



HAL
open science

Évaluation des effets de l'azote et des herbicides sur les indicateurs qualitatifs du sol dans des agrosystèmes contrastés

Élodie Nivelles

► **To cite this version:**

Élodie Nivelles. Évaluation des effets de l'azote et des herbicides sur les indicateurs qualitatifs du sol dans des agrosystèmes contrastés. Biologie végétale. Université de Picardie Jules Verne, 2017. Français. NNT : 2017AMIE0026 . tel-03650491

HAL Id: tel-03650491

<https://theses.hal.science/tel-03650491>

Submitted on 25 Apr 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat

*Mention Sciences Ecologiques
Spécialité AgroEcologie et Ecophysiologie*

présentée à *l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Elodie NIVELLE

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Evaluation des effets de l'azote et des herbicides sur les
indicateurs qualitatifs du sol dans des agrosystèmes
contrastés*

Soutenue le 14 Septembre 2017 après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. B. HIREL, Directeur de Recherche, CNRS, Versailles

M. Y. MOENNE-LOCCOZ, Professeur, UCB, Lyon

M^{me} K. PAGEAU, Maître de Conférences, UPJV, Amiens

M. F. DUBOIS, Professeur, UPJV, Amiens

M^{me} H. HOREN, Maître de Conférences, UPJV, Amiens

M. E. NAVA-SAUCEDO, Maître de Conférences HDR, UPJV, Amiens (*membre invité*)

M. T. TETU, Maître de Conférences, UPJV, Amiens (*membre invité*)

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Membre invité

Co-directeur

Directeur

Evaluation des effets de l'azote et des herbicides sur les indicateurs qualitatifs du sol dans des agrosystèmes contrastés

Elodie NIVELLE, 2017

L'utilisation des fertilisants azotés et des herbicides de synthèse est aujourd'hui nécessaire pour assurer la productivité des systèmes de culture et répondre à la demande alimentaire d'une population mondiale en croissance démographique. Cependant, les effets potentiels de ces produits de synthèse sur les propriétés édaphiques et aériennes des agrosystèmes ont été décrits comme dépendants de l'environnement physico-chimique et biologique du sol sur lequel ils sont appliqués. En particulier, il semblerait que les sols non perturbés et sous couverture végétale permanente, caractérisés par des propriétés édaphiques très différenciées des sols gérés sous labour conventionnel, puissent modifier les effets non ciblés de certains herbicides. Plusieurs expérimentations au champ ainsi que deux études en conditions contrôlées ont permis de mettre en évidence que les systèmes gérés en semis-direct sous couverture végétale permanente étaient associés à une augmentation des teneurs en carbone et azote organique, des activités fonctionnelles microbiennes, de l'abondance en spores de champignons mycorhiziens arbusculaires, et de la colonisation racinaire du maïs par les champignons mycorhiziens. Deuxièmement, la fertilisation azotée a induit des effets négatifs sur certains indicateurs biologiques du sol comme l'activité de deshydrogénase alors qu'elle a permis d'augmenter la productivité végétale et le taux de survie larvaire de certains parasites aériens des cultures. Troisièmement, le glyphosate, un herbicide total, a augmenté le temps de dégradation des substrats organiques, et n'a pas eu d'effet sur l'activité des champignons mycorhiziens lorsqu'il était appliqué seul ; par contre l'application d'azote en combinaison avec le glyphosate sur un sol fertilisé depuis 6 ans a entraîné une diminution du taux de colonisation du haricot par les champignons mycorhiziens. Les engrais azotés appliqués sur le long terme sont donc capables de modifier les effets non ciblés du glyphosate. Enfin, le S-Metolachlore, un herbicide sélectif, a augmenté la teneur en nitrates des sols cultivés en semis-direct, sans affecter ceux gérés en labour annuel, et a également augmenté la teneur en ammonium des turricules de vers de terre des sols conduits en semis-direct sous couvert et fertilisés en azote de synthèse depuis 6 ans. Nous concluons que ce sont essentiellement les combinaisons de pratiques qui sont responsables des effets des herbicides sur les propriétés édaphiques et aériennes dans les agrosystèmes.

Mots-clés : Indicateurs de la qualité du sol – Carbone et azote du sol – Réponse microbienne – Désherbage chimique – Fertilisation azotée – Travail du sol – Couverts végétaux

Assessing the effects of nitrogen and herbicides on soil quality indicators in contrasted agrosystems

