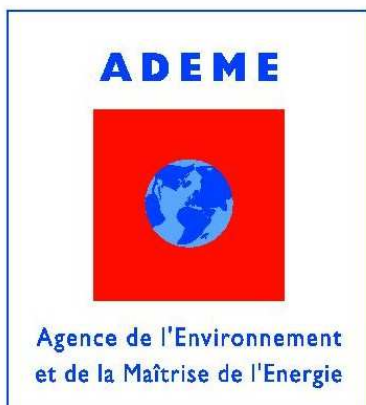




VADEBIO (2010-2013)

Caractérisation de l'état biologique des sols du site de la Bouzule (Lorraine, France) après 10 années d'épandage de Produits Résiduels Urbains (PRO)

Soil Biological characterization after 10 years of Biosolid spreading at La Bouzule site (Lorraine, France)

Rapport final

15 mai 2013

Etude coordonnée pour le compte de l'ADEME par
Jérôme CORTET



Laboratoire Sols et Environnement – UMR UL/INRA 1116

Ont contribué à la rédaction

Jérémy BEGUET, Anne-Marie CHARISSOU, Elodie-Denise CHENOT, Mickael HEDDE,
Fabrice MARTIN-LAURENT, Denis PIRON, Christophe SCHWARTZ, Françoise WATTEAU

contrat n° 0875C0077

Coordination technique

Antonio BISPO
ADEME, Angers

Remerciements

Nous remercions chaleureusement l'ensemble du personnel technique ayant contribué de près ou de loin à cette étude, particulièrement Bernard Colin et Stéphane Colin, en charge de la gestion du site de La Bouzule, Alain Rakoto, Jean-Claude Bégin, Romain Goudon, Marion Klein et Adeline Bouchard, ayant contribué aux prélèvements et analyses.

Nous remercions l'ensemble des chercheurs ayant contribué à réaliser ce projet, particulièrement Daniel Cluzeau et Guénola Peres (Université de Rennes 1), David Bru (INRA Dijon), Tony Paris (Eurofins),

Cette étude rentre dans le cadre du SOERE PRO animé par Sabine Houot.

L'ADEME en bref

L'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) est un établissement public sous la tutelle conjointe du ministère de l'Ecologie, du Développement et de l'Aménagement durables, et du ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Elle participe à la mise en oeuvre des politiques publiques dans les domaines de l'environnement, de l'énergie et du développement durable. L'agence met ses capacités d'expertise et de conseil à disposition des entreprises, des collectivités locales, des pouvoirs publics et du grand public et les aide à financer des projets dans cinq domaines (la gestion des déchets, la préservation des sols, l'efficacité énergétique et les énergies renouvelables, la qualité de l'air et la lutte contre le bruit) et à progresser dans leurs démarches de développement durable.

www.ademe.fr

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite selon le Code de la propriété intellectuelle (art. L 122-4) et constitue une contrefaçon réprimée par le Code pénal. Seules sont autorisées (art. 122-5) les copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé de copiste et non destinées à une utilisation collective, ainsi que les analyses et courtes citations justifiées par la caractère critique, pédagogique ou d'information de l'œuvre à laquelle elles sont incorporées, sous réserve, toutefois, du respect des dispositions des articles L 122-10 à L 122-12 du même Code, relatives à la reproduction par reprographie.

Résumé

De 1996 à 2002, un système expérimental a été mis en place sur le site de La Bouzule (Nancy, France) pour étudier les effets de différents produits résiduels organiques (PRO) sur la fertilité et les polluants organiques et métalliques dans les sols. L'objectif était de travailler en conditions réelles d'utilisation de ces produits, c'est-à-dire aux doses recommandées en agriculture par le législateur et en conditions réalistes de mise en culture sur ce type de sol (mise en place de rotations, pratiques agricoles classiquement utilisées). Les résultats ont pu démontrer un effet bénéfique des PRO sur la fertilité des sols, tout en maintenant les teneurs en polluants métalliques et organiques dans les sols à des niveaux acceptables. En 2010 et 2011, après huit années et plus d'arrêt des épandages, une étude a été menée afin d'analyser les arrières-effets de ces épandages sur la biodiversité des sols, prenant en compte aussi bien des paramètres d'abondance et de diversité des communautés du sol, que des critères liés au fonctionnement biologique des sols. Ont été analysées les communautés bactériennes, le potentiel enzymatique des sols, les communautés de microarthropodes, notamment les collemboles, les communautés de macrofaune du sol épigées et endogées, les associations organo-minérales, la dynamique de décomposition de la matière organique, la production de biomasse végétale. Les principales caractéristiques agronomiques, éléments traces métalliques, totaux et disponibles, ainsi que les polluants organiques dans les sols ont été aussi étudiées. Les résultats mettent en évidence une persistance de l'effet traitement sur certains éléments mesurés dans les sols, notamment le phosphore et le C/N, permettant d'apprécier l'effet fertilisant à long terme des produits d'origine urbaine; ou encore les teneurs en Cd, Cu et Pb, qui restent supérieures aux témoins mais bien en dessous des limites légalement acceptées. Toutefois ces différences ne se reflètent pas au niveau des paramètres biologiques du sol. Ainsi les communautés étudiées ne présentent pas de différences significatives entre traitements. Seuls certains traits fonctionnels mesurés (vitesse de dégradation de l'atrazine, traits fonctionnels des lombriciens) permettent une légère distinction entre certains traitements. Les associations organo-minérales observées ne permettent pas de distinguer nettement les modalités étudiées. Enfin, l'effet fertilité observé au niveau des sols, ne se reflète plus au niveau de la biomasse aérienne mesurée au niveau des cultures de maïs.

Mots-Clés : Biodiversité, Produits Résiduels Organiques (PRO), Sols, Bactéries, Enzymes, Microarthropodes, macrofaune, Associations organo-minérales

Abstract

From 1996 to 2002, an experimental system was set up at La Bouzule site (Nancy, Northeast France), to study the effects of 8 biosolids on soil fertility and soil metallic and organic pollutants. The objectives were to work in real conditions, by using the recommended doses in agriculture and classic agricultural practices (rotations, crop productions...). Results have shown a benefit on soil fertility, with only a slight acceptable impact on soil metal contents. In 2010 and 2011, eight years after biosolid spreading, a study was carried out to analyse the effects of these biosolids on soil biodiversity, by taking into account soil communities, but also soil biofunctioning. Thus Bacterial communities, microarthropod communities, particularly Collembola, soil epigeic and endogeic macrofauna communities were assessed, as well as organo-mineral associations, organic matter decomposition dynamic and biomass production. Soils samples were also collected for the analyses of chemical fertility and pollutants. The results show a persistent higher fertility concerning phosphorus and C/N for soils that have received urban products (sludge and composts of sludge). In these soils, some metals (Cd, Cu, Pb) were also still present in higher quantities compared to other soils, even though they were under the legal threshold values. However, at the biological level, the main characteristics of the studied communities did not show any significant differences between treatments. Only some functional traits (microbial degradation dynamic of atrazine, functional traits of Lumbricidae) showed a small effect of treatments. Organo-mineral associations did not show any significant differences between treatments. Finally the differences observed for fertility at the chemical level into the soils did not have any consequences for maize growth.

Key-words : Biodiversity, Biosolids, Sols, Bacteria, Enzymes, Microarthropods, Macrofauna, Organo-mineral associations

Sommaire

1	Introduction	13
1.1	Objectifs généraux	13
1.2	Equipes engagées	13
1.3	Site atelier	15
1.4	Paramètres indicateurs	15
1.4.1	Paramètres physico-chimiques	15
1.4.2	Micro-organismes et activités enzymatiques	15
1.4.3	Microarthropodes	16
1.4.4	Macrofaune	18
1.4.5	Décomposition de la matière organique	18
1.4.6	Biostructures du sol	19
1.4.7	Biomasse végétale	19
2	Matériel et Méthodes	21
2.1	Déchets épandus et système expérimental	21
2.2	Caractéristiques des déchets épandus	21
2.2.1	Caractéristiques physico-chimiques	21
2.2.2	Aspect morphologique global	21
2.3	Historique des cultures sur le site	24
2.4	Fréquence et coordination de l'échantillonnage des différents indicateurs	25
2.5	Physico-chimie des sols	25
2.5.1	Paramètres agronomiques	25
2.5.2	Eléments traces métalliques et polluants organiques	25
2.6	Communautés bactériennes	26
2.6.1	Extraction de l'ADN	26
2.6.2	Purification de l'ADN extrait du sol	26
2.6.3	Quantification de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	27
2.6.4	Test d'inhibition	27
2.6.5	PCR quantitative et abondance bactérienne	27
2.6.6	A-RISA et structure bactérienne	28
2.6.7	Radiorespirométrie et minéralisation de l'atrazine	28
2.6.8	Statistiques	28
2.7	Activités enzymatiques	28
2.8	Micoarthropodes	29
2.8.1	Echantillonnage et identification des taxons	29

2.8.2	Analyse de la diversité.....	29
2.8.3	Statistiques.....	29
2.9	Macrofaune totale.....	30
2.9.1	Abondances et biomasses.....	30
2.9.2	Diversité taxonomique.....	30
2.9.3	Diversité fonctionnelle.....	31
2.9.4	Statistiques.....	31
2.10	Lombriciens.....	31
2.11	Dynamique de décomposition de la matière organique	32
2.12	Stabilité structurale et associations organo-minérales	32
2.12.1	Origine des échantillons analysés	32
2.12.1.1	Les PRO épandus.....	32
2.12.1.2	Les prélèvements de sols	32
2.12.1.3	Les sacs à litière	32
2.12.1.4	Les turricules	33
2.12.2	Fractionnement granulométrique.....	33
2.12.3	Réalisation de lames minces	33
2.12.4	Caractérisation morphologique et analytique en MET/EDX.....	33
2.13	Biomasse végétale.....	33
3	Résultats acquis	35
3.1	Physico-chimie des sols.....	35
3.1.1	Paramètres agronomiques	35
3.1.1.1	Texture.....	35
3.1.1.2	Distribution pondérale des fractions granulométriques stables à l'eau	37
3.1.1.3	Eléments majeurs	39
3.1.1.4	Analyse en composantes principales sur les paramètres agronomiques	41
3.1.1.5	Eléments échangeables	44
3.1.2	Eléments traces métalliques et polluants organiques.....	45
3.1.2.1	Eléments traces métalliques.....	45
3.1.2.2	Polluants organiques	49
3.1.2.3	Fractions biodisponibles (essais de lixiviation).....	49
3.2	Communautés bactériennes	50
3.2.1	Abondance de la communauté bactérienne	50
3.2.1.1	Communauté globale (ADNr 16S).....	50
3.2.1.2	Gènes de dégradation de l'atrazine : atzA, trzD, trzN	52

3.2.1.3	Communauté pca dégradant les composés aromatiques.....	52
3.2.1.4	Gène impliqué dans la nitrification : amoA	52
3.2.1.5	Évolution de l'abondance entre 2010 et 2011.....	52
3.2.1.6	Abondance spécifique relative	53
3.2.2	Structure de la communauté bactérienne.....	55
3.2.3	Impact de l'ajout d'atrazine sur la structure globale, l'abondance et le potentiel dégradant de la communauté bactérienne en 2010	55
3.2.3.1	Effet sur l'abondance.....	55
3.2.3.2	Effet sur la structure (A-RISA)	56
3.2.3.3	Cinétique de minéralisation	57
3.2.3.4	Conclusion	58
3.2.4	Conclusion générale.....	58
3.3	Potentiel enzymatique.....	59
3.4	Microarthropodes	61
3.4.1	Abondance et Fréquence	61
3.4.2	Richesse et diversité des collemboles.....	63
3.4.3	Structure des communautés	66
3.5	Macrofaune	67
3.5.1	Abondance et biomasse de la macrofaune totale	67
3.5.2	Diversité taxonomique.....	68
3.5.3	Diversité fonctionnelle des lombriciens (échantillonnage sur monolithes de sol)	69
3.5.4	Discussion	70
3.6	Lombriciens (extraction éthologique et physique).....	71
3.6.1	Evolution des abondances et biomasses de 2001 à 2011	71
3.6.2	Structure des communautés en 2011.....	72
3.6.3	Diversité taxonomique des communautés en 2011	73
3.6.4	Structuration spatiale des communautés lombriciennes.....	75
3.6.5	Discussion	76
3.7	Dynamique de décomposition de la matière organique	76
3.7.1	Pertes de masse de la paille de blé au sein des sacs à litières	76
3.7.2	Dégradation de la paille de blé au sein des sacs à litières.....	76
3.7.2.1	Observation des pailles initiales :	77
3.7.2.2	Observation des pailles en fin d'expérimentation :	77
3.7.2.3	Observation des agrégats récoltés sur les sacs en fin d'expérimentation	78
3.7.2.4	Synthèse des résultats concernant l'incubation des pailles de blé	

au champ	78
3.8 Dynamique des associations organo-minérales dans les sols	81
3.8.1 Analyses des macrostructures	81
3.8.2 Analyse des microstructures	82
3.8.2.1 Recherche de traceurs microstructuraux.....	82
3.8.2.2 Visualisation des PRO au sein des fractions 0-20 µm des sols.....	83
3.8.2.3 Analyse de biostructures produites par les vers de terre : les turricules.....	84
3.9 Croissance de la végétation	85
3.9.1 Production de biomasse aérienne	85
3.9.2 Teneurs en carbone et azote	87
4 Conclusion	90

Liste des tableaux

Tableau 1: Consortium établi pour le programme VADEBIO	14
Tableau 2: Caractéristiques des déchets, éléments en traces métalliques et polluants organiques. Moyenne de quatre valeurs pour chaque paramètre correspondant à chacun des quatre épandages. Les valeurs en gras sont au-dessus des limites légales (Cortet <i>et al.</i> , 2011).	23
Tableau 3 : Principales interventions agricoles sur les parcelles du site de la Bouzule (modifié de Cortet <i>et al.</i> , 2011)	24
Tableau 4 : polluants organiques et éléments traces métalliques analysés lors du programme VADEBIO	26
Tableau 5 : Caractéristiques des différents couples d'amorces utilisés en test d'inhibition et en PCR quantitative	27
Tableau 6 : valeurs des traits morphologiques et des préférences écologiques des espèces de lombriciens collectées sur l'essai de la Bouzule. * les valeurs correspondent à des indices d'affinité de chaque espèce pour chaque modalité des traits étudiés (ex : <i>A. longa</i> à une affinité de 11% pour la modalité 'oligohumique')	30
Tableau 7 : Texture en 2010 des différentes parcelles par modalité (moyenne de 4 parcelles par modalité)	35
Tableau 8 : Pourcentages pondéraux des fractions granulo-densimétriques des échantillons des différents traitements	38
Tableau 9 : Valeur de <i>Is</i> en 2010 pour les différentes modalités	38
Tableau 10 : Eléments traces métalliques (mg kg ⁻¹ DM) dans le sol mesurés de 1996 à 2006 (d'après Cortet <i>et al.</i> 2011)	47
Tableau 11 : Teneurs moyennes en HAPs des 44 parcelles en 2010 par type de matrice épandue ...	49
Tableau 12 : mobilité des éléments traces métalliques après extraction au CaCl ₂	50
Tableau 13 : Valeurs de <i>p</i> données par le test ANOVA effectué sur le nombre de copies de gènes (ADNr 16S, <i>pcaH</i> , <i>amoAA</i> , <i>amoAB</i>) par gramme de sol soumis à une transformation logarithmique, pour chacun des onze traitements considérés	50
Tableau 14 : Valeurs moyennes du nombre de copies de gènes (ADNr 16S, <i>pcaH</i> , <i>amoAA</i> , <i>amoAB</i>) par gramme de sol pour chacun des onze traitements considérés, associés aux résultats du test ANOVA ($\alpha=0,05$) réalisé sur les valeurs brutes	51
Tableau 15 : Valeurs de <i>p</i> données par le test ANOVA effectué sur les rapports <i>pcaH</i> /16S, <i>amoAB</i> /16S et <i>amoAA</i> / <i>amoAB</i> soumis à une transformation logarithmique, pour chacun des onze traitements d'épandage de l'étude	53
Tableau 16 : Valeurs moyennes du nombre de copies de gènes d'ADNr 16S par gramme de sol sec pour chacun des onze traitements considérés après l'ajout d'atrazine dans les échantillons, mesurées par QPCR et associées aux résultats du test ANOVA ($\alpha=0,05$)	56
Tableau 17 : Synthèse des résultats d'analyses du potentiel enzymatique des campagnes 2010 et 2011.	60
Tableau 18 : Liste des espèces présentes sur le dispositif expérimental de la Bouzule	74
Tableau 19 : Abondance moyenne (ind. m ⁻²) de cinq espèces endogées pour les années 2001 et 2011	74
Tableau 20 : Richesse taxonomique, diversité (Indice de Shannon) et équitabilité des communautés lombriciennes sur les onze modalités expérimentales de la Bouzule	74
Tableau 21 : Rapports C/N de différentes biomasses en comparaison à celle de la biomasse de maïs (USDA, 2011)	89

Liste des figures

Figure 1 : Relation fonctionnelle entre les différents groupes d'organismes proposés et implications des différents partenaires scientifiques du projet.....	14
Figure 2 : plan du parcellaire étudié et traitements appliqués.....	22
Figure 3 : Tri de la macrofaune du sol sur le site de la Bouzule au printemps 2010	30
Figure 4 : Prélèvement des lombriciens (méthode éthologique).....	32
Figure 5 : Mise en place (mai 2010) et récolte d'un sac de litière (photo : novembre 2010), puis extraction des microarthropodes par berlèse	32
Figure 6 : Prélèvement des structures au niveau des sacs à litière.....	33
Figure 7 : Photographies des deux extrémités de la parcelle n°1.....	34
Figure 8 : Schéma de la méthode de récolte du maïs sur les 40+4 parcelles (2011 et 2012).....	34
Figure 9 : Coupe des rangs latéraux de maïs écartés de l'échantillonnage	34
Figure 10 : teneurs en limons grossiers dans les parcelles et différences entre modalités (données 2010 et 2011 groupées)	36
Figure 11 : teneurs en sables grossiers dans les parcelles et différences entre modalités (données 2010 et 2011 groupées)	36
Figure 12 : Distribution spatiale de la teneur en argiles (en % de la fraction de terre fine < 2mm) mesurée en 2010 (gauche) et 2011 (droite) selon un gradient de couleur.	37
Figure 13 : Teneurs en Carbone organique des sols en fonction des traitements sur le site de la Bouzule (Moyennes sur 2010 et 2011). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.	39
Figure 14 : Teneurs en Azote total des sols en fonction des traitements sur le site de la Bouzule (Moyennes sur 2010 et 2011). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.....	40
Figure 15 : C/N des sols en fonction des traitements sur le site de la Bouzule (Moyennes sur 2010 et 2011). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.	40
Figure 16 : Teneurs en Phosphore Olsen des sols en fonction des traitements sur le site de la Bouzule (Moyennes sur 2010 et 2011). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.....	41
Figure 17 : Analyse en Composantes Principales (projection des échantillons et cercle des corrélations sur plan formé par les axes 1 et 2) sur les paramètres de texture et éléments majeurs des sols pour les analyses de sol récoltés en 2010 et 2011.....	42
Figure 18 : Effet traitement sur les composantes 1 et 2 de l'Analyse en Composantes principales (test de Kruskal-Wallis). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.	43
Figure 19 : Analyse en Composantes Principales (projection des échantillons et cercle des corrélations sur plan formé par les axes 1 et 3) sur les paramètres de texture et éléments majeurs des sols pour les analyses de sol récoltés en 2010 et 2011.....	44
Figure 20 : Effet traitement sur les composantes 1 et 3 de l'Analyse en Composantes principales (test de Kruskal-Wallis). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.	44
Figure 21 : teneurs en Calcium dans les sols en fonction des différents traitements (test de Kruskal-Wallis). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.	45
Figure 22 : teneurs en éléments traces métalliques dans les sols en 2010 en fonction des différents traitements (test de Kruskal-Wallis). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.	46
Figure 23 : Rapports moyens du nombre de copies du gène <i>pcaH</i> au nombre de copies du gène ADNr 16S pour chaque traitement considéré, années confondues.....	54
Figure 24 : Rapports moyens du nombre de copies du gène <i>amoAB</i> au nombre de copies du gène ADNr 16S pour chaque traitement considéré, années confondues.....	54
Figure 25 : Rapports moyens du nombre de copies du gène <i>amoAA</i> au nombre de copies du gène <i>amoAB</i> , pour chaque traitement considéré, années confondues	54
Figure 26 : Représentation graphique (ACP) de l'ensemble des onze traitements de la parcelle de la Bouzule en 2010 (gauche) et 2011 (droite) (1. CWP; 2. LSS: boues urbaines peu déshydratées; 3. LDSS: boues urbaines déshydratées; 4. LDCSS: boues urbaines compostées; 5. LDCSSO: boues urbaines compostées et polluants organiques; 6. LDCSSM: boues urbaines compostées et polluants minéraux; 7. MPS: boue de papeterie; 8. CA: cendres de combustion; 9. HWA: compost d'ordures	

ménagères; 10. CMF: témoin à fertilisation minérale basse; 11. COF: témoin à fertilisation minérale haute).....	55
Figure 27 : Représentation graphique (ACP) de l'ensemble des onze traitements, après supplément d'atrazine (t=21 j.) (1. CWP; 2. LSS: boues urbaines peu déshydratées; 3. LDSS: boues urbaines déshydratées; 4. LDCSS: boues urbaines compostées; 5. LDCSSO: boues urbaines compostées et polluants organiques; 6. LDCSSM: boues urbaines compostées et polluants minéraux; 7. MPS: boue de papeterie; 8. CA: cendres de combustion; 9. HWA: compost d'ordures ménagères; 10. CMF: témoin à fertilisation minérale basse; 11. COF: témoin à fertilisation minérale haute).....	56
Figure 28 : Cinétique de dégradation de l'atrazine en fonction des différents traitements de la parcelle de La Bouzule.....	57
Figure 29 : Vitesses de dégradation de l'atrazine en fonction des différents traitements de la parcelle de La Bouzule.....	58
Figure 30 : Visualisation spatiale du potentiel enzymatique sur les parcelles et blocs du dispositif expérimental de la Bouzule pour 2010 (bas gauche) et 2011 (bas droite)	60
Figure 31 : Fréquence relative (gauche) et abondance moyenne (nombre ind. m ⁻²) (droite) des 3 principaux groupes de microarthropodes observés sur le site de la Bouzule.....	61
Figure 32 : Fréquence relative (gauche) et abondance moyenne (nombre ind. m ⁻²) (droite) des 4 groupes d'acariens identifiés sur le site de la Bouzule	61
Figure 33 : Abondances moyennes en microarthropodes totaux en fonction des traitements sur le site de la Bouzule en 2010.....	61
Figure 34 : Abondances moyennes en acariens et collembolés en fonction des traitements sur le site de la Bouzule en 2010.....	62
Figure 35 : Abondances moyennes des « autres Arthropodes » en fonction des traitements sur le site de la Bouzule en 2010.....	62
Figure 36 : Abondances moyennes des trois principaux groupes d'acariens du sol en fonction des traitements sur le site de la Bouzule en 2010	63
Figure 37 : Liste des espèces et fréquence relative des collembolés récoltés sur le site de la Bouzule en 2010.....	64
Figure 38 : Abondances moyennes des trois taxons de collembolés montrant une différence significative entre traitements sur le site de la Bouzule en 2010 (test de kruskal-Wallis). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre traitements sur les tests post-hoc 2 à 2.....	65
Figure 39 : Richesse et diversité taxonomique des collembolés sur le site de la Bouzule en 2010.....	66
Figure 40 : Analyse en Composantes Principales (projection des échantillons et cercle des corrélations sur plan formé par les axes 1 (13,3% de la variance) et 2 (7% de la variance)) sur les abondances en microarthropodes du sol récoltés sur le site de la Bouzule en 2010. Les échantillons sont représentés par traitement (a), parcelle (b) ou bloc (c).	67
Figure 41 : Abondance moyenne de la macrofaune totale (individus m ⁻²) au printemps 2010 par traitement d'épandage effectués sur les 44 parcelles du site de La Bouzule	68
Figure 42 : abondance (individus m ⁻²) et biomasse (g m ⁻²) moyennes des vers de terre par traitement effectués sur les parcelles du site de la Bouzule en 2010	69
Figure 43 : Résultats de l'ACP sur les traits et préférences écologiques des vers de terre. (a) décroissance des valeurs propres des axes (PC1 = 38,6% et PC2 = 35,4%). (b) cercle des corrélations (pour les codes, voir leTableau 6). (c) ordination des relevés et barycentre des 11 traitements sur le premier plan factoriel (PC1-PC2).....	70
Figure 44 : Abondances et biomasses moyennes de communautés lombriciennes sur 11 modalités expérimentales de la Bouzule pour l'année 2001 et 2011.	72
Figure 45 : distributions relatives des trois catégories écologiques lombriciennes pour les onze modalités en 2011 sur le site de la Bouzule, les barres noires illustrent la position les abondances relatives en 2001	73
Figure 46 : Résultat de l'Analyse en Composant principale des modalités expérimentales en fonction de l'abondance des espèces lombriciennes (Contribution des axes : 1 = 21.7% et 2= 14.5%) sur le site de la Bouzule en 2011	75
Figure 47 : Distribution spatiale de quatre espèces lombriciennes sur le dispositif en 2011 (1cellule = 1parcelle élémentaire) (en noir: les densités les plus élevées, en blanc = densités nulles).....	75
Figure 48 : Coupe transversale de paille de blé observée en photonique (à gauche) et en électronique (à droite).	77
Figure 49 : Clichés des pailles de blé en fin d'expérimentation. 1 et 2 : colonisation et dégradation des tissus ligneux par des champignons ; 3 : interface résidus de paille /minéral ; 4 : bactéries dégradant les parois cellulaires	78
Figure 50 : Clichés MET des agrégats récoltés sur les sacs à litière. de 1 à 6 : agrégats issus des sacs	

de maille de 5 mm ; 7 et 8 : agrégats issus des sacs de maille de 200 µm.....	80
Figure 51 : Exemples de lames minces des modalités LSS, LDSS et COF (de gauche à droite).....	81
Figure 52 : Traceurs des PRO sur lames minces. Les flèches indiquent la présence de fibres au sein des structures organo-minérales du sol de la modalité MPS (B. papeteries) et HWA (com : compost d'ordures ménagères), ainsi que des cendres de combustion de la modalité CA.	82
Figure 53 : Microstructures caractéristiques des boues liquides urbaines LSS (1) et (2), des boues de papeteries MPS (3) et des cendres de combustion CA (4).....	83
Figure 54 : Clichés MET des fractions 0-2 µm et 2-20 µm de différentes parcelles 1 et 2: 2-20 µm et 0-2 µm de CMF; 3 et 4: 2-20 µm et 0-2 µm de la modalité LSS (boue peu déshydratée); 5 : 2-20 µm de la modalité LDSS ; 6 : 0-2 µm de la modalité LDCSS (boue urbaine compostée); 7 et 8 : 2-20 µm de la modalité MPS (boue de papeterie).....	84
Figure 55 : Clichés MET de turricules. 1 et 4 : modalité CMF ; 2, 3 et 6 : modalité HWA (compost d'ordures ménagères) ; 5 : modalité MPS (boue de papeterie). Barre = 2 µm, sauf pour le cliché 4 où la barre équivaut à 500 nm.....	85
Figure 56 : Rendements du maïs fourrage entre 2002 et 2005 (première campagne VADETOX) puis 2011 et 2012 (campagne correspondant à VADEBIO)	86
Figure 57 : Teneurs en azote (%) de la biomasse aérienne de maïs fourrage suivant les différents traitements en 2011 sur le site de la Bouzule	87
Figure 58 : Teneurs en carbone (%) de la biomasse aérienne de maïs fourrage suivant les différents traitements en 2011 sur le site de la Bouzule	88
Figure 59 : Rapport C/N de la biomasse aérienne de maïs fourrage suivant les différents traitements en 2011 sur le site de la Bouzule	88

Liste des Annexes

Annexe 1 : Protocole du fractionnement granulométrique (1/3).....	98
Annexe 2 : Humidité des échantillons de sol prélevés en 2010.....	101

1 Introduction

La plupart des déchets utilisés en agriculture correspond à des boues et composts dérivés d'épuration urbaine. Depuis plus de quinze années, la législation relative à l'utilisation et l'épandage des déchets s'est progressivement renforcée dans l'Union Européenne, et particulièrement en France. Parallèlement, la quantité de boues produites a considérablement augmenté, passant de 800 000 t de matières sèches par an en 2000 à plus de 950 000 t aujourd'hui. En France, l'épandage des boues et composts en milieu agricole constitue la principale voie d'élimination de ces déchets (60%).

De nombreuses études ont exploré les effets potentiels positifs et/ou négatifs des épandages de boues et autres déchets en milieux agricoles. Les principaux bénéfices concernent la fertilité des sols. En effet, les boues et composts sont riches en nutriments, calcium et matières organiques, ce qui induit généralement des effets positifs sur la production de biomasse végétale ainsi que sur les propriétés physico-chimiques des sols (Wei *et al.*, 1985; Logan *et al.*, 1997; Stamatiadis *et al.*, 1999; Aggelides and Londra, 2000; Al-Assiuty *et al.*, 2000). Des investigations récentes ont montré que l'épandage de boues pouvait améliorer les propriétés structurales des sols et ainsi accroître leur perméabilité, conductivité hydrique et capacité de rétention en eau, tout en diminuant l'érosion des sols (Mantovi *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2005; Oleszczuk, 2006; Brazauskiene *et al.*, 2008).

Les principaux risques concernent la pollution des sols, plus particulièrement le transfert de polluants organiques et minéraux vers l'agrosystème. Ainsi, il a été démontré que des applications de boues à très fortes doses pouvaient induire un transfert de polluants, principalement en éléments traces métallique, vers la plante (Juste and Solda, 1977; Morel and Guckert, 1984; Juste and Mench, 1992). Des interrogations portent également sur la présence de polluants organiques dans les sols (Rogers *et al.*, 1996; Petersen *et al.*, 2003; Oleszczuk, 2006).

Ces conclusions ont été récemment rassemblées dans différentes synthèses bibliographiques, montrant que l'épandage des boues aux doses recommandées permettait d'augmenter la fertilité et les rendements, et que la biodisponibilité des métaux n'augmentait qu'après des usages excessifs sur de nombreuses années (Hargreaves *et al.*, 2008; Singh and Agrawal, 2008; Smith, 2009).

Des travaux antérieurs financés par l'ADEME (programme VADETOX) ont démontré sur le site de la Bouzule un effet positif des déchets sur les propriétés agronomiques des sols tout en maintenant les niveaux en éléments traces métalliques et polluants organiques dans les sols en dessous des seuils imposés par la législation (Cortet *et al.*, 2011).

1.1 Objectifs généraux

Ce projet de recherche a pour objectif d'évaluer les effets d'épandages de huit déchets sur les paramètres de diversité et d'activité biologique des sols. Les travaux sont réalisés avec comme support un réseau de parcelles agricoles ayant reçu quatre épandages de 10t MS/ha sur une période de dix ans. Les déchets ont été apportés à des doses agronomiques compatibles avec le cadre réglementaire. Le but des épandages était d'améliorer la fertilité des sols et leur capacité à être supports de végétation. L'épandage de déchets a été arrêté en 2002. Le dispositif donne alors la possibilité de mesurer des arrière-effets potentiels. Ce projet fait suite aux programmes successifs notamment soutenus par l'ADEME ayant eu lieu depuis 1996 sur le site atelier de La Bouzule (domaine expérimental de l'INPL).

Le projet a plus particulièrement pour but d'effectuer le bilan de l'état biologique des sols après plus de 10 années de pratiques d'épandages suivi de plus de 8 années d'arrêt des épandages.

1.2 Equipes engagées

Les travaux réalisés ont pour objectif de rechercher, en fonction des matrices épandues (boues, composts, etc.), des relations directes et indirectes entre les réponses mesurées sur les organismes à différents niveaux d'organisation (individu, population, communauté), l'état (biostructure, contamination) et le fonctionnement du sol (dégradation de la MO, minéralisation de l'N, respiration du sol), ainsi que ses effets sur la croissance des végétaux (Figure 1).

Pour ce faire, un consortium réunissant différents laboratoires de recherche publics et privés a été mis en place (Tableau 1).

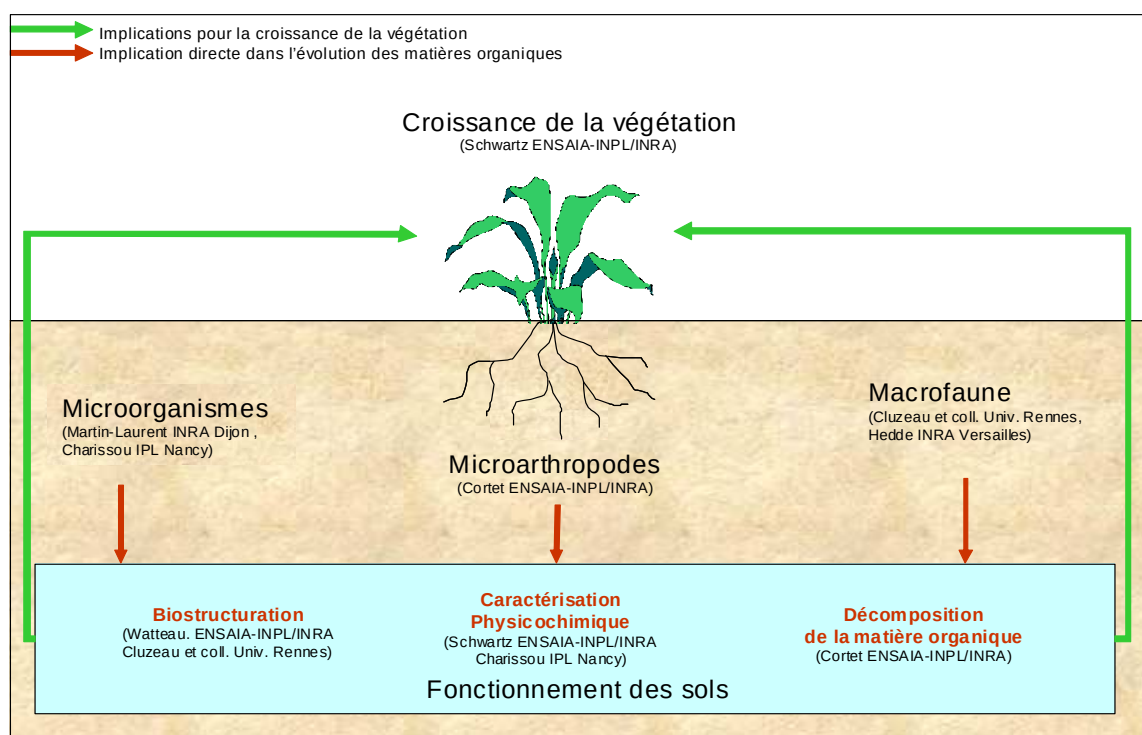


Figure 1 : Relation fonctionnelle entre les différents groupes d'organismes proposés et implications des différents partenaires scientifiques du projet

Tableau 1: Consortium établi pour le programme VADEBIO

N°partenaire	Organisme	Responsable pour le projet	Signatures de chaque partenaire
1 responsable du projet	Nancy Université, INPL(ENSAIA)/INRA Laboratoire Sols et Environnement ¹	Jérôme CORTET	
2	Université de Rennes I, UMR 6553 CNRS EcoBio Écosystèmes - Biodiversité - Évolution	Daniel CLUZEAU	
3	IPL santé, environnement durables / Laboratoire d'études et d'expertises ²	Anne-Marie CHARISSOU	
4	INRA-CMSE, UMR 1229 INRA- Université de Bourgogne ³	Fabrice MARTIN- LAURENT	

¹ Aujourd'hui UMR 1116 Université de Lorraine/INRA

² Aujourd'hui Eurofins Expertises Environnementales

³ Aujourd'hui UMR 1347 Agroécologie

1.3 Site atelier

Le site pilote commun proposé est le **Domaine Expérimental de la Bouzule** (Centre de référence traçabilité, qualité des aliments, ENSAIA-Université de Lorraine), exploitation agricole en polyculture-élevage qui permet de disposer de sols et d'usages parfaitement connus de l'échelle de la parcelle à celle de l'exploitation. Situé à environ 12 km au Nord-Est de Nancy, le Domaine Expérimental de la Bouzule (170 ha) appartient à la partie occidentale du Plateau Lorrain correspondant aux assises du Lias. Cette formation géologique représente approximativement 280 000 ha, soit 12% de la surface totale de la Lorraine. Le sous-sol est constitué par des formations du Sinémurien. Tantôt argileuses (argiles grises à Promicroceras), tantôt marno-calcaires (calcaires à Bélemnites et calcaires ocreux), elles sont généralement peu perméables et n'assurent pas un drainage naturel satisfaisant des sols. Sur les replats, elles peuvent être masquées par des placages limoneux observés sur l'essai. En fonction de leur comportement hydrique et agronomique, les sols du Domaine de la Bouzule peuvent être regroupés en trois grandes catégories : (1) les sols sur alluvions et colluvions, (2) les sols sur substrat argileux ou marno-calcaire, (3) les sols sur limons. Le réseau de 40 parcelles de 40 m², support du programme ADEME VADETOX, a fait l'objet de travaux multidisciplinaires pour l'évaluation des risques écotoxicologiques liés à l'épandage de déchets en agriculture de 1996 à aujourd'hui (Martin-Laurent *et al.*, 2004; Schwartz *et al.*, 2006; Cortet *et al.*, 2011). Ce dispositif permet de tester des effets « type de déchet » en comparaison à des témoins de pratiques agricoles classiques. Le site est aujourd'hui intégré au sein du SOERE PRO, animé par Sabine Houot (INRA Grignon).

1.4 Paramètres indicateurs

Trois types d'indicateurs ont été envisagés pour caractériser l'état biologique des sols : 1) une sélection d'organismes choisis représentatifs de la biodiversité rencontrée dans les sols : **micro-organismes, micro-arthropodes, macrofaune (dont macrofaune lombricienne)** 2) des variables d'état permettant de décrire la qualité physico-chimique du sol : **teneurs en éléments fertilisants et polluants, biostructures**, 3) une variable de fonctionnement permettant de mesurer les effets des déchets sur un processus du sol : **dynamique de décomposition de la matière organique**. Parmi ces indicateurs, on retrouve ceux récemment identifiés comme indispensables pour surveiller la biodiversité des sols (Bispo *et al.*, 2010). Par ailleurs un quatrième type d'indicateur, correspondant au service rendu par l'écosystème sol, a été estimé en mesurant la **production de biomasse végétale**.

1.4.1 Paramètres physico-chimiques

La connaissance de la qualité des sols ne peut pas s'affranchir d'une **caractérisation agronomique complète** qui va renseigner sur leur niveau de fertilité physique et chimique (densité, granulométrie, pH, carbone organique total, matière organique, azote total, rapport C/N, phosphore assimilable, capacité d'échange cationique, bases échangeables, humidités caractéristiques). Par ailleurs, les déchets épandus sont susceptibles de contenir des **polluants organiques (HAP, PCB) et métalliques (Cd, Cu, Zn, Pb, Ni notamment)**, qu'il est alors nécessaire de quantifier dans les sols.

1.4.2 Micro-organismes et activités enzymatiques

Les micro-organismes édaphiques (bactéries, champignons et algues) représentent de l'ordre de 140 à 1200 mg de carbone par kilogramme de sol (Chaussod *et al.*, 1986) pour des populations variant entre 10⁷ et 10⁹ cellules par gramme de sol. Ils constituent le second pool de carbone biologique des sols après les racines des plantes. Au-delà de cette importance pondérale, les micro-organismes du sol jouent un rôle prépondérant dans les processus d'évolution des sols, en participant activement aux cycles géochimiques, notamment ceux du carbone et de l'azote (recyclage de la matière organique, fixation symbiotique de l'azote, nitrification, ...), dont dépend la fertilité des sols (Berthelin *et al.*, 1994). De plus, les champignons mycorhizogènes à arbuscules, dont le réseau mycélien peut atteindre jusqu'à 100 m/cm³ de sol (Miller *et al.*, 1995), jouent un rôle très important dans le flux sol-plante de phosphore (Smith and Read, 1997), dans la structure des sols en augmentant la stabilité des agrégats (Bearden and Petersen, 2000), et aussi dans leur capacité de rétention en eau (Augé *et al.*, 2001). Les micro-organismes du sol sont également des agents d'épuration vis-à-vis de composés (xénobiotiques, hydrocarbures, ...) dont le sol est un lieu de passage obligé et dont la présence est une menace à la fois pour les espèces telluriques et pour l'homme. Une vingtaine d'activités microbiennes susceptibles d'influencer la qualité agronomique des sols a été identifiée par Waid (cité par Chaussod 1996), en particulier la fixation de l'azote atmosphérique, la transformation des matières carbonées, la solubilisation d'éléments minéraux (Ca, Mg, P...). Récemment, le développement de méthodes moléculaires basées sur l'extraction des acides nucléiques du sol et leur analyse après

polymérisation en chaîne (PCR) a offert de nouvelles perspectives à l'écologie microbienne autorisant l'étude de la structure, la diversité et l'abondance de communautés microbiennes.

Dans les années 2000, l'impact de l'épandage de boues sur l'activité potentielle et l'abondance de communautés microbiennes dégradant l'atrazine, un herbicide appartenant à la famille des s-triazines fréquemment appliqué sur les cultures de maïs à La Bouzule, avait été évalué (Martin-Laurent *et al.*, 2004). Nous avons alors montré que l'activité des communautés microbiennes estimée dans les différents traitements appliqués sur les parcelles de La Bouzule était semblable. Toutes les parcelles étaient adaptées à la minéralisation de l'atrazine (ca 40 % de minéralisation de l'atrazine initialement apporté en 60 jours d'incubation). Toutefois, pour certains traitements, nous avons observé des communautés dégradantes plus abondantes ($p < 0.05$). Malgré ces observations, l'activité potentielle de cette communauté était homogène dans les différentes parcelles suggérant que d'autres paramètres (probablement physico-chimiques) interféraient avec l'expression de ce potentiel microbien.

Dix ans après cette étude, nous avons souhaité évaluer de nouveau l'évolution de l'activité et de l'abondance de la communauté microbienne minéralisant l'atrazine dans les différents traitements appliqués sur le dispositif de la Bouzule. Il s'agit ici aussi d'évaluer la résilience des traitements atrazine appliqués pendant de nombreuses années sur les parcelles de la Bouzule.

Par ailleurs, de très nombreuses activités enzymatiques microbiennes peuvent être mesurées dans le sol: hydroxylases, oxydo-réductases, transférases, lyases (Dick et Tabatabai, 1992). Les enzymes correspondantes sont des enzymes extracellulaires, d'origines végétales ou microbiennes, libres ou adsorbées sur des colloïdes du sol, ou bien encore des enzymes intracellulaires des micro-organismes (Chaussod, 1996). Leurs activités correspondent fréquemment à des transformations d'intérêt agronomique. La connaissance de ces activités peut également permettre d'estimer l'effet de la présence de xénobiotiques sur la dynamique microbienne et dans certains cas d'évaluer la capacité du sol à dégrader ou transformer la pollution.

Parmi les mesures d'activités, le choix s'est porté sur la mesure de l'hydrolyse de la fluorescéine di-acétate ou FDA (Schnürer et Rosswall, 1982) qui présente l'avantage de concerner plusieurs groupes d'enzymes différentes (lipases, protéases, estérases). La mesure de l'activité enzymatique d'un sol par l'hydrolyse de la FDA a pour objectif de donner une vision globale de l'activité enzymatique qui y prend place. En aucun cas, cette mesure ne doit être reliée directement à une quantité de biomasse. En effet, la même activité enzymatique globale peut résulter de plusieurs combinaisons différentes (ex : biomasse importante mais activité faible ou biomasse faible mais activité importante).

1.4.3 Microarthropodes

D'un point de vue purement taxonomique, **les microarthropodes du sol** ne constituent pas un taxon *sensus stricto*. Ils font partie de l'Embranchement des Arthropodes (Invertébrés Métazoaires caractérisés par un corps segmenté pourvu d'un exosquelette à carapace dure et à pattes articulées) qui représente plus de 80% des espèces animales recensées sur Terre. Ils ont en commun une taille minuscule à l'état adulte (en général moins d'un cm de longueur totale). Ils sont avant tout représentés par les Acariens et les Collembolés, qui sont les groupes de microarthropodes en général les plus importants dans le sol, avec des abondances et des richesses spécifiques écrasantes (Lavelle and Spain, 2001). Les microarthropodes comprennent aussi des larves et des imagos d'Insectes ptérygotes, des Protoures, des Diploures, des Thysanoures, des Pauropodes. Ils effectuent tout leur cycle de développement dans la litière et les premiers centimètres du sol. Ils sont les animaux non aquatiques les plus abondants dans la plupart des écosystèmes (Joosse, 1981; Bardgett and Cook, 1998). Ce groupe « microarthropodes du sol » est donc taxonomiquement très large et il convient de noter que la plupart des études scientifiques menées ces dernières années concernent uniquement les Acariens et les Collembolés.

Les Acariens font officiellement partie du sous Embranchement des Chélicérates, Classe des Arachnides. Les Acariens comptent deux sous ordres : les Actinotrichida (Acariformes ou « vrai » acariens) possédant une substance biréfringente dans leurs poils appelée actinopiline et les Anactinotrichida (Parasitiformes et Opilioacariformes) dont les poils sont dépourvus d'actinopiline (Krantz, 1978). Les Actinotrichida (Magowski, 2004) comprennent trois Ordres: Astigmata (Acaridida), Prostigmata (Actinedida), et Oribatida. Les Anactinotrichida (Lundqvist, 2004) sont représentés par les Ordres suivants : Ixodida, Mesostigmata (Gamasida), Notostigmata. Dans les études écologiques, seuls quatre Ordres sont rencontrés et comptabilisés dans le sol : Prostigmata, Astigmata, Oribatida et Mesostigmata. Notons qu'il est maintenant communément considéré que les Astigmata dérivent des Oribatida (OConnor, 1984; Norton *et al.*, 1993; Sakata and Norton, 2001). D'un point de vue

phylogénétique, certains scientifiques estiment que les Acariens sont monophylétiques (Actinotrichida et Anactinotrichida seraient deux groupes sœurs) (Lindquist, 1984), d'autres qu'ils seraient diphyllétiques (Actinotrichida et Anactinotrichida proviendraient de deux lignées différentes) (Shultz, 1990). Environ 45000 espèces d'Acariens ont été décrites. D'un point de vue morphologique, ils sont relativement peu homogènes et seraient plutôt caractérisés par ce qu'ils ne sont pas (autres Arachnides) que par une série de caractères propres. On peut toutefois noter généralement la présence de chélicères, une larve hexapode, un discret gnathosoma et un défaut de segmentation primaire (Walter *et al.*, 1996). La reproduction des Acariens est généralement sexuelle mais la reproduction parthénogénétique existe aussi. Les Acariens non parasites, après le stade de l'œuf, connaissent 6 stades de développement émergeant après une mue : la prélarve, la larve hexapode, la protonympe, la deutonympe, la tritonympe et l'adulte.

