

Université des Sciences et Techniques du Languedoc



Master : *Sciences et technologies*
Mention : *Ecologie Biodiversité*
Spécialité : *Biodiversité Evolution*
Parcours : *Ecosystèmes*
Année : 2012 / 2013

PROJET DE RECHERCHE

LA CARENCE EN PHOSPHORE EST-ELLE LE PRINCIPAL DETERMINANT DU « PRIMING EFFECT » DANS LES SOLS MALGACHES ?



Par Kanto RAZANAMALALA

Stage de M2
réalisé sous la direction de Laetitia BERNARD
Chargée de Recherche IRD en écologie microbienne
Tel : +261 32 22 000 12
Mail : laetitia.bernard@ird.fr

UMR 210 Ecologie fonctionnelle & biogéochimie des Sols & des agro-écosystèmes
Implantation au Laboratoire des Radio-Isotopes, Antananarivo



Soutenu le 20 juin 2013

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.....	1
2. OBJECTIF	3
3. STRATEGIE METHODOLOGIQUE	3
Site d'étude, caractéristiques du sol et conditions d'incubation	3
Dosage CO ₂ et ¹³ CO ₂	3
Dosage du Carbone et microbien	3
Dosage du phosphore disponible et microbien	3
Dosage de la teneur en azote mineral	3
Mesures du pH du sol	3
Analyses moléculaires	5
Analyses statistiques.....	5
4. RESULTATS.....	5
Respiration basale du sol.....	5
Minéralisation de la paille	5
Détermination du priming effect (PE).....	5
Teneur en phosphore et carbone microbien.....	6
Teneur en azote minéral.....	6
Teneur en phosphore et carbone disponible	6
Valeur du pH de la solution du sol (d'acidité active) et du sol (acidité totale)	6
Ratio c:p	6
Composition des communautés bactériennes	6
5. DISCUSSION.....	7
(h1) la teneur en P _i du sol contrôle négativement l'intensité du PE généré par un apport de carbone (C) frais riche en énergie et issu de paille de blé	7
(h2) L'intensité du priming effect peut être corrélée à la proportion de certaines populations.....	8
(h3) la stœchiométrie des éléments minéraux du sol contrôle la biomasse et l'activité microbienne dont le nutriment limitant est le phosphore	9
6. CONCLUSION	10
7. BIBLIOGRAPHIE.....	11
8. ANNEXES	

1. INTRODUCTION

L'augmentation de la production agricole mondiale a été multipliée par 2,6 au prix d'une utilisation massive d'intrants (Mazoyer, 2009) mais certains pays du Sud n'atteignent toujours pas leur autosuffisance alimentaire. De plus, dans la plupart des régions tropicales, les rendements présentent un lien exponentiellement négatif avec la perte de qualité du sol (Stocking, 2003). Ainsi, l'investigation du fonctionnement des différents sols tropicaux est nécessaire pour installer les principes d'ingénierie écologique dans une gestion pérenne des agrosystèmes dans les pays du Sud (Odum and Odum, 2003; Mitsch, 2012).

Dans le contexte actuel de changement climatique, la matière organique contenue dans les sols (MOS) est impliquée dans les flux de gaz à effet de serre (Agren, 2010) et dans la source de nutriments pour la production primaire. La décomposition de cette MOS en composés inorganiques, et ainsi le recyclage des nutriments, est notamment dirigée par l'activité microbienne et entraîne ainsi l'évolution de la MOS jusqu'à sa stabilisation. Le priming effect (PE) est un autre phénomène lié à l'activité microbienne et qui présente un intérêt agronomique. Il a été observé pour la première fois en 1926 par Löhnis et correspond au turnover des stades complexes et stabilisés de la MOS en réponse à un apport de substance organique fraîche et riche en carbone labile (MOF ; Kuzyakov *et al.*, 2000). Le PE réel peut être positif, si la minéralisation de la MOS est accélérée, ou négatif, si elle diminue en comparaison à un contrôle sans apport. Le PE a été observé dans toutes les sphères écologiques caractérisées par des apports en MOF. Il a notamment été observé dans la rhizosphère (Kuzyakov, 2002 ; Blagodatskaya and Kuzyakov, 2008; Cheng, 2009; Nottingham *et al.*, 2009), la drillosphère (Bernard *et al.*, 2012; Bityutskii *et al.*, 2012), la résidusphère (Fontaine *et al.*, 2004, 2007; Bernard *et al.*, 2007, 2009) et même les écosystèmes aquatiques (Guenet, Danger, *et al.*, 2010; Guenet, Neill, *et al.*, 2010). Cela indiquerait qu'il s'agit d'un phénomène général et déterminant dans les cycles biogéochimiques et le fonctionnement des écosystèmes.

Mais après plus d'une décennie de recherche (Kuzyakov *et al.*, 2009, 2000; Kuzyakov, 2002, 2010; Fontaine *et al.*, 2003, 2011; Blagodatskaya and Kuzyakov, 2008; Kemmitt *et al.*, 2008; Brookes *et al.*, 2009; Guenet, Neill, *et al.*, 2010; Bernard *et al.*, 2012), les mécanismes de régulation du priming effect (PE) restent mal compris. La principale contrainte du PE est la forte demande en énergie de la dégradation de la matière organique évoluée du sol. En absence de composés organiques riches en énergie et facile à dégrader, les pertes énergétiques et de diffusion liées au catabolisme d'enzymes spécifiques ont un feedback négatif sur l'activité microbienne et pourrait contraindre la croissance microbienne et la décomposition de la MOS à des taux constants (Ekschmitt *et al.*, 2005). L'apport de MOF marqué dans le sol a notamment permis de mettre en évidence, de nombreuses fois, une augmentation de la dégradation de la MOS non marquée. La du PE est à l'intersection de la théorie métabolique de l'écologie et de la théorie de la stœchiométrie écologique (Sinsabaugh and Shah, 2012 ; Sullivan and Hart, 2013). En effet, l'activité microbienne responsable du PE est contrainte par la physiologie des micro-organismes produisant les enzymes de dégradation de la MOS mais également contrainte par la nature des enzymes. En effet, les enzymes impliquées dans la décomposition de la MOS seraient majoritairement des exo-enzymes. La théorie métabolique de l'écologie (MTE) prédit que les métabolismes des organismes présents contrôlent les processus, la structure et la dynamique d'un écosystème. Elle se base sur la variation, entre organismes, des métabolismes d'exploitation des nutriments disponibles dans l'environnement (Brown *et al.*, 2004). Ainsi, le PE pourrait être contrôlé par la disponibilité en nutriments (Kuzyakov *et al.*, 2000; Kuzyakov, 2010) et serait principalement restreint par des caractéristiques physiologiques et écologiques. La théorie de la stœchiométrie écologique (EST) se concentre sur la compréhension de l'importance de l'équilibre des éléments sur les communautés d'organismes et leur environnement (Sturner & Elser, 2002 cité par Allen and Gillooly, 2009). Ainsi, le PE pourrait être contrôlé par la réponse de la structure de la communauté microbienne à la limitation en nutriments (Fontaine *et al.*, 2003, 2011; Blagodatskaya *et al.*, 2007; Blagodatskaya and Kuzyakov, 2008). En effet, Fontaine *et al.* (2003) ont proposé le priming effect (PE) comme résultant d'une compétition pour des ressources nutritionnelles entre différentes guildes de microorganismes : les stratèges r et les stratèges K. De plus, Blagodatskaya *et al.* (2007

et 2008) ont observé que la dynamique du PE réel était composée de PE positifs et PE négatifs variant en fonction des ratios C:N de la biomasse microbienne et de l'environnement. Des études récentes tentent de



Photographie 1 : Emplacement de prélèvement : jachère à *Aristida sp.* sur tanety, Lazaina

Tableau 1 : Caractéristiques du sol de Lazaina

Ferralsol (Lazaina)	
Argile (g kg ⁻¹ de sol)	340
Limon (g kg ⁻¹ de sol)	70
Sable (g kg ⁻¹ de sol)	580
Al _{DCB} ^a (g kg ⁻¹ de sol)	7,2
Fe _{DCB} ^a (g kg ⁻¹ de sol)	35,13
Si _{DCB} ^a (g kg ⁻¹ de sol)	0,24
Al _p	3,04
Fe _p	1,73
Si _p	0,72
Carbone (g kg ⁻¹ de sol)	20,34
Azote total (g kg ⁻¹ de sol)	1,36
Ammonium (mg kg ⁻¹ de sol)	1,31
Nitrate (mg kg ⁻¹ de sol)	388,08
Ptot Olsen (mg kg ⁻¹ de sol)	22,533
Pi Olsen (mg kg ⁻¹ de sol)	3,321
Capacité d'Echange Cationiques (cmol kg ⁻¹ de sol)	6,20
ratio C:N	13,7
pH eau	5,5

déterminer si une de ces deux théories prévaut dans la régulation de la décomposition de la MO et, par extension, du PE (Allen and Gillooly, 2009; Sinsabaugh *et al.*, 2009; Sullivan and Hart, 2013). Depuis la découverte du priming effect (PE), les études se sont surtout concentrées sur son implication dans les cycles du carbone (C) et de l'azote (N) dans les régions tempérées. Peu d'études se sont intéressées au PE sur la base du phosphore (P). Or le P est indispensable pour les organismes vivants et ne peut être remplacé dans la plupart des fonctions biologiques où il est requis.

Dans le sol, les micro-organismes peuvent jouer le rôle de puits ou de source de phosphore et interviennent dans le cycle du P dans le sol (Frossard *et al.*, 2011). En effet, la distribution du P dans la biomasse microbienne varie en fonction des conditions environnementales et peut affecter la disponibilité en P pour les plantes (Bünemann *et al.*, 2011). Une meilleure compréhension du devenir du phosphore microbien dans l'environnement fournirait une amorce pour une meilleure efficacité d'utilisation du P dans les agrosystèmes.

Or, les sols tropicaux, très anciens, sont le plus souvent des sols carencés en phosphore disponibles (P_{disp}) qui constitue un facteur limitant pour le développement végétal mais aussi pour certains processus microbiens (Hinsinger, 2001; Cleveland *et al.*, 2002). C'est le cas des sols de Madagascar où l'utilisation d'engrais est pourtant très limitée (Rabeharisoa, 2004). Dans le cadre d'une Révolution verte à Madagascar, l'occupation durable des tanety, c'est-à-dire les versants des collines des Hauts Plateaux, a été valorisée. Ces tanety représentent 50% de la surface agricole utile des Hautes Terres (Andriamaniraka *et al.*, 2010) et sont dominées par des ferralsols. Ces sols sont extrêmement anciens et tous les éléments intéressants pour l'agriculture (calcium, magnésium, potassium, oligo-éléments...) ont été lessivés (Raunet, 1997). Ces sols sont notamment carencés en phosphore disponible malgré une teneur en phosphore totale élevée avoisinant celle des sols tempérés (Rasoamaharo, 2007). Le phosphore y est notamment adsorbé sur les oxydes de fer et d'aluminium et sur la matière organique. D'autant plus que, dans les ferralsols des Hautes Terres soumis à un climat tropical d'altitude, la matière organique se minéralise lentement. Les ferralsols ont une faible résilience aux perturbations et, une fois la végétation enlevée, ils sont soumis à une érosion et à une acidification rapide qui augmente la fixation du phosphore (Stocking, 2003). De cette façon, le réservoir principal de phosphore dans les ferralsols malgaches est le phosphore organique (P_{org}). Des études des processus microbiens dans ces ferralsols permettraient ainsi d'améliorer l'exploitation de ce réservoir (Bunemann *et al.*, 2004b; Ehlers *et al.*, 2010). Ainsi, le priming effect (PE) pourrait s'avérer être un processus remettant une fraction du P_{org} à disposition des plantes. La question à laquelle nous allons essayer de répondre au cours de ce stage est : le P est-il le principal déterminant du PE dans les sols ferrallitiques tropicaux, tout comme le N dans les sols des régions tempérées ? A travers cette question nous verrons si, d'une manière plus générale, le principal déterminant du PE est toujours l'élément le plus déficient dans un sol ou si ce processus est contrôlé de façon plus complexe.

2. OBJECTIF

Afin d'évaluer la place du phosphore (P) et le rôle de la stœchiométrie dans la détermination du priming effect (PE), certaines hypothèses seront testées : (h1) la teneur en P_i du sol contrôle négativement l'intensité du PE généré par un apport de carbone (C) frais riche en énergie et issu de paille de blé, (h2) l'intensité du priming effect peut être corrélée à la proportion de certaines populations et (h3) la stœchiométrie des éléments minéraux du sol contrôle la biomasse et l'activité microbienne dont le nutriment limitant est le phosphore.

3. STRATEGIE METHODOLOGIQUE

SITE D'ETUDE, CARACTERISTIQUES DU SOL ET CONDITIONS D'INCUBATION

Le sol étudié a été prélevé sous une jachère à *Aristida sp.* (Photographie 1) dans la commune de Lazaina (18°46'54.45"S, 47°32'05.99"E), à environ 12 km au Nord Est d'Antananarivo (Madagascar). Lazaina se situe à une altitude de 1274 m et est soumis à un climat tropical d'altitude. Le sol est un ferralsol très représentatif de la majorité des sols de la Grande Ile. Ses caractéristiques physicochimiques sont présentées dans le Tableau 1. La teneur en MO est de 2,6 kg pour 100 kg de sol et le C:N initial, compris entre 13 à 25, indique une MO faiblement décomposée.

Tableau 2 : Détails des différents traitements apportés aux microcosmes

CT : Control traitement

CNT : Control traitement + nitrogen

CPT : Control traitement + phosphorus

CNPT: Control traitement + nitrogen and phosphorus

ST : Straw traitement

SNT : Straw traitement + nitrogen

SPT : Straw traitement + phosphorus

SNPT : Straw traitement + nitrogen and phosphorus

Traitement	sol frais (g)	apport de paille marquée (g)	apport de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)	apport de KH_2PO_4 (g)	apport d'eau (ml)
CT	110,16	0	0	0	13,34
CNT	110,16	0	0,1511	0	13,34
CPT	110,16	0	0	0,0703	13,34
CNPT	110,16	0	0,1511	0,0703	13,34
ST	110,16	0,4	0	0	13,34
SNT	110,16	0,4	0,1511	0	13,34
SPT	110,16	0,4	0	0,0703	13,34
SNPT	110,16	0,4	0,1511	0,0703	13,34

Environ 5 kg de sol ont été prélevés à une profondeur de 0 – 10 cm et en évitant la couche rhizosphérique. Le sol prélevé a été tamisé à 2 mm afin d'oter les débris végétaux restant et de l'homogénéiser. Son humidité a été déterminée et ajustée à 100% de sa capacité au champ ($0,2350 \text{ ml g}^{-1}$ sol) lors de l'application des traitements. Pour notre étude, nous avons réalisé des microcosmes de 100 g équivalent sol sec, soit 110,16 g de sol frais, placé dans des flacons de 250 ml. Le sol a ensuite été amendé en paille marquée à 10% en ^{13}C avant l'ajout des solutions d'azote ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) et/ou de phosphore minéral (KH_2PO_4) (Annexe I). Ces apports ont été réalisés de sorte à respecter un ratio C:N:P microbien de 10:2:1 (Griffiths *et al.*, 2012) sur la base d'un apport de 0,004 g de paille par gramme de sol. Les quantités de N et P apportées aux microcosmes étaient largement supérieures aux quantités apportées lors de fertilisation de systèmes agronomiques. Les huit modalités (Tableau 2) ont été répétées trois fois (Annexe I). Les vingt-quatre microcosmes ainsi obtenus ont été incubés à une température constante de 26°C et à l'obscurité pendant sept jours.

DOSAGE CO_2 ET $^{13}\text{CO}_2$

Le dosage du CO_2 dans l'atmosphère de chaque microcosme a été réalisé, après un, trois et sept jours d'incubation, par chromatographie en phase gazeuse. Pour cela, un microcatharomètre μCPG (CP-4900, Varian) a été utilisé selon la méthode de routine exécuté au LRI (Annexe II). En parallèle, 5 ml de l'atmosphère des microcosmes enrichis en paille marquée ont été prélevés à la seringue et injecté dans des tubes sous vide et envoyé à la plateforme d'isotopie de l'IBIP à Montpellier pour le dosage du $^{13}\text{CO}_2$. Ce dosage a été réalisé par IRMS comme décrit dans Bernard *et al.* (2012).

