

# METHODES DE DESCRIPTEURS DE LA BIODIVERSITE ET DU FONCTIONNEMENT ECOLOGIQUE DU SOL

Fascicule réalisé en 2018 par un groupe d'étudiants de Montpellier SupAgro dans le cadre d'un Projet d'Élèves Ingénieurs réalisé au sein du projet SECURE :  
**J. Andriamampianina, A. Charles, L. Cornaert, B. Maubé, C. Willaume**

sous la responsabilité scientifique de :  
**Eric Blanchart (IRD) et de Claire Marsden (SupAgro)**

Ont également contribué à ce fascicule :  
**Laetitia Bernard (IRD), Nancy Rakotondrazafy (IRD), Malalâtiana Razafindrakoto (LRI), Alexis Thoumazeau (CIRAD), Jean Trap (IRD)**



## LE PROJET SECURE

En agriculture, une faible attention a été donnée jusqu'à maintenant aux processus écologiques des sols et à la biodiversité souterraine dans les pratiques agricoles en dépit de leur potentiel reconnu dans la provision des services écosystémiques.

L'importance des processus et fonctions écologiques des sols pour la croissance des plantes et d'autres services donne un rôle essentiel au sol pour la durabilité des systèmes agroécologiques. La restauration, ou l'intensification, des fonctions écologiques du sol est au cœur de ce projet. L'objectif est de fournir aux agriculteurs des pratiques de restauration des fonctions du sol basées sur des connaissances locales et scientifiques, pour accroître la performance agronomique, socio-économique et écologique des systèmes agroécologiques, en contexte tropical. Le projet vise à optimiser les pratiques des agriculteurs et à proposer des pratiques innovantes qui favorisent l'habitat 'sol' de façon à intensifier les fonctions associées de la plante et du sol. L'un des objectifs est notamment d'évaluer l'impact de ces pratiques sur le fonctionnement écologique des sols, à travers l'utilisation de différents descripteurs.

Ce projet est réalisé grâce à un soutien financier de la Fondation Agropolis.

## OBJECTIF DU FASCICULE

L'objectif de ce fascicule est de présenter, sous forme de fiches, différentes méthodes de **descripteurs du fonctionnement écologique des sols**<sup>1</sup>. Ces méthodes doivent pouvoir être utilisables et adaptables sur tout type de sol ou de climat. La publication de ce fascicule sur internet et en accès libre permet de rendre les fiches accessibles à une large communauté de chercheurs, de techniciens, d'agriculteurs ou d'étudiants ayant besoin de réaliser une étude en écologie du sol.

Les méthodes qui y sont présentées sont classées selon différents critères permettant le choix d'un protocole en fonction du besoin de l'utilisateur, du coût, de la technicité, de la précision, etc. Certaines de ces méthodes seront illustrées par des vidéos rendant la réalisation du protocole plus facile pour les utilisateurs.

---

<sup>1</sup> On entend par descripteur, toute mesure ou analyse qui permet de caractériser la biodiversité et le fonctionnement écologique du sol

## LE FONCTIONNEMENT ECOLOGIQUE DU SOL

Les scientifiques reconnaissent généralement la nécessité d'une **intensification écologique** de la production agricole en augmentant la biodiversité et la complexité dans les agrosystèmes, de mieux s'appuyer sur les fonctions naturelles et d'amplifier les services fournis par les organismes vivants. Généralement, les pratiques agroécologiques visent à optimiser la biodiversité fonctionnelle aérienne (la végétation), tandis que la **biodiversité** et les **fonctions écologiques du sol** (souterraines) sont rarement gérées. L'importance des fonctions écologiques du sol dans la performance des systèmes agroécologiques est largement reconnue et leur restauration apparaît nécessaire. Malheureusement, en raison de la complexité du fonctionnement du sol et de la faible connaissance de son déterminisme, une très faible attention est donnée au sol lorsqu'on définit les systèmes de culture.

Quatre fonctions écologiques du sol apparaissent primordiales pour la fourniture des services écosystémiques : (i) **la dynamique des matières organiques**, (ii) **le recyclage des nutriments**, (iii) **le maintien de la structure du sol** et (iv) **la régulation des populations de bioagresseurs** (Figure 1). Ces fonctions affectent directement ou indirectement les fonctions de la plante<sup>2</sup> ; elles sont assurées par l'activité des organismes du sol et définissent ce qu'on appelle parfois la **santé du sol**. Tous les organismes du sol sont impliqués dans ces fonctions, généralement dans le cadre d'interactions complexes. Ces quatre fonctions écologiques ainsi que le rôle des organismes du sol dans leurs réalisations sont particulièrement bien décrites dans l'article :

Kibblewhite M.G., Ritz K. & Swift M.J. (2008) Soil health in agricultural systems. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 685-701.

## LA BIODIVERSITE DU SOL

Les organismes du sol sont représentés par une multitude de taxons et d'espèces, qu'ils appartiennent à des procaryotes (bactéries et archées), des animaux, des végétaux, des protistes, des champignons. On classe généralement les organismes du sol en fonction de leur taille (Figure 2) :

- Les microorganismes regroupent les organismes les plus petits : bactéries, et champignons ;
- La microfaune qui comprend notamment les protistes, les nématodes, mais aussi les

---

<sup>2</sup> Réponses de la plante : ensemble des processus physiologiques par lesquels une plante croît, s'adapte, résiste à des maladies ou à des stress et se reproduit. Ces processus sont modifiés par les propriétés du sol et par les activités des organismes du sol

rotifères et les tardigrades ;

- La mésofaune qui regroupe essentiellement les acariens et les collemboles ;
- La macrofaune (organismes facilement visibles à l'œil nu) constituée surtout de larves et adultes d'insectes, de vers de terre, d'araignées et de mille-pattes.
- Enfin, la mégafaune regroupe les vertébrés qui utilisent le sol comme abri ou habitat.

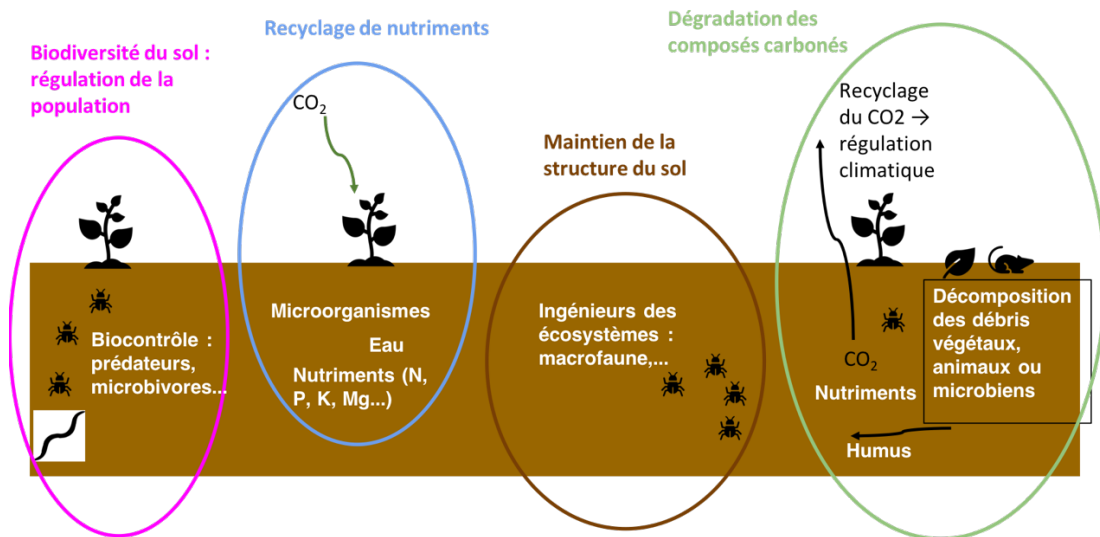


Figure 1 : Les quatre grandes fonctions écologiques du sol

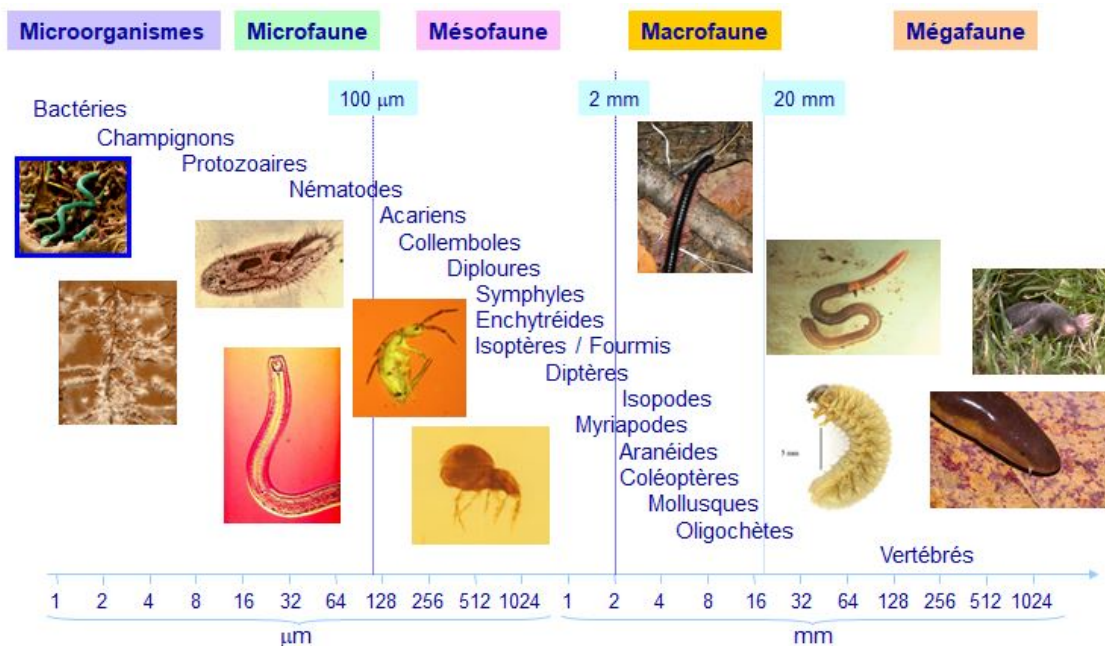


Figure 2 : Classification des organismes du sol selon leur taille

## ORGANISATION DU FASCICULE

Les différentes fiches du fascicule comportent chacune au moins 3 pages. Elles sont classées en fonction des catégories suivantes, identifiables par un liseré de couleur sur chaque fiche et correspondant aux fonctions du sol définies ci-dessus :

- Biodiversité du sol → rose saumon
- Dégradation des composés organiques → vert
- Recyclage des nutriments du sol → bleu
- Maintien de la structure du sol → marron

## ORGANISATION GÉNÉRALE D'UNE FICHE




### 1. La structure d'une fiche

Une fiche est composée de plusieurs parties successives :

- Une présentation générale de la méthode : l'objectif et le principe, les avantages et inconvénients, le matériel à utiliser (une page) ;
- Le protocole détaillé de la méthode (une ou plusieurs pages) ;
- L'analyse et l'interprétation des résultats (une ou plusieurs pages) ;
- Une conclusion et éventuellement une comparaison avec d'autres méthodes ;
- Une partie "Pour en savoir plus" qui oriente vers d'autres méthodes, des documents, vidéos, ou sites internet à consulter pour approfondir le sujet.

### 2. Évaluation rapide des méthodes

Pour une identification rapide des caractéristiques générales d'une méthode : son coût, sa précision, la technicité et le temps nécessaire qu'elle demande, un système d'émoticône est présent en haut de chaque protocole :

|   |     |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Faible coût<br>Précision élevée<br>Technicité faible<br>Manipulation de courte durée | Coût moyen<br>Précision moyenne<br>Technicité moyenne<br>Manipulation de durée moyenne | Coût élevé<br>Faible précision<br>Forte technicité<br>Manipulation de longue durée    |

### **3. Nécessité d'échantillonner en saison des pluies**

La majorité des analyses doivent être réalisées à des périodes où le sol est humide (mais pas détrempé). En effet, un sol humide sera plus facilement analysable (facilité de creuser, etc.) et l'activité biologique y sera plus intense. La faune du sol sera plus active, les mécanismes du sol (dégradation de la matière organique, respiration du sol, etc.) seront également plus importants et donc plus visibles.

### **4. Des méthodes comparatives plutôt que référence absolue**

Les méthodes traitées dans ces fiches sont en grande partie des méthodes permettant des comparaisons entre des situations proches, c'est-à-dire situées dans un même contexte climato-édaphique. En effet, il n'existe pas, encore, de référentiel pour ces différentes méthodes qui permettraient des comparaisons entre des situations variées de diverses parties du globe. De plus, les méthodes utilisées par les scientifiques peuvent montrer certaines variations dans leur protocole.

L'usage recommandé de ces méthodes est de réaliser des comparaisons entre des systèmes de culture, ou des pratiques culturales, chez des agriculteurs, ou au sein d'essais expérimentaux. Leur objectif est notamment de montrer si des pratiques agricoles sont plus à même que d'autres de restaurer/régénérer le fonctionnement écologique du sol. C'est typiquement le cas dans le cadre du projet SECuRE où des comparaisons de différents SFR (pratiques de restauration des fonctions écologiques des sols) sont effectuées au sein d'un dispositif expérimental.