Les Collemboles sont reconnus comme faisant partie du sous Embranchement des Hexapodes, Classe des Entognathes. Ils se différencient ainsi de la Classe des Insectes (Deharveng, 2004a). D'un point de vue phylogénique, les Collemboles dériveraient des Crustacés. Toutefois, ce positionnement phylogénique reste flou. En effet, certains travaux récents ont démontré que les critères d'hexapodie sont clairement reliés aux Crustacés mais peuvent être considérés comme le résultat d'évènements indépendants apparus lors de la conquête des milieux terrestres à partir de différentes lignées de Crustacés (Carapelli *et al.*, 2007). A ce jour, environ 6700 espèces ont été décrites (Deharveng, 2004b). Toutefois, suite au progrès des techniques moléculaires, de nombreuses espèces cryptiques sont suspectées (Porco *et al.*, 2012a, 2012b) ; ce nombre est donc susceptible d'évoluer grandement au cours des prochaines années. D'un point de vue morphologique, les Collemboles possèdent des pièces buccales entognathes enfermées dans une capsule céphalique et sont caractérisés par la présence d'un appareil permettant le saut, composé de la furca retenue sous l'abdomen par le rétinacle (Coineau *et al.*, 1997) et par la présence d'un tube ventral permettant, entre autre, l'absorption de liquides, ions et gaz. Ce tube ventral est d'ailleurs à l'origine du mot Collembole (Kolla (grec) = glue ; embolon (grec) = ce qui s'insère dans quelque chose) (Lubbock, 1873). Par ailleurs, les Collemboles ne possèdent pas d'ailes, et sont donc souvent dits « aptérygotes ». La longueur de leur corps varie entre quelques dixièmes de mm à 2 cm. Classiquement, deux grandes catégories morphologiques peuvent être reconnues chez les Collemboles : (i) les Symphypléones au corps subglobuleux, dont les 4 segments thoraciques sont fusionnés avec les 4 premiers segments abdominaux, les deux derniers formant une sorte de croupion ; (ii) les Arthropléones au corps allongé, dont les segments thoraciques et abdominaux sont nettement séparés. Salmon (1964) distinguait parmi ces deux groupes morphologiques 4 Ordres : Arthropleona, Neoarthropleona, Metaxyleona et Symphyleona. Deharveng (2004a), basé sur de nombreux travaux récents croisant critères morphologiques et moléculaires, propose une classification révisée à partir de la Classe des Collemboles, incluant 4 sous Ordres : Poduromorpha, Entomobryomorpha, Symphyleona, Neelipleona. La croissance des Collemboles est continue tout au long de leur vie et se fait par mues successives, entre 4 et 50 selon l'espèce. Ils vivent en général moins d'un an et leur reproduction est parthénogénétique ou sexuelle.

Les microarthropodes du sol sont plus particulièrement liés aux fonctions de soutien, notamment à travers l'amélioration de la fertilité des sols. Parmi les organismes décomposeurs, les microarthropodes du sol ont une action sur le cycle des nutriments, généralement considérée comme indirecte ou catalytique, à travers leur consommation de micro-organismes (Hopkin, 2002). Toutefois, la consommation n'est sûrement pas le seul facteur à prendre en compte. D'autres interactions avec les micro-organismes doivent sans doute être prises en considération. Par exemple, il a été montré que les Collemboles peuvent activer la diffusion des propagules microbiens fixateurs d'azote dans les sols et donc modifier l'assimilation de l'azote (Klironomos and Moutoglou, 1999). La mésofaune pourrait même servir de source d'azote directe pour les plantes à travers la prédation par certains mycorrhizes (Klironomos and Hart, 2001). En outre, toujours concernant les relations Collemboles-micro-organismes, il a été suggéré que le tube digestif des collemboles pourrait être un lieu privilégié pour les transferts de gènes bactériens (Tebbe *et al.*, 2006).

Concernant les effets de boues et sous-produits issus de station d'épuration sur les microarthropodes, aucun réel effet négatif n'est signalé sur l'abondance des microarthropodes. Au pire les populations restent stables (Mitchell *et al.*, 1978; Bruce *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 1999), au mieux elles augmentent leur abondance par rapport à un témoin minéral (Cole *et al.*, 2001; Pernin *et al.*, 2006). Les effets sur l'abondance peuvent toutefois apparaître plus faibles que dans le cas d'un épandage d'autres types d'engrais organiques, comme du fumier (Petersen *et al.*, 2003). Par ailleurs, il est généralement signalé une modification de la structure des communautés, certaines espèces se développant au profit d'autres (Bruce *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 1999; Cole *et al.*, 2001; Pernin *et al.*, 2006). Les boues vermicompostées semblent également favorables aux microarthropodes en augmentant le nombre de

groupes trophiques (Gunadi *et al.*, 2002). Enfin, un enrichissement des boues en métaux modifie également les équilibres entre espèces, certaines tolérant mieux les métaux que d'autres (Bruce *et al.*, 1999).

La présente étude s'attache à caractériser les communautés de collemboles (déterminés au niveau spécifique) et les abondances des principaux ordres d'acariens du sol.

1.4.4 Macrofaune

La macrofaune correspond à la faune de plus de 2 mm de diamètre (Bardgett and Cook, 1998). Certains groupes (vers, termites, myriapodes, diptères ou coléoptères) exercent un rôle essentiel de par leurs abondances et leurs activités dans le sol (Lavelle and Spain, 2001). Par exemple, la présence de vers « ingénieurs du sol » augmente la bioturbation, favorisant le transfert des éléments nutritifs ou chimiques au sein du sol, et permettant d'accroître la porosité du sol. L'absence de ces ingénieurs peut aboutir à une trop grande compaction des sols, très défavorable pour les sols cultivés (Jongmans *et al.*, 2003). Les isopodes, diplopodes et vers de terre épigés jouent un rôle essentiel dans la dynamique de la matière organique morte des sols (Barrios, 2007). A travers un réseau trophique complexe (Hunt *et al.*, 1987), ils ont une action directe sur la décomposition d'une part, notamment par la fragmentation, et d'autre part, une action indirecte en augmentant la biodisponibilité pour les microorganismes et la digestion enzymatique (Barrios, 2007). La distribution des macro-invertébrés du sol répond à plusieurs facteurs : biotiques, comme le comportement social, la capacité de dispersion, la compétition inter- et intra-spécifique, les relations proies-prédateurs ou encore la ressource trophique ; abiotiques, comme le pH du sol, son humidité, sa texture ou l'épaisseur et l'hétérogénéité verticale des horizons (Aubert *et al.*, 2005).

Peu d'études existent sur l'impact des pratiques d'épandage sur la macrofaune du sol. En revanche il existe diverses références concernant l'impact de polluants tels que les métaux, également contenus dans les boues destinées à l'épandage, sur différents groupes de la macrofaune du sol. Notamment des études menées sur les Isopodes *Porcelio scaber* (Latreille, 1804) en milieu pollué par des métaux, montrant une relation négative entre les concentrations en métaux, surtout le Zinc, que l'on retrouve en élément trace dans les boues de STEP, et la survie de cette espèce (Drobne and Hopkin, 1994; Jones and Hopkin, 1998). D'autres groupes ont été étudiés, notamment les vers de terre. Il a été montré une sensibilité au teneur dans le sol en Zinc, qui varie selon les espèces (Spurgeon and Hopkin, 1996). D'un point de vue plus fonctionnel Grelle *et al.* (2000) a montré que l'accumulation de métaux par les plantes sur des sites pollués, confère à la litière de forte concentration en métaux, ceci se répercute plus particulièrement sur les communautés saprophages et phytophages.

La présente étude s'attache à caractériser, d'une part les communautés lombriciennes du sol en couplant une méthode d'extraction éthologique et physique (Bouché et Gardner, 1984 ; Cluzeau *et al.*, 1999), d'autre part la macrofaune totale édaphique contenue dans des monolithes de sols prélevés in situ.

1.4.5 Décomposition de la matière organique

L'impact des polluants ou perturbations anthropiques sur les microarthropodes du sol (essentiellement les collemboles et acariens) et la macrofaune lombricienne a montré que ces organismes sont des indicateurs particulièrement pertinents de la qualité des sols (Hopkin, 1997; Cortet *et al.*, 1999). Deux points méritent d'être soulignés : (1) la plupart des études ont été développées en laboratoire laissant subsister un manque d'informations sur le terrain, particulièrement concernant la variabilité des réponses obtenues ; (2) les effets ont souvent été mesurés sur les individus ou populations, voire sur les communautés, mais très rarement sur les fonctions exercées par ces organismes au niveau des sols, comme le recyclage de la matière organique. Or, c'est non seulement la biodiversité des sols qu'il est utile de préserver, mais surtout leur fonctionnement. Afin de mesurer conjointement les effets sur la structure des communautés de microarthropodes et de lombriciens et le fonctionnement des sols, certaines méthodes ont déjà été utilisées avec succès. Ainsi, la méthode des sacs de litière (litter-bags) a permis de démontrer l'impact négatif de pesticides en milieux agricoles (Cortet and Poinot-Balaguer, 2000; Cortet *et al.*, 2002), mais également les effets de boues d'épandages de station d'épuration en milieu agro-sylvopastoral (Pernin *et al.*, 2006). Cette méthode est d'ailleurs actuellement en voie de normalisation pour évaluer l'impact des produits phytosanitaires (Römbke *et al.*, 2003).

L'objectif du projet vise ici **à évaluer les effets à long terme des épandages sur les dynamiques de décomposition des matières organiques à travers la méthode des sacs de litière, mais également les activités de bioturbations observées au niveau des matériaux mis à**

décomposer.

1.4.6 Biostructures du sol

La structure des sols représente l'arrangement spatial au sein d'un volume de sol des constituants organiques et minéraux, ménageant entre eux la porosité du sol. La structure est une propriété véritablement intégrative de la fertilité du sol (Gobat *et al.*, 1998) car en dépendent l'accessibilité de l'air, de l'eau, des éléments minéraux et organiques pour l'ensemble des organismes vivant dans les sols, conditionnant ainsi la capacité du sol à assurer son rôle de support de végétation. Plus largement, la structure du sol est définie comme l'hétérogénéité spatiale des différents composés ou propriétés du sol (Dexter, 1988). Résultant des interactions entre les facteurs chimiques, physiques et biologiques au sein des sols, le suivi de sa dynamique doit alors permettre de contribuer à la compréhension du fonctionnement du sol.

Les pratiques agricoles impactent la structure du sol. Le travail du sol peut avoir un impact positif ou négatif sur la stabilité structurale, dans la mesure où il peut modifier la porosité, la compaction, la teneur et la composition de l'eau, la redistribution et la biodégradation des matières organiques, l'activité de la faune et de la microflore (Angers *et al.*, 1993 ; Carter, 1994). D'une manière générale, *l'apport de matières organiques*, résidus de récolte ou amendements, augmente la porosité du sol (Guisquiani *et al.*, 1981 ; Marinari, 2000), le stockage de l'eau (Epstein, 1976 ; Kumar, 1985), leur résistance mécanique vis-à-vis de la compaction et de l'érosion (Sort and Alcaniz, 1996), le stock et l'accessibilité des éléments fertilisants, en particulier l'azote (Levi-Minzi *et al.*, 1985 ; Albiach *et al.*, 2001), la dynamique microbienne et l'activité de la faune (Perucci, 1990 ; Marinari *et al.*, 2000). Généralement la (macro)-stabilité des sols est augmentée et ce en fonction de la quantité, de la constitution et de la décomposabilité de l'amendement apporté (Debosz *et al.*, 2002 ; Elmholt *et al.*, 2008). Les apports en produits organiques augmentent à plus ou moins long terme la teneur en carbone du sol et la teneur en certains pools de matières organiques aux propriétés agrégeantes, comme les substances humiques, les polysaccharides liés à l'activité biologique ou les lipides (Monnier, 1965 ; Diaz *et al.*, 1994 ; Aggelides et Londra, 2000).

Les facteurs biologiques - racines, faune et microflore du sol - impactent la porosité et jouent un rôle sur la stabilisation des agrégats (Degens, 1997). Les racines et les hyphes fongiques participent à l'association des macro-agrégats, alors que les exsudats d'origine microbienne ou végétale sont impliqués dans la stabilisation des microagrégats (Ladd *et al.*, 1996). La faune en ingérant le sol, ou préférentiellement les matières organiques, en modifie la structure via leurs bioturbations : boulettes fécales, turricules, galeries (Lee and Foster, 1991 ; Decaëns *et al.*, 2001). Les vers de terre sont reconnus comme étant les principaux ingénieurs du sol (Lavelle *et al.*, 2006). A ce titre, ils participent significativement à la formation d'agréats, à la dynamique microbienne au sein du profil de sol et la séquestration/minéralisation des matières organiques, en milieu tropical et tempéré (Bossuyt *et al.*, 2005 ; Jouquet *et al.*, 2009).

De nombreux travaux soulignent les étroites interactions entre la dynamique des matières organiques et celle des agrégats, en particulier à l'échelle sub-centimétrique (Balesdent *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2003). **La structure du sol est donc étudiée ici afin de préciser l'impact de l'apport de produits résiduels organiques (PRO) sur le biofonctionnement du sol, en suivant l'évolution des matières organiques au sein du sol, en particulier au sein des microstructures organo-minérales d'origine biologique (Watteau *et al.*, 2006; 2012).** Pour ce faire, une caractérisation morphologique et analytique des (bio)structures du sol est réalisée à différentes échelles sur : 1) les PRO épandus, 2) des fractions granulométriques du sol des différentes parcelles du site expérimental, 3) des matières organiques et agrégats prélevés au niveau de sacs à litières déposés sur le site, 4) des turricules prélevés sur les parcelles. L'analyse comparée des résultats est réalisée sur les prélèvements réalisés en 2010 et 2011, soit près de 10 ans après le dernier épandage de PRO, afin de préciser l'arrière effet et la résilience d'un sol cultivé soumis à l'épandage de divers PRO apportés selon des conditions respectueuses de la réglementation.

1.4.7 Biomasse végétale

Les pratiques agricoles intensives se traduisent souvent par une diminution progressive de la capacité des sols à remplir la **fonction de support de végétation** (Burelle *et al.*, 2005) et par des risques de transferts de polluants (Morel *et al.*, 1998). Entretenir la fertilité d'un sol ou restaurer un sol dégradé nécessite ainsi d'améliorer ses propriétés physiques, chimiques et/ou biologiques afin de favoriser l'implantation et le maintien de la végétation à court, moyen et long terme (Barnhisel and Hower, 1997; Bacholle *et al.*, 2005). L'objectif des cultures agricoles est de produire de la biomasse à vocation alimentaire ou éventuellement la production de biomasse à valeur énergétique. Il s'agit donc de

valoriser au mieux les déchets souvent utilisés comme fertilisants en agriculture, qui sont pour une part importante constitués de matières organiques. Le dispositif expérimental des 40 parcelles de la Bouzule (domaine de l'ENSAIA) permet alors d'acquérir des connaissances sur le fonctionnement in situ de l'agrosystème, en particulier sur **la production de biomasse végétale** après un épandage cumulé de 40 t MS.ha⁻¹ de déchets. Ces sous-produits sont contrastés et représentent les principales sources de matériaux potentiellement valorisables en agriculture. Il s'agit alors de mieux connaître les arrières-effets sur le système sol-plante cultivée des épandages de déchets arrêtés en 2001.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Déchets épandus et système expérimental

Dix traitements (huit déchets et deux témoins) ont été mis en place en 1996 en utilisant un système de 4 blocs et 10 parcelles (10 x 4 m) par bloc, permettant de répéter chaque traitement quatre fois (Schwartz *et al.*, 2006). Les huit déchets sont représentatifs des matériaux disponibles en France pour épandages en zones agricoles (ADEME and Cabinet Arthur Andersen, 1999) :

- boues digérées de stations urbaines liquides (liquid sewage sludge, LSS)
- boues urbaines déshydratées en station (lightly dehydrated sewage sludge, LDSS)
- boues urbaines après déshydratation en station et compostage (lightly dehydrated composted sewage sludge, LDCSS)
- boues urbaines dopées en polluant organiques avant compostage (lightly dehydrated composted sludge with added organic pollutants, LDCSSO)
- boues urbaines dopées en polluants métalliques avant compostage (lightly dehydrated composted sludge with added metals, LDCSSM)
- boues de papeteries de type mélangé (mixed paper sludge, MPS)
- cendres de combustion de charbon (coal ashes, CA)
- déchets ménagers (household waste ashes, HWA).

Les deux témoins n'ont pas reçu de déchets, mais une fertilisation minérale:

- le premier témoin correspond à une fertilisation minimale (CMF)
- le second témoin a reçu une fertilisation plus élevée et optimale pour la croissance des cultures (COF)

Pour les besoins du programme VADEBIO, une parcelle a été ajoutée au sein de chaque bloc, correspondant à une zone de prairie fraîchement retournée en 2008, et n'ayant reçu aucun traitement phytosanitaire (Control without pesticides, CWP).

Au total, 44 parcelles ont donc été échantillonnées (Figure 2)

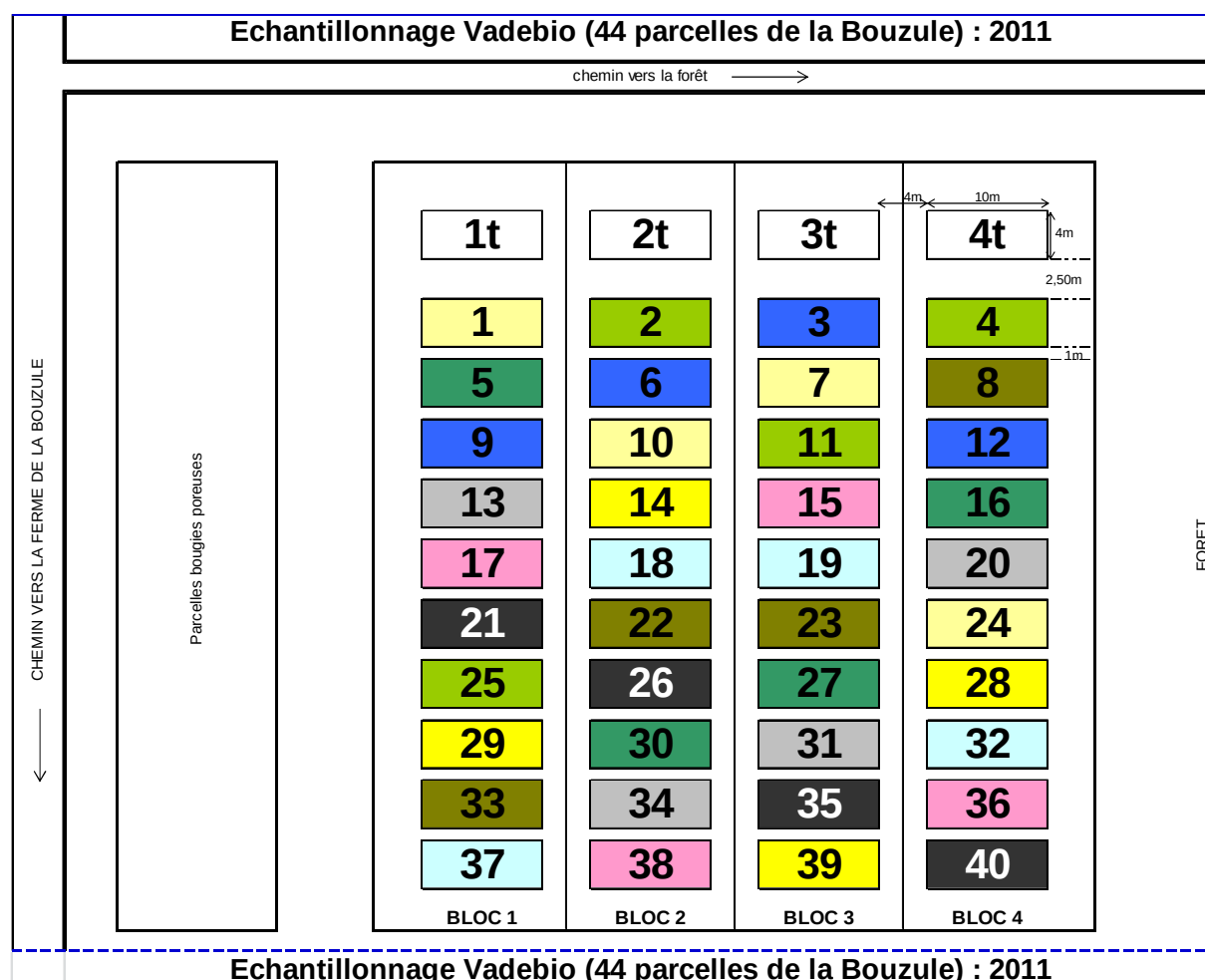
2.2 Caractéristiques des déchets épandus

2.2.1 Caractéristiques physico-chimiques

Les principales caractéristiques physico-chimiques des déchets sont résumées dans le Tableau 2. Tous les types de déchets, excepté LDCSSO étaient en accord avec la réglementation en vigueur concernant leurs propriétés fertilisantes et leurs concentrations en polluants. La moyenne des éléments traces métalliques pour LDCSSM est en accord avec la réglementation, mais les valeurs en Cd étaient plus élevées que la limite légale à deux occasions. Les boues ont été épandues manuellement (quatre applications de 10t ha⁻¹ sur 10 ans de 1996 à 2002, soit 160 kg de matières sèches sur chaque parcelle) (Schwartz *et al.*, 2006). Pour toutes les parcelles (excepté CMF), afin d'éviter des déficiences en nutriments pour les plantes, et mimer une réelle activité agricole, un complément minéral a été apporté au sol, afin de parvenir au niveau des parcelles COF.

2.2.2 Aspect morphologique global

Si les boues urbaines liquides sont de couleur grise, les boues déshydratées sont sous forme d'une pâte noire, mais sans qu'aucune structure ne se distingue à l'œil nu. Dans les boues compostées peuvent être reconnus des éléments du compost, résidus ligneux et morceaux d'écorces. Des morceaux de plastiques se retrouvent au sein des boues de papeteries et du compost d'ordures ménagères.



LEGENDE :

bloc1	bloc2	bloc3	bloc4			
n° parcelle :				modalités (français)	acronyme (anglais)	modalités (anglais)
29	14	39	28	boue de STEP urbaine peu déshydratée	LSS	liquid sewage sludge
1	10	7	24	boue de STEP urbaine déshydratée	LDSS	lightly dehydrated sewage sludge
25	2	11	4	boue de STEP urbaine compostée	LDCSS	lightly dehydrated composted sewage sludge
33	22	23	8	boue de STEP urbaine compostée + polluants organiques	LDCSSO	lightly dehydrated composted sludge with added organic pollutants
5	30	27	16	boue de STEP urbaine compostée + polluants minéraux	LDCSSM	lightly dehydrated composted sludge with added metals
13	34	31	20	boue de papeterie	MPS	mixed paper sludge
21	26	35	40	cendre de combustion	CA	coal ashes
17	38	15	36	compost d'ordures ménagères	HWA	household waste ashes
37	18	19	32	référence basse : fertilisation minérale minimale	CMF	control minimal fertilisation
9	6	3	12	référence haute : fertilisation minérale optimale	COF	control higher and optimal quantitative fertilisation
1t	2t	3t	4t	parcelle témoin sans traitement phytosanitaire (créée en 2008)	CWP	control without pesticides

Figure 2 : plan du parcellaire étudié et traitements appliqués

Tableau 2: Caractéristiques des déchets, éléments en traces métalliques et polluants organiques. Moyenne de quatre valeurs pour chaque paramètre correspondant à chacun des quatre épandages. Les valeurs en gras sont au-dessus des limites légales (Cortet *et al.*, 2011).

	LSS [†]	LDSS	LDCSS	LDCSSO	LDCSSM	MPS	CA	HWA	Threshold values [‡]
Dry matter (DM) %	3.70	23.78	39.23	39.18	38.63	47.70	76.15	80.58	-
Organic matter (OM) %	54.55	49.13	61.60	55.20	60.48	48.25	6.70	40.85	-
Organic carbon (C) %	31.60	27.50	33.28	30.65	32.75	27.35	5.63	22.40	-
Total Nitrogen (N) %	5.95	3.85	1.95	1.65	1.93	0.83	0.06	1.28	-
C/N	5.30	7.18	17.38	23.23	18.93	34.30	107.4	17.80	-
pH _{water}	7.65	7.73	6.25	6.75	6.05	7.53	9.08	8.25	-
CaO ‰	84.75	76.75	50.48	79.30	54.30	126.30	22.63	83.18	-
MgO ‰	7.65	9.48	6.85	11.73	6.95	22.55	32.85	12.83	-
P ₂ O ₅ ‰	72.25	67.33	34.20	26.75	35.20	5.00	2.63	6.25	-
K ₂ O ‰	7.90	7.70	8.15	7.10	8.95	4.10	35.30	12.50	-
Cd mg.kg ⁻¹ DM	1.25	3.28	2.20	3.37	9.89	0.23	0.59	1.81	10
Cu mg.kg ⁻¹ DM	495.75	450.25	232.50	230.75	495.25	167.75	95.50	218.75	1000
Ni mg.kg ⁻¹ DM	42.75	38.75	25.50	31.75	84.00	11.50	125.50	44.00	200
Pb mg.kg ⁻¹ DM	284.00	285.75	160.5	162.75	284.00	25.50	104.75	373.25	800
Zn mg.kg ⁻¹ DM	1271.25	1358.50	682.75	702.00	1455.75	148.25	249.75	1113.25	3000
Benzo(a)Pyrene mg.kg ⁻¹ DM	0.26	0.35	0.77	10.20	0.15	0.05	0.01	0.04	2
Fluoranthene mg.kg ⁻¹ DM	1.78	0.98	2.48	18.63	0.44	0.01	0.01	0.08	5
Benso(b)Fluoranthene mg.kg ⁻¹ DM	0.35	0.35	0.08	0.32	0.18	0.58	0.01	0.16	2.5
7 PCB sum mg.kg ⁻¹ DM	0.16	0.16	0.11	0.07	0.12	0.15	0.01	0.20	0.8

[†] : liquid sewage sludge (LSS), lightly dehydrated sewage sludge (LDSS), lightly dehydrated composted sewage sludge (LDCSS), lightly dehydrated composted sludge added with organic pollutants (LDCSSO), lightly dehydrated composted sludge added with metals (LDCSSM), mixed paper sludge (MPS), coal ashes (CA), household waste ashes (HWA)

[‡] : French Council decision of 8 January 1998, Journal Officiel 31 Janvier 1998 (Voynet *et al.*, 1998)

2.3 Historique des cultures sur le site

Différentes cultures se sont succédé sur le site de la Bouzule depuis sa création. Depuis 2002, le site est cultivé en maïs, excepté en 2008 et 2009, où du blé a été introduit. Les principales interventions concernant la mise en culture, le travail du sol et la fertilisation sont rassemblées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Principales interventions agricoles sur les parcelles du site de la Bouzule (modifié de Cortet et al., 2011)

dates	Waste spreading (W) Tillage (T)	mineral fertilization (N, P, K, units/ha)		Sowing (S), Harvesting (H), Soil sampling (T0 to TXIII)
		CMF ^T	COF	
09.04.1997	W			
24.04.1997		48 (N), 30 (P), 30 (K)	75 (N), 50 (P), 50 (K)	
01.05.1997				S (spring rape)
20.08.1997				H
22.09.1997	W			
18.10.1997				S (wheat)
09.03.1998		50 (N)	50 (N)	
24.04.1998		50 (N)	100 (N)	
06.09.1998	W, T			
08.09.1998				S (winter rape)
05.11.1998		50 (P), 50 (K)	100 (P), 90 (K)	
15.03.1999		30 (N)	45 (N)	
02.04.1999		50 (N)	75 (N)	
23.04.1999		20 (N)	30 (N)	
19.05.1999				H
12.10.1999	T			
15.10.1999				S (wheat)
09.03.2000		50 (N)	50 (N)	
20.04.2000		50 (N)	100 (N)	
18.09.2000	T			
18.10.2000				S (wheat)
27.03.2001		50 (N)	50 (N)	
27.04.2001		50 (N)	100 (N)	
07.07.2001				H
17.10.2001	W			
19.04.2002				
08.05.2002	T			S (maize)
31.05.2002		120 (N)	140 (N)	
24.09.2002				H
26.03.2003	T			
23.04.2003				S (maize)
28.05.2003		120 (N)	140 (N)	
27.09.2003				H
19.03.2004	T			
28.04.2004				S (maize)
14.06.2004		120 (N)	140 (N)	
22.09.2004				H
17.01.2005	T			
12.05.2005				S (maize)
15.06.2005		120 (N)	140 (N)	
28.10.2005				H
24.04.2006	T			
02.05.2006				S (maize)
20.06.2006		120(N)	140(N)	
12.10.2006				H
11.10.2007	T			
26.05.2008				
20.10.2008				S (wheat)
07.04.2009		120(N)	140(N)	
16.07.2009				H
29.10.2009				S(wheat)
20.08.2010				H
26.04.2011	T			
04.05.2011				S(maize)

^T: Control with minimum Fertilization (CMF), Control with Optimal Fertilization (COF)

2.4 Fréquence et coordination de l'échantillonnage des différents indicateurs

Au printemps 2010 (7 avril 2010), les paramètres récoltés sur le terrain ont concerné la physico-chimie des sols, les communautés bactériennes, les activités enzymatiques, les microarthropodes du sol, la macrofaune, ainsi que les associations organo-minérales. L'échantillonnage spécifique aux lombriciens, jugé trop destructif, n'a pas été effectué en 2010.

Au printemps 2011 (6 au 8 avril 2011), les paramètres récoltés sur le terrain ont concerné la physico-chimie des sols, les communautés bactériennes, les activités enzymatique, les lombriciens, ainsi que les associations organo-minérales. Etant donné les résultats acquis en 2010 concernant la macrofaune et les microarthropodes, il n'a pas été jugé utile de renouveler l'opération en 2011 pour ce paramètre.

L'étude de la décomposition de la matière organique (à partir de sacs de litière avec extraction des microarthropodes) a été entreprise à partir du printemps 2010 et s'est poursuivie jusqu'au printemps 2011.

L'étude des rendements (croissance de la végétation) a été effectuée sur le maïs mis en place au printemps 2011.

Les paramètres microbiologiques (communautés bactériennes et activités enzymatiques), physico-chimiques (fertilité physique et chimique, contaminants, fractionnement granulométrique) ont été étudiés à partir d'échantillons de sol prélevés en commun. Ainsi, sur chacune des 44 parcelles, trois points de prélèvement ont été réalisés à la tarière (15 cm de profondeur) sur une diagonale. Les trois prélèvements – correspondant à environ 2,5 - 3 kg de sols – ont été placés dans un sac après émiettement à la main et homogénéisation. 500 g ont été utilisés pour les analyses physico-chimiques (paramètres agronomiques et granulodensimétrie), 1 kg pour les analyses en contaminants et activités enzymatiques, le restant (au moins 500 g) étant dévolu aux analyses des communautés bactériennes.

2.5 Physico-chimie des sols

2.5.1 Paramètres agronomiques

Les 44 échantillons moyens ont été mis à sécher à l'air au laboratoire, puis tamisés à 2 mm. Une aliquote a été séchée et envoyée au Laboratoire d'Analyse des Sols d'ARRAS en vue des analyses physico-chimiques. Une autre aliquote a été mise en pédothèque. Le reste a été réservé au fractionnement granulo-densimétrique.

Les analyses effectuées par le LAS sur les prélèvements de sols de 2010 et 2011 sont:

- granulométrie 5 fractions (NF X 31-107)
- C organique et Azote organique total (NF ISO 10694 et 13878)
- pH eau (NF ISO 10390)
- Calcaire total (NF ISO 10693)
- Phosphore Olsen (NF ISO 11263)
- Capacité d'échange cationique (NF X 31 130)
- Ca, Mg, Na, K, Fe, Mn, Al échangeables à la cobaltihexamine (NF ISO 23470)

2.5.2 Eléments traces métalliques et polluants organiques

Les teneurs totales en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et Polychlorobiphényles (PCB), ainsi que de cinq éléments traces métalliques (Cd, Cu, Ni, Pb et Zn) ont été analysées dans les sols prélevés. Le choix s'est porté sur les polluants déjà suivis lors de programme VADETOX (Tableau 4).

Le dosage des éléments métalliques a été réalisé par ICP-AES (NF EN ISO 11885) après minéralisation à l'eau régale (NF EN 13346, partie C).

Les éléments organiques ont été analysés suivant la norme XP X33-012 (2000) soit par chromatographie en phase liquide pour les HAPs soit par chromatographie en phase gazeuse avec détection à absorption électronique pour les PCBs.

Les polluants du sol interagissent avec les constituants minéraux (complexation ou absorption) et la matière organique (absorption) les rendant plus ou moins disponibles à l'analyse. Afin de quantifier les fractions biodisponibles des polluants, des extractions ont été conduites. Le protocole utilisé a été sélectionné lors d'un précédent programme de recherche ADEME (Impact à long terme de l'épandage de déchets en agrosystème, convention n° 99 75 023, 2000-2004). L'extractant utilisé est une solution de chlorure de calcium à 0,1 mol/L dans un rapport 1/10 (m/v) (Lévy, 2001). Les échantillons sont mis sous agitation pendant 2 heures puis filtrés à 0,2 µm pour les métaux et 0,45 µm pour les organiques avant analyse.

Tableau 4 : polluants organiques et éléments traces métalliques analysés lors du programme VADEBIO

Hydrocarbures aromatiques polycycliques	Polychlorobiphényles	Eléments traces métalliques
Benzo(b)fluoranthène	PCB 28	Cadmium
Benzo(k)fluoranthène	PCB 52	Cuivre
Benzo(g,h,i)pérylène	PCB 101	Nickel
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	PCB 118	Plomb
Fluoranthène	PCB 138	Zinc
Benzo(a)pyrène	PCB 153	
Acénaphthène	PCB 180	
Acénaphthylène		
Anthracène		
Benzo(a)anthracène		
Chrysène		
Dibenzo(a,h)anthracène		
Fluorène		
Naphtalène		
Phénanthrène		
Pyrène		

2.6 Communautés bactériennes

2.6.1 Extraction de l'ADN

Après tamisage avec un tamis à mailles de diamètre de 2 mm, ces échantillons composites de sol ont été conservés à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

Les échantillons ont été extraits par l'équipe EMFI de l'UMR Agroécologie 1347 (INRA Dijon, France), suivant la méthode ISO 11063 dérivée de Martin-Laurent *et al.* (2001). En bref, pour chaque échantillon, 250 mg (poids sec) de sol ont été mélangés avec 1 ml d'un tampon d'extraction contenant 0,1 M Tris (pH 8,0), 1 M EDTA (pH 8,0), 0,1 M de NaCl, 1% de polyvinylpyrrolidone et 2 % de sodium dodécyl-sulfate. Quelques billes - 106 µm et 2 mm de diamètre respectivement - ont été ajoutées dans chaque échantillon et les tubes ont été agités pendant 30 secondes à 1600 tr/min dans un Mikro-Dismembrator (SB Braun Biotech International). Ensuite, les échantillons ont été mis au bain-marie à 70°C pendant 15 minutes, avant leur centrifugation (14000g, 1 min., 4°C). La précipitation des protéines a été réalisée en ajoutant aux surnageants 1/10^{ème} du volume total d'une solution à 3 M d'acétate de sodium, puis en incubant les échantillons dans de la glace pendant 10 minutes. Après cette étape, les échantillons ont été centrifugés (14000g, 5 min., 4°C). Dans la dernière étape, les acides nucléiques ont été précipités à partir des surnageants recueillis par addition de 600 µl d'une solution froide d'isopropanol pur (VWR International SAS). Les culots d'ADN obtenus après centrifugation (14000g, 30 min., 4°C) ont été lavés avec une solution d'éthanol à 70% (VWR International SAS). Après les avoir séché à l'étuve à 37°C pendant 15 minutes, nous avons ajouté 100 µl de tampon TE (Tris-EDTA, pH 8,0) dans chaque tube. La procédure est décrite en détail dans la norme ISO-11063 (2010), qui est une version modifiée de la méthode décrite ci-dessus.

2.6.2 Purification de l'ADN extrait du sol

Tous les échantillons d'ADN extrait du sol ont été purifiés selon une méthode développée en interne qui utilise deux types de colonnes de séparation (Micro-Spin chromatography column de Bio-Rad): l'un en polyvinyl-polyrrolidone (Sigma-Aldrich) et l'autre fait de Sépharose 4B (Sigma- Aldrich). Les colonnes de PVPP ont été préparées en pesant environ 95 mg de poudre de PVPP et en y ajoutant 400 µl d'eau pure par colonne. Ces colonnes de PVPP ont ensuite été centrifugées à 1000g pendant 2 minutes. En ce qui concerne la préparation des colonnes de Sépharose 4B, nous avons versé 1 ml de Sepharose 4B par colonne, suivie par une centrifugation à 1000 g pendant 2 minutes et enfin nous les avons rincées en ajoutant 400 µl de tampon TE (Tris-EDTA, pH 8,0), étape suivie d'une centrifugation à 1000 g pendant 2 minutes. Les extraits d'ADN ont été purifiés à l'aide primo des colonnes de PVPP (1000 g, 4 min., 10°C), secundo des colonnes de Sépharose 4B (1500 g, 4 min., 10°C). Les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à quantification.

2.6.3 Quantification de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

La quantité d'ADN obtenue après purification a été estimée par quantification sur un gel d'agarose 1% (QBiogen), par comparaison avec l'ADN de thymus de veau (Biorad), ce dernier dilué à cinq concentrations différentes (respectivement 1,25, 2,5, 5, 10 et 20 ng/μl). La migration s'est déroulée dans une cuve d'électrophorèse horizontale Horizon® 11-14 (Gibco-BRL) contenant un certain volume de TBE 1X (Tris/Borate/EDTA) préparé à partir de tampon TBE 10X (Sigma-Aldrich). Après coloration au bromure d'éthidium (Invitrogen), le gel a été photographié grâce au système Infinity 3000 (Vilber-Lourmat). Puis, le gel a été analysé en utilisant le logiciel ImageQuant TL v.7.0 de GE Healthcare, qui permet d'établir une droite-étalon à partir de laquelle est calculée la concentration des échantillons. Tous les échantillons furent finalement dilués à la même concentration de 1ng/μl.

2.6.4 Test d'inhibition

Avant la PCR quantitative (qPCR), nous avons testé la présence d'inhibiteurs de PCR dans les extraits d'ADN du sol (ex. : acides humiques). Afin de mettre en pratique un tel test, nous avons ajouté de l'ADN plasmidique pGEM-T Easy (Promega) en concentration connue ($0,5 \cdot 10^6$ copies/μl) avec soit 2 μl d'eau, jouant ainsi le rôle de contrôles (une demi-douzaine), soit 2 μl de nos échantillons d'ADN du sol. En utilisant le thermocycleur ABI 7900 HT d'Applied Biosystems et les amorces universelles SP6/T7 (Tableau 5), nous avons ainsi contrôlé la quantité de plasmide dans tous les échantillons et l'avons comparé aux contrôles (Henry *et al.*, 2006). L'absence d'une inhibition détectable dans nos échantillons a été mise en évidence, ce qui nous a donc permis de continuer notre analyse de l'abondance.

Tableau 5 : Caractéristiques des différents couples d'amorces utilisés en test d'inhibition et en PCR quantitative

Cible	amorce "forward" 5' -> 3'	amorce "reverse" 5' -> 3'	Tm (°C)	Référence
pGEMT	SP6 GGTGACTATTTAACTATAG	T7 AATACGACTCACTATAG	60	Promega
16S	341F GGACCTACGGGCAGCAG	515R ATTAACCGCGGCTGCTGGCA	60	Lopez-Gutierrez <i>et al.</i> , 2004
atzA	A1F ACGGGCGTCAATTCTATGAC	A1R CACCCACCTCACCATAGACC	60	Devers <i>et al.</i> , 2004
trzD	trzd1QF GTTGCCACCGAAGATACCTA	trzd1QR GCTGTTGCCCATGACGATGA	56	Devers <i>et al.</i> , 2004
trzN	C190:10 CACCAGCACTGTACGAAGG	C190:11 GATTCGAACCATCCAAACG	56	Mulbry <i>et al.</i> , 2002
pcaH	pcaHf GAGRTSTGGCARGCSAAY	pcaHr CCGYSSAGCAGCATGTC	60	El Azhari <i>et al.</i> , 2007
amoAA	A23F ATGGTCTGGCTWAGACG	A616R GCCATCCATCTGTATGTCCA	55	Tourna <i>et al.</i> , 2008
amoAB	amoA1F GGGGTTTCTACTGGTGGT	amoA2R CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	55	Leininger <i>et al.</i> , 2006

2.6.5 PCR quantitative et abondance bactérienne

Par conséquent, la taille de la communauté bactérienne totale a été estimée par qPCR en utilisant le couple d'amorces universelles 341F/515R correspondant au gène de l'ADNr 16S (Tableau 5).

Au-delà de cette analyse, nous avons également quantifié l'abondance de différents groupes bactériens : dégradant l'atrazine (atz, trz), du cycle de dégradation des β-cétoadipates (pcaH), des communautés nitrifiantes bactérienne (amoAB) et des Crenarchae (amoAA).

Concernant les communautés dégradant l'atrazine, nous avons testé différents gènes comme marqueurs moléculaires spécifiques, atzA, trzD et trzN, qui codent pour des enzymes impliquées dans la voie de dégradation de l'herbicide, en utilisant respectivement les couples d'amorces suivants : A1F/A1R, trzd1QF/trzd1QR et C190:10/C190:11 (Tableau 5).

Concernant les communautés impliquées dans le cycle de dégradation des β-cétoadipates, nous avons pris en compte le gène pcaH, gène codant pour la protochatéchuete-3,4-désoxygénase, une enzyme qui intervient dans la dégradation des composés aromatiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques et certains pesticides. Le couple d'amorces qui correspond à ce gène est pcaHf/pcaHr (Tableau 5).

Enfin, concernant les communautés nitrifiantes, nous avons retenu deux gènes codant l'ammonium monooxygénase, une enzyme impliquée dans les processus de nitrification : amoAB représentant la communauté globale et amoAA, spécifique aux Crenarchae. Les couples d'amorces associés sont respectivement amoA1F/amoA2R et A23F/A616R (Tableau 5).

Les analyses qPCR ont été effectuées dans le thermocycleur ABI 7900 HT (Applied Biosystems), dans un volume total de réaction de 20 μl contenant 10 μl de Absolute™ QPCR SYBR® Green mix Rox (ABgene), 0,5 μg de T4 gp 32 (QBiogene) et 0,5 μM de chaque amorce citée ci-dessus. Trois contrôles négatifs ou non-template controls (NTC), consistant en de l'eau pure à la place de l'ADN, ont

également été inclus dans chaque plaque. Les courbes d'étalonnage pour tous les essais ont été obtenues en utilisant une série de standards de concentrations connues (0,5.10² à 0,5.10⁷ copies/μl) du plasmide linéarisé pGEM-T contenant les gènes correspondants.

2.6.6 A-RISA et structure bactérienne

L'A-RISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) est une méthode de fingerprinting qui a été utilisée ici pour étudier la structure génétique de l'ensemble de la communauté bactérienne dans les échantillons de sol. L'espaceur intergénique 16S-23S de l'ADNr bactérien a été amplifié dans un volume final de 25 μl contenant 0,4 μM des amorces universelles 1552F* 5'-TCG GGC TGG ATC ACC TCC TT-3' et 132R 5'-GCC GGT TTC CCC ATT CGG-3', 3,75 unités de Taq DNA polymérase (MP Biomedicals) et 5 ng d'ADN matrice. L'amorce 1552F* est marquée à son extrémité 5' avec le fluorochrome IRDye 800 (MWG Biotech SA).

L'amplification PCR a été réalisée dans un thermocycleur PTC-200 (MJ Research) pendant 3 min. à 94°C, puis 30 cycles de 1 min. à 94°C, 1 min. à 55°C et 2 min. à 72°C et une étape supplémentaire finale de 7 min. à 72°C. La quantité de produits de PCR a été évaluée après électrophorèse sur un gel d'agarose à 2%, comparativement à 5 μl de Smart Ladder (Eurogentec), par l'utilisation du logiciel ImageQuant TL v.7.0 de GE Healthcare. Cette étape nous a permis de les diluer à la même concentration (environ 12,5%). Ils ont ensuite été dénaturés à 92°C pendant 2 min., en présence de colorant de chargement Stop IR² (Li-Cor Biosciences) à raison d'1 μl par échantillon, avant d'être chargés sur un gel d'acrylamide à 3,7% (Li-Cor Biosciences). La migration s'effectue dans un séquenceur Li-Cor 4300 DNA Analysis System (Biosciences) pendant 15 h à 2500 V/80 W. La taille des bandes, exprimées en paires de bases, a été appréciée à l'aide d'un marqueur de taille d'ADN standard, constituée de 15 bandes allant de 207 à 1149 pb.

2.6.7 Radiorespirométrie et minéralisation de l'atrazine

Cette expérience a été menée uniquement sur les échantillons de 2010. Elle a pour objectif d'évaluer la capacité de la microflore du sol à minéraliser l'atrazine. L'objectif est ainsi de quantifier l'impact à long terme de l'apport des boues dopées ou non sur cette capacité dégradante.

Les sols n'étant plus traités avec cet herbicide sur le terrain, nous avons traité les 44 échantillons à équivalence de 10 g de sol sec en leur ajoutant 500 μl d'atrazine froide à concentration de 30 mg/l (soit 1,5 mg/kg). Les sols ainsi traités sont ensuite incubés à 20°C pendant 20 jours environ, correspondant à l'optimum de dégradation.

Nous avons alors réalisé l'extraction de 250 mg de sol pour chaque échantillon, comme précédemment.

Parallèlement, une fraction de ces échantillons a été traitée avec de l'atrazine marquée au carbone 14 afin de mesurer, par radiorespirométrie, la capacité de la microflore à effectuer la minéralisation de l'herbicide, pour chaque traitement considéré.

2.6.8 Statistiques

Plusieurs analyses statistiques (test ANOVA, test de Kruskal-Wallis, $\alpha=0,05$) ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT© 2009 (Addinsoft) pour rechercher une éventuelle différence significative entre traitements du nombre de copies de chaque gène considéré par gramme de sol sec, nombre ayant été mesuré par PCR quantitative.

Les résultats en A-RISA ont été obtenus en effectuant une conversion des images de gels en un tableau contenant plusieurs paramètres (nombre de bandes, poids moléculaire, intensité relative) grâce au logiciel One-DSCAN v.2.05 de Scanalytics, Inc. Le tableau a été converti en une matrice de distance à l'aide du programme PrepRISA (Thioulouse et al., 1997). Enfin, cette matrice nous a permis d'effectuer une série d'analyses en composantes principales (ACP) en utilisant le programme ADE-4 présenté dans Thioulouse et al. (1997).

2.7 Activités enzymatiques

Après prélèvements, un tamisage direct à 2 mm a été réalisé sur les 44 échantillons de sol. Pour chacun d'eux, la démarche suivante a été adoptée :

- Peser 3 x 2 g de sol frais et les répartir dans 3 tubes d'essais
- Ajouter 15 mL de tampon phosphate à pH 7,6
- Suspendre les échantillons au vortex
- Ajouter 200 μL d'une solution stock de FDA à 1mg/mL à 2 des 3 tubes d'essai

- Placer les tubes à l'étuve (30°C) sur une table d'agitation (200 rpm) pendant 20 min (à l'obscurité)
- Bloquer la réaction enzymatique par ajout de 15 mL d'un mélange chloroforme / méthanol et agiter immédiatement par retournement pour dégazer
- Centrifuger à 4°C pendant 10 min à 3500 g
- Prélever la phase aqueuse et filtrer sur papier Whatman n°2
- Mesurer l'absorbance à 490 nm
- Faire la moyenne des 2 réplicats et retrancher la valeur de l'échantillon sans FDA
- Comparer à la gamme étalon réalisée à l'aide de solutions de fluorescéine.
- Rendre le résultat en µg de fluorescéine par gramme de poids sec de sol en corrigeant par le taux de matières sèches.