DOSAGE DU CARBONE MICROBIEN

Les teneurs en carbone de la biomasse microbienne du sol ont été déterminées par la méthode de fumigation-extraction (Vance *et al.*, 1987; Jenkinson *et al.*, 2004). Brièvement, 24h de fumigation au chloroforme d'une série de sous-échantillons de 10 g de sol frais a entraîné la lyse des cellules microbiennes. Ensuite les sous-échantillons fumigés et non fumigés ont été soumis à une extraction du C microbien par une solution de K_2SO_4 à 0,5 M (Annexe III). Enfin, il faut soustraire les teneurs en C des extraits non fumigés aux teneurs en C des extraits fumigés pour estimer le carbone provenant des micro-organismes. Cette teneur en C microbien est assimilée à la biomasse microbienne.

DOSAGE DU PHOSPHORE DISPONIBLE ET MICROBIEN

Parallèlement, la quantité de phosphore de la biomasse microbienne a été estimée par la méthode de fumigation-extraction d'après Kouno *et al.* (1995), McLaughlin *et al.* (1986) et Ohno and Zibilske (1991). L'équivalent de 2 g de sol sec a été agité pendant 16h en présence de bandes de résines échangeuses d'anions (BDH #55164 2S, BDH Laboratory supplies, Poole, England) dans de l'eau distillée, de l'eau distillée et de l'hexanol et de l'eau avec apport de P pour corriger l'absorption du phosphore libéré durant la fumigation-extraction. Le phosphore est ensuite dosé par colorimétrie au vert de malachite (Annexe IV). Cette méthode permet aussi de déterminer la teneur en phosphore disponible (P_{disp}) dans le sol.

DOSAGE DE LA TENEUR EN AZOTE MINERAL

Après sept jours d'incubation, la teneur en azote minéral (ammonium et nitrate) a été déterminée par la méthode Kejdhal (1934) modifiée par Jean Delarivière. Pour chaque microcosme, 5 g de sol frais ont été agité une heure dans une solution de chlorure de potassium. Les suspensions de sol ont ensuite été filtrées avant d'être congelé en attendant le dosage (Annexe VII). Le dosage colorimétrique de l'azote minéral, sous forme ammoniacal et sous forme de nitrate, a ensuite été réalisé selon la réaction modifiée de Berthelot à l'aide d'un auto-analyseur SKALAR.

MESURES DU PH DU SOL

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer le pH du sol après sept jours d'incubation. La première méthode, pH_{eau} , est une détermination du pH à partir de suspension de 5 g de sol sec broyé à 2 mm dans 12,5 ml d'eau distillée suivie d'une agitation de 30 min. Ce pH_{eau} est la mesure de la concentration en ions hydrogène (H^+) dans la solution du sol également appelé l'acidité active du sol. La seconde méthode, pH_{KCl} , consiste à

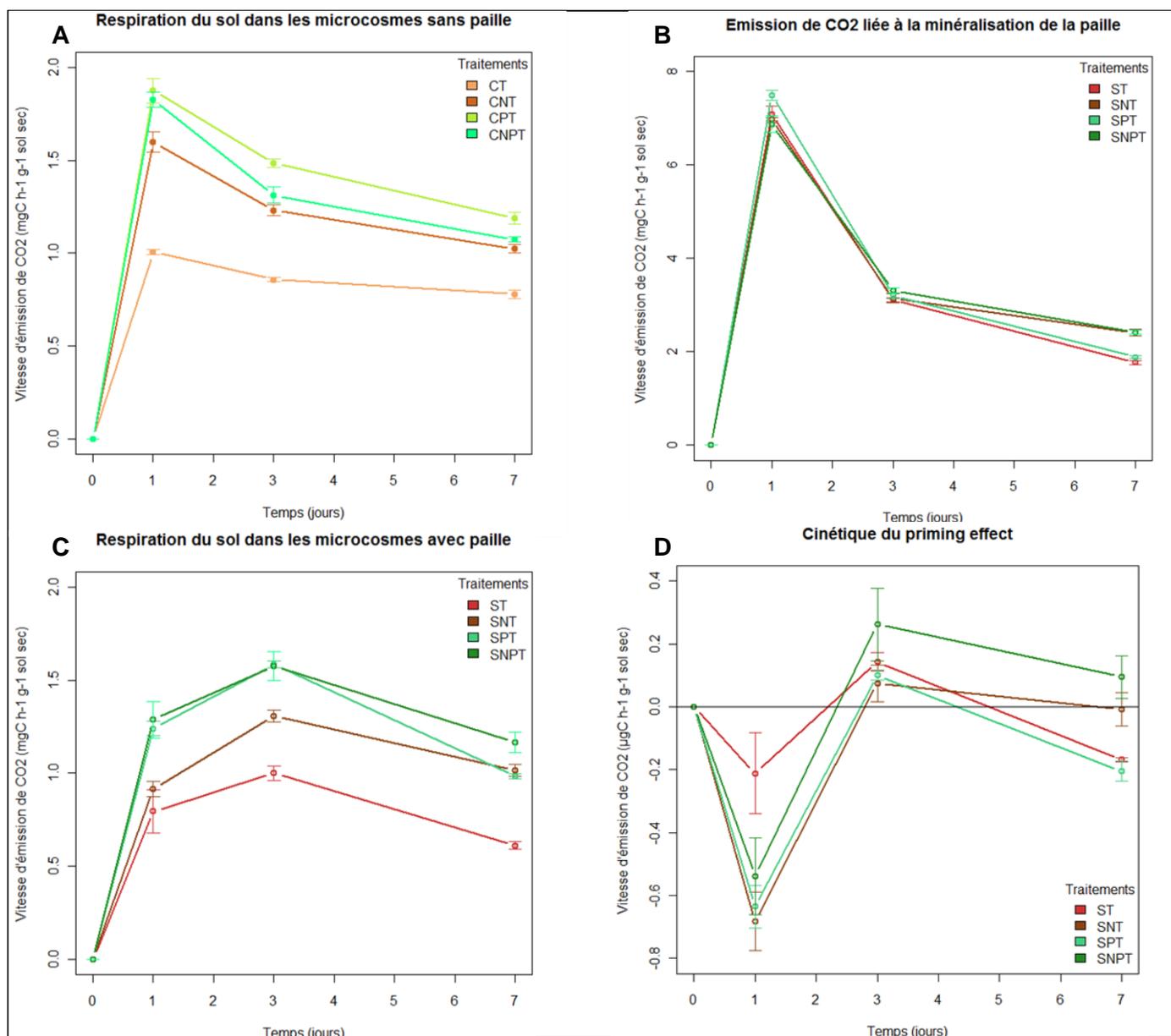


Figure 1 : Mesures d'émission de CO₂ par les microcosmes

1A : Respiration basale du sol dans les microcosmes sans paille. 1B : Emission de CO₂ liée à la minéralisation de la paille calculée à partir des émissions de ¹³CO₂. 1C : Respiration du sol dans les microcosmes avec paille obtenue après soustraction de la minéralisation de la paille. 1D : Priming effect obtenu par soustraction, à la respiration basale du sol (1A), de la minéralisation de la paille (1B) et de la respiration du sol en présence de paille (1C).

Les données représentées par des cercles pleins sont celles des microcosmes sans paille alors que les données représentées par des cercles vides sont celles des microcosmes avec paille.

Tableau 3: Résultats des ANOVA croisées des effets des traitements sur les émissions de CO₂
P-value des effets des facteurs sur les variables

Facteur	P-value des effets des facteurs sur les variables	
	respiration du sol	minéralisation de la paille
Paille	< 1	< 0,001
NH ₄	< 1	< 1
Phosphore	< 0,001	< 1
Paille x NH ₄	< 1	< 1
Paille x Phosphore	< 1	< 0,1
NH ₄ x Phosphore	< 0,001	< 1

mettre en suspension 5 g de sol sec broyé dans 12,5 ml de solution KCl à 1 M suivi d'une agitation de 15 min. L'utilisation de solution KCl a permis d'extraire tous les ions H⁺ du sol afin de déterminer l'acidité totale du sol

ANALYSES MOLECULAIRES

Après sept jours d'incubation, un aliquot de chaque microcosme a été congelé avant la co-extraction quantitative d'ADN et d'ARN sur 500 mg de sol. Nous avons d'abord réalisé cette co-extraction sur le plateau de biologie moléculaire du FOFIFA Ambatobe / Cirad Forêt. La méthode suivie est celle de l'UMR Eco&Sols (Annexe V) qui est issue des protocoles fournis par le kit d'extraction d'ADN (FastDNA™ SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals, Solon, Etats-Unis) et le kit de purification d'ARN (RNaid™ Kit with SPIN™, MP Biomedicals, Solon, Etats-Unis) utilisés. Les extraits d'ADN ainsi obtenus ont été envoyés à DNAVision (Belgique) pour pyroséquençage de la région V2, V3 et V4 du gène ribosomique 16S. Les ARN n'ont pas été traités dans cette étude.

ANALYSES STATISTIQUES

Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse multivariée des différents résultats obtenus afin d'identifier les corrélations entre les différentes variables étudiées. Ensuite, nous avons réalisé des ANOVA croisées sur les différentes variables afin de déterminer l'effet des différents traitements. Pour réaliser ces analyses statistiques, nous avons utilisé le logiciel R version 2.13.1 (The R Foundation for Statistical Computing).

4. RESULTATS

RESPIRATION BASALE DU SOL

En absence de paille, la vitesse de respiration du sol sous tous les traitements suivait la même tendance pendant les sept jours d'incubation (Figure 1A) mais la vitesse de respiration du sol des microcosmes contrôle (CT) est restée inférieure à celles des sols sous les trois autres traitements. Elle a atteint une vitesse maximale après un jour d'incubation avec des vitesses moyennes respectives de $1,0067 \pm 0,0139 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$, de $1,5981 \pm 0,053 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$, de $1,8743 \pm 0,0661 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$ et de $1,8260 \pm 0,0426 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$ pour les microcosmes contrôle (CT), ceux amendés en NH₄ (CNT), ceux amendés en phosphore (CPT) et ceux amendés en NH₄ et phosphore (CNPT) respectivement. En apportant de l'azote minéral et/ou du phosphore dans nos microcosmes la cinétique de respiration du sol a été significativement accélérée voire doublée après un jour d'incubation. Cette accélération de la respiration du sol semble plus importante dans les microcosmes auxquels du P_i a été apporté. En présence de paille (Figure 1C), la respiration du sol a été calculée en retranchant la minéralisation de la paille mesurée par IRMS à la mesure du CO₂ total des microcosmes avec paille. Ainsi, ces respirations calculées du sol ont atteint une vitesse maximale après trois jours d'incubation, avec des valeurs moyennes de $1,001 \pm 0,0387 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$, $1,306 \pm 0,0326 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$, $1,5838 \pm 0,0188 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$ et $1,5748 \pm 0,0780 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$ pour les microcosmes non ST, SNT, SNPT. A sept jours d'incubation, on a observé grâce à une ACP, une très forte corrélation positive entre la respiration du sol et l'apport de phosphore (p-value < 0,001) et une ANOVA croisée a permis de mettre en évidence un effet significatif de l'apport croisé de NH₄ et de phosphore avec une p-value < 0,001 (Tableau 3).

MINERALISATION DE LA PAILLE

Dans les microcosmes avec paille, la minéralisation de la paille suivait la même tendance dans tous les microcosmes et a atteint après un jour d'incubation une vitesse maximale comprise entre $6,87 \pm 0,05 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$ et $7,50 \pm 0,12 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$ (Figure 1B). A sept jours d'incubation, la minéralisation de la paille dans les microcosmes ST était significativement inférieure aux autres (p-value < 0,05) mais on n'a observé aucune corrélation significative entre la minéralisation de la paille et l'apport de NH₄ ou de phosphore (Tableau 3).

DETERMINATION DU PRIMING EFFECT (PE)

Le Priming Effect (PE) est obtenu par la soustraction de la respiration basale du sol, mesurée dans les microcosmes sans paille, et de la minéralisation de la paille, mesurée par IRMS, à la mesure du CO₂ total des microcosmes avec paille (Figure 1D). Jusqu'à 7 jours, la vitesse du PE que nous avons mesuré a oscillé entre

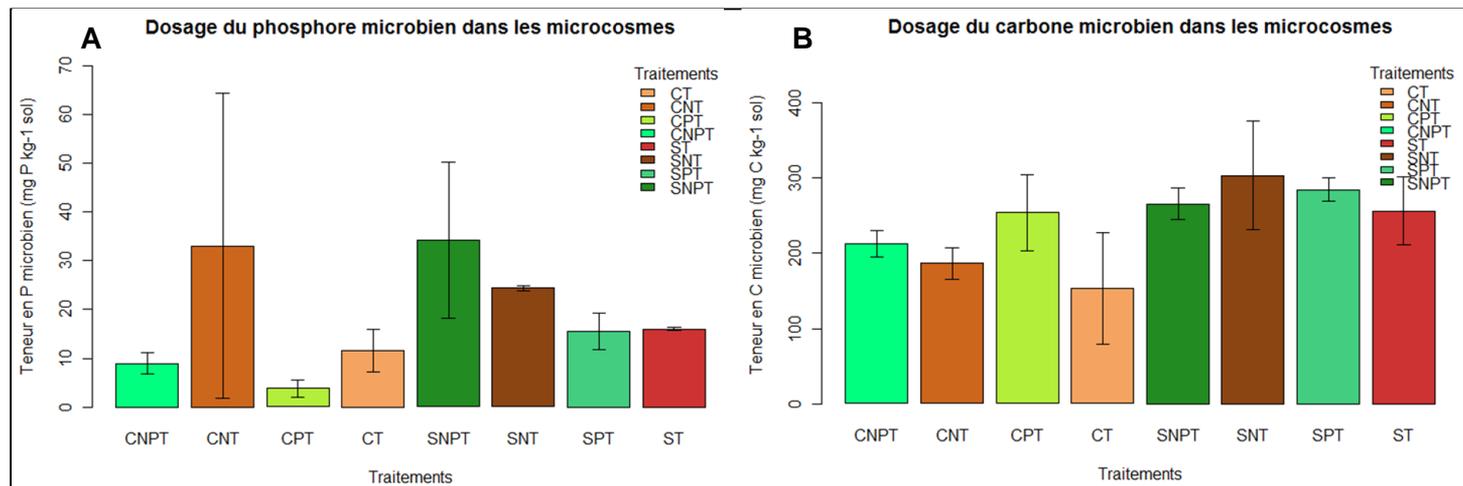


Figure 2: Teneurs en phosphore et carbone microbien obtenues après 7 jours d'incubation

CT : control traitement

..N.. : traitement + nitrogen

ST : Straw traitement

..P.. : traitement + phosphorus

2A : dosage du phosphore microbien par la méthode de fumigation-extraction avec résines échangeuses d'anions

2B : dosage du carbone microbien par la méthode de fumigation-extraction

Tableau 4 : Tableau de valeur des paramètres mesurés du sol

La teneur en phosphore disponible est obtenue lors de la détermination de la teneur en phosphore microbien par extraction-fumigation avec résines échangeuse d'anions.

La teneur en carbone disponibles est obtenue lors de la détermination de la biomasse microbienne du sol par extraction-fumigation.