## LISTE DES FICHES

(voir Figure 3)

- 1- Caractérisation de la **macrofaune du sol** par la méthode TSBF
- 2- Caractérisation de la **mésafaune du sol** par la méthode Berlèse
- 3- Caractérisation de la **nématofaune du sol** par une méthode simplifiée
- 4- Extraction d'**ADN du sol** pour la caractérisation des microorganismes du sol
- 5- La **respiration basale du sol** par la méthode SituResp
- 6- Une mesure simplifiée de la **respiration potentielle du sol**
- 7- Décomposition de la matière organique du sol - méthode des **Bait lamina**
- 8- Décomposition de la matière organique du sol - méthode des **Tea bag**
- 9- Décomposition de la matière organique du sol - méthode des **Sacs à litière**
- 10- Caractérisation du **carbone labile du sol** par dosage du POXC

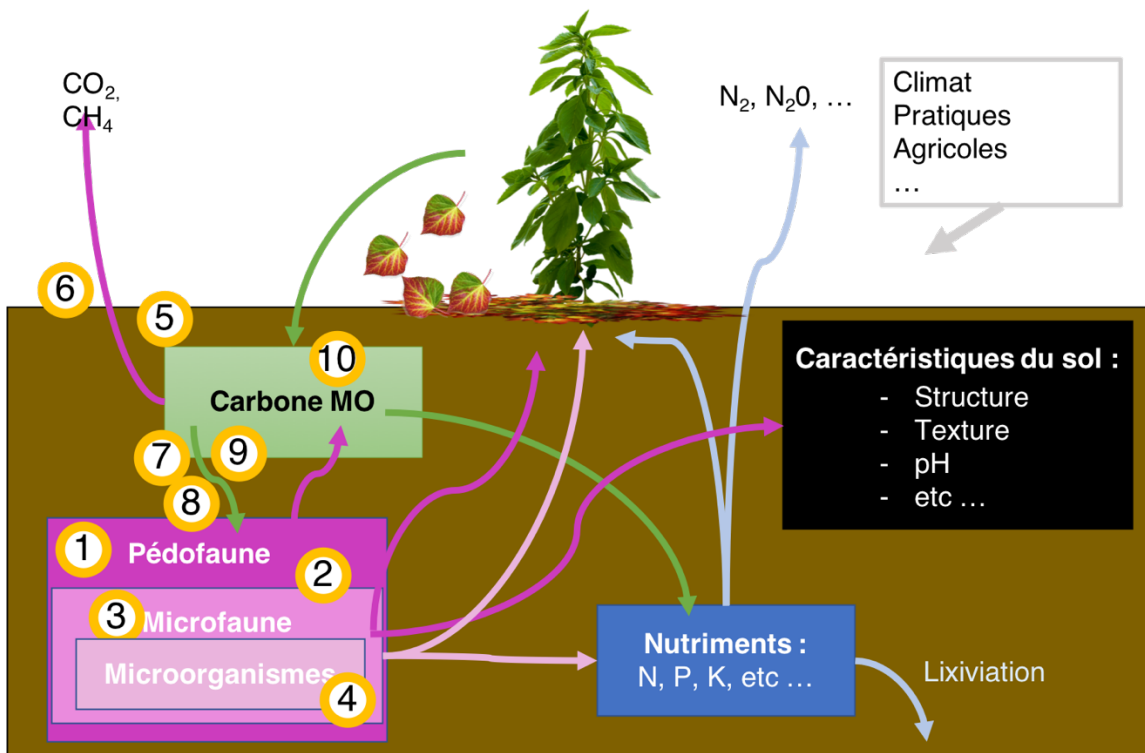


Figure 3 : Positionnement des propriétés étudiées dans les fiches sur un schéma simple du fonctionnement du sol

## OBJECTIF

La méthode TSBF (du programme international Tropical Soil Biology and Fertility) vise à réaliser un échantillonnage de la macrofaune du sol. On entend par macrofaune l'ensemble des invertébrés facilement visibles à l'œil nu.

## PRINCIPE

Trier manuellement les invertébrés supérieurs à 2 mm (visibles à l'œil nu) qui sont compris dans un bloc de sol (monolithe) de 25 cm de côté et de 30 cm de profondeur. Les organismes récoltés sont conservés dans de l'alcool à 75 % avant d'être triés, identifiés, pesés et comptés.

## AVANTAGES

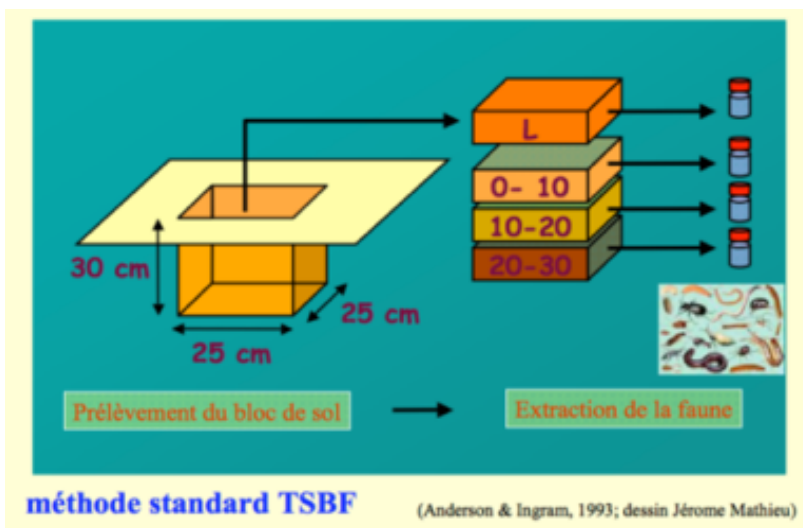
- + Applicable à la quasi totalité des sols
- + Facile à mettre en œuvre sur le terrain
- + Ne nécessite pas de matériel spécifique

## INCONVENIENTS

- Contraintes météorologiques
- Nécessite une main-d'œuvre importante
- Entraîne une perturbation importante du sol

## MATERIEL

- 4 récipients (bassines, seaux) pour un transect
- Outils pour creuser la terre
- Mètre ruban
- Cadre de 25 cm de côté (à fabriquer, en bois)
- Nombreux récipients plats (plateaux, assiettes ou bêche)
- Loupe binoculaire
- Papier absorbant
- Balance assez précise ( $10^{-4}$  g)
- Gants







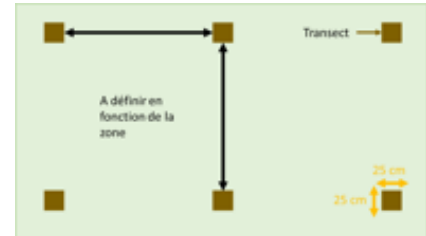
**PROTOCOLE :** C'est une méthode classique et couramment utilisée du fait de sa facilité de mise en œuvre.

### 1<sup>ère</sup> étape

Délimiter la zone à creuser à l'aide d'un cadre de 25 x 25 cm, espace les différents monolithes en fonction de la taille de la zone à étudier.



**Au minimum 6 monolithes par parcelle (de préférence 10) car les communautés de macrofaune sont très hétérogènes spatialement**



### 2<sup>ème</sup> étape

Isoler le monolithe en faisant une tranchée tout autour ou d'un seul côté (pour limiter la perturbation et diminuer le temps de travail) de la délimitation de la zone prévue



### 3<sup>ème</sup> étape

Récolter (rapidement) la litière de surface dans un récipient.



**Avec des gants car certains organismes peuvent piquer ou mordre**

### 4<sup>ème</sup> étape

Creuser délicatement les 10 premiers centimètres du monolithe et les placer dans une bassine.

### 5<sup>ème</sup> étape

Répéter l'opération pour la couche de 10 à 20 cm et pour la couche de 20 à 30 cm de profondeur.

### 6<sup>ème</sup> étape

Ensuite, pour chaque bassine, récolter les éléments de la faune visibles à l'œil nu. Pour cela:

- étaler une poignée de sol sur un récipient plat (petite assiette) pour que les éléments de la faune soient visible.
- Casser délicatement les mottes et les agrégats du sol avec les doigts pour extraire les animaux qui pourraient se cacher.
- Effectuer cette opération jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'organismes visibles (attention de ne pas y passer un temps trop important : environ 5 minutes par poignée de sol).
- Puis répéter ceci jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de sol dans la bassine.

# Méthode TSBF

## 7<sup>ème</sup> étape

Déposer les individus dans un pilulier contenant de l'alcool à 75%, chaque récipient étant étiqueté et spécifique à chaque couche et chaque monolithe, et chaque site.

## 8<sup>ème</sup> étape

Passer à la bassine suivante, avec un autre pilulier

## 9<sup>ème</sup> étape

De retour au laboratoire, pour chaque pilulier, verser l'alcool et les organismes dans une coupelle en verre (type boîte de Pétri). Placer les organismes sur un papier absorbant pendant environ 1 minute pour éliminer l'excès de liquide.

## Dernière étape

Identifier (à l'œil nu ou sous binoculaire), compter et peser les individus en fonction de leur taxonomie, par grand groupe taxonomique (Ordre généralement).

## ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Répertorier dans un tableau (exemple ci-contre) le nombre d'éléments de la macrofaune identifiés en fonction de la profondeur dans le monolithe.

|                 | Litière | 0-10 cm | 10-20 cm | 20-30 cm | Total |
|-----------------|---------|---------|----------|----------|-------|
| Vers de terre   | 2       | 6       | 4        | 7        | 19    |
| Termites        | 32      | 38      | 1        | 7        | 78    |
| Fourmis         | 83      | 75      | 5        | 66       | 229   |
| Diploptides     | 0       | 5       | 0        | 0        | 5     |
| Chilopodes      | 0       | 0       | 0        | 0        | 0     |
| Coléo adultes   | 0       | 0       | 0        | 0        | 0     |
| Colée larves    | 0       | 1       | 0        | 0        | 1     |
| Forficules      | 0       | 0       | 0        | 0        | 0     |
| Hémiptères      | 0       | 1       | 0        | 0        | 1     |
| Diptères        | 0       | 0       | 0        | 0        | 0     |
| Isopodes        | 0       | 0       | 0        | 0        | 0     |
| Diploures       | 0       | 0       | 1        | 1        | 2     |
| Pseudoscorpions | 0       | 0       | 0        | 0        | 0     |
| Arachnides      | 0       | 0       | 0        | 0        | 0     |
| TOTAL           | 117     | 126     | 11       | 81       | 335   |

L'attribution taxonomique de la macrofaune identifiée, et l'estimation de celle-ci en pourcentage permet d'avoir une idée globale de sa répartition en fonction de la profondeur de sol. Les nombres d'individus par monolithe permettent de calculer la densité (en ind/m<sup>2</sup>) en multipliant la valeur par 16 (car le monolithe fait 1/16 de m<sup>2</sup>). De la même façon le poids permet d'avoir la biomasse (en g/m<sup>2</sup>) pour toute la macrofaune ou pour chacun des groupes taxonomiques.

Une comparaison entre différentes parcelles/sites est possible.

## CONCLUSION

Cette méthode permet l'identification de la macrofaune présente dans un sol en fonction des strates étudiées (litière jusqu'à 30 cm de profondeur). Cette méthode donne accès à la diversité taxonomique, à la biomasse et à la densité des différents groupes taxonomiques. De plus, une comparaison de la répartition de cette macrofaune entre les différentes strates mais aussi différentes zones étudiées est intéressante.

Sous les tropiques, c'est la méthode idéale permettant l'accès à la communauté des vers de terre.

## POUR EN SAVOIR PLUS :

### Sources bibliographiques :

Anderson J.M. & Ingram J.S.I. (1993) Tropical Soil Biodiversity and Fertility – A handbook of methods. CAB International, Wallingford, UK.

Blanchart E., Villenave C., et al., (2006) Long-term effect of a legume cover crop (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) on the communities of soil macrofauna and nematofauna, under maize cultivation, in southern Benin. *European Journal of Soil Biology*, 42 : 136-144.

Rossi J.P. & Blanchart E. (2005) Seasonal and land-use induced variations of soil macrofauna composition in the Western Ghats (South India). *Soil Biology and Biochemistry*, 37 : 1093-1104.

Ruiz N., Lavelle P. & Jimenez J. (2008) Soil macrofauna. Field manual. Technical level. Rapport FAO, Rome, Italie.

Swift M. & Bignell D. (2001) Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice. ICRAF Southeast Asia, Bogor, Indonesia.

### Sources Internet :

[Lien vers la vidéo  
\(non disponible\)](#)



## OBJECTIF

Cette méthode permet d'identifier et de comptabiliser la mésofaune et la petite macrofaune du sol.

## PRINCIPE

L'appareil de Berlèse est constitué d'un entonnoir sur lequel est disposée une grille et sous lequel se trouve un flacon récepteur. L'échantillon de sol ou de litière est placé sur la grille. Une lampe à incandescence (source de lumière et de chaleur) disposée au-dessus de l'échantillon de litière va provoquer la fuite des organismes vers le bas ; ils vont alors passer à travers la grille. Ils tombent alors dans le flacon récepteur contenant de l'éthanol.

## AVANTAGES

- + Simple
- + Faible coût
- + Rapide

## INCONVENIENTS

- Difficulté pour identifier certains groupes (acariens, collemboles)

## MATERIEL

- Source lumineuse (ampoule à incandescence de 20 à 40 watts)
- Grille en plastique ou métal (environ 15 cm de diamètre)
- Entonnoir
- Flacon récepteur
- Alcool à 70 %
- Pelle
- Loupe binoculaire
- Papier absorbant
- Facultatif : Cache tapissé de papier aluminium pour augmenter la température et la lumière au-dessus de l'échantillon





**PROTOCOLE :** Ce protocole peut être adapté selon les besoins (taille de la grille et de l'entonnoir, puissance de la source lumineuse). C'est une méthode classique dont plusieurs variantes existent selon la faune que l'on souhaite observer.