2.8 Micoarthropodes

2.8.1 Echantillonnage et identification des taxons

Les protocoles de prélèvements pour les microarthropodes du sol suivent la norme ISO (ISO 23611-2., 2004). 3 échantillons par parcelle ont été prélevés en avril 2010, soit un total de 132 échantillons. Les prélèvements ont été effectués grâce à un carottier standard de 5 cm de diamètre et 5 cm de profondeur. Au laboratoire, les microarthropodes ont été extraits par voie sèche grâce à un extracteur de type McFadyen. Les animaux ont ensuite été fixés dans l'alcool. Les comptages ont été effectués sous la loupe binoculaire. 3 groupes d'acariens ont été identifiés : Oribatida, Gamasida et Actinedida. Par ailleurs, l'ensemble des Collembolles a été identifié au niveau spécifique après décoloration, montage des individus sur lame et observation au microscope. De plus, les collembolles ont été regroupés au sein de 3 groupes fonctionnels, épi- hémi- et eu-édaphiques en fonction de critères morphologiques (Gisin, 1943; Renaud, 2003). Enfin, les autres arthropodes présents (Myriapodes, petits insectes, Protoures et Diploures...) ont été regroupés en un seul groupe nommé « autres arthropodes ».

Par ailleurs, les microarthropodes du sol ont été extraits des sacs de litière mis en place sur le site en mai 2010 (voir § 2.11).

2.8.2 Analyse de la diversité

La diversité des collembolles a été appréhendée par sa dimension structurelle en utilisant l'indice de Shannon-Weaver, indice de diversité biologique qui prend en compte le nombre d'espèces présentes dans un échantillon mais aussi l'abondance de chaque espèce et la taille totale de l'effectif (Pielou, 1975), dont la formule est la suivante :

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

H' : indice de biodiversité de Shannon.

i : une espèce du milieu d'étude.

pi : la fréquence relative de l'espèce.

L'indice Evenness de Pielou (1966) (ou d'équitabilité) est calculé à partir de l'indice de Shannon-Weaver :

$$J' = \frac{H'}{H'_{\max}}$$

Il renseigne sur la répartition de l'abondance relative de chaque espèce dans un échantillon, c'est-à-dire sur la structure de l'échantillon en termes de diversité spécifique. Cet indice varie entre 0 et 1, si toutes les espèces d'un échantillon ont la même abondance relative alors J' sera égal à 1.

2.8.3 Statistiques

Les abondances des différents taxons, groupes fonctionnels, ainsi que les indices de diversité obtenus dans les différents traitements ont été comparés grâce à des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis. Par ailleurs, la structure des communautés a été analysée grâce à une Analyse en

Composantes Principales (ACP). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2010).

2.9 Macrofaune totale

La macrofaune édaphique a été prélevée au centre de chaque parcelle. Un monolithe de 25 x 25 x 15 cm a été prélevé et trié manuellement sur place (Figure 3). L'ensemble des 44 prélèvements a été réalisé le 7 avril 2010 et le tri manuel les 7 et 8 avril. Les échantillons ont été conservés dans de l'alcool à 70%. Les individus à corps mous, comme les vers de terre ont été fixés dans du formol à 4% pendant une semaine puis conservés dans de l'alcool à 70% avec les autres organismes. Les invertébrés ont été déterminés à l'ordre ou la famille à l'aide de clés d'identification internes à l'unité PESSAC. Trois groupes ont été déterminés à l'espèce, Oligochaeta, Isopoda et Chilopoda Lithobiomorpha, à l'aide de clés d'identification spécifiques (Bouché, 1972; Brolemann, 1930; Vandel, 1962).



Figure 3 : Tri de la macrofaune du sol sur le site de la Bouzule au printemps 2010

2.9.1 Abondances et biomasses

Les abondances (individus m⁻²) ont été calculées pour les différents groupes taxonomiques identifiés (ordres et familles pour les invertébrés ou espèce pour les Chilopoda Lithobiomorpha, Isopoda et Oligochaeta). Toutefois, l'abondance des Formicidae n'a pas été prise en compte car il s'agit d'un groupe d'insectes sociaux pour lequel la stratégie d'échantillonnage utilisée n'est pas pertinente. L'abondance des vers de terre juvéniles, qui ne peuvent être déterminés à l'espèce, a été ajoutée à celle des adultes pour chaque point, en fonction de la proportion de chaque espèce sur le point. Concernant les juvéniles tanylobiques, ils ont été ajoutés à la seule espèce du genre *Lumbricus* rencontré sur le site, à savoir *Lumbricus castaneus* (Savigny 1826). Les mesures de biomasse (g m⁻²) ont été réalisées sur les vers de terre à l'aide d'une balance AG204 Mettler Toledo.

2.9.2 Diversité taxonomique

La diversité des macro-invertébrés a été calculée comme le nombre total d'unités taxonomiques observées (UTO). Plus spécifiquement, la diversité des vers de terre a été appréhendée par sa dimension structurelle en utilisant les indices de Shannon et Piéluou (voir § 2.8.2).

Tableau 6 : valeurs des traits morphologiques et des préférences écologiques des espèces de lombriciens collectées sur l'essai de la Bouzule. * les valeurs correspondent à des indices d'affinité de chaque espèce pour chaque modalité des traits étudiés (ex : *A. longa* à une affinité de 11% pour la modalité 'oligohumique')

			<i>A. longa</i>	<i>A. chlorotica</i>	<i>A. caliginosa</i>	<i>A. icterica</i>	<i>A. rosea</i>	<i>S. mammalis</i>	<i>L. castaneus</i>
Carbone organique *	oligohumique	C1	<20 g kg ⁻¹	0,11	0,15	0,12	0,09	0,09	0,14
	oligo-mesohumique	C2	20-30 g kg ⁻¹	0,46	0,35	0,45	0,58	0,45	0,40
	meso-euhumique	C3	30-40 g kg ⁻¹	0,28	0,36	0,28	0,25	0,30	0,25
	euhumique	C4	> 40 g kg ⁻¹	0,15	0,13	0,15	0,08	0,16	0,22
Acidité du sol (pH) *	acidiphiles	pH1	< 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	acidotolérants	pH2	4 à 6	0,19	0,25	0,33	0,33	0,27	0,32
	neutrophiles	pH3	6 à 7	0,21	0,16	0,17	0,17	0,21	0,19
	alkalinotolérants	pH4	7 à 8	0,60	0,59	0,50	0,50	0,52	0,50
	alkalinophiles	pH5	> 8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Morphologie	longueur	Lg	maximum (mm)	170	80	80	90	70	41
	biomasse	Bm	maximum (mg)	3800	700	840	1200	280	105
	pigmentation	Pg	0/1	1	0,5	0	0	0	1
	aplatissement caudal	Ac	0/1	1	0	1	0	0	1

2.9.3 Diversité fonctionnelle

La diversité fonctionnelle des lombriciens a été étudiée par une approche basée sur les traits fonctionnels des espèces collectées. Ces traits ont été déduits du livre de Bouché (1972) sur la Faune de France des Lombriciens. Les traits morphologiques ont été obtenus par la lecture de la diagnose de chaque espèce. Les préférences écologiques ont été calculées à partir du croisement des abondances par site et des paramètres mésologiques (teneur en carbone organique et pH) de chaque site. Les préférences pour le carbone organique ont été attribuées à 4 modalités (oligohumique, oligomesohumique, meso-euhumique, euhumique) et les préférences pour l'acidité du sol à 5 modalités (acidiphiles, acidotolérants, neutrophiles, alcalinotolérants et alcalinophiles) (Tableau 6), la somme des affinités pour une espèce pour un trait étant égale à 1.

Afin de comparer la distribution des traits morphologiques et des préférences écologiques entre traitements, la valeur moyenne des traits/préférences a été calculée pour chaque communauté (CWM) et donc pour chaque parcelle. Pour cela, la valeur de chaque trait/préférence a été pondérée par l'abondance relative de chaque espèce, suivant l'équation:

$$CWM = \sum_{i=1}^n p_i \text{ trait}_i$$

avec, p_i la fréquence relative de chaque espèce et trait_i la valeur d'affinité de l'espèce pour le trait.

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée afin de synthétiser l'information et la représenter en deux dimensions. Les données n'étant pas normales et présentant des différences de format, elles ont été normalisées (pourcentages : $\arcsin(\text{racine carrée}(x))$; autres : $\log(x+1)$). Les analyses ont été réalisées à l'aide des bibliothèques 'ade4' et 'FD' du logiciel R (R Development Core Team, 2010).

2.9.4 Statistiques

Pour toutes les analyses univariées, la normalité a été testée avec le test de Shapiro-Wilk et l'homoscedasticité a été testée avec le test de Bartlett, tous deux à un seuil de significativité de 5%. Si ces deux règles n'étaient pas violées, des analyses de variance à un facteur (ANOVA), ont été appliquées afin de tester l'effet des différents épandages sur la structure et la diversité des communautés de la macrofaune du sol. Si l'ANOVA indiquait un effet significatif un test de Tukey HSD a été réalisé pour comparer les moyennes des échantillons. Lorsque les conditions de normalité et d'homoscedasticité n'étaient pas remplies, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été préféré. Les différences significatives entre modalités ont été identifiées par un test de Wilcoxon.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2010).

2.10 Lombriciens

Les lombriciens ont été échantillonnés le 6 avril 2011 en couplant une méthode d'extraction éthologique et physique (Bouché et Gardner, 1984 ; Cluzeau et al., 1999). L'extraction éthologique consiste en un triple épandage d'une solution diluée de formaldéhyde (2 x 2,5‰ puis 4‰) sur une surface de 1m². Cette solution stimule le comportement de fuite des lombriciens en surface par irritation épidermique : les lombriciens peuvent alors être récoltés (Figure 4). La méthode physique consiste en un tri manuel de bloc de sol qui a été extrait sur 1/16ème m² (25x25cm) pour une profondeur de 20cm. Chaque lombricien échantillonné est fixé puis conservé dans une solution formolée à 4%. Les appartenances taxonomiques, les stades de développement et les biomasses pondérales sont caractérisés au laboratoire. Les résultats présentés dans ce chapitre résultent des données issues de l'extraction éthologique et qui sont corrigées par les données issues du tri manuel sur bloc de sol.

Ce protocole a été appliqué de manière systématique sur chaque parcelle élémentaire : soit sur 40m² en 2001 (résultats du programme Vadetox) et sur 44m² en 2011 (la parcelle témoin sans pesticides existant depuis 2008). Lors des échantillonnages, les occupations du sol étaient différentes : blé tendre d'hiver en 2001, inter-culture de maïs en 2011.



Figure 4 : Prélèvement des lombriciens (méthode éthologique)

2.11 Dynamique de décomposition de la matière organique

Afin de comparer les effets des déchets sur l'activité biologique globale des sols, nous avons choisi d'étudier la dynamique de décomposition de la matière organique au cours du temps à l'aide de sacs de litière (Cortet *et al.*, 2002). Par ailleurs, nous avons également choisi d'utiliser deux mailles de taille différente afin d'évaluer la contribution de la macrofaune aux processus de décomposition.

Le 11 mai 2010, sur chaque parcelle, 9 sacs de litières de maille 5 mm et 9 sacs de litière de maille 200 µm, contenant chacun 4 g de paille de blé (chaumes de 5 à 8 cm de long), ont été enfouis (position horizontale) à une profondeur d'environ 5 cm. Trois sacs de chaque maille sur chaque parcelle ont été relevés les 8 novembre 2010, 10 février 2011 et 06 avril 2011, soit 264 sacs à chaque date d'échantillonnage. Les sacs ont ensuite immédiatement été mis en sachet. Un des sacs de chaque maille (soit 88 en tout par date d'échantillonnage) a ensuite été placé sous berlèse pour en extraire les microarthropodes (Figure 5). Le contenu de l'ensemble des sacs a ensuite été mis à sécher à l'étuve à 45°C. Après une séparation sommaire des particules de sol adhérentes, les résidus de paille de blé ont été pesés, broyés, puis analysés au CHN pour en déterminer les teneurs en cendres, en carbone et en azote.



Figure 5 : Mise en place (mai 2010) et récolte d'un sac de litière (photo : novembre 2010), puis extraction des microarthropodes par berlèse

2.12 Stabilité structurale et associations organo-minérales

2.12.1 Origine des échantillons analysés

2.12.1.1 Les PRO épandus

Un échantillonnage des PRO du dernier épandage de 2002 a été congelé et conservé jusqu'à présent. Une aliquote de ces PRO a été prélevée en vue de leur examen en MET. Toutefois il faut noter que la congélation ne permet pas toujours de conserver les structures initiales et qu'au vu des quantités de produits disponibles, un échantillonnage exhaustif n'a pu être réalisé.

2.12.1.2 Les prélèvements de sols

Parallèlement aux échantillons de sol prélevés (voir § 2.5.1) des blocs de sols ont été prélevés au sein de chaque parcelle du bloc 2 à l'aide de boîte de Kubiena, afin de réaliser des lames minces.

2.12.1.3 Les sacs à litière

A la dernière date d'échantillonnage des sacs à litière (6 avril 2011), les résidus de paille contenus dans les sacs ainsi que les structures adhérentes au sac correspondant à une activité de bioturbation,

ont été prélevés sur deux modalités du bloc 1 (témoin fertilisation basse et boues de papeterie, dont les différences en abondances de bactéries étaient les plus élevées au printemps 2010) (Figure 6).



Figure 6 : Prélèvement des structures au niveau des sacs à litière

2.12.1.4 Les turricules

1 à 2 turricules (les plus frais possible) ont été prélevés par modalité lors de la campagne d'échantillonnage en 2011. Disposés à l'état frais dans une boîte de Pétri humidifiée, ils ont été conservés ainsi jusqu'à leur conditionnement en vue d'un examen en microscopie électronique à transmission.

2.12.2 Fractionnement granulométrique

Pour le fractionnement granulométrique, les échantillons ont été regroupés par traitement, soit 11 échantillons. Le protocole du fractionnement est rappelé en annexe 1. Il permet d'une part d'établir la distribution pondérale des fractions granulométriques stables à l'eau et d'autre part de récupérer les fractions en vue d'analyses ultérieures (dosage C, N et analyse en MET). La comparaison entre la distribution pondérale des associations organo-minérales stables à l'eau et celle des minéraux (texture) permet d'évaluer la stabilité structurale du sol.

2.12.3 Réalisation de lames minces

Après séchage et imprégnation dans de la résine, les blocs prélevés ont été découpés afin de réaliser des lames minces de sol de 20 μm d'épaisseur. L'examen de ces lames à l'échelle photonique permet de décrire la macro-agrégation et la macro-porosité.

2.12.4 Caractérisation morphologique et analytique en MET/EDX

Les fractions de sol 0-2 μm et 2-20 μm , les matières organiques et agrégats des sacs à litières, ainsi que des turricules, ont été conditionnés en vue de leur caractérisation morphologique et analytique en microscopie électronique à transmission associée à la micro-analyse EDX (Watteau *et al.*, 2006). Après fixation, déshydratation et inclusion dans la résine, des coupes ultrafines de 80 nm sont réalisées et observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL EX II (80 kV). Les résultats attendus doivent permettre de préciser (i) la nature et l'état de biodégradation des matières organiques, (ii) le potentiel microbien et (iii) les modes d'associations organo-minérales.

2.13 Biomasse végétale

Le protocole d'échantillonnage pour l'évaluation de la croissance de la végétation a été le suivant pour les deux années de prélèvement : avant la coupe du maïs toutes les parcelles ont été photographiées (Figure 7) ; la récolte a débuté par les rangs de maïs latéraux, sur une largeur de 1 mètre, qui ont été écartés afin d'éviter les effets de bords (Figure 8, Figure 9). Les maïs restant dans la partie centrale des parcelles sont ensuite coupés, pesés, broyés, et des prises d'aliquotes sont réalisées sur place. Les échantillons sont ensuite systématiquement pesés, séchés et broyés avant analyse au laboratoire.



Figure 7 : Photographies des deux extrémités de la parcelle n°1

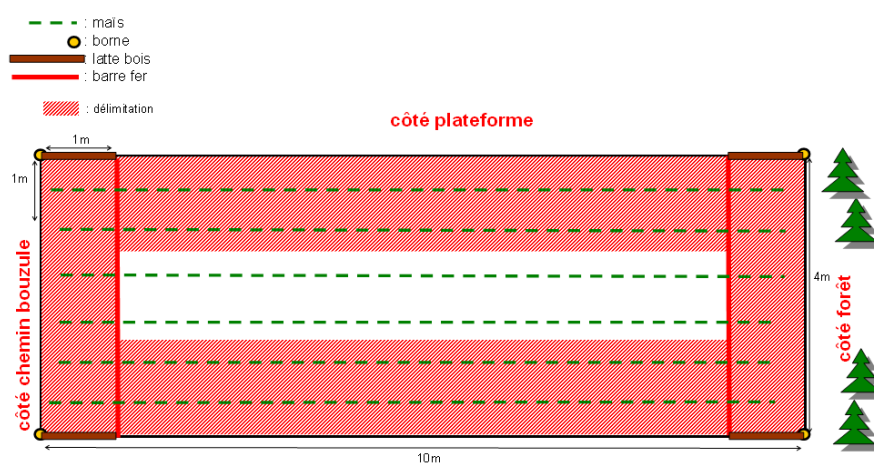


Figure 8 : Schéma de la méthode de récolte du maïs sur les 40+4 parcelles (2011 et 2012)

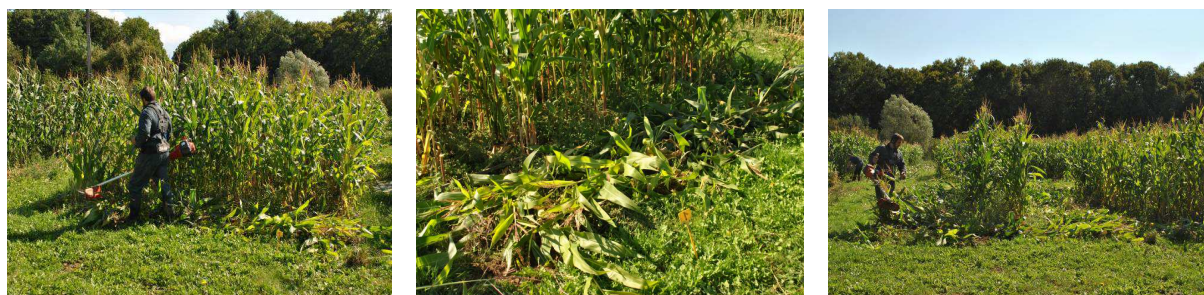


Figure 9 : Coupe des rangs latéraux de maïs écartés de l'échantillonnage

3 Résultats acquis

3.1 Physico-chimie des sols

3.1.1 Paramètres agronomiques

3.1.1.1 Texture

Les analyses texturales réalisées en 2010 (Tableau 7) et 2011 sont similaires et mettent en évidence de très faibles différences entre traitements. Seuls les limons grossiers (Figure 10) et sables grossiers (Figure 11) permettent de différencier certains traitements. Ainsi les limons grossiers apparaissent significativement plus élevés pour le témoin CWP par rapport au traitement en déchets ménagers HWA ; et les sables grossiers sont plus abondants sous les parcelles témoin CWP par rapport aux parcelles témoin basse fertilisation (CMF) et ayant reçu des cendres de combustion (CA).

La récente conversion de prairies en cultures des parcelles CWP pourrait sans doute expliquer en partie ce résultat. Toutefois, les faibles différences significatives texturales pourraient aussi être expliquées par des différences topographiques relevées sur le terrain. Ainsi, la répartition spatiale des teneurs en argiles montre qu'il existe effectivement une légère pente entre le haut et le bas du dispositif et de gauche à droite, L'enrichissement en argile se fait alors selon une diagonale visible par le code couleur utilisé (Figure 12).

Tableau 7 : Texture en 2010 des différentes parcelles par modalité (moyenne de 4 parcelles par modalité).

Modalités	Argiles	LF	LG	SF	SG
CWP	331,25	375,00	169,75	41,25	82,75
COF	293,75	407,00	167,50	40,75	91,00
CMF	341,00	390,75	152,50	40,00	75,75
LSS	343,50	382,25	153,00	44,75	76,50
LDSS	306,50	408,00	164,75	41,25	79,50
LDCSS	290,75	417,25	164,00	41,00	87,00
LDCSSO	320,75	400,25	158,50	41,50	79,00
LDCSSM	332,25	391,75	159,25	43,50	73,25
MPS	331,25	405,25	149,75	43,00	70,75
CA	345,00	387,75	151,75	44,50	71,00
HWA	333,25	398,50	145,50	39,50	83,25

Les teneurs sont exprimées en g.kg⁻¹

CWP : parcelle témoin sans traitement sanitaire ; COF : témoin fertilisation haute ; CMF : témoin fertilisation basse ; LSS : boues digérées de stations urbaines liquides ; LDSS : boues urbaines déshydratées en station ; LDCSS : boues urbaines déshydratées en station et compostées ; LDCSSO : boues urbaines dopées en polluant organiques avant compostage ; LDCSSM : boues urbaines dopées en polluants métalliques avant compostage ; MPS : boues de papeteries ; CA : cendres de combustion de charbon ; HWA : déchets ménagers

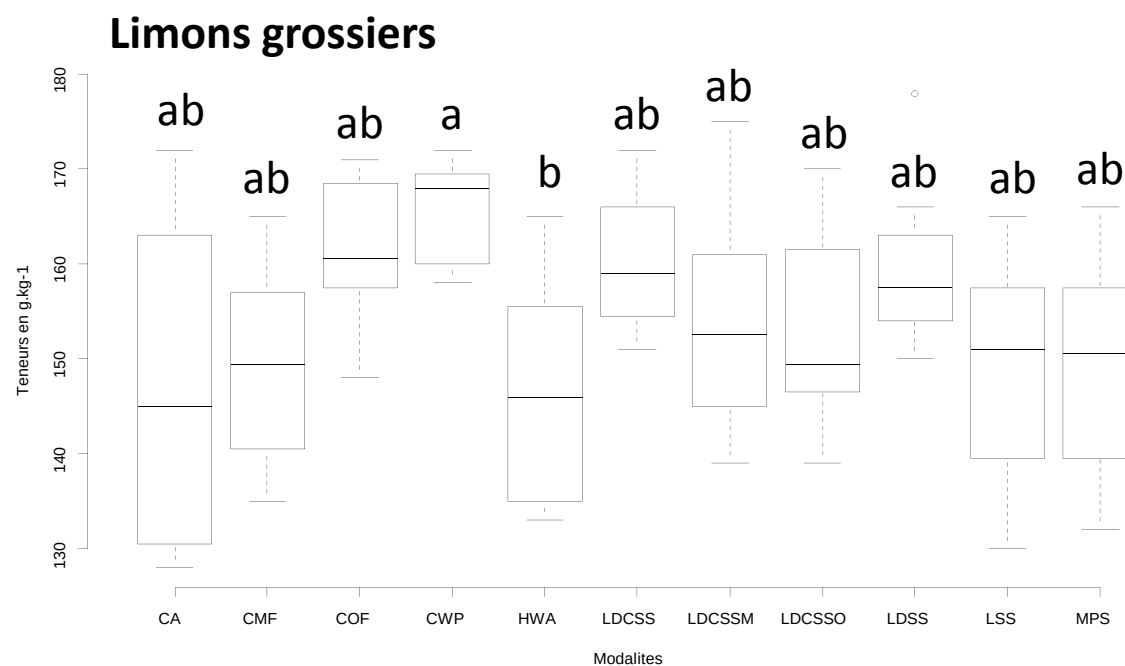


Figure 10 : teneurs en limons grossiers dans les parcelles et différences entre modalités (données 2010 et 2011 groupées)

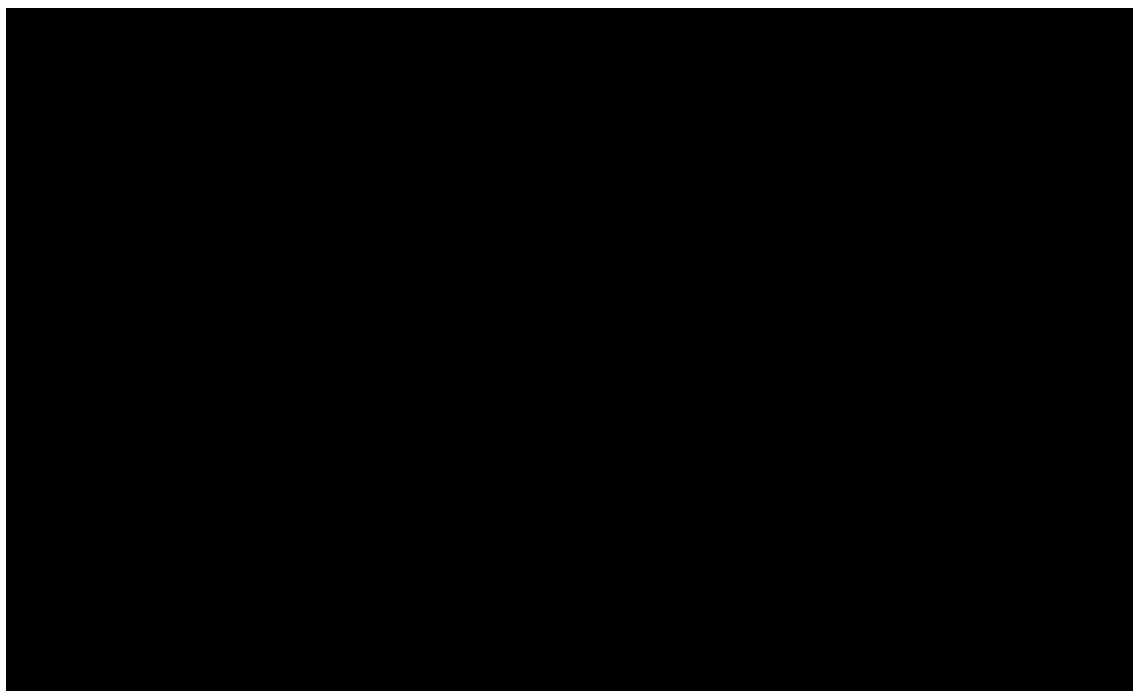


Figure 11 : teneurs en sables grossiers dans les parcelles et différences entre modalités (données 2010 et 2011 groupées)

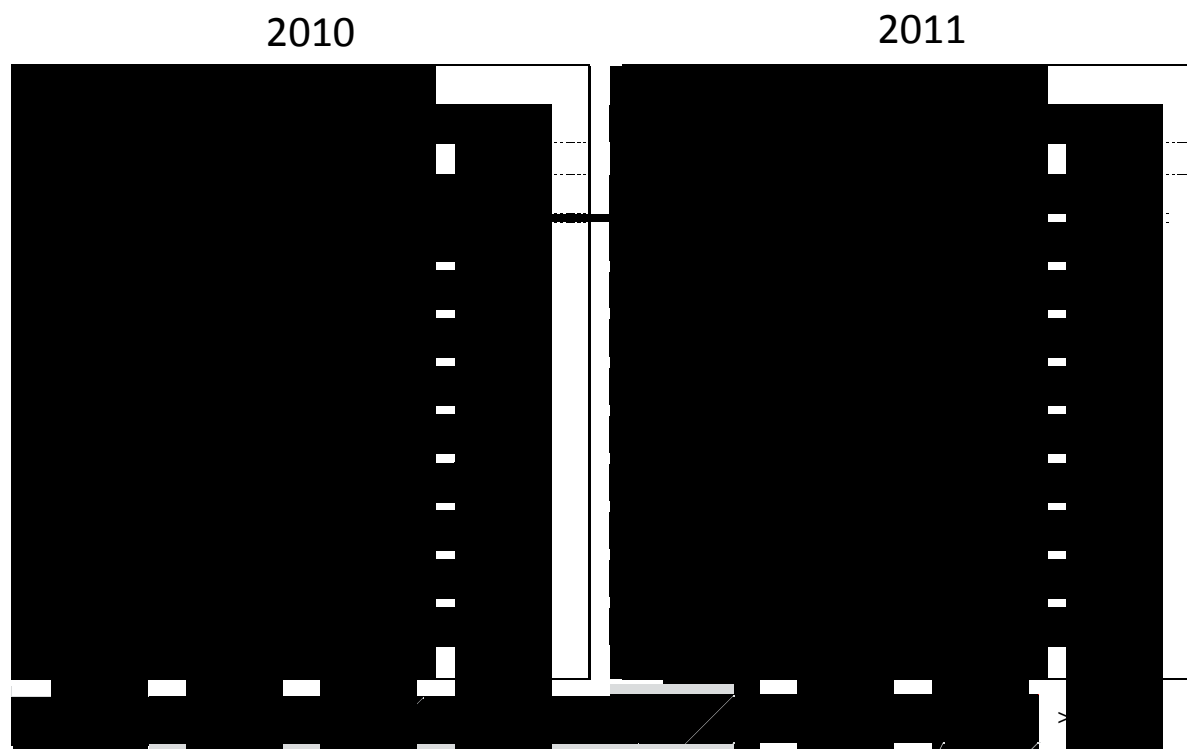


Figure 12 : Distribution spatiale de la teneur en argiles (en % de la fraction de terre fine < 2mm) mesurée en 2010 (gauche) et 2011 (droite) selon un gradient de couleur.

3.1.1.2 Distribution pondérale des fractions granulométriques stables à l'eau

Au jour du prélèvement, les humidités des échantillons variaient entre 18,5% et 25% (cf. annexe 2). Le pourcentage de refus (fraction > 2 mm) de ce sol est d'environ 5% et les distributions pondérales des différentes fractions granulométriques stables à l'eau, < 2 mm, sont rassemblées dans le Tableau 8.

Les distributions pondérales ne semblent pas très différentes selon les modalités, soulignant ainsi le peu d'impact des traitements sur la distribution pondérale des fractions granulométriques stables à l'eau. Toutefois un test de Student portant sur les fractions les plus fines, 0-2 μm et 2-20 μm , souligne des différences significatives. Il apparaît des différences entre :

- le traitement « apport de boue urbaine », en particulier la boue urbaine déshydratée ou non (LSS, LDSS) comparativement aux autres modalités et témoins. 8 ans après le dernier épandage, ces traitements semblent diminuer la stabilité structurale du sol, dans la mesure où pour les modalités LSS et LDSS, la fraction 0-2 μm non agrégée atteint les valeurs les plus élevées, alors que la fraction 2-20 μm présente les valeurs les plus faibles
- le témoin sans pesticides CWP est différent des autres parcelles dans la mesure où il présente une macro-agrégation plus importante (teneurs en fraction > 200 μm les plus élevées).
- la modalité CA et les témoins COF et CMF

Tableau 8 : Pourcentages pondéraux des fractions granulo-densimétriques des échantillons des différents traitements (moyenne $\pm$ écartypes sur 4 répétitions).

Modalités	0-2 μm	2-20 μm	20-50 μm	50-200 μm	200-2000 μm
CWP	18,2 $\pm$ 1,2	45,5 $\pm$ 0,9	14,9 $\pm$ 1,1	9,5 $\pm$ 0,4	12,0 $\pm$ 0,1
COF	20,2 $\pm$ 0,2	48,3 $\pm$ 0,8	20,2 $\pm$ 0,2	7,4 $\pm$ 0,4	9,7 $\pm$ 0,1
CMF	20,5 $\pm$ 0,3	49,0 $\pm$ 0,3	13,5 $\pm$ 0,6	7,8 $\pm$ 0,5	9,3 $\pm$ 0,2
LSS	24,1 $\pm$ 0,2	45,9 $\pm$ 0,9	12,9 $\pm$ 1,3	8,1 $\pm$ 0,2	9,0 $\pm$ 0,4
LDSS	23,4 $\pm$ 0,5	46,5 $\pm$ 0,4	14,1 $\pm$ 0,7	7,7 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,4
LDCSS	19,7 $\pm$ 0,2	48,2 $\pm$ 0,1	14,8 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,1	10,0 $\pm$ 0,0
LDCSSO	20,7 $\pm$ 0,1	48,3 $\pm$ 0,3	13,5 $\pm$ 0,6	8,1 $\pm$ 0,3	9,4 $\pm$ 0,2
LDCSSM	21,1 $\pm$ 0,4	48,3 $\pm$ 0,3	13,2 $\pm$ 0,2	8,1 $\pm$ 0,2	9,3 $\pm$ 0,1
MPS	21,3 $\pm$ 0,6	48,3 $\pm$ 0,2	13,6 $\pm$ 0,1	7,7 $\pm$ 0,3	9,0 $\pm$ 0,3
CA	19,8 $\pm$ 0,4	49,7 $\pm$ 0,4	13,5 $\pm$ 0,6	8,2 $\pm$ 0,4	8,8 $\pm$ 0,2
HWA	19,8 $\pm$ 0,6	49,4 $\pm$ 0,5	13,1 $\pm$ 0,7	8,1 $\pm$ 0,3	9,5 $\pm$ 0,3

Afin d'évaluer la stabilité structurale des parcelles en prenant en compte la variabilité du taux d'argile, nous calculons le rapport I_s égal à la teneur de la fraction 0-2 μm / teneur en argiles (tableau 4). Plus ce rapport se rapproche de 1, plus la stabilité structurale est faible.

Tableau 9 : Valeur de I_s en 2010 pour les différentes modalités

Modalité	CWP	COF	CMF	LSS	LDSS	LDCSS	LDCSSO	LDCSSM	MPS	CA	HWA
I_s	0,55	0,7	0,59	0,7	0,76	0,68	0,65	0,64	0,64	0,57	0,59

Les modalités peuvent donc être classées par rapport à I_s selon un gradient croissant d'instabilité, tel que :

CWP < CA < CMF < HWA < LDCSSM < MPS < LDCSSO < LDCSS < COF < LSS < LDSS.

Ce gradient confirme les résultats précédents à savoir que le témoin Té et la modalité 7 (cendres de combustion) sont les parcelles les plus stables, à l'opposé des modalités 1 et 2 (boue urbaines déshydratée ou non), qui semblent provoquer une légère désagrégation.

Les différences observées dues aux traitements n'impactent toutefois pas profondément le fonctionnement de l'agrosystème.

Différentes hypothèses peuvent malgré tout être avancées pour expliquer ces différences :

- le fait que les parcelles CWP soient restées en prairie jusqu'en 2008 peut expliquer leur importante stabilité: moins de travail du sol, plus de matières organiques résiduelles dans le sol comme en atteste le taux de matières organiques de cette modalité (24%), plus élevé que celui des autres modalités (autour de 18%).
- En raison de leur situation topographique, les parcelles des modalités CMF et CA ont un taux d'argiles plus élevé que les autres parcelles. Ce facteur peut également contribuer à expliquer la plus grande stabilité de ces parcelles.
- Jusqu'à un an après le dernier épandage, l'apport de boues urbaines déshydratées (LDSS) favorisait une agrégation des fractions fines (<20 μm) sur les fractions organo-minérales > 50 μm (Watteau et al., 2012). Cette agrégation a été imputée à des matières organiques issues des floccs bactériens (en particulier exopolymères). Force est de constater qu'après 8 ans, ces matières organiques relativement labiles ne jouent plus leurs rôles. On observe même une relative désagrégation, due peut-être à la plus forte proportion d'eau apportée par ces deux modalités. Ces boues urbaines compostées semblent par contre avoir un effet plus stabilisant, certainement dû aux matières organiques du compost apportées.

3.1.1.3 Eléments majeurs

Les résultats concernant le Carbone organique confirment ceux observés lors du programme Vadetox, à savoir un effet significatif positif des PRO sur les teneurs en C dans les sols (Cortet *et al.*, 2011). Ainsi, après plusieurs années d'arrêt des épandages, 3 groupes peuvent être identifiés en fonction des traitements : 1) le témoin sans pesticides (CWP) crée récemment qui possède les teneurs en C organique les plus élevées, 2) les parcelles ayant reçu des déchets présentant des valeurs intermédiaires en C organique, 3) les témoins n'ayant reçu qu'une fertilisation minérale, présentant les teneurs en C les plus faibles (Figure 13).

Des résultats similaires peuvent être constatés concernant l'azote total dans les sols, avec toutefois certains types de PRO (CA, LDCSS, LDSS) se situant au même niveau que les témoins CMF et COF (Figure 14).

Au niveau du C/N, on retrouve également certains arrières effets similaires à ceux constatés au moment des épandages (Cortet *et al.*, 2011), à savoir des valeurs plus élevées pour les traitements CA et MPS, comparativement à certains autres traitements, particulièrement les 3 témoins (CWP, COF, CMF). Ainsi un effet PRO est encore visible plusieurs années après arrêt des épandages sur le C/N (Figure 15).

Ces arrières effets sont également encore nettement visibles au niveau du Phosphore assimilable (méthode Olsen), puisque plusieurs années après arrêt des épandages, les teneurs sont encore supérieures pour les sols des parcelles ayant reçu des boues liquides ou compostées par rapport aux autres traitements (Figure 16).

L'ensemble de ces résultats confirme ainsi un effet à long terme des traitements sur les paramètres physico-chimiques des sols, avec une augmentation des teneurs en Phosphore pour les sols ayant reçu des boues et des C/N plus élevés pour les sols ayant reçu des cendres ou des boues de papeterie. Il confirme ainsi l'intérêt, déjà évoqué par Cortet *et al.* (2011), de suivre plus particulièrement ces 2 paramètres pour évaluer les effets des PRO sur les sols.

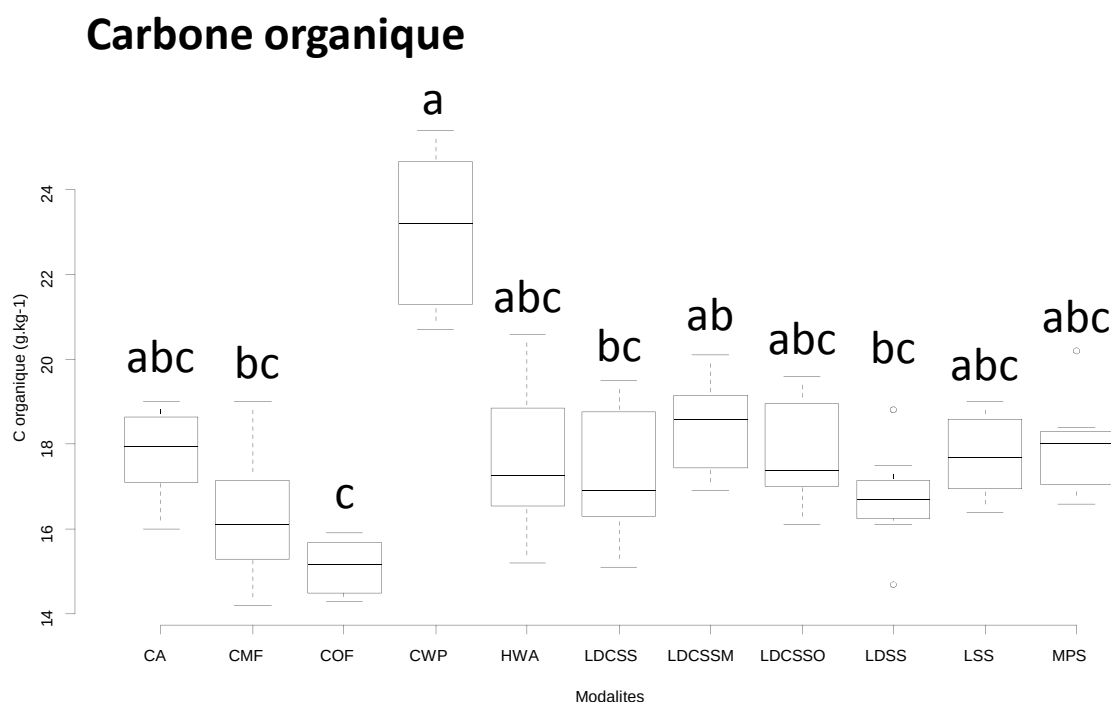


Figure 13 : Teneurs en Carbone organique des sols en fonction des traitements sur le site de la Bouzule (Moyennes sur 2010 et 2011). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.

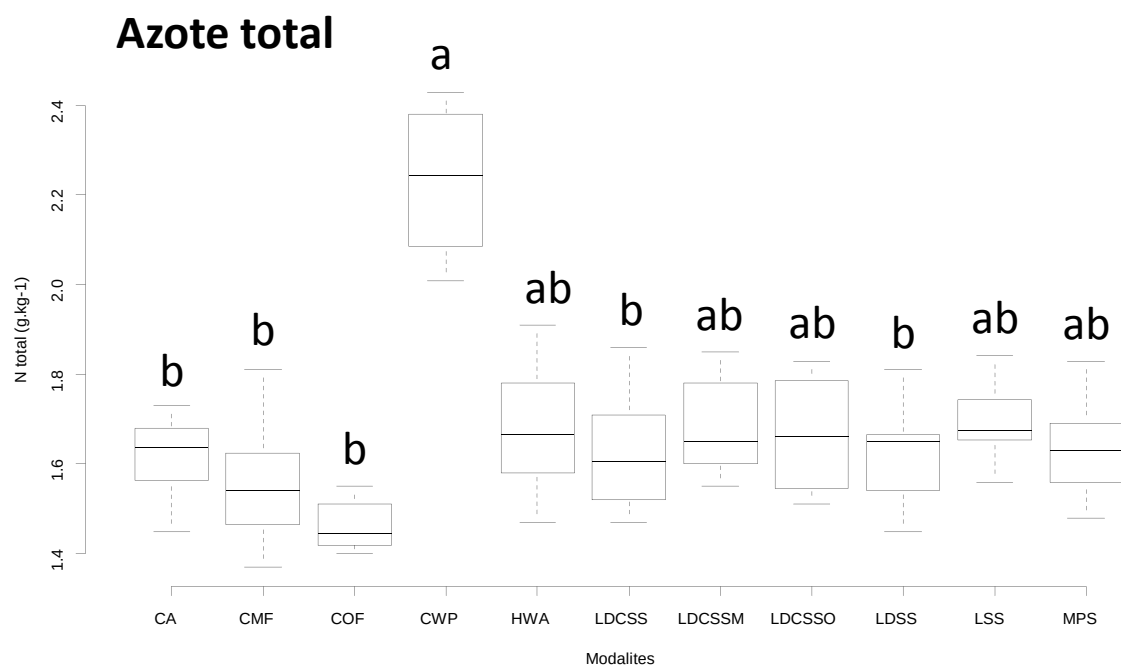


Figure 14 : Teneurs en Azote total des sols en fonction des traitements sur le site de la Bouzule (Moyennes sur 2010 et 2011). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.

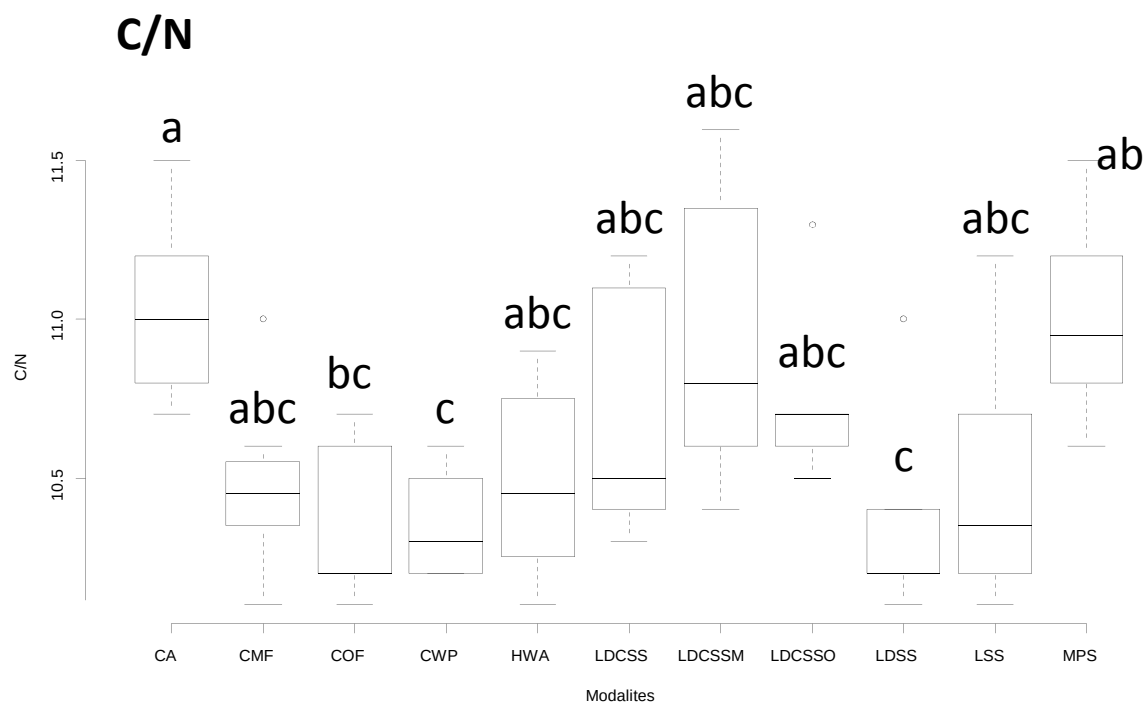


Figure 15 : C/N des sols en fonction des traitements sur le site de la Bouzule (Moyennes sur 2010 et 2011). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.

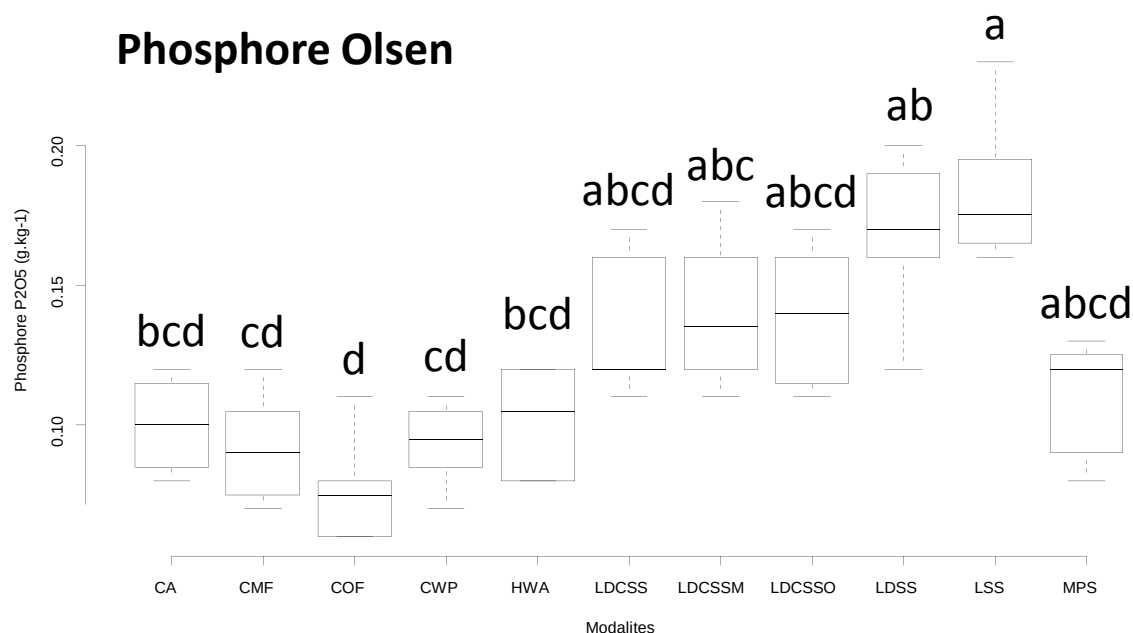


Figure 16 : Teneurs en Phosphore Olsen des sols en fonction des traitements sur le site de la Bouzule (Moyennes sur 2010 et 2011). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.