Traitement	Phosphore disponible		Carbone disponible		Teneur en NH4		Teneur NO3	
	mg P kg ⁻¹ sol		mg C kg ⁻¹ sol		mg g ⁻¹ sol		mg g ⁻¹ sol	
CT	0,5288	± 0,0682	213,6229	± 0,8827	0,0028	± 0,0001	0,0025	± 0,0001
CNT	0,3484	± 0,0364	180,1363	± 4,0655	0,2225	± 0,0246	0,0033	± 0,0006
CPT	74,2833	± 9,2291	148,3425	± 30,9415	0,0026	± 0,0002	0,0023	± 0,0003
CNPT	57,3944	± 6,5747	186,5231	± 6,9914	0,2213	± 0,0219	0,005	± 0,0002
ST	0,9239	± 0,0744	198,6159	± 12,2056	0,0022	± 8,838 E-05	0,002	± 4,424E-05
SNT	0,5889	± 0,2607	194,6199	± 1,9166	0,1977	± 0,0195	0,017	± 0,0014
SPT	69,4834	± 3,9271	176,1229	± 15,9580	0,0024	± 0,0006	0,0021	± 0,0005
SNPT	59,0823	± 5,2641	210,3249	± 4,2922	0,1945	± 0,0264	0,0185	± 0,0004

Tableau 5 : Résultats des ANOVA croisées des effets des traitements sur les paramètres mesurés

Facteur	P-value des effets des facteurs sur les variables									
	P disponible	P microbien	C disponible	C microbien	ratio C:P sol	ratio C:P microbien	pH eau	pH KCl	NH4 min	NO3 min
Paille	< 1	< 1	< 1	< 0,01	< 1	< 0,1	< 0,05	< 0,001	< 1	< 0,1
NH4	< 1	< 0,05	< 1	< 1	< 1	< 0,1	< 0,001	< 1	< 0,001	< 0,001
Phosphore	< 0,001	< 1	< 0,1	< 1	< 0,001	< 0,05	< 1	< 1	< 1	< 1
Paille x NH4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 0,001
Paille x Phosphore	< 0,05	< 0,1	< 1	< 0,1	< 0,05	< 0,05	< 1	< 0,001	< 1	< 1
NH4 x Phosphore	< 1	< 1	< 0,001	< 1	< 0,1	< 1	< 0,001	< 1	< 1	< 1

des valeurs positives et négatives mais très proches de 0. Il a été négatif après un jour d'incubation ce qui correspondrait à un ralentissement de la minéralisation de la matière organique du sol (MOS), puis a augmenté ensuite et atteint respectivement des valeurs moyennes de $0,143 \pm 0,029 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$, $0,075 \pm 0,058 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$, $0,100 \pm 0,016 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$ et $0,262 \pm 0,115 \mu\text{gC h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{sol sec}$ pour les traitements ST, SNT, SPT et SNPT après trois jours d'incubation. Le PE était à nouveau négatif après sept jours d'incubation pour les traitements sans apport de NH_4 .

TENEUR EN PHOSPHORE ET CARBONE MICROBIEN

Après sept jours d'incubation, les teneurs moyennes en phosphore microbien (P_{mic}) étaient comprises entre $3,83 \pm 1,80 \text{ mgP kg}^{-1}\text{sol sec}$ et $34,19 \pm 16,00 \text{ mgP kg}^{-1}\text{sol sec}$ (Figure 2A). La teneur minimale en P_{mic} a été observée dans les microcosmes amendés en phosphore (CPT) alors que la teneur maximale a été observée dans les microcosmes amendés en paille, phosphore et NH_4 (SNPT). La teneur en P_{mic} était positivement corrélée à l'apport de paille (p-value < 0,01) et à l'apport de NH_4 (p-value < 0,01). Ainsi, l'apport de paille a eu un effet significatif sur la teneur en P_{mic} (p-value < 0,05) mais c'était également le cas de l'apport croisé de paille et de NH_4 (p-value < 0,05 ; Tableau 5). De plus, la teneur en P_{mic} semblait positivement corrélée à la minéralisation de la paille (p-value < 0,001). Cependant, ces corrélations sont différentes si on considère séparément les microcosmes sans et avec paille. Dans les microcosmes sans paille, la teneur en P_{mic} était négativement corrélée à l'apport en phosphore (p-value < 0,01) mais également à la respiration du sol (p-value < 0,01) et à la teneur en P_{disp} (p-value < 0,01). Cependant, la teneur en P_{mic} des microcosmes avec paille présentait une très forte corrélation positive avec l'apport en NH_4 (p-value < 0,001) mais également avec les teneurs en NH_4 et NO_3 minéral (p-values < 0,05).

Après sept jours d'incubation, les teneurs moyennes en carbone microbien (C_{mic}) étaient comprises entre $153,30 \pm 74,65 \text{ mgC kg}^{-1}\text{sol sec}$ sous les microcosmes CT et $303,62 \pm 72,49 \text{ mgC kg}^{-1}\text{sol sec}$ sous les microcosmes SNT (Figure 2B). Le C_{mic} était positivement corrélé à l'apport de paille (p-value < 0,01) et à sa minéralisation (p-value < 0,01) ainsi qu'à la teneur en P_{disp} (p-value < 0,05). Cependant, ces corrélations étaient différentes si on considère séparément les microcosmes avec et sans paille. En ne considérant que les microcosmes sans paille, la teneur en C_{mic} (biomasse microbienne) était positivement corrélée à l'apport de phosphore (p-value < 0,05), à la respiration du sol (p-value < 0,01) et à la teneur en P_{disp} (p-value < 0,01). Dans les microcosmes avec paille, la teneur en C_{mic} ne présentait plus de corrélation significative avec d'autres paramètres mesurés et était sous la seule influence de l'apport de paille (p-value < 0,01).

TENEUR EN AZOTE MINERAL

La teneur en NH_4 minéral était comprise entre $2,832 \cdot 10^{-3} \pm 8,838 \cdot 10^{-5} \text{ mg NH}_4 \text{ g}^{-1}\text{sol sec}$, pour le traitement ST, et $0,23 \pm 0,025 \text{ mg NH}_4 \text{ g}^{-1}\text{sol}$, pour le traitement CNT (Tableau 4). On observe également que seuls les quatre traitements présentant un apport de NH_4 (CNT, CNPT, SNT, SNPT) ont eu une teneur moyenne en NH_4 minéral significativement différente de celle des microcosmes CT ($2,832 \cdot 10^{-3} \pm 0,139 \cdot 10^{-3} \text{ mg NH}_4 \text{ g}^{-1}\text{sol sec}$) avec une p-value < 0,001. En effet, l'apport de NH_4 était la seule modalité de traitement à avoir un effet significatif sur la teneur en NH_4 minéral. La teneur en NO_3 minéral était, quant à elle, comprise entre $1,907 \cdot 10^{-3} \pm 5,006 \cdot 10^{-5} \text{ mg NO}_3 \text{ g}^{-1}\text{sol sec}$, pour le traitement ST, et $0,018 \pm 0,405 \cdot 10^{-3} \text{ mg NO}_3 \text{ g}^{-1}\text{sol sec}$, pour le traitement SNPT (Tableau 5) et était positivement corrélée à l'apport de NH_4 (p-values < 0,001). En plus, de l'effet significatif de l'apport de NH_4 , l'apport croisé de paille et de NH_4 a eu un effet significatif sur la teneur en NO_3 (p-value < 0,001). Ainsi, dans les microcosmes avec paille, les apports croisés de paille et d'azote (SNT, $0,017 \pm 1,361 \cdot 10^{-3} \text{ mg NO}_3 \text{ g}^{-1}\text{sol sec}$) et les apports croisés de paille, d'azote et de phosphore (SNPT, $0,018 \pm 0,405 \cdot 10^{-3} \text{ mg NO}_3 \text{ g}^{-1}\text{sol sec}$) ont significativement augmenté la teneur en NO_3 minéral par rapport à celle du traitement contrôle (CT) avec des p-value < 0,001. Ces traitements ont favorisé une activité nitrifiante dans nos microcosmes. Les teneurs en NH_4 et NO_3 minéral étaient également négativement corrélées au pH traduisant l'acidité active de la solution du sol (p-value < 0,001). Dans les microcosmes avec paille, les teneurs en NH_4 et NO_3 minéral étaient positivement corrélées à la teneur en P_{mic} (p-values < 0,05)

Tableau 6 : Tableau de valeurs des paramètres calculés du sol et du pH

Le pH de la solution du sol reflète l'acidité active du sol alors que le pH du sol reflète l'acidité totale du sol.

Le ratio C:P du sol est calculé à partir des teneurs en phosphore et carbone disponible.

Traitement	pH solution		pH sol		C:P sol		C:P microbien	
CT	5,45	± 0,02	4,46	± 0,006	408,3622	± 50,9515	15,7739	± 11,0992
CNT	5,43	± 0,04	4,48	± 0,006	497,5749	± 67,2584	8,7961	± 5,078
CPT	5,74	±0,01	4,48	± 0,01	2,0191	± 0,5220	75,2684	± 30,1805
CNPT	5,34	± 0,02	4,52	± 0,006	3,2793	± 0,4091	24,7446	± 5,5283
ST	5,66	± 0,05	4,65	± 0,03	215,5501	± 15,1730	16,0680	± 3,0868
SNT	5,57	± 0,03	4,66	± 0,006	369,8111	± 133,4015	12,4127	± 2,6775
SPT	6,04	± 0,05	4,85	± 0,02	2,5468	± 0,3460	19,1065	± 5,0866
SNPT	5,46	± 0,02	4,77	± 0,03	3,5818	± 0,3699	8,7254	±3,029

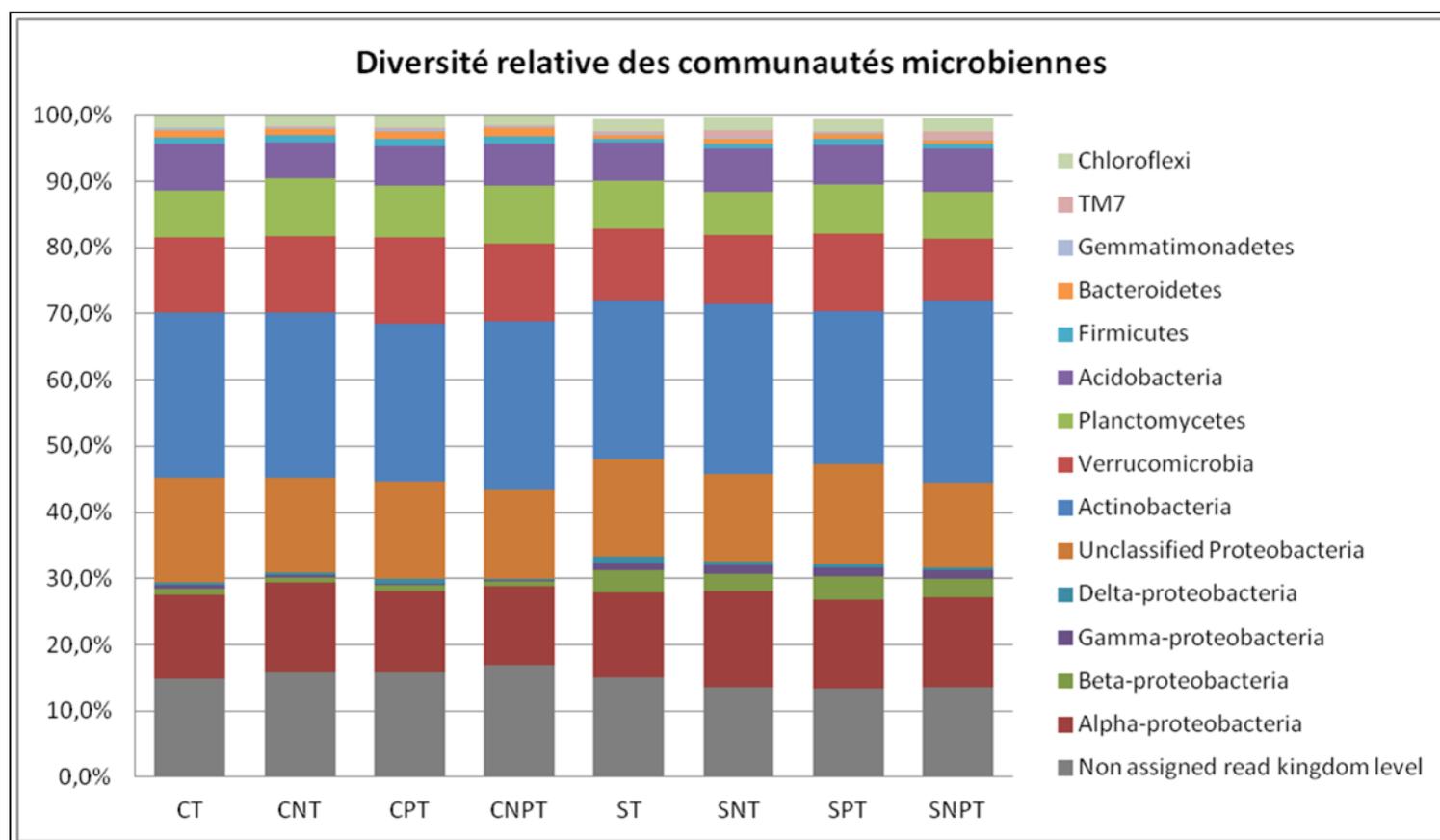


Figure 3: Abondance relative des phyla au sein des communautés microbiennes des microcosmes

TENEUR EN PHOSPHORE ET CARBONE DISPONIBLE

Après sept jours d'incubation, les teneurs moyennes en phosphore disponible (P_{disp}) étaient comprises entre $0,3484 \pm 0,0364 \text{ mgP kg}^{-1} \text{ sol sec}$, dans les microcosmes CNT, et $74,2833 \pm 9,2291 \text{ mgP kg}^{-1} \text{ sol sec}$, dans les microcosmes CPT (Tableau 5). Que ce soit en présence ou absence de paille, on a constaté une très grande différence significative entre les teneurs en P_{disp} des microcosmes amendés en phosphore et amendés en NH_4 et phosphore (respectivement $74,2833 \pm 9,2291 \text{ mgP kg}^{-1} \text{ sol sec}$, $57,3944 \pm 6,6747 \text{ mgP kg}^{-1} \text{ sol sec}$, $69,4834 \pm 3,9271 \text{ mgP kg}^{-1} \text{ sol sec}$ et $59,0823 \pm 5,2641 \text{ mgP kg}^{-1} \text{ sol sec}$ pour CPT, CNPT, SPT, SNPT) et celles des microcosmes non amendés en phosphore (respectivement $0,5288 \pm 0,0682 \text{ mgP kg}^{-1} \text{ sol sec}$, $0,3484 \pm 0,0364 \text{ mgP kg}^{-1} \text{ sol sec}$, $0,9239 \pm 0,0744 \text{ mgP kg}^{-1} \text{ sol sec}$ et $0,5889 \pm 0,2607 \text{ mgP kg}^{-1} \text{ sol sec}$ pour CT, CNT, ST et SNT) avec des p -value $< 0,001$. En plus de l'apport en phosphore, l'apport croisé de paille et de phosphore a eu un effet significatif sur la teneur en P_{disp} . Ainsi, les teneurs moyennes en P_{disp} des microcosmes CNPT et SNPT n'étaient pas significativement différentes entre elles mais étaient significativement inférieures aux teneurs moyennes des microcosmes CPT et SPT avec des p -value comprises entre 0,05 et 0,001.

Les teneurs moyennes en carbone disponible (C_{disp}) étaient comprises entre $213,6230 \pm 0,8827 \text{ mgC kg}^{-1} \text{ sol}$, pour les microcosmes CT, et $148,3425 \pm 30,9415 \text{ mgC kg}^{-1} \text{ sol}$ pour les microcosmes CPT (Tableau 4). Seul l'apport de phosphore était corrélé à la teneur moyenne en C_{disp} et la même tendance était observée en présence ou non de paille. L'apport de phosphore était négativement corrélé à la teneur moyenne en carbone disponible. Ainsi, avec l'apport de phosphore, la teneur en C_{disp} a atteint les valeurs minimales et les teneurs augmentent par rapport à ces valeurs minimales avec l'apport de NH_4 et l'apport croisé de NH_4 et phosphore.

VALEUR DU pH DE LA SOLUTION DU SOL (D'ACIDITE ACTIVE) ET DU SOL (ACIDITE TOTALE)

Les valeurs moyennes d'acidité active de la solution des sols de nos microcosmes sont comprises entre $5,34 \pm 0,02$, pour les microcosmes CNPT, et $6,04 \pm 0,05$, pour les SPT (Tableau 6). Le pH traduisant cette acidité active est positivement corrélé à l'apport de paille (p -value $< 0,05$) mais est également négativement corrélée à l'apport de NH_4 (p -value $< 0,001$). En plus des effets significatifs des apports de paille ou de NH_4 , l'apport croisé de NH_4 et de phosphore a également un effet significatif sur l'acidité active de la solution du sol.

Les valeurs moyennes d'acidité totale, comprises entre $4,46, \pm 0,006$ (CT) et $4,85 \pm 0,025$ (SPT), ne suivent pas les mêmes tendances (Tableau 6). Le pH traduisant cette acidité totale est positivement corrélé à l'apport de paille (p -value $< 0,001$) et, en plus de cet effet significatif, l'apport croisé de paille et de phosphore a un effet significatif sur l'acidité totale (p -value $< 0,001$). En effet, en absence de paille, il existe une corrélation positive entre le pH traduisant l'acidité totale du sol et l'apport de phosphore (p -value $< 0,05$). En présence de paille, les valeurs de pH le pH traduisant l'acidité totale du sol est positivement corrélé à la respiration du sol (p -value $< 0,05$) et à la teneur en P_{disp} (p -value $< 0,01$).