## 1<sup>ère</sup> étape

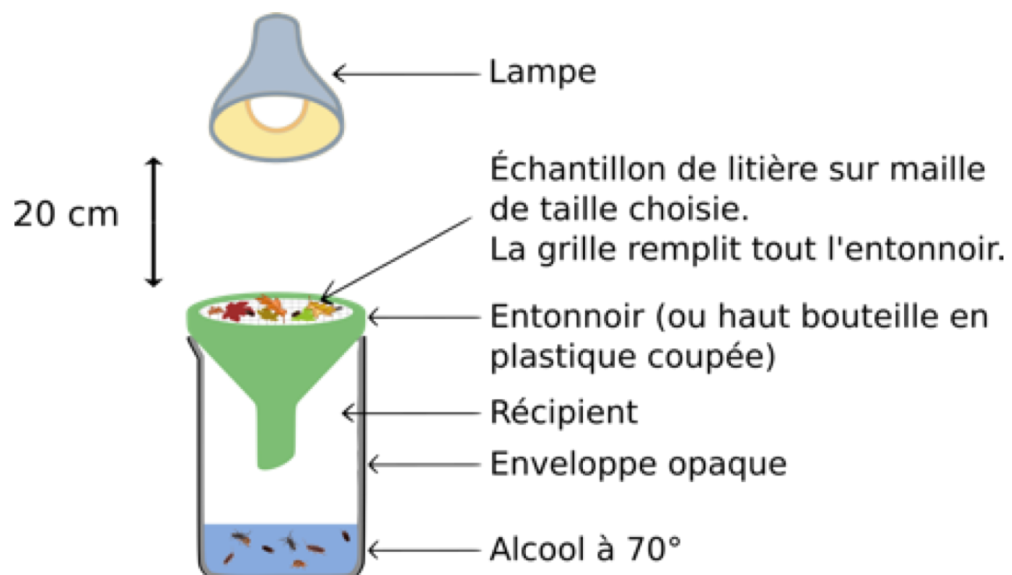
Prélever de la litière ou du sol, en quantité suffisante pour être placée dans le tamis. Mettre l'échantillon dans un récipient fermé. Si l'on souhaite échantillonner un milieu, on répète cette étape à différents endroits du site (penser à réaliser un plan d'échantillonnage du site). On peut également noter la surface ou le volume de sol prélevé, en cas de comptage.

## 2<sup>ème</sup> étape

Disposer le sol ou la litière (frais, non séché) sur la grille placée dans l'entonnoir

## 3<sup>ème</sup> étape

Récolter (rapidement) la litière de surface dans un récipient.



## 4<sup>ème</sup> étape

Au bout de 5-7 jours, on récupère le pilulier et on verse le contenu dans une coupelle en verre (type boîte de Pétri).

## Dernière étape

Sous loupe binoculaire, on sépare les organismes par grands groupes taxonomiques (acariens, collemboles, fourmis...).

# Méthode Berlèse

## ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Les observations sous loupe binoculaire permettent de séparer les individus récoltés par grands groupes taxonomiques (acariens, collemboles, larves d'insectes, myriapodes...).

Si l'on souhaite les dénombrer ou en calculer la proportion, il faut également effectuer un comptage systématique du nombre de spécimens pour chaque taxon. On peut alors calculer le nombre d'individus pour le volume ou le poids de l'échantillon de sol ou de litière.

---

## CONCLUSION

La méthode Berlèse est très simple de fabrication et d'utilisation. On peut fabriquer des rampes de Berlèse permettant d'extraire les organismes de plusieurs échantillons en parallèle. Elle permet avec peu de moyens de répertorier la mésofaune du sol. Pratique, peu coûteuse et avec une faible demande en matériel.

---

## POUR EN SAVOIR PLUS :

### Sources bibliographiques :

Coleman D.C., Crossley Jr. A.D. & Hendrix P.F. (2004) Fundamentals of Soil Ecology 2e. Burlington, MA. Elsevier Academic Press.

### Sources Internet :

Berlese Funnels - Collecting Methods - Mississippi Entomological Museum Home  
<https://mississippientomologicalmuseum.org.msstate.edu/collecting.preparation.methods/Berlesefunnel.htm>

Le monde des insectes - Le berlèse . <https://www.insecte.org/spip.php?article78>

[Lien vers la vidéo  
\(non disponible\)](#)



## OBJECTIF

Extraire et déterminer le nombre de nématodes libres dans un échantillon de sol grâce à une méthode simple.

## PRINCIPE

La quantification des nématodes est réalisée par un tamisage, élutriation et piégeage actif avant de faire un comptage de ceux-ci à la loupe binoculaire

### AVANTAGES

- + Facile à réaliser
- + Rapide
- + Peu coûteux (pas ou peu de consommables)

### INCONVENIENTS

- Nécessite une loupe binoculaire
- Nécessite un ajustement du temps d'extraction en fonction du type de sol
- Difficulté pour identifier les nématodes

## MATERIEL

- Tarière
- Bassine
- Balance
- Sachet plastique
- Glacière
- Eau distillée
- Bouteille de 1 L
- Bocal de 500 mL
- Béchers
- Tamis de mailles de 2 mm et 50 µm
- Papiers absorbants
- Balance
- Pissette
- Assiettes en plastique
- Chronomètre
- Loupe Binoculaire
- Compteur et lame de comptage
- Flacons en verre de 50 ml
- Coupelles
- Solutions de formols diluées à 5%
- Masque
- Pipettes de 5 ml et 1 ml
- Bouilloire
- Flacons plastiques de 15 ml

Photo : Cécile Villenave





**PROTOCOLE :** Cette méthode dite des bouteilles (ou « The Erlenmeyer, or (milk) bottle method ») est une méthode simplifiée d'extraction des nématodes du sol

## 1<sup>ère</sup> étape

Prélever une dizaine de carottes d'une profondeur de 10 cm environ avec un cylindre ou une tarière

## 2<sup>ème</sup> étape

Placer les carottes dans des bassines étiquetées

## 3<sup>ème</sup> étape

Homogénéiser le contenu des bassines, retirer les grosses racines et les éléments grossiers



Les échantillons doivent être conservés à l'abri de la chaleur (dans une glacière sans glace par exemple) puis ramenés au laboratoire. L'extraction des nématodes doit avoir lieu moins d'une semaine après le prélèvement.

## 4<sup>ème</sup> étape

Au laboratoire, le sol est bien homogénéisé. On pèse avec précision une quantité de 250 g d'échantillon

## 5<sup>ème</sup> étape

Mélanger cet échantillon avec 200 ml d'eau distillée dans une cuvette

## 6<sup>ème</sup> étape

Verser toute la suspension et le sol dans une bouteille de 1 L en utilisant un entonnoir et une pissette d'eau. On remplira la bouteille à ras bord. Bien mélanger, par retournement, la bouteille fermée.

## 7<sup>ème</sup> étape

Placer la bouteille sur un bocal rempli d'eau (500 ml) en retournant la bouteille de manière à ce que le niveau de l'eau dans le bocal soit juste au-dessus du goulot de la bouteille retournée.

## 8<sup>ème</sup> étape

Dévisser le bouchon de la bouteille et lancer le chronomètre. Le sol s'écoule dans le bocal à une vitesse plus ou moins rapide selon sa granulométrie



## 9<sup>ème</sup> étape

Après 4-5 minutes pour les sols sableux et 7-8 minutes pour les sols argileux, retirer la bouteille en bouchant le goulot avec les doigts et sans appuyer sur la bouteille afin d'éviter tout rejet d'eau dans le bocal.



# Nématofaune

## 10<sup>ème</sup> étape

Verser délicatement le contenu de la bouteille dans une colonne de 3 tamis (de maille 50 µm) préalablement humidifiés



Pour les derniers 200 ml de solution, bien agiter la bouteille avant de verser sur les tamis afin de récupérer les particules collées à la bouteille

## 11<sup>ème</sup> étape

Récupérer les refus des 3 tamis dans un bécher de 200 ml

## 12<sup>ème</sup> étape

Verser les premiers 500 ml du contenu du bocal dans la colonne de 3 tamis et répéter l'étape deux fois, ensuite verser le sol et l'eau restant du bocal dans la bouteille vide. Avec une pissette, on éliminera les particules collées au fond du bocal.



Ne pas dépasser 1 L d'eau

## 13<sup>ème</sup> étape

Répéter l'étape de sédimentation avec les bouteilles (élutriation)

## 14<sup>ème</sup> étape

Découper des morceaux de papier absorbant et les placer dans un tamis de 2 mm de manière à favoriser le contact avec l'intégralité de la surface du tamis. Humidifier avec la pissette.

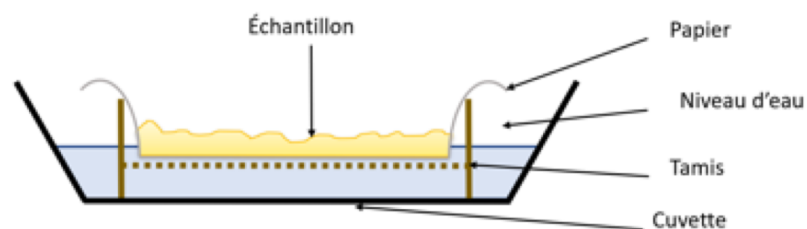
## 15<sup>ème</sup> étape

Verser lentement le contenu du bécher dans le tamis. Réaliser l'opération dans l'évier pour laisser couler l'excès d'eau.

## 16<sup>ème</sup> étape

Mettre le tamis dans une coupelle et verser de l'eau au fond jusqu'à ce que l'eau arrive au niveau du papier absorbant

48 heures



48h : période de repos pendant lesquelles les nématodes actifs et vivants vont migrer dans l'eau de la coupelle sous le papier absorbant

# Nématofaune

## 17<sup>ème</sup> étape

Récupérer l'eau limpide de la coupelle contenant les nématodes dans un bécher taré de 100 mL

## 18<sup>ème</sup> étape

Mesurer le volume total de l'eau de récupération par pesée puis compter sous binoculaire les nématodes dans un aliquote de 5 mL.

## 19<sup>ème</sup> étape

Fixation des nématodes pour la détermination des taxons. Verser l'eau contenant les nématodes dans des flacons en verre de 50 mL en laissant décanter pendant 24h. Récupérer le fond pour les faire concentrer dans des coupelles.

48 heures



Le tout sera conservé au froid pendant 48h

## 20<sup>ème</sup> étape

Récupérer le fond concentré des nématodes. Mettre environ 500 µL de concentré de nématodes dans un flacon en plastique de 15 mL. Sous hotte et avec un masque, ajouter 5mL de formol chauffé puis 5mL de formol froid dilué à 5%

## Dernière étape

Observer sur une grande lame au microscope les nématodes pour la détermination des taxons.



Cette opération nécessite une expertise réelle.

## ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Le comptage se fait grâce à la lame de comptage qui permet la détermination du nombre de nématodes dans un volume précis (5 mL). Ce résultat sera exprimé en nombre de nématodes/mL.

Le nombre obtenu sera extrapolé au volume total pour estimer la concentration totale/kg de sol.

Le comptage se fera électroniquement ou manuellement à l'aide d'une loupe binoculaire.

La lame est observée sous le microscope. On compte au moins 4 ou 5 carrés du quadrillage.

Calcul pour obtenir la densité des nématodes :

Densité (*nombre de nématodes total pour 250 g de sol frais*) = (Quantité de nématodes x Volume total) / 5.

Il faut ensuite diviser ce nombre par 250 pour avoir la densité par gramme de sol frais. Une analyse complémentaire de l'humidité des sols est nécessaire pour exprimer les résultats en nombre d'individus par gramme de sol sec.

---

## CONCLUSION

Cette méthode permet de déterminer le nombre de nématodes dans le sol. Cela permettra de faire une comparaison entre différentes zones d'étude et également d'avoir une idée du seuil de fréquence et de nuisibilité des nématodes.

### **Différences et complémentarités par rapport à d'autres méthodes d'extraction**

Il existe un grand nombre de méthodes d'extraction des nématodes selon le matériel à partir duquel les nématodes sont extraits, mais également en fonction des espèces de nématodes. Extraire les nématodes à partir de matières organiques peut être réalisé avec les méthodes suivantes : « l'entonnoir de Baermann », la méthode « Funnel spray » ou les méthodes dites « Blender filter ou centrifugal flotation ». A partir du sol, les nématodes peuvent être extraits avec la méthode « cotton wool filter method », la Méthode « decanting and sieving de Cobb » ou en utilisant « l'élutriation d'Oostenbrink ».

Pour les nématodes à kystes, les méthodes suivantes peuvent être utilisées : « Baunacke », « Fenwick can », « Kort's cyst extraction elutriator » ou la plus courante « Seinhorst cyst extraction elutriator ».

# Nématofaune

## POUR EN SAVOIR PLUS :

### Sources bibliographiques :

Coleman D.C., Crossley Jr. A.D. & Hendrix P.F. (2004) Fundamentals of Soil Ecology 2e. Burlington, MA. Elsevier Academic Press.

Mahesh Kumar R., Catherine S., Cotillas & Raveendra H.R. (2012) Comparative efficiency in different methods of extracting nematode from soil and plant material. International Journal of Advanced Biological Research 2: 143-145.

Römbke J., Sousa J.P., Schouten T. & Riepert F. (2006) Monitoring of soil organisms: a set of standardized field methods proposed by ISO. European Journal of Soil Biology 42: S61-S64.

Villenave C., Saj S., Pablo A.L., Sall S., Djigal D., Chotte J.L. & Bonzi M. (2010) Influence of long-term organic and mineral fertilization on soil nematofauna when growing Sorghum bicolor in Burkina Faso. Biology and Fertility of Soils 46: 659-670.

Villenave C., Rabary B., Chotte J.L., Blanchart E. & Djigal D. (2009) Impact of direct seeding mulch-based cropping systems on soil nematodes in a long-term experiment in Madagascar. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 44: 949-953.

Whitehead A.G. & Hemming J.R. (1965) A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annals of Applied Biology.

### Sources Internet :

<http://nemaplex.ucdavis.edu/Methods/extrmeth.htm>

**Lien vers la vidéo  
(non disponible)**



## OBJECTIF

Le but de cette méthode est d'extraire l'ADN génomique du sol et de le quantifier. La méthode proposée est une adaptation du kit d'extraction d'ADN commercial (kit FastDNA SPIN™ pour sol, MP Biomedical) publiée par Tournier et al. en 2015.

## PRINCIPE

La méthode est basée sur l'utilisation d'un tampon d'extraction SDS.

## AVANTAGES

- + Relativement rapide à réaliser
- + L'ADN extrait peut ensuite être utilisé pour des déterminations de diversité microbienne par séquençage.