3.1.1.4 Analyse en composantes principales sur les paramètres agronomiques

Les analyses multivariées effectuées sur les résultats issus des paramètres de texture et les éléments majeurs, mettent clairement en évidence une très grande similarité des échantillons récoltés, quel que soit le traitement envisagé. Seule la modalité CWP, correspondant au nouveau témoin créé pour le programme VADEBIO, se distingue nettement avec des valeurs en N et C supérieures par rapport aux autres modalités (Figure 17).

Toutefois, les tests effectués sur les composantes des axes de l'ACP permettent d'affiner ce résultat. Ainsi, un effet traitement est visible sur l'axe 1, mettant en évidence une différence significative entre CWP par rapport aux 2 autres témoins (COF et CMF) ainsi que CA et MPS. Ce résultat indique que les parcelles ayant reçu des boues et composts (LSS, LDSS, LDCSSO, LDCSSM, LDCSS), ainsi que les parcelles ayant reçu des ordures ménagères (HWA) conservent des niveaux de C et N dans les sols supérieurs par rapport aux autres traitements (Figure 18). Sur l'axe 2 l'effet CWP est également visible mettant en évidence des différences texturales (Figure 18). L'analyse de la troisième composante permet encore de distinguer un effet traitement, en individualisant les traitements CA et MPS, dont les C/N sont plus élevés et les teneurs en limons grossiers plus faibles que les témoins COF et CWP (Figure 19, Figure 20).

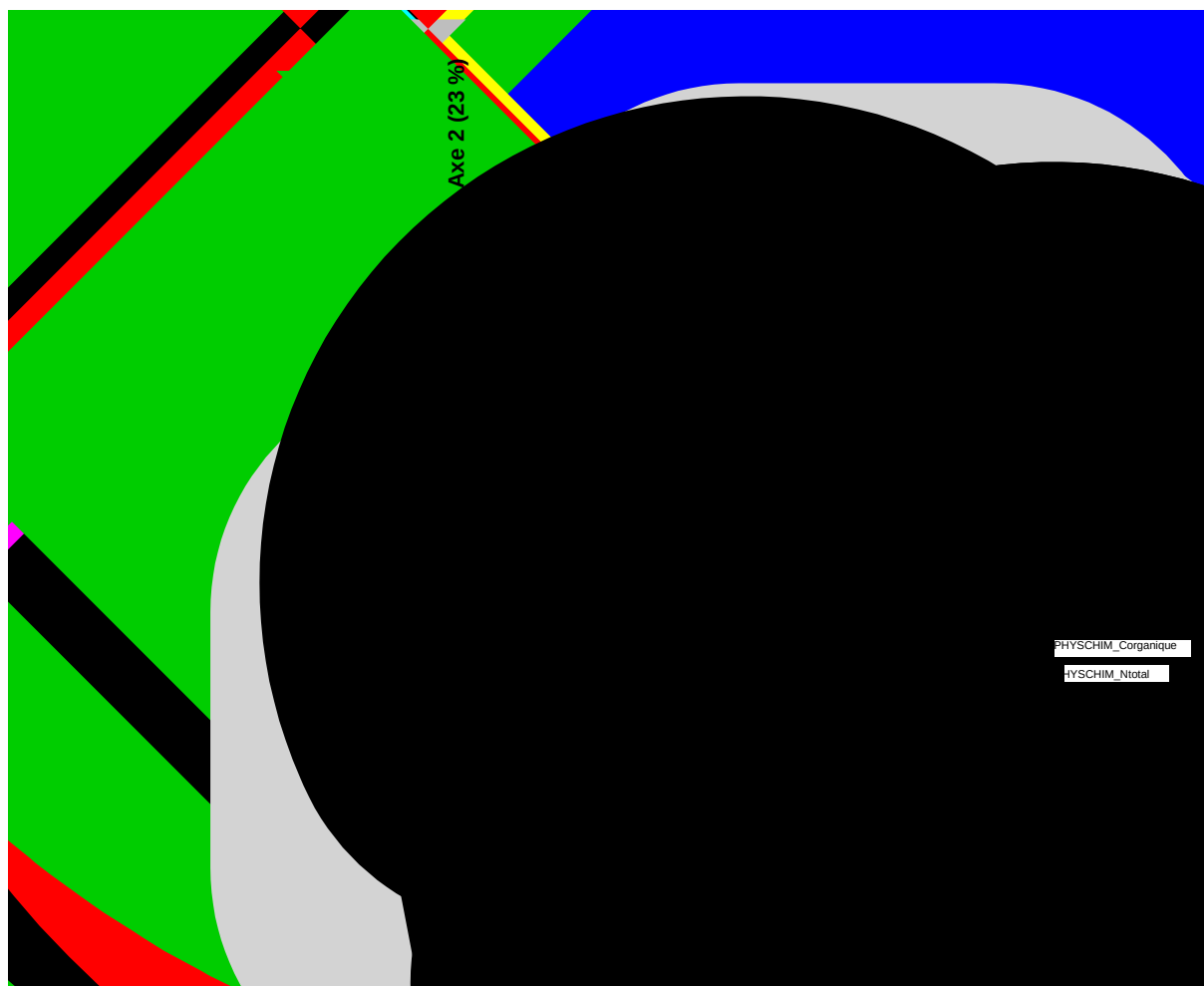


Figure 17 : Analyse en Composantes Principales (projection des échantillons et cercle des corrélations sur plan formé par les axes 1 et 2) sur les paramètres de texture et éléments majeurs des sols pour les analyses de sol récoltés en 2010 et 2011.

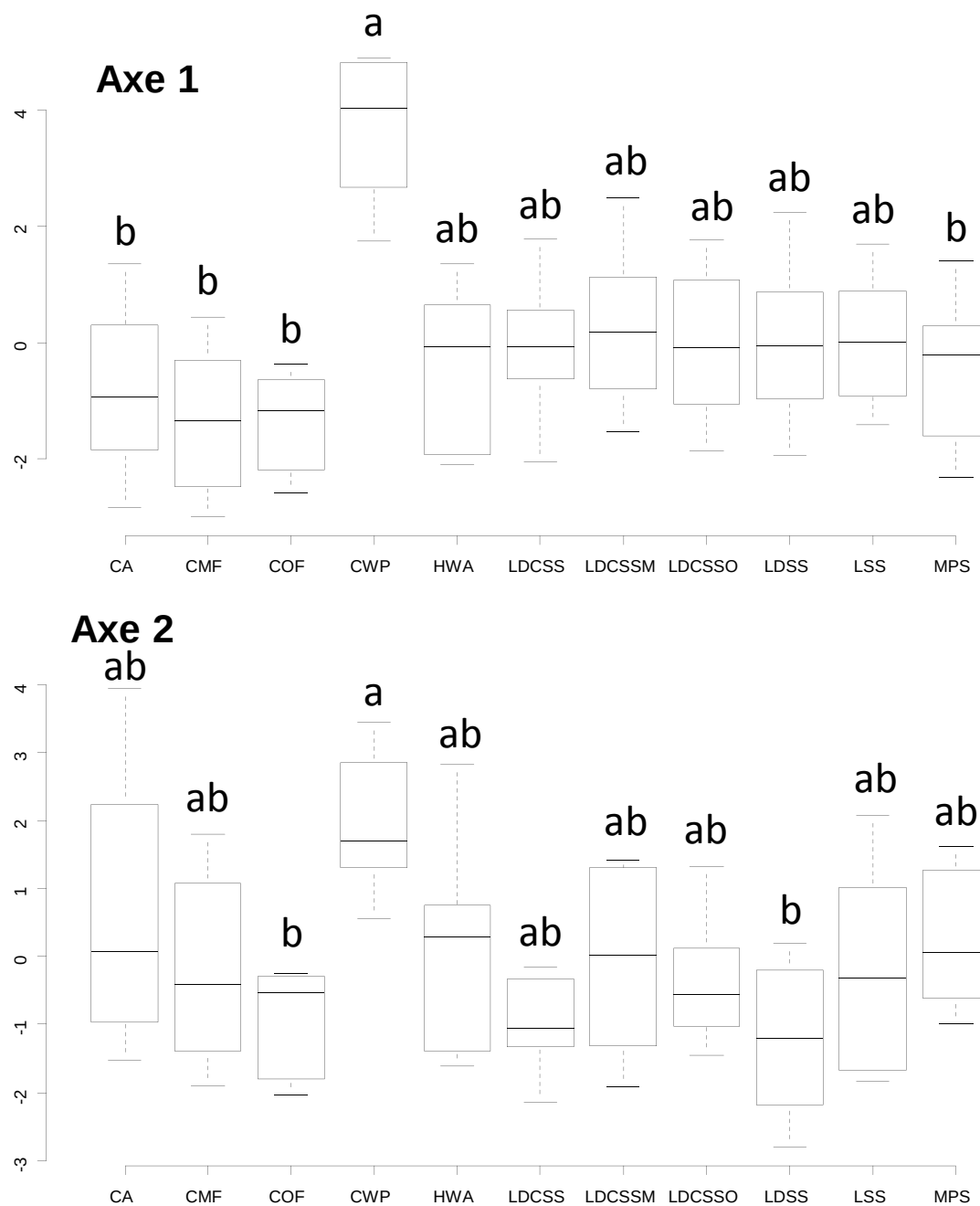


Figure 18 : Effet traitement sur les composantes 1 et 2 de l'Analyse en Composantes principales (test de Kruskal-Wallis). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.

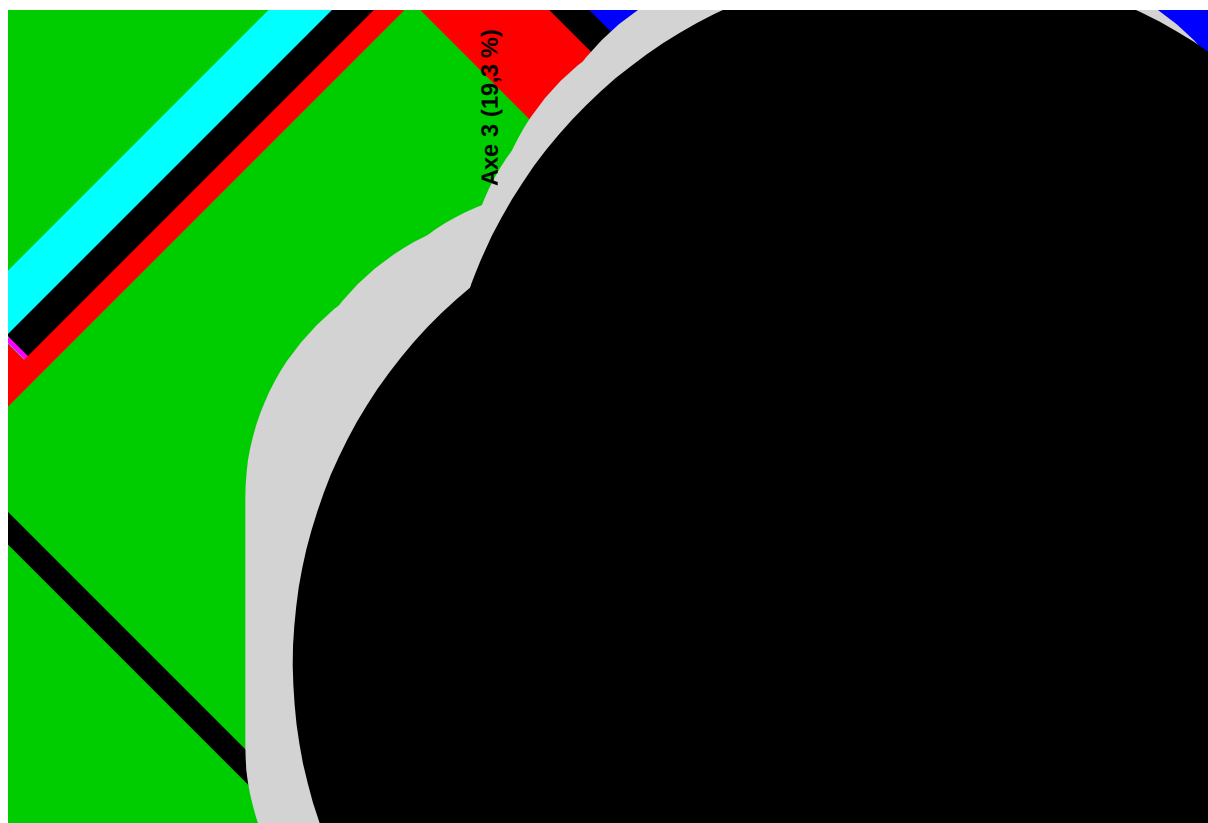


Figure 19 : Analyse en Composantes Principales (projection des échantillons et cercle des corrélations sur plan formé par les axes 1 et 3) sur les paramètres de texture et éléments majeurs des sols pour les analyses de sol récoltés en 2010 et 2011.

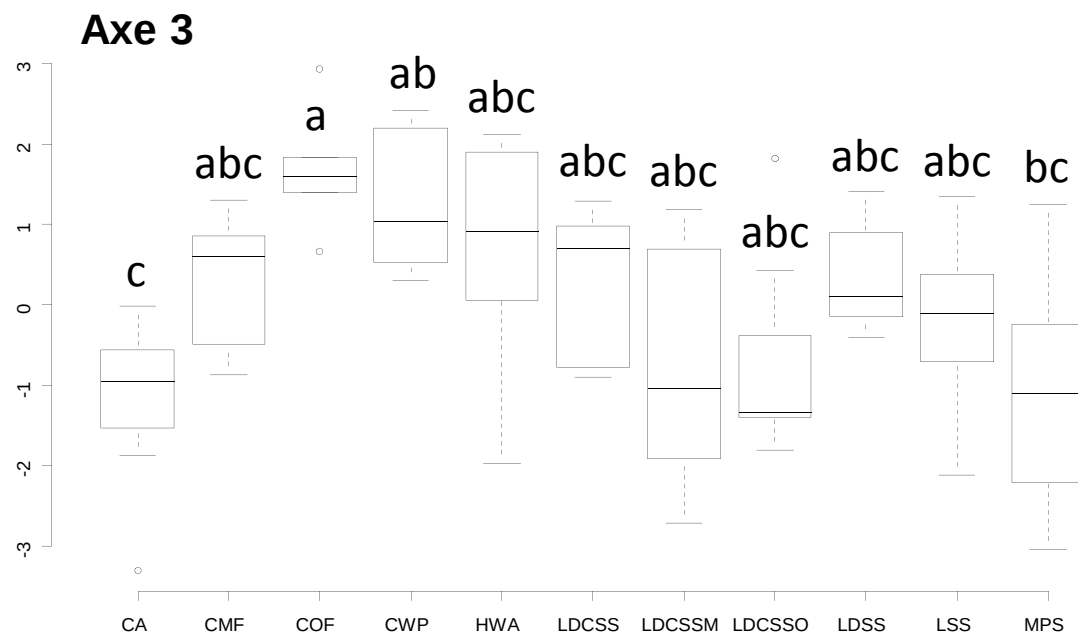


Figure 20 : Effet traitement sur les composantes 1 et 3 de l'Analyse en Composantes principales (test de Kruskal-Wallis). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.

3.1.1.5 Éléments échangeables

Les résultats obtenus concernant le sodium, potassium, fer et aluminium ne mettent pas en évidence de différences significatives entre traitements. Une légère tendance, mais non significative est observée concernant le magnésium, dont les valeurs sont plus élevées en CA par rapport aux autres

modalités. Par ailleurs les valeurs en calcium sont significativement plus élevées en CWP par rapport à COF (Figure 21) ; et les valeurs en manganèse sont significativement plus élevées en LSS par rapport à MPS.

Globalement, la CEC ne présente pas de différences significatives entre traitements.

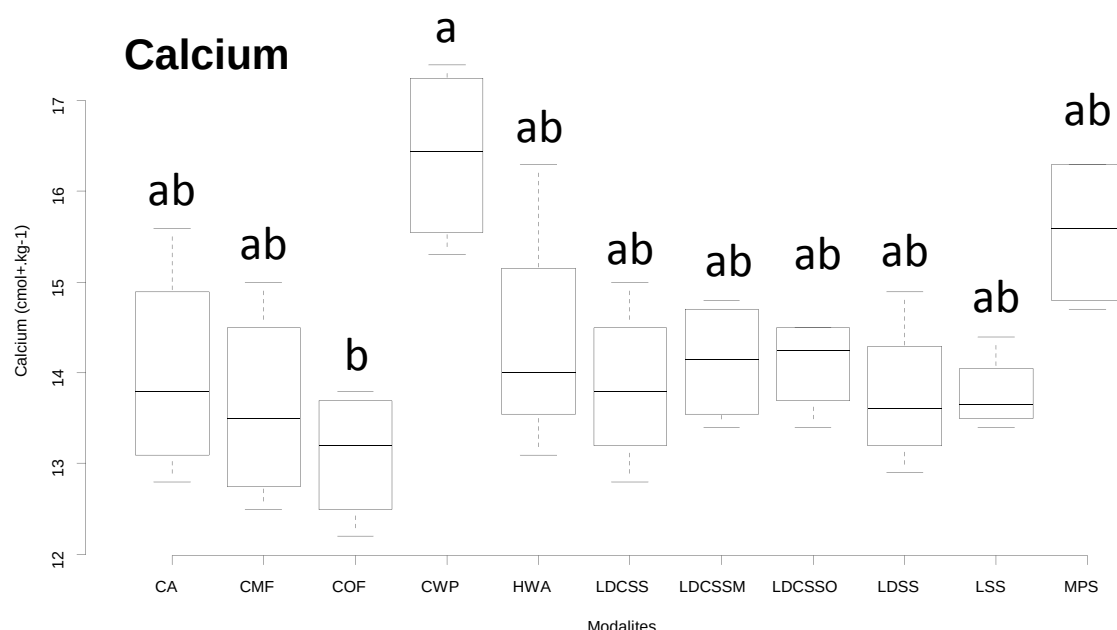


Figure 21 : teneurs en Calcium dans les sols en fonction des différents traitements (test de Kruskal-Wallis). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.

3.1.2 Eléments traces métalliques et polluants organiques

3.1.2.1 Eléments traces métalliques

Les résultats concernant les éléments traces métalliques analysés dans les sols en 2010 (Figure 22), indiquent des niveaux similaires à ceux rencontrés de 1997 à 2005 (Tableau 10), qui restent donc en dessous des niveaux acceptés par la législation pour la plupart des métaux (arrêté du 8 janvier 1998). Pour le nickel, la valeur moyenne de 59,5 mg/kg MS est supérieure à la valeur limite de 50 mg/kg fixée par la réglementation. Le fond géochimique peut être à l'origine de cette valeur haute en nickel. Une enquête de Pailler (1992) réalisée sur 333 échantillons de sols dans le Nord-Est de la France, a montré que la teneur en Ni des sols est particulièrement élevée lorsque les sols se sont développés sur des roches-mères marneuses ou calcaires. Lors de précédentes études sur le site (programme VADETOX, convention 03 75 C0006), les analyses ont montré que les sous-sols de la Bouzule sont argileux (horizon C1), marno-calcaires (horizon C2) et riches en nickel (110-140 mg/kg MS).

Des différences significatives entre traitement sont observées concernant le cuivre et le zinc. Pour le cuivre les valeurs restent significativement plus élevées dans les sols ayant reçu des composts dopés en métaux (LDCSSM) par rapport aux 2 sols témoins COF et CMF. Pour le zinc, les valeurs sont également plus élevées en LDCSSM par rapport à COF, mais aussi par rapport à CWP ; par ailleurs les sols ayant reçu des boues liquides (LSS) ont des teneurs en zinc significativement supérieures aux sols témoins COF.

Pour le plomb et la Cadmium, les tests de Kruskal-Wallis mettent en évidence un effet traitement. Toutefois les tests 2 à 2 effectués a posteriori ne permettent pas d'établir de réelles différences entre traitements. On notera toutefois une tendance à des valeurs plus élevées pour le Cadmium dans les sols ayant reçu des composts dopés en métaux (LDCSSM) ou en polluants organiques (LDCSSO) par rapport aux autres sols. Par ailleurs le plomb a nettement tendance à être plus élevé dans tous les sols ayant reçu des boues ou des composts (LSS, LDSS, LDCSS, LDCSSM, LDCSSO) ainsi que des ordures ménagères (HWA) par rapport aux autres parcelles.



Figure 22 : teneurs en éléments traces métalliques dans les sols en 2010 en fonction des différents traitements (test de Kruskal-Wallis). Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches indiquent les traitements significativement différents.

Tableau 10 : Eléments traces métalliques (mg kg⁻¹ DM) dans le sol mesurés de 1996 à 2006 (d'après Cortet *et al.* 2011)

		Mars 97 [†]	Mai 97	Sept 97	Oct 97	Juil 98	Sept 98	Sept 99	Juil 00	Aout 01	Avr 02	Nov 02	Oct 03	Dec 04	Nov 05
Cd	LSS [‡]		0.09	0.10	0.08	0.12	0.17 ab	0.13	0.16	0.18	0.19 b	0.24 abc	0.27	0.35 abc	0.28 ab
	LDSS		0.09	0.10	0.11	0.14	0.16 bc	0.12	0.17	0.20	0.18 b	0.19 c	0.27	0.27 c	0.10 b
	LDCSS		0.10	0.12	0.15	0.16	0.17 b	0.12	0.17	0.21	0.20 ab	0.19 c	0.28	0.45 a	0.25 ab
	LDCSSO		0.09	0.10	0.10	0.11	0.24 a	0.06	0.15	0.19	0.23 ab	0.24 abc	0.28	0.30 bc	0.10 b
	LDCSSM	0.07	0.11	0.14	0.12	0.08	0.14 bcd	0.07	0.17	0.22	0.28 a	0.28 a	0.30	0.40 ab	0.30 ab
	MPS		0.11	0.14	0.08	0.11	0.12 bcde	0.12	0.14	0.15	0.18 b	0.27 ab	0.27	0.28 bc	0.34 a
	CA		0.10	0.12	0.09	0.08	0.07 de	0.10	0.13	0.15	0.20 ab	0.21 bc	0.26	0.36 abc	0.33 ab
	HWA		0.09	0.10	0.11	0.12	0.09 cde	0.09	0.12	0.15	0.22 ab	0.2 c	0.26	0.33 abc	0.33 ab
	CMF		0.11	0.14	0.10	0.07	0.06 e	0.12	0.14	0.14	0.17 b	0.19 c	0.28	0.31 bc	0.38 a
	COF		0.11	0.14	0.12	0.06	0.05 e	0.10	0.16	0.21	0.17 b	0.25 abc	0.24	0.30 bc	0.35 a
Cu	LSS		25	35	33 ab	22	32 ab	43 a	35 ab	31	31	31 a	37 ab	29	26
	LDSS		23	44	29 abc	24	37 a	43 a	42 a	33	30	31 a	38 a	29	24
	LDCSS		22	32	27 bc	22	27 ab	38 ab	35 ab	32	29	26 ab	32 abcd	30	21
	LDCSSO		20	29	30 abc	24	29 ab	42 a	35 ab	32	27	29 ab	34 abc	29	22
	LDCSSM	28	26	36	30 abc	33	29 ab	32 abc	37 ab	29	30	31 a	37 ab	33	26
	MPS		30	28	35 a	23	26 ab	33 abc	36 ab	33	27	29 ab	32 abcd	32	21
	CA		24	33	28 abc	23	30 ab	32 abc	31 b	28	26	27 ab	28 cd	40	21
	HWA		25	52	25 c	25	28 ab	30 bc	31 b	30	29	28 ab	31 bcd	28	26
	CMF		21	41	28 abc	21	22 b	26 bc	30 b	28	22	26 ab	26 d	24	21
	COF		20	33	24 c	22	24 b	25 c	31 b	31	23	24 b	27 cd	25	20
Ni	LSS		61	66	69	44	58	65	58	54	60	54	77	76	57
	LDSS		54	47	55	56	69	55	57	59	55	53	69	78	51
	LDCSS		50	54	63	58	54	50	55	63	63	51	68	65	53
	LDCSSO		54	62	61	40	56	61	51	67	57	55	68	70	52
	LDCSSM	56	51	61	63	52	58	58	62	45	58	53	69	67	59
	MPS		55	57	64	47	60	62	60	69	58	61	72	72	54
	CA		59	61	69	57	69	65	64	40	63	59	75	71	57
	HWA		56	64	69	58	62	56	56	63	58	54	72	67	54
	CMF		58	56	62	42	59	58	59	56	57	53	73	72	58
	COF		53	65	58	49	60	52	56	62	53	53	62	62	54

		Mars 97 [†]	Mai 97	Sept 97	Oct 97	Juil 98	Sept 98	Sept 99	Juil 00	Aout 01	Avr 02	Nov 02	Oct 03	Dec 04	Nov 05
Pb	LSS		45 a	41	46 a	29	43 ab	29	36	31	36	36 a	48 ab	35	39 ab
	LDSS		34 b	34	38 bcd	34	44 ab	30	36	32	37	34 ab	50 a	37	40 ab
	LDCSS		37 ab	40	38 cd	33	39 ab	35	36	31	35	32 ab	46 ab	42	39 ab
	LDCSSO		31 b	38	44 abc	26	38 ab	35	31	35	45	33 ab	46 ab	35	38 b
	LDCSSM	37	33 b	41	41 abcd	29	38 ab	36	35	31	42	35 ab	47 ab	44	41 ab
	MPS		36 ab	38	38 cd	34	38 ab	34	33	33	33	32 ab	39 b	38	36 b
	CA		37 ab	39	42 abc	30	37 ab	34	32	28	33	33 ab	42 ab	40	36 b
	HWA		38 ab	54	46 ab	40	46 a	36	37	32	38	36 a	51 a	44	46 a
	CMF		38 ab	35	38 cd	29	34 b	32	36	32	31	32 ab	41 ab	39	38 b
	COF		36 ab	48	35 d	33	36 ab	33	34	33	31	30 b	39 b	40	37 b
Zn	LSS		130	144	156 abcd	188	146 abc	132 ab	144	138	173	140	183 ab	158 ab	128
	LDSS		127	132	137 cd	114	151 abc	140 a	144	141	155	133	181 ab	146 ab	123
	LDCSS		117	134	136 d	117	148 abc	109 ab	128	151	166	124	163 abc	138 b	115
	LDCSSO		126	148	144 bcd	99	129 c	138 a	130	149	185	139	173 abc	185 a	125
	LDCSSM	113	110	147	148 bcd	119	143 bc	123 ab	141	125	171	140	191 a	154 ab	133
	MPS		119	135	141 cd	103	158 ab	121 ab	136	146	145	129	157 abc	148 ab	120
	CA		122	146	175 a	120	167 a	119 ab	141	114	152	137	158 abc	144 ab	123
	HWA		123	140	167 ab	164	142 bc	116 ab	133	136	191	130	167 abc	149 ab	138
	CMF		118	132	135 d	100	128 c	109 ab	123	134	144	126	156 bc	142 ab	123
	COF		109	123	132 d	120	138 bc	102 b	121	139	133	132	139 c	126 b	120

[†] liquid sewage sludge (LSS), lightly dehydrated sewage sludge (LDSS), lightly dehydrated composted sewage sludge (LDCSS), lightly dehydrated composted sludge added with organic pollutants (LDCSSO), lightly dehydrated composted sludge added with metals (LDCSSM), mixed paper sludge (MPS), coal ashes (CA), household waste ashes (HWA). Des lettres différentes entre traitements pour chaque date et chaque élément trace indiquent des différences significatives (ANOVA, p<0.05).

3.1.2.2 Polluants organiques

Les concentrations en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques mesurées dans les sols à l'exception du Fluoranthène (et du Pyrène dans une moindre mesure) sont très faibles et proches des limites de quantification quel que soit le type de matrice épandue (Tableau 11).

La présence de Fluoranthène sur le site (83,3 µg/kg MS en moyenne) peut être issue de sources environnementales (feux de forêt), anthropiques (cheminée, four à bois, incinérateur, production de goudron, d'asphalte, craquage du pétrole) ou encore de sources mobiles (véhicules Essence et Diesel).

Une étude réalisée en 2006 par Morin dans le cadre de l'épandage de boues urbaines et agroalimentaires montre que les concentrations en HAPs dans les sols français dépendent des activités et infrastructures qui existent autour des parcelles échantillonnées. Ainsi, les valeurs en HAPs les plus faibles restent mesurées dans les zones rurales ou reculées. De même, Morin (2006) souligne que les HAPs principalement retrouvés dans les sols en prenant l'exemple du Bassin de la Seine sont les molécules légères comme le Fluoranthène et le Pyrène. Ces mêmes HAPs sont retrouvés dans les parcelles de la Bouzule.

Concernant les composés organiques chlorés, les concentrations en PCBs sont toutes inférieures aux limites de quantification (soit 10 µg/kg MS).

Tableau 11 : Teneurs moyennes en HAPs des 44 parcelles en 2010 par type de matrice épandue

HAPs (µg/kg MS)	LSS	LDSS	LDCSS	LDCSSM	LDCSSO	MPS	CA	HWA	CMF	COF	CWP
Benzo(b)fluoranthène	110(1)	<50*	56(2)	61(2)	61(1)	<50*	<50*	<50*	<50*	56(1)	71(3)
Benzo(k)fluoranthène	61(1)	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*
Benzo(g,h,i)pérylène	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*
Fluoranthène	104(3)	76(3)	92(4)	104(3)	86(4)	63(4)	66(4)	69(2)	64(4)	74(2)	118(4)
Benzo(a)pyrène	100(1)	<50*	53(2)	60(3)	65(1)	<50*	<50*	<50*	<50*	52(1)	77(2)
Acénaphthène	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*
Acénaphthylène	<500*	<500*	<500*	<500*	<500*	<500*	<500*	<500*	<500*	<500*	<500*
Anthracène	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*
Benzo(a)anthracène	84(1)	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	83(1)
Chrysène	88(1)	63(1)	52(1)	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	<50*	67(3)
Dibenzo(a-h)anthracène	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*
Fluorène	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*
Naphtalène	<200*	<200*	<200*	<200*	<200*	<200*	<200*	<200*	<200*	<200*	<200*
Phénanthrène	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*	<250*
Pyrène	96(2)	70(2)	66(4)	69(2)	66(2)	60(1)	62(1)	54(1)	61(1)	58(2)	93(4)

* Valeurs obtenues pour les 4 réplicats

(x) Valeur moyenne calculée à partir de x échantillons (1<x<4), les autres valeurs de réplicats étant inférieures aux limites de quantification

3.1.2.3 Fractions biodisponibles (essais de lixiviation)

Les résultats obtenus pour les polluants organiques montrent que toutes les valeurs obtenues sont inférieures aux limites de quantification quelle que soit la famille chimique (HAP ou PCB) ou la matrice épandue.

Les teneurs en métaux des différents éluats de lixiviation sont de l'ordre de 3 µg/L pour le cadmium, inférieures à la limite de quantification (10 µg/L) pour le cuivre et le plomb, 20 et 45 µg/L pour le nickel et le zinc respectivement.

La mobilité des métaux est alors évaluée en rapportant les valeurs obtenues après extraction au CaCl₂ avec les valeurs trouvées dans les sols (Tableau 12).

Le comportement du cadmium à la lixiviation est nettement différent de celui des autres métaux suivis. Sa fraction lixiviable (teneur lixiviée rapportée à la teneur dans les sols) est de l'ordre de 13 % alors que celle des autres métaux est 40 fois plus faible. Ainsi, le cadmium apparaît comme étant le métal le plus mobile parmi les 5 étudiés.

Tableau 12 : mobilité des éléments traces métalliques après extraction au CaCl_2

	Elément métallique (mg/kg MS)				
	Cadmium	Cuivre	Nickel	Plomb	Zinc
Part extraite au CaCl_2	0.03	< limite de quantification	0.20	< limite de quantification	0.45
Moyenne sol	0.24	28.8	59.5	40.4	140.1
% métal extrait	12.5	-	0.34	-	0.32

3.2 Communautés bactériennes

3.2.1 Abondance de la communauté bactérienne

Les valeurs moyennes du nombre de copies par gramme de sol sec pour chaque traitement et chacun des gènes sont présentées dans le Tableau 14.

3.2.1.1 Communauté globale (ADNr 16S)

L'abondance globale de la communauté microbienne varie de 1,11.10⁹ à 4,51.10⁹ copies par gramme de sol sec en 2010 et de 2,7.10⁹ à 1,09.10¹⁰ copies par gramme de sol sec en 2011.

Un test ANOVA ($\alpha=0,05$) sur les valeurs transformées montre qu'il existe une différence significative ($p<0,05$) entre les traitements suivants (test a posteriori avec correction de Bonferroni, $p=0,002$) : LDCSS et CWP ($p<0,0001$), LDSS et LSS ($p<0,0001$) et LDCSS et MPS ($p=0,0003$), quelle que soit l'année considérée (Tableau 13, colonne 2). Toutefois, bien que significatives, ces différences dans l'abondance restent minimales et dans la gamme de variations observées entre les différents traitements.

On peut conclure que l'abondance de la communauté globale est relativement homogène et que l'apport de boues n'affecte pas ce paramètre quelle que soit la modalité considérée. Donc, il semblerait que 8 ans après les dernières applications de boue la résilience du sol agricole du site expérimental de La Bouzule est effective.

Tableau 13 : Valeurs de p données par le test ANOVA effectué sur le nombre de copies de gènes (ADNr 16S, *pcaH*, *amoAA*, *amoAB*) par gramme de sol soumis à une transformation logarithmique, pour chacun des onze traitements considérés

Facteur \ Abondance	Année	Traitement	Année x Traitement
ADNr 16S	<0,0001***	0,002 **	0,518
<i>amoAA</i>	<0,0001***	0,861	0,763
<i>amoAB</i>	0,0002***	0,036 *	0,417
<i>pcaH</i>	<0,0001***	0,205	0,588

Tableau 14 : Valeurs moyennes du nombre de copies de gènes (ADNr 16S, *pcaH*, *amoAA*, *amoAB*) par gramme de sol pour chacun des onze traitements considérés, associés aux résultats du test ANOVA ($\alpha=0,05$) réalisé sur les valeurs brutes

	parcelle	2010				2011			
		ADNr 16S	<i>pcaH</i>	<i>amoAA</i>	<i>amoAB</i>	ADNr 16S	<i>pcaH</i>	<i>amoAA</i>	<i>amoAB</i>
CWP	1T	n/a	1,75E+08	5,70E+08	2,13E+08	5,43E+09	1,95E+08	1,18E+09	9,38E+07
	2T	3,02E+09	1,55E+08	5,20E+08	1,53E+08	1,00E+10	2,87E+08	2,38E+09	4,44E+08
	3T	4,45E+09	1,57E+08	1,46E+08	9,27E+07	6,63E+09	2,40E+08	1,83E+09	7,18E+07
	4T	3,26E+09	1,48E+08	6,41E+08	1,21E+08	8,38E+09	3,56E+08	2,37E+09	2,52E+08
LSS	14	3,20E+09	1,03E+08	1,93E+08	8,84E+08	1,04E+10	3,73E+08	2,62E+09	7,66E+08
	28	4,51E+09	3,39E+07	n/a	2,57E+08	6,27E+09	2,50E+08	1,18E+09	2,43E+08
	29	2,33E+09	1,23E+08	4,27E+08	7,54E+08	9,88E+09	2,28E+08	9,70E+08	5,96E+08
	39	2,77E+09	1,07E+08	3,98E+08	5,37E+08	6,28E+09	1,54E+08	7,23E+08	1,30E+08
LDSS	1	2,19E+09	9,93E+07	n/a	5,90E+08	5,26E+09	2,23E+08	1,49E+09	3,70E+08
	7	2,13E+09	1,28E+08	2,01E+08	4,71E+08	3,66E+09	1,71E+08	1,35E+09	3,16E+08
	10	3,17E+09	2,37E+08	1,58E+09	3,67E+08	5,37E+09	1,31E+08	9,01E+08	1,86E+08
	24	3,45E+09	2,36E+08	3,70E+09	4,87E+08	5,84E+09	2,76E+08	1,84E+09	4,82E+08
LDCSS	2	1,47E+09	9,21E+07	2,38E+08	5,75E+08	4,29E+09	1,78E+08	1,24E+09	1,95E+08
	4	1,86E+09	1,09E+08	9,48E+08	1,51E+09	2,76E+09	1,02E+08	6,43E+08	6,68E+07
	11	2,30E+09	2,06E+08	1,16E+09	4,65E+08	4,72E+09	1,70E+08	1,30E+09	1,09E+08
	25	7,11E+08	2,83E+07	1,67E+07	9,39E+07	7,03E+09	2,17E+08	1,18E+09	1,89E+08
LDCSSO	8	1,57E+09	1,37E+08	1,03E+08	2,25E+08	3,61E+09	1,54E+08	1,07E+09	8,09E+07
	22	3,36E+09	1,79E+08	1,97E+09	3,12E+08	7,74E+09	3,72E+08	2,72E+09	5,50E+08
	23	3,22E+09	1,65E+08	1,00E+09	7,50E+08	3,71E+09	2,03E+08	1,53E+09	1,33E+08
	33	2,60E+09	1,26E+08	5,40E+08	1,82E+08	6,44E+09	2,42E+08	1,29E+09	1,62E+08
LDCSSM	5	2,03E+09	9,19E+07	1,19E+09	9,75E+08	4,29E+09	1,43E+08	5,45E+08	7,16E+07
	16	1,16E+09	6,28E+07	2,09E+08	1,60E+08	7,01E+09	2,94E+08	1,78E+09	2,23E+08
	27	2,20E+09	1,05E+08	5,73E+08	1,71E+08	6,84E+09	2,59E+08	1,57E+09	1,69E+08
	30	3,16E+09	1,57E+08	9,84E+08	6,30E+08	1,09E+10	2,75E+08	1,40E+09	3,53E+08
MPS	13	2,65E+09	8,86E+07	4,28E+07	5,04E+08	1,01E+10	3,08E+08	1,59E+09	6,03E+08
	20	3,58E+09	1,06E+08	2,33E+08	5,38E+08	5,25E+09	2,43E+08	9,96E+08	2,25E+08
	31	2,28E+09	1,11E+08	5,68E+08	2,51E+08	8,43E+09	2,11E+08	1,02E+09	1,92E+08
	34	2,79E+09	1,34E+08	7,82E+08	4,77E+08	8,12E+09	2,63E+08	1,48E+09	6,83E+08
CA	21	4,16E+09	1,88E+08	1,67E+09	5,01E+08	5,09E+09	2,34E+08	1,22E+09	3,07E+08
	26	2,98E+09	1,28E+08	6,38E+08	3,40E+08	4,81E+09	1,51E+08	9,77E+08	1,34E+08
	35	1,96E+09	4,68E+07	n/a	1,77E+08	7,80E+09	1,71E+08	9,55E+08	1,64E+08
	40	2,19E+09	6,42E+07	n/a	2,31E+08	4,05E+09	1,19E+08	5,72E+08	4,56E+07
HWA	15	1,11E+09	5,03E+07	7,16E+07	2,33E+08	5,71E+09	1,65E+08	1,67E+09	2,31E+08
	17	3,31E+09	1,83E+08	9,11E+08	8,58E+08	6,19E+09	2,41E+08	1,82E+09	4,03E+08
	36	2,14E+09	1,04E+08	5,16E+08	1,35E+08	5,60E+09	2,00E+08	9,75E+08	1,03E+08
	38	3,60E+09	1,71E+08	1,13E+09	4,52E+08	6,44E+09	2,08E+08	1,17E+09	2,75E+08
CMF	18	2,85E+09	1,21E+08	3,03E+08	6,81E+08	5,73E+09	3,09E+08	1,66E+09	3,28E+08
	19	2,02E+09	1,14E+08	4,67E+08	2,81E+08	8,17E+09	5,41E+08	1,21E+09	4,05E+08
	32	1,88E+09	8,41E+07	2,12E+08	2,05E+08	5,20E+09	1,71E+08	9,28E+08	1,62E+08
	37	2,28E+09	1,27E+08	9,78E+08	2,74E+08	6,91E+09	1,97E+08	1,26E+09	1,26E+08
COF	3	2,06E+09	8,33E+07	6,35E+07	3,77E+08	4,85E+09	2,00E+08	1,18E+09	9,61E+07
	6	1,52E+09	1,60E+08	9,86E+08	5,74E+08	7,93E+09	3,53E+08	2,51E+09	7,64E+08
	9	1,47E+09	1,33E+08	3,94E+08	7,74E+08	5,09E+09	1,78E+08	1,35E+09	3,15E+08
	12	2,12E+09	1,49E+08	7,64E+08	4,59E+08	4,71E+09	1,25E+08	7,82E+08	5,75E+07

3.2.1.2 Gènes de dégradation de l'atrazine : *atzA*, *trzD*, *trzN*

Les valeurs de cycle-seuil Ct des échantillons sont égales, voire supérieures, à celles des Ct des échantillons de contrôle (NTC), ce qui signifie que le nombre de copies des gènes considérés se situe en dessous du seuil de détection.

Néanmoins, l'étude de la cinétique de dégradation montre que les échantillons sont capables de dégrader l'atrazine qui leur est ajoutée (cf. § 3.2.3).

On peut donc supposer que le potentiel dégradant est certes bien présent mais l'abondance des gènes impliqués dans la dégradation métabolique de cet herbicide est trop faible pour être détectée de façon satisfaisante par la méthode de PCR quantitative, même après le traitement des microcosmes de sols avec l'atrazine.

Ces résultats sont partiellement en désaccord avec ceux rapportés par Martin-Laurent *et al.* (2004) qui montraient que les parcelles des sols de la Bouzule étaient bien capables de minéraliser cet herbicide et que les gènes *atzA*, *B* et *C* pouvaient être détectés par qPCR. A cette époque, les parcelles étaient encore traitées avec l'atrazine. Depuis son interdiction en 2003, cet herbicide n'a plus été appliqué et il est probable qu'en conséquence la microflore dégradante ait évolué. Il semblerait donc que le potentiel dégradant enregistré dans le sol ne soit pas la résultante de la voie métabolique connue impliquant les gènes *atz* et *trz*.

3.2.1.3 Communauté *pca* dégradant les composés aromatiques

Le nombre moyen de copies par gramme de sol sec varie entre 9,19.107 et 1,75.108 en 2010 et 1,67.108 et 3,05.108 en 2011.

Un test ANOVA ($\alpha=0,05$) sur les valeurs transformées montre qu'il n'existe pas de différence significative ($p>0,05$) entre les différents traitements ($p=0,205$), quelle que soit l'année (Tableau 13).

La nature de la source d'épandage ne semble donc pas influencer l'abondance de la communauté *pca* dans les différentes parcelles de la Bouzule contrairement aux observations rapportées par El Azhari *et al.* (2012). Il est probable que la différence entre ces deux études réside dans le fait que les quantités d'amendement organiques apportées sur le dispositif de Couhins étaient bien supérieures à celles apportées sur le site de la Bouzule. Par ailleurs, les applications de matières organiques sur le site de Couhins ont conduit à l'accumulation de métaux lourds qui sont probablement la cause de la modification durable de la structure, de l'abondance et de la diversité des communautés microbiennes.

3.2.1.4 Gène impliqué dans la nitrification : *amoA*

L'abondance de la communauté bactérienne impliquée dans la nitrification a été quantifiée. Ainsi, le nombre moyen de copies par gramme de sol sec que nous avons mesuré pour chacun des deux gènes *amoA* (A : Crenarchae et B : Bactéries) est le suivant :

gène *amoAA*

En 2010 : il varie de 3,39.108 à 1,83.109,

En 2011 : il varie de 9,32.108 à 1,94.109.

gène *amoAB*

En 2010 : il varie de 1,45.108 à 8,49.108,

En 2011 : il varie de 1,40. 108 à 4,33. 108.

Un test ANOVA ($\alpha=0,05$) sur les valeurs transformées ne révèle aucune différence significative ($p>0,05$) entre les différents traitements pour le gène *amoA* chez les Crenarchae ($p=0,861$), a contrario de ce même gène dans la communauté bactérienne globale ($p=0,036$). Néanmoins, malgré cette différence significative, il n'y a plus de différence notable lorsqu'on se focalise sur les comparaisons par paire (test *a posteriori*, correction de Bonferroni, $\alpha'=0,001$). En effet, les valeurs de *p* pour chaque comparaison sont toutes supérieures au seuil corrigé α' (Tableau 13).

En conséquence, huit ans après l'apport de boues d'épuration, la nature de la source d'épandage ne semble pas influencer l'abondance de la communauté nitrifiante, aussi bien dans la communauté bactérienne globale que chez les Crenarchae.

3.2.1.5 Évolution de l'abondance entre 2010 et 2011

Pour chaque gène considéré, on note en outre une différence significative (ANOVA, $p<0,05$) du nombre de copies moyens entre 2010 et 2011 (Tableau 13, colonne 1). Cette différence est toutefois indépendante des différents traitements appliqués sur la parcelle de La Bouzule (Tableau 13, colonne 3).

Cet effet annuel peut s'expliquer par le fait que l'abondance bactérienne est dépendante de nombreux facteurs dont le pédoclimat et les pratiques agronomiques (Hafeez et al., 2012). Ainsi, les variations saisonnières (température, humidité, types de cultures,...) influencent l'abondance de la communauté microbienne des sols bactéries mesurée par qPCR.

3.2.1.6 Abondance spécifique relative

Les rapports moyens permettent d'apprécier la proportion de chaque communauté microbienne fonctionnelle considérée (pcaH, amoAB) au sein de la communauté globale (ADNr 16S). On peut également apprécier le rapport amoAA/amoAB pour évaluer l'importance des Crenarchaea dans le processus de nitrification vis-à-vis de la communauté bactérienne amoA globale.

Les valeurs moyennes de ces rapports sont présentées sur les Figure 23, Figure 24 et Figure 25, tandis que les valeurs p du test ANOVA sont présentées dans le Tableau 15. Nous avons réalisé un test ANOVA ($\alpha=0,05$) sur les valeurs transformées ($\log_{10}$) pour chacun des rapports considérés.

Nous avons observé une différence significative ($p=0,003$) en ce qui concerne le rapport pcaH/16S dans les cas suivants (test a posteriori, correction de Bonferroni, $\alpha'=0,001$) : LSS et LDCSSO ($p=0,0002$), LSS et COF ($p=0,0003$), LSS et LDCSS ($p=0,001$). D'une part, nous remarquons que l'abondance spécifique de la communauté bactérienne pca, dégradant le protochatéchuete, est diminuée dans l'échantillon issu de boues urbaines peu déshydratées (LSS) par rapport au témoin à haute fertilisation (COF) mais pas par rapport aux deux autres témoins (CWP et CMF). D'autre part, la valeur moyenne relevée pour l'échantillon LSS est inférieure à celles observées dans les échantillons de boues urbaines déshydratées (LDSS) et de boues urbaines compostées et mélangées à des polluants organiques (LDCSSO) qui, elles, ne sont pas significativement différentes de celles des trois témoins. Par conséquent, seul le traitement LSS semble avoir affecté l'abondance spécifique de la communauté pcaH.

Au sujet du rapport amoAB/16S, il existe une différence significative ($p=0,0005$) et plus particulièrement (test a posteriori, correction de Bonferroni, $\alpha'=0,001$) entre les modalités témoin CWP et COF ($p<0,0001$), CWP et LDCSS ($p<0,0001$), CWP et LDSS ($p<0,0001$), CWP et LSS ($p=0,0001$), CWP et MPS ($p=0,0002$), CWP et HWA ($p=0,001$). Nous remarquons donc que l'abondance relative de la communauté bactérienne nitrifiante est augmentée de manière significative dans le cas des traitements de LSS, LDSS, LDCSS et de boues de papeterie (MPS) par rapport au témoin CWP mais pas des deux autres témoins (COF et CMF).

Enfin, nous avons aussi mis en évidence une différence significative ($p=0,015$) dans le cadre du rapport amoAA/amoAB sur les paires suivantes (test a posteriori, correction de Bonferroni, $\alpha'=0,001$) : CWP et MPS ($p=0,0004$), CWP et LSS ($p=0,001$).