RATIO C:P

A partir des teneurs en C_{disp} , P_{disp} , C_{mic} et P_{mic} , nous avons pu calculer les ratios molaire C:P du sol et de la biomasse microbienne (Tableau 6). Pour le calcul du ratio C:P du sol, nous avons utilisé la teneur en carbone total dissout mesurée dans les échantillons non fumigés lors de la détermination de la biomasse microbienne par fumigation-extraction. La teneur en phosphore disponible a été mesurée dans les échantillons non fumigés lors de la détermination de la teneur en phosphore microbien. Le ratio molaire C:P du sol avec ou sans paille suis la même tendance. L'apport de NH_4 entraîne une augmentation du ratio alors que l'apport de phosphore entraîne sa diminution.

COMPOSITION DES COMMUNAUTES BACTERIENNES

Les effets des apports de paille, NH_4 et phosphore sur la communauté bactérienne a été observée. Pour les traitements contrôle (CT), environ 15% des séquences n'ont pas pu être classées après le niveau de règne. Ce pourcentage a significativement augmenté dans les microcosmes CNPT mais a significativement diminué dans les microcosmes avec paille. L'apport croisé de paille et de phosphore a également entraîné une baisse significative de ce pourcentage. Quatorze phyla ont été identifiés à partir des autres séquences extraites mais seulement huit avaient une abondance relative supérieure à 1% dans tous les microcosmes (Figure 3).

Tableau 7 : Tableau de corrélation des variables mesurées avec toutes les modalités de traitement

	coefficient de corrélation des variables								
	min. paille	sol.CO2	C mic	P mic	P disp	pH eau	pH KCl	n. NH4	n.NO3
min. paille	1,0000								
sol.CO2	-0,2388	1,0000							
C mic	0,6166	0,0409	1,0000						
P mic	0,6514	-0,2930	0,2948	1,0000					
P disp	0,1676	0,5520	0,4680	-0,3849	1,0000				
pH eau	0,4063	-0,0700	0,6108	0,0030	0,5162	1,0000			
pH KCl	0,8737	-0,0597	0,6001	0,4720	0,3599	0,3955	1,0000		
n. NH4	-0,1617	0,3417	-0,3817	0,1478	-0,4123	-0,7683	-0,1395	1,0000	
n.NO3	0,2041	0,3139	-0,0252	0,4356	-0,2601	-0,5760	0,0989	0,7740	1,0000
non classées	-0,7025	0,2504	-0,4104	-0,4678	-0,0892	-0,4350	-0,5666	0,2261	-0,1252
<i>α-Proteobacteria</i>	0,5729	-0,3209	0,4104	0,5739	-0,1805	0,1805	0,3822	-0,0452	0,1104
<i>β-Proteobacteria</i>	0,7592	-0,3913	0,6991	0,4513	0,2601	0,7040	0,7138	-0,5610	-0,2974
<i>γ-Proteobacteria</i>	0,8475	-0,4861	0,5183	0,7287	-0,1287	0,2158	0,6685	-0,0870	0,2243
<i>δ-Proteobacteria</i>	0,1980	-0,3243	0,4817	-0,0409	0,2066	0,8405	0,1608	-0,7556	-0,7061
<i>Un.Proteobacteria</i>	-0,1951	-0,0956	0,0739	-0,1930	0,1057	0,3171	-0,2733	-0,4043	-0,4956
<i>Actinobacteria</i>	0,1417	0,1148	0,1026	0,3983	-0,1801	-0,4007	0,0161	0,4400	0,5609
<i>Verrucomicrobia</i>	-0,2286	0,1635	0,0497	-0,2991	0,1866	0,0700	-0,2149	-0,1252	-0,2870
<i>Planctomycetes</i>	-0,4442	0,3652	-0,1365	-0,2165	0,0661	-0,2036	-0,2946	0,2061	-0,1243
<i>Acidobacteria</i>	0,1598	-0,1443	0,1374	0,1565	0,0174	-0,1510	-0,0288	0,0374	0,2217
<i>Firmicutes</i>	-0,7044	0,5070	-0,4121	-0,5913	0,0983	-0,3370	-0,6529	0,2800	-0,0026
<i>Bacteroidetes</i>	0,4302	-0,0296	0,4826	0,0930	0,3640	0,3372	0,3870	-0,3365	-0,1861
<i>Gemmatimonadetes</i>	-0,2834	-0,1340	-0,0470	-0,0513	-0,1592	0,0283	-0,4733	-0,1556	-0,1443
<i>TM7</i>	0,8503	-0,2939	0,5017	0,7748	-0,1057	0,0552	0,7766	0,1287	0,4243
<i>Chloroflexi</i>	-0,2425	0,1261	-0,1278	-0,1009	-0,1731	0,1605	-0,4938	0,1583	0,1435
	p-value < 0,001		p-value < 0,01		p-value < 0,05				

Les phyla majoritaires dans le traitement CT étaient *Proteobacteria* (30,33%), *Actinobacteria* (24,91%) et *Verrucomicrobia* (11,33%). Les *Proteobacteria* présentes étaient principalement des *Proteobacteria* non répertoriées dans les sous classes et la sous classe dominante était la sous classe α . Nous avons notamment réalisé des ACP sur les modalités de traitement, les paramètres mesurés et les séquences observées (Tableau 7). On a notamment observé une très forte corrélation de la paille avec les *Proteobacteria*. L'apport de paille seul a significativement augmenté l'abondance des α -, β - et γ -*Proteobacteria* dans le sol. Cela a notamment stimulé les *Sphingomodaceae* et *Caulobacteraceae* des α -*Proteobacteria*, les *Sphingobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Burkholderiales* et *Oxalobacteraceae* des β -*Proteobacteria*, et les *Xanthomonadaceae* des γ -*Proteobacteria*. Il y a également eu des corrélations positives entre l'abondance des *Proteobacteria* et la minéralisation de la paille (p-values < 0,01) mais également entre l'abondance des *Proteobacteria* et les teneurs en C_{mic} et P_{mic} (p-values < 0,01). En séparant l'analyse sur les données issues des microcosmes avec ou sans paille respectivement, on a pu observer que les *Actinobacteria* ont présenté une forte corrélation positive avec l'apport de NH_4 mais seulement dans les microcosmes amendés en paille (Tableau 8). Cette corrélation était principalement due aux *Micromonosporaceae*, *lamiaceae* et *Microbacteraceae*. Le troisième phylum majoritaire n'a pas significativement été affecté par les différentes modalités de traitements et ne présentait une très forte corrélation avec le C_{mic} que dans les microcosmes sans paille (p-value < 0,01 ; Tableau 7). Les *Planctomycetes*, représentant environ 7,17 % de la communauté bactérienne détectée dans les microcosmes CT, présentait une corrélation négative avec l'apport de paille (Tableau 9) et l'apport croisé de paille et de NH_4 avait un effet significatif sur leur abondance (AnnexeVII). Les *Planctomycetes* présentaient également une corrélation positive avec la teneur en NO_3 . Les *Ktedonobacteraceae* du phylum des *Chloroflexi*, représentant 2,19% de la communauté bactérienne détectée dans les microcosmes CT, présentait une corrélation négative avec l'apport de paille mais ne présentait aucune corrélation avec les autres paramètres mesurés. L'apport de paille seul et l'apport croisé de paille et de NH_4 ont eu des effets significatifs sur leur abondance (p-value < 0,05). Enfin, les *Firmicutes*, des familles *Bacillaceae* et *Paenibacillaceae* détectées dans nos microcosmes, étaient négativement corrélés à l'apport de paille (p-value < 0,001) et seul l'apport de paille a eu un effet significatif sur leur abondance. Les *Firmicutes* présentaient également des corrélations négatives avec la minéralisation de la paille (p-value < 0,001), le P_{mic} (p-value < 0,01) et le C_{mic} (p-value < 0,05). Ils présentaient également une corrélation positive avec la respiration du sol. Cependant, en séparant les paramètres mesurés en fonction de l'apport de paille, les *Firmicutes* étaient positivement corrélés à la teneur en C_{mic} (p-value < 0,01) en absence de paille mais ne présentaient plus de corrélation significative en présence de paille (Tableau 8 et 9). Cependant, l'apport de phosphore seul n'a pas eu d'effet significatif sur la structure de la communauté microbienne.

5. DISCUSSION

(H1) LA TENEUR EN P_i DU SOL CONTROLE NEGATIVEMENT L'INTENSITE DU PE GENERE PAR UN APPORT DE CARBONE (C) FRAIS RICHE EN ENERGIE ET ISSU DE PAILLE DE BLE

Cette hypothèse était l'hypothèse principale qui conduisait le pourquoi de notre étude. Pour la tester, nous avons fait varier la teneur en éléments minéraux exploitables par les micro-organismes afin de lever le voile sur le contrôle du priming effect (PE). En apportant de la paille de blé riche en C, les contraintes énergétiques devrait être levée et permettre la sur-minéralisation de la MOS (Kuzyakov *et al.*, 2000). Comme le phosphore inorganique et disponible est limité dans les ferralsols, notre première hypothèse était qu'en apportant de l'énergie aux micro-organismes, ceux-ci pourraient prélever le P qui leur est nécessaire dans la MOS. Ainsi l'apport de paille seul entrainerait un PE positif et l'apport conjoint de paille et P devrait, à l'inverse, limiter ce PE voire le supprimer. Cependant, ce n'est pas ce qui a pu être observé dans nos microcosmes. L'ajout de paille n'a pas stimulé la cinétique de la respiration du sol qui n'est devenue que très légèrement supérieure à celle observée dans les microcosmes sans paille et seulement au troisième jour d'incubation. Cependant, le PE est, pour chaque traitement, resté inférieur à $0,3 \mu g C g^{-1} sol$ et seulement à cette date. A l'inverse de ce que l'on attendait, le PE observé a été négatif les trois premiers jours d'incubation, ce qui peut s'expliquer par un changement de substrat des espèces qui dégradait initialement la MOS et qui sont passé sur la paille

Tableau 8 : Tableau de corrélation des variables mesurées dans les microcosmes avec paille

	coefficient de corrélation des variables									
	min.paille	sol.CO2	C mic	P mic	P disp	pH eau	pH KCl	n. NH4	n.NO3	
min.paille	1,0000									
sol.CO2	0,5245	1,0000								
C mic	-0,1748	0,1468	1,0000							
P mic	0,4336	0,3356	-0,0699	1,0000						
P disp	0,2242	0,6270	0,1366	-0,3327	1,0000					
pH eau	-0,2657	-0,3846	0,1329	0,7413	0,3818	1,0000				
pH KCl	0,5213	0,6409	-0,0704	-0,1761	0,7831	0,2887	1,0000			
n. NH4	0,3357	0,3776	-0,1049	0,6503	-0,3748	-0,8252	-0,2465	1,0000		
n.NO3	0,3916	0,5804	0,0350	0,7343	-0,2137	-0,9231	-0,0986	0,8322	1,0000	
non classées	-0,2028	-0,5175	-0,5245	-0,1468	-0,3118	-0,0560	-0,4437	-0,0769	-0,2447	
<i>α-Proteobacteria</i>	0,4475	0,0280	-0,1188	0,0759	-0,0595	-0,0909	-0,0352	0,2797	0,0000	
<i>β-Proteobacteria</i>	-0,3287	-0,1818	-0,0489	-0,7063	0,5289	0,7343	0,2394	-0,6503	-0,7343	
<i>γ-Proteobacteria</i>	0,3357	0,0070	-0,3007	0,4685	-0,4063	-0,5594	-0,3380	0,5664	0,3846	
<i>δ-Proteobacteria</i>	-0,5594	-0,7762	-0,0210	-0,7133	-0,0420	0,7622	-0,2535	-0,7482	-0,8461	
<i>Un.Proteobacteria</i>	-0,1329	-0,2168	0,0350	-0,4126	0,2802	0,6014	0,0493	-0,4475	-0,5524	
<i>Actinobacteria</i>	0,2517	0,3566	-0,2587	0,6434	-0,1681	-0,7342	-0,2465	0,6853	0,6433	
<i>Verrucomicrobia</i>	0,1188	-0,3147	-0,1538	-0,3427	0,0911	0,3986	-0,0211	-0,3566	-0,4755	
<i>Planctomycetes</i>	-0,0489	-0,0230	-0,0559	-0,1119	0,2942	0,3077	-0,0141	-0,2308	-0,2797	
<i>Acidobacteria</i>	0,2587	0,3427	-0,0280	0,4685	0,0525	-0,3357	-0,1338	0,5175	0,3357	
<i>Firmicutes</i>	0,5175	0,3466	0,1468	0,1189	0,3012	0,2098	0,3451	0,1678	-0,0140	
<i>Bacteroidetes</i>	0,2797	-0,0140	-0,1259	-0,2308	0,3152	0,2168	0,1408	-0,3007	-0,2657	
<i>Gemmatimonadetes</i>	-0,2867	-0,2378	-0,2867	0,2028	-0,3152	0,2447	-0,5563	0,2657	0,0699	
<i>TM7</i>	0,3566	0,2518	-0,2587	0,7482	-0,4448	-0,8881	-0,3310	0,8112	0,7482	
<i>Chloroflexi</i>	0,5175	0,0909	-0,1119	0,4336	-0,2837	-0,3776	-0,1549	0,5175	0,2867	
		p-value < 0,001		p-value < 0,01		p-value < 0,05				

(Kuzyakov et al., 2000). Nous n'avons ainsi pu observer de PE positif conséquent durant cette étude, et nous n'avons pas pu valider notre hypothèse principale H1. En conséquence, nous avons dû revisiter nos hypothèses de travail, car nous n'avons pas pris en compte l'hypothèse H0 qui n'a pas été vérifiée et qui était : l'apport en C frais doit stimuler positivement la minéralisation de la matière organique du sol. Pourtant, quelques années plus tôt, le même sol prélevé à la même saison avait montré un fort priming effect positif généré par la même paille (Bernard et al., 2012). Il arrive que les espèces en présence qui décomposent la MOS n'aient pas accès à la MOF pour des raisons de compétition avec celles qui décomposent cette dernière (Fontaine et al., 2003). En conséquences, la minéralisation de la paille et la minéralisation de la MOS sont découplées et régies par différents contrôles (Fontaine et al., 2003; Ekschmitt et al., 2005). Si cette hypothèse est vraie, en comparant nos données sur la composition bactérienne de nos communautés avec celles obtenues lors de travaux antérieurs, nous devrions voir se dégager des relations entre la présence de certaines populations et l'intensité du priming effect. Ce qui signifierait que dans la hiérarchie des déterminants du priming effect, la composition des communautés microbiennes, principaux acteurs de ce processus, prédominerait sur la carence en nutriments, et donc sur les facteurs abiotiques.

(H2) L'INTENSITE DU PRIMING EFFECT PEUT ETRE CORRELEE A LA PROPORTION DE CERTAINES POPULATIONS

Pour tester cette hypothèse, nous avons donc réalisé une analyse en composante principale avec nos valeurs de respirations microbiennes (vitesse de respiration du sol, de minéralisation de la paille ainsi que du priming effect) et nos données phylogénétiques (des traitements avec paille) à des données similaires obtenues depuis 2009 sur les sols de Lazaina, mais également sur d'autres sols de Madagascar (Annexe VIII et IX).