Elodie NIVELLE, 2017

Nowadays, the use of synthetic nitrogen fertilizers and herbicides is required to ensure cropping systems productivity and meet the demand for food of a growing population. However, the potential effects of these synthetic products on agrosystem's below- and above-ground properties have been described to be dependent of soil physicochemical and biological characteristics on which they are applied. Especially, it seems that soils under no-till and continuous cover-cropping, characterized by contrasted edaphic properties as compared to soils managed under annual plowing, may change the non-target effects of certain herbicides. Several field experiments, as well as two mesocosm studies, evidenced that cropping systems conducted under no-till with continuous cover-cropping were associated to increased organic carbon and nitrogen contents, microbial functional activities, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spore density, and maize root colonization by AMF. Secondly, nitrogen fertilization induced negative effects on soil biological indicators such as dehydrogenase activity while it improved plant productivity and nymph survival of certain above-ground pests. Thirdly, glyphosate, a total herbicide, increased degradation time of organic substrates, while it did not change AMF activity when applied alone. However, the combinaison of glyphosate plus nitrogen fertilization in a soil fertilized over a 6-year period led to a decreased root colonization of bean by AMF. Thus, the long term nitrogen fertilization is capable to change the non-target effects of glyphosate. Finally, S-Metolachlor, a selective herbicide, increased nitrate content of soils subjected to no-till, while those conducted under annual plowing revealed no effect, and increased ammonium content of earthworm casts in soils managed under no-till with cover crops and nitrogen fertilization for 6 years. We conclude that the effects of herbicides on agrosystem's above- and below-ground properties are mainly due to the combination with other agricultural practices such as nitrogen fertilization.

Keywords: Soil quality indicators – Soil carbon and nitrogen – Microbial response – Herbicide application – Nitrogen Fertilization – Tillage – Cover crops

Remerciements

Ce travail de thèse a été financé une bourse ministérielle. Le financement supplémentaire, nécessaire pour la réalisation des analyses scientifiques, a été possible grâce au partenariat entre l'unité EDYSAN et les financeurs privés BONDUELLE et SYNGENTA, dans le cadre du développement du programme VEGESOL, retenu pour son engagement environnemental. Je tiens donc, en premier lieu, à remercier vivement le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Français, de m'avoir financé mon projet de thèse. J'en profite également pour remercier les financeurs privés, BONDUELLE et SYNGENTA de m'avoir permis à la fois d'utiliser la plateforme expérimentale du programme VEGESOL et de financer les analyses nécessaires au développement de ma thèse.

Ce travail a été réalisé dans l'Unité de recherche FRE-CNRS 3498 EDYSAN (Écologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés), au sein du laboratoire AEB (Agroécologie, Ecophysiologie et Biologie intégrative). Ainsi, je tiens à remercier Guillaume DECOCQ, Directeur de l'unité, de m'avoir accueilli au sein d'EDYSAN.

Mes plus sincères remerciements à mes deux Directeurs de thèse, Thierry TETU et José-Edmundo NAVA-SAUCEDO, qui m'ont fait confiance dans ce projet de thèse. Cette aventure a été très instructive et m'a permis d'acquérir une certaine autonomie dans le travail et la rédaction des articles scientifiques grâce à la confiance que vous m'avez accordée et à votre disponibilité dès que j'en avais besoin. Je vous remercie profondément pour vos conseils scientifiques et votre soutien tout au long de ces années qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Je tiens à remercier particulièrement Thierry TETU pour avoir mis à ma disposition tous les éléments nécessaires permettant l'aboutissement de ce travail de thèse.

Je souhaite remercier Bertrand HIREL, Directeur de Recherche de l'INRA de Versailles et Yvan MOENNE-LOCCOZ, Professeur au sein de l'UMR Ecologie Microbienne de Lyon, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je tiens également à remercier Karine PAGEAU et Hélène HOREN Maîtres de Conférences, ainsi que Frédéric DUBOIS, Professeur, tous trois travaillant au sein de l'Université de Picardie Jules Verne à Amiens, d'avoir accepté d'intégrer ce jury de thèse.

Je remercie également tous les membres du programme VEGESOL et PHYTOSOL pour leur professionnalisme et leur dévouement à ce programme. Particulièrement, je remercie Jean TASIAUX, chef de culture de la ferme de La Woestyne qui accueille la plateforme VEGESOL, pour sa collaboration avec tous les membres du projet et la réalisation des travaux agricoles sur la plateforme de recherche.

Je tiens à remercier David ROGER pour son accompagnement, sa disponibilité, son aide technique avec la conception de dispositifs expérimentaux mais également pour sa bonne humeur et son soutien tout au long de ma présence au laboratoire. Je tiens aussi à remercier Manuella CATTEROU, qui a été très présente durant la première année de ma thèse et qui m'a permis de mettre en place et de suivre les

travaux en condition contrôlée. Plus globalement, je remercie toute l'équipe VEGESOL et plus particulièrement Fabien SPICHER pour sa disponibilité et son aide technique sur le terrain, ainsi que pour son aide en statistiques.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont collaboré avec moi sur certains des projets de thèse ; Je pense particulièrement à Guillaume DECOCQ, directeur de l'unité EDYSAN, Arnaud AMELINE et Quentin CHESNAIS, du Laboratoire de Biologie des Insectes Phytophages et Entomophages (BIPE) d'EDYSAN, Yakov KUZYAKOV, professeur du département de science du sol des écosystèmes tempérés à l'Université de Göttingen pour leurs conseils judicieux et très précieux m'ayant permis d'améliorer et de structurer les articles scientifiques. Je tiens particulièrement à remercier Julien VERZEAUX, pour son aide précieuse tant pour la partie terrain que pour la partie réflexion scientifique mais aussi pour son soutien sans faille tout au long de ces années.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui m'ont aidé dans les analyses en laboratoire. Je pense tout particulièrement à Amélie CHABOT, technicienne de laboratoire dans l'enseignement, qui m'a été d'une précieuse aide dans l'acquisition des données scientifique mais qui a également été d'un réel soutien psychologique. Je remercie également les stagiaires du programme VEGESOL, Cyril GRANDJEAN, Perrine COMPTOUR, Alexane VANGRAEFSCHPEPE, Guillaume CHENU, Simon TETU pour leur dynamisme, leur motivation sans faille et leur bonne humeur au quotidien.