Ainsi, c'est essentiellement le nouveau témoin CWP introduit récemment qui se distingue, ce qui laisse à penser qu'aucun effet résiduel des traitements n'a été mis en évidence sur ces paramètres.

Tableau 15 : Valeurs de p données par le test ANOVA effectué sur les rapports pcaH/16S, amoAB/16S et amoAA/amoAB soumis à une transformation logarithmique, pour chacun des onze traitements d'épandage de l'étude

Rapport \ Facteur	Année	Traitement	Année x Traitement
pcaH/ADNr 16S	<0,0001***	0,003***	0,409
amoAB/ADNr 16S	<0,0001***	0,0005***	0,055
amoAA/amoAB	<0,0001***	0,015**	0,743

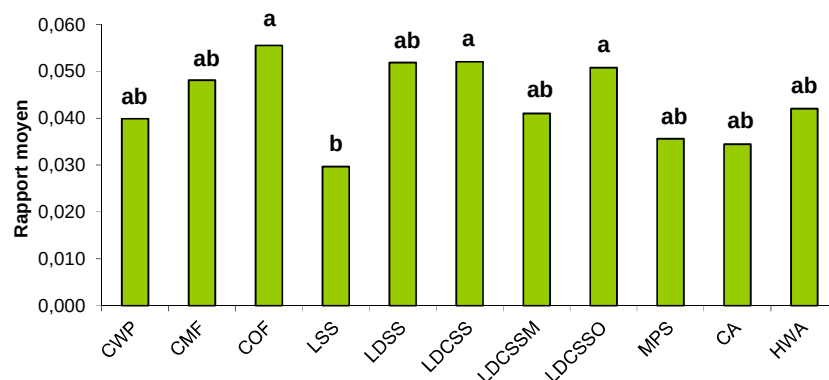


Figure 23 : Rapports moyens du nombre de copies du gène *pcaH* au nombre de copies du gène ADNr 16S pour chaque traitement considéré, années confondues

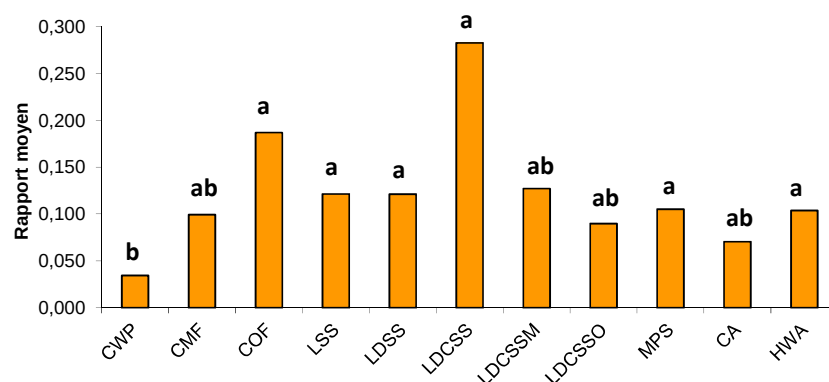


Figure 24 : Rapports moyens du nombre de copies du gène *amoAB* au nombre de copies du gène ADNr 16S pour chaque traitement considéré, années confondues

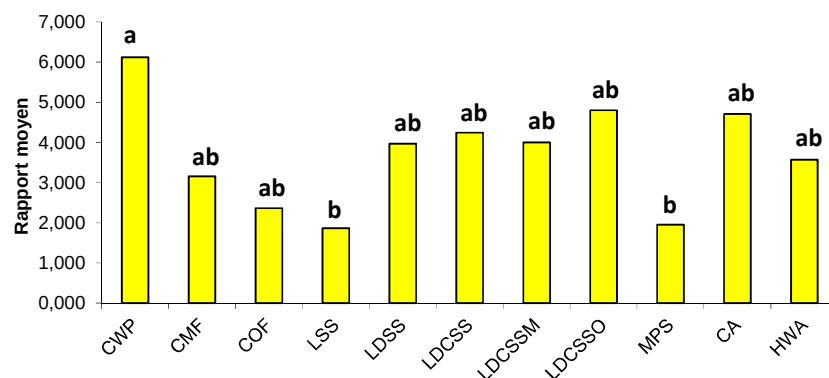


Figure 25 : Rapports moyens du nombre de copies du gène *amoAA* au nombre de copies du gène *amoAB*, pour chaque traitement considéré, années confondues

3.2.2 Structure de la communauté bactérienne

La structure de la communauté globale, pour l'ensemble des traitements, en 2010 et 2011 est représentée sous forme d'une analyse en composantes principales (ACP) (Figure 26).

L'analyse en composantes principales de la structure globale des communautés microbiennes en 2010 montre que seulement 25,60 % de la variance observée sont représentés dans le plan ACP (14,40% sur l'axe 1 et 11,20 % sur l'axe 2). Les ellipses correspondant aux différents traitements se chevauchant, il semblerait donc que la structure des communautés microbiennes soit similaire d'un traitement à l'autre. Toutefois, selon l'axe 1, CWP est différent du traitement LDSS et, selon l'axe 2, du traitement CMF. On notera ici que le témoin CWP est le traitement le plus isolé des autres.

Par contre, près de 53,5 % de la variance observée sont représentés dans le plan ACP (39 % sur l'axe 1 et 14,5 % sur l'axe 2) pour l'année 2011.

De ces analyses en composantes principales, il ressort peu de différences structurales entre les échantillons — sauf exceptions (MPS en 2010, COF et CMF en 2011), qui peuvent s'interpréter par un biais d'échantillonnage et/ou de mesure, ou tout simplement que la résilience est différentielle selon l'amendement —, ce qui montre encore une fois la résilience effective du milieu, quel que soit le type d'amendement considéré.

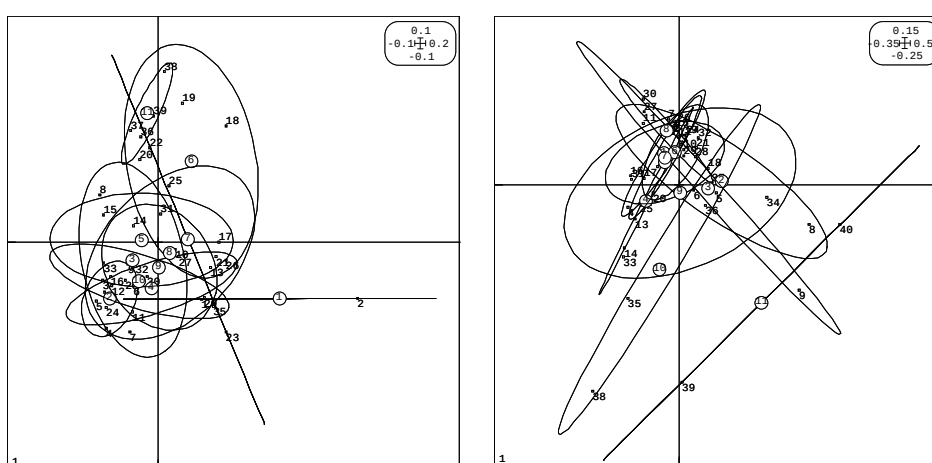


Figure 26 : Représentation graphique (ACP) de l'ensemble des onze traitements de la parcelle de la Bouzule en 2010 (gauche) et 2011 (droite) (1. CWP; 2. LSS: boues urbaines peu déshydratées; 3. LDSS: boues urbaines déshydratées; 4. LDCSS: boues urbaines compostées; 5. LDCSSO: boues urbaines compostées et polluants organiques; 6. LDCSSM: boues urbaines compostées et polluants minéraux; 7. MPS: boue de papeterie; 8. CA: cendres de combustion; 9. HWA: compost d'ordures ménagères; 10. CMF: témoin à fertilisation minérale basse; 11. COF: témoin à fertilisation minérale haute)

3.2.3 Impact de l'ajout d'atrazine sur la structure globale, l'abondance et le potentiel dégradant de la communauté bactérienne en 2010

3.2.3.1 Effet sur l'abondance

3.2.3.1.1 De la communauté globale ADNr 16S

Les valeurs moyennes pour chaque traitement sont présentées dans le Tableau 16, colonne 2. Nous avons également réalisé un test ANOVA ($\alpha=0,05$) sur les valeurs transformées dont le résultat est affiché dans le Tableau 16, colonne 3.

L'abondance de l'échantillon ayant reçu le traitement LDSS est significativement différente de celles de LSS ($p=0,024$), LDCSSO ($p=0,028$), LDCSSM ($p=0,042$), MPS ($p=0,031$) et CA ($p=0,049$), tandis que l'abondance de l'échantillon ayant reçu le traitement LSS est significativement différente de celle de COF ($p=0,046$). Notons enfin que malgré l'absence de significativité pour les modalités LDCSSO, LDCSSM, MPS et CA par rapport à la modalité COF, la valeur de p calculée est relativement proche de la valeur critique α (0,053, 0,078, 0,058, 0,09 respectivement).

On observe par ailleurs une augmentation significative (ANOVA en mesures répétée, $\alpha=0,05$) du nombre de copies par gramme de sol sec, quel que soit le traitement, par rapport à celui avant l'ajout d'atrazine (voir Tableau 14), les modalités LDCSSO, LDCSSM, MPS et CA semblant être les plus sensibles au traitement herbicide. Toutefois, même si les différences observées sont statistiques, les

valeurs observées demeurent dans la gamme de variation de l'abondance globale bactérienne quantifiée par qPCR.

Traitement	Nb de copies/g de sol sec	Résultat du test ANOVA
CWP	3,63E+09	ABC
CMF	4,26E+09	ABC
COF	2,95E+09	AB
LSS	6,16E+09	C
LDSS	3,06E+09	A
LDCSS	3,67E+09	ABC
LDCSSO	6,14E+09	BC
LDCSSM	6,33E+09	BC
MPS	5,67E+09	BC
CA	6,47E+09	BC
HWA	5,07E+09	ABC

Tableau 16 : Valeurs moyennes du nombre de copies de gènes d'ADNr 16S par gramme de sol sec pour chacun des onze traitements considérés après l'ajout d'atrazine dans les échantillons, mesurées par qPCR et associées aux résultats du test ANOVA ($\alpha=0,05$)

3.2.3.1.2 Des communautés atzA, trzD et trzN

Les valeurs de cycle-seuil Ct des échantillons sont égales, voire supérieures, à celles des Ct des échantillons de contrôle (NTC), ce qui signifie que le nombre de copies des gènes considérés se situe en dessous du seuil de détection.

Des conclusions similaires à celles établies dans le paragraphe 3.2.1.2 peuvent être dressées. Ainsi, le potentiel dégradant est présent mais indétectable par qPCR, l'abondance des gènes impliqués dans cette dégradation étant trop faible pour être détectée.

3.2.3.2 Effet sur la structure (A-RISA)

La structure de la communauté bactérienne globale a été mesurée par A-RISA, pour l'ensemble des traitements, est représentée sous forme d'une analyse en composantes principales (ACP), évoquée sur la Figure 27.

Le traitement atrazine des microcosmes de sol ne modifie pas drastiquement la structure de la communauté : on retrouve ainsi la modalité "boue de papeterie" (MPS) à part des autres, tandis que les valeurs sur les axes 1 et 2 sont sensiblement du même ordre de grandeur que celles en 2010, avant ajout.

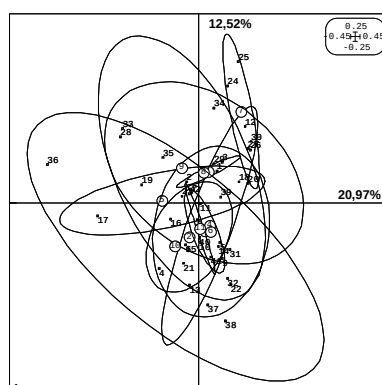


Figure 27 : Représentation graphique (ACP) de l'ensemble des onze traitements, après supplément d'atrazine (t=21 j.) (1. CWP; 2. LSS: boues urbaines peu déshydratées; 3.

LDSS: boues urbaines déshydratées; 4. LDCSS: boues urbaines compostées; 5. LDCSSO: boues urbaines compostées et polluants organiques; 6. LDCSSM: boues urbaines compostées et polluants minéraux; 7. MPS: boue de papeterie; 8. CA: cendres de combustion; 9. HWA: compost d'ordures ménagères; 10. CMF: témoin à fertilisation minérale basse; 11. COF: témoin à fertilisation minérale haute)

3.2.3.3 Cinétique de minéralisation

3.2.3.3.1 Méthode

Les 44 échantillons ont été traités à équivalence de 10 g de sol sec avec 500 µl d'atrazine à concentration de 30 mg/l (soit 1,5 mg/kg), marquée au ^{14}C sur le cycle s-triazine (4,3 kBq), puis incubés à 20°C pendant 87 jours. Au cours de l'incubation, la quantité d'herbicide marqué au ^{14}C transformé en $^{14}\text{CO}_2$ a été évaluée par comptage à scintillation liquide. Nous avons effectué un total de 15 prélèvements réguliers.

Ces mesures nous ont alors permis de calculer d'une vitesse de dégradation selon la formule :

$$VD_t = (\%_t - \%_{t-1}) / (t - t^{-1})$$

3.2.3.3.2 Cinétique de dégradation

La cinétique de dégradation de l'atrazine est représentée pour chacun des traitements sur la Figure 28.

Il existe une différence significative (ANOVA en mesures répétées, $p < 0,0001$), fonction de la durée (ANOVA MR, $p < 0,0001$, à $T = 43$ j) et du type de traitement (ANOVA en MR, $p < 0,0001$), en l'occurrence les traitements témoin CWP et boues de papeterie MPS, le premier ayant une capacité de dégradation plus faible que les autres traitements jusqu'à $t = 80$ j. environ, tandis que le second voit sa capacité de dégradation ralentir après 43 j d'incubation.

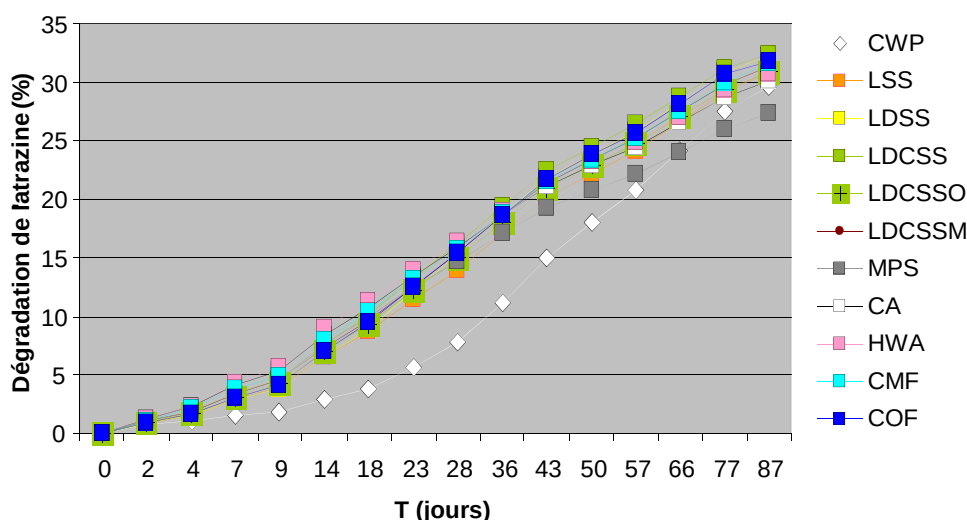


Figure 28 : Cinétique de dégradation de l'atrazine en fonction des différents traitements de la parcelle de La Bouzule

3.2.3.3.3 Vitesse de dégradation

Les courbes de minéralisation de l'atrazine ont été modélisées avec le modèle présenté ci-après :

$$f = a / [1 + \exp(-(x - x_0)/b)] + c \cdot x$$

où :

a : valeur maximale de dégradation (% $^{14}\text{CO}_2$)

b : vitesse de dégradation (% ^{14}C /jour)

x_0 : temps de latence (jour)

La vitesse de dégradation de l'atrazine calculée par la modélisation des cinétiques de minéralisation est représentée pour chacun des traitements sur la Figure 29. Nous avons effectué un test de Kruskal-Wallis (10 ddl, $\alpha = 0,05$) sur chacun de ces paramètres afin de discerner un éventuel effet significatif de l'apport de boues (données non représentées).

En conclusion :

- valeur maximale de dégradation (a) : il n'y a pas de différence significative ($p = 0,054$); notons toutefois une valeur p proche du seuil α ,
- vitesse de dégradation (b) : il existe une différence significative ($p = 0,012$) pour HWA et MPS par rapport au témoin CWP,

- temps de latence (x_0) : il existe une différence significative ($p=0,0002$) pour HWA, CA et MPS par rapport au témoin CWP.

La vitesse optimale de minéralisation de l'atrazine est atteinte après 21 jours d'incubation. Les modalités HWA, MPS et CA sont significativement différentes de la modalité Témoin CWP mais pas des sept autres modalités. Par ailleurs, le groupe CWP atteint la vitesse optimale de minéralisation plus tard, comparativement aux autres.

L'ensemble de ces données pose la question du témoin CWP introduit tardivement dans l'expérimentation et qui, en conséquence, n'a probablement pas été exposé à l'atrazine comme l'a été le reste de la parcelle cultivée avec le maïs et désherbée par cet herbicide. Par conséquent, la microflore du sol des parcelles du groupe CWP n'est pas adaptée de manière optimale à la biodégradation de l'atrazine, expliquant sa plus faible capacité à minéraliser cet herbicide, d'autant que cette modalité a été en outre établie en bordure de la parcelle cultivée.

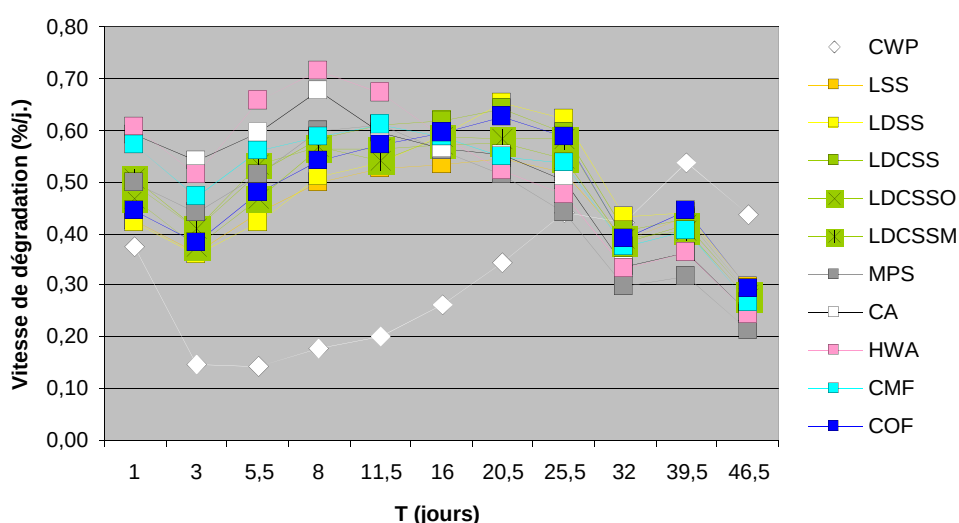


Figure 29 : Vitesses de dégradation de l'atrazine en fonction des différents traitements de la parcelle de La Bouzule

3.2.3.4 Conclusion

Le traitement des sols avec l'atrazine a montré que le sol de La Bouzule présentait toujours une microflore adaptée à la biodégradation de l'atrazine. Toutefois, les gènes *atz* et *trz* codant pour des enzymes impliquées dans la voie métabolique de l'atrazine n'ont pas pu être détectés alors qu'ils l'étaient précédemment (Martin-Laurent *et al.*, 2004). Il est probable que l'arrêt de l'application régulière de cet herbicide sur les parcelles de La Bouzule ait conduit à un changement du potentiel génétique dégradant de la microflore. Par ailleurs, nous avons observé un effet des traitements "compost d'ordures ménagères" (HWA), "cendres de combustion" (CA) et "boue de papeterie" (MPS) sur la capacité de dégradation de la microflore. Ainsi, nous avons montré que leur vitesse de dégradation était significativement plus élevée au départ donc leur temps de latence respectif plus court.

Par ailleurs, le traitement des sols avec l'atrazine ne semble pas modifier la structure des communautés microbiennes mais induire des différences au niveau de l'abondance de la communauté bactérienne selon les traitements. Cette dernière observation suscite des interrogations à propos de la capacité de la microflore des sols à réagir à un stress en fonction de leur état de résilience. En d'autres termes, il serait intéressant d'évaluer la résistance et la résilience des communautés microbiennes issues des différentes parcelles de La Bouzule soumises à différents stress.

3.2.4 Conclusion générale

Les résultats obtenus laissent à penser, du moins avec les outils dont nous disposons, que la résilience de la microflore du sol des parcelles de La Bouzule, dix ans après l'application de boues de station d'épuration, est effective. Toutefois, nous avons pu observer quelques différences

statistiquement significatives pour quelques traitements. Malgré tout, les valeurs observées étaient dans la gamme de variations et l'interprétation de ces données reste difficile à faire car nous manquons de références.

Cette remarque est d'autant plus criante que nous avons pu montrer que le facteur temporel (c'est-à-dire l'année de prélèvement) influençait grandement l'abondance et la structure des communautés microbiennes. Ceci nous amène à conclure que les variations saisonnières jouent un rôle déterminant dans la composition bactérienne du sol, entre autres facteurs physico-chimiques et pédologiques, mais que ce facteur est indépendant du type d'amendements apportés.

De plus, la résilience transparaît au travers de la structure des communautés bactériennes, puisque les ACP n'ont pas permis de mettre en évidence de profondes différences structurales entre les traitements, même après l'ajout d'atrazine aux échantillons. Malgré cela, cette conclusion est à modérer par le fait que ce type d'outils ne permet que d'étudier les populations bactériennes les plus abondantes. Pour avoir une idée des modifications induites sur les populations minoritaires, il aurait fallu employer des techniques d'analyse plus performantes reposant sur le pyro-séquençage d'amplicons d'ARNr 16S obtenus à partir d'ADN extraits des différentes placettes du site de La Bouzule par exemple.

Enfin, nous avons aussi démontré que la microflore du sol de La Bouzule conservait sa capacité à dégrader l'atrazine mais que la composition du potentiel génétique dégradant a évolué depuis l'interdiction d'usage de cet herbicide. En effet, les gènes de dégradation (atzA, trzD, trzN) détectés initialement n'ont pas pu être quantifiés ici.

3.3 Potentiel enzymatique

Les visualisations spatiales par rangées (1 à 11) des résultats d'analyses de potentiel enzymatique en 2010 et 2011 (Figure 30) permettent de mettre en évidence une disparité dans la répartition spatiale des résultats notamment selon les campagnes d'analyses :

- En 2010, les activités sont les plus basses pour le bloc 3 et notamment les rangées 3 et 6 (10-20 µg de fluorescéine / g MS).
- En 2011, les activités enzymatiques basses se retrouvent au niveau des rangées 6, 7 et 8 (10-20 µg de fluorescéine / g MS), les activités du bloc 3 sont équivalentes à celles des autres blocs.

Les données récoltées ne permettent pas d'interpréter les différences observées sur site en 2010 (notamment pour le bloc 3) et 2011 (pour les rangées 7 et 8). Un complément d'informations concernant la topographie du site et/ou des activités anthropiques à proximité pourrait permettre d'expliquer ces différences.

Tableau 17 synthétise les principaux résultats des analyses réalisées au cours des campagnes de prélèvements de 2010 et 2011.

L'analyse des résultats concernant le potentiel enzymatique permet de mettre en évidence que :

- Les activités restent similaires quel que soit le type de produit épandu. Les moyennes sur les 4 blocs par type de produit épandu sont comprises entre 19,9 et 22,3 µg fluorescéine /g MS en 2010 et, 19,0 et 25,5 µg fluorescéine /g MS en 2011 respectivement.
- Les activités sont également peu différentes par bloc quelle que soit la campagne de prélèvement (les activités varient en moyenne de 20,4 à 25,6 µg fluorescéine /g MS).
- Le potentiel enzymatique dans les témoins sans pesticide (CWP) est en revanche nettement plus élevée que celles issues des autres parcelles toute matrice et toute année confondues (en moyenne, par type de produit, 47,3 et 43,5 µg fluorescéine /g MS en 2010 et 2011 respectivement).

Les visualisations spatiales par rangées (1 à 11) des résultats d'analyses de potentiel enzymatique en 2010 et 2011 (Figure 30) permettent de mettre en évidence une disparité dans la répartition spatiale des résultats notamment selon les campagnes d'analyses :

- En 2010, les activités sont les plus basses pour le bloc 3 et notamment les rangées 3 et 6 (10-20 µg de fluorescéine / g MS).
- En 2011, les activités enzymatiques basses se retrouvent au niveau des rangées 6, 7 et 8 (10-20 µg de fluorescéine / g MS), les activités du bloc 3 sont équivalentes à celles des autres

Les données récoltées ne permettent pas d'interpréter les différences observées sur site en 2010 (notamment pour le bloc 3) et 2011 (pour les rangées 7 et 8). Un complément d'informations concernant la topographie du site et/ou des activités anthropiques à proximité pourrait permettre d'expliquer ces différences.

Tableau 17 : Synthèse des résultats d'analyses du potentiel enzymatique des campagnes 2010 et 2011.

Code	2010	2011	Moyenne 2010 / type de produit	Moyenne 2011 / type de produit
			µg de fluorescéine / g MS	µg de fluorescéine / g MS
Bloc 4				

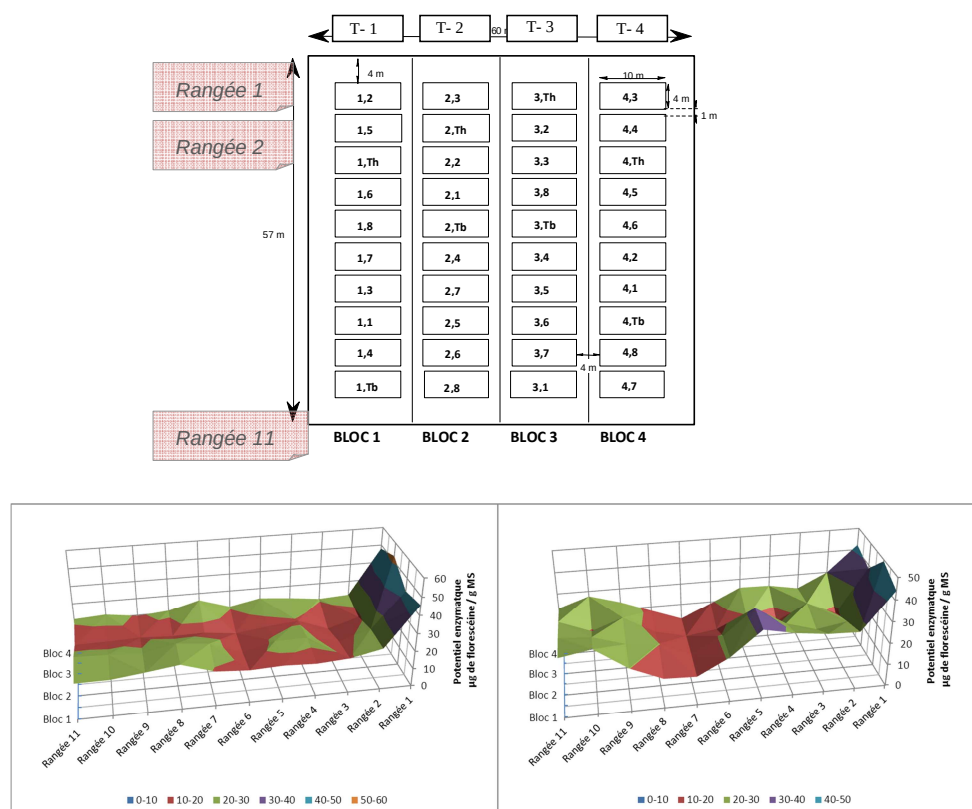


Figure 30 : Visualisation spatiale du potentiel enzymatique sur les parcelles et blocs du dispositif expérimental de la Bouzule pour 2010 (bas gauche) et 2011 (bas droite)

3.4 Microarthropodes

3.4.1 Abondance et Fréquence

Les Collembolles apparaissent comme le groupe dominant des microarthropodes, suivis par les acariens. Les autres Arthropodes (myriapodes, larves, petits insectes...) sont significativement beaucoup moins abondants (Figure 31).

Parmi les acariens, Actinedida et Oribatida sont co-dominants, puis viennent les prédateurs Gamasida. Les Acaridida sont très faiblement abondants (Figure 32).

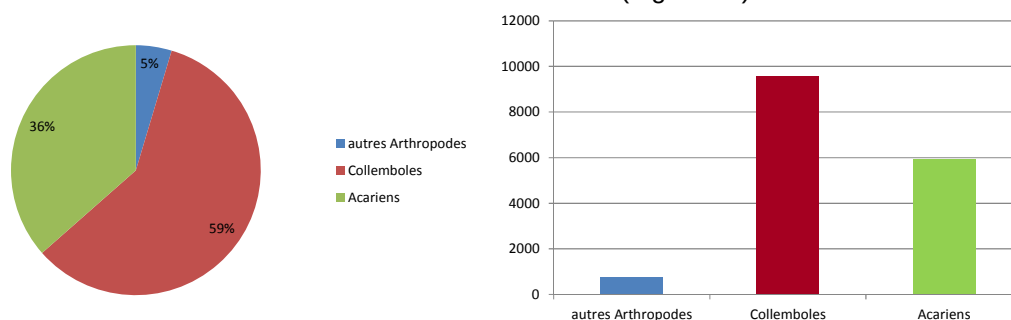


Figure 31 : Fréquence relative (gauche) et abondance moyenne (nombre ind. m⁻²) (droite) des 3 principaux groupes de microarthropodes observés sur le site de la Bouzule

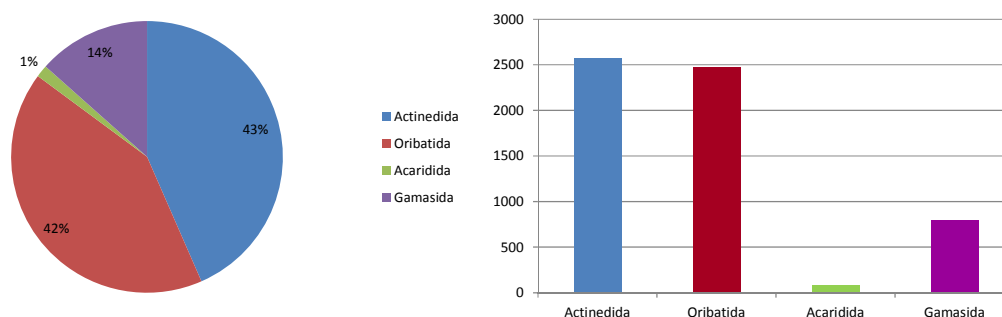


Figure 32 : Fréquence relative (gauche) et abondance moyenne (nombre ind. m⁻²) (droite) des 4 groupes d'acariens identifiés sur le site de la Bouzule

Les abondances rencontrées présentent très peu de différences significatives entre traitements. On notera une absence d'effet traitement sur l'abondance totale en microarthropodes (Figure 33), l'abondance totale en Collembolles et en acariens (Figure 34). En revanche les abondances du groupe « autres Arthropodes » présentent des différences significatives entre traitements, avec des valeurs plus élevées en CWP par rapport à CA, LSS, LDSS, LDCSSO, MPS, HWA.



Figure 33 : Abondances moyennes en microarthropodes totaux en fonction des traitements sur le site de la Bouzule en 2010

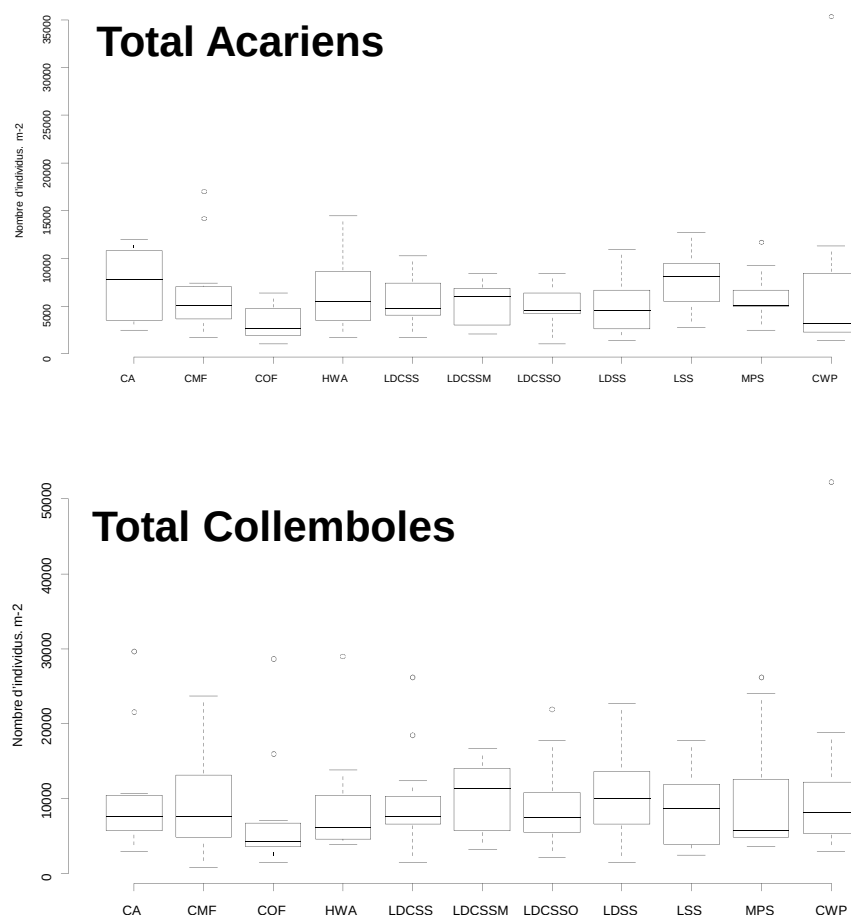


Figure 34 : Abondances moyennes en acariens et collemboles en fonction des traitements sur le site de la Bouzule en 2010

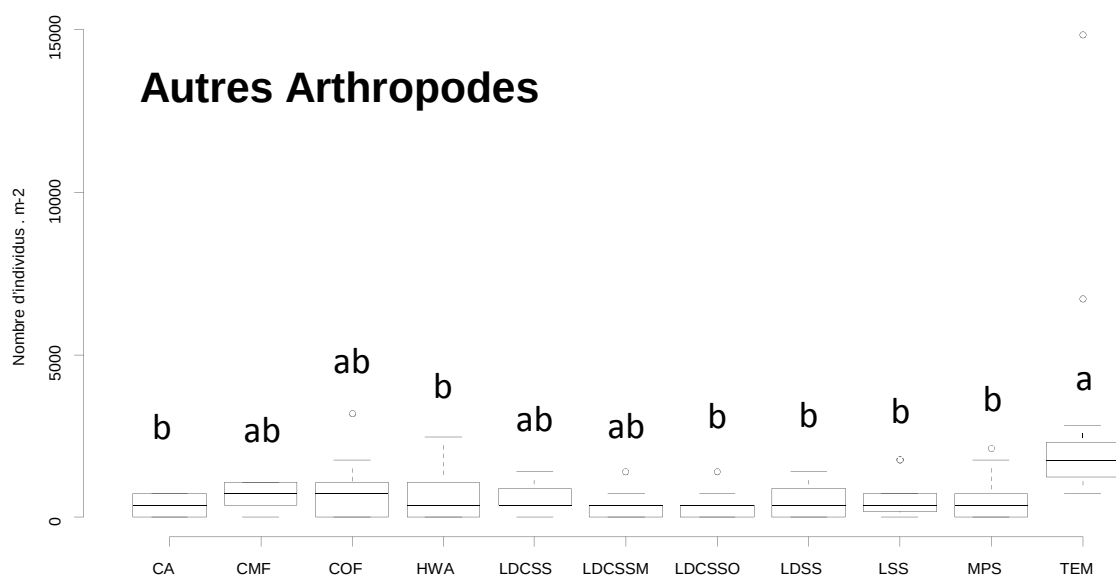


Figure 35 : Abondances moyennes des « autres Arthropodes » en fonction des traitements sur le site de la Bouzule en 2010

Concernant les acariens, seuls les Actinedida présentent quelques différences significatives entre traitements, avec des abondances plus élevées en LSS par rapport à COF et LDCSSM. Les autres groupes (Oribatida, Gamasida et Actinedida) montrent des abondances similaires, quel que soit le traitement considéré (Figure 36).

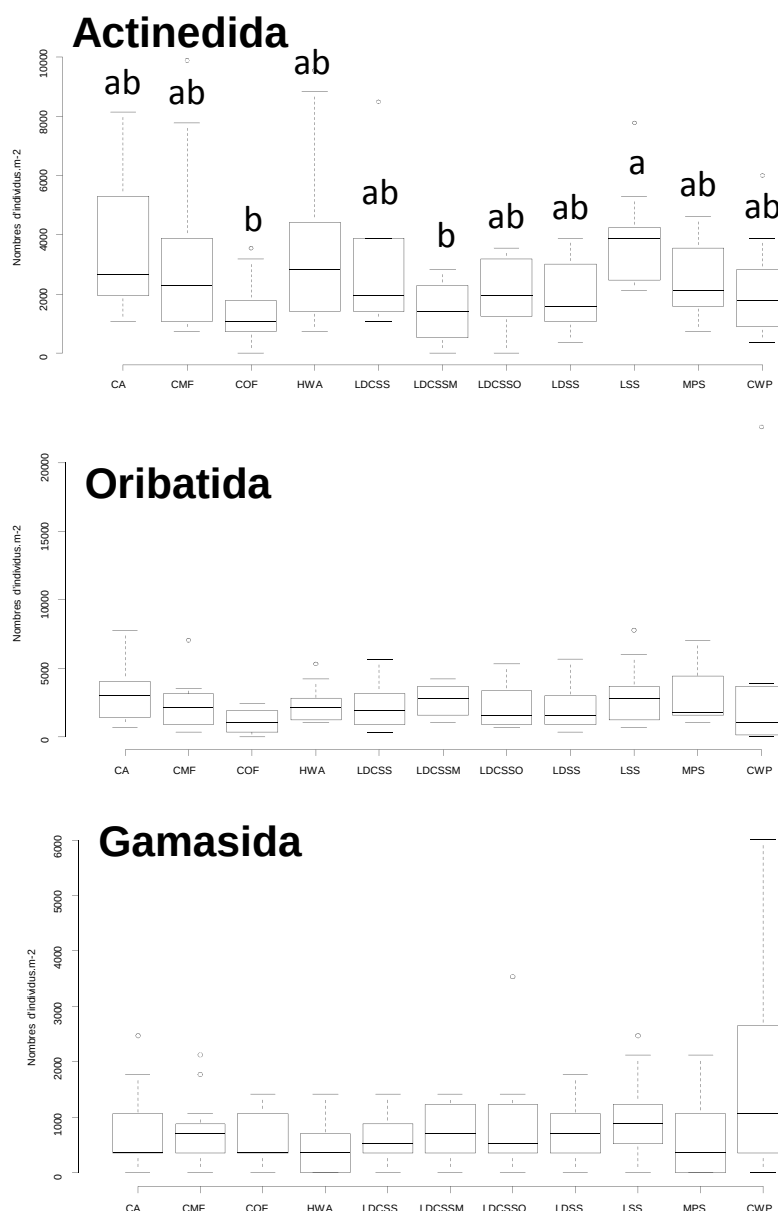


Figure 36 : Abondances moyennes des trois principaux groupes d'acariens du sol en fonction des traitements sur le site de la Bouzule en 2010

3.4.2 Richesse et diversité des collemboles

Au total, 28 taxons de collemboles ont pu être identifiés. 6 taxons représentent plus de 90% des individus récoltés (

Figure 37).

Trois espèces montrent des différences significatives entre traitements : 1) *Pseudosinella alba*, espèce peu abondante, sur laquelle le test de Kruskal-Wallis montre un effet traitement significatif, mais dont les tests 2 à 2 ne permettent pas de différencier les traitements, avec toutefois une tendance à être plus abondante dans le témoin CWP par rapport aux autres traitements ; 2) *Parisetoma notabilis*, espèce cosmopolite, fréquemment rencontrée dans tous les types de sols, significativement plus abondante en CWP par rapport à LDCSS et LDCSSO ; 3) *Mesaphorura* sp., second taxon le plus abondant sur le site, pour lequel le test de Kruskal-Wallis montre un effet traitement significatif, mais dont les tests 2 à 2 ne permettent pas de différencier les traitements, avec toutefois une tendance à être plus abondante dans les sols ayant reçu des boues et composts de boues (LSS, LDSS, LDCSS, LDCSSO, LDCSSM) ainsi que des ordures ménagères (HWA) (Figure 38).

Les richesses et diversités (indice de Shannon) en collemboles calculées pour chaque échantillon ne montrent aucune différence significative entre traitements (Figure 39).

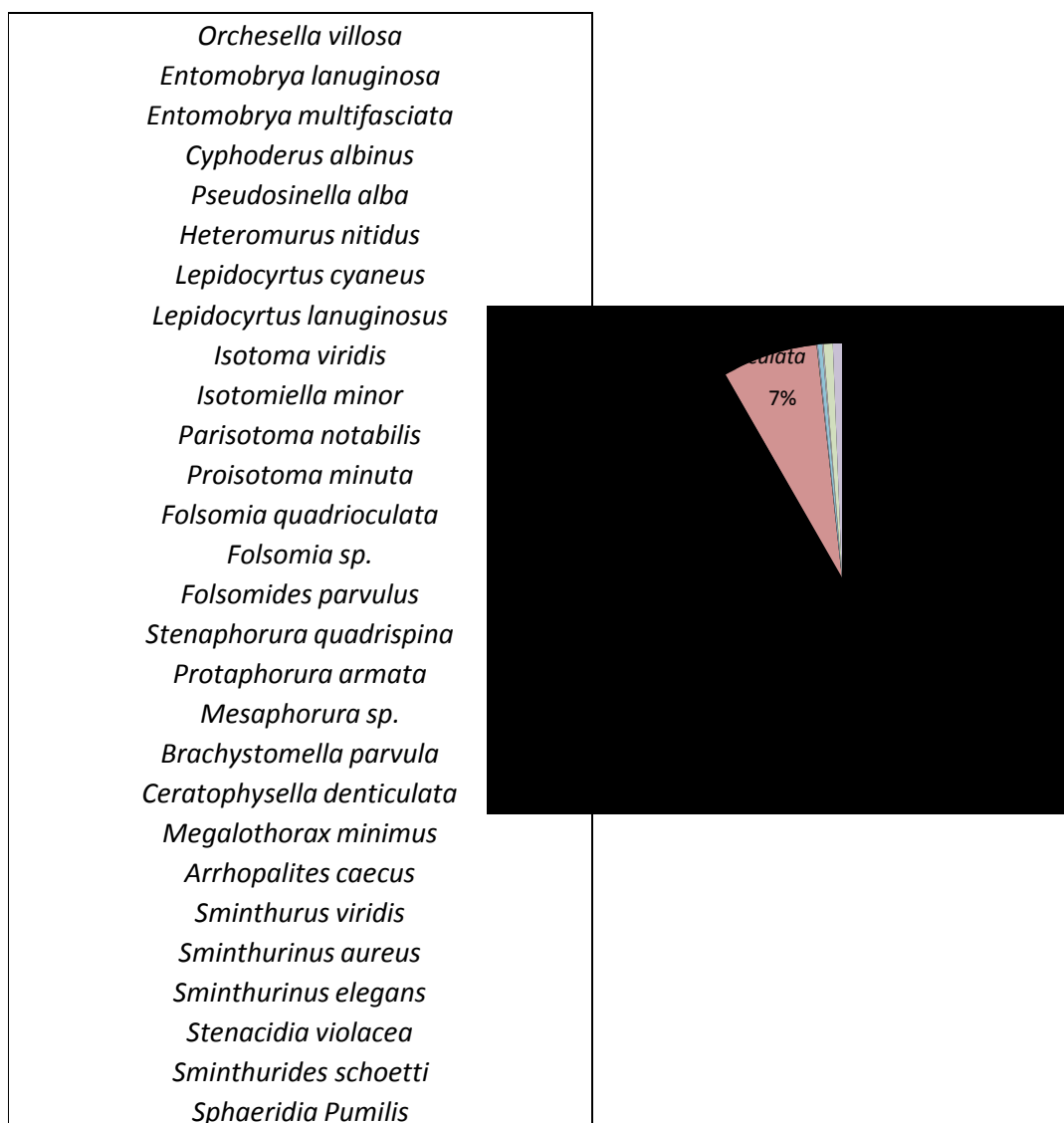


Figure 37 : Liste des espèces et fréquence relative des collemboles récoltés sur le site de la Bouzule en 2010

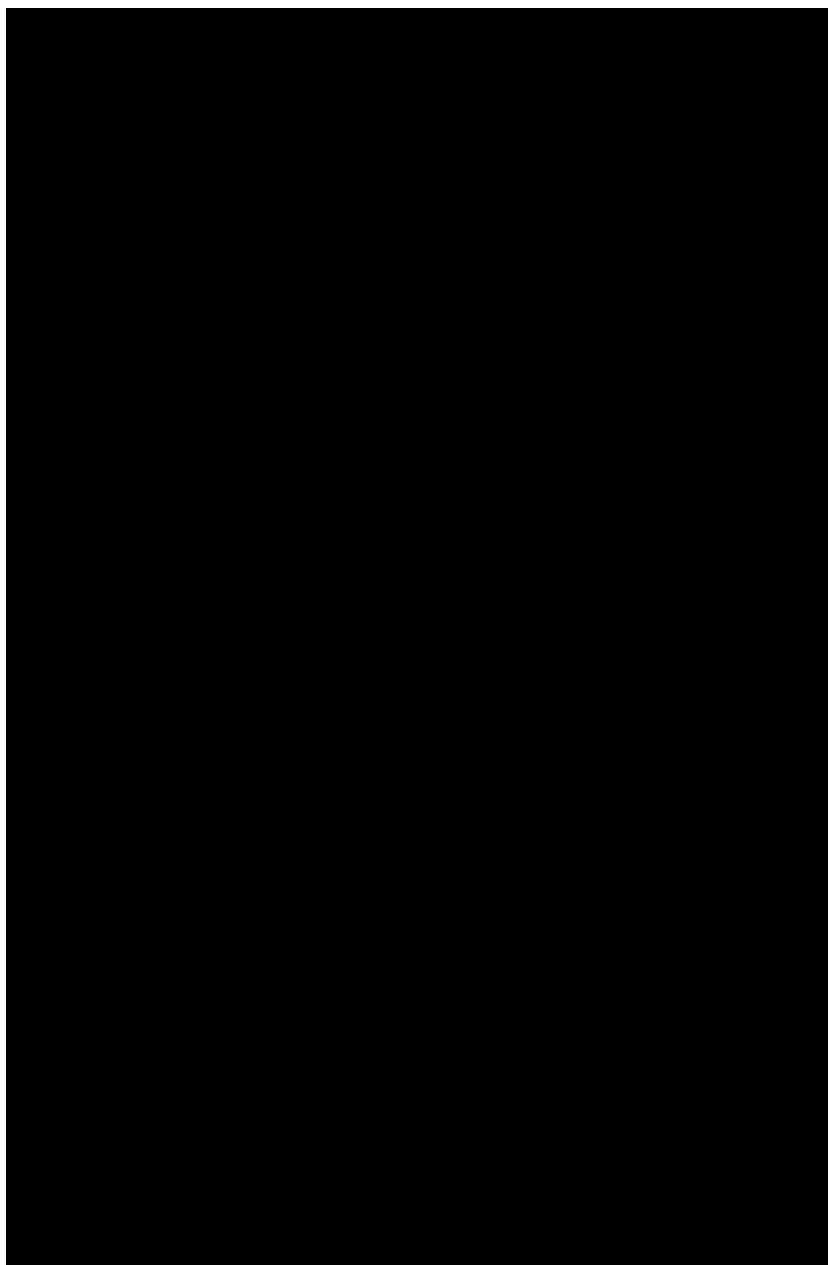


Figure 38 : Abondances moyennes des trois taxons de collemboles montrant une différence significative entre traitements sur le site de la Bouzule en 2010 (test de kruskal-Wallis). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre traitements sur les tests post-hoc 2 à 2.