## INCONVENIENTS

- Nécessite l'usage d'un laboratoire équipé, d'équipements de protection
- Protocole dépendant du kit

---

## MATERIEL

- Broyeur
- Kit FASTDNA SPINTM
- Balance de précision
- Micropipette P5000/P10000
- Glace
- Congélateur
- Vortex
- Cônes 5 ml-10 ml
- Tubes de type Falcon de 15mL adaptés au broyeur
- Matériel pour une électrophorèse Biorad
- Gants
- Blouse
- Centrifugeuse
- Incubateur
- Flacon de 500 mL
- Epruvette 25,100, 500 mL
- Micro-ondes
- Générateur
- Agarose
- Tampon TBE (Tris, EDTA et acide borique) 10X préparé en 1X par les utilisateurs
- Bromure d'éthidium
- Marqueurs de poids moléculaires : ladder 1Kb
- Colorant : bleu de bromophénol
- ADN de thymus de veau (1 mg/ml), biorad
- Table UV



**PROTOCOLE :** Il s'agit, ici, d'une méthode nécessitant le kit d'extraction FastDNA SPIN™ pour sol, de MP Biomedical

## 1<sup>ère</sup> étape

Préparation de l'échantillon de sol : ajouter 250 mg de l'échantillon de sol dans un tube adapté au broyeur et congeler toute une nuit à -80°C

## 2<sup>ème</sup> étape

Lyse cellulaire : ajouter 978 µL de solution tampon de phosphate de sodium ainsi que 122 µL de tampon MT



20 mg de caséine doivent être ajoutés dans le cas des Andosols pour saturer la forte adsorption des argiles non cristallisées

## 3<sup>ème</sup> étape

Broyage : homogénéiser dans le broyeur pendant 40 secondes à une vitesse de 6 et refroidir l'échantillon sur de la glace pendant 5 min. Répéter l'opération une 2<sup>e</sup> fois

## 4<sup>ème</sup> étape

Centrifuger à 14 000 g pendant 5 min à 4°C. Transférer le surnageant dans un microtube centrifuge propre

## 5<sup>ème</sup> étape

Précipitation des protéines : ajouter 250 µL de PPS (solution de précipitation des protéines) et mélanger en agitant manuellement les tubes 10 fois.



**Laisser en attente dans la glace avant la prochaine étape**

## 6<sup>ème</sup> étape

Centrifuger à 14 000 g pendant 5 min à 4°C pour sédimenter le précipité. Transférer le surnageant dans un microtube centrifuge de 2 mL propre

## 7<sup>ème</sup> étape

Remettre en suspension la matrice de liaison et ajouter 1 mL au surnageant dans un tube de 2 mL. Placer sur l'agitateur rotatif pendant 12 min et 23 rpm à température ambiante.

## 8<sup>ème</sup> étape

Centrifuger à 14 000 g pendant 2min à 4°C pour sédimenter la matrice de liaison de l'ADN. Enlever le surnageant et le mettre dans un microtube centrifuge propre de 15 mL

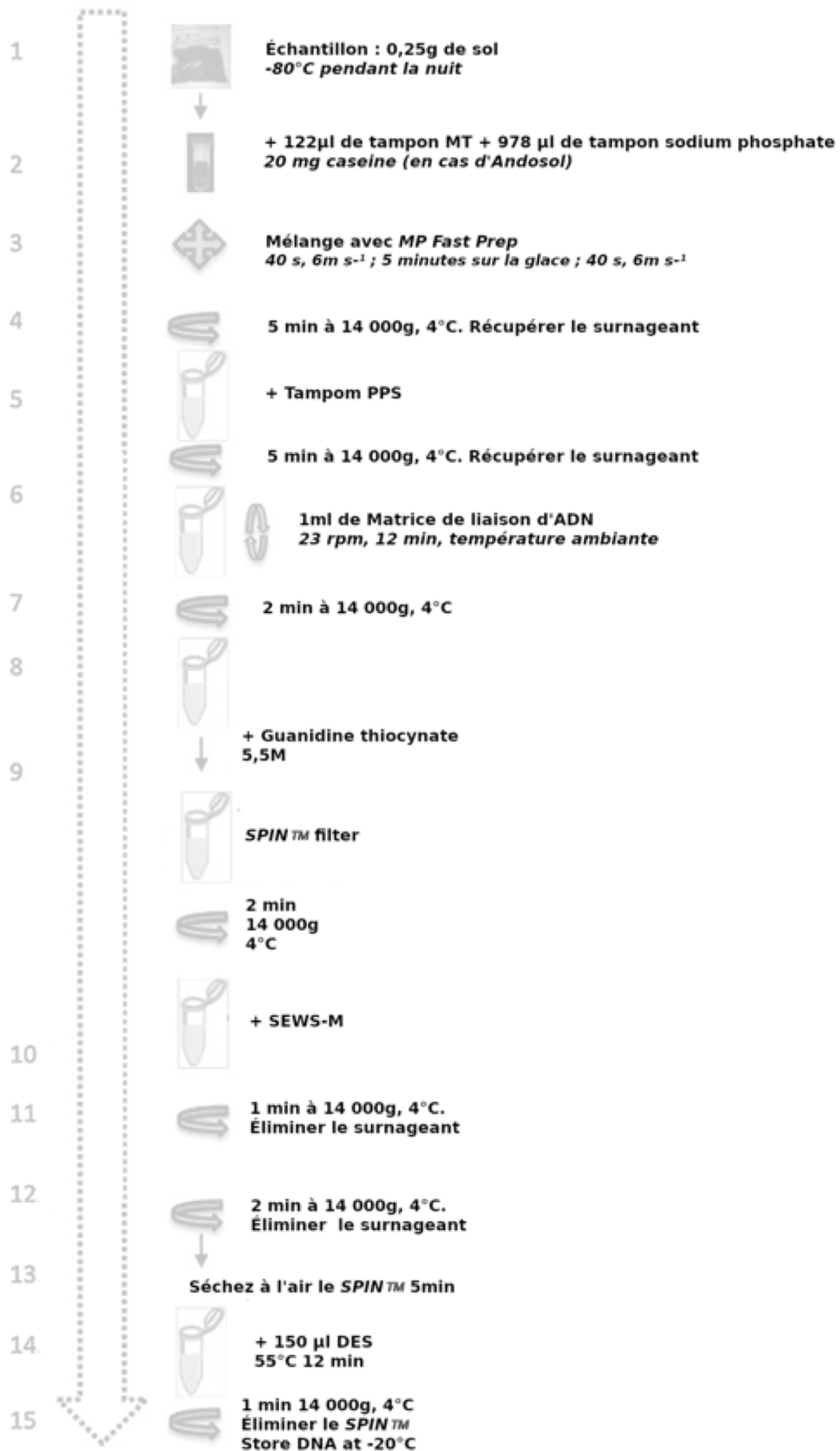


Diagramme schématique du protocole d'extraction de l'ADN  
Adapté de E.Tournier et al. (2015)

# Extraction ADN

## 9<sup>ème</sup> étape

Purification de l'ADN : remettre en suspension la matrice de liaison d'ADN dans 500 µL de guanidine thiocyanate (5,5 M) et transférer le tout dans une colonne filtre SPIN. Centrifuger pendant 1 min à 14 000 g à 4°C

## 10<sup>ème</sup> étape

Ajouter 500 µL de SEWS-M (avec éthanol) et remettre en suspension le culot en utilisant la force du liquide de la pointe de la pipette

## 11<sup>ème</sup> étape

Centrifuger pendant 1min à 14 000 g et à 4°C. Vider le tube et remplacer le par un propre

## 12<sup>ème</sup> étape

Centrifuger de nouveau pendant 2 min à 14 000 g pour débarrasser la matrice de la solution résiduelle de lavage. Vider le tube et transférer le contenu dans un nouveau. Nettoyer le tube vide

## 13<sup>ème</sup> étape

Sécher à l'air libre le filtre SPIN pendant 5 min à température ambiante

## 14<sup>ème</sup> étape

Remettre doucement en suspension la matrice de liaison dans 150 µL de DES et incuber à 55°C pendant 12 min.

## 15<sup>ème</sup> étape

Centrifuger pendant 1 min à 14 000 g à 4°C pour mettre l'ADN élué dans un tube propre. Jeter le filtre SPIN et conserver l'ADN à -20°C.

## Electrophorèse

### 1<sup>ère</sup> étape

Préparation de la gamme d'ADN de thymus de veau : à partir de la solution mère à 1 mg/mL\*, préparer 2 mL de solution à 250 ng/10 µL : 50 µL de solution mère + 1,950 mL de TE

### 2<sup>ème</sup> étape

Laisser la solution à 250 ng/10 µL pendant 30 min au bain-marie à 37°C, puis la placer à 4°C pendant une nuit

### 3<sup>ème</sup> étape

Faire plusieurs dilutions en cascade avec un facteur de dilution de 3/4 dans du TE pour constituer une gamme de 9 points (250 ; 187,5 ; 140,6 ; 105,5 ; 79,1 ; 59,3 ; 44,5 ; 33,4 ; 25 ng/10 µL)



Ne seront gardé que les points : 250; 187,5; 140,6; 79,1; 25 ng/10 µL qui seront injectés dans les puits ultérieurement



# Extraction ADN

## 4<sup>ème</sup> étape

Vortexer entre chaque point de dilution

|          |       |       |       |       |       |       |       |      |      |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| ng/10µL  | 250   | 187,5 | 140,6 | 105,5 | 79,1  | 59,3  | 44,5  | 33,4 | 25   |
| ADN (mL) | 0,050 | 1,5   | 1,5   | 1,5   | 1,5   | 1,5   | 1,5   | 1,5  | 1,5  |
| TE (mL)  | 1,95  | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5  | 0,5  |
| dilution | 1     | 3/4   | 4/7   | 1/7   | 25/79 | 14/59 | 13/73 | 2/15 | 1/10 |

## 5<sup>ème</sup> étape

Préparation du gel et du montage : Préparer du TBE dilué 1x à partir du concentré 10x avec de l'eau permutée

## 6<sup>ème</sup> étape

Préparation du gel Agarose de routine à 1 % :

Peser directement dans le flacon (Erlenmeyer) la quantité d'agarose nécessaire X g et compléter à Y mL de TBE à l'éprouvette. Faire fondre au micro-onde puissance maximale. Surveiller l'ébullition et adapter la puissance du micro-onde en fonction.

Stabiliser la température de l'agarose à l'eau froide. Couler à chaud risque de déformer les plaques.



La fiole est débouchée dans le micro-onde. Quand l'agarose devient jaune, il n'est plus utilisable



Il est possible de préparer à l'avance l'agarose et le conserver dans une étude à 69°C en surfusion dans une bouteille Shott fermée

## 7<sup>ème</sup> étape

Préparation du montage : Placer le support et son peigne dans le guide de coulage et régler l'horizontalité du montage avec le niveau à bulle

## 8<sup>ème</sup> étape

Couler le gel selon le tableau suivant afin de calibrer la quantité d'agarose à mettre dans les supports de cuve pour harmoniser les dosages sur gel.

| Quantification ADN |                       |                               |
|--------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Taille tray        | Volume de gel 1% (ml) | Nombre de peignes de 8 puits  |
| 7 x 10             | 35                    | 1                             |
| Taille gel tray    | Volume de gel 1% (ml) | Nombre de peignes de 20 puits |
| 15 x 7             | 0                     | 0                             |
| 15 x 10            | 80                    | 1                             |
| 15 x 20            | 160                   | 2                             |
| 15 x 25            | 200                   | 3                             |

## 9<sup>ème</sup> étape

Chargement du gel : Remplir les puits avec la gamme d'ADN de thymus de veau (5 puits de 10 µL) et l'échantillon d'ADN récolté et purifié (3 puits de 10 µL) en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette.

## 10<sup>ème</sup> étape

Placer le support avec le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la cathode (pôle noir)

# Extraction ADN

## 11<sup>ème</sup> étape

Remplir la cuve de tampon TBE (réutilisable plusieurs fois) en versant délicatement et très lentement lorsque le gel commence à être recouvert pour éviter les fuites d'ADN vers le tampon.

## 12<sup>ème</sup> étape

Fermer la cuve, brancher les fils et mettre sous tension. Laisser migrer de 2 à 3h à courant constant de 70 mA (si le voltage dépasse 100 V, baisser l'ampérage).

2-3 heures

## 13<sup>ème</sup> étape

Coloration du gel : délicatement votre gel seul (sans support) dans un plastique Immerger le gel dans un bain de BET pendant 15 à 40 min sans souiller le plastique.

15 à 40 minutes



**Le port de blouse, gants violets en nitrile et manchettes sont obligatoires. Garder un gant non souillé pendant cette opération**

## 14<sup>ème</sup> étape

Récupérer le gel à l'aide d'une pelle et l'égoutter  
Mettre ensuite le gel dans un bain de rinçage (eau) à l'aide de la pelle pendant 10 à 20 min

10 à 20 minutes

## 15<sup>ème</sup> étape

Rincer la pelle.  
Récupérer le gel à l'aide d'une pelle et prendre la/les photo(s)

## Dernière étape

Visualisation du gel :  
Placer le gel sur la table UV sous la caméra pour le visualiser sur ordinateur et imprimer une photo.  
Récupérer le gel à l'aide d'une pelle, le mettre dans un bain de décontamination (contenant du charbon actif qui capte le BET).  
Nettoyer la table UV avec de l'eau et du papier absorbant.  
Noter sur le cahier d'enregistrement des photos de gels avec un GANT PROPRE

# Extraction ADN

## ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

L'analyse du gel d'électrophorèse se fait à l'oeil nu, de manière qualitative ou à l'aide d'un logiciel pour quantifier et permettre une bonne reproductibilité.

A l'aide d'une électrophorèse de référence (type préparation du commerce) avec des fragments de tailles connues, on peut déterminer la taille des échantillons d'ADN présents dans notre préparation, et ainsi identifier leur provenance. On peut également utiliser l'intensité de la fluorescence pour quantifier la quantité d'ADN présent (et éventuellement par espèce avec une électrophorèse adéquate).

---

## CONCLUSION

Blabla...

---

## POUR EN SAVOIR PLUS :

### Sources bibliographiques :

Tournier E., Amenc L., Pablo A.L., Legname E., Blanchart E., Plassard C., Robin A. & Bernard L. (2015) Modification of a commercial DNA extraction kit for safe and rapid recovery of DNA and RNA simultaneously from soil, without the use of harmful solvents. *MethodsX* 2: 182-191.