Un grand merci à Pierre BERREZIG, enseignant en anglais à l'université de Picardie Jules Verne, à Lyla ROTSCHILD, étudiante américaine, mais également Shan WILLIAMS, de la Maison des Langues d'Amiens, pour leurs relectures et suggestions concernant l'écriture des articles en Anglais.

Je tiens également à remercier Laurent GUTIERREZ, responsable du centre de ressources regionales en biologie moléculaire pour m'avoir chaleureusement accueilli et m'avoir permis d'utiliser le phytotron de la plateforme analytique de l'UPJV. Je remercie également Hervé Demailly, serriste de la plateforme, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

J'adresse un grand merci à tous mes collègues doctorants de l'équipe AEB pour leur accueil, leur bonne humeur et les agréables moments passés ensemble : Hazzar, Amira, Abed, Sabrina.

Je remercie toute ma famille, de m'avoir encouragée et soutenue pendant ces années de thèse.

Avant-propos

Le financement ministériel

Chaque année, le Ministère attribue à l'école doctorale des allocations de recherche pour financer un contrat doctoral de trois ans. Les allocations sont attribuées par l'école doctorale à des étudiants suite à un concours et après examen de leurs dossiers. Ces étudiants ont préalablement postulé pour un sujet de thèse prédéfini se déroulant la plupart du temps dans une équipe d'accueil universitaire. Le but étant de se consacrer pleinement aux travaux de recherche pour la préparation de la thèse. C'est à partir de ce financement que j'ai pu réaliser mes travaux de recherches. Mon sujet de thèse était le suivant : « **Impact des pratiques culturelles innovantes sur la biodiversité édaphique et ses conséquences qualitative et quantitative sur la productivité des agrosystèmes** ». L'unité Ecologie et DYnamique des Systèmes ANthropisés (EDYSAN), dirigée par Mr Guillaume DECOCQ, a été mon unité d'accueil et c'est plus particulièrement dans les locaux de l'équipe d'Agroécologie, Ecophysiologie et Biologie intégrative (AEB) que j'ai réalisé mes travaux. Mr Thierry TETU et Mr Edmundo NAVA-SAUCEDO étaient les deux porteurs du sujet de thèse, et sont devenus mes deux directeurs de thèse. Pour finir, le financement de mes travaux de recherche était soutenu en grande partie par le programme de recherche privé VEGESOL décrit ci-après.

Le programme de recherche VEGESOL

Le programme de recherche « VEGESOL » a été pensé, au cours de l'année 2008, suite à une réflexion commune autour de la nécessité de développer une agriculture responsable alliant, durabilité et productivité. Ce projet a été permis par un partenariat public/privé entre l'unité de recherche EDYSAN de l'Université de Picardie Jules Verne, dirigée par Guillaume DECOCQ et les financements privés des groupes Bonduelle, représenté par Jean Bernard Bonduelle et SYNGENTA, représenté par Gerard Thomas. La responsabilité scientifique du projet a été confiée à Thierry Tetu, initiateur du programme. Cette collaboration a permis d'étendre le projet VEGESOL sur huit campagnes agricoles (2010-2018).

La mise en place, en 2010, d'une plateforme expérimentale au lieu-dit *La Woestyne*, située à Renescure (59) signait le début du projet VEGESOL. Cette plateforme a été initiée sur un champ de 7 ha appartenant à l'entreprise BONDUELLE, et qui était initialement cultivé en culture de blé. Dans le but d'étudier **l'impact environnemental, agronomique, et économique de systèmes de culture contrastés**, le champ a été découpé en huit lignes correspondant à la rotation culturale de 8 cultures principales : haricot-vert, blé, betterave, lin, blé, maïs, pois, blé. Ces lignes ont elles mêmes été divisées en blocs (21 x 28 m) caractérisés par des pratiques culturelles contrastées : 1/ **travail du sol** : travail conventionnel (labour : « CT »), absence de travail du sol (semis-direct : « NT ») ; 2/ **doses d'intrants azotés** : dose conventionnelle selon la méthode du bilan (« NX »), dose conventionnelle réduite de 25

% (« NX-25 »), sans ajout d'intrant (« N0 ») ; 3/ **couverts végétaux en inter-culture** : couverts enrichis en légumineuses (« lcc »), couverts non enrichis en légumineuses (« cc »), absence de couverts végétaux (« bf »). Le cahier des charges initialement mis en place permettait de mesurer annuellement les teneurs en carbone organique total et en azote total du sol et des plantes principales ou d'inter-culture pour chacun des systèmes de culture et pour chaque rotation. Suite à des résultats encourageants et, à l'initiative de Thierry Tetu, d'autres analyses complètes ont été réalisées sur la plateforme et ont permis l'acquisition d'un certain nombre de résultats et à la publication de ces résultats dans des revues à comité de lecture. De plus, cette dynamique a permis également la mise en place d'un nouveau programme annexe : le programme PHYTOSOL, né grâce à un financement de SYNGENTA.