Une première analyse en composantes principales (Annexe X) a montré que la respiration basale du sol est positivement corrélée (p-value < 0,05) à la minéralisation de la paille et au priming effect (PE). La minéralisation de la paille présente une corrélation positive (p-value < 0,05) à la présence d'*Actinobacteria* et de *Firmicutes* et une corrélation négative (p-value < 0,05) à la présence d'*Acidobacteria* et de séquences non attribuées à des phyla connus. La plus grande partie de la diversité microbienne du sol correspond à des organismes non décrits et en apportant de la paille riche en C, nous avons favorisé la croissance des micro-organismes connus pour être des décomposeurs. Les *Actinobacteria* comportent des bactéries capable de produire des enzymes et exo-enzymes pouvant dégrader la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (de Boer et al., 2005). Les *Firmicutes* comportent eux aussi de nombreuses espèces ayant une activité cellulolytique et la capacité de dégrader une grande variété de protéines et composés carbonés et même retrouvé dans le tube digestif humain. Les *Firmicutes* et notamment les genres *Bacillus* et *Paenibacillus*, sont aussi connues pour dégrader le phytate qui est une des formes de P organique très importante dans le sol et que peu d'organismes arrivent à décomposer (Jonquera et al., 2011). Le PE était d'ailleurs positivement corrélé (p-value < 0,05) à la présence de *Firmicutes*. Les *Firmicutes* peuvent donc tirer leur énergie de la paille pour décomposer le phytate et libérer ainsi le P nécessaire à leur croissance. Les Actinobactéries étaient aussi corrélées au PE. En plus de leur capacité à dégrader les composés polymérisés ce phylum comprend de nombreuses espèces filamenteuses. Cette forme qui leur a valu historiquement d'être confondues avec des champignons (Actinomycètes), leur confère l'avantage de pouvoir être facilement en contact avec deux substrats en même temps. Elles peuvent ainsi tirer l'énergie de l'un et les nutriments de l'autre. A l'inverse, le PE était négativement corrélé (p-value < 0,05) à la présence de *Verrucomicrobia* qui avaient justement une proportion très fortes dans nos échantillons contrairement aux données antérieures sur le même sol. Malheureusement, si les *Verrucomicrobia* sont ubiquistes et retrouvées dans de nombreux sols (Bergmann et al., 2011), on sait peu de choses de ces bactéries car celles-ci sont difficilement cultivables. Dans un second temps, nous avons regroupé dans un premier groupement (G1) les phyla présentant une corrélation positive avec le PE même non significative individuellement, c'est-à-dire les *Actinobacteria*, *Firmicutes* et les TM7. Dans le groupement G2, nous avons rassemblé ceux présentant une corrélation négative avec le PE (*Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* et les séquences non classées). En réalisant une nouvelle analyse en composantes principales, on observe que le groupe G1 est positivement corrélé (p-value < 0,05) à la respiration basale du sol, la minéralisation de la paille et au PE (Annexe X). Cette corrélation entre le groupement G1 et le PE présente un R² de 0,498. Le groupe G2 est, quant à lui,

Tableau 9 : Tableau de corrélation des variables mesurées dans les microcosmes sans paille

	coefficient de corrélation des variables							
	sol.CO2	C mic	P mic	P disp	pH eau	pH KCl	n. NH4	n.NO3
sol.CO2	1,0000							
C mic	0,7133	1,0000						
P mic	-0,6713	-0,4056	1,0000					
P disp	0,7762	0,7133	-0,7692	1,0000				
pH eau	0,2882	0,3199	-0,2847	0,3550	1,0000			
pH KCl	0,5204	0,2159	-0,2230	0,2018	-0,5160	1,0000		
n. NH4	-0,2028	-0,4266	0,2867	-0,5524	-0,8260	0,5841	1,0000	
n.NO3	-0,0070	-0,0629	0,2727	-0,2098	-0,7874	0,6124	0,7343	1,0000
non classées	0,4126	0,4755	-0,0699	0,1818	-0,4253	0,6584	0,4196	0,5105
<i>α-Proteobacteria</i>	-0,2308	0,2727	0,3986	-0,3916	0,0667	0,2266	0,0769	-0,0699
<i>β-Proteobacteria</i>	0,0280	0,4755	-0,0699	0,1189	0,7030	-0,5593	-0,6014	-0,6294
<i>γ-Proteobacteria</i>	-0,6153	-0,0699	0,5245	-0,5315	-0,2039	-0,3469	0,1468	0,1188
<i>δ-Proteobacteria</i>	0,3566	0,5175	-0,3147	0,2867	0,8717	-0,4036	-0,6294	-0,6853
<i>Un.Proteobacteria</i>	-0,0770	0,5035	0,0000	0,0839	0,4534	-0,4850	-0,4825	-0,4336
<i>Actinobacteria</i>	0,0470	0,4965	0,1678	-0,0419	-0,2671	0,1912	0,2168	0,3070
<i>Verrucomicrobia</i>	0,4266	0,7902	-0,2098	0,3357	0,1124	0,1628	-0,1049	0,0140
<i>Planctomycetes</i>	0,2937	0,5175	0,1538	-0,0490	-0,1722	0,3752	0,3147	0,2867
<i>Acidobacteria</i>	-0,3636	0,1259	0,0420	0,0559	-0,1546	-0,3505	-0,2098	0,0000
<i>Firmicutes</i>	0,4266	0,7203	-0,3496	0,4825	-0,1300	0,2832	-0,0559	0,1678
<i>Bacteroidetes</i>	0,4056	0,8042	-0,3287	0,4545	0,1581	0,0779	-0,2517	-0,9090
<i>Gemmatimonadetes</i>	-0,1818	0,3496	-0,0070	0,0210	0,5167	-0,6053	-0,5225	-0,5664
<i>TM7</i>	-0,2098	-0,1189	0,5245	-0,4825	-0,7768	0,5239	0,7972	0,7832
<i>Chloroflexi</i>	-0,0770	0,5035	0,0000	0,0839	0,4534	-0,4850	-0,4825	-0,4336
		p-value < 0,001	p-value < 0,01		p-value < 0,05			

négativement corrélé (p -value < 0,05) au PE avec un R^2 de 0,4238. Nous avons ensuite calculé le ratio G1/G2 et nous avons pu établir une relation positive avec le PE à un R^2 de 0,5211. L'équation de la droite de régression nous indique qu'un ratio G1/G2 supérieur à 0,4 pourrait correspondrait à un PE positif. Il semble donc que nous ayons vérifié notre hypothèse H2 corrélant l'intensité du PE avec la proportion de certaines population. Toutefois, cette relation doit être vérifiée dans les projets futurs sur un plus grand nombre de données. De plus, nous avons établi cette relation sur les données phylogénétiques analysées après 7 jours d'incubation. Or si nous voulons définir un véritable bio-indicateur du priming effect, il nous faudrait établir une relation entre l'intensité du priming effect et la structure des communautés au moment du prélèvement.

(H3) LA STOECHIMETRIE DES ELEMENTS MINERAUX DU SOL CONTROLE LA BIOMASSE ET L'ACTIVITE MICROBIENNE DONT LE NUTRIMENT LIMITANT EST LE PHOSPHORE

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si les relations stœchiométriques entre les microorganismes et leur milieu régissent leur activité et leur biomasse Et dans un deuxième temps, nous avons voulu voir si ces relations stœchiométriques pouvaient expliquer plus particulièrement cette absence de PE dans notre expérience.

Il est apparu que, comme nous l'attendions, l'apport de P_i a entraîné l'augmentation de la minéralisation d'une fraction de la matière organique du sol MOS, ainsi qu'une forte augmentation de la biomasse microbienne. Par contre, l'apport de N minéral n'a entraîné qu'une augmentation de la minéralisation sans générer de croissance. De plus, l'apport simultané des deux éléments n'a pas eu d'effet additif. Nous avons donc vérifié que le P est donc bien l'élément principalement limitant dans la dégradation et l'évolution des MOS dans les ferralsols tropicaux. Nous suspectons que la fraction dont la minéralisation a été le plus stimulée est la fraction la moins évoluée dans le sol, c'est à dire celle qui correspond aux débris végétaux fins que nous n'avons pas pu retirer manuellement. En effet, la matière organique la moins évoluée est plutôt riche en carbone et donc en énergie et plutôt pauvre en N et P (Fontaine et al. 2003). Nous avons aussi observé une diminution importante de la teneur en P_{mic} par rapport aux microcosmes CT. Cela implique que, dans ces sols, la diminution du ratio C:P du sol entraîne une forte augmentation du ratio C:P microbien, atteignant des valeurs caractéristiques des prairies non carencées en P enregistrées dans la littérature (Cleveland and Liptzin, 2007), et traduisant une baisse du stockage de P dans la biomasse microbienne. Deux hypothèses peuvent être envisagées. La première est que l'apport en P a modifié la composition des communautés et favorisé les espèces utilisant rapidement le phosphore pour produire plus de biomasse sans réaliser de stockage en prévision de conditions défavorables, c'est-à-dire les stratégies r (Smit *et al.*, 2001). Cependant, nous n'avons pas observé de changements importants dans la structure des communautés sous l'effet de l'apport en P_i . L'hypothèse la plus plausible est donc que nous avons généré un changement rapide d'état physiologique chez les espèces présentes. Ces résultats nous permettent donc de valider de façon globale l'hypothèse H3.

L'apport de paille a stimulé la croissance microbienne sans influencer significativement le ratio C:P des microorganismes, mais en changeant significativement la structure des communautés. Les organismes stimulés appartenaient majoritairement aux protéobactéries qui sont connues pour faire partie des stratégie-r (Fierer *et al.*, 2007). Les stratégies r présentent des fortes activités cellulaires et donc un contenu initial important en ribosome (Klappenbach *et al.*, 2000). C'est sûrement pour cette raison que le ratio C:P microbien n'a pas augmenté avec l'apport de P, comme observé précédemment dans le sol sans apport de paille de blé. D'après l'hypothèse de Fontaine *et al.* (2003), les stratégies r, ne sont pas à l'origine du priming effect, car ils n'ont pas les capacités enzymatiques pour aller décomposer la matière organique plus évoluée et donc plus récalcitrante. De plus, dans le cas présent, la minéralisation de la paille n'a pas du tout été impactée par l'apport en P. Il semble donc que le P ne limitait pas la minéralisation de cette paille, et donc les individus qui dégradent cette paille n'avaient pas de raison de co-métaboliser la MOS évoluée et riche en N et P. Il est donc normal que nous n'ayons pas obtenu de PE généré par la carence en P. Nous avons observé que l'apport de paille générait une petite diminution du N minéral du sol, mais à l'inverse augmentait le P disponible dans le milieu. C'est sûrement pour cette raison que certaines familles des Actinobactéries ont été stimulées par l'effet croisé Paille x NH_4 et non par celui de Paille x P_i . La minéralisation de la paille nécessitait

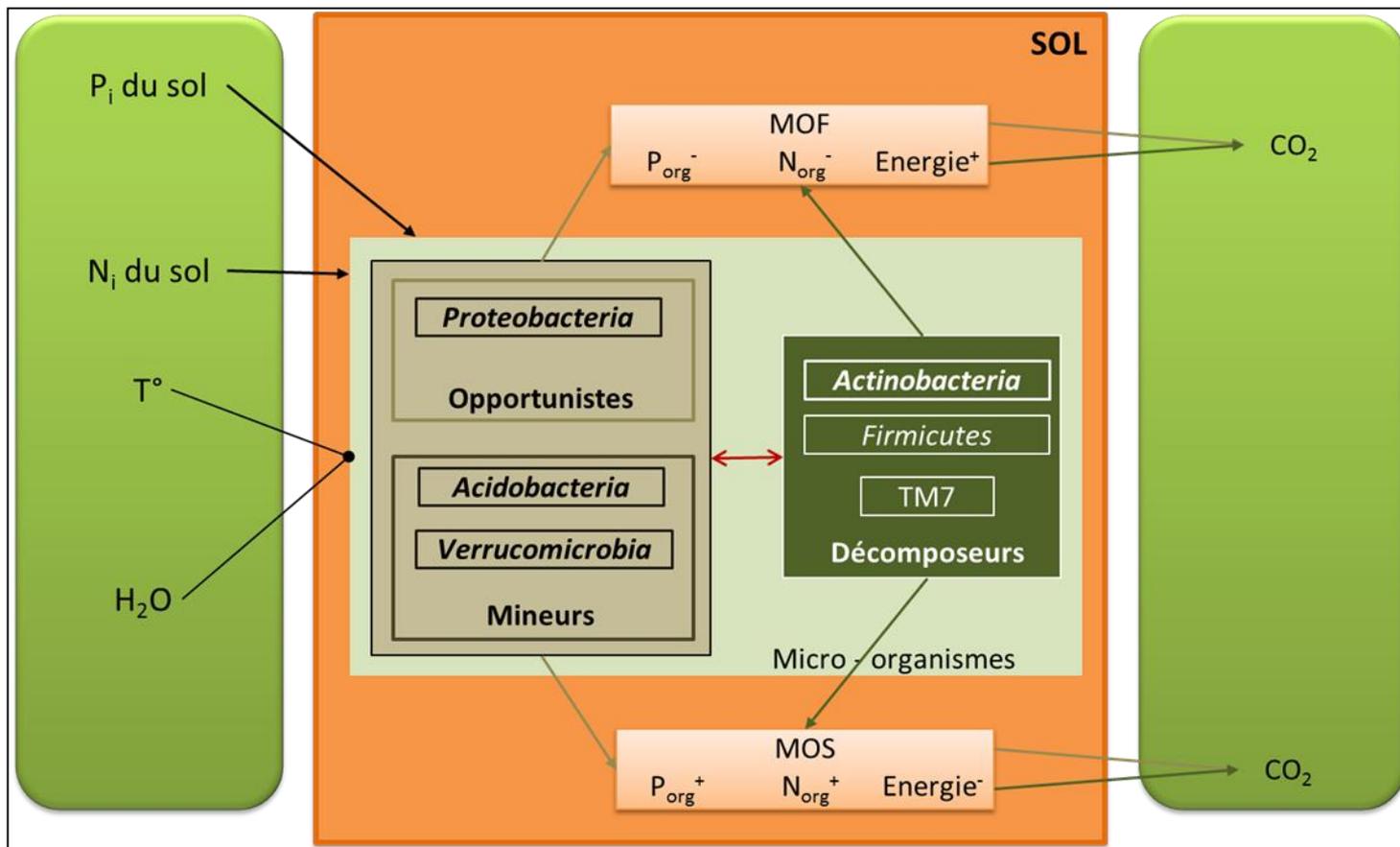


Figure 4: Proposition d'un schéma conceptuel sur les processus de générations du priming effect dans les sols malgaches

donc quand même un faible apport de N dans le milieu. On peut d'ailleurs voir qu'à 7 jours d'incubation, celle-ci commence à être limitée par l'azote dans les microcosmes sans apport de NH_4 . De plus, l'apport de N en présence de paille a pour effet de diminuer le C:P des microorganismes, peut-être par une stimulation de leur activité et donc de leur contenu en ARN. Une première conclusion serait que le facteur qui limite le priming effect est en fait le facteur qui limite la minéralisation de la MOF. Donc, même si le sol est principalement carencé en P, si la MOF est proportionnellement moins riche en N, c'est cet élément qui sera le principal facteur limitant du PE. Il faudrait vérifier cette hypothèse avec différentes qualités des matières organiques fraîches. Toutefois, une première question qui découle de ces observations est : pourquoi le P n'était pas limitant dans la minéralisation du résidu que nous avons apporté alors qu'il l'était pour les résidus qui étaient déjà présents dans le sol ? Nous n'avons malheureusement pas analysé la teneur en P de la paille, partant du postulat que son ratio C:P était forcément supérieur à celui des microorganismes. Mais cette paille cultivée dans des conditions spéciales de laboratoire (non limitantes en nutriments) pour son marquage au ^{13}C avait peut-être un ratio C:P beaucoup plus faible qu'attendu. En tout cas son ratio C:P devait être beaucoup plus faible que celui des débris végétaux du sol provenant de plantes ayant elles-mêmes poussé sur un sol carencé. Une deuxième question découle de nos observations : pourquoi la limitation en N de la minéralisation des résidus, même faibles, n'a pas entraîné un léger priming effect ? Nous n'excluons pas la présence d'une autre limitation par un facteur que nous n'avons pas pris en compte dans notre étude. Pour le moment, les relations stœchiométriques n'ont pu que nous donner des réponses partielles à l'absence de PE dans notre étude. Il faudra multiplier les expériences et peut-être réfléchir à d'autres facteurs environnementaux pouvant jouer un rôle important dans ce processus pour arriver à comprendre les mécanismes qui le contrôlent.

6. CONCLUSION

Notre étude nous a permis d'avoir un aperçu des processus microbiologiques impliqués dans la minéralisation de la matière organique dans le sol même sans observer de priming effect. Dans le ferralsol tropical étudié, il semblerait que la minéralisation et l'évolution de la matière organique soit liée à fois à la carence en P et à la structure de la communauté microbienne. Par comparaison avec des études antérieures similaires à la nôtre et réalisées également sur des sols malgaches, nous avons pu séparer les phyla bactériens en deux groupes selon qu'ils soient positivement ou négativement reliés à l'intensité du priming effect généré par la MOF. Un ratio entre ces deux groupes pourrait être un bon indicateur de la capacité d'un sol à déstocker du carbone et recycler des nutriments. Toutefois, il nous reste maintenant à comprendre comment ces organismes sont impliqués dans le processus de génération du PE. Il est fort probable que même si certains phyla font partie du même groupe, ils ne soient pas impliqués de la même façon dans le processus. Par exemple les protéobactéries, appartenant au r-stratèges, peuvent être négativement corrélées au PE car uniquement responsables de la minéralisation de la MOF. A l'inverse, les Acidobactéries, considérées plutôt comme des oligotrophes ou K-stratèges peuvent être négativement corrélées au PE car non responsables de la dégradation de la MOF. Notre hypothèse serait que le groupe G1 pourrait être composé de groupes phylogénétiques ayant les capacités enzymatiques pour attaquer les matières organiques évoluées, mais suffisamment compétitrices pour avoir accès à la matière organique fraîche riche en énergie. Dans une classification des microorganismes proposée par Moorhead & Sinsabaugh (2006) on pourrait dire que le groupe 1 est composé de décomposeurs alors que le groupe 2 serait composé des opportunistes et des mineurs (Figure 4). Le priming effect serait donc généré si les décomposeurs sont en proportion suffisante dans la communauté et la matière organique fraîche pour laquelle ils sont en compétition avec les opportunistes est carencé en un nutriment contenu dans la matière organique évoluée du sol.