### Sources Internet :

[Lien vers la vidéo  
\(non disponible\)](#)



## OBJECTIF

Evaluer la respiration basale du sol sur le terrain (= émission de CO<sub>2</sub> du sol par l'activité microbienne sans ajout de substrat). La respiration basale est utilisée comme un indicateur de l'activité microbiologique du sol.

## PRINCIPE

On incube un échantillon frais de sol grossièrement tamis. dans un pot hermétique auquel on ajoute une cuvette spectrophotométrique. Cette cuvette contient un gel dont la couleur change en fonction du pH. Le CO<sub>2</sub> mis par le sol va modifier le pH du gel et donc sa couleur. La mesure du changement de couleur du gel (via une différence d'absorbance) permet d'estimer la quantité totale de CO<sub>2</sub> émis par le sol.

## AVANTAGES

- + Se fait directement sur le terrain (spectrophotomètre portable)
- + Temps d'incubation court (24h)
- + Faible coût

## INCONVENIENTS

- Nécessite une calibration du spectrophotomètre pour établir la relation entre le changement de couleur du substrat et la quantité de CO<sub>2</sub>
- Résultats variables en fonction de la texture, de l'humidité et de la température du sol.

---

## MATERIEL

- Gel dont la couleur est sensible au pH (Composition du gel : indicateur coloré cresol red 12.5 ppm, chlorure de potassium 150 mM, bicarbonate de soude 2.5 mM et Noble agar 1% 150 µl)
- Spectrophotomètre portatif ou fixe
- 30 cuves pour spectrophotomètre de 4,5 mL
- Bouteille de gaz CO<sub>2</sub> (Pureté 99,9 %)
- Couteau
- Tamis (maille de 5 mm)
- Pot hermétique
- Incubateur/ étuve



**PROTOCOLE** : Nécessite deux phases : (i) la calibration du spectrophotomètre et (ii) la mesure proprement dite sur le terrain

### Phase de calibration du spectrophotomètre (en laboratoire)

#### 1<sup>ère</sup> étape

Remplir 30 cuves avec 1,5 mL de gel. Laisse reposer pendant 1 semaine dans un dessiccateur

#### 2<sup>ème</sup> étape

Mesurer l'absorbance à t=0 (absT0), pour une longueur d'onde de 570 nm

#### 3<sup>ème</sup> étape

Insérer les cuves dans 30 pots hermétiques de 250 mL

#### 4<sup>ème</sup> étape

Injecter une quantité connue de gaz CO<sub>2</sub> dans chaque pot (avec des quantités variant de 0 à 3% du volume du pot)

#### 5<sup>ème</sup> étape

Incuber les pots à 30°C pendant 24h puis mesurer l'absorbance (absT24)

#### 6<sup>ème</sup> étape

Mesurer la différence d'absorbance entre t=0 et t=24h :  $\Delta_{abs} = absT0 - absT24$

### Phase de mesure sur le terrain

#### 1<sup>ère</sup> étape

Prélever un échantillon de sol entre 0 et 10 cm de profondeur. Le tamiser grossièrement à 5 mm

#### 2<sup>ème</sup> étape

Etape optionnelle : en l'absence d'un spectrophotomètre portatif, ramener les échantillons dans le laboratoire d'analyses dans de brefs délais

#### 3<sup>ème</sup> étape

Laisser reposer le gel pendant une semaine dans un dessiccateur

## 4<sup>ème</sup> étape

Mesurer l'absorbance de départ du gel à 570 nm (absT0). Mettre le gel dans les cuves à raison de 1,5 mL par cuve

## 5<sup>ème</sup> étape

Introduire dans un pot hermétique :

- 100 g d'échantillon de sol tamisé à 5 mm
- la cuve contenant 1,5 mL de gel.

## 6<sup>ème</sup> étape

Laisser incuber pendant 24 heures



**Sur le terrain : incuber à température ambiante**  
**Au laboratoire : privilégier une température fixe (20°C ou 30°C selon la zone d'étude)**

## 7<sup>ème</sup> étape

Mesurer l'absorbance du gel avec le spectrophotomètre portatif à 570 nm (absT24)

## Dernière étape

Mesurer la différence d'absorbance entre t=0 et t=24h :  $\Delta\text{abs} = \text{absT0} - \text{absT24}$

Macro-cuvette de spectrophotomètre remplie avec 1,5mL de gel

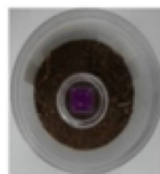
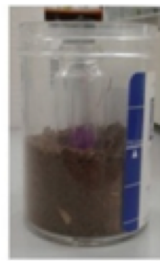


1 semaine

Lire AbsT0



100g de sol frais dans un bocal ~250mL étanche



Incubation

24h

Lire AbsT24



Basse Haute  
Activité Microbiologique du Sol



Adapté de Thoumzeau et al.

## ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

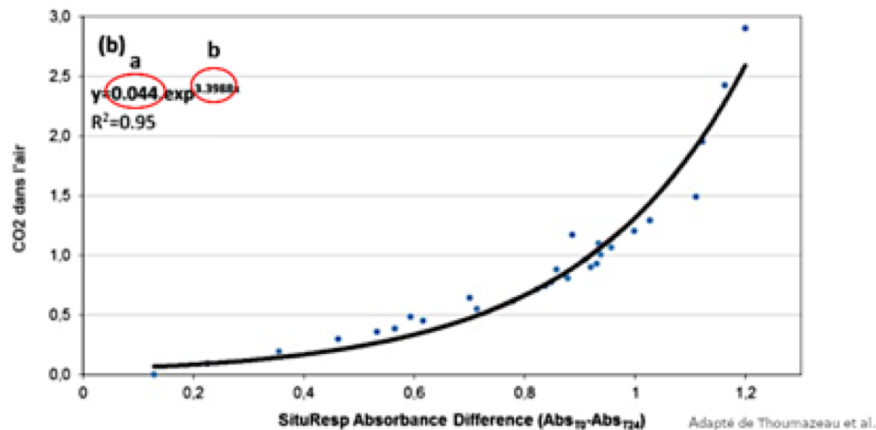
Plus la couleur du gel se rapproche du jaune, plus l'émission de CO<sub>2</sub> par le sol est importante.

Phase de calibration : Il existe une relation exponentielle entre le pourcentage de CO<sub>2</sub> injecté dans les pots et la différence d'absorbance ( $\Delta_{abs} = abs_{T0} - abs_{T24}$ ), représentée par la formule :

$$y (\%CO_2) = a \cdot \exp(b \cdot \Delta_{abs})$$

*a, b* : Constantes de calibrations déterminées à partir de la courbe de régression reliant %CO<sub>2</sub> et  $\Delta_{abs}$

Exemple d'une courbe de régression et identification de a et b :



Phase de mesure sur le terrain : En utilisant l'équation de la courbe de régression, on déduit le pourcentage de CO<sub>2</sub> (%CO<sub>2</sub>) dans l'échantillon à partir du  $\Delta_{abs}$  mesuré ( $\Delta_{abs} = abs_{T0} - abs_{T24}$ ). Le résultat final est exprimé en mg de CO<sub>2</sub> produit par kg en utilisant l'équation :

$$\text{SituResp mgCO}_2\text{C.kg}^{-1} \text{ soil} = (y \cdot M \cdot P \cdot V \cdot 10) / (m \cdot R \cdot T)$$

*y* = pourcentage de CO<sub>2</sub> dans l'échantillon (%CO<sub>2</sub>)

*m* = Matière sèche du sol incubé (kg) ;

*M* = Masse molaire du Carbone (g.mol<sup>-1</sup>) ;

*P* = Pression du gaz (Pa) ;

*R* = Constante Universelle des gaz parfaits

*T* = Température d'incubation (K) ;

*V* = Volume de l'espace libre dans le pot (m<sup>3</sup>)



La différence d'absorbance est de plus en plus utilisée comme indicateur de l'activité microbienne. C'est aussi un indicateur spectro-dépendant qui permet d'éviter les extrapolations et les comparaisons avec des méthodes plus usuelles au laboratoire que l'on utilise pour faire des analyses comparatives.

## CONCLUSION

La méthode Situresp est une méthode peu coûteuse et simple à appliquer sur le terrain pour des mesures rapides. La décomposition de la matière organique est évaluée indirectement en mesurant la respiration microbienne. Elle peut être directement réalisée sur le terrain si l'on dispose d'un spectrophotomètre portatif.

### Différences et complémentarités entre SituResp et MicroResp

Cette méthode sur terrain a été adaptée de la méthode Microresp™, qui est une méthode de mesure de la respiration basale du sol faite en laboratoire mais est aussi et surtout utilisée pour faire des profils de diversité fonctionnelle des microorganismes du sol.

Elle est facile à réaliser directement sur le terrain, mais sujette aux aléas d'humidité du sol, d'ensoleillement qui peuvent jouer sur la respiration microbienne. Elle est donc moins précise que la méthode de mesure de la respiration du sol par incubation en laboratoire où températures et humidités sont contrôlées.

## POUR EN SAVOIR PLUS :

### Sources bibliographiques :

Thoumazeau A., Gay F., Alonso P., Suvannang N., Phongjinda A., Panklang P., Chevallier T., Bessou C. & Brauman A. (2017) SituResp®: a time- and cost-effective method to assess basal soil respiration in the field. *Applied Soil Ecology* 121: 223-230.

Campbell C.D. et al. (2003) A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3593-3599.

### Sources Internet :

[Lien vers la vidéo  
\(non disponible\)](#)





### OBJECTIF

Cette méthode permet de comprendre et d'évaluer le comportement du sol. Avec les enjeux environnementaux actuels, la mesure de la respiration du sol permet de mieux comprendre les sources d'émission de CO<sub>2</sub> ainsi que d'établir un bilan carboné.

### PRINCIPE

Mesurer la respiration des microorganismes du sol, via leur production de CO<sub>2</sub>, ce qui permet de mesurer la vitesse de minéralisation du carbone du sol. La méthode décrite ici est la plus simple pouvant être proposée (Fierer, 2003). Elle nécessite toutefois l'emploi d'un analyseur de CO<sub>2</sub>.

### AVANTAGES

- + Possibilité de mesurer la respiration du sol sur de longues périodes (un mois)
- + Relativement simple à réaliser

### INCONVENIENTS

- Problèmes possibles de fuites d'air lors de l'incubation
- Dépend de la température et de l'humidité qu'il faut donc bien contrôler
- Nécessite un analyseur de CO<sub>2</sub>

---

### MATERIEL

- Tubes en verre (type Exetainer®) avec septum en caoutchouc (50 mL)
- Seringues en verre
- Granules de chaux sodée (Absorbeur de CO<sub>2</sub>)
- Analyseur de gaz par Infrarouge
- Aiguille hypodermique
- Capuchons septum (ou équivalent)



**PROTOCOLE :** C'est une méthode classique, qui existe dans de nombreuses variantes selon les objectifs spécifiques de l'expérimentation. Est présentée ici la version la plus basique et généraliste.

### 1<sup>ère</sup> étape

Peser 5 à 10 g de sol. Les placer dans un tube en verre de 50 mL. Sceller le tube avec un septum en caoutchouc étanche aux gaz.

### 2<sup>ème</sup> étape

Laisser l'échantillon au repos pendant 15 à 30 min, à température ambiante.

### 3<sup>ème</sup> étape

Préparer de l'air sans CO<sub>2</sub> : mettre l'air en contact avec la chaux sodée dans un pot hermétique (2,8 cm<sup>2</sup>/g de chaux, ex : si on a 50 ml dans un pot, on a donc besoin de  $50/2,8 = 17,8$  g de chaux)



L'indicateur coloré contenu dans la chaux sodée change de couleur (blanc à mauve) indiquant la fixation du CO<sub>2</sub>

### 4<sup>ème</sup> étape

Incuber le pot hermétique jusqu'à ne plus observer de changement de couleur de la chaux sodée

### 5<sup>ème</sup> étape

Prélever un échantillon initial de gaz (noté T0) dans le haut du tube : aspirer 5 mL d'air sans CO<sub>2</sub> dans une seringue en verre. Fixer une aiguille hypodermique sur la seringue et percer le septum du tube en verre contenant l'échantillon de sol. Injecter l'air sans CO<sub>2</sub>, pomper avec la seringue 3 à 4 fois, et aspirer 5mL du tube dans la seringue.

### 6<sup>ème</sup> étape

Injecter le gaz prélevé dans un Analyseur de Gaz par InfraRouge (ou IRGA) équipé pour mesurer le CO<sub>2</sub>. Enregistrer la concentration en CO<sub>2</sub> (en ppm) et le temps d'échantillonnage.

### Dernière étape

Reproduire l'opération entre 2 heures et 24 heures plus tard



**On souhaite que la concentration de CO<sub>2</sub> reste en dessous de 2% de l'air. En effet, une concentration supérieure aurait tendance à inhiber l'activité microbienne**

# Respiration du sol

## ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Calculer tout d'abord la quantité d'air dans le tube de 50 mL en utilisant la loi des gaz parfaits :

$$n = PV/RT$$

*n* : Quantité d'air en mol dans le tube

*P* : Pression (1 atm)

*V* : Volume du tube (mL)

*R* : 82.05 mL.atm/ mol.K

*T* : Température en K

Soit une quantité d'air de 2,08 mmol pour un tube de 50 mL à 20°C.

Utiliser la formule suivante pour convertir la concentration en CO<sub>2</sub> obtenue par IRGA (conversion de ppm en µg C-CO<sub>2</sub>):

$$\mu\text{g CCO}_2 = \text{mmol air} * \text{ppm CO}_2 (\mu\text{mol C/ mol air}) * 10^{-3} \text{ mol/mmol} * 12 \mu\text{g C}/\mu\text{mol C}$$

mmol air : quantité d'air dans un tube de 50 mL (2,08 mmol)

ppm CO<sub>2</sub> (en µmol C/ mol air) : concentration en CO<sub>2</sub> mesurée par l'IRGA

12 µg C/µmol C : masse molaire du Carbone

Cela nous permet de déduire la concentration en CO<sub>2</sub> par gramme de sol ou par gramme de C du sol :

$$\text{Concentration de CO}_2 \text{ par g de sol} = \mu\text{g CCO}_2/\text{gramme de sol de l'échantillon}$$

On peut faire des comparaisons en fonction de différentes températures, du temps d'incubation, des caractéristiques du sol, etc.