Le programme PHYTOSOL

Le programme de recherche « PHYTOSOL » a été pensé, au cours de l'année 2011, suite à une réflexion entre le groupe SYNGENTA, dirigé par Gérard THOMAS, le directeur de l'unité de recherche EDYSAN, Guillaume DECOCQ et Thierry TETU, responsable du programme VEGESOL. La parcelle expérimentale de la Woestyne, servant au programme VEGESOL, a été utilisée pour la mise en place du dispositif du programme PHYTOSOL. Ce dispositif consiste à la mise en place de bougies poreuses céramiques (lysimètres), placées à 50 cm de profondeur sous la zone de prospection racinaire, sur des micro-parcelles avec des gestions culturales différentes : 1/ labour avec couverts végétaux en inter-culture ; 2/ labour sans couverts végétaux ; 3/ semis-direct avec couverts végétaux. Ces trois pratiques culturales étaient également subdivisées en 3 modalités d'intrants azotés : 1/ NX (dose conventionnelle) ; 2/ NX-25 (dose d'azote NX réduite de 25 %) ; 3/ N0 (absence d'intrants azotés de synthèse). Les prélèvements d'eau sont réalisés deux fois par an en hiver et au printemps.

L'impact environnemental est mesuré au travers des analyses de la teneur en substances actives phytosanitaires et métabolites de dégradation dans l'eau libre du sol (récoltée à partir des lysimètres). Les molécules concernées sont toutes présentes dans des produits phytosanitaires de la gamme Syngenta et ont été utilisées au moins une fois pour les cultures en place sur les micro-parcelles choisies. Ainsi, le S-métolachlore (herbicide ici maïs et betterave) et ses métabolites majeurs ont été utilisés sur maïs en juin 2011 et en juin 2012. Le thiaméthoxam (insecticide ici en traitement de semences de maïs et pois) et ses produits de dégradation ont été utilisés lors des semis de maïs en mai 2011 et 2012. Le pinoxaden (herbicide ici en sortie d'hiver des blés) avec ses métabolites ont été utilisés en mars 2012 et en mai 2013. Enfin, les métabolites anioniques de dégradation du chlorothalonil (fongicide ici sur blés) ont été concernés par des applications sur blé au printemps 2012 et 2010/2013. Au total, 12 molécules sont donc recherchées dans l'eau du sol. Dans le cadre du projet, aucun calcul de flux de molécules dans le sol n'a été calculé et seules des concentrations dans l'eau du sol ont été dosées.

Objectifs de la thèse

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont en lien direct et indirect avec les deux programmes VEGESOL et PHYTOSOL. Ces programmes ont pour but d'étudier les effets de la gestion des pratiques agricoles sur la qualité/santé des sols en lien avec la productivité durable des agrosystèmes du Nord de la France. Ces régions, fortement industrialisées, pratiquent une agriculture dite « intensive » avec une utilisation accrue de la mécanisation, des fertilisants et des produits phytosanitaires. Afin de minimiser l'impact de l'agriculture intensive sur la qualité des sols et de l'environnement et pouvoir produire durablement, des leaders dans les domaines de l'agroalimentaire, des produits phytosanitaires mais aussi des agriculteurs s'intéressent de plus en plus aux pratiques de gestion agricole durables. C'est dans ce contexte que j'ai réalisé mon travail de thèse dont les objectifs étaient axés principalement sur les effets comparatifs de différentes pratiques agricoles intensives et durables sur des indicateurs de la qualité des sols et la productivité végétale. Il était aussi question de savoir si la combinaison des pratiques agricoles pouvait affecter le comportement des herbicides sur les indicateurs qualitatifs et d'évaluer l'utilité potentielle des interactions trophiques dans l'amélioration de la performance des agrosystèmes.

Pour cela, nous avons en premier lieu étudié dans des conditions contrôlées en mésocosme les effets de la fertilisation azotée minérale de long terme et d'un herbicide total (le glyphosate) sur quelques indicateurs physico-chimiques et biologiques de la qualité du sol, ainsi que sur la productivité végétale et les relations trophiques entre le sol, la plante et les herbivores phytophages (2 publications scientifiques). Puis, nous avons étudié dans des conditions au champ les effets de trois types de pratiques agricoles : le travail du sol, la fertilisation azotée et la couverture végétale sur certains des indicateurs édaphiques de la qualité du sol (2 publications scientifiques). Enfin, nous nous sommes attachés à évaluer, au champ, les effets d'un herbicide sélectif (le S-metolachlore) sur des indicateurs édaphiques de la qualité des sols et la productivité végétale dans des systèmes de gestion agricole différenciés (1 publication scientifique). Le chapitre I est une synthèse bibliographique des connaissances actuelles sur les thématiques abordées dans les différents articles présentés dans les chapitres II, III, et IV. Le chapitre V est une discussion générale.