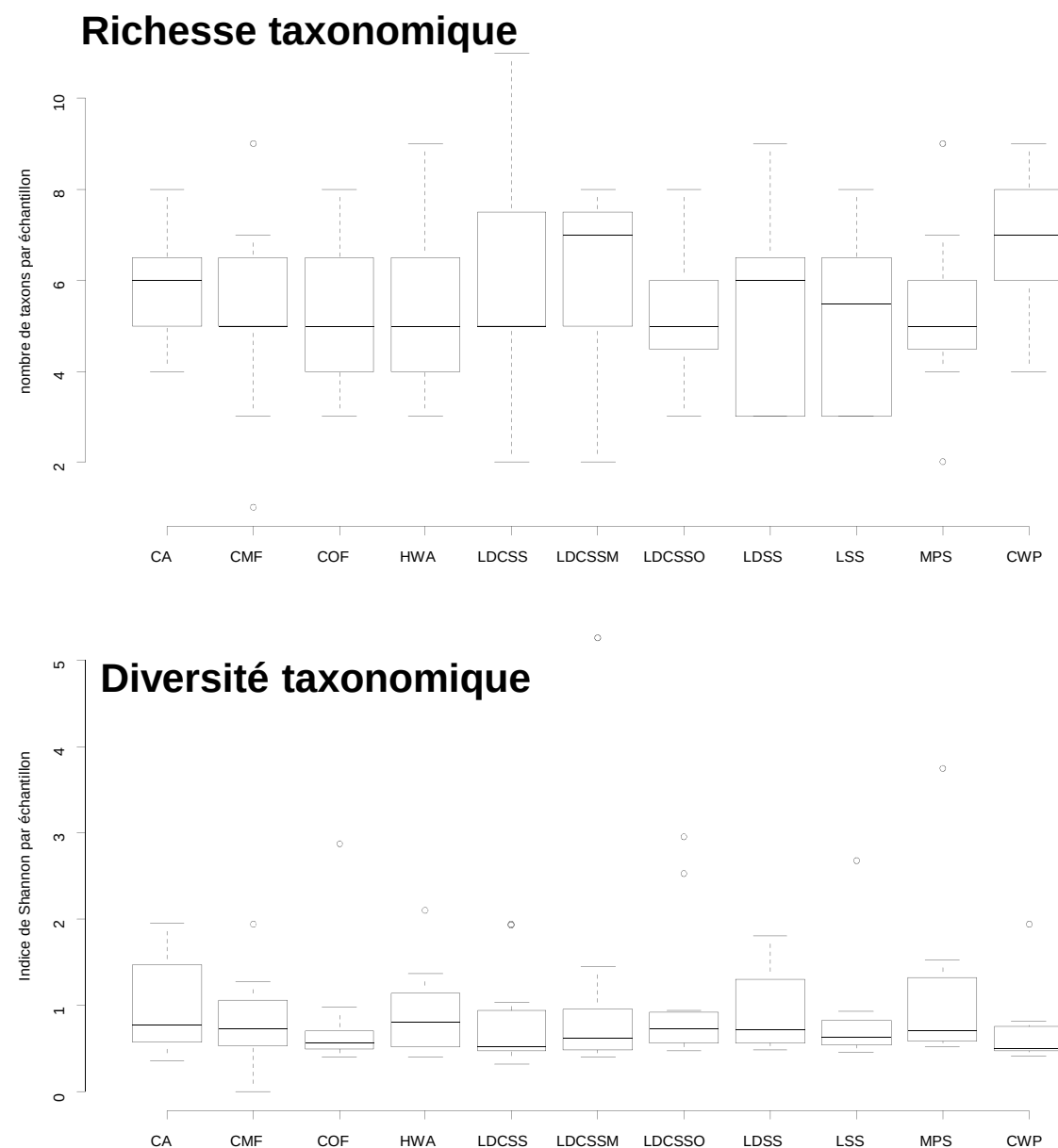


Figure 39 : Richesse et diversité taxonomique des collemboles sur le site de la Bouzule en 2010

3.4.3 Structure des communautés

Les analyses en composantes principales calculées sur les abondances, richesse et diversité, montrent un nuage peu structuré avec environ 20% de la variance sur les 2 premiers axes (Figure 40). Les tests de Kruskal-Wallis effectués sur l'axe 1 ne permettent pas de mettre en évidence un effet traitement. En revanche, sur l'axe 2, on note une différence significative entre le traitement CWP et les traitements CA, CMF, LSS, LDSS, LDCSS, LDCSSO, MPS, HWA. C'est donc le témoin récemment créé qui se différencie des autres parcelles, avec une richesse taxonomique plus importante que les autres modalités, une abondance plus élevée pour certains taxons (*Parisotoma notabilis*, *Isotomiella minor*), et une diversité taxonomique plus faible.

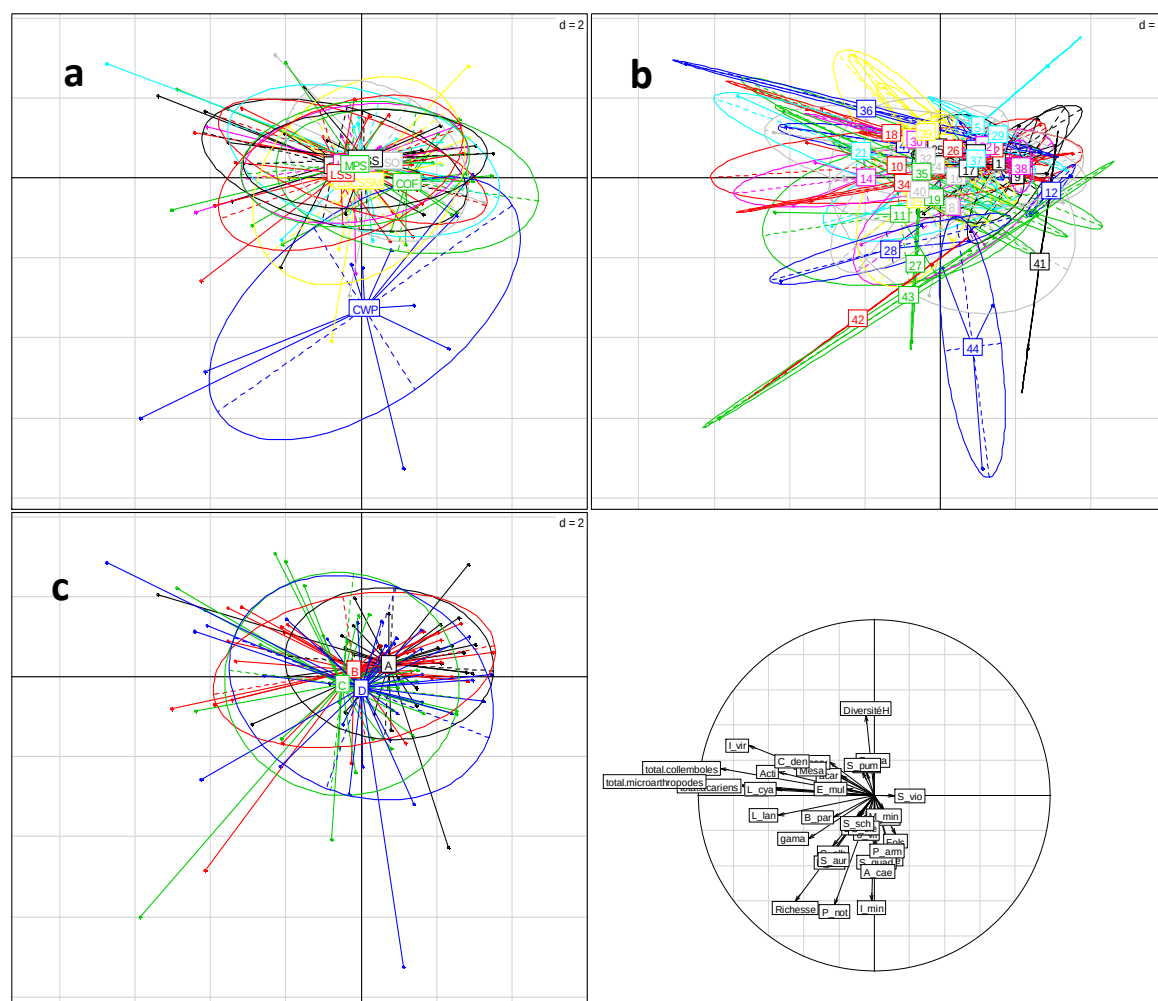


Figure 40 : Analyse en Composantes Principales (projection des échantillons et cercle des corrélations sur plan formé par les axes 1 (13,3% de la variance) et 2 (7% de la variance)) sur les abondances en microarthropodes du sol récoltés sur le site de la Bouzule en 2010. Les échantillons sont représentés par traitement (a), parcelle (b) ou bloc (c).

3.5 Macrofaune

3.5.1 Abondance et biomasse de la macrofaune totale

Sur le site, 14 ordres de la macrofaune du sol ont été échantillonnés (Oligochaeta, Opisthophora, Malacostraca, Isopoda, Gastropoda, Arachnida, Chilopoda, Lithobiomorpha, Geophilomorpha et Scolopendromorpha, Diplopoda, Iulida et Polydesma, Insecta, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Heteroptera et Lepidoptera). L'abondance moyenne de la macrofaune totale, qui variait entre 444 individus m^{-2} pour le traitement CA et 640 individus m^{-2} pour le traitement HWA, ne présentait pas de différence significative entre les différents traitements testés (Figure 41). L'abondance moyenne sur tous les traitements est de $530.2 \pm$ individus m^{-2} . Aucune différence significative n'a été trouvée pour les abondances des différents taxons en fonction des traitements.

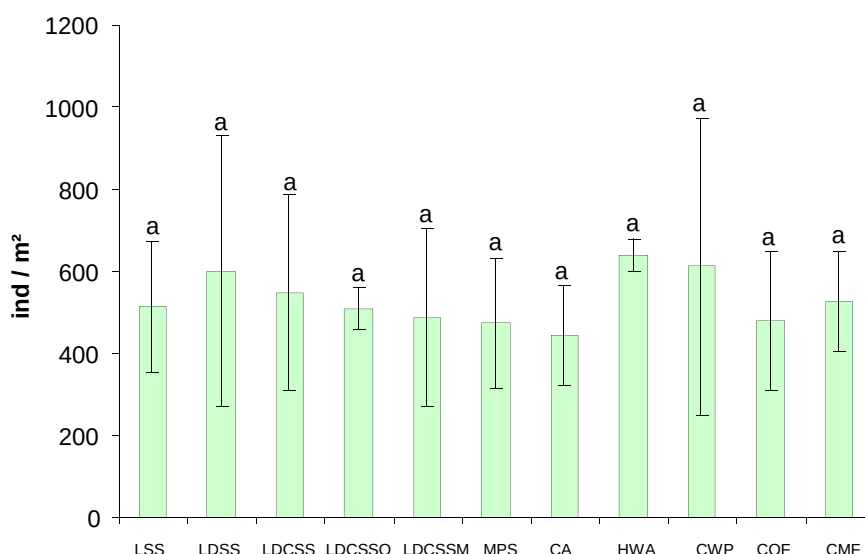


Figure 41 : Abondance moyenne de la macrofaune totale (individus m⁻²) au printemps 2010 par traitement d'épandages effectués sur les 44 parcelles du site de La Bouzule

Sur le site, huit espèces de vers de terre ont été échantillonnées. A savoir, *Allolobophora chlorotica*, *Aporrectodea caliginosa*, *Aporrectodea rosea*, *Aporrectodea icterica*, *Aporrectodea longa*, *Murchieona minuscula*, *Satchellius mammalis*, *Lumbricus castaneus*. L'abondance totale des vers de terre, qui variait entre 148 individus m⁻² en moyenne pour le traitement MPS et 276 individus m⁻² pour le traitement LDCSSO, ne présentait aucune différence significative entre les différents traitements (Figure 42). L'abondance moyenne des vers de terre sur le dispositif est de 204.1 individus m⁻². Aucune différence significative n'a été trouvée pour l'abondance de chaque espèce en fonction des traitements.

La biomasse totale de vers de terre varie entre les traitements de 37.6 g.m⁻² pour le Témoin sans pesticides (CWP) à 103.9 g.m⁻² pour le Témoin fertilisation haute (COF). La biomasse de vers de terre ne présentait aucune différence significative entre les différents traitements (Figure 42). La biomasse moyenne des vers de terre sur le dispositif est de 69.4 g m⁻². Aucune différence significative n'avait été trouvée pour la biomasse de chaque espèce en fonction des différents amendements.

3.5.2 Diversité taxonomique

Le nombre d'unités taxonomiques observé variait de 12.25 (CA) à 17.75 (LSS) sans différences significatives entre traitements. Le nombre total et la richesse moyenne d'espèce de vers de terre sur le dispositif étaient de 8 espèces et de 3,02 espèces par point de prélèvement, respectivement. La richesse spécifique moyenne des vers de terre variait de 2 espèces (CMF) à 4 espèces (LSS et COF), sans différences statistiques. La valeur d'équitabilité (J) variait de 0,32 (COF) à 0,70 (CMF), sans différences significatives. Sur le dispositif, la valeur moyenne d'équitabilité était de 0,45. Il faut noter qu'il n'a pas été possible de calculer cet indice pour trois parcelles (9, 34 et 37 correspondant respectivement aux traitements COF, MPS et CMF), car ces relevés ne comptaient qu'une seule espèce. De façon similaire, la diversité des isopodes et des lithobies ne répondaient pas significativement aux traitements appliqués.

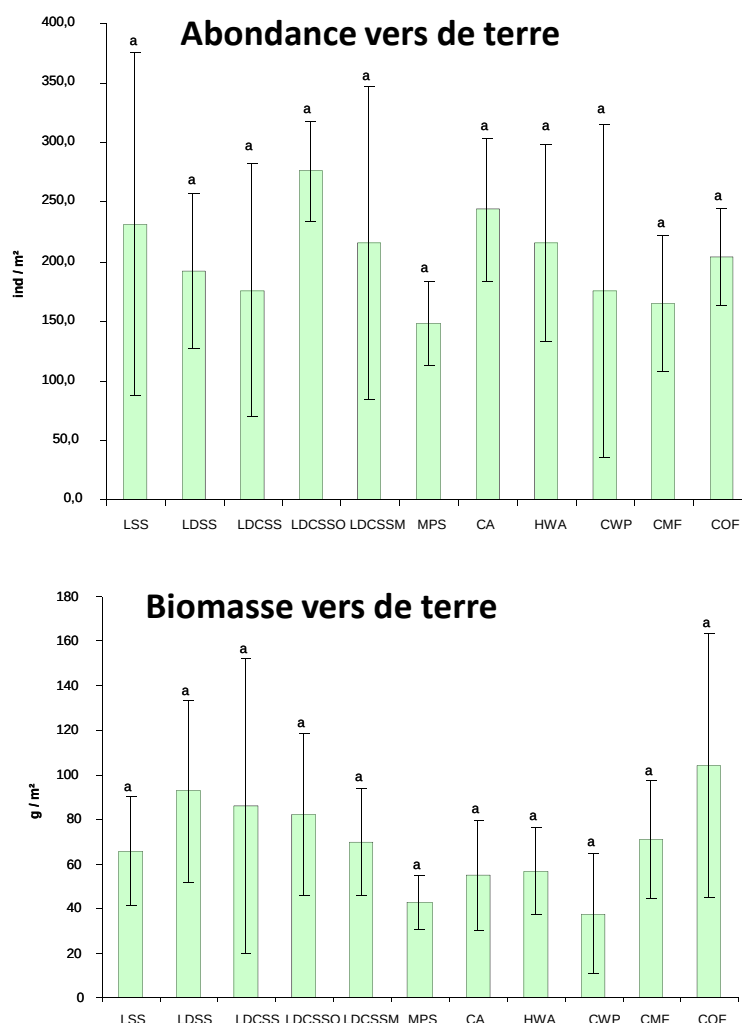


Figure 42 : abondance (individus m^{-2}) et biomasse ($g\ m^{-2}$) moyennes des vers de terre par traitement effectués sur les parcelles du site de la Bouzule en 2010

3.5.3 Diversité fonctionnelle des lombriciens (échantillonnage sur monolithes de sol)

Les résultats de l'ACP sur les traits/préférences écologiques des lombriciens (CWM) montrent une forte structuration des données, le premier plan factoriel absorbant 74% de l'inertie totale (Figure 43). Le premier axe (39% de l'inertie totale) identifie un gradient de stature des animaux (biomasse et longueur) et tend à opposer les traitements 'boues' (LSS, LDSS, LDCSS, LDCSSO, LDCSSM, MPS) et CA aux traitements témoins (COF, CMF et CWP) et HWA. Les sols amendés avec des boues et CA présentent donc des communautés lombriciennes caractérisées par des animaux de plus grande taille et plus lourds que les autres traitements. Les valeurs des coordonnées sur l'axe 1 sont linéairement, positivement corrélées aux teneurs en phosphore dans les sols ($r^2 = 0.27$, $p < 0.001$).

L'axe 2 représente 35% de l'inertie totale. Il correspond à l'opposition entre les espèces préférant (i) en coordonnées positives les pH élevés (alkalinophiles et alkalinotolérants) et les teneurs intermédiaires ou faibles en carbone organique (meso-euhumiques et oligohumiques) et (ii) en coordonnées négatives les pH faibles (acidophiles et acidotolérants), les teneurs élevées en carbone (euhumiques), pigmenté et présentant un aplatissement caudal. Les valeurs des coordonnées sur l'axe 2 sont linéairement, positivement corrélées aux valeurs de pH dans les sols ($r^2 = 0.15$, $p = 0.007$).

Aucune corrélation n'a été trouvée entre les axes de l'ACP et les teneurs en métaux totaux ou en HAP dans les sols.

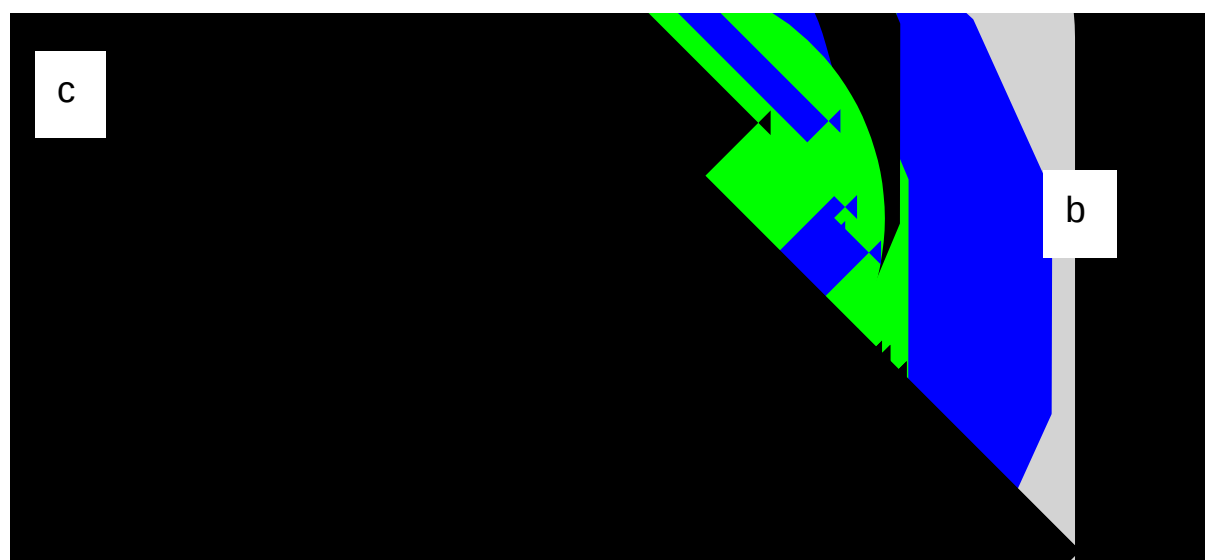


Figure 43 : Résultats de l'ACP sur les traits et préférences écologiques des vers de terre. (a) décroissance des valeurs propres des axes (PC1 = 38,6% et PC2 = 35,4%). (b) cercle des corrélations (pour les codes, voir leTableau 6). (c) ordination des relevés et barycentre des 11 traitements sur le premier plan factoriel (PC1-PC2).

3.5.4 Discussion

Les résultats montrent donc qu'il n'existait aucune différence significative en terme d'abondance, de biomasse et de diversité taxonomique entre les différents traitements testés sur le dispositif de La Bouzule longtemps après les derniers épandages. Les paramètres des communautés calculés (abondances, biomasse, richesse taxonomique) sont faibles et en accord avec l'usage agricole de ces sols, et notamment le labour (Paoletti et al., 1998; Peigné et al., 2009; Smith et al., 2008). N'ayant pas de données sur les communautés de macroinvertébrés avant et à la fin des épandages, l'absence de différences significative peut relever de deux dynamiques. Premièrement, les épandages n'ont eu aucun effet sur ces communautés, ce qui indiquerait une résistance des communautés à ces pratiques. Deuxièmement, dix ans après arrêt de l'épandage la résilience des communautés a gommé les différences potentielles entre traitements. Dans la littérature, la réponse de la macrofaune du sol à court terme à l'épandage de produits résiduels montrent une augmentation des paramètres de structure des communautés (Baker et al., 2002; Cuendet and Ducommun, 1990; Price and Voroney, 2008). L'hypothèse d'une résilience des paramètres structurels des communautés semblerait donc à privilégier.

Toutefois, l'étude de la diversité fonctionnelle montre deux sources de variabilité importantes. La première oppose certains traitements (axe 1 de l'ACP), alors que la seconde est liée à la variabilité intra-dispositif (axe 2 de l'ACP) (Figure 4). Ainsi, les résultats sur l'axe 1 (39% de l'inertie totale) montrent que la teneur en phosphore dans les sols et les taille/biomasse moyennes des communautés de lombriciens sont reliées. A ce stade il n'est pas possible d'isoler les différentes raisons potentielles (Bayon and Milleret, 2009). Ainsi, soit le P est un facteur limitant de la stature des communautés lombriciennes (Zhang et al., 2012), soit la stature des communautés lombriciennes agit sur la dynamique du P (Muir et al., 2007) ou encore les deux co-varient en réponse à l'apport de PRO (Briones et al., 2011). Les traits morphologiques, agrégés en valeurs moyennes pour la communauté (CWM), semblent donc particulièrement pertinents pour mettre en évidence un arrière effet de l'épandage de PRO sur les lombriciens.

D'autre part, l'axe 2 de l'ACP permet d'identifier l'effet de la variabilité intra-essai de la distribution des préférences écologiques (pH et carbone organique) et des CWM pour la pigmentation et la présence d'aplatissement caudal au sein des communautés lombriciennes. Ces résultats montrent que deux types d'assemblages existent dans l'essai : des assemblages composés (i) d'individus acidophiles/tolérants, pigmentés et présentant un aplatissement caudal et (ii) d'individus alcalinophiles/tolérants, apigmentés et sans aplatissement caudal. De plus, les coordonnées sur l'axe 2 (35% de l'inertie totale) sont corrélées aux valeurs de pH dans les sols et n'ont été reliées ni à un effet traitement ni à un effet bloc. Cela révèle donc l'effet de la variabilité intra-essai du pH des sols sur l'assemblage des communautés de lombriciens. L'acidité des sols est connu pour être un facteur crucial de l'assemblage des communautés lombriciennes (Lavelle and Spain, 2001).

Concernant l'effet potentiel des micropolluants sur les communautés de la macrofaune des sols, les

niveaux de contamination (HAP et ETM totaux) mesurés dans les sols étudiés n'ont pas d'incidence sur les paramètres étudiés (abondance, biomasse, diversité taxonomique et fonctionnelle). Les valeurs dosées sont toutefois faibles et seules certains traitements présentent des valeurs un peu plus importantes (voir § 3.1.2).

Enfin, ces résultats confirment que l'utilisation d'une approche basée 'trait' permet de mettre en lumière la réponse de la macrofaune des sols aux contraintes environnementales (Hedde et al., 2012b; Hedde et al., 2013). Cette approche a permis dans cette étude d'identifier des effets à long terme sur la composition fonctionnelle des communautés d'invertébrés des sols. Toutefois, le manque actuel de base de données sur les traits fonctionnels des invertébrés des sols ne permet pas ou difficilement de généraliser cette approche à l'ensemble des individus collectés (cloporte, mille-pattes, araignées, etc). Une proposition pour lever ce verrou méthodologique est en cours de finalisation (Hedde et al., 2012a).

3.6 Lombriciens (extraction éthologique et physique)

3.6.1 Evolution des abondances et biomasses de 2001 à 2011

A l'échelle du dispositif, les abondances lombriciennes ont évolué positivement avec 265 ind.m^{-2} en 2011 contre 233 ind.m^{-2} en 2001, bien que cette évolution ne soit pas vérifiée statistiquement (M&W, n.s.).

Des différences intermodales avaient été détectées pour l'année 2001 (K&W, H_0 rejetée), la comparaison multiple des moyennes montrant que les abondances lombriciennes des modalités C1 (Cendre de combustion) et CMF (fertilisation basse) étaient significativement inférieure à la seule modalité LDSS (Compost déshydraté) (Tukey, $p < 0,05$). L'année 2011 est marquée par un lissage général des abondances lombriciennes : de fait, aucune différence statistique ne montre d'effet traitement (K&W, n.s.). Malgré ce lissage, les moyennes lombriciennes les plus hautes en 2001 restent sensiblement sur les mêmes modalités en 2011 (Figure 44). Par ailleurs, s'il n'y avait pas d'effet bloc en 2001, celui-ci est observé pour l'année 2011 (K&W, $p < 0,05$) avec une différence marquée entre les blocs 1 et 3, le Bloc1 présentant les abondances les plus faibles.

A l'instar de l'évolution des abondances, les biomasses lombriciennes moyennes ont évolué positivement avec 53 g.m^{-2} en 2001 pour 92 g.m^{-2} en 2011 (Figure 44). Cette évolution est positive pour une partie des modalités (M&W, $p < 0,05$) à l'exception des épandages de boues urbaines compostées (LDCSS, LDCSSO, LDCSSM) et des boues de papeterie (MPS). En 2011, la seule différence intermodale concernait le témoin CWP (qui n'existait pas en 2001) dont les biomasses sont inférieures à celle des modalités HWA et COF. Il n'y a pas d'effet bloc pour les biomasses moyennes (K&W, n.s.).

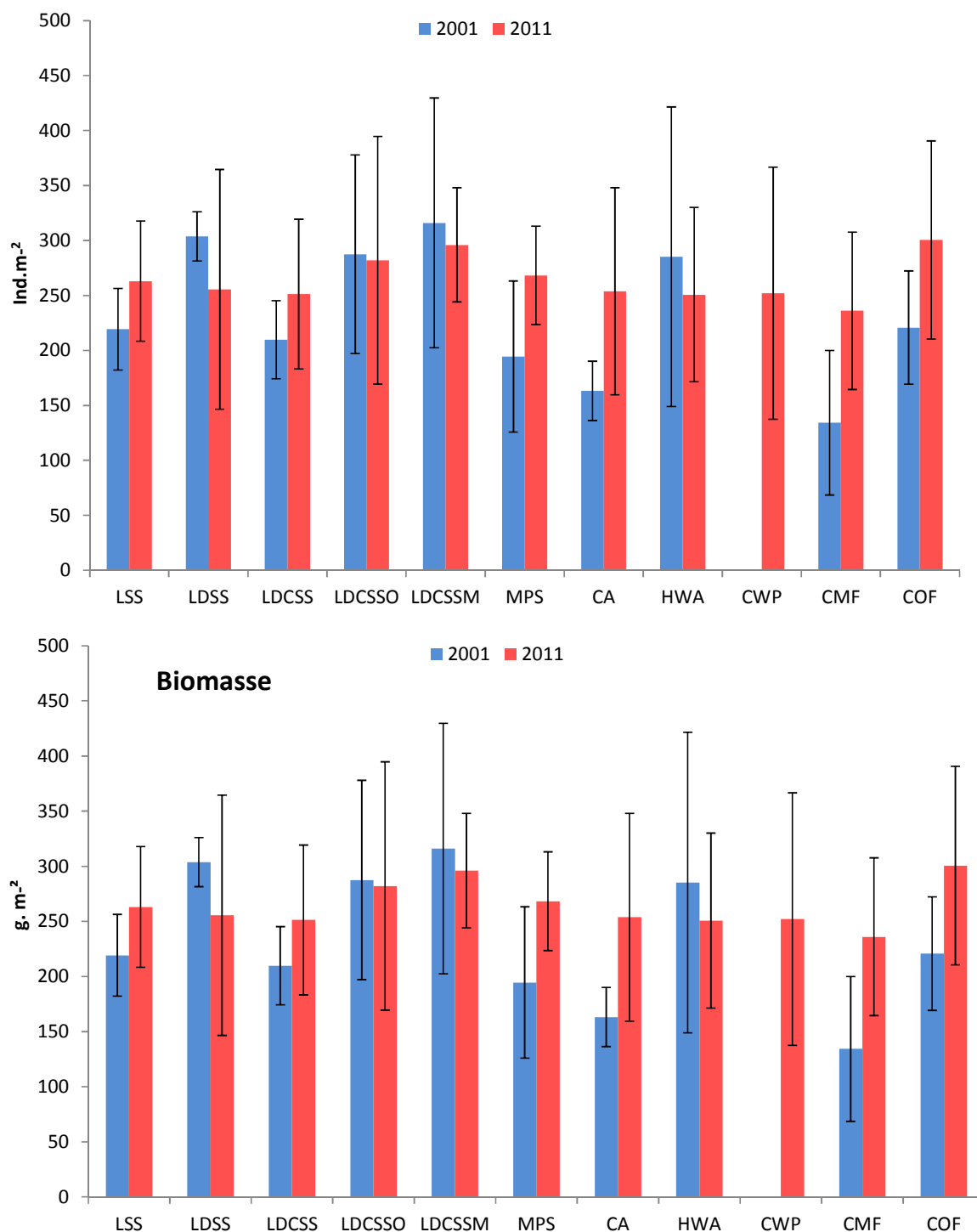


Figure 44 : Abondances et biomasses moyennes de communautés lombriciennes sur 11 modalités expérimentales de la Bouzule pour l'année 2001 et 2011.

3.6.2 Structure des communautés en 2011

Une évolution contrastée entre des biomasses et abondances moyennes est généralement indicatrice d'une profonde modification dans la structure des communautés lombriciennes. Les effectifs anéciques et épigées ont été multipliés par 3 ou 4 et sont significativement supérieurs à ceux de 2001 (M&W, $p < 0,05$), à l'exception de la modalité HWA (Compost d'ordure ménagère) pour les épigées. Dans le même temps, les effectifs endogés ont plutôt diminué et de manière significative pour les épandages de boues STEP liquides et compostées (LSS et LDCSS). Les lombriciens anéciques

composaient ainsi près de 20% de la communauté en 2001 pour environ 40% en 2011 (Figure 3). Cette modification de structure est explicable par l'occupation des sols au moment des échantillonnages (blé tendre en 2001 et inter-culture de maïs en 2011) mais surtout par la succession des opérations culturales et celle des labours qui sont défavorables aux épigés et aux anéciques (Tebrügge et Düring, 1999 ; Jordan et al., 2004). L'échantillonnage de 2001 était en effet précédé de 5 labours (depuis la mise en place du dispositif en 1997) dont le dernier à l'automne 2000 alors que l'échantillonnage de 2011 était précédé de seulement 3 labours au cours des cinq années précédentes dont le dernier datait d'environ 1an (automne 2010) (Tableau 3, § 2.3) .

Que ce soit en 2001 et 2011, les communautés lombriciennes n'étaient pas caractérisées par des structures significativement différentes entre les traitements (χ^2 d'homogénéité, d.l. = 10, n.s.). Il apparaît toutefois que les abondances relatives et absolues des épigés sont plus faibles pour les trois témoins (CWP, CMF et COF) et sous compost d'ordure ménagère (HWA). Les anéciques et épigés apparaissent relativement plus abondants sous STEP deshydraté LDSS (>50%) tandis que les endogés sont plus abondants sur le Témoin CWP et les boues STEP LDCSSO (65%). Une tendance remarquable est la diminution d'abondance relative des épigés et anéciques avec le traitement des boues STEP : LDSS (déshydraté) > LDCSS (composté) et LDCSSO (composté avec addition de polluants organiques) ; ce gradient léger en 2001 est plutôt marqué en 2011.

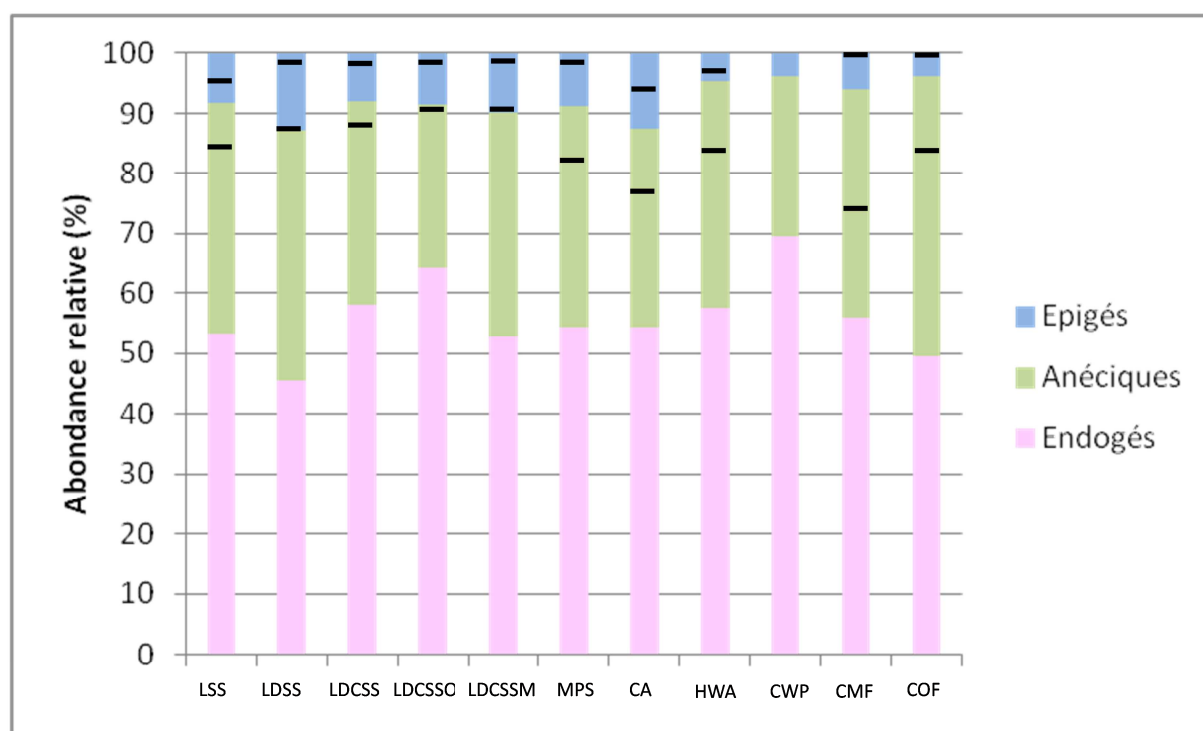


Figure 45 : distributions relatives des trois catégories écologiques lombriciennes pour les onze modalités en 2011 sur le site de la Bouzule, les barres noires illustrent la position des abondances relatives en 2001

3.6.3 Diversité taxonomique des communautés en 2011

12 espèces lombriciennes ont été identifiées en 2011 sur l'ensemble du dispositif de la Bouzule (Tableau 18); une d'entre elles (X) n'a pu être déterminée par l'absence d'individus adultes. L'assemblage des espèces retrouvées est caractéristique d'une parcelle agricole du Nord de la France (Bouché et Gardner, 1984). Cette composition d'espèce a profondément changée puisque les espèces *A. icterica* (AI) et *O. cyaneum* (OC) sont quasi-absentes du dispositif en 2011 tandis que les espèces *A. rosea* (ARR) et *A. c. chlorotica albanica* (ACCA) étaient inexistantes en 2001 (Tableau 19). La disparition de AI et OC étant globale, les conditions climatiques plutôt desséchantes de l'hiver puis du printemps 2011 ont sans doute limité l'activité de ces espèces et la possibilité d'échantillonner ces espèces qui sont plutôt sensible au maintien d'un certain taux d'humidité dans les sols.

La richesse taxonomique maximale a été observée pour la modalité avec épandage de boues STEP compostée (LDCSS) tandis que la plus faible a été observée sur la modalité témoin (CWP) (Tableau 20). La diversité taxonomique la plus faible a été également mesurée sur le Témoin CWP

ainsi que pour HWA (Compost d'ordures ménagères), la diversité la plus élevée a été observée sur la modalité LDCSSO (boue compostée avec enrichissement en contaminants organiques). La diversité ainsi que l'équitabilité des communautés lombriciennes divergeaient faiblement entre les modalités expérimentales.

Tableau 18 : Liste des espèces présentes sur le dispositif expérimental de la Bouzule

Code	Taxons lombriciens
ACCA	<i>Allolobophora chlorotica chlorotica typica</i>
ACCT	<i>Allolobophora chlorotica chlorotica albanica</i>
AI	<i>Allolobophora icterica</i>
ARR	<i>Allolobophora rosea</i>
DM	<i>Dendrobaena mammalis</i>
LC	<i>Lumbricus castaneus</i>
LRR	<i>Lumbricus rubellus rubellus</i>
LT	<i>Lumbricus terrestris</i>
NCCT	<i>Aporrectodea caliginosa typica</i>
NLL	<i>Aporrectodea longa longa</i>
OC	<i>Octolassium cyaneum</i>
X	Indéterminée

Tableau 19 : Abondance moyenne (ind. m⁻²) de cinq espèces endogées pour les années 2001 et 2011

	NCCT	ACCA	AI	ARR	OC
2001	57	0	56	1	9
2011	70	27	2	41	0

Tableau 20 : Richesse taxonomique, diversité (Indice de Shannon) et équitabilité des communautés lombriciennes sur les onze modalités expérimentales de la Bouzule

Modalités expérimentales		Codes	Richesse taxonomique	Diversité	Equitabilité
Boues STEP	liquides	LSS	10	2,88	0,87
	Déshydratées	LDSS	9	2,73	0,86
	Compostées	LDCSS	12	2,72	0,76
	+ PCB	LDCSSO	11	2,95	0,85
	+ métaux	LDCSSM	9	2,65	0,84
Boues de papeterie		MPS	9	2,88	0,91
Cendres de combustion de charbon		CA	9	2,62	0,83
Compost d'ordure ménagère		HWA	9	2,50	0,79
Témoin	Sans pesticides	CWP	8	2,50	0,83
Référence	Fertilisation basse	CMF	9	2,64	0,83
	Fertilisation haute	COF	11	2,58	0,75

L'Analyse en Composante Principale en utilisant les abondances des taxons lombriciens comme variables explicatives permet de différencier la modalité LDCSSO et le témoin CWP sur les deux premiers axes (36,2%) (Figure 46). La différenciation du compost LDCSSO ne tient cependant qu'à un seul point d'échantillonnage en lien avec les espèces *Aporrectodea c. chlorotica typica* (ACCT) et *Aporrectodea caliginosa* (NCCT). La différenciation du témoin CWP est liée à trois points d'échantillonnage et s'explique par l'abondance élevée des espèces *Allolobophora rosea rosea* (ARR)

et *Allolobophora icterica* (AI), et l'abondance faible de *Aporrectodea c. chlorotica albanica*. A l'inverse, la modalité CA (cendres de combustion) se différencie légèrement des autres modalités par une abondance plus élevée de ACCA et plus faible de ARR et AI.

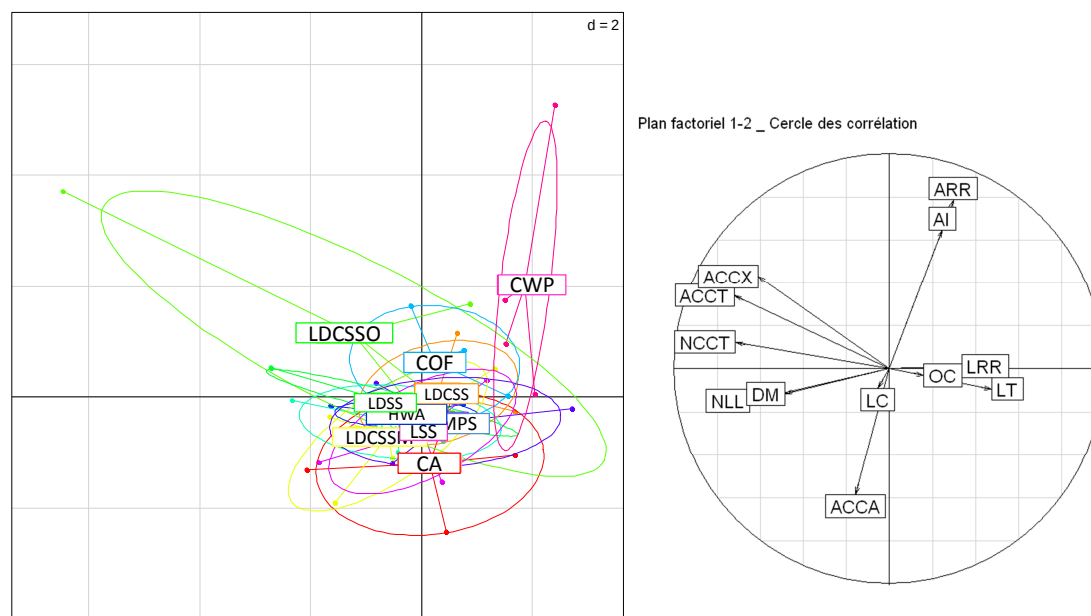


Figure 46 : Résultat de l'Analyse en Composant principale des modalités expérimentales en fonction de l'abondance des espèces lombriciennes (Contribution des axes : 1 = 21.7% et 2 = 14.5%) sur le site de la Bouzule en 2011

3.6.4 Structuration spatiale des communautés lombriciennes

N° de parcelle	ACCA				ACCT				ARR				NCCT					
	Bloc1	Bloc2	Bloc3	Bloc4	Bloc1	Bloc2	Bloc3	Bloc4	Bloc1	Bloc2	Bloc3	Bloc4	Bloc1	Bloc2	Bloc3	Bloc4		
1T									33	82	147		2	48	49	52	HAUT	
1				1			1	1	1	19	87	103	84	146	66	59		
5				2			16	1	71	146	66	84	50	119	122	68	E	
9			18	3		17		18	52	2	17	4	2	52	103	63	N ? S	
13	32	80	1	51				2	49	18	16	1	0	4		90	O	
17	16			17			16	17	50	1	0	49	18	4	120	78		
21	32	17	17	17					1	16	52	18	33	69		71		
25	16		17	16					33	32	32	32	32	81	117	84		
29	33	96	64	96	16			1	65	0	33	32	18	96	50	129		
33	48	80	113	64			16		49	17	18	48	33	97	82	131		
37	32	16	64						49	0	16	0	48	64	113	16	BAS	

Figure 47 : Distribution spatiale de quatre espèces lombriciennes sur le dispositif en 2011 (1cellule = 1parcelle élémentaire) (en noir: les densités les plus élevées, en blanc = densités nulles)

Les quatre espèces endogées qui expliquent la différenciation des modalités LDCSSO et CWP présentaient des distributions spatiales contrastées au sein du dispositif (Figure 47). L'espèce *A. c. chlorotica albanica* ACCA est absente sur la partie haute (Est) du dispositif et tend à présenter un gradient croissant de densité vers la partie basse (Ouest). L'espèce *A. rosea* (ARR) présentait un gradient de densité opposé à celui d'ACCA, avec une agrégation préférentielle sur la partie sud-est et notamment sur deux parcelles élémentaires de la modalité Témoin CWP (Sud-Est). L'espèce *A. caliginosa* (NCCT) présentait une densité maximale sur le bloc 3 (>100ind.m⁻²) avec gradient décroissant de densité répartie des deux côtés d'un axe Nord-Est/Sud-Ouest, atteignant les densités

les plus faibles sur le Bloc 1. La distribution de ces trois espèces suggère un évitement spatial d'ACCA, ARR et ACCT qui est validé par l'ACP (Figure 46). L'espèce *A. c. chlorotica typica* (ACCT) qui est peu représentative à l'échelle du dispositif, présentait un hot spot de densité qui était localisé sur une parcelle élémentaire correspondant à la modalité LDCSSO (Boues compostées enrichies en polluants organiques).

L'étude de distribution spatiale de ces quatre espèces a permis de comprendre la forte variabilité des populations lombriciennes et d'apporter des explications aux différences de structures des communautés entre les modalités expérimentales. Ainsi, la seule espèce NCCT permet d'expliquer l'effet bloc sur l'abondance lombricienne. La distribution des espèces ACCT, ACCA et ARR permettent de comprendre la différenciation des parcelles de modalités CWP et LDCSSO dans les résultats de l'ACP (Figure 46).

3.6.5 Discussion

Le dispositif expérimental de la Bouzule a permis d'évaluer les possibles effets sub-létaux de cinq années d'épandage de déchets sur les lombriciens.

Dix ans après la fin des épandages, la comparaison des modalités expérimentales ne permet pas de conclure à un effet négatif des apports de déchets sur les communautés lombriciennes. Si des effets traitements étaient avérés et/ou perceptibles en 2001, l'harmonisation des traitements durant dix ans ont permis de lisser la variabilité inter-modale des abondances lombriciennes et d'atténuer les éventuels effets des différents épandages. Les variabilités inter-modales de 2001 semblent davantage liées aux valeurs fertilisantes et amendantes des produits d'épandage et aux quantités de matières organiques apportées aux sols (facteurs limitant pour l'évolution des populations lombriciennes). Les boues de STEP, en apportant des matières organiques, favorisent ainsi davantage les lombriciens que des cendres de combustion. Cette hypothèse peut être validée par la comparaison des épandages à valeur agronomique similaire : les enrichissements modérés en polluants organiques (LDCSSO) et métalliques (LDCSSM) des boues STEP (LDCSS) n'ont généré aucune modification tangible des communautés lombriciennes en 2001 et en 2011. Les déchets utilisés n'ont pas permis d'atteindre une concentration seuil de polluants dans les sols comme cela a pu être observé par Nahmani et al. (2003) dans le nord de la France.

Les lombriciens ne constituent pas l'indicateur le plus pertinent pour révéler des effets de faibles niveaux de contamination au terrain. Van Straalen et Denneman (1989) montrent ainsi que les lombriciens expriment une forte résilience par adaptations génétiques aux contaminations alors que les mêmes lombriciens utilisés pour des tests de survie au laboratoire n'ont pas le temps d'exprimer ces adaptations. La multiplicité des paramètres édaphiques influençant la biodisponibilité des polluants (Meharg et al., 1998) et les lombriciens eux même, peuvent avoir un effet masquant des impacts réels d'une pollution en éléments traces. Le dispositif de la Bouzule illustre également la difficulté récurrente d'hétérogénéité de distribution spatiale des espèces lombriciennes (Figure 47). Autant la distribution de certaines espèces peut être prédite par des gradients d'hydromorphie ou de profondeur des sols (Cannavacciuolo et al., 1998), autant la distribution de l'espèce *A. caliginosa* sur le site de la Bouzule par exemple difficilement prédictible (Figure 47). Toutefois, ces agrégations préférentielles et les effets bloc argumente aussi que la distribution des lombriciens au sein du dispositif n'a pas ou peu été influencé par la distribution des traitements.