---

## CONCLUSION

Cette méthode permet de mesurer simplement la vitesse de minéralisation du carbone, par mesure de la respiration microbienne.

### Différences et complémentarités avec d'autres méthodes

Pour doser le CO<sub>2</sub> émis, en absence d'analyseur de gaz par infrarouge, il est possible de piéger le CO<sub>2</sub> émis par de la soude et de titrer cette soude en retour grâce à un titrimètre.

Cette méthode simplifiée de laboratoire est à rapprocher d'autres méthodes fréquemment utilisées et se développant au champ: SituResp, Solvita, MicroResp, Oxitop...

# Respiration du sol

## POUR EN SAVOIR PLUS :

### Sources bibliographiques :

Bekku Y., Koizumi H., Oikawa T. & Iwaki H. (1997) Examination of four methods for measuring soil respiration. *Applied Soil Ecology* 5: 247-254.

Creamer R.E., Schulte R.P.O., Stone D., Gal A., Krogh P.H., Lop Papa G., Murray P.J., Pérès G., Foerster B., Rutgers M., Sousa J.P. & Winding A. (2014) Measuring basal soil respiration across Europe: Do incubation temperature and incubation period matter? *Ecological Indicators* 36: 409-418.

Haney R.L., Brinton W.F. & Evans E. (2008) Soil CO<sub>2</sub> respiration: Comparison of chemical titration, CO<sub>2</sub> IRGA analysis and the Solvita gel system. *Renewable Agriculture and Food Systems* 23: 171-176.

Schiedung H., Bauke S., Bornemann L., Welp G., Borchard N. & Amelung W. (2016) A simple method for in-situ assessment of soil respiration using alkali absorption. *Applied Soil Ecology* 106: 33-36.

### Sources Internet :

Fierer (2003) : Measuring Soil C Mineralization Rates  
<https://labs.eemb.ucsb.edu/schimmel/josh/Protocols/soil%20respiration.pdf>

[Lien vers la vidéo  
\(non disponible\)](#)



## OBJECTIF

Mesurer la vitesse de la décomposition de la matière organique, en particulier l'activité d'alimentation des invertébrés de la macrofaune et de la mésofaune du sol.

## PRINCIPE

Des languettes en PVC percées de 16 trous de 1,5 mm de diamètre sont plantées verticalement dans le sol. Les trous sont remplis d'un substrat organique qui sera consommé par les organismes du sol au cours du temps. La comparaison des profils de décomposition renseigne sur l'activité biologique.

## AVANTAGES

- + Réutilisation des languettes
- + Pas besoin de connaissances en taxonomie de la faune du sol
- + Grande quantité de données en peu de temps
- + Possibilité d'utiliser différentes qualités de substrat pour accéder à la largeur fonctionnelle des organismes du sol

## INCONVENIENTS

- Seules des substances en poudre sont utilisables
- Pas de normes internationales
- Investissement initial en matériel relativement élevé

## MATERIEL

- Languettes : 8 à 10 languettes par lots sont nécessaires afin de pouvoir faire une analyse satisfaisante des résultats

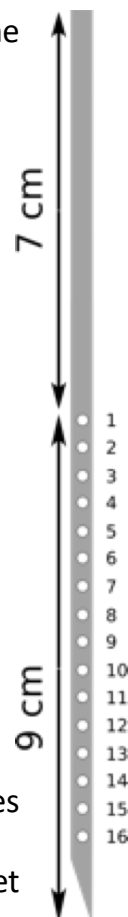


Ces languettes sont réutilisables mais fragiles

- Couteau ou outil métallique ayant la taille et la forme de la languette, comme celui-ci:



- Mètre-ruban
- Substrats pour remplir les languettes :
  - Achat chez un professionnel du substrat standard et des languettes PVC : Société Terra Protecta (Allemagne)
  - Fabrication artisanale : feuilles végétales broyées, séchées et tamisées à 100 µm puis mélangées à de l'agar et de la cellulose en poudre





**PROTOCOLE :** Cette méthode est répandue mais existe sous plusieurs variantes selon les besoins. Est présentée ci-dessous une version classique (languettes positionnées verticalement dans le sol, nombre de répétitions optimal)

## 1<sup>ère</sup> étape

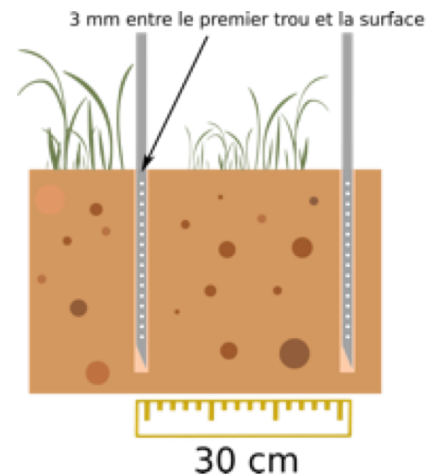
Annoter au marqueur indélébile chaque languette : date, numéro de répétition, site d'expérimentation, type de substance.

## 2<sup>ème</sup> étape

- Pour ne pas endommager les languettes, faire un trou dans le sol avec un outil en métal de la même forme, taille et épaisseur que les languettes.
- Insérer les 8 languettes sur une ligne, espacées de 30 cm. Le trou le plus haut doit se situer à 3 mm sous la surface du sol. Ceci doit être répété pour chaque site à analyser.
- Positionner également 2-3 languettes supplémentaires qui serviront à définir le moment idéal pour la mesure.



Le nombre de languettes est variable selon la précision attendue et l'hétérogénéité des sols. On peut alors répéter des groupes de 8 languettes à différents endroits d'une même parcelle.



## 3<sup>ème</sup> étape

Vérifier régulièrement (toutes les semaines) l'état de consommation des 2-3 languettes en extra et compter les trous vides/pleins. Lorsqu'on arrive à un taux de consommation entre 60% et 80% (60 à 80% de trous vides), on peut alors retirer toutes les languettes.

2-3 semaines



## 4<sup>ème</sup> étape

Retirer alors délicatement toutes les languettes du sol sans endommager les trous.

## Dernière étape

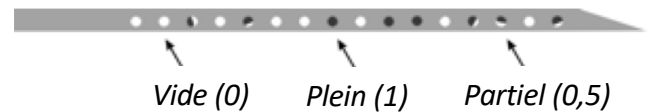
Retirer délicatement la terre collée sur les languettes avec une pissette d'eau ou un chiffon humide.

# Bait lamina

## ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Regarder à la lumière chaque trou séparément et noter :

- 1 si le trou est plein
- 0,5 si le trou est partiellement perforé
- 0 si le trou est vide

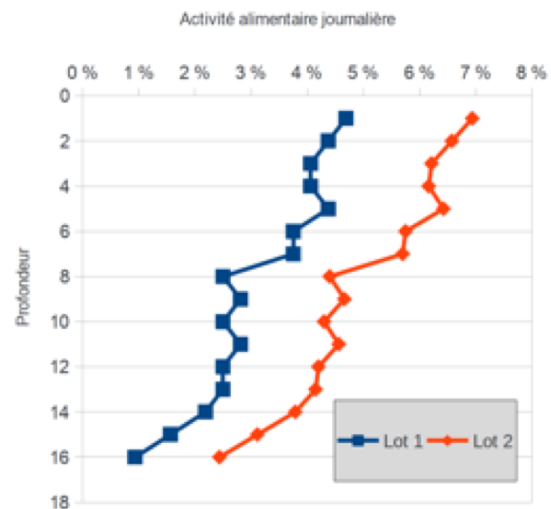


L'activité alimentaire a été évaluée en quantifiant le nombre d'ouvertures par languette, c'est-à-dire le nombre d'appâts organiques consommés par les organismes du sol. L'activité alimentaire atteint 100 % si tous les appâts d'une languette ont été consommés. On peut représenter l'activité alimentaire globale des lamelles dans un tableau.

On va utiliser ces informations pour comparer différents lots. Pour cela on calcule des valeurs statistiques (moyenne, écart-type, variance) et si besoin on réalise des tests statistiques (ANOVA, Student) pour déterminer si les lots sont significativement différents.

On peut aussi utiliser un profil de distribution de l'activité alimentaire, en comparant la moyenne des activités alimentaires de chaque lot en fonction de la profondeur, pour visualiser d'éventuelles différences et tendances entre chaque lot.

| Trous                                                     | Languettes |       |       |       |       |       |       |       | Activité alimentaire médiane |
|-----------------------------------------------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------------|
|                                                           | 1          | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     |                              |
| 1                                                         | 1          | 1     | 1     | 1     | 1     | 0,5   | 1     | 1     | 67,2%                        |
| 2                                                         | 1          | 1     | 1     | 1     | 1     | 0     | 1     | 1     |                              |
| 3                                                         | 1          | 1     | 1     | 1     | 1     | 0     | 0,5   | 1     |                              |
| 4                                                         | 1          | 0,5   | 1     | 0,5   | 1     | 0,5   | 1     | 1     |                              |
| 5                                                         | 1          | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 0     |                              |
| 6                                                         | 1          | 0,5   | 1     | 1     | 0,5   | 0     | 1     | 1     |                              |
| 7                                                         | 1          | 0     | 1     | 1     | 1     | 0     | 1     | 1     |                              |
| 8                                                         | 0          | 0,5   | 1     | 0     | 1     | 0,5   | 1     | 0     |                              |
| 9                                                         | 0          | 0     | 1     | 1     | 1     | 0     | 0,5   | 1     |                              |
| 10                                                        | 0          | 0     | 1     | 1     | 0     | 0,5   | 0,5   | 1     |                              |
| 11                                                        | 0,5        | 0     | 1     | 1     | 1     | 0,5   | 0,5   | 0     |                              |
| 12                                                        | 0          | 0     | 1     | 1     | 0,5   | 0,5   | 0     | 1     |                              |
| 13                                                        | 0          | 0,5   | 1     | 0     | 1     | 0,5   | 1     | 0     |                              |
| 14                                                        | 0          | 1     | 1     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0,5   |                              |
| 15                                                        | 0          | 0     | 0,5   | 0     | 0,5   | 0     | 0,5   | 1     |                              |
| 16                                                        | 0          | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0,5   |                              |
| Activité alimentaire par languette (%)                    | 46,9%      | 43,8% | 96,9% | 65,6% | 71,9% | 28,1% | 71,9% | 68,8% | 67,2%                        |
| Activité alimentaire journalière par languette (% / jour) | 2,3%       | 2,2%  | 4,8%  | 3,3%  | 3,6%  | 1,4%  | 3,6%  | 3,4%  | 3,4%                         |



## CONCLUSION

En conclusion, nous pouvons dire que la technique de Bait lamina est simple à mettre en place et peu chère à réaliser. L'analyse, bien définie et très utilisée, permet de faire des comparaisons avec d'autres sols et écosystèmes. Après un premier achat, les languettes sont réutilisables et les substrats à appliquer sont personnalisables et permettent une étude adaptée aux besoins.

### Différences et complémentarités entre Bait lamina, Sacs à litière et Tea Bag

- Méthode moins coûteuse que Litter Bag
- Plus spécifique à la macro- et à la mésofaune (les Tea Bag résultent plutôt d'une activité microbienne)
- Indications en fonction de la profondeur sur un point, ce que ne permet pas les Tea Bag, et plus difficilement les Litter Bag)
- Temps d'analyse plus court

# Bait lamina

## POUR EN SAVOIR PLUS :

### Sources bibliographiques :

Hamel C., Schellenberg M.P., Hanson K. & Wang H. (2007) Evaluation of the “bait-lamina test” to assess soil microfauna feeding activity in mixed grassland. *Applied Soil Ecology* 36:199-204.

Kratz W. (1998) The bait-lamina test – General aspects, applications and perspectives. *Environmental Sciences & Pollution Research* 5:94-96.

Römbke J. (2014) The feeding activity of invertebrates as a functional indicator in soil. *Plant and Soil* 383:43-46.

Römbke J., Höfer H., Garcia M.V.B. & Martius C. (2006) Feeding activities of soil organisms at four different forest sites in Central Amazonia using the bait lamina method. *Journal of Tropical Ecology* 22: 313-320.

Von Törne E. (1990) Assessing feeding activities of soil-living animals. I. Bait-lamina-tests *Pedobiologia* 34:89-101.

### Sources Internet :

Prix des lamelles : [www.terra-protecta.de/en/prices.html](http://www.terra-protecta.de/en/prices.html)

Life & Biodivine, Soil biological activity protocol, 2014.

(<https://www.biodivine.eu/docs/results-docs/A3.7%20%20Soil%20biological%20activity%20protocol%202013.pdf>)

[Lien vers la vidéo  
\(non disponible\)](#)





## OBJECTIF

Mesurer le taux de décomposition de la matière organique du sol par des activités microbiennes (microorganismes et microfaune).

## PRINCIPE

Des sachets de thé sont placés dans le sol pendant 3 mois pour les zones tempérées ou 2 mois pour les zones tropicales. Les microorganismes et la microfaune du sol décomposent la matière contenue dans le sachet. Le taux de décomposition est un bon indicateur global de l'activité biologique. Deux thés (thé vert et rooibos), de qualités différentes, permettent un accès à la largeur fonctionnelle des communautés de microorganismes.