1. La gestion de deux intrants de synthèse : l'azote de synthèse et le glyphosate. Quels effets ont ils sur la santé des sols, la productivité végétale et quelles sont les interactions trophiques impactées ?

Dans le chapitre II, nous avons cherché à étudier les effets de deux intrants de synthèse sur certains indicateurs clés de la qualité du sol dans des conditions contrôlées. Les intrants de synthèse choisis étaient i. Le glyphosate est un herbicide non sélectif qui est le plus utilisé en agriculture à

l'échelle mondiale ; ii. La fertilisation azotée de synthèse, utilisée par les agriculteurs dans la plupart des grandes cultures. Pour cela, nous avons fait deux études distinctes en mésocosme. La première étude (partie 1) permettait d'évaluer si l'historique de fertilisation azotée pouvait affecter les réponses microbiennes à court terme et le contenu en éléments nutritifs lorsque le sol était soumis à différentes concentrations de glyphosate. La deuxième étude (partie 2) a permis d'affiner les investigations en évaluant les systèmes tri-trophiques sol, plante, ravageur aérien. Cette deuxième étude a donc permis d'évaluer les effets de l'application simultanée du glyphosate et de la fertilisation azotée sur les facteurs édaphiques, la productivité végétale et les conséquences sur les relations de type « bottom-up » entre les milieux souterrain et aérien. Ce chapitre est basé sur la mise en place de deux premières études dites « fondamentales » puisqu'elles nous ont permis de mettre en évidence les indicateurs physico-chimiques et biologiques sensibles aux pratiques agricoles tout en nous affranchissant des contraintes liés aux études applicatives menées en conditions de plein champ.

2. La gestion de trois pratiques culturales : le travail du sol, les couverts végétaux et la fertilisation azotée. Quels effets ont-ils sur les indicateurs qualitatifs du sol ?

Dans le chapitre III, nous avons cherché à comparer les effets de des pratiques culturales sur certains indicateurs édaphiques de la qualité du sol en conditions de plein champ. Dans la première étude (partie 1), deux pratiques culturales étaient sélectionnées : 1. Le travail du sol (labour versus semis-direct) ; 2. La fertilisation azotée minérale (sol fertilisé conventionnellement versus sol non fertilisé). Dans la deuxième étude (partie 2), trois Les pratiques culturales étaient combinées : 1. le travail du sol (labour vs semis-direct) ; 2. Les couverts végétaux en inter-culture (sol nu vs sol enrichi en légumineuses vs sol enrichi en non légumineuses) ; 3. La fertilisation azotée (sol fertilisé conventionnellement vs sol non fertilisé). Les indicateurs qualitatifs sélectionnés pour ces deux études étaient les spores de mycorhizes, les activités enzymatiques du sol, les profils physiologiques des communautés bactériennes bactériennes, les teneurs en carbone, azote et phosphore du sol. Ce chapitre se fonde sur la mise en place d'une première étude applicative au champ. Elle a permis notamment de déterminer les effets de la fertilisation azotée sur certains des indicateurs édaphiques de qualité des sols, sélectionnés à partir du chapitre précédant, dans des agrosystèmes différenciés. Cette étude applicative nous a permis de prendre en compte l'influence des variations pédoclimatiques dans la sensibilité des indicateurs édaphiques mais aussi de comparer les pratiques culturales en fonction de leurs effets négatifs sur la qualité du sol.

3. Le devenir d'un herbicide, le S-metolachlore, dans des agrosystèmes différenciés par le mode de travail du sol et le régime de fertilisation azotée. Effets de l'association des pratiques culturales sur les indicateurs qualitatifs du sol, la productivité végétale et leurs interactions.

Dans le chapitre IV, nous avons cherché à comparer les effets d'un herbicide sélectif sur certains indicateurs édaphiques de la qualité du sol et la productivité végétale dans des conditions au champ. Pour cela, une étude expérimentale a permis de mettre en évidence les effets de deux apports de S-Metolachlore sur les indicateurs qualitatifs du sol étaient différents selon le type de gestion agricole, et quelles étaient les répercussions sur la productivité végétale. Le choix de l'herbicide sélectif (S-Metolachlore) s'est fait en fonction des programmes classiques réalisés par les agriculteurs en condition réelle. Le S-Metolachlore est un herbicide sélectif du maïs (*Zea mays*) et c'est pourquoi nous l'avons sélectionné pour cette étude.