Il nous reste à affiner nos hypothèses en à un niveau phylogénétique plus fin et plus proche du niveau fonctionnel, par exemple le niveau famille, que nous avons un peu abordé mais pas encore exploité en détail. Enfin, il nous faut vérifier ces hypothèses sur un plus grand nombre d'échantillons, prélevés dans différents sols et sous différents usages pour mieux comprendre comment le priming effect est généré, et contrôlé et comment il pourrait ainsi servir d'outil dans un contexte d'intensification écologique.

7. **BIBLIOGRAPHIE**

- Agren, G.I., 2010. CLIMATE CHANGE Microbial mitigation. *Nat. Geosci.* 3, 303–304.
- Allen, A.P., Gillooly, J.F., 2009. Towards an integration of ecological stoichiometry and the metabolic theory of ecology to better understand nutrient cycling. *Ecology Letters* 12, 369–384.
- Andriamaniraka, H., Rabearisoa, L., Michellon, R., Moussa, N., Morel, C., 2010. Influence de différents systèmes de culture sur la productivité de sols cultivés des Hautes Terres de Madagascar et conséquences pour le bilan de phosphore. *E. G. S.* 17, 119–130.
- Bergmann, G.T., Bates, S.T., Eilers, K.G., Lauber, C.L., Caporaso, J.G., Walters, W.A., Knight, R., Fierer, N., 2011. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1450–1455.
- Bernard, L., Chapuis-Lardy, L., Razafimbelo, T., Razafindrakoto, M., Pablo, A.-L., Legname, E., Poulain, J., Brûls, T., O'Donohue, M., Brauman, A., Chotte, J.-L., Blanchart, E., 2012. Endogeic earthworms shape bacterial functional communities and affect organic matter mineralization in a tropical soil. *ISME J* 6, 213–222.
- Bernard, L., Maron, P.A., Mougél, C., Nowak, V., Lévêque, J., Marol, C., Balesdent, J., Gibiat, F., Ranjard, L., 2009. Contamination of Soil by Copper Affects the Dynamics, Diversity, and Activity of Soil Bacterial Communities Involved in Wheat Decomposition and Carbon Storage. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7565–7569.
- Bernard, L., Mougél, C., Maron, P.-A., Nowak, V., Lévêque, J., Henault, C., Haichar, F.E.Z., Berge, O., Marol, C., Balesdent, J., Gibiat, F., Lemanceau, P., Ranjard, L., 2007. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ¹³C-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environ. Microbiol.* 9, 752–764.
- Bityutskii, N.P., Maiorov, E.I., Orlova, N.E., 2012. The priming effects induced by earthworm mucus on mineralization and humification of plant residues. *European Journal of Soil Biology* 50, 1–6.
- Blagodatskaya, E.V., Blagodatsky, S.A., Anderson, T.-H., Kuzyakov, Y., 2007. Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies. *Applied Soil Ecology* 37, 95–105.
- Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2008. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biol Fertil Soils* 45, 115–131.
- Brookes, P.C., Kemmitt, S.J., Addiscott, T.M., Bird, N., 2009. Reply to Kuzyakov et al.'s comments on our paper: "Kemmitt, S. Lanyon, C. V., Waite, I.S., Wen, Q., O'Donnell, A.G., Brookes, P.C., 2008. Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass – a new perspective. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 61–73". *Soil Biology and Biochemistry* 41, 440–443.
- Brown, J.H., Gillooly, J.F., Allen, A.P., Savage, V.M., West, G.B., 2004. TOWARD A METABOLIC THEORY OF ECOLOGY. *Ecology* 85, 1771–1789.
- Bünemann, E.K., Prusisz, B., Ehlers, K., 2011. Characterization of Phosphorus Forms in Soil Microorganisms, in: Bünemann, E., Oberson, A., Frossard, E. (Eds.), *Phosphorus in Action, Soil Biology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 37–57.
- Bünemann, E.K., Smithson, P.C., Jama, B., Frossard, E., Oberson, A., 2004. Maize productivity and nutrient dynamics in maize-fallow rotations in western Kenya. *Plant Soil* 264, 195–208.
- Cheng, W., 2009. Rhizosphere priming effect: Its functional relationships with microbial turnover, evapotranspiration, and C–N budgets. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1795–1801.
- Cleveland, C.C., Liptzin, D., 2007. C : N : P stoichiometry in soil: is there a "Redfield ratio" for the microbial biomass? *Biogeochemistry* 85, 235–252.

- Cleveland, C.C., Townsend, A.R., Schmidt, S.K., 2002. Phosphorus limitation of microbial processes in moist tropical forests: Evidence from short-term laboratory incubations and field studies. *Ecosystems* 5, 680–691.
- de Boer, W., Folman, L.B., Summerbell, R.C., Boddy, L., 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *Fems Microbiol. Rev.* 29, 795–811.
- Ehlers, K., Bakken, L.R., Frostegard, A., Frossard, E., Buenemann, E.K., 2010. Phosphorus limitation in a Ferralsol: Impact on microbial activity and cell internal P pools. *Soil Biol. Biochem.* 42, 558–566.
- Ekschmitt, K., Liu, M.Q., Vetter, S., Fox, O., Wolters, V., 2005. Strategies used by soil biota to overcome soil organic matter stability - why is dead organic matter left over in the soil? *Geoderma* 128, 167–176.
- Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88, 1354–1364.
- Fontaine, S., Bardoux, G., Abbadie, L., Mariotti, A., 2004. Carbon input to soil may decrease soil carbon content. *Ecology Letters* 7, 314–320.
- Fontaine, S., Barot, S., Barré, P., Bdioui, N., Mary, B., Rumpel, C., 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450, 277–280.
- Fontaine, S., Henault, C., Aamor, A., Bdioui, N., Bloor, J.M.G., Maire, V., Mary, B., Revalliot, S., Maron, P.A., 2011. Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 86–96.
- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L., 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry* 35, 837–843.
- Frossard, E., Achat, D.L., Bernasconi, S.M., Bünemann, E.K., Fardeau, J.-C., Jansa, J., Morel, C., Rabeharisoa, L., Randriamanantsoa, L., Sinaj, S., Tamburini, F., Oberson, A., 2011. The Use of Tracers to Investigate Phosphate Cycling in Soil–Plant Systems, in: Bünemann, E., Oberson, A., Frossard, E. (Eds.), *Phosphorus in Action, Soil Biology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 59–91.
- Griffiths, B., Spilles, A., Bonkowski, M., 2012. C:N:P stoichiometry and nutrient limitation of the soil microbial biomass in a grazed grassland site under experimental P limitation or excess. *Ecological Processes* 1, 6.
- Guenet, B., Danger, M., Abbadie, L., Lacroix, G., 2010. Priming effect: bridging the gap between terrestrial and aquatic ecology. *Ecology* 91, 2850–2861.
- Guenet, B., Neill, C., Bardoux, G., Abbadie, L., 2010. Is there a linear relationship between priming effect intensity and the amount of organic matter input? *Applied Soil Ecology* 46, 436–442.
- Hinsinger, P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237, 173–195.
- Janssen, P.H., 1998. Pathway of glucose catabolism by strain VeGlc2, an anaerobe belonging to the Verrucomicrobiales lineage of bacterial descent. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4830–4833.
- Janssen, P.H., 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1719–1728.
- Jenkinson, D.S., Brookes, P.C., Powlson, D.S., 2004. Measuring soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* 36, 5–7.
- Kemmitt, S.J., Lanyon, C.V., Waite, I.S., Wen, Q., Addiscott, T.M., Bird, N.R.A., O'Donnell, A.G., Brookes, P.C., 2008. Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass—a new perspective. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 61–73.
- Kouno, K., Tuchiya, Y., Ando, T., 1995. Measurement of Soil Microbial Biomass Phosphorus by an Anion-Exchange Membrane Method. *Soil Biol. Biochem.* 27, 1353–1357.

- Kuzyakov, Y., 2002. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 382–396.
- Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1363–1371.
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., Blagodatsky, S., 2009. Comments on the paper by Kemmitt et al. (2008) “Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass – A new perspective” [*Soil Biology & Biochemistry* 40, 61–73]: The biology of the Regulatory Gate. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 435–439.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J., Stahr, K., 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1485–1498.
- Mazoyer, M., 2004. La situation agricole et alimentaire mondiale : causes, conséquences, perspectives. *TROPICULTURA* 24, 246-252.
- McLaughlin, M.J., Alston, A.M., Martin, J.K., 1986. Measurement of phosphorus in the soil microbial biomass: A modified procedure for field soils. *Soil Biology and Biochemistry* 18, 437–443.
- Mitsch, W.J., 2012. What is ecological engineering? *Ecol. Eng.* 45, 5–12.
- Moorhead, D., L. & Sinsabaugh, R., L., 2006. A theoretical model of litter decay and microbial interaction. *Ecological Monographs* 76 (2), 151-174.
- Nottingham, A.T., Griffiths, H., Chamberlain, P.M., Stott, A.W., Tanner, E.V.J., 2009. Soil priming by sugar and leaf-litter substrates: A link to microbial groups. *Applied Soil Ecology* 42, 183–190.
- Odum, H.T., Odum, B., 2003. Concepts and methods of ecological engineering. *Ecol. Eng.* 20, 339–361.
- Ohno, T., Zibilske, L.M., 1991. Determination of Low Concentrations of Phosphorus in Soil Extracts Using Malachite Green. *Soil Science Society of America Journal* 55, 892–895.
- Rabeharisoa, L., 2004. Gestion de la fertilité et de la fertilisation phosphatée des sols ferrallitiques des Hautes Terres de Madagascar. Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences Naturelles. Université d'Antananarivo. 196p
- Rasoamaharo, L. A., 2007. Effet du guano et du triple superphosphate sur la culture de maïs : cas d'un ferralsol de Lazaina, Antananarivo. Mémoire Ingénieur ESSA, Antananarivo.
- Senechkin, I.V., Speksnijder, A.G.C.L., Semenov, A.M., van Bruggen, A.H.C., van Overbeek, L.S., 2010. Isolation and Partial Characterization of Bacterial Strains on Low Organic Carbon Medium from Soils Fertilized with Different Organic Amendments. *Microb. Ecol.* 60, 829–839.
- Sinsabaugh, R.L., Hill, B.H., Shah, J.J.F., 2009. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature* 462, 795–U117.
- Sinsabaugh, R.L., Shah, J.J.F., 2012. Ecoenzymatic Stoichiometry and Ecological Theory, in: Futuyma, D.J. (Ed.), *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, Vol 43. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 313–343.
- Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S., Wernars, K., 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2284–2291.
- Stocking, M.A., 2003. Tropical soils and food security: The next 50 years. *Science* 302, 1356–1359.
- Sullivan, B.W., Hart, S.C., 2013. Evaluation of mechanisms controlling the priming of soil carbon along a substrate age gradient. *Soil Biology and Biochemistry* 58, 293–301.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703–707.

8. ANNEXES

Annexe I. Préparation des microcosmes

Annexe II. Protocole de mesure de l'émission de CO₂ dans un microcosme

Annexe III. Protocole de détermination de la biomasse microbienne du sol par la méthode de fumigation-extraction

Annexe IV. Protocole de détermination du phosphore de la biomasse microbienne par la méthode de fumigation-extraction avec des résines échangeuses d'anions

Annexe V. Protocole de co-extraction quantitative d'ADN et ARN

Annexe VI. Protocole de dosage de l'azote minéral du sol

Annexe VII. Résultats des ANOVA croisées des effets des modalités de traitement

Annexe VIII. Tableaux de comparaison des émissions de C-CO₂ retrouvés durant des études antérieures

Annexe IX. Tableau de comparaison des phyla retrouvés durant des études antérieures

Annexe I. Préparation des microcosmes**Détermination de l'humidité**

Peser 20 g de sol frais dans des boîtes à tare et les mettre dans l'étuve à 105°C pendant 48h afin de déterminer l'humidité du sol. Une fois l'humidité connue, celle-ci sera ajustée à l'humidité à la capacité au champ lors de l'ajout des solutions nutritives. Cette humidité a été déterminée, lors de précédents travaux sur le dispositif de Lazaina, à 23,50 ml pour 100 g de sol à la capacité au champ.

Préparation des microcosmes et des solutions nutritives

Peser 100 g de sol frais dans des flacons

Pour tous les microcosmes, le volume de solution à rajouter est le même. Cela correspond au volume d'eau dans le sol à la capacité au champ auquel on retire le volume d'eau présent dans le sol à l'humidité initiale.

Pour les traitements contrôles (CT et ST), ajouter de l'eau ultra pure permettant d'ajuster l'humidité à la capacité au champ.

Pour les traitements azotés à 0,00032 g N / g de sol sec (CNT et SNT), ajouter 0,151065 g de (NH₄)₂SO₄ dans le volume d'eau ultra pure permettant l'ajustement de l'humidité.

Pour les traitements phosphatés à 0.00016 g P / g de sol sec (CNT et SNT), ajouter 0,0703 g de KH₂PO₄ dans le volume d'eau ultra pure permettant l'ajustement de l'humidité.

Pour la combinaison des traitements azotés et phosphatés (CNPT et SNPT, ajouter 0,151065 g de (NH₄)₂SO₄ et 0,0703 g de KH₂PO₄ dans le volume d'eau ultra pure permettant l'ajustement de l'humidité.

Préparation et ajout de la paille marquée à 10%

Préparer une paille marquée à 10% préparée à partir de paille marquée à 95% et de paille non marquée. Bien mélanger pour homogénéiser le mélange.

Après l'apport des différentes solutions nutritives, ajouter 0,04g de paille marquée à 10% dans les microcosmes destinée aux traitements présentant de la paille marquée (ST, SNT, SPT et SNPT).

Une fois les microcosmes traités, refermer les flacons avec le bouchon plasma et celer avec la bague. Noter l'heure de fermeture des flacons et mettre à incubation.

Annexe II. Protocole de mesure de l'émission de CO₂ dans un microcosme (Protocole LRI – mesure µCPG)

Le sol est incubé à 26°C et à l'obscurité pendant 7 jours. On réalise des prélèvements réguliers d'atmosphère du microcosme pour doser, grâce au µCPG, le CO₂ émis lors de l'activité bactérienne.

Mesure préliminaire : Détermination du volume atmosphérique dans les microcosmes

Pour le calcul de la concentration de CO₂ présent dans l'atmosphère du microcosme, le volume atmosphérique dans microcosme a été déterminé. Dans un microcosme contrôle (100 g de sol dont l'humidité a été ajustée à la capacité au champ), ajouter de l'eau à la seringue jusqu'à saturation du flacon. Le volume d'eau ajoutée correspond au volume atmosphérique du flacon.

Mode opératoire

Ouvrir la bouteille de gaz vecteur Hélium, vérifier les manomètres (200 bars au départ – 5.5 à l'arrivée)

Au moins une heure avant les premières mesures, connecter l'ordinateur au µCPG via le câble Ethernet jaune.

Allumer l'onduleur et l'ordinateur à l'interface « Microcatha », mot de passe « Varian »

Dans la barre de menu du logiciel STAR Cliquer sur l'icône « system control ». Vérifier que la méthode sélectionnée soit 'arrêt appareil' dans « Method file ». La page 'log' apparaît, elle permet de suivre le bon déroulement de l'allumage et de voir les rapports d'erreur éventuelle.

Vérifier que les 4 ventilations à l'arrière du µCPG sont ouvertes (capuchons blancs ôtés) puis allumer le µCPG.

Le µCPG doit être reconnu par l'ordinateur. Les voyants vont clignoter et l'appareil va faire un cycle Flush.

