<b>Tr résiduel (d'après XPU 44-162) :</b>	<b>37.8</b>	<b>% (MO)</b>
<b>Indice ISB :</b>	<b>0.23</b>	
<b>Potentiel d'Humus Stable (d'après indice ISB) :</b>	<b>30</b>	<i>Les résultats du potentiel d'humus stable sont exprimés en kg de matière organique par tonne de produit brut</i>
<b>Potentiel d'Humus Stable (d'après indice CBM) :</b>	<b>50</b>	

Les 2 indices donnés (CBM et ISB) sont issus de 2 formules de calcul différentes. Les quantités d'humus stable calculées par chacune peuvent être différentes selon la nature du produit analysé.

La moyenne calculée par les 2 approches est de 40 kg d'humus stable par tonne de produit brut.

Le test ISMO fait appel quand à lui à un indice unique.



Référence Produit :

**RATION SUBSTRAT - NANCY - 545**

Type :

**AMENDEMENT ORGANIQUE**

Potentiel d'humus stable :

**50** kg d'humus stable par tonne de produit brut (calculé à partir du Tr)

Niveau : **FAIBLE**

**Cette analyse ne permet pas de préciser le temps nécessaire pour obtenir ce potentiel après incorporation du produit dans le sol, ce délai étant dépendant des conditions pédo-climatiques liées à l'emploi de ce produit.**

Jean-Yves BALITEAU  
Responsable Scientifique

**Ce rapport annule et remplace la précédente version (version n°0)  
Veuillez nous renvoyer ou détruire le précédent rapport. SADEF se dégage de toute responsabilité quant à l'usage du rapport initial.**

### Commentaires / Observations

Le résultat est donné à titre indicatif car le produit n'appartient pas au domaine d'application de la norme NFU 44-162 (Applicable aux amendements organiques et supports de culture normalisés contenant un minimum de 20 % de MO exprimée par rapport à la MS)

### Références :

- Norme XP U44-162 - Amendement organiques et supports de culture - Caractérisation de la matière organique par fractionnement biochimique et estimation de sa stabilité biologique.  
Robin D. (1997) *Intérêt de la caractérisation biochimique pour l'évaluation de la proportion de matière organique stable dans le sol et la classification des produits organominéraux*. *Agronomie*, 17, 157-171  
Linères M. et Djakovitch J.L. (1993) *Caractérisation de la stabilité biologique des apports organiques par l'analyse biochimique Matières organiques et agriculture*. 4ème journée de l'analyse de terre et 5ème forum de la fertilisation raisonnée, pp 159-168.

**SADEF**

Page : 2/2

Rapport d'analyse n° : D-01895-14

Version n° : 1

Rue de la Station - F-68700 Aspach le Bas - www.sadef.fr  
Tel : +33 (0)3 89 62 72 30 - Fax : +33 (0)3 89 62 72 49 - Email : pole@sadef.fr

Dossier : **LAB14-4161-3**Numéro Laboratoire : **D-01897-14**

Référence Echantillon :

**DIGESTEUR - NANCY - 54547.SA003.2.3**

Arrivée labo : 28/02/14

Edité le :14/03/2014

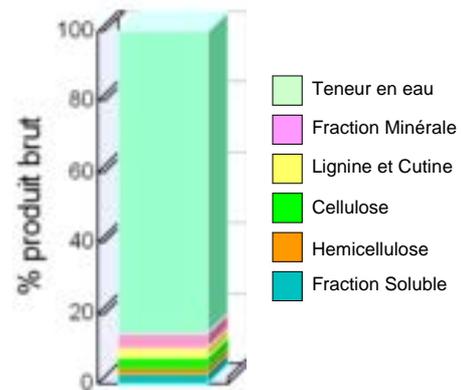
**ENSAIA****2 Avenue de la Forêt de Haye****54 505 VANDOEUVRE LES NANCY**

## CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA MATIERE ORGANIQUE

*XP U44-162*

Composition  
(en % de la matière brute) (en % de la matière organique)