## AVANTAGES

- + Faible coût
- + Peu de manipulations
- + Demande peu de compétences techniques, très simple à mettre en œuvre
- + Méthode standard et internationale
- + Discrimination robuste entre les sites d'observation

## INCONVENIENTS

- Temps d'attente
- Risque d'échec important selon les conditions météo
- Sachets de thé très spécifiques
- Sachets à usage unique
- Risque d'introduction d'argile dans les sachets qui peut perturber l'analyse et nécessite la mesure du taux de cendre

## MATERIEL

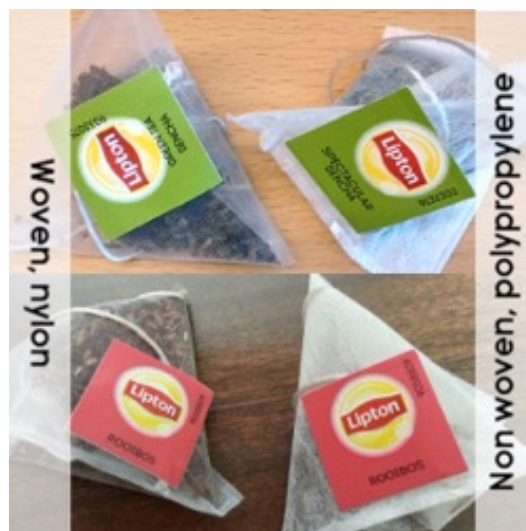
- Sachet de thé vert Lipton (EAN 87 10908 90359 5 ou l'ancien numéro de produit EAN 87 22700 05552 5).
- Sachet de thé Rooibos (EAN 87 22700 18843 8).



Deux versions, aux résultats identiques, existent pour chaque modèle: sachet tissé (après 2017, à gauche) et non tissé (avant 2017, à droite)



**Utiliser obligatoirement ces modèles de sachets**



- étuve ventilée (60°C)
- Four à moufle (550°C)
- Balance de précision (0,01 g minimum, idéalement 0,001 g)
- Marqueur indélébile



**PROTOCOLE :** Ceci est une méthode standardisée et utilisée internationalement. Le protocole ci-dessous est tiré de Keuskamp et al., 2013.



**La décomposition du thé doit être suivie au cours de la saison des pluies. Il faut donc les installer entre le début et la première moitié de la saison des pluies pour une durée de 2 à 4 mois.**

### 1<sup>ère</sup> étape

Marquer les deux types de sachets du côté blanc de l'étiquette (l'autre face en couleur va s'effacer avec le temps) avec un marqueur permanent. Codes de notation : V (thé vert) ; R (thé rooibos) ; nom de la parcelle, numéro de la répétition ; date de mise en sol.



Deux à trois répétitions sont conseillées pour une mesure approximative, au moins cinq pour plus de précision. Cela dépend de la surface à étudier ; il est important de prendre en compte la possible variabilité spatiale.

### 2<sup>ème</sup> étape

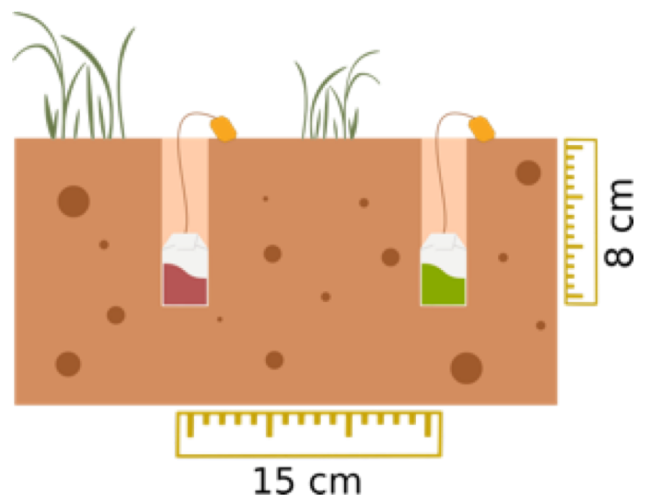
Optionnel : peser les sachets de thé à la balance de précision



Si cette étape n'est pas réalisée, se reporter à la rubrique « Pour en savoir plus »

### 3<sup>ème</sup> étape

Enterrer chaque sachet séparément, dans des trous de 8 cm de profondeur et de la largeur du sachet, espacés d'au moins 15 cm. Recouvrir de terre et tasser légèrement pour s'assurer du contact du sachet avec le sol. Gardez les étiquettes visibles à la surface du sol.



**Bien veiller à ne pas mélanger les deux types de thé**

Optionnel : marquer la position avec un bâtonnet. Un plan de localisation peut être réalisé



**Ne pas trop perturber le sol : utiliser une petite spatule, mettre le sachet à plat, éviter de creuser trop large**

# Tea bag

90 jours (60-120 jours)



## 4<sup>ème</sup> étape

Notez la date, et toute condition expérimentale qui vous semble pertinente (par ex : ombrage, végétation, texture du sol, profondeur de sol...), selon votre besoin. Laissez les sachets en place jusqu'à l'étape 5.



Le temps d'incubation n'a pas besoin d'être exactement de 3 mois. Dans les climats tropicaux humides, il peut être plus court (ex: 60 jours); il peut en revanche être plus long sous climats arides (120 jours). Mais la période de 3 mois permet plus aisément de faire des comparaisons avec d'autres sites.

## 5<sup>ème</sup> étape

Récupérer les sachets après la période définie



**Noter soigneusement les dates de début et de fin d'incubation**

## 6<sup>ème</sup> étape

Enlever les particules de terres (sans eau pour éviter les pertes de matériel dans le sachet - nettoyer avec un pinceau). Sécher les sachets de thé de préférence dans une étuve pendant 48h à 60°C.

## 7<sup>ème</sup> étape

Peser les sachets

## 8<sup>ème</sup> étape

Ouvrir les sachets et retirer la totalité du thé des sachets, sans perdre de matière

## 9<sup>ème</sup> étape

Peser le thé à la balance de précision

## 10<sup>ème</sup> étape

Mesurer le taux de cendre par une combustion à 550°C dans un four à moufle. Ce poids de cendres (matière minérale – par exemple des argiles – qui a pu pénétrer dans les sachets au cours de l'incubation) est décompté de la pesée de l'étape précédente.

## Dernière étape

Calculer la perte de poids au cours du temps (voir la rubrique Analyse et interprétation des résultats)

# Tea bag

## ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Les sachets sont décomposés principalement par les microorganismes et la microfaune. Les deux types de thé se décomposent à des vitesses différentes. Le thé vert se décompose rapidement dans les premières semaines, alors que le rooibos a une structure plus ligneuse, plus lente à se décomposer.

Pour chaque sachet de thé on aura :

- un poids initial (Pi) = poids de matière sèche de thé, sans le sachet
- un poids final (Pf) = poids de matière sèche de thé, sans le sachet et sans les cendres

### Formules

Taux de décomposition (mg/jour) =  $P_i - P_f$  (en mg) / nombre de jours

Décomposition totale (%) :  $[(P_i - P_f) \times 100] / P_i$

Si vous n'avez pas pesé les sachets, Keuskamp et al. (2013) donnent un poids moyen des sachets remplis de thé de 2,019 g et des sachets vides de 0,246 g donc un poids de thé par sachet de 1,773 g.

On peut comparer ces valeurs pour les différents sites, pour déterminer une différence de décomposition de la matière organique en fonction des conditions expérimentales. On compare par exemple la moyenne des répétitions par type de sachet sur chaque site. La comparaison entre les taux de décomposition des deux sachets de thé (thé vert et rooibos) permet de savoir si les communautés microbiennes sont plutôt représentées par des microorganismes de type r (décomposant rapidement le thé vert) ou des microorganismes de type K (décomposant plus lentement le rooibos).

Cet indicateur peut servir à détecter un problème de décomposition de la matière organique, donc une mauvaise qualité biologique du sol. On peut aussi l'utiliser pour comparer des conditions de sols différentes, entre plusieurs écosystèmes, des pratiques culturales différentes, ou des lieux d'expérimentations.

---

## CONCLUSION

La méthode des Tea Bag constitue un bon estimateur pour caractériser et/ou estimer la vitesse de décomposition de deux types de matière organique et pour comparer des sites. C'est un protocole simple et peu coûteux à mettre en œuvre. Il nécessite toutefois l'utilisation d'une étuve et d'un four à moufle. Cet outil ne se substitue pas à des méthodes plus précises comme les sacs à litières, mais il demande moins de moyens et d'efforts pour obtenir une estimation de la décomposition de la matière organique. Il est aussi utilisé au niveau international pour cartographier les taux de décomposition et quantifier l'effet du climat et de son évolution.

### Différences et complémentarités entre Sacs à litière et Tea Bag

- Meilleure précision des sacs à litière : choix des sacs spécifiques à la culture et aux résidus à décomposer, choix de la densité de la maille et donc de la faune qui peut y pénétrer
- Coût plus élevé pour les sacs à litière s'ils ne sont pas fabriqués soit même
- Difficulté de se procurer des sacs à litière
- Le temps d'attente est plus long, au moins 6 mois, pour les sacs à litière

# Tea bag

## POUR EN SAVOIR PLUS :

### Sources bibliographiques :

Keuskamp J.A., Dingemans B.J.J., Lehtinen T., Sarneel J.M. & Hefting M.M. (2013) Tea Bag Index: a novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 1070-1075.

MacDonald E., Brummell M.E., Bieniada A., Elliott J., Engering A., Gauthier T.L., Saraswati S., Touchette S., Turmel-Courchesne L. & Strack M. (2018) Using the Tea Bag Index to characterize decomposition rates in restored peatlands. *Boreal Environment Research* 23: 221-235.

### Sources Internet :

- Le site du projet Tea Bag Index : <http://www.teatime4science.org>  
Vous y trouverez de la documentation et des exemples d'expérimentations.

- Vous pouvez utiliser ce site pour les calculs :  
<http://www.teatime4science.org/data/submitonedatapoint/>

Tresch S. & Fliessbach A. (2017): Decomposition study using tea bags. FertilCrop Technical note  
[www.fertilcrop.net](http://www.fertilcrop.net)

The science of a buried tea bag (Global Soil Biodiversity Initiative)  
<http://blog.globalsoilbiodiversity.org/article/2016/07/06/science-buried-tea-bag>

[Lien vers la vidéo  
\(non disponible\)](#)



## OBJECTIF

Mesure de la vitesse de décomposition d'une matière organique de référence dans un sol

## PRINCIPE

Une masse connue de litière est incorporée à l'intérieur d'un sac maillé perméable. Le sac à litière ou « litter bag » est placé sur ou dans le sol pendant plusieurs mois. Après incubation, la litière dans les sacs est collectée et pesée à nouveau. La perte de masse est due à la dégradation de la matière organique par les organismes du sol traversant la maille. Cela permet de mesurer la vitesse de décomposition de la matière organique dans un sol en comparant différents milieux.

## AVANTAGES

- + Interprétation facile
- + Demande peu de compétences techniques, facile à mettre en œuvre
- + Peu de manipulation
- + Sac réutilisable
- + étude de l'activité de la pédofaune dans différents horizons du sol et substrats

## INCONVENIENTS

- Pas de standardisation
- Temps d'attente qui peut être important
- Nécessité de mesurer le taux de cendre si on souhaite des valeurs précises
- Sac enterré : perturbation du sol lors de la mise en terre

## MATERIEL

- Litière au choix (collectée sur le site, litière de forêt, paille, résidus de culture...)
  - Quantité : 10 g (adaptable en fonction des besoins)
- Sacs : maille en fibre de verre ou en nylon
  - Taille de la maille : choix dépendant de la faune que l'on veut étudier
    - 200 µm : micro-organismes et microfaune
    - 2 mm : Mésofaune
    - 2 mm-20 mm : Macrofaune
    - Taille du sac : 20 cm x 20 cm



**Il est possible de fabriquer soi-même un sac. Matériel : bâche plastique à maille de taille connue, agrafes, épingles de sûreté, règle, ciseaux, étiquettes**

- Jalon ou ruban de signalisation à mettre sur le terrain (pour localiser les sacs)
- Sardine pour maintenir les sachets au sol
- Balance
- Etuve à 60°C (pour sécher les litières)
- Bêche
- Etiquette en métal
- Four à moufle (550°C) (pour calculer le taux de cendres)



**PROTOCOLE : ce protocole peut être adapté selon les besoins (taille de la maille, des sacs, contenu des sacs)**

## 1<sup>ère</sup> étape

Récupération de la litière.

La litière utilisée peut se présenter sous deux formes (au choix, en fonction des sites d'étude) : soit de la litière de forêt, soit des résidus de culture. Dans tous les cas, la litière ne doit pas avoir touché le sol : il faut soit la récupérer dans des bacs à litière sous forêt, soit couper la nécromasse (litière morte) des cultures. Faire sécher la litière à 60°C pendant 2 jours.

## 2<sup>ème</sup> étape

Fabrication de sacs à litière :

Découper un morceau de maille plastique pour chaque sac, mesurant 20 x 40 cm.

Plier les côtés pour faire un carré de 20 cm de côté (laisser dépasser un peu de maille sur les côtés).

Fixer avec des agrafes ou des épingles. Le sachet doit être cousu. Laisser un côté ouvert pour introduire la litière.

Ecrire sur l'étiquette en métal un numéro d'identification (Date de mise dans le sol + type de litière) unique pour chaque sac. Mettre l'étiquette dans le sac. Pesez l'étiquette et le sac vide, noter les valeurs.



**Le nombre de répétitions, au minimum de 3, dépend de la taille de la zone étudiée et de la précision attendue. Répéter les étapes 2 à 8 pour chaque répétition.**

## 3<sup>ème</sup> étape

Remplir les sacs avec 10g de litière sèche (mettre le même poids dans chacun des sacs)

## 4<sup>ème</sup> étape

Peser le sac rempli, noter la valeur

## 5<sup>ème</sup> étape

Fermer le sac avec une épingle ou des agrafes, le coudre

## 6<sup>ème</sup> étape

Placer les sacs sur les sites : les sacs sont posés horizontalement à la surface du sol ou enterrés, selon que l'on s'intéresse à l'activité de la faune de la litière ou à la décomposition des racines. (Il est plus fréquent de laisser les sacs sur le sol)

Noter la date.

## 7<sup>ème</sup> étape

Après 6 mois (au minimum, préférablement 12 à 18 mois), récupérer les sacs. Noter la date pour chacun des sacs. Un sac supplémentaire pourra être utilisé pour vérifier l'avancée de la dégradation, et laisser les sacs plus longtemps si besoin.