Attendre que le voyant « Ready » sur l'avant du µCPG soit vert. Attendre dix minutes puis changer la méthode pour «Denit Pot LRI-65_15Nov08», Attendre que les colonnes aient atteint les conditions d'analyse.

Dans le menu « Inject », choisir « Inject single sample ». Dans la fenêtre de dialogue « Inject single sample », cliquer « data file » pour sélectionner le répertoire où seront stockées les données (1 dossier par date).

Piquer le 1er flacon, entrer le nom de l'échantillon puis cliquer sur Ok pour lancer la mesure. A la fin de la mesure, cliquer « view result only », sélectionner le canal B pour relever le résultat en « peak count ».

A la fin d'une série, mettre « method file » sur « arrêt appareil » et attendre que la température des colonnes soit descendue pour arrêter le programme puis les appareils.

Prévoir 1 échantillon toutes les 5 minutes

Annexe III. Protocole de détermination de la biomasse microbienne du sol par la méthode de fumigation-extraction (Protocole LRI adapté des modes opératoires de l'UMR Eco&Sol et de l'ETH de Zurich)

La teneur en C et N de la biomasse microbienne est estimée par la méthode de Fumigation-Extraction (FE) selon Vance et al. (1987). La fumigation par les vapeurs de trichlorométhane (ou chloroforme, CHCl_3) dissout les membranes cellulaires des microorganismes du sol. Ainsi, le contenu cellulaire devient extractible par une solution de K_2SO_4 . Le temps de fumigation usuel est de 24 h mais peut être étendu à 7 jours. La quantité de C et N microbien est calculé par la différence de quantité extraite entre les échantillons fumigés et les extraits non fumigés.

Hygiène et sécurité

Le trichlorométhane ou chloroforme (CHCl_3) est utilisé en chimie organique comme solvant polaire aprotique ou comme éluant pour chromatographie.

Quelques règles de sécurité à respecter :

- ne jamais mettre de trichlorométhane en milieu basique avec des molécules contenant des doubles liaisons carbone-carbone, sous risque d'explosion !
- le trichlorométhane est un produit dangereux pour la santé et l'environnement. Il est interdit de jeter les résidus de trichlorométhane dans l'évier. Ils seront placés dans un bidon prévu pour les déchets chlorés. Ce bidon rempli et fermé sous hotte chimique sera ultérieurement emporté par une société spécialisée en traitement de déchets chimiques
- il est important que le manipulateur se protège par le port de la blouse, d'un masque respiratoire et de gants adéquats
- le manipulateur travaille sous hotte chimique

Matériel

Flacons vissés de 60 ml et de 30 ml en polyéthylène

Balance, spatule, verre à tare, crayon gras

Chloroforme stabilisé à l'amylène, pierres ponce, ampoule à décanter, béchers

Dessiccateur, plateaux, pompe à vide, papier aluminium,

Seringues, filtres embouts de seringue avec membrane en polyéthersulfonate et des pores de 0,20 μm

Mode opératoireLe premier jour :

Laver 3 à 4 fois 100 ml de trichlorométhane dans l'ampoule à décanter afin de supprimer l'amylène qui lui permet de rester stable sous forme liquide. Une fois lavé, mettre le trichlorométhane dans un bécher avec de la pierre ponce dans le fond du bécher.

Peser l'équivalent de 10 g de sol sec dans des flacons vissés en polyéthylène de 60 ml pour les sous-échantillons non fumigé et dans des verres à tare pour les échantillons à fumiger. Marquer mes verres à tare avec un crayon gras car l'encre se dissout sous les vapeurs de trichlorométhane. Inclure 2 blancs à fumiger et 2 blancs non fumigé.

Tapisser le fond du dessiccateur de papier filtre humide ou y mettre une coupelle d'eau pour éviter que les échantillons ne se dessèchent pendant la fumigation. Transférer les échantillons à fumiger et le bécher de trichlorométhane dans le dessiccateur.

Fermer puis mettre le dessiccateur sous vide grâce à la pompe à vide. Laisser le trichlorométhane bouillir pendant 2 minutes puis arrêter en fermant le robinet du couvercle du dessiccateur puis en débranchant la pompe à vide. Recouvrir le dessiccateur de papier aluminium et laisser le dessiccateur sous vide pendant 24 heures à température ambiante.

Dans les flacons vissés contenant les sous-échantillons non fumigés, procéder directement à l'extraction. Ajouter 50 ml de solution K_2SO_4 à 0,5 M (rapport sol/extractant : 1/5). Agiter pendant 1 h à température ambiante à l'aide d'un agitateur rotatif à raison de 150 tour.min⁻¹. Laisser ensuite décanter les échantillons pendant 1 h avant de prélever, à la seringue, 30 ml de surnageant. Filtrer à 0,2 μm et placer le surnageant dans les flacons vissés de 30 ml.

Congeler les échantillons pour une mesure ultérieure avec l'analyseur TOC/TN. Durant la congélation, un précipité blanc peut se former mais celui-ci disparaît durant la décongélation.

Second jour :

Casser le vide dans le dessiccateur en ouvrant délicatement le robinet du couvercle. Ouvrir ensuite le couvercle et laisser les échantillons dans l'atmosphère de la hotte pendant 1 h pour éliminer l'excès de trichlorométhane. Ensuite procéder à l'extraction de la même façon que pour les échantillons non fumigés.

Dosage

Les concentrations du carbone organique total (TOC) et d'azote total (TN) dans les solutions sont déterminées grâce à un analyseur TOC/TN.

Références

Vance E.D., Brookes P. C., Jenkinson ; D. S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology & Biochemistry* 19, 703-707.

Annexe IV. Protocole de détermination du phosphore de la biomasse microbienne par la méthode de fumigation-extraction avec des résines échangeuses d'anions (Protocole de l'ETH de Zurich, auteur : Else Bünemann)

Matériel, réactifs et appareils

Sol frais tamisé à 2 mm et conservé à 4°C.

Tube de 30 ml en polyéthylène

Résines échangeuses d'anions BDH #55164 2S (BDH Laboratory supplies, Poole, PH15 1TD, England) coupées en bandes de surface 6 x 2 cm.

Balance, agitateur horizontal, photomètre

Solution HCl à 0,5 M, solution NaCl/HCl à 0,1 M, solution NaHCO₃ à 0,5 M, hexanol, solution P standard, réactifs colorés (vert de malachite I et II)

Mode opératoire

Premier jour :

Régénérer les bandes de résine échangeuses d'anions :

- les agiter pendant 1 h dans une solution de HCl à 0,5 M pour enlever les traces de phosphore puis les rincer à l'eau distillée
- agiter les résines pendant 1 h dans une solution de NaHCO₃ (pH 8,5) à 0,5 M puis les rincer à l'eau distillée
- agiter à nouveau les résines pendant une heure dans une solution de NaHCO₃ (pH 8,5) à 0,5 M puis les conserver dans cette solution.
- Rincer 3 fois les résines à l'eau distillée avant de les utiliser

Peser l'équivalent de 2 g de sol sec dans les tubes en polyéthylène (du sol frais devrait toujours être utilisé comme une partie du P microbien devient extractible durant le séchage des échantillons) puis y ajouter 29 ml d'eau distillée et une résine de 6 x 2 cm (ou 2 résines de 3 x 2 cm). Pour chaque valeur finale de P microbien, 3 sous échantillons doivent être préparés :

Ajouter 1 ml d'eau distillée dans la série de sous-échantillons non fumigés.

Ajouter ensuite 1 ml d'hexanol dans la série des sous-échantillons à fumiger (réaliser cette manipulation sous la hotte).

Enfin, ajouter 1 ml de solution P à 20 ppm dans la troisième série de sous-échantillons. Cela permettra de tenir compte de l'adsorption du P libéré lors de la lyse des cellules microbienne. Ne pas oublier d'inclure des blancs pour chaque série.

Fermer les tube et les placer à agitation horizontale pendant 16 h à raison de 160 tours min⁻¹.

Second jour :

Rincer soigneusement les résines avec de l'eau distillée puis les agiter afin d'ôter l'eau restant sur les résines. Placer ensuite les résines dans des tubes en polyéthylènes propres.

Ajouter 30 ml de solution NaCl + HCl à 0,1 M puis laisser reposer au moins 30 min avant la fermeture des tubes.

Conserver le restant de solution de NaCl + HCl à 0,1 M pour le dosage.

Placer ensuite les tubes à agitation horizontale pendant 2 h à raison de 160 tours.min⁻¹. Retirer ensuite les résines et les mettre dans une solution HCl en attendant de les régénérer.

Dosage

Préparer la gamme étalon à partir d'une solution P standard à 1 ppm selon le tableau suivant dans des cuves plastiques de 1 ml.

	Ajout de solution P (ml)	ajout de H2O (ml)	ajout de solution NaCl + HCl (ml)
S0	0	0,750	0,250
S1	0,050	0,700	0,250
S2	0,100	0,650	0,250
S3	0,150	0,600	0,250
S4	0,200	0,550	0,250

S5	0,250	0,500	0,250
S6	0,300	0,450	0,250
S7	0,350	0,400	0,250
S8	0,400	0,350	0,250
S9	0,450	0,300	0,250

Prélever 0,250 ml d'extrait et les disposer dans une cuve plastique de 1 ml pour chaque échantillon. Ajouter ensuite dans chaque cuve 0,750 ml d'eau distillée.

Dans toutes les cuves (gamme + échantillons) ajouter 0,200 ml de vert de malachite I puis attendre 10 min avant de rajouter 0,200 ml de vert de malachite II.

Recouvrir chaque cuve de parafilm, agiter puis laisser agir la réaction pendant 1h.

Mesurer ensuite la densité optique avec un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 610 nm.

Convertir, grâce à la gamme étalon, les valeurs de densité optique en quantité mg P kg⁻¹ de sol et, ensuite, corriger les données grâce aux échantillons qui ont reçu la solution de P à 20 ppm.

Références

Kouno, K., Tuchiya, Y., Ando, T., 1995. Measurement of soil microbial biomass phosphorus by an anion exchange membrane method. *Soil Biology & Biochemistry* 27, 1353-1357.

McLaughlin, M.J., Alston, A.M., Lartin, J.K., 1986. Measurement of phosphorus in the soil microbial biomass: a modified procedure for field soils. *Soil Biology & biochemistry* 18, 437-443.

Oberson, A., Joner, E.J., 2005. Microbial turnover of phosphorus in soil. In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D. (Eds), *Organic phosphorus in the environment*. CABI, Wallingford, Oxon, UK, pp. 133-164.

Ohno, R., Zibilske, L.M., 1991. Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. *Soil Science Society of America Journal* 55, 892-895.

Annexe V. Protocole de co-extraction quantitative d'ADN et ARN (kits FastDNA™ SPIN Kit for Soil et RNaid™ Kit with SPIN™, MP Biomedicals, Solon, Etats-Unis)

Matériel, réactifs et appareils

Purification d'ADN	Purification d'ARN
	eau distillée sans ADNase & ARNase
Matrice de lyse (Lysing Matrix E)	solution de sel de fixation d'ARN (RNA Binding Salt)
Tampon Sodium Phosphate (Sodium Phosphate Buffer)	solution de lavage d'ARN (RNA Wash)
Tampon MT (MT Buffer)	Matrice ARN (RNAMATRIX™)
PPS (Protein Précipitation Solution)	Acide Acétique à 10%
Matrice de fixation d'ADN (Binding Matrix)	Tampon TAE (TAE Buffer)
tube à filtre SPIN™ (SPIN™ Modules)	Ethanol à 100%
Catch tubes	isopropanol
Solution de lavage SEWS-M (SEW-M)	solution d'acétate de sodium (3 M, pH 4)
DES	éthanol à 70%
Broyeur FastPrep®	
	Guanidine thyocyanate
	microcentrifugeur
	tubes de 2 ml et de 15 ml

Considérations importantes avant utilisation

Le kit FastDNA™ SPIN contient une bouteille de 12 ml de solution de lavage SEWS-M concentrée. Avant de l'utiliser, y ajouter 100 ml d'éthanol à 100% et noter la date de l'ajout sur la bouteille. Mélanger et conserver à température ambiante.

Pour un broyage efficace. MP Biomedicals recommande d'ajouter 500 mg de sol dans les tubes de Lysing Matrix tant qu'il y a entre 250 et 500 µl d'espace vide dans le tube.

La Binding Matrix contient des composants pouvant causer une irritation des tissus humains.

Le kit RNaid™ with SPIN™ contient une bouteille de solution concentrée de lavage d'ARN. Ce composant nécessite l'ajout de 120 ml d'éthanol à 100% avant utilisation.

Avant l'extraction, toutes les solutions et la verrerie doivent être rendue libre d'ARNase et seuls des tubes plastique certifié libre d'ADNase et ARNase (ou autoclavés 2 fois) doivent être utilisés.

Mode opératoire

Ajouter les 500 mg de sol dans les tubes de Lysing Matrix E et congeler toute une nuit à -80°C.

Ajouter, dans les tubes de Lysing Matrix E, 978 µl de tampon Sodium Phosphate puis 122 µl de tampon MT. Homogénéiser les échantillons à l'aide du broyeur FastPrep® en le programmant à une vitesse de 6.0 m s⁻¹ pour 40 secondes. Placer ensuite les tubes dans de la glace pendant 5 minutes.

Centrifuger les tubes à une vitesse de 14000 g et à 4°C pendant 5 minutes. Transférer ensuite le surnageant dans des tubes de 2 ml.

Ajouter au surnageant 250 µl de PPS et agiter les tubes 10 fois à la main (Conserver les tubes dans la glace avant l'étape suivante).

Centrifuger les tubes à une vitesse de 14000 g et à 4°C pendant 5 minutes pour permettre la décantation du précipité (protéines). Transférer le surnageant dans des tubes de 2 ml et jeter le culot.

Re-suspendre la Matrice de fixation d'ADN avant utilisation. Ajouter 1 ml de Matrice de fixation d'ADN dans le tube puis agiter le tube (à une vitesse de 23 rpm) pendant 12 minutes et à température ambiante pour permettre la fixation de l'ADN.

Centrifuger les tubes à une vitesse de 14000 g et à 4°C pendant 2 minutes pour culotter la matrice. Transférer le surnageant dans des tubes de 15 ml puis les conserver dans la glace avant la purification d'ARN.

Procédure de purification d'ADN :

Re-suspendre le culot (c'est-à-dire la matrice de fixation d'ADN) dans 500 µl de Guanidine thiocyanate à 5,5 M (pour se débarrasser des acides humiques) puis transférer la solution dans un tube à filtre SPIN™ puis le centrifuger à une vitesse de 14000 g et à température ambiante pendant 1 minute. Transférer l'éluat dans le tube de 15 ml destiné à la purification d'ARN.

Ajouter 500 µl de solution de lavage SEWS-M et re-suspendre le culot à l'aide de la pointe de la pipette.

Centrifuger les tubes à filtre SPIN™ à une vitesse de 14000 g et à température ambiante pendant 1 minute. Jeter l'éluat avant de centrifuger une seconde fois à 14000 g pendant 2 minutes pour sécher la matrice. Placer le filtre SPIN™ dans un nouveau catch tube.

Laisser sécher le filtre SPIN™ pendant 5 minutes à température ambiante.

Re-suspendre délicatement la matrice de fixation d'ADN dans 150 µL d'eau libre d'ADNase et ARNase avant d'incuber à 55°C pendant 12 min.

Centrifuger les tubes à une vitesse de 14000 g pendant 1 minute puis jeter le filtre. Conserver l'éluat contenant l'ADN à -20°C avant utilisation.

Procédure de purification d'ARN :

Reprendre les tubes de 15 ml conservés dans la glace.

Ajouter 1 volume d'isopropanol (conservé à -20°C) puis 0,1 volume de solution d'acétate de sodium. Agiter délicatement le tube puis l'incuber à -20°C pendant 90 min.

Centrifuger les tubes à une vitesse de 14000 g et à 4°C pendant 30 minutes ; Jeter le surnageant et rincer le culot (sans le re-suspendre) avec de l'éthanol à 70%. Centrifuger à nouveau à une vitesse de 14000 g et à 4°C pendant 5 minutes avant de retirer l'éthanol. Laisser sécher le culot à température ambiante pendant 5 minutes. Re-suspendre le culot dans 100 µl d'eau libre d'ADNase et ARNase puis placer les tubes dans de la glace pendant 10 minutes.

Ajouter 3 volumes de solution de sel de fixation d'ARN. Transférer dans un tube de 2 ml avant d'ajouter 6 µl de matrice de fixation d'ARN. Agiter délicatement les tubes et à température ambiante pendant 15 minutes.