En ajoutant le S-Metolachlore dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence les interactions entre les pratiques culturales et leurs effets synergiques, neutres ou négatifs sur la qualité biologique du sol, la productivité végétale et les interactions sol-plante. Cette étude vient compléter les précédents chapitres (II et III) en apportant une réponse plus globale dans des conditions de plein champ. D'une façon globale, nous mettons en évidence que ce sont essentiellement les synergies ou antagonismes de combinaisons de pratiques culturales qui, via des modifications des indicateurs qualitatifs du sol, modifient les impacts initiaux des herbicides dans les agrosystèmes.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Remerciements | 4 |
| Avant-propos | 6 |
| Le financement ministériel | 6 |
| Le programme de recherche VEGESOL | 6 |
| Le programme PHYTOSOL | 7 |
| Objectifs de la thèse | 8 |
| Index des Figures | 14 |
| Introduction générale | 16 |
| Références bibliographiques | 23 |
| Chapitre I. Synthèse bibliographique | 25 |
| 1. La gestion des pratiques culturales pour atténuer la dégradation des sols, restaurer leur qualité et limiter les pollutions environnementales | 26 |
| 1.1. <i>Gestion du travail du sol et des couverts végétaux pour atténuer l'érosion et stocker le carbone organique des sols</i> | 27 |
| 1.2. <i>Gestion des intrants de synthèse pour améliorer la santé du sol et limiter les contaminations environnementales.</i> | 31 |
| 2. Evaluation de la qualité et de la santé des sols par l'utilisation des indicateurs physico-chimiques et biologiques sensibles à la gestion des pratiques culturales. | 37 |
| 2.1. <i>Les indicateurs physico-chimiques jouent un rôle dans les transformations des éléments nutritifs</i> | 38 |
| 2.2. <i>Les indicateurs biologiques jouent un rôle dans la santé des sols et la productivité végétale</i> | 44 |
| 3. Interactions trophiques entre les biotes souterrains et aériens. Quels sont les effets de la gestion des pratiques culturales sur ces interactions écologiques ? | 54 |
| Références bibliographiques | 59 |
| Chapitre II. Effets de la gestion de la fertilisation azotée et du glyphosate sur les paramètres édaphiques et aériens et sur les interactions trophiques aériennes et souterraines | 79 |
| <i>Partie 1. Article 1 : L'historique de la fertilisation azotée affecte-t-il, à court terme, les réponses microbiennes et les teneurs en nutriments dans les sols soumis à différentes concentrations en glyphosate ?</i> | 80 |

| | |
|---|-----|
| Partie 2. Article 2 : Effets de l'application du glyphosate et de la fertilisation azotée sur les facteurs édaphiques et aériens et les conséquences sur les interactions aériennes et souterraines. | 105 |
| Résumé des principaux résultats du chapitre II | 134 |
| Chapitre III. Effets de la gestion du travail du sol, des couverts végétaux et de la fertilisation azotée sur la réponse fonctionnelle microbienne édaphique | 135 |
| <i>Partie 1. Article 3.</i> L'abondance de spores de champignons mycorhiziens arbusculaires est favorisée par 6 années de non-labour et est corrélée avec les paramètres environnementaux dans un sol limono-argileux | 136 |
| <i>Partie 2. Article 4 :</i> Réponse fonctionnelle microbienne édaphique au travail du sol, à la couverture végétale et à la fertilisation azotée | 149 |
| Résumé des principaux résultats du chapitre III | 169 |
| Chapitre IV. Effets de la gestion de la fertilisation azotée et du travail du sol sur les propriétés édaphiques et aériennes et sur le devenir de l'herbicide S-Metolachlore | 170 |
| Article 5. La gestion du travail du sol et de la fertilisation azotée change-t-elle les potentiels effets de l'herbicide S-Metolachlore sur les propriétés édaphiques et la la productivité du maïs ? | 171 |
| Résumé des principaux résultats du chapitre IV | 194 |
| Chapitre V. Discussion générale | 195 |
| 1. Sensibilité des indicateurs vis à vis des pratiques culturales et effets sur la qualité du sol et de son environnement | 197 |
| <i>1.1. La sensibilité des indicateurs déterminée par les effets positifs, neutres ou négatifs induits par les pratiques agricoles</i> | 197 |
| <i>1.2. Les effets individuels des pratiques de gestion sur les indicateurs qualitatifs</i> | 201 |
| 2. Effets des combinaisons de pratiques sur la qualité du sol, la productivité végétale et les interactions trophiques aériennes et souterraines | 211 |
| <i>2.1. Effets des combinaisons de pratiques sur les paramètres souterrains et aériens</i> | 211 |
| <i>2.1.1. Effets négatifs de la combinaison de deux pratiques culturales</i> | 211 |
| <i>2.1.2. Effets neutres ou synergiques de deux pratiques culturales combinées</i> | 212 |
| <i>2.2. Interactions trophiques</i> | 214 |
| Références bibliographiques | 218 |

| | |
|----------------------------|------------|
| Conclusion générale | 223 |
| Annexes 1. Posters | 226 |
| Annexe 2. Publications | 230 |