# Sacs à litière (Litterbag)

## Dernière étape

Traiter l'échantillon :

- Enlevez la litière et la saleté de l'extérieur du sac à l'aide d'un pinceau sec.
- Sécher la litière de chaque sac à l'étuve à 60°C pendant 48h.
- Noter le poids sec de chacune des litières.
- Mesurer le taux de cendre en brûlant les échantillons (ou une aliquote) dans un four à moufle (550°C). Noter ce poids des cendres.

## ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

On va calculer le pourcentage de dégradation de la litière pour chaque sac :

$$\text{Dégradation (\%)} = ((\text{Poids initial sec} - \text{poids final sec}) / \text{poids initial sec}) \times 100$$



Le poids final sec correspond au poids de litière sèche – poids des cendres

On peut ensuite en faire la moyenne pour chaque site, et le cas échéant par horizon du sol exploré. On a donc une mesure du taux de dégradation de la litière que l'on peut comparer entre différents sites pour évaluer la qualité de la dégradation de la litière.

## CONCLUSION

La méthode Litter Bag est un moyen simple et facile à mettre en œuvre pour quantifier le taux de décomposition d'une litière personnalisable au type de culture voulu. Il est très adaptable selon la zone du sol que l'on souhaite tester, ou le type de litière ou de composé à placer dans le sac.

### Différences et complémentarités entre Sacs à litière et Tea Bag Index

- Meilleure précision du sac à litière : choix des sacs spécifiques à la culture (grandes cultures, viticulture, maraîchage...) et aux résidus à décomposer, choix de la densité de la maille (donc de la faune qui y pénètre).
- Coût plus élevé pour les sacs à litière, même fabriqués soi-même.
- Difficulté de se procurer les sacs à litière neufs.



# Sacs à litière (Litterbag)

## POUR EN SAVOIR PLUS :

### Sources bibliographiques :

Bokhorst S. & Wardle D.A. (2013) Microclimate within litter bags of different mesh size: Implications for the 'arthropod effect' on litter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 58: 147-52.

Coleman D.C., Crossley Jr. A.D. & Hendrix P.F. (2004) *Fundamentals of Soil Ecology* 2e. Burlington, MA. Elsevier Academic Press.

Jacobs A., Ludwig B., Schmidt J.H., Bergstermann A., Rauber R. & Joergensen R.G. (2011) Influence of tillage on degradation kinetics using the Litterbag method. *European Journal of Soil Biology* 47: 198-204.

Kampichler C. & Bruckner A. (2009) The role of microarthropods in terrestrial decomposition: a meta-analysis of 40 years of litterbag studies. *Biological Reviews* 84:375-389.

Karberg N.J., Scott N.A. & Giardina C.P. (2008) Methods for estimating litter decomposition. In: Hoover C.M. (Ed) *Field measurements for forest carbon monitoring*, Chapter 8. Springer Science+Business Media B.V., 103-111.

Lecerf A. (2017) Methods for estimating the effect of litterbag mesh size on decomposition. *Ecological modelling* 362:65-68.

Tardif A. (2013) Prédiction des taux de décomposition des litières végétales par les traits fonctionnels agrégés. *Sciences agricoles*. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.

### Sources Internet :

Les organismes du sol - Classification par taille des organismes du sol.

[http://www.supagro.fr/ress-pepites/OrganismesduSol/co/4\\_1d OSTaille.html](http://www.supagro.fr/ress-pepites/OrganismesduSol/co/4_1d OSTaille.html).

**Lien vers la vidéo  
(non disponible)**



## OBJECTIF

Mesurer la matière organique labile ou « active » présente dans le sol ; il s'agit de la fraction de matière organique facilement décomposable

## PRINCIPE

Par cette méthode, on mesure la quantité de carbone oxydable par le permanganate (POxC = Permanganate Oxidizable Carbon). Ce carbone correspond au carbone « actif » du sol. La méthode nécessite un spectrophotomètre

## AVANTAGES

- + Reproductibilité et fiabilité
- + Faible coût
- + Obtention rapide des résultats

## INCONVENIENTS

- Contraintes de conservation des solutions : elles se dégradent à la lumière
- Difficultés à interpréter le devenir de ce compartiment carboné du sol

---

## MATERIEL

- Spectrophotomètre UV – Visible (550 nm)
- Balance de précision (0,01 g)
- pH- mètre calibré pour mesurer 6-8 pH et NaOH pour l'ajustement du pH
- Agitateur oscillant ou horizontal (240 oscillations/min ou 120 rpm)
- Plaque magnétique chauffante et barreaux d'agitation
- Permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ ; Masse Molaire= $158.03 \text{ g.mol}^{-1}$ )
- Chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; Masse Molaire= $147.01 \text{ g.mol}^{-1}$ )
- Tubes pour centrifuges de 50 mL



**PROTOCOLE :** Cette méthode nécessite de préparer des solutions de réactifs

### 1<sup>ère</sup> étape

Peser 147 g de chlorure de sodium ( $\text{CaCl}_2$ ) ; les mettre dans un bécher de 1000 mL puis ajouter 900 mL d'eau distillée

### 2<sup>ème</sup> étape

Mettre à l'intérieur du bécher un barreau aimanté, placer le tout sur un agitateur magnétique jusqu'à dilution complète

### 3<sup>ème</sup> étape

Transférer le mélange dans une éprouvette graduée de 1000 mL. Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée

### 4<sup>ème</sup> étape

Peser 31,60 g de permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ ) dans un bécher et ajouter 900 mL de la solution  $\text{CaCl}_2$  préalablement préparée

### 5<sup>ème</sup> étape

Placer un barreau aimanté dans le bécher puis mettre le bécher sur un agitateur magnétique chauffant. Laisser dissoudre à une température modérée jusqu'à dissolution complète.



La dissolution peut être très lente ; il peut être nécessaire de laisser décanter la solution pour vérifier la présence de particules de permanganate non dissoutes.

### 6<sup>ème</sup> étape

Placer une sonde de pH calibré dans la solution (sous agitation continue) et mesurer le pH. Ajuster le pH à 7,2 en ajoutant  $\text{NaOH}$  0,1 M goutte par goutte.

### 7<sup>ème</sup> étape

Une fois le pH ajusté, verser la solution dans une éprouvette graduée de 1000 mL et compléter le volume manquant avec la solution  $\text{CaCl}_2$

### 8<sup>ème</sup> étape

Transférer le tout dans un flacon à conserver à l'abri de la lumière (dans ces conditions, la solution est stable de 3 à 6 mois)

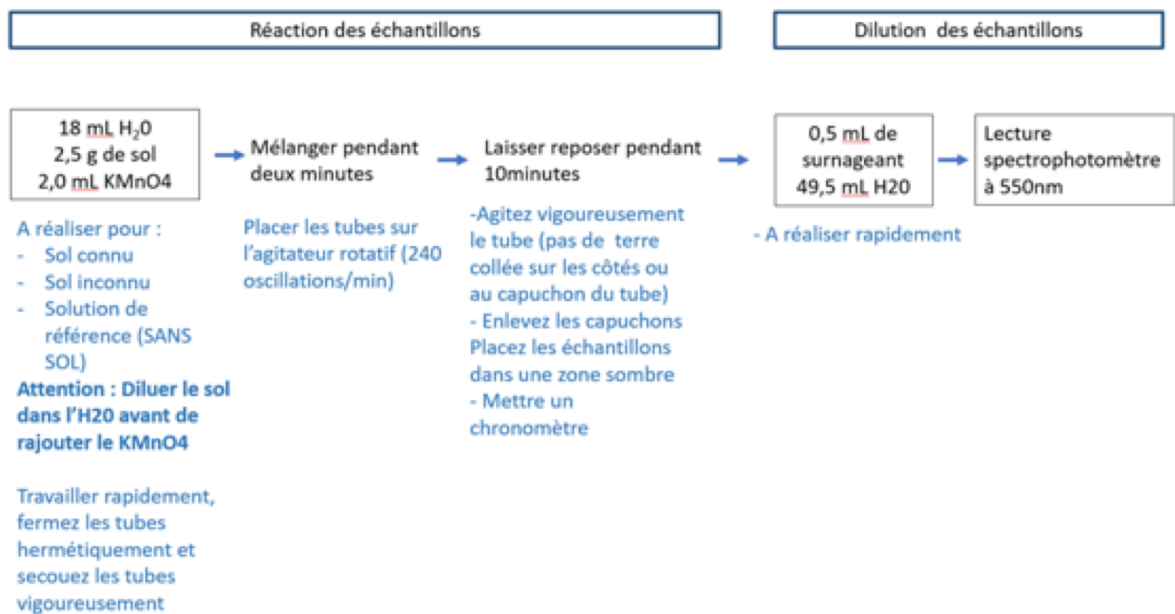


La quantité de solution de permanganate  $\text{KMnO}_4$  préparée peut être ajustée en fonction du nombre total d'échantillons à analyser. Un échantillon de sol nécessite 2 mL de cette solution de  $\text{KMnO}_4$  à 0,2 M.

**9<sup>ème</sup> étape : préparation de l'étalonnage**

4 solutions-étalon de 4 concentrations différentes (0,005 ; 0,01 ; 0,015 ; 0,02 M) vont être préparées à partir de la solution réserve  $\text{KMnO}_4$ . La préparation des solutions-étalon se fait par dilution de la solution réserve  $\text{KMnO}_4$ . Dans des tubes à centrifugation de 50 mL, rajouter 0,5 mL de chacune des dilutions préparées ci-dessus et ajouter 49,5 mL d'eau distillée.

| Concentration (M) | Volume de solution de réserve $\text{KMnO}_4$ (mL) | Volume d'eau distillée (mL) |
|-------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|
| 0,005             | 0,25                                               | 9,75                        |
| 0,01              | 0,5                                                | 9,5                         |
| 0,015             | 0,75                                               | 9,25                        |
| 0,02              | 1                                                  | 9                           |

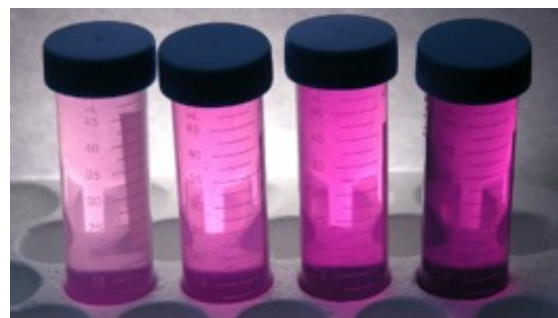
**10<sup>ème</sup> étape : préparation des échantillons**

Le sol connu sert de référence.

Il s'agit d'un sol séché, pulvérisé et homogénéisé, et qui sert de contrôle pour de mesures de POXC sur plusieurs jours, sur des réactifs différents. La solution de référence (sans sol) est préparée dans les mêmes conditions, pour détecter d'éventuelles contamination par des agents oxydants ou du carbone.

**Dernière étape**

Mesure de l'absorbance à 550 nm



## ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

La quantité de carbone oxydée est reliée à la quantité de permanganate réduit. La valeur du POXC est inversement proportionnelle à l'absorbance. Utilisez l'équation suivante pour déterminer la teneur en POxC :

$$\text{POXC (mg.kg}^{-1} \text{ de sol)} = [0,02 \text{ mol/L} - (a \times \text{Abs} + b)] \times (9000 \text{ mg C/ mol}) \times (0,02 \text{ L solution/ Pt})$$

Avec :

- 0,02 mol/L = concentration de la solution initiale
- a = coefficient directeur de la courbe de régression
- b = ordonnée à l'origine de la courbe de régression
- Abs = absorbance mesurée à 550 nm
- 9000 mg C/ mol : carbone oxydé par une mole de  $\text{MnO}_4$
- 0,02 L = volume de solution qui a réagi
- Pt = poids total du sol (sec) en kg

On obtient donc la quantité de carbone rapidement décomposable par le sol. On peut ensuite la comparer avec d'autres échantillons.

---

## CONCLUSION

La méthode POXC permet de mesurer le carbone oxydable au permanganate sur une parcelle. Cela permet un suivi de la teneur en matière organique labile dans les sols. Cette méthode est reproductible, relativement précise et rapide à mettre en œuvre mais nécessite un matériel plutôt spécifique.

### **Différences et complémentarités avec la méthode du fractionnement granulométrique**

Cette méthode se rapproche d'un fractionnement granulométrique de la matière organique qui permet un dosage de carbone dans les fractions organiques, figurées du sol.

## POUR EN SAVOIR PLUS :

### Sources bibliographiques :

- Culman S., Freeman M. & Snapp S. (xxxx) Procedure for the determination of Permanganate Oxidizable Carbon ., s. d., 5.
- Hurisso T.H., Culman S.W., Horwath W.R., Wade J., Cass D., Beniston J.W., Bowles T.M., Grandy A.S., Franzluebbbers A.J., Schipanski M.E., Lucas S.T. & Ugarte C.M. (2016) Comparison of permanganate-oxidizable carbon and mineralizable carbon for assessment of organic matter stabilization and mineralization. Soil Science Society of America Journal 80: 1352-1364.
- Thoumazeau A., Bessou C., Renevier M.S., Trap J., Marichal R., Mareschal L., Decaëns T., Bottinelli N., Jaillard B., Chevallier T., Suvannang N., Sajjaphan K., Thaler P., Gay F. & Brauman A. (2019) Biofunctool: a new framework to assess the impact of land management on soil quality. Part A: concept and validation of the set of indicators. Ecological Indicators97: 100-110.
- Weil R.R., Islam K.R. , Stine M.A., Gruver J.B. & Samson-Liebig S.E. (2003) Estimating active carbon for soil quality assessment: A simplified method for laboratory and field use. American Journal of Alternative Agriculture 18:3–17.

### Sources Internet :

- McKnight Foundation (2018) Soil health evaluation manual. Soils cross cutting project. [https://smallholdersha.files.wordpress.com/2018/07/soiltoolkitmanual\\_sv6-2.pdf](https://smallholdersha.files.wordpress.com/2018/07/soiltoolkitmanual_sv6-2.pdf)

[Lien vers la vidéo  
\(non disponible\)](#)