(Si besoin, ajouter 500 µl de guanidine thiocyanate avant de centrifuger à une vitesse de 14000 g pendant 1 minute. Retirer la guanidine thiocyanate avant de procéder à l'étape suivante)

Centrifuger les tubes à une vitesse de 14000 g et à 4°C pendant 1 minute puis jeter le surnageant. Re-suspendre le culot dans 500 µl de solution de lavage d'ARN.

Centrifuger les tubes à une vitesse de 14000 g et à 4°C pendant une minute. Retirer le surnageant à l'aide d'une pipette puis laisser sécher le culot. Une fois sec, re-suspendre le culot dans 60 µl d'eau libre d'ADNase et ARNase puis agiter délicatement. Incuber à 55°C pendant 15 min.

Centrifuger les tubes à une vitesse de 14000 g et à 4°C pendant 2 minutes. Transférer le surnageant dans des tubes de 2 l et conserver à -80°C avant utilisation.

Annexe VI. Protocole de dosage de l'azote minéral du sol (Protocole du LRI, auteur : Jean Delarivière)**ANALYSE : Azote Ammoniacal / GAMME MIXTE : 0.05 – 5.0 mg/l NH₄ et**

La détermination de l'ammonium utilise la réaction de Berthelot modifiée : L'ammonium est chloré en monochloramine ; celle-ci réagit avec le salicylate pour former le 5-aminosalicylate. Après oxydation et couplage oxydant, il se forme un complexe coloré vert. L'intensité de sa coloration, mesurée à 660 nm, est en relation avec la concentration initiale en ammonium.

L'extraction peut être utilisée pour la détermination de N-NH₄, N-NO₃, Al, SO₄ et Urée dans les sols.

Matériel

Agitateur par retournement
Flacons 100 ml Polyéthylène
Entonnoirs (±70 mm de diamètre)
Papier filtre S&S ruban bleu

RéactifsSolution de Chlorure de potassium 1M :

- 1- peser 74,5 g de chlorure de potassium (KCl) dans un erlenmeyer de 1 litre.
- 2- Ajouter 800 ml d'eau distillée, et dissoudre. Ajuster à 1 litre avec de l'eau distillée et mélanger.

Solution Tampon

Produits chimiques :	Préparation :
Tartrate de potassium et sodium.....33g C ₄ H ₄ O ₆ KNa, 4 H ₂ O	Dissoudre le tartrate dans 800 ml d'eau distillée.
Citrate de sodium.....24g C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ , 2 H ₂ O	Ajouter le citrate de sodium et le dissoudre. Compléter à 1 litre puis agiter.
Brij 35 (30%).....3 ml	Ajouter le Brij 35 et homogénéiser.

Vérifier le pH et le ramener à 5,2 +/- 0,1 et, si nécessaire, avec de l'acide chlorhydrique

NOTE : la solution est stable une semaine à 20°C. Stocker à 4°C quand elle n'est pas utilisée

Salicylate de sodium

Produits chimiques :	Préparation :
Hydroxyde de sodium.....25 g NaOH	Dissoudre la soude dans 500 ml d'eau distillée
Salicylate de sodium.....80 g C ₇ H ₅ NaO ₃	Ajouter le salicylate de sodium, ajuster à 1 litre puis mélanger.

NOTE : Conserver en flacon brun. Cette solution est stable une semaine à 20°C. Stocker à 4°C quand elle n'est pas utilisée.

Nitroprussiate de sodium

Produits chimiques :	Préparation :
Nitroprussiate de sodium.....1 g Na ₂ [Fe(CN) ₅ NO], 2 H ₂ O	Dissoudre le nitroprussiate dans 800 ml d'eau distillée puis ajuster à 1 litre

NOTE : Conserver en flacon brun. Cette solution est stable une semaine à 20°C. Stocker à 4°C quand elle n'est pas utilisée.

Dichloroisocyanurate de sodium

Produits chimiques :	Préparation :
Dichloroisocyanurate de sodium.....2 g C ₃ N ₃ O ₃ Cl ₂ Na, 2 H ₂ O	Dissoudre le dichloroisocyanurate dans 800 ml d'eau distillée puis ajuster à 1 litre

NOTE : Conserver en flacon brun. Cette solution est stable une semaine à 20°C. Stocker à 4°C quand elle n'est pas utilisée.

Liquide de rinçage du passeur :

Produits chimiques :	Préparation :
----------------------	---------------

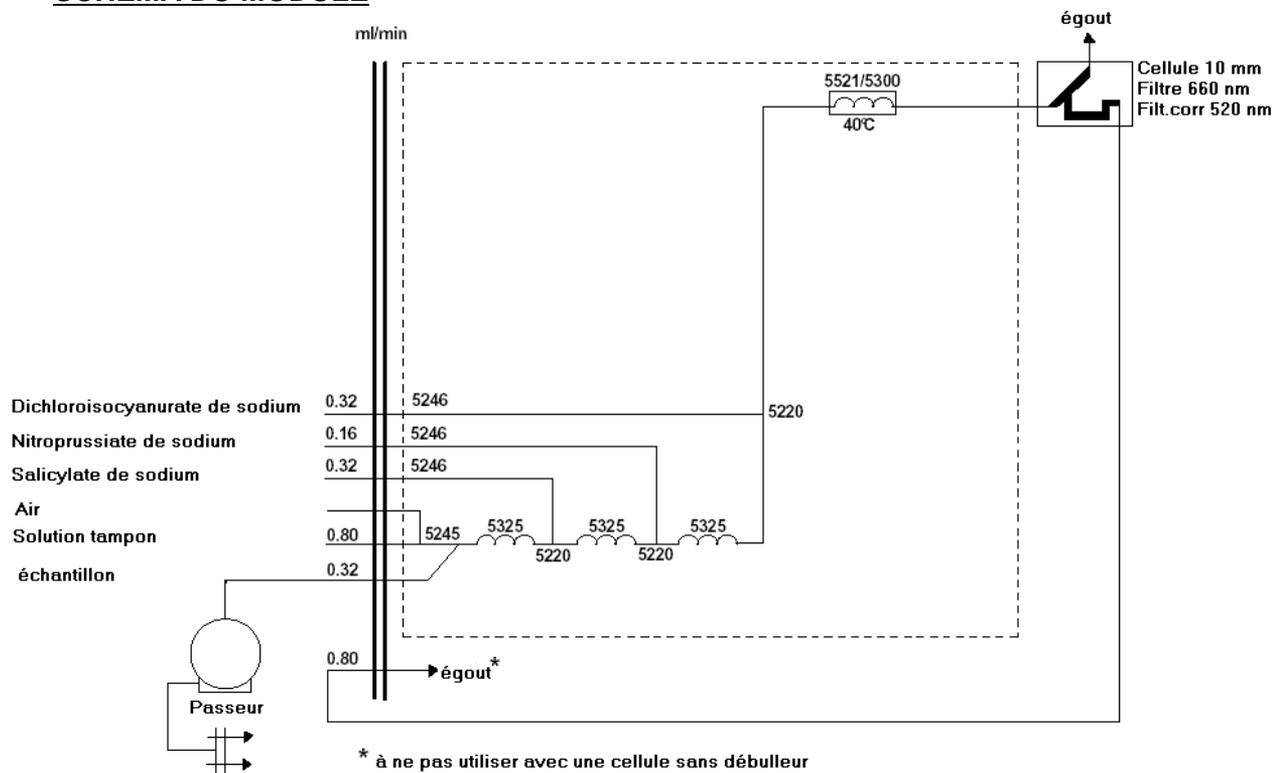
Krom, M., "Spectrophotometric determination of ammonia; a study of modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate", *The Analyst*, April 1980, Vol. 105, page 305-316.

Searle, P.L., "The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analysis chemistry of nitrogen", *The Analyst*, Vol. 109, May 1984, page 549-565.

ISO 3696:1987, Water for analytical laboratory use. Specification and test methods.

ASTM, D1193, Standard Specification for Reagent Water.

SCHEMA DU MODULE



Annexe VII. Résultats des ANOVA croisées des effets des modalités de traitement**P-value des ANOVA croisées des effets des facteurs sur la présence des différents phyla**

Facteur	NA.read.kingdom	A.proteobacteria	B.proteobacteria	G.proteobacteria	D.proteobacteria	Un.Proteobacteria	Actinobacteria	Verrucomicrobia
Paille	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 1	< 1	< 1	< 1
NH4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 0,001	< 0,05	< 0,05	< 1
Phosphore	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Paille x NH4	< 0,1	< 1	< 0,1	< 0,1	< 1	< 1	< 1	< 1
Paille x Phosphore	< 0,05	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
NH4 x Phosphore	< 1	< 1	< 1	< 1	< 0,01	< 1	< 1	< 1

P-value des ANOVA croisées des effets des facteurs sur la présence des différents phyla

Facteur	Planctomycetes	Acidobacteria	Firmicutes	Bacteroidetes	Gemmatimonadetes	TM7	Chloroflexi
Paille	< 0,1	< 1	< 0,001	< 0,1	< 1	< 0,001	< 0,05
NH4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 0,01	< 1
Phosphore	< 1	< 1	< 0,1	< 1	< 1	< 1	< 1
Paille x NH4	< 0,05	< 0,1	< 1	< 1	< 0,1	< 0,001	< 0,05
Paille x Phosphore	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
NH4 x Phosphore	< 1	< 0,1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

Annexe VIII. Tableaux de comparaison des émissions de C-CO₂ retrouvés durant des études antérieures

Modalité	Echant	Emission de C-CO ₂				
		Resp Sol	Resp base	min paille	PE	ratio Paille/Sol
effet des vers de terre	ST t16	9,91	10,91	2,43	-1,01	0,245
	SWT t16	41,9	23,36	6,89	18,54	0,164
	Maïs Fu	35,08	19,42	16,6	15,66	0,473
	Beans Fu	32,16	17,45	16,4	14,72	0,51
Sol issu de parcelles agronomiques sous différentes pratiques	Maïs Fm	60,77	26,36	38,28	34,41	0,63
	Beans Fm	53,94	27,19	36,66	26,75	0,68
	Eleusine Fu	35,23	18,73	16,22	16,5	0,46
	Eleusine Fm	42,3	18,64	24,19	23,67	0,572
	Labour Fu	27,65	13,68	15,3	13,96	0,553
	Labour Fm	32,16	13,94	17,74	18,22	0,552
	Bosaka	58,95	32,39	27,15	26,56	0,461
	L1S	143,31	28,73	104,38	114,58	0,728
	L7S	75,37	31,65	36,29	43,72	0,481
	L28S	26,04	18,74	5,06	7,31	0,194
comparaison de sols de texture et minéralogie différentes cinétique sur 2 temps	A1S	226,88	136,71	96,17	90,17	0,424
	A7S	90,52	47,63	34,56	42,9	0,382
	B1S	147,39	33,1	76,89	114,29	0,522
	B7S	73,5	14,29	11,19	59,21	0,152
	M1S	234,63	101,88	141,17	132,75	0,602
	M7S	86,19	29,63	10	56,56	0,116
présente étude	ST t7	14,69	18,72	42,59	-4,03	0,696
	SNT t7	24,39	24,56	57,98	-0,17	0,571
	SPT t7	23,62	28,53	45,37	-4,9	0,461
	SNPT t7	28,03	25,75	58,09	2,28	0,497

Annexe IX. Tableau de comparaison des phyla détectés durant des études antérieures

Année	Sol	Modalité	Echant	Phylum détecté dans les échantillons												
				Acido	Actino	Bacteroidetes	Chloroflexi	Firmicutes	Gemma	Planctomycetes	Proteobacteria	TM7	Unclassified	Verruco	G1	G2
2009	Lazaina	effet des vers de terre	ST t16	13,45%	27,59%	3,31%	0,06%	0,42%	1,15%	0,31%	34,48%	0,03%	15,80%	0,51%	28,04%	64,60%
			SWT t16	7,35%	19,54%	32,03%	0,00%	0,61%	0,32%	0,49%	26,89%	0,01%	8,49%	2,02%	20,16%	45,24%
			Maïs Fu	13,22%	24,58%	1,51%	0,19%	0,94%	2,52%	2,21%	23,13%	0,52%	24,42%	0,19%	26,04%	63,37%
			Beans Fu	13,76%	24,95%	1,34%	0,16%	0,90%	2,03%	2,04%	21,45%	0,56%	25,51%	0,15%	26,41%	63,06%
			Maïs Fm	11,92%	25,44%	4,01%	0,17%	0,59%	2,78%	1,88%	27,29%	0,82%	20,03%	0,42%	26,85%	61,70%
2010	Andrano	Sol issu de parcelles agronomiques sous différentes pratiques	Beans Fm	12,90%	22,91%	4,73%	0,25%	0,54%	2,63%	1,63%	27,94%	1,17%	20,58%	0,39%	24,63%	63,70%
			Eleusine Fu	15,59%	20,47%	1,69%	0,13%	1,09%	2,57%	2,93%	21,58%	0,51%	26,95%	0,28%	22,08%	67,46%
			Eleusine Fm	13,26%	25,79%	2,89%	0,14%	0,67%	3,67%	2,44%	25,16%	0,69%	20,38%	1,04%	27,15%	62,42%
			Labour Fu	13,98%	25,92%	1,37%	0,14%	1,10%	2,91%	2,69%	20,66%	0,38%	24,68%	0,42%	27,39%	62,56%
			Labour Fm	13,63%	26,20%	1,94%	0,15%	1,19%	3,01%	2,25%	21,06%	0,56%	22,95%	0,29%	27,95%	60,33%
			Bosaka	16,97%	26,60%	0,86%	0,06%	0,33%	0,93%	2,44%	24,83%	0,44%	16,62%	0,69%	27,37%	61,62%
			L1S	8,51%	39,98%	3,14%	0,03%	1,66%	0,22%	4,18%	26,64%	0,35%	11,39%	1,64%	41,99%	52,40%
2011	Lazaina	comparaison de sols de texture et minéralogie différentes cinétique sur 2 temps	L7S	10,70%	33,74%	2,82%	0,01%	1,30%	0,32%	4,10%	28,87%	0,34%	13,89%	1,42%	35,38%	58,98%
			L28S	8,03%	45,68%	3,05%	0,00%	1,49%	0,03%	0,51%	26,70%	0,04%	10,88%	2,79%	47,22%	48,91%
			A1S	12,16%	33,32%	0,62%	0,11%	0,51%	0,47%	3,03%	23,94%	0,75%	16,69%	0,80%	34,59%	56,72%
			A7S	10,88%	30,96%	0,97%	0,09%	0,72%	0,33%	2,92%	27,02%	1,98%	15,82%	0,88%	33,66%	57,59%
			B1S	9,15%	28,98%	3,06%	0,94%	7,38%	2,84%	2,60%	28,72%	1,18%	13,74%	0,60%	37,54%	55,74%
2011	Betafo	comparaison de sols de texture et minéralogie différentes cinétique sur 2 temps	B7S	10,20%	25,85%	3,21%	1,13%	6,40%	3,17%	2,91%	28,43%	0,50%	16,69%	0,58%	32,75%	59,94%
			M1S	5,18%	36,32%	2,09%	1,05%	15,89%	1,33%	0,98%	27,20%	1,29%	8,05%	0,25%	53,51%	42,71%
			M7S	9,23%	26,31%	4,95%	1,68%	8,88%	2,02%	2,16%	27,79%	1,98%	13,61%	0,89%	37,17%	55,37%
2013	Lazaina	présente étude	ST t7	5,87%	24,10%	1,02%	1,84%	0,50%	0,24%	7,23%	32,84%	0,37%	15,10%	10,79%	24,97%	73,67%
			SNT t7	6,45%	25,64%	0,84%	2,18%	0,78%	0,19%	6,55%	32,28%	1,02%	13,56%	10,44%	27,44%	71,46%
			SPT t7	6,09%	23,19%	1,27%	1,93%	0,80%	0,11%	7,29%	33,84%	0,26%	13,40%	11,74%	24,26%	74,30%
			SNPT t7	6,55%	27,65%	1,01%	1,99%	0,67%	0,18%	7,12%	30,80%	1,13%	13,65%	9,20%	29,45%	69,30%

Echant : Echantillon Acido : Acidobacteria Actino : Actinobacteria Gemma : Gemmatimonadetes
Unclassified : Séquence non classées dans des phyla connus Verruco : Verrucomicrobia
G1 : Actinobacteria, Firmicutes et TM7 G2 : Acidobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes, Proteobacteria, Verrucomicrobia et Unclassified