Index des Figures

- Fig. 1.** Frise chronologique des évolutions, révolutions agricoles depuis le paléolithique jusqu'à nos jours
- Fig. 2.** Evolution des rendements (en quintaux/ ha) de 1800 à 2005 en fonction du développement de la mécanisation et de l'agrochimie.
- Fig. 3.** Schématisation des effets (rectangle du haut) de quatre pratiques de gestion agricoles (A. travail du sol, B. couverts végétaux d'inter-culture, C. fertilisation azotée, D. herbicides) pouvant influencer les relations trophiques (rectangle du bas) sol/plante/pucerons.
- Fig. 4.** Schéma illustrant les différents compartiments de l'agrosystème abordés au cours de la thèse. Les pratiques culturales.
- Fig. 5.** Interactions entre la dégradation, la résilience et la qualité du sol influencées par les méthodes de travail du sol et de couverture végétale.
- Fig. 6.** Simulation des changements des teneurs en carbone total du sol (0-20cm) selon les pratiques agricoles dans une région des Etats-Unis cultivée avec du maïs
- Fig. 7.** Consommation annuelle mondiale d'azote (N), phosphore (P₂O₅), potassium (K₂O) dans les intrants de synthèse
- Fig. 8.** Estimation des risques potentiels de contamination des nappes par lixiviation des pesticides à l'aide d'un modèle numérique simple pour une situation pédo-climatique donnée. Le niveau de risque élevé correspond à des résultats simulant un transfert d'au moins 0,1 % de la quantité appliquée à plus de 3 mètres de profondeur.
- Fig. 9.** Processus impliqués dans le devenir des pesticides dans les sols conditionnant leur disponibilité et par conséquent conditionnant leur caractère polluant.
- Fig. 10.** Schéma illustrant les différents compartiments de l'agrosystème abordés au cours de la thèse. Les indicateurs qualitatifs souterrains et aériens.
- Fig. 11.** « Loi du minimum » énoncée par Liebig pour la croissance des plantes pouvant être illustrée par un baril sur lequel chaque planche de bois représente un nutriment nécessaire pour la croissance des plantes.
- Fig. 12.** Cycle du carbone en lien avec le climat, la gestion des pratiques culturales et les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol.
- Fig. 13.** Cycles de (A) l'azote et (B) du phosphore qui participent aux gains ou pertes en terme de fertilité du sol et de contaminations environnementales.

- Fig. 14.** Contributions directes ou indirectes des organismes édaphiques et aériens à la formation des agrégats du sol par association des particules minérales et de la matière organique.
- Fig. 15.** Schéma illustrant les différents compartiments de l'agrosystème abordés au cours de la thèse. Les relations trophiques
- Fig. 16.** Les communautés en surface sont affectées à la fois par les conséquences directes et indirectes des organismes de la chaîne alimentaire du sol.
- Fig. 17.** Effets de la gestion de deux intrants agrochimiques : l'azote de synthèse et le glyphosate sur les indicateurs édaphiques de la qualité de sols.
- Fig. 18.** Effets de la gestion de deux produits agrochimiques : l'azote de synthèse et le glyphosate sur les indicateurs édaphiques qualitatifs, la productivité végétale et les interactions trophiques.
- Fig. 19.** Schéma récapitulatif qui illustre les grandes tendances des effets des pratiques agricoles sur les indicateurs mesurés pour les articles 1 et 2 de la thèse.
- Fig. 20.** Effets de la gestion de deux pratiques culturales, le travail du sol et la fertilisation azotée sur les indicateurs qualitatifs du sol.
- Fig. 21.** Effets de la gestion de trois pratiques culturales, le travail du sol, les couverts végétaux et la fertilisation azotée sur les indicateurs qualitatifs du sol.
- Fig. 22.** Schéma récapitulatif qui illustre les grandes tendances des effets des pratiques agricoles sur les indicateurs mesurés pour les articles 3 et 4 de la thèse.
- Fig. 23.** Effets de la gestion du travail du sol et de la fertilisation azotée sur le devenir du S-metolachlore et sur les indicateurs qualitatifs du sol, la productivité végétale et leurs interactions.
- Fig. 24.** Schéma récapitulatif qui illustre les grandes tendances des effets des pratiques agricoles sur les indicateurs mesurés pour l'article 5 de la thèse.
- Fig. 25.** Schéma résumant la sensibilité des indicateurs vis-à-vis des pratiques de gestions agronomiques issues des articles de ce manuscrit de thèse ainsi que les interactions et impacts qui peuvent se produire dans un sol.
- Fig. 26.** Schéma récapitulatif qui illustre les grandes tendances des effets des pratiques agricoles sur les indicateurs mesurés pour les 5 articles de la thèse.
- Fig. 27.** Représentation schématique des interactions plantes-insectes-bactéries.

INTRODUCTION GENERALE

« A nation that destroys its soil destroys itself. »

Franklin D. Roosevelt, *32^{ème} président des Etats-Unis, 1937*

Introduction générale

L'histoire de l'agriculture est fondée sur des évolutions, révolutions qui remontent au paléolithique (Fig. 1).