Cette étude permet de conclure à l'innocuité de 5 années d'épandage de déchets faiblement contaminés. Ces résultats corroborent les tests négatifs sur le taux de survie des lombriciens en contact avec ces différents produits. Cette étude ne permet en revanche pas de prédire l'innocuité à long terme d'épandages répétés sur les lombriciens.

3.7 Dynamique de décomposition de la matière organique

3.7.1 Pertes de masse de la paille de blé au sein des sacs à litières

Des difficultés techniques nous ont contraints à différer l'analyse des échantillons récoltés. Les résultats sont actuellement encore en cours d'analyse et feront l'objet d'un rapport annexe ultérieur.

3.7.2 Dégradation de la paille de blé au sein des sacs à litières

Les pailles de blé initiales, ainsi que les résidus de paille et agrégats organo-minéraux issus de sacs de litières récoltés en avril 2011 dans les parcelles CMF et MPS (boues de papeteries), ont fait l'objet d'une caractérisation en MET.

3.7.2.1 Observation des pailles initiales :

Les différentes coupes transversales de paille observées en microscopie photonique et électronique montrent l'état initial des matières organiques, à savoir qu'elles ne sont pas dégradées (Figure 48). Dans la majorité des cas, les tissus sont intacts, les cellules entières sans image de lyse.

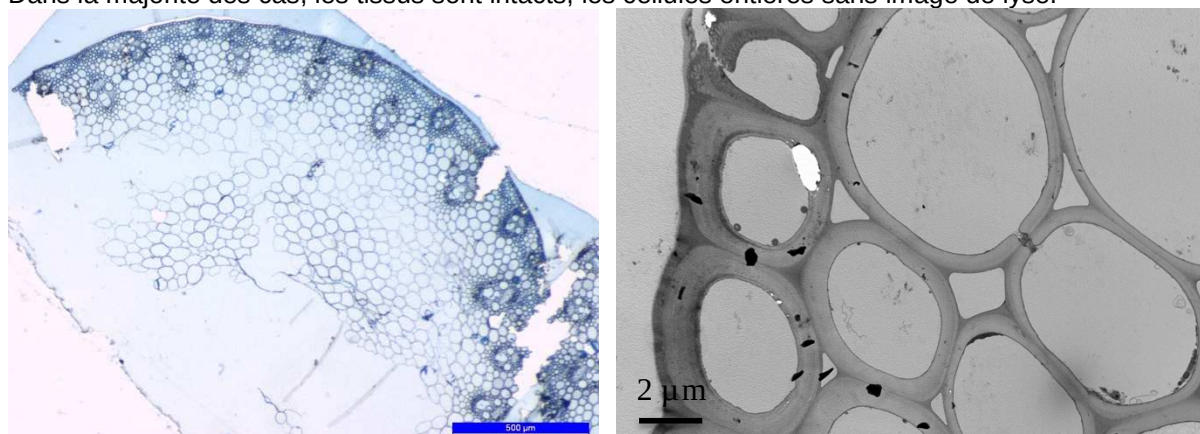


Figure 48 : Coupe transversale de paille de blé observée en photonique (à gauche) et en électronique (à droite).

3.7.2.2 Observation des pailles en fin d'expérimentation :

En fin d'expérimentation, les résidus de paille sont colonisés par des microorganismes, correspondant ainsi à des stades différents de biodégradation mis en évidence par de la disparition de matière, plus que de la destruction des tissus végétaux (Figure 49). Les tissus végétaux sont colonisés pas des champignons lignolytiques, en particulier au niveau de la cuticule (Figure 49.1 et Figure 49.2). Des bactéries sont également observées principalement à l'interface entre les résidus et les minéraux adsorbés (Figure 49.3), mais aussi le long des parois de tissus plus internes (Figure 49.4) ou encore à l'intérieur de résidus de champignons.

La taille des mailles des deux types de sacs à litières testés ne semble pas impacter la colonisation microbienne des tissus végétaux, ni leur stade de biodégradation. De même les minéraux adsorbés sur les tissus externes le sont en quantité différente mais indépendante du type de sacs.

La comparaison par modalité, à savoir entre le témoin CWP et la modalité amendée en boue de papeterie MPS, ne met également rien en évidence en ce qui concerne la biodégradation des tissus, leur colonisation ou leur association avec les éléments minéraux.

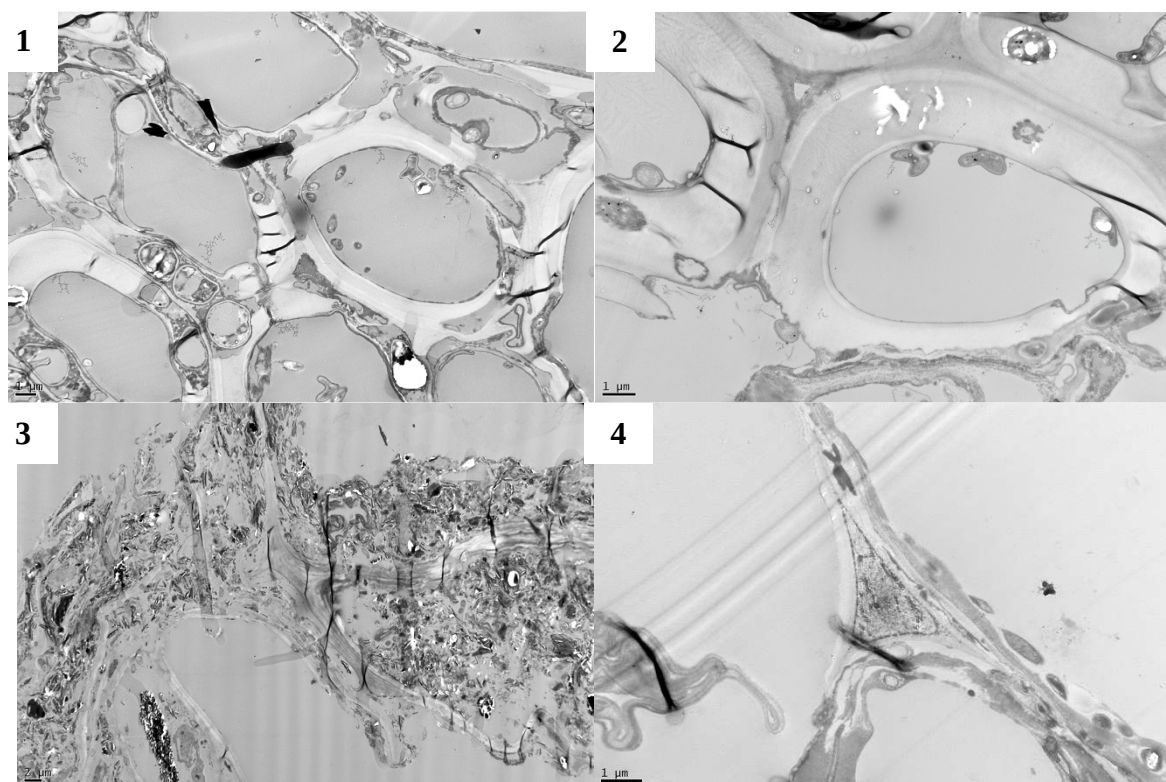


Figure 49 : Clichés des pailles de blé en fin d'expérimentation. 1 et 2 : colonisation et dégradation des tissus ligneux par des champignons ; 3 : interface résidus de paille /minéral ; 4 : bactéries dégradant les parois cellulaires

3.7.2.3 Observation des agrégats récoltés sur les sacs en fin d'expérimentation

Des agrégats adhérant plus ou moins aux sacs ont été récoltés. Leur observation en MET permet de mettre en évidence l'incorporation des matières organiques issus des pailles au sein d'agrégats organo-minéraux d'origine biologique (Figure 50).

Des résidus tissulaires de paille de blé sont retrouvés au sein des agrégats prélevés au niveau des sacs à grosse maille (5 mm) (Figure 50.3 et Figure 50.4), alors que ces résidus sont de taille plus petite dans les agrégats prélevés au sein des sacs de 200 µm (Figure 50.7 et Figure 50.8). L'état de biodégradation de ces résidus n'est pas uniforme, mais ne semble pas relié au fait que les agrégats prélevés soient très adhérents ou non aux sacs. Les résidus peuvent apparaître identiques à ceux prélevés au sein des sacs (Figure 50.3) ou au contraire dans des stades ultimes de biodégradation (Figure 50.8).

Des bactéries vivantes retrouvées au sein des résidus tissulaires ou associées aux minéraux sous forme d'agrégats bactériens ou de bactéries libres, attestent de l'activité microbienne effective existante au sein des agrégats (Figure 50.1, Figure 50.2 et Figure 50.7).

Les clichés attestent du brassage organo-minéral résultant de l'ingestion des constituants par la faune et de la formation d'agrégats stables de plusieurs dizaines de microns (Fig. Figure 50.5), similaires à ceux observés dans la fraction 2-20 µm. La Figure 50.4. correspond aux agrégats issus d'un turricule adhérent au sac de maille 5 mm, attestant de la contribution des vers de terre à l'évolution des pailles initialement contenue dans ces sacs.

Un morceau de plastique a été observé au sein d'un agrégat prélevé sur un sac récolté dans la parcelle amendée en boue de papeterie (Figure 50.6). Ce résultat témoigne de l'ingestion des matières plastiques par la faune du sol et leur contribution à l'incorporation de ce genre d'inertes dans les structures du sol.

3.7.2.4 Synthèse des résultats concernant l'incubation des pailles de blé au champ

Les résultats obtenus nous permettent de suivre la dégradation des pailles de blé par les micro-organismes, en particulier les champignons lorsque les résidus de paille évoluent au sein des sacs, et le brassage/dégradation par la faune du sol, donnant lieu ainsi à la formation d'agrégats organo-minéraux d'origine biologique.

Il semble ne pas y avoir d'effet modalité (comparaison entre CMF et la parcelle amendée en boue de

papeterie MPS) sur ces paramètres.

La taille des mailles des sacs à litière les plus gros semble favoriser la sortie de résidus hors du sac via l'ingestion par la faune. Ceci sera à prendre en compte dans le bilan de la biomasse de cette expérimentation.

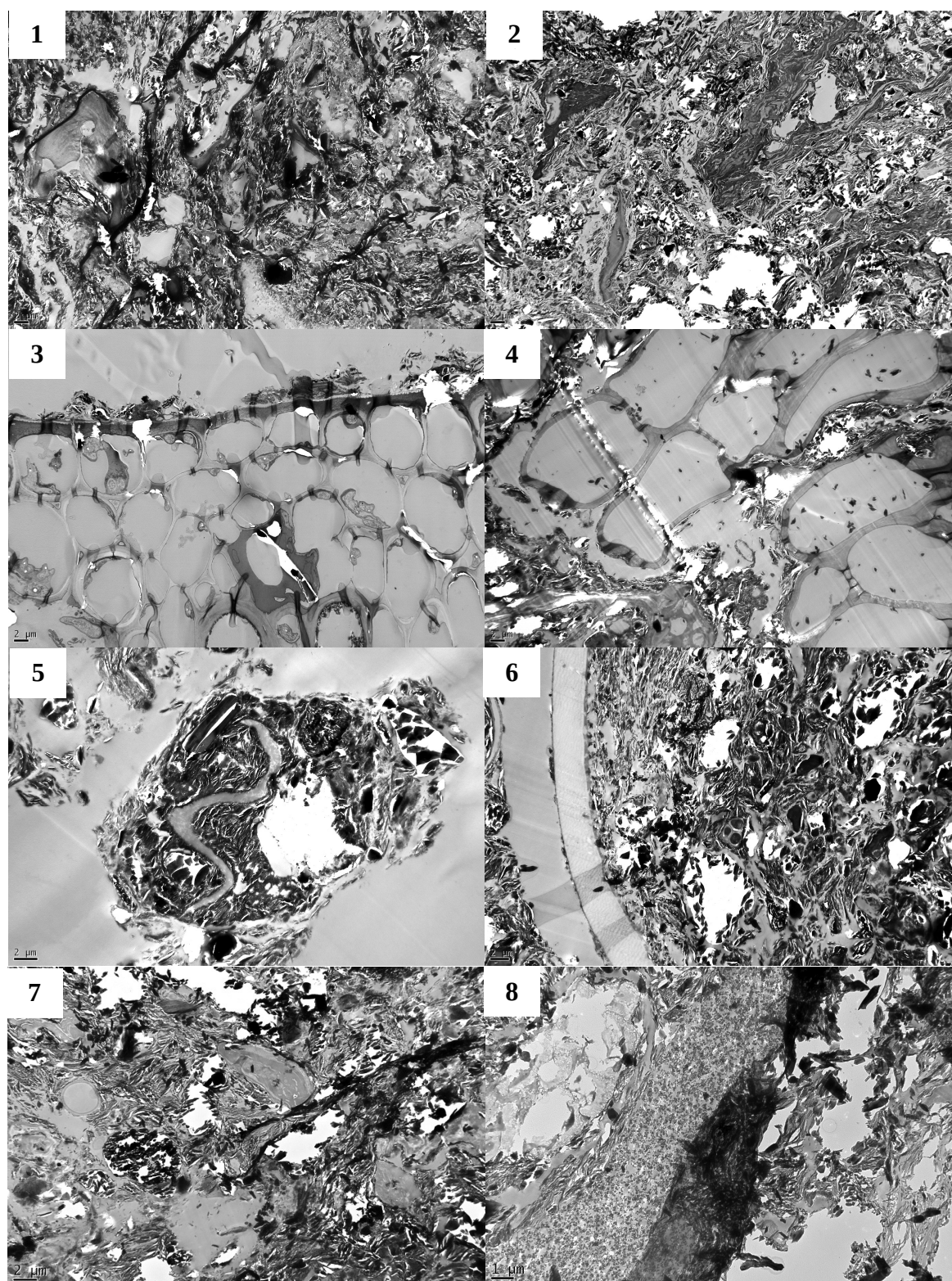


Figure 50 : Clichés MET des agrégats récoltés sur les sacs à litière. de 1 à 6 : agrégats issus des sacs de maille de 5 mm ; 7 et 8 : agrégats issus des sacs de maille de 200 µm.

3.8 Dynamique des associations organo-minérales dans les sols

3.8.1 Analyses des macrostructures

Lors de l'échantillonnage, certaines traces des matrices épandues ont pu être observées :

- présence de différents plastiques dans les parcelles amendées en compost d'ordures ménagères
- présence de cendres de combustion dans les parcelles amendées en cendres
- présence de morceaux d'écorces dans les parcelles amendées en boue compostée

Bien que les doses épandues en différents déchets soient relativement faibles (en accord avec les normes), certaines matrices sont encore repérables 8 ans après le dernier épandage.

Si l'observation des lames de sol réalisée pour chaque modalité permet de décrire la structure des différentes parcelles à l'échelle macroscopique, aucune différence concernant l'impact des PRO sur l'agencement des constituants organiques et minéraux n'a été mise en évidence (Figure 51).

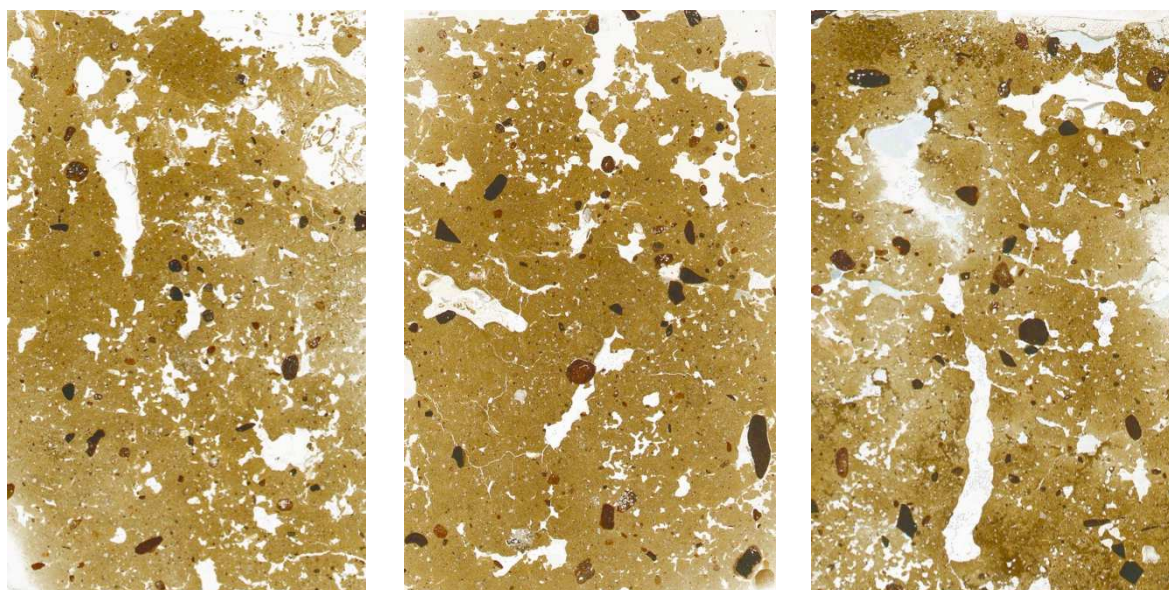


Figure 51 : Exemples de lames minces des modalités LSS, LDSS et COF (de gauche à droite)

En revanche, des traceurs de certains PRO peuvent être visualisés sur les lames (Figure 52) :

- des fibres plastiques colorées en quantité notable, isolées ou en paquets au sein de la matrice organo-minérale du sol de la modalité MPS (fibres de papeteries),
- ces mêmes fibres, mais observées en quantité nettement plus faibles dans la modalité HWA (compost d'ordures ménagères),
- des structures noires de différentes tailles assimilables à des cendres de combustion dans la modalité CA.

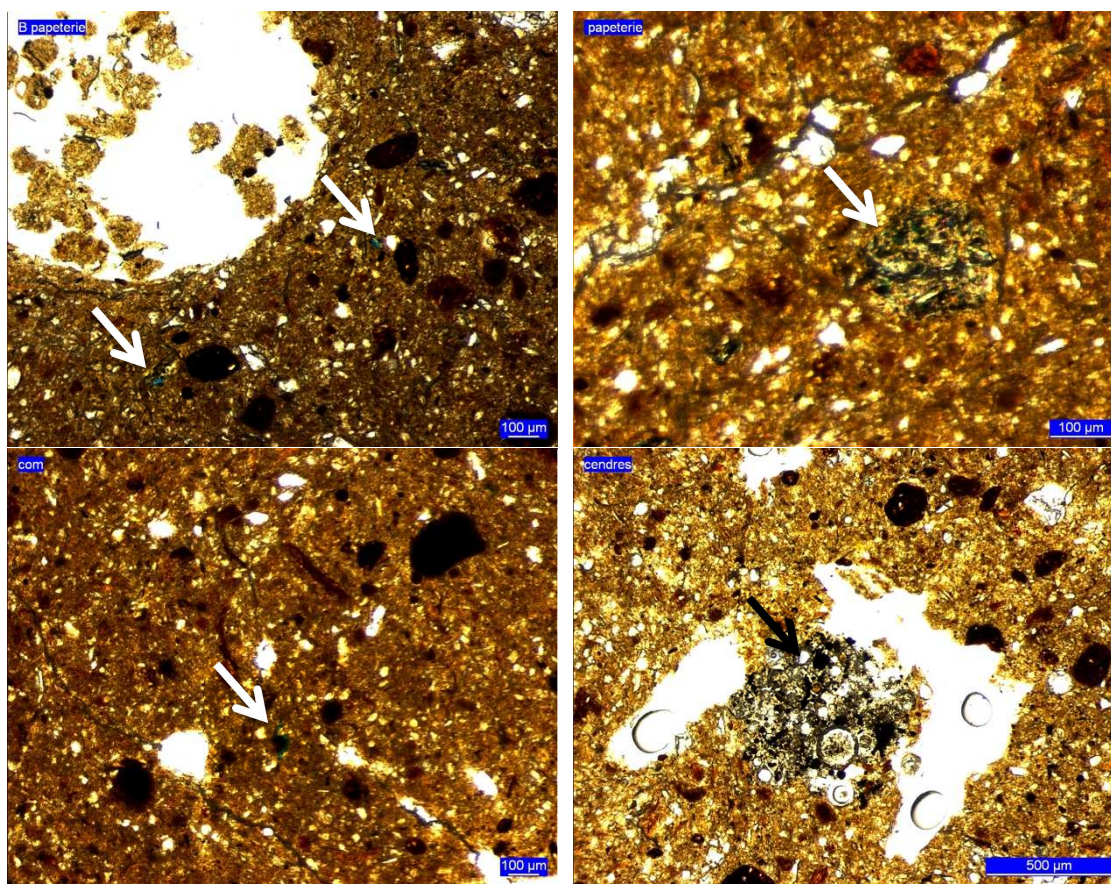


Figure 52 : Traceurs des PRO sur lames minces. Les flèches indiquent la présence de fibres au sein des structures organo-minérales du sol de la modalité MPS (B. papeteries) et HWA (com : compost d'ordures ménagères), ainsi que des cendres de combustion de la modalité CA.

3.8.2 Analyse des microstructures

3.8.2.1 Recherche de traceurs microstructuraux

La caractérisation en MET des différents déchets permet d'identifier certaines microstructures caractéristiques des déchets épandus (Figure 53) :

- **des résidus microbiens** en grande quantité ou sous forme de floccs identifiant la présence de boues urbaines. Il est à noter que les échantillons utilisés ayant été congelés, les structures bactériennes sont moins bien conservées et les floccs plus difficilement identifiables que dans d'autres travaux (Watteau *et al.*, 2012).
- **des fibres de cellulose** retrouvées en grande quantité dans les boues de papeteries et le compost d'ordures ménagères. L'échantillonnage n'a pas permis de prélever des morceaux de plastiques.
- des structures caractéristiques **des cendres de combustion**, présentant un contraste aux électrons élevé.

Ces microstructures caractéristiques pourront être utilisées comme traceurs des PRO et seront recherchées au sein des fractions granulométriques des sols. Un travail antérieur avait montré la possibilité de retrouver des résidus de floccs dans les parcelles amendées en boue urbaine déshydratée jusqu'à un an après l'épandage (Watteau *et al.*, 2012).

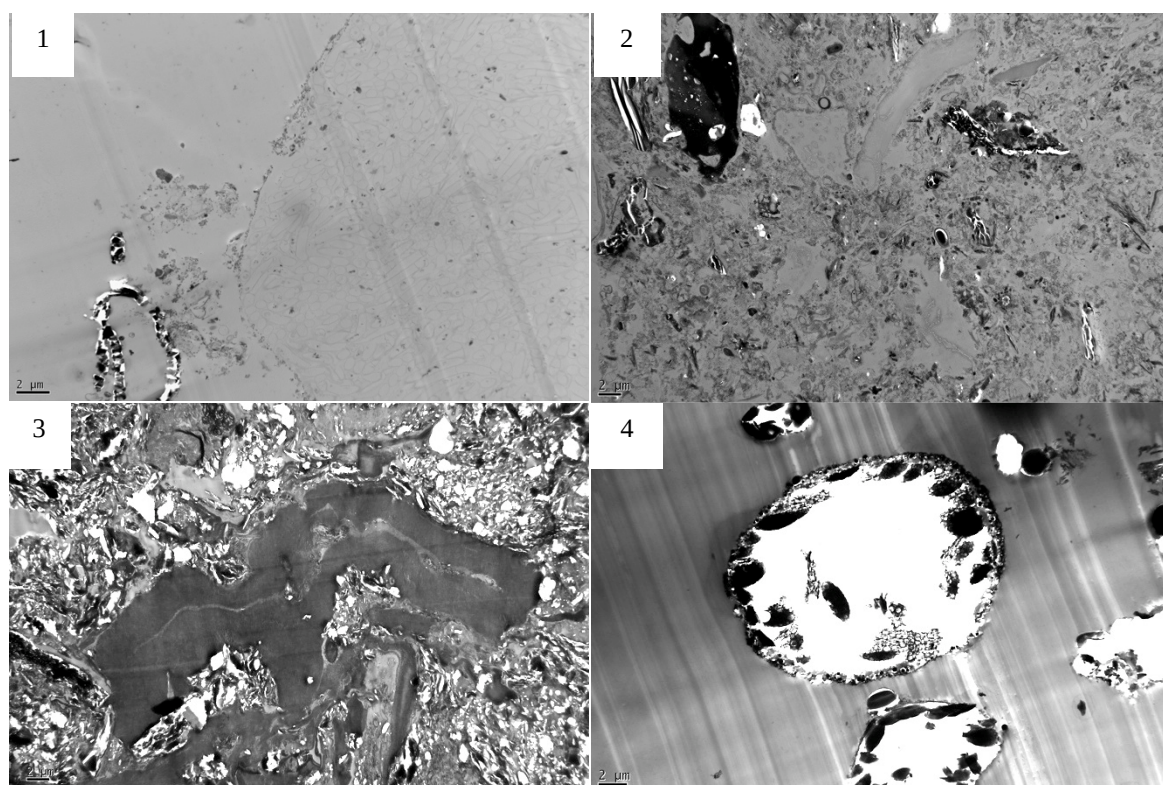


Figure 53 : Microstructures caractéristiques des boues liquides urbaines LSS (1) et (2), des boues de papeteries MPS (3) et des cendres de combustion CA (4).

3.8.2.2 Visualisation des PRO au sein des fractions 0-20 µm des sols

L'examen en microscopie électronique à transmission des fractions 0-2 µm et 2-20 µm montre que ces fractions sont constituées de particules minérales et organiques libres et d'agrégats (Figure 54). Ces agrégats peuvent être à dominante organique ou minérale, parmi lesquels sont également reconnus des agrégats bactériens.

La comparaison des différentes modalités ne permet pas de mettre en évidence de différence significative concernant un impact des modalités sur la répartition des différents types d'agrégats. Il semble toutefois que la proportion de fragments de matières organiques et d'agrégats bactériens soit plus importante dans la modalité CWP, soulignant ainsi l'influence de la prairie restée plus longtemps dans cette parcelle.

Les indicateurs microstructuraux des boues n'ont pas été retrouvés. La constitution en matières organiques labiles des floccs et les faibles quantités de boues apportées expliquent que ces résidus ne se retrouvent pas de façon notable 8 ans après le dernier épandage.

Seules des fibres de celluloses observées au sein d'agrégats au sein du sol de la modalité HWA présumant de l'épandage du compost d'ordures ménagères (Figure 54.8). Toutefois, ces observations ne sont pas très fréquentes.

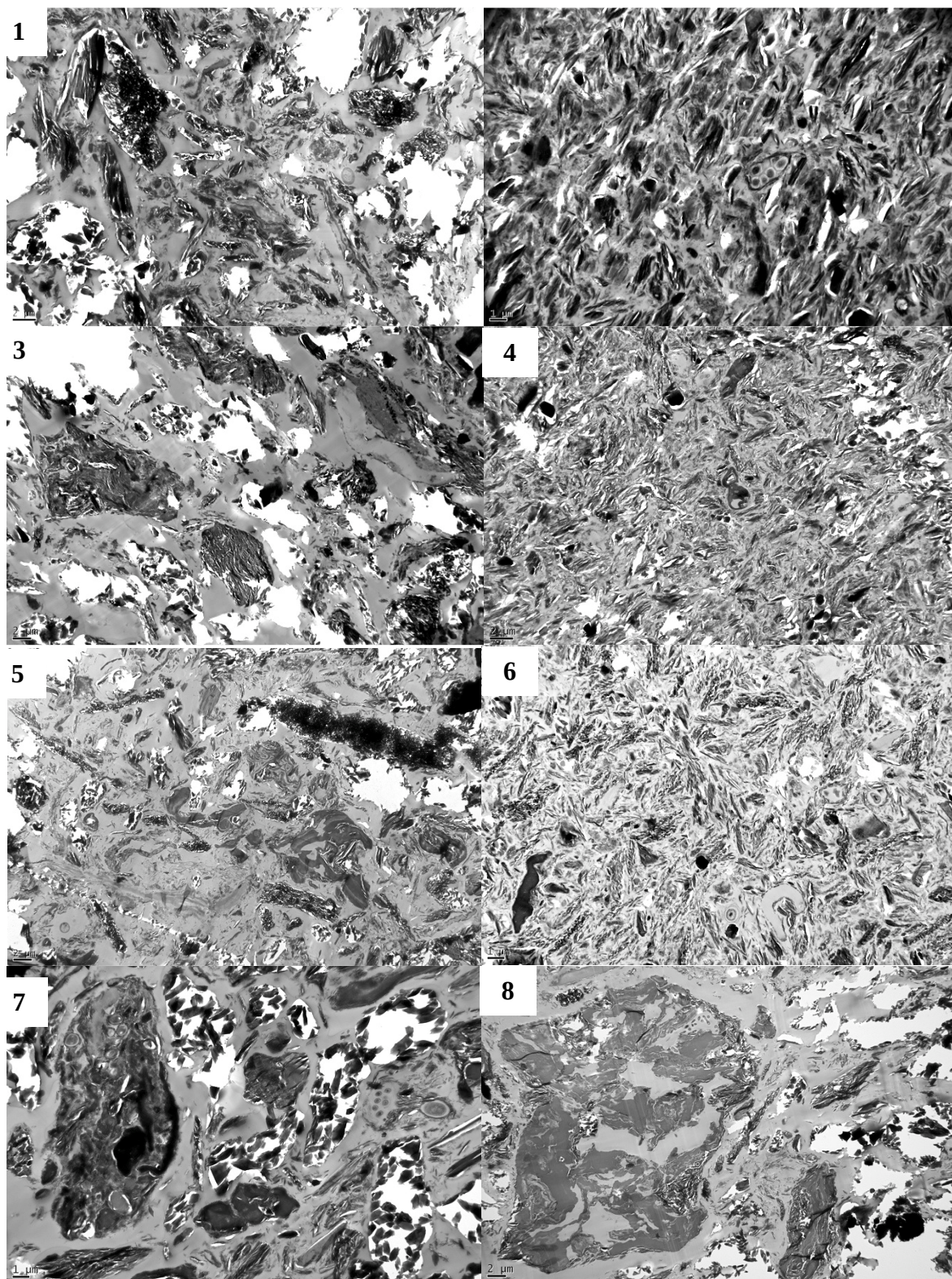


Figure 54 : Clichés MET des fractions 0-2 µm et 2-20 µm de différentes parcelles 1 et 2: 2-20 µm et 0-2 µm de CMF; 3 et 4: 2-20 µm et 0-2 µm de la modalité LSS (boue peu déshydratée); 5 : 2-20 µm de la modalité LDSS ; 6 : 0-2 µm de la modalité LDCSS (boue urbaine compostée); 7 et 8 : 2-20 µm de la modalité MPS (boue de papeterie).

3.8.2.3 Analyse de biostructures produites par les vers de terre : les turricules

Les clichés MET des turricules attestent du brassage organo-minéral intense dû à l'ingestion des matériaux du sol par les vers de terre (Figure 55). Ces associations sont également le lieu d'une forte

activité bactérienne : bactéries libres au sein de la porosité, colonie bactérienne au sein des minéraux ou bactéries associées aux résidus organiques (Figure 55.2 à Figure 55.4). Certains tissus végétaux sont également ingérés sans grosse transformation (Figure 55.5), tel qu'il l'avait été déjà observé dans l'expérimentation avec les sacs à litières (Figure 50. 4).

La comparaison des clichés de turricules obtenus pour les différentes modalités ne met pas en évidence de différence significative quant à la composition et l'agencement des constituants organiques et minéraux ou l'activité microbienne. L'ensemble des constituants est ingéré par les vers comme en témoigne la présence de fibres de cellulose altérées au sein du turricule prélevé sur la modalité HWA (compost d'ordures ménagères) (Figure 55.6), montré également dans Pey et al. (2013).

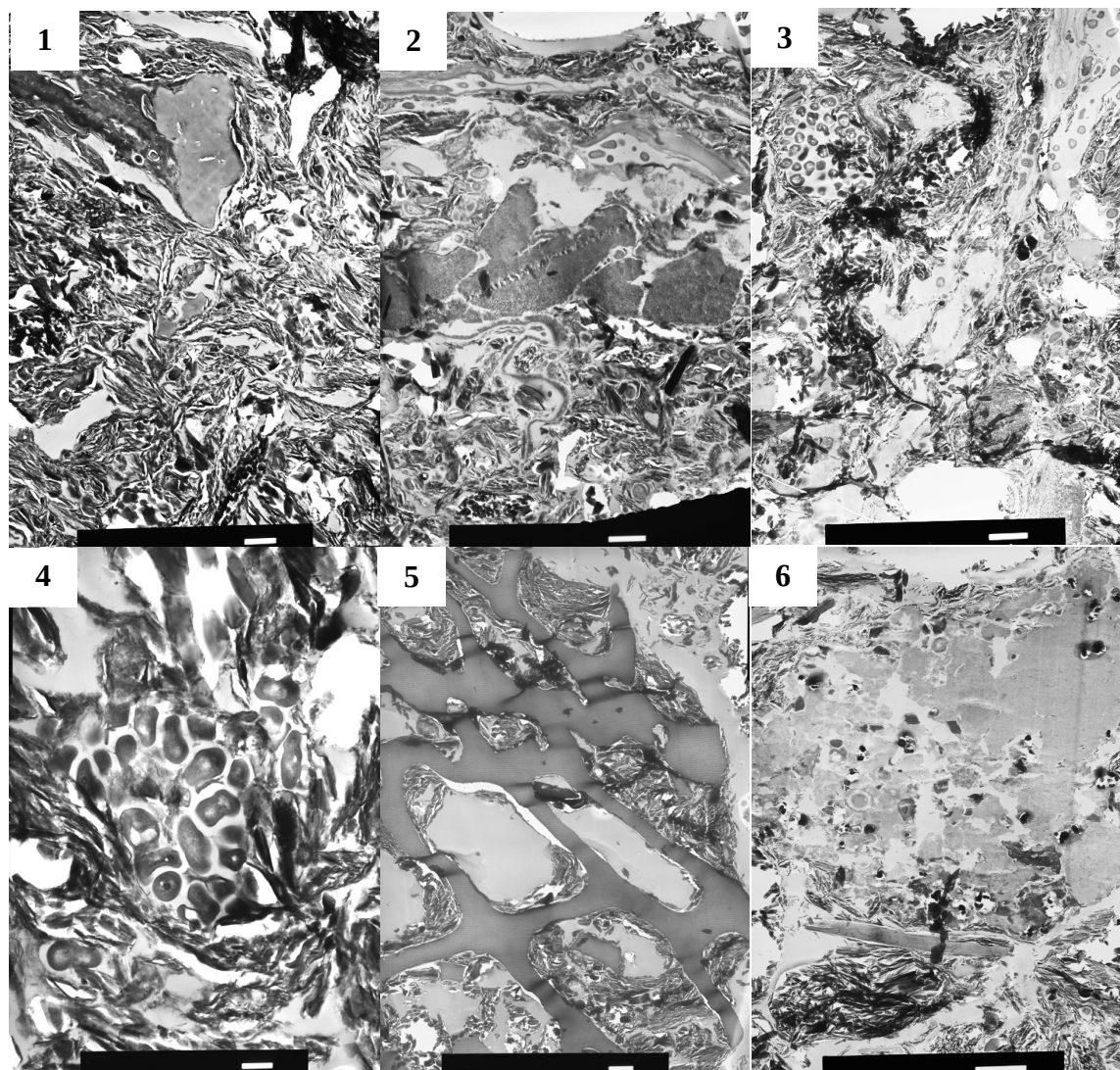


Figure 55 : Clichés MET de turricules. 1 et 4 : modalité CMF ; 2, 3 et 6 : modalité HWA (compost d'ordures ménagères) ; 5 : modalité MPS (boue de papeterie). Barre = 2 μ m, sauf pour le cliché 4 où la barre équivaut à 500 nm.

3.9 Croissance de la végétation

3.9.1 Production de biomasse aérienne

Depuis 1996 et dans le contexte des programmes ADEME VADETOX puis VADEBIO, trois espèces végétales de grande culture ont été installées sur le dispositif expérimental de la Bouzule : le colza, le blé d'hiver et le maïs fourrage.

Durant quatre ans, de 2002 à 2005, l'espèce cultivée a été le maïs (variété Anjou 258). Les

rendements, obtenus pour chacune de ces années, ont été représentés sur la Figure 56, et correspondent aux rendements après récolte des parcelles entières (moins les rangs situés sur le mètre de bordure éliminés au préalable). Les pesées ont été réalisées sur plante entière après broyage.

En 2002, les rendements obtenus variaient entre 14,3 et 17,9 tMS/ha. Ils sont comparables aux valeurs obtenues par ARVALIS pour des maïs fourrage pour le Nord-Est de la France (en moyenne 17,6 tMS/ha). Ces rendements ont systématiquement diminué les années suivantes avec, d'une part, un effet « année climatique » (e.g. 2003) et d'autre part, une tendance globale à la diminution des rendements années après années, due à l'arrêt d'apports de déchets et sous-produits. C'est pour la campagne 2002 que les différences entre les parcelles témoins, c'est-à-dire ayant eu un traitement de fertilisation minérale (CMF et COF), et celles des 8 autres traitements sont les plus marquées. On note une différence significative de production de biomasse entre LSS et CA qui présentent des extrêmes de potentiel fertilisant. En effet, la boue LSS est en particulier riche en azote biodisponible et a contribué plus globalement à l'enrichissement des parcelles en éléments fertilisants. Ces derniers effets sont moins marqués pour les années 2003, 2004, et 2005.

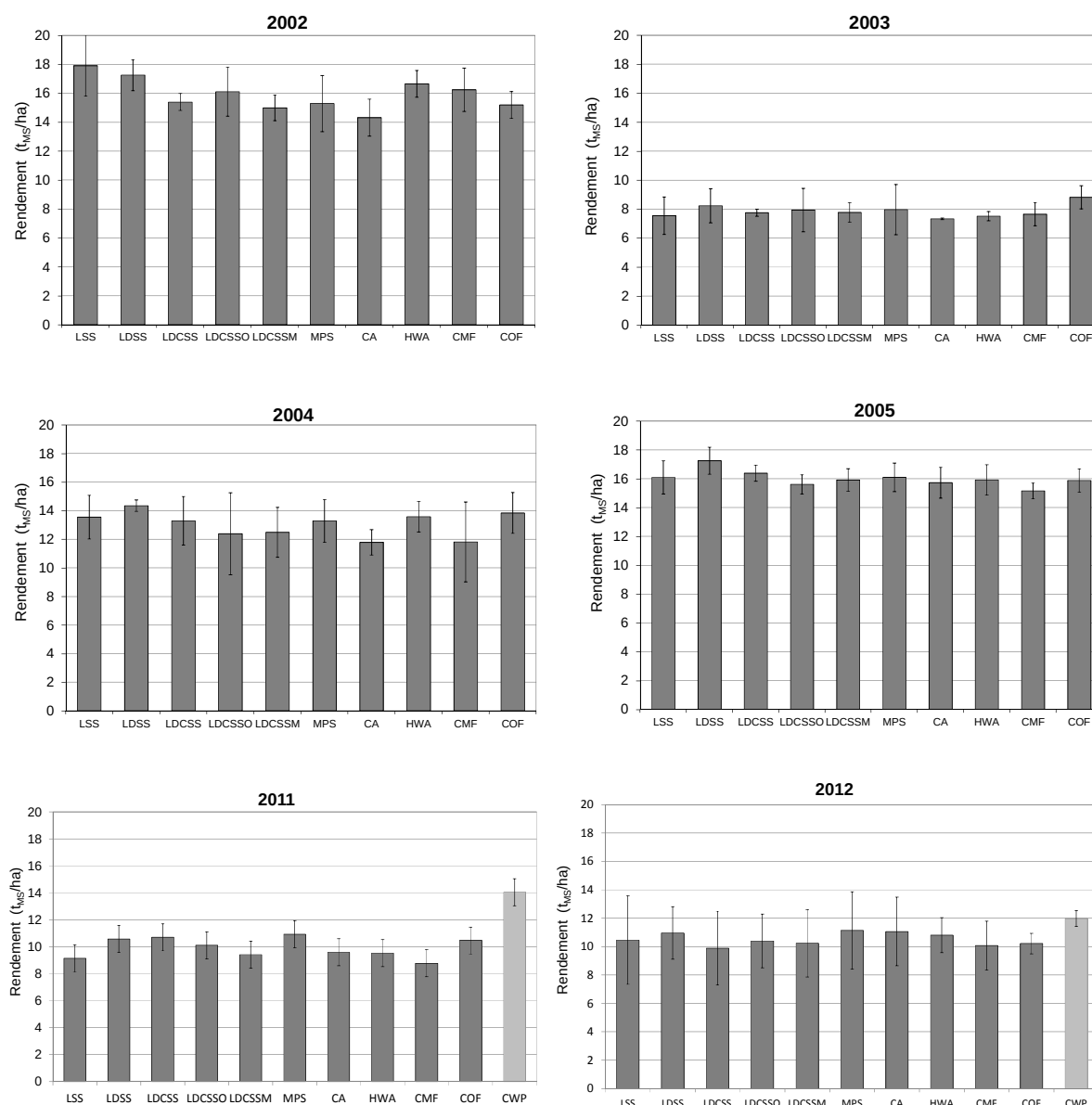


Figure 56 : Rendements du maïs fourrage entre 2002 et 2005 (première campagne VADETOX) puis 2011 et 2012 (campagne correspondant à VADEBIO)

A l'automne 2009, du blé d'hiver a été semé. Toutefois, désirant limiter au maximum l'apport d'intrants et notamment de produits phytosanitaires en cohérence avec les objectifs généraux du programme de recherche, un très fort développement de la flore adventice est apparu. Ce phénomène a conduit à un développement perturbé du blé, sans aucune significativité par rapport à des conditions habituelles de culture. En conséquence, il a été décidé de ne pas effectuer de mesure de biomasse pour évaluer les rendements en 2010.

Pour 2011, le choix de culture s'est alors porté sur du maïs fourrage (variété Ronaldinio), qui permettait une intervention minimale jusqu'au printemps sur les parcelles. La présence de sacs de litière dans le sol rendait en effet difficile tout travail du sol.

Le même dispositif (culture de maïs) a été réalisé en 2012 afin de pouvoir procéder à une comparaison interannuelle des rendements (Figure 56). Il faut noter que les rendements sur les parcelles témoins (CWP) sont plus élevés et moins variables que les autres parcelles. Globalement, les écarts-types élevés peuvent être expliqués par la pratique du semis direct qui induit le développement d'adventices sur certaines parcelles. Dans tous les cas, la tendance globale à la diminution des rendements années après années, due à l'arrêt d'apports de déchets et sous-produits est confirmée, ainsi que l'absence de différence significative de productions de biomasse entre les modalités initiales d'apports de déchets.

3.9.2 Teneurs en carbone et azote

En 2011, suite aux calculs de rendements, des analyses de carbone et d'azote (Figure 57, Figure 58) ont été réalisées sur la biomasse végétale obtenue sur les 44 parcelles. Ces analyses ont également permis de déterminer le rapport C/N (% de carbone/% d'azote) pour les différents traitements (Figure 59).

Très globalement, aucune différence significative n'a pu être mesurée pour les teneurs en C, N et les rapports C/N suivant les différentes modalités d'épandage de déchets. Ce résultat est en cohérence avec l'absence de différence significative de rendements en biomasse pour la récolte 2011 de maïs et avec une absence d'arrière-effets des épandages passés.

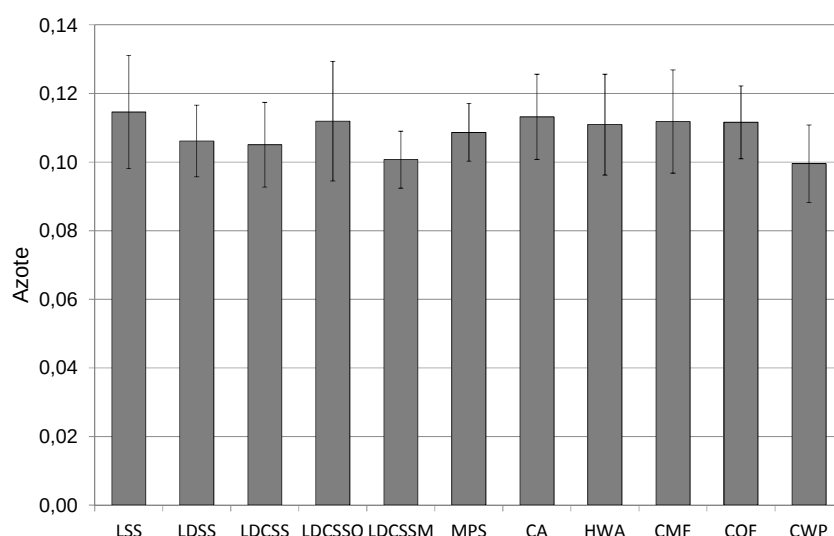


Figure 57 : Teneurs en azote (%) de la biomasse aérienne de maïs fourrage suivant les différents traitements en 2011 sur le site de la Bouzule

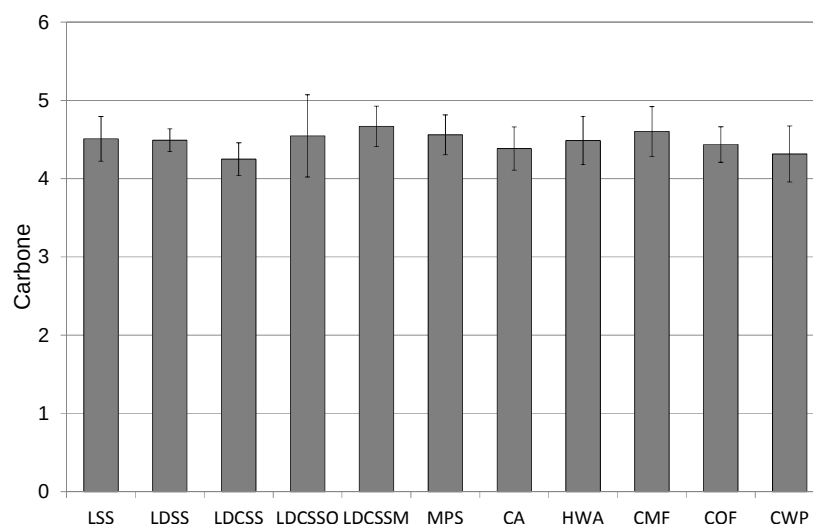


Figure 58 : Teneurs en carbone (%) de la biomasse aérienne de maïs fourrage suivant les différents traitements en 2011 sur le site de la Bouzule

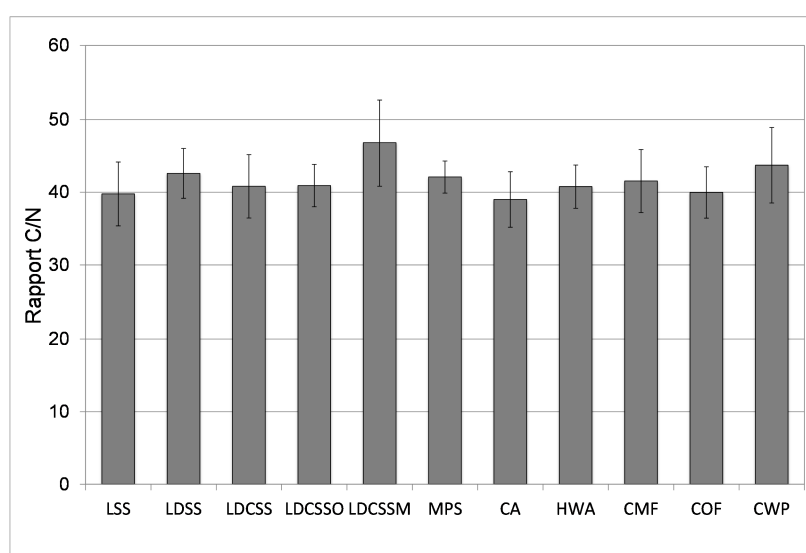


Figure 59 : Rapport C/N de la biomasse aérienne de maïs fourrage suivant les différents traitements en 2011 sur le site de la Bouzule

Le rapport C/N est un indicateur de l'état de la matière organique et plus précisément de sa dynamique de décomposition dans le sol. Les résultats obtenus à partir de la biomasse de maïs de l'essai sont cohérents avec ceux de la littérature (Tableau 21).