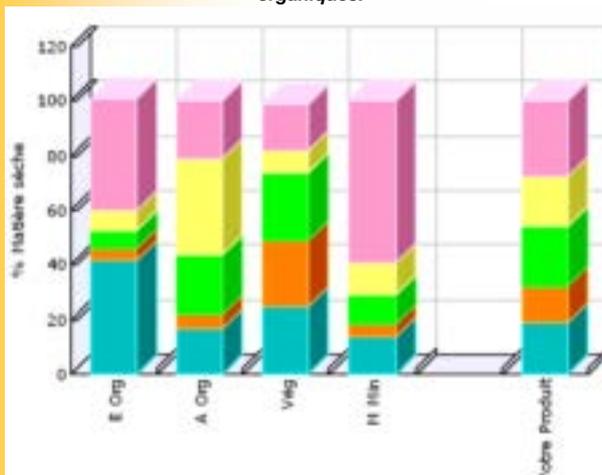
Fraction Soluble <b>SOL</b>	2.6	26.1
Hémicellulose <b>HEM</b>	1.8	18.3
Cellulose <b>CEL</b>	3.0	30.1
Lignine et Cutine <b>LIC</b>	2.6	25.4
<b>Cellulose Wende</b>		<b>49.9</b>
<b>Total matière organique</b>	<b>10.1</b>	
Matières minérales	3.8	
Eau	86.1	



Composition du produit en %

## COMPARAISON DE VOTRE PRODUIT AVEC DES PRODUITS ORGANIQUES DE REFERENCE

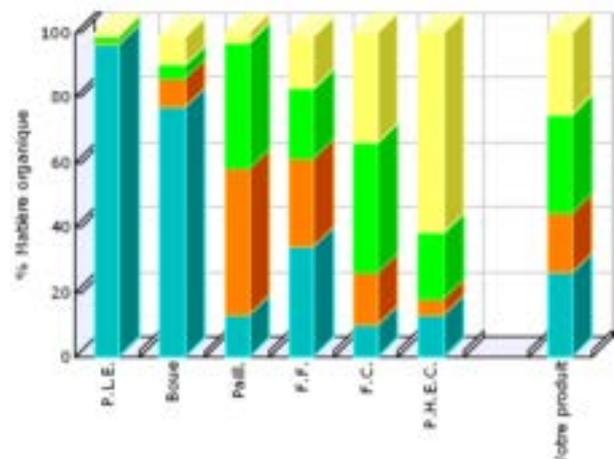
Comparaison de la composition de la matière sèche du produit étudié avec la composition moyenne de différents types de produits organiques.



E Org : Engrais Organique  
A Org : Amendement Organique

M Min : Produit riche en matières minérales  
Vég : Produit de type résidus végétaux

Comparaison de la partie organique du produit à des produits organiques utilisés en agriculture.



P.L.E. : Produits Labiles à base d'Excréments  
Paill. : Pailles de céréales

P.H.E.C. : Produit Humifère à base d'Ecorces Compostées

F.F. : Fumier Frais  
F.C. : Fumier Composé

Selon la classification proposée par ROBIN (1997), la matière sèche du produit est de type :

**AMENDEMENT ORGANIQUE**

## BUT DE L'ANALYSE

Outre les éléments nutritifs apportés ou libérés, certains produits organiques apportent des quantités importantes de composés organiques qui, après transformation dans le sol, reconstituent le stock humique du sol.

La Caractérisation Biochimique de la Matière organique permet de classer votre produit en termes d'usage agronomique (engrais, amendements,...) et d'en estimer son potentiel humique, c'est à dire la quantité potentielle d'**humus stable** restant après sa décomposition dans le sol.

## ESTIMATION DU POTENTIEL HUMIQUE

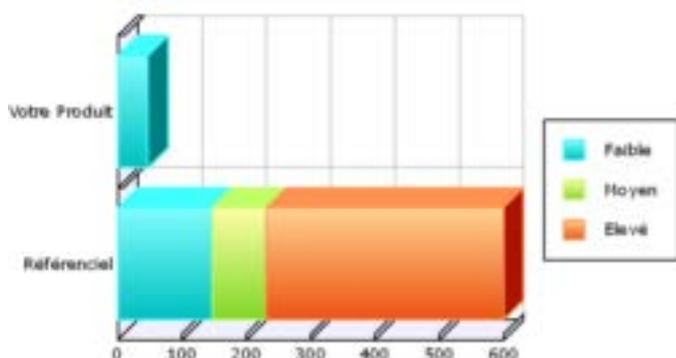
<b>K1 (coefficient iso humique - indice CBM) :</b>	<b>0.34</b>	<b>(exprimé par rapport à la MS)</b>
<b>Tr résiduel (d'après XPU 44-162) :</b>	<b>46.9</b>	<b>% (MO)</b>
<b>Indice ISB :</b>	<b>0.26</b>	
<b>Potentiel d'Humus Stable (d'après indice ISB) :</b>	<b>26</b>	<b>Les résultats du potentiel d'humus stable sont exprimés en kg de matière organique stable par tonne de produit brut</b>
<b>Potentiel d'Humus Stable (d'après indice CBM) :</b>	<b>47</b>	

Les 2 indices donnés (CBM et ISB) sont issus de 2 formules de calcul différentes. Les quantités d'humus stable calculées par chacune peuvent être différentes selon la nature du produit analysé.

La moyenne calculée par les 2 approches est de 36 kg d'humus stable par tonne de produit brut.

Le test ISMO fait appel quand à lui à un indice unique.

## POTENTIEL D'HUMUS STABLE - INTERPRETATION



### Référence Produit :

**DIGESTEUR - NANCY - 54547.SA0**

### Type :

**AMENDEMENT ORGANIQUE**

### Potentiel d'humus stable :

**47** kg d'humus stable par tonne de produit brut (calculé à partir du Tr)

**Niveau : FAIBLE**

**Cette analyse ne permet pas de préciser le temps nécessaire pour obtenir ce potentiel après incorporation du produit dans le sol, ce délai étant dépendant des conditions pédo-climatiques liées à l'emploi de ce produit.**

**Jean-Yves BALITEAU**  
Responsable Scientifique

**Ce rapport annule et remplace la précédente version (version n°0)  
Veuillez nous renvoyer ou détruire le précédent rapport. SADEF se dégage de toute responsabilité quant à l'usage du rapport initial.**

### Commentaires / Observations

Le résultat est donné à titre indicatif car le produit n'appartient pas au domaine d'application de la norme NFU 44-162 (Applicable aux amendements organiques et supports de culture normalisés contenant un minimum de 20 % de MO exprimée par rapport à la MS)

### Références :

Norme XP U44-162 - Amendement organiques et supports de culture - Caractérisation de la matière organique par fractionnement biochimique et estimation de sa stabilité biologique.  
Robin D. (1997) *Intérêt de la caractérisation biochimique pour l'évaluation de la proportion de matière organique stable dans le sol et la classification des produits organominéraux*. *Agronomie*, 17, 157-171  
Linères M. et Djakovitch J.L. (1993) *Caractérisation de la stabilité biologique des apports organiques par l'analyse biochimique Matières organiques et agriculture*. 4ème journée de l'analyse de terre et 5ème forum de la fertilisation raisonnée, pp 159-168.

Rapport d'analyse n° : D-01897-14

Version n° : 1

**SADEF**

Rue de la Station - F-68700 Aspach le Bas - www.sadef.fr  
Tel : +33 (0)3 89 62 72 30 - Fax : +33 (0)3 89 62 72 49 - Email : pole@sadef.fr

Page : 2/2

# Résumé

Les mesures de potentiel méthanogène sur 16 rations de même type provenant d'autant d'exploitations montre que beaucoup d'exploitations (15 sur les 16 testés) ont la qualité d'effluent nécessaire pour produire une quantité de biogaz (en conditions idéales) limitant leurs dépendances énergétiques.

L'application selon les préconisations de ration de méthaniseur, de digestats brut ou ayant subi une séparation de phase (fraction solide et liquide) n'ont eu aucun effet sur les micro-organismes (biomasses C, N biomasses moléculaires bactériennes et fongiques) ou sur les indicateurs de la fertilité du sol (minéralisation du carbone et activités enzymatiques). Plusieurs éléments peuvent expliquer ces résultats. Les analyses de caractérisation de la ration et du digestat montrent une proportion de matières organiques, un rapport C/N et des teneurs en azote  $\text{NH}_4^+$  plus faibles que les valeurs habituelles de ce genre de matrice. Les analyses de caractérisation du sol quant à elle montrent un sol avec un pH de 8.2 et des proportions de calcaire actif importantes. Enfin l'état du sol lors de son prélèvement et un temps de stockage un peu long ont pu biaiser les résultats obtenus.

Mots-clés : Potentiel méthanogène, digestat, activités enzymatiques, biomasse C, biomasse N, biomasse moléculaire bactérienne, biomasse moléculaire fongique, minéralisation C

## Abstract

Methane producing potential assessing of 16 rations (manure/liquid manure) comes from 16 farms shows that, many of them have a good quality to product enough biogas (under ideal conditions) to limit their energy dependencies.

Application (according to the recommendations) of ration, raw digestate or undergoing phase separation (solid and liquid fraction) had no effects on micro-organisms (biomass C, N bacterial and fungal molecular biomass) and indicators of soil fertility (carbon mineralization and enzyme activities). Several factors can explain these results. Ration's and digestate's characterization show a organic matter proportion, carbon/nitrogen ratio and nitrogen contents lower than the typical values of such values matrix. Soil's characterization indicate high pH (8,2) and active limestone important proportions. Finally soil conditions during its removal and storage time a bit longer could have biased the results.

Keywords: Methane producing potential, digestate, enzymatic activity, biomass C, biomass N, bacterial biomass, fungal biomass, C mineralization