Tableau 21 : Rapports C/N de différentes biomasses en comparaison à celle de la biomasse de maïs (USDA, 2011)

Matériel	Rapport C/N
paille de seigle	82
paille de blé	80
paille d'avoine	70
canne de maïs	57
Biomasse VADEBIO 2011	42
seigle culture de couverture (anthèse)	37
paille de pois	29
seigle culture de couverture (végétative)	26
foin de luzerne matures	25
alimentation microbienne idéale	24
fumier de basse-cour pourri	20
foin de légumineuse	17
fumier de bovins	17
jeune foin de luzerne	13
vesce velue culture de couverture	11
microbes du sol (moyenne)	8

En conclusion, l'étude de la croissance de la végétation a permis de démontrer que le sol remplit sa fonction de support fertile pour des plantes et permet une production de biomasse globalement comparable à des rendements agricoles locaux, hors épandages de déchets urbains et industriels.

4 Conclusion

Au regard des résultats acquis différentes conclusions méritent d'être soulignées.

L'analyse des paramètres physico-chimiques des sols, prélevés en 2010 et 2011, laisse apparaître des différences significatives entre traitements qu'il est nécessaire de discuter.

- Une différence significative entre le témoin nouvellement créé CWP et les autres traitements est mise en évidence concernant les critères de **fertilité C et N**. Il est clair que CWP, provenant d'une prairie fraîchement retournée montre des teneurs en C et N nettement supérieures par rapport aux autres parcelles, dont la majeure partie de la production de biomasse a été exportée du système et n'est donc pas retournée au sol depuis plus de 15 années.
- Des différences significatives subsistent entre certains traitements au niveau des sols concernant **le P et le C/N**. Ainsi le P disponible (Olsen) reste significativement plus élevé dans les parcelles ayant reçu des boues urbaines, compostées ou non, par rapport aux autres traitements, confirmant l'intérêt de ces produits pour améliorer la fertilité phosphorique des sols. Par ailleurs le C/N reste aussi plus élevé dans les modalités ayant reçu des boues de papeterie et des cendres de combustion.
- Concernant **les métaux**, mettent si les concentrations dans les sols sont inférieures aux teneurs acceptées par la législation, quelques différences subsistent entre traitements. Ainsi le Cd et le Cu restent plus élevés dans les modalités ayant reçu des composts dopés en métaux, et le Pb reste plus abondant pour les modalités d'origine urbaine (boues et composts, ordures ménagères).

Considérant les caractéristiques biotiques des sols, il apparaît clairement **qu'aucun effet notable des traitements n'est visible en 2010 et 2011, respectivement 8 et 9 années après l'arrêt des épandages**.

- Ainsi, l'étude **des abondances et structures des communautés de microorganismes** ne présentent pas de différences suffisamment importantes pour conclure à un éventuel arrière effet. A contrario, un effet annuel est observé suggérant que les communautés bactériennes sont avant tout influencées par les facteurs pédo-climatiques. Il apparaît également des communautés bactériennes différentes dans le témoin CWP nouvellement créé en 2008, probablement du à un contexte et une histoire pédo-climatique contrastant avec les autres traitements. Il semble par ailleurs que les capacités des communautés dégradant l'atrazine soient encore présentes, même si faiblement détectables et non attribuable à la voie métabolique impliquant les gènes *atz* et *trz*. Cependant les traitements "compost d'ordures ménagères" (HWA), "cendres de combustion" (CA) et "boue de papeterie" (MPS) semblent accélérer la dégradation de l'atrazine, suggérant une modification des capacités de dégradation de la microflore. Des études plus fines par pyro-séquençage d'amplicons d'ARNr 16S, permettant d'accéder aux populations bactériennes minoritaires restent toutefois à entreprendre pour affiner l'ensemble de ces résultats.
- Concernant **le potentiel enzymatique** des sols, les analyses par incubations effectuées ne permettent pas de dégager d'effet traitement, excepté CWP, dont le potentiel est notablement plus élevé que celui des autres traitements.
- Considérant **la faune du sol (microarthropodes et macrofaune)**, aucune différence significative n'est observée entre traitements sur les critères d'abondance taxonomique, de diversité ou d'équitabilité. Seule la modalité CWP semble s'individualiser en considérant la structure des communautés de collemboles, due à l'apparition de certains taxons minoritaires sur cette modalité. Pour la macrofaune, on notera un niveau élevé d'abondances comparable à celui d'une prairie normande, suggérant une biodiversité exceptionnelle pour un site cultivé en grandes cultures. Par ailleurs les communautés de vers de terre ont évolué au cours des dix dernières années, montrant une forte augmentation des anéciques au détriment des endogés. Certaines espèces de vers de terre montrent également une forte structuration spatiale sur le site, ce qui pose la question de la pertinence de la taille des parcelles pour l'étude de la macrofaune. Malgré tout, l'étude des traits fonctionnels de la macrofaune permet d'individualiser tous les traitements ayant reçu des boues et composts de boues urbaines, ainsi que le traitement « cendres de combustion » par rapport aux témoins (CWP compris) et le traitement « compost d'ordures ménagères » HWA. Ce résultat reste à confirmer mais pourrait laisser penser que les traits fonctionnels des espèces seraient particulièrement pertinents à observer dans ce contexte.

Considérant les critères pris en compte pour étudier le fonctionnement biologique des sols et les services rendus par l'agrosystème, il apparaît clairement **qu'aucun effet notable des traitements n'est visible en 2010 et 2011, respectivement 8 et 9 années après l'arrêt des épandages.**

- Concernant les dynamiques de **décomposition de la matière organique** dans les sacs à litière, même si la totalité des résultats n'est pas encore disponible, la caractérisation des associations organo-minérales au niveau des pailles de blé ne permet de différencier aucun traitement.
- Au niveau des **macrostructures**, des traceurs de Produits Résiduaire Organiques restent visibles (fibres caractéristiques pour les modalités MPS ou HWA, structures noires de différentes tailles assimilables à des cendres de combustion dans la modalité CA).
- Toutefois au niveau des **microstructures**, l'analyse des fractions 0-20 µm des sols, les indicateurs microstructuraux des boues n'ont pas été retrouvés, alors qu'ils étaient toujours visibles 2 ans après le dernier épandage. L'analyse des turricules de vers de terre obtenus pour les différentes modalités ne met pas en évidence de différence significative quant à la composition et l'agencement des constituants organiques et minéraux ou l'activité microbienne.
- La production de **biomasse végétale**, qui apparaissait significativement différente entre traitements, juste après les épandages de PRO en 2002, montrant l'effet positif fertilisant de ces produits sur les rendements, ne présente plus aucune différence significative en 2011 et 2012. Il est probable que les différences significatives encore rencontrées au niveau de certains paramètres physico-chimiques des sols (Phosphore notamment) ne sont plus suffisantes pour induire un différentiel de production végétale. De même les teneurs en C, N et C/N analysés sur les végétaux récoltés en 2011 ne sont pas significativement différents entre traitements.

Références Bibliographiques

- ADEME, Cabinet Arthur Andersen, 1999. Examen de la situation de la filière de recyclage agricole des boues d'épuration urbaines en Europe et dans divers autres pays du monde. ADEME Editions, Paris.
- Aggelides, S.M., Londra, P.A., 2000. Effects of compost produced from town wastes and sewage sludge on the physical properties of a loamy and clay soil. *Bioresource Technology* 71, 253-259.
- Al-Assiuty, A.I., Khalil, M.A., Abdel-Lateif, H.M., 2000. Effects of dry sludge application on soil microarthropod communities in a reclaimed desert ecosystem. *Pedobiologia* 44, 567 - 578.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F., 2001. Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. *Bioresource technology* 77, 109-114.
- Angers D.A., Samson N. and Légère A., 1993. Early changes in water-stable aggregation induced by rotation and tillage in a soil under barley production. *Can J. Soil Sci*, 73, 51-59.
- Aubert, M., Hedde, M., Decaëns, T., Margerie, P., Alard, D., Bureau, F., 2005. Facteurs contrôlant la variabilité spatiale de la macrofaune du sol dans une hêtraie pure et une hêtraie charmaie. *Comptes Rendus Biologie* 328, 57-74.
- Augé, R.M., Stodola, A.J.W., Tims, J.E., Saxton, A.M., 2001. Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and Soil* 230, 87-97.
- Bacholle, C., Leclerc, B., Coppin, Y., 2005. Utilisation des produits organiques en reconstitution de sol: inventaire des pratiques en France et état de l'art des connaissances liées aux impacts de ces pratiques. ADEME.
- Baker, G., Michalk, D., Whitby, W., O'Grady, S., 2002. Influence of sewage waste on the abundance of earthworms in pastures in south-eastern Australia. *European Journal of Soil Biology* 38, 233-237.
- Balesdent J., Chenu C. and Balabane M., 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil and Tillage Research*, 53, 215-230.
- Barnhisel, R.I., Hower, J.M., 1997. Coal surface mine reclamation in the eastern United States: the revegetation of disturbed lands to hayland/pasture or cropland. *Advances in Agronomy* 61, 233-275.
- Bardgett, R.D., Cook, R., 1998. Functional aspects of soil animal diversity in agricultural grasslands. *Appl. Soil Ecol.* 10, 263-276.
- Barrios, E., 2007. Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics* 64, 269-285.
- Bayon, R.C.I., Milleret, R., 2009. Effects of earthworms on phosphorus dynamics - a review. *Dynamic Soil, Dynamic Plant* 3, 21-27.
- Bearden, B.N., Petersen, L., 2000. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of a vertisol. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Berthelin, J., Leyval, C., Toutain, F., 1994. Biologie des sols-rôle des organismes dans l'altération et l'humification. In: Bonneau, M., Souchier, B. (Eds.), *Pédologie*, Vol. 2-Constituants et propriétés des sols. Masson, Paris, pp. 143-247.
- Bispo, A., Cluzeau, D., Creamer, R., Dombos, M., Graefe, U., Krogh, P.H., Sousa, J.P., Peres, G., Rutgers, M., Winding, A., Römbke, J., 2010. Indicators for monitoring soil biodiversity. *Integrated Environmental Assessment and Management* 5, 717-719.
- Bossuyt, H., Six, J. and Hendrix, P.F., 2005. Protection of soil carbon by microaggregates within earthworm casts. *Soil Biol. Bioch.*, 37, 251- 258.
- Bouché, M., 1972a. Lombriciens de France. *Ecologie et Systématique*. Institut National de Recherches Agronomiques, Paris.
- Bouché, M.B., 1972b. Lombriciens de France. *Ecologie et Systématique*. INRA, Paris.
- Bouché M.B., Gardner R.H., 1984. Earthworm functions VIII, - Population estimation techniques. *Rev. Ecol. Biol. Sol* 21, 37-63.
- Brazauskienė, D.-M., Paulauskas, V., Sabienė, N., 2008. Speciation of Zn, Cu, and Pb in the soil depending on soil texture and fertilization with sewage sludge compost. *Journal of Soils and Sediments* 8, 184-192.
- Briones, M.J.I., Barreal, M.E., Harrison, A.C., Gallego, P.P., 2011. Earthworms and nitrogen applications to improve soil health in an intensively cultivated kiwifruit orchard. *Applied Soil Ecology* 49, 158-166.
- Brolemann, H.W., 1930. Faune des Myriapodes de France. Imprimerie toulousaine, Toulouse.
- Bruce, L.J., Mac Cracken, D.I., Foster, G.N., Aitken, M.N., 1997. The effects of cadmium and zinc-rich

- sewage sludge on epigeic collembola populations. *Pedobiologia* 41, 167-172.
- Bruce, L.J., McCracken, D.I., Foster, G.N., Aitken, M.N., 1999. The effects of sewage sludge on grassland euedaphic and hemiedaphic collembolan populations. *Pedobiologia* 43, 209-220.
- Burelle, S., Beaulieu, R., St-Laurent, S., 2005. Direction des politiques en milieu terrestre. Québec, p. 35.
- Carapelli, A., Lio, P., Nardi, F., van der Wath, E., Frati, F., 2007. Phylogenetic analysis of mitochondrial protein coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea. p. S8.
- Cannavacciuolo, M., Bellido, A., Cluzeau, D., Gascuel, C., Trehen, P. 1998 A geostatistical approach to the study of earthworm distribution in grassland. *Appl. Soil Ecol.* 9, 345 :349
- Carter M.R., 1994. A review of conservation tillage strategies for humide temperate regions. *Soil Till Res.*, 31, 289-301.
- Chaussod, R., 1996. La qualité biologique des sols: évaluation et implications. *Etude et Gestion des Sols* 3-4, 261-278.
- Chaussod, R., Nicolardot, B., Catroux, G., Chretien, J., 1986. Relations entre les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de quelques sols cultivés. *Sciences du sol* 2, 213-226.
- Cluzeau D., Cannavacciuolo M., Pérès G., 1999. Indicateurs microbiologiques des sols: les lombriciens—Méthode d'échantillonnage dans les agrosystèmes tempérés. In: Institut Technique du Vin. 12ème Colloque Viticole et OEnologique, Paris, pp. 25– 35.
- Coineau, Y., Cleva, K., du Chatenet, G., 1997. Ces animaux minuscules qui nous entourent. Delachaux et Niestlé.
- Cole, L.J., McCracken, D.I., Foster, G.N., Aitken, M.N., 2001. Using Collembola to assess the risks of applying metal-rich sewage sludge to agricultural land in western Scotland. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 83, 177-189.
- Cortet, J., Gillon, D., Joffre, R., Ourcival, J.-M., Poinot-Balaguer, N., 2002. Effects of pesticides on organic matter recycling and microarthropods in a maize field: use and discussion of the litterbag methodology. *Eur. J. Soil Biol.* 38, 261-265.
- Cortet, J., Gomot de Vauflery, A., Poinot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., Cluzeau, D., 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *Eur. J. Soil Biol.* 35, 115-134.
- Cortet, J., Kocev D., Ducobu C., Džeroski S., Debeljak M., Schwartz C., 2011. Using data mining to predict soil quality after application of biosolids in agriculture. *J. Environ. Qual.* 40, 1972-1982.
- Cortet, J., Poinot-Balaguer, N., 2000. Impact de produits phytopharmaceutiques sur les microarthropodes du sol en culture de maïs irrigué: approche fonctionnelle par la méthode des sacs de litière. *Canadian Journal of Soil Science* 80, 237 - 249.
- Cuendet, G., Ducommun, A., 1990. Earthworm populations and surface activity in relation with sewage sludge and other fertilizers. Peuplements lombriciens et activité de surface en relation avec les boues d'épuration et autres fumures. *Revue Suisse de Zoologie* 97, 851-869.
- Debosz K., Petersen S.O., Kure L.K. and Ambus P., 2002. Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. *Applied Soil Ecology*, 19, 237-248.
- Decaëns T., Galvis J.H., Amézquita E., 2001. Propriétés des structures produites par les ingénieurs écologiques à la surface du sol d'une savane colombienne. *C.R. Acad. Sci.* 324, 465-478.
- Degens B.P., 1997. Macro-aggregation in soils by biological bonding and binding mechanisms and the factors affecting these: a review. *Aust. J. Soil Res.*, 35, 431-459.
- Deharveng, L., 2004a. Fauna Europaea: Collembola. Fauna Europaea Version 1.1. <http://www.faunaeur.org>.
- Deharveng, L., 2004b. Recent advances in Collembola systematics. *Pedobiologia* 48, 415-433.
- Devers M., Soulas G. & Martin-Laurent F. 2004 Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil, *Journal of Microbiological Methods* 56, 3–15
- Dexter, 1988. Advances in characterization of soil structure. *Soil and Tillage Research*, 11, 199-238.
- Diaz E., Roldan A., Lax A. and Abalajedo J., 1994. Formation of stable aggregates in degraded soil by amendment with urban refuse and peat. *Geoderma*, 63, 277-288.
- Dick, W.A., Tabatabai, M.A. 1992. Potential Uses of Soil Enzymes, In: Meeting, F. B. (Ed)., *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker, New York, pp. 95-127.
- Drobne, D., Hopkin, S.P., 1994. The toxicity of zinc to terrestrial Isopods in a standard laboratory test. *Ecotoxicology and environmental safety* 31, 1-6.
- El Azhari N., Chabaud S., Percept A., Bru D. & Martin-Laurent F. 2007. *pcaH*, a molecular marker for estimating the diversity of the protocatechuate-degrading bacterial community in the soil

- environment, *Pest Management Science* 63, 459–467.
- El Azhari, N., Lainé, S., Sappin-Didier, V., Beguet, J., Rouard, N., Philippot, L., Martin-Laurent, F. 2012. Long-term impact of 19 years' farmyard manure or sewage sludge application on the structure, diversity and density of the protocatechuate-degrading bacterial community. *Agriculture Ecosystem & Environment*. 158, 72-82.
- Elmholt S., Schjøning P., Munkholm L.J. and Deboz Z., 2008. Soil management effects on aggregate stability and biological binding. *Geoderma*, 144, 455-467.
- Epstein E., Taylor J.M. and Chaney R.L., 1976. Effects of sewage sludge compost applied to soil on some soil physical and chemical properties. *J. Environ. Qual*, 5, 422-426.
- Gisin, H., 1943. Ökologie und Lebensgemeinschaften der Collembolen im Schweizerischen Exkursionsgebiet Basels. *Revue Suisse de Zoologie* 50, 131-224.
- Gobat, J.-M., Aragno, M., Matthey, W., 1998. *Le sol vivant, base de pédologie, biologie des sols*, 1st edn. Lausanne.
- Grelle, C., Fabre, M.C., Leprêtre, A., Descamps, M., 2000. Myriapod and Isopod communities in soils contaminated by heavy metal in northern France. *Eur. J. Soil Sci.* 51, 425-433.
- Giusquiani P.L., Pagliai M., Gigliotti G., Businelli D. and Benetti A., 1995. Urban waste compost: effects on physical, chemical, and biochemical soil properties. *J. Environ. Qual*, 24: 175-182.
- Gunadi, B., Edwards, C.A., Arancon, N.Q., 2002. Changes in trophic structure of soil arthropods after the application of vermicomposts. *Eur. J. Soil Biol.* 38, 161-165.
- Hafeez, F., Martin-Laurent, F., Béguet, J., Bru, D., Cortet, J., Schwartz, C., Morel, J.-L. & Philippot, L. 2012. Taxonomic and functional characterization of microbial communities in constructed Technosols, *Journal of Soils and Sediments* 12 (9), 1396–1406
- Hargreaves, J.C., Adl, M.S., Warman, P.R., 2008. A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 123, 1-14.
- Hedde, M., Pey, B., Auclerc, A., Capowiez, Y., Cluzeau, D., Cortet, J., Decaëns, T., Deharveng, L., Dubs, F., Grumiaux, F., Guernion, M., Joimel, S., Laporte, M.-A., Pasquet, A., Pelosi, C., Pernin, C., Ponge, J.-F., Salmon, S., Santorufu, L., Nahmani, J., 2012a. BETSI, a complete framework for studying soil invertebrate functional traits, XVI ICSZ - International Colloquium on Soil Zoology, Coimbra, P.
- Hedde, M., van Oort, F., Lamy, I., 2012b. Functional traits of soil invertebrates as indicators for exposure to soil disturbance. *Environmental Pollution* 164, 59-65.
- Hedde, M., van Oort, F., Renouf, E., Thénard, J., Lamy, I., 2013. Dynamics of soil fauna after plantation of perennial energy crops on polluted soils. *Applied Soil Ecology* 66, 29-39.
- Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S. & Philippot L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils, *Applied and Environmental Microbiology* 72 (8), 5181–5189
- Hopkin, S.P., 1997. *Biology of the springtails (Insecta: collembola)*. Oxford University Press, Inc., New York.
- Hopkin, S.P., 2002. Collembola. In: Lal, R. (Ed.), *Encyclopedia of Soil Science*. Marcel Dekker, pp. 207-210.
- Hunt, H.W., Coleman, D.C., Ingham, E.R., Ingham, R.E., Elliott, E.T., Moore, J.C., Rose, S.L., Reid, C.P.P., Morley, C.R., 1987. The detrital food web in a shortgrass prairie. *Biol. Fertil. Soils* 3, 57-68.
- ISO-11063, 2010. Soil quality - Method to directly extract DNA from soil samples. International organization for Standardization (ISO).
- ISO 23611-2., 2004. Soil Quality - Sampling of soil Invertebrates Part 2: sampling and extraction of microarthropods (Collembola and Acari), Geneva, Switzerland.
- Jones, D.T., Hopkin, S.P., 1998. Reduced survival and body size in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* from a metal-polluted environment. *Environmental Pollution* 99, 215-223.
- Jongmans, A.G., Puleman, M.M., Balabane, M., van Oort, F., Marinissen, J.C.Y., 2003. Soil structure and characteristics of organic matter in two orchards differing in earthworm activity. *Appl. Soil Ecol.* 24, 219-232.
- Joosse, N.G., 1981. Ecological strategies and population regulation of collembola in heterogeneous environments. *Pedobiologia* 21, 346-356.
- Jordan, D., Miles, R., Hubbard, V., Lorenz, T. 2004. Effect of management practices and cropping systems on earthworm abundance and microbial activity in Sanborn Field: a 115-year-old agricultural field. *Pedobiologia* 48, 99–110.
- Jouquet P., Zangerle A., Rumpel C., Brunet D., Bottinelli N. and Tran Duc, T., 2009. Relevance and limitations of biogenic and physico-genic classification: a comparison of approaches for differentiating the origin of soil aggregates. *Eur. J. Soil Sci.*, 60, 1117-1125.
- Juste, C., Mench, M., 1992. Long-term application of sewage sludge and its effects on metal uptake by

- crops. In: Adriano, D.C. (Ed.), *Biochemistry of trace elements*. Lewis, Boca Raton, pp. 159-193.
- Juste, C., Solda, P., 1977. Effets d'applications massives de boues de stations d'épuration urbaines en monoculture de maïs: action sur le rendement et la composition des plantes et sur quelques caractéristiques du sol. *Bull. AFES Science du Sol* 3, 147-155.
- Klironomos, J.N., Hart, M.M., 2001. Animal nitrogen swap for plant carbon. *Nature* 410, 651-652.
- Klironomos, J.N., Moutoglou, P., 1999. Colonization of nonmycorrhizal plants by mycorrhizal neighbours as influenced by the collembolan, *Folsomia candida*. *Biol. Fertil. Soils* 29, 277-281.
- Krantz, G.W., 1978. *A manual of acarology*. Oregon State University Book Stores, Inc. Corvallis.
- Kumar, S., Mallik, R.S., Dahiya, I.S., 1985. Influence of different wastes upon water retention transmission and contact characteristics of sandy soil. *Aust. J. Soil Res.*, 23, 131-136.
- Ladd J.N., Foster R.C., Nannipieri P., Oades J.M., 1996. Soil structure and biological activity. In: Stozky G., Bollag J.M. (Eds), *Soil Biochemistry* Marcel Dekker, 9, 23-78.
- Latreille, P.A., 1804. *Histoire naturelle, générale et particulière des Crustacés et des Insectes*. F. Dufart, Paris.
- Lavelle, P., Spain, A.V., 2001. *Soil ecology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Lee K.E. and Foster R.C., 1991. Soil fauna and soil structure. *Aust. J. Soil Res.*, 29, 745-746.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidising prokaryotes in soils. *Nature* 442: 806–809.
- Levi-Minzi, R., Riffaldi, R., Guidi, G., Poggio, G., 1985. Chemical characterization of soil organic matter in a field study with sewage sludges and composts. In : *long-term Effects of Sewage Sludge and farm Slurries Applications* (eds. William, J.H. et al.). Elsevier, New York. pp. 151-160.
- Lévy, A., 2001. Evaluation de la phytodisponibilité du cadmium des sols. Mémoire de DEA Sciences Agronomiques. INPL-ENSAIA, p. 30p.
- Lindquist, E.E., 1984. Current theories on the evolution of major groups of Acari and on their relationships with other groups of Arachnida, with consequent implications for their classification. In: Griffiths, D.A., Bowman, C.E. (Eds.), *Acarology VI* John Wiley & Sons, New York, pp. 28-62.
- Logan, T.J., Lindsay, B.J., Goins, L.E., Ryan, J.A., 1997. Field assessment of sludge metal bioavailability to crops: sludge rate response. *Journal of Environmental Quality* 26, 534-550.
- Lopez-Gutierrez J.C., Henry S., Hallet S., Martin-Laurent F., Catroux G. & Philippot L. 2004. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR, *Journal of Microbiology Methods* 57 (3), 399–407
- Lubbock, J., 1873. *Monograph of the Collembola and Thysanura*. Ray Society, London.
- Ludwig B., John B., Ellerbrock R., Kaiser M. and Flessa H., 2003. Stabilization of carbon from maize in a sandy soil in a long-term experiment. *Eur. J. Soil Sci.*, 54, 117–126.
- Lundqvist, L., 2004. Fauna Europea: Acariformes, Mesostigmata. Fauna Europea version 1.1., www.faunaeur.org.
- Magowski, W., 2004. Fauna Europea: Acariformes, Actinotrichida. Fauna Europea version 1.1., www.faunaeur.org.
- Mantovi, P., Baldoni, G., Toderi, G., 2005. Reuse of liquid, dewatered, and composted sewage sludge on agricultural land: effects of long-term application on soil and crop. *Water Research* 39, 289-296.
- Marinari, S., Masciandaro, G., Ceccanti, B., Grego, S., 2000. Influence of organic and mineral fertilisers on soil biological physical properties. *Bioresource technology* 72, 9-17.
- Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J.-C., Soulas G. & Catroux G. 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods, *Applied and Environmental Microbiology* 67 (5), 2354–2359
- Martin-Laurent, F., Cornet, L., Ranjard, L., Lopez-Gutierrez, J.-C., Philippot, L., Schwartz, C., Chaussod, R., Catroux, G., Soulas, G., 2004. Estimation of atrazine-degrading genetic potential and activity in three French agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 425-435.
- Meharg, A.A., Shore, R.F., Broadgate, K. 1998. Edaphic factors affecting the toxicity and accumulation of arsenate in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environmental Toxicology & Chem.* 17, 1124–1131.
- Miller, R.M., Jastrow, J.D., Reinhardt, D.R., 1995. External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* 103, 17-23.
- Mitchell, M.J., Hartenstein, R., Swift, B.L., Neuhauser, E.F., Abrams, B.I., Mulligan, R.M., Brown, B.A., Craig, D., Kaplan, D., 1978. Effects of different sewage sludges on some chemical and biological characteristics of soil. *Journal of Environmental Quality* 7, 5591-5598.
- Monnier G., 1965. Action des matières organiques sur la stabilité structurale des sols. Thèse de la faculté des sciences de Paris, 140 p.
- Morel, J.L., Guckert, A., 1984. Evolution en plein champ de la solubilité dans DTPA des métaux lourds

- du sol introduits par des épandages de boues urbaines chaulées. *Agronomie* 4, 377-386.
- Morel, J.L., Leyval, C., Schwartz, C., Florentin, L., Berthelin, J., 1998. Dynamique des éléments en traces dans le système sol-plante. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 84, 133-147.
- Morin H, 2006, Evaluation des risques sanitaires liés aux éléments traces métalliques, composés traces organiques et agents pathogènes dans le cadre de l'épandage de boues urbaines et boues issues d'industries agroalimentaires, mémoire de l'Ecole Nationale de la Santé Publique, 69 p.
- Muir, M.A., Yunusa, I.A.M., Burchett, M.D., Lawrie, R., Chan, K.Y., Manoharan, V., 2007. Short-term responses of two contrasting species of earthworms in an agricultural soil amended with coal fly-ash. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 987-992.
- Mulbry W., Zhu H., Nour S., Topp E. 2002. The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioides* sp. strain C190: cloning and construction of gene-specific primers, *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 75-79.
- Nahmani, J., Lavelle, P., Lapied, E., van Oort, F. 2003. Effects of heavy metal soil pollution on earthworm communities in the north of France: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. *Pedobiologia* 47, 663-669.
- Norton, R.A., Kethley, J.B., Johnston, D.E., OConnor, B.M., 1993. Phylogenetic perspectives on genetic systems and reproductive modes of mites. In: Wrensch, D.L., Ebbert, M.A. (Eds.), *Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites*. Chapman & Hall, New York, pp. 8-99.
- OConnor, B.M., 1984. Phylogenetic relationships among higher taxa in the Acariformes, with particular reference to the Astigmata. In: Griffiths, D.A., Bowman, C.E. (Eds.), *Acarology VI*. Ellis-Horwood Ltd, Chichester.
- Oleszczuk, P., 2006. Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge-amended soil. *Chemosphere* 65, 1616-1626.
- Oliver, I.W., McLaughlin, M.J., Merrington, G., 2005. Temporal trends of total and potentially available element concentrations in sewage biosolids: a comparison of biosolid surveys conducted 18 years apart. *Science of The Total Environment* 337, 139-145.
- Paoletti, M.G., Sommaggio, D., Favretto, M.R., Petruzzelli, G., Pezzarossa, B., Barbafieri, M., 1998. Earthworms as useful bioindicators of agroecosystem sustainability in orchards and vineyards with different inputs. *Applied Soil Ecology* 10, 137-150.
- Paillet, V. 1992. Etude des teneurs "naturelles" et éléments-traces métalliques dans les sols agricoles du grand Nord-Est de la France (Cd-Cr-Cu-Ag-Ni-Pb-Se-Zn). Rapport de stage Univ. Poitiers / Ademe, 39p
- Peigné, J., Cannavaciolo, M., Gautronneau, Y., Aveline, A., Giteau, J.L., Cluzeau, D., 2009. Earthworm populations under different tillage systems in organic farming. *Soil and Tillage Research* In Press, Corrected Proof.
- Pernin, C., Cortet, J., Joffre, R., Le Petit, J., Torre, F., 2006. Sewage sludge effects on mesofauna and cork oak (*Quercus suber* L.) leaves decomposition in a Mediterranean forest firebreak. *J. Environ. Qual* 35, 2283-2292.
- Perucci, P., 1990. Effect on the addition of municipal solid waste compost on microbial biomass and enzyme activities. *Biol. Fertil. of Soils*, 10, 221-226.
- Petersen, S.O., Henriksen, K., Mortensen, G.K., Krogh, P.H., Brandt, K.K., Sørensen, J., Madsen, T., Petersen, J., Grøn, C., 2003. Recycling of sewage sludge and household compost to arable land: fate and effects of organic contaminants, and impact on soil fertility. *Soil and Tillage Research* 72, 139-152.
- Pey, B., Cortet, J., Watteau, F., Cheynier, K., Schwartz, C., 2013. Structure of earthworm burrows related to organic matter of a constructed Technosol. *Geoderma*, 202, 203, 103-111.
- Pielou, E.C., 1966. Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession. *Journal of Theoretical Biology* 10, 370-383.
- Pielou, E.C., 1975. *Ecological diversity*. John Wiley and Sons, New York.
- Porco, D., Potapov, M., Bedos, A., Busmachu, G., Weiner, W.M., Hamra-Kroua, S., Deharveng, L. 2012a. Cryptic diversity in the ubiquitous species *Parisotoma notabilis* (Collembola, Isotomidae): a long used chimeric species? *PLoS One* 7: e46056.
- Porco, D., Bedos, A., Greenslade, P., Janion, C., Skarżyński, D., Stevens, M.I., Jansen van Vuuren, B., Deharveng, L. 2012b Challenging species delimitation in Collembola: cryptic diversity among common springtails unveiled by DNA barcoding. *Invertebrates Systematics* 26: 470-477.
- Price, G.W., Voroney, R.P., 2008. Response to annual applications of de-inked papermill biosolids by field earthworms on three agricultural soils. *Applied Soil Ecology* 38, 230-238.
- R Development Core Team, 2010. R a language and environment for statistical computing, version 2.10.1.
- Renaud, A., 2003. Impact des pratiques d'entretien des sols sur les microarthropodes et la décomposition de la matière organique dans un vignoble méditerranéen. Aix-Marseille III, Marseille, p. 362.

- Rogers, H.B., Beyrouthy, C.A., Nichols, T.D., Wolf, D.C., Reynolds, C.M., 1996. Selection of cold-tolerant plants for growth in soils contaminated with organics. *Journal of soil contamination* 5, 171-186.
- Römbke, J., Heimbach, F., Hoy, S., Kula, C., Scott-Fordsmand, J., Sousa, P., Stephenson, G., Weeks, J., 2003. Effects of Plant Protection Products on Functional Endpoints in soil. SETAC press, Pensacola.
- Sakata, T., Norton, R.A., 2001. Opisthonotal gland chemistry of early-derivative oribatid mites (Acari) and its relevance to systematic relationships of Astigmata. *International Journal of Acarology* 29, 345-350.
- Salmon, J.T., 1964. An index to the Collembola. *Royal Society of New Zealand Bulletin* 7, 1-651.
- Schnurer, J., Rosswall, T., 1982. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. *Appl. Environ. Mic.* 43, 1256-1261.
- Schwartz, C., Séré, G., Florentin, L., Morel, J.L., 2006. Impact à long terme de l'épandage de déchets en agrosystèmes. Rapport final. Contrat ADEME 0375C0006. Institut National Polytechnique de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, p. 124 p.
- Shultz, J.W., 1990. Evolutionary morphology and phylogeny of Arachnida. *Cladistics* 6, 1-38.
- Singh, R.P., Agrawal, M., 2008. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management* 28, 347-358.
- Smith, S.R., 2009. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environment International* 35, 142-156.
- Smith, S.E., Read, D.J., 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd ed. Academic Press, London.
- Smith, R.G., McSwiney, C.P., Grandy, A.S., Suwanwaree, P., Snider, R.M., Robertson, G.P., 2008. Diversity and abundance of earthworms across an agricultural land-use intensity gradient. *Soil & Tillage Research* 100, 83-88.
- Sort, X., Alcaniz, J.M., 1996. Contribution of sewage sludge to erosion control in the rehabilitation of limestones quarries. *Land degradation and Development*, 7, 69-76.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1996. The effects of metal contamination on earthworm populations around a smelting works: quantifying species effects. *Appl. Soil Ecol.* 4, 147-160.
- Stamatiadis, S., Doran, J.W., Kettler, T., 1999. Field and laboratory evaluation of soil quality changes resulting from injection of liquid sewage sludge. *Appl. Soil Ecol.* 12, 263-272.
- Tebbe, C.C., Czarnetzki, A.B., Thimm, T., 2006. Collembola as a habitat for microorganisms. In: König, H., Varma, A. (Eds.), *Intestinal Microorganisms of Soil Invertebrates*. Springer, Berlin, pp. 133-153.
- Tebrügge, F., Düring, R.-A. 1999. Reducing tillage intensity — a review of results from a long-term study in Germany. *Soil & Tillage Res.* 53, 15–28.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S., Olivier, J.-M. 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* 7, 75–83
- Tourna, M., Freitag, T.E., Nicol, G.W., and Prosser, J.I. 2008. Growth, activity and temperature responses of ammonia oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *Environ Microbiol* 10, 1357–1364.
- USDA NRCS East National Technology Support Center, Greensboro, NC. 2011, Carbon to nitrogen ratios in cropping systems, 2 pp.
- Vandel, A., 1962. *Faune de France Isopodes terrestres*. Paul Lechevalier, Paris.
- Van Straalen, N.M., Denneman, C.A.J. 1989. Ecotoxicological evaluation of soil quality criteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 18, 241-251.
- Walter, D.E., Krantz, G.W., Lindquist, E., 1996. Acari. The Mites. Version 13 December 1996. <http://tolweb.org/Acari/2554/1996.12.13>. The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.
- Watteau F., Villemin G., Burtin G. and Jocteur-Monrozier L., 2006. Root impact on the stability and constitution of the fine organo-mineral associations in a maize cultivated soil. *Eur. J. Soil Sci.*, 57, 247-257.
- Watteau F., Villemin G., Bartoli F., Schwartz C., Morel J.L., 2012. 0-20 µm aggregate typology based on the nature of aggregative organic materials in a cultivated silty topsoil. *Soil Biol. Biochem.*, 4, 103-114.
- Wei, Q.F., Lowery, B., Peterson, A.E., 1985. Effect of sludge application on physical properties of silty clay loam soil. *Journal of Environmental Quality* 14, 178-180.
- Zhang, N., Liao, Y., Sun, F., Wang, C., Sun, Z., 2012. Earthworm population characteristics in soils different in land use and their relationships with biological fertility of the soils. *Acta Pedologica Sinica* 49, 364-372.

Annexe 1 : Protocole du fractionnement granulométrique (1/3)

Rédactrices : Adeline BOUCHARD et Marion KLEIN

ETAPE 2// Mise en solution et Distribution des Sables Grossiers (SG) et Sables Fins (SF) par tamisage

Date : 25/10/10

Méthode : (voir schéma ci-contre)

- Préparation et pesée de 60 cristallisoirs destinés à recevoir les différentes fractions (SG, SF, LG+LF+A, LF+A, A)

- Préparation de 4 répétitions pour chaque matrice de la SERIE 1 : Pesée de 30 g de sol brute (à l'aide de BAL 00 ?????) dans un flacon de 1L en plastique + rajout de 200 ml d'eau distillé (Voir tableau 6 ci-dessous)
- Mise en agitation : 1H
- Tamissage des fractions SG et SF et récupération dans les cristallisoirs (pesée au préalable) à l'aide de la pissette d'ED (Quantité d'eau nécessaire : 700 ml QSP)
 - LSE TAM 050 pour fraction de Sables Grossiers (SG : 2 mm-200µm)
 - LSE TAM 055 pour fraction de Sables Fins (SF : 200µm - 50µm)

- Séchage des fractions: à l'étuve (T°C (étuve)=60 °C pendant 48H) des cristallisoirs contenant SG et SF ainsi récupérés, pour détermination du pourcentage de Sables (Fin et Grossier) il est aisé de calculer le pourcentage des sables puisque nous en avons récupéré la totalité sur notre masse initiale de sol brute

REMARQUE : Après les 48H de séchage à l'étuve et avant d'effectuer les pesées, les cristallisoirs sont placés dans des dessiccateurs pendant 1H (gel de silice).

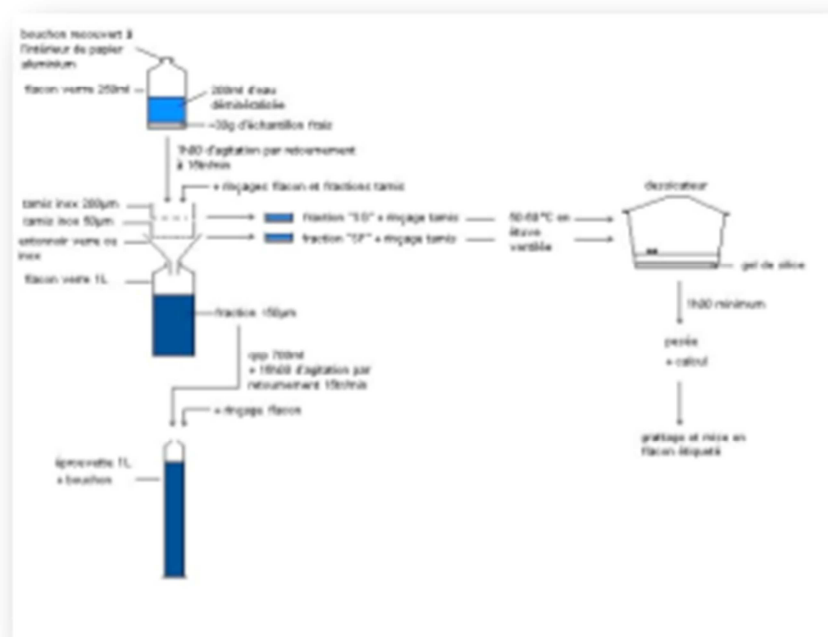


Figure 2 - Mise en solution et distribution des sables

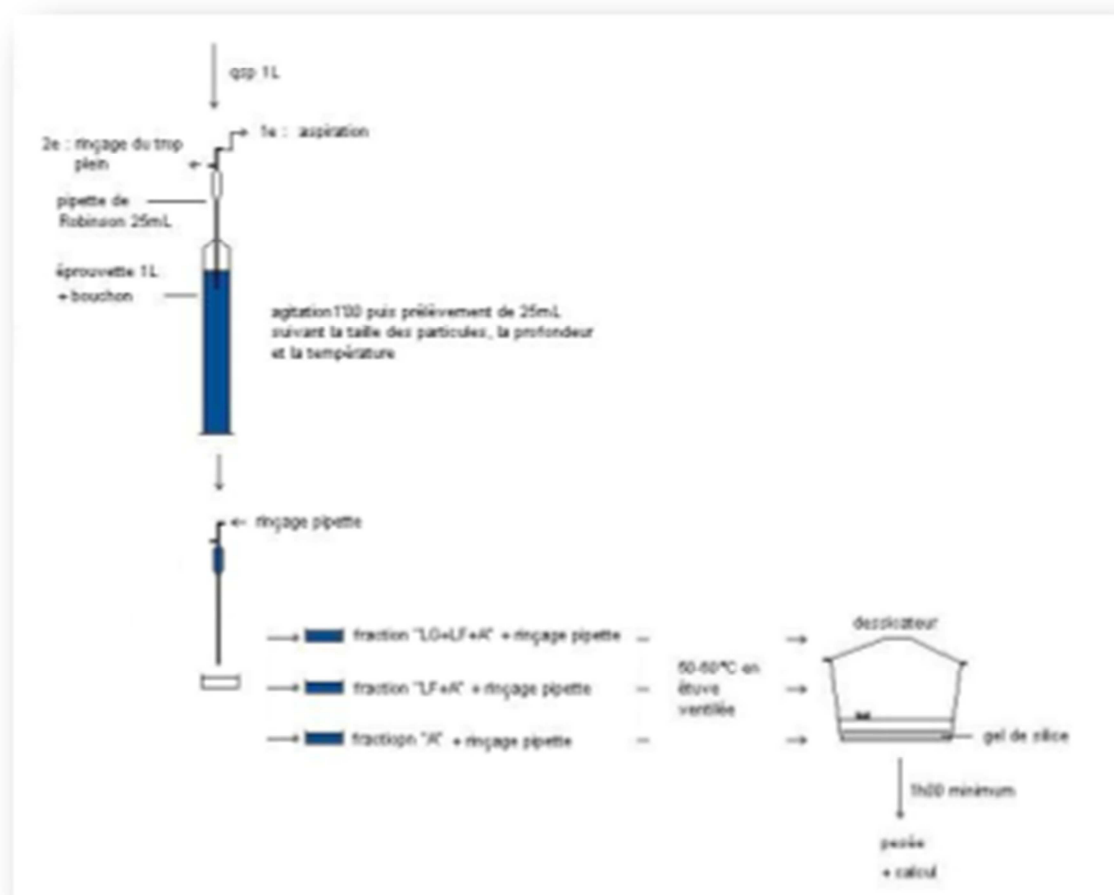
Annexe 1 : Protocole du fractionnement granulométrique (2/3) Rédactrices : Adeline BOUCHARD et Marion KLEIN

ETAPE 3// Dispersion des fines et distribution des fines (par la méthode de la pipette de Robinson)

Date : 26/10/10 : Pipette de Robinson brisée avant distribution des argiles donc expérience remis
au lendemain : au 27/10/10

Schéma :

Figure 3 - Dispersion et distribution des fines



Méthode :

- Arrêt agitation (16H max le 26/10/10) des 12 flacons contenant la fraction < 50 μm
- Les 12 flacons contenant (pour chaque matrice et chaque répétition) les fractions < 50 μm sont placés dans des allonges de 1L (complétées avec de l'ED si nécessaire) et portées à température ambiante.
- Calcul des temps de sédimentation – LOI DE STOKES (fonction de la température de la pièce, de la taille de particule désirée et de la profondeur de prélèvement)
- Agitation homogénéisante pendant 1 minute de chaque allonge

Annexe 1 : Protocole du fractionnement granulométrique (3/3) Rédactrices : Adeline BOUCHARD et Marion KLEIN

- PRELEVEMENT à la pipette de Robinson calibrer

REMARQUE : Lors de la première SERIE la pipette de Robinson s'est brisée, nous utilisons donc une pipette de 25 ml calibré pour la suite de l'expérience. La prise en compte des volumes est détaillée dans les tableaux de calcul Excel ayant servi au calcul de la répartition granulométrique (voir annexes). Les deux opérateurs (ABO et KM) ont donc réalisé chacun le calibrage de leur pipette nécessaire au calcul de la répartition granulométrique.

$$V_{\text{Robinson calibré}} = 0.0252 \text{ L}$$

$$V_{\text{Pipette (25ml) calibré ABO}} = 0.02505 \text{ L}$$

$$V_{\text{Pipette (25ml) calibré KM}} = 0.02497 \text{ L}$$

1^{er} prélèvement : LG+LF+A (fraction < 50 µm)

2^{ème} prélèvement : LF+A (fraction < 20 µm)

3^{ème} prélèvement : A (fraction < 2 µm)

Tableau 11 - Temps de prélèvement selon STOKES à la pipette de Robinson (fonction de la température et d'une profondeur de prélèvement constante)

Température °C	Temps de chute pour profondeur de prélèvement à 10 cm		
	Particules/agrégats 0 – 50 µm LG+LF+A	Particules/agrégats 0 – 20 µm LF+A	Particules/agrégats 0 – 2 µm A
	En min. et sec.	En min. et sec.	En h. et min.
15	0'53"	5'27"	9h05'
16	51"	5'19"	8h51'
17	50"	5'10"	8h37'
18	49"	5'03"	8h24'
19	47"	4'55"	8h12'
20	46"	4'48"	8h00'
21	45"	4'41"	7h48'
22	44"	4'34"	7h37'
23	43"	4'28"	7h26'
24	42"	4'22'	7h16'
25	41"	4'15"	7h06'
26	40"	4'10"	6h56'
27	39"	4'04"	4h47'
28	38"	3'59"	6h38'
29	37"	3'54"	6h29'
30	36"	3'48"	6h21'
31		3'44'	6h13'
32		3'40"	6h06'

Annexe 2 : Humidité des échantillons de sol prélevés en 2010

Traitement	Humidité (%)
1. Boue de STEP peu déshydratée	20,6
2. Boue de STEP déshydratée	18,5
3. Boue de STEP urbaine compostée	20,6
4. Boue de STEP urbaine compostée + polluants organiques	20,5
5. Boue de STEP urbaine compostée + polluants minéraux	22,9
6. Boue de papeterie	23,5
7. Cendres de combustion	19,5
8. Compost d'ordures ménagères	19,2
Tb. Référence basse: fertilisation minérale minimale	19,4
Th. Référence haute: fertilisation minérale optimale	19,6
Té. Parcelle témoin sans traitement phytosanitaire	25,0

Pourcentage d'humidité des échantillons (norme AFNOR NF ISO 11465, détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau) des 11 échantillons correspondant aux traitements.