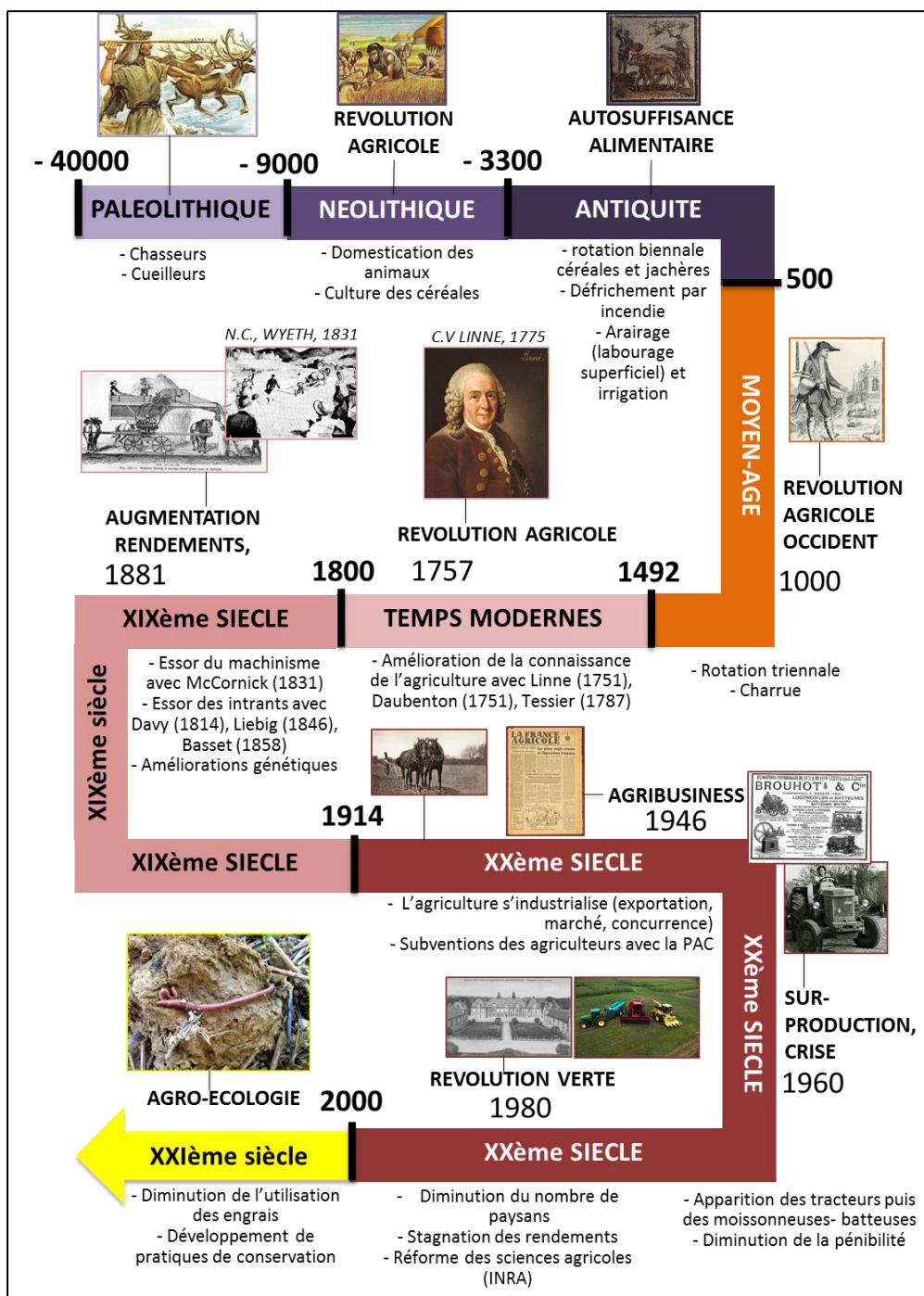


Fig. 1. Frise chronologique des évolutions, révolutions agricoles depuis le paléolithique jusqu'à nos jours (E. NIVELLE).

La première évolution majeure dans l'histoire de l'agriculture est la « révolution néolithique » qui se traduit par une transition de l'Homme nomade et prédateur avec une économie fondée sur la chasse, la pêche et la cueillette à l'Homme sédentaire et producteur avec une économie fondée sur la domestication des animaux, le semis et la sélection des espèces cultivées. Le préhistorien Jacques Cauvin (1998) définit cette révolution comme le "début des premières manipulations par notre espèce de son milieu naturel", auparavant, l'impact anthropique était limité et le problème de durabilité pour les premiers chasseurs-cueilleurs n'existait pas. A ce propos et en se fondant sur les travaux de Gordon Childe (1930), Callens (1998) écrit que cette révolution du néolithique était avant tout climatique, en lien avec la dernière grande période glaciaire, et Cauvin (1998) d'ajouter : « le passage à l'agriculture n'était pas, à ses débuts, une réponse à un état de pénurie ».

La seconde évolution de l'agriculture date de l'époque antique pendant laquelle l'Homme utilise des outils dans le but de faciliter son travail dans les champs. Par exemple, certaines civilisations ont mis au point les techniques d'irrigation, qui consistent à apporter de l'eau des fleuves ou des crues sur un terrain cultivé, pendant que d'autres civilisations ont mis au point la technique d'araillage, qui consiste à préparer le sol aux semis à l'aide d'un soc en bois ou en fer (ébauche de la charrue). Par ailleurs, cette dernière technique a rapidement évolué en étant complété par un semoir qui permis d'augmenter de moitié les rendements céréaliers par rapport aux semis à la volée. De plus, l'agriculture de l'antiquité a été marquée par la première dégradation des milieux naturels avec l'utilisation de l'incendie volontaire permettant de défricher les sols (Amouretti et Comet, 1993). Dès l'Antiquité, l'homme est déjà confronté aux conséquences de la pression qu'il exerce sur la nature et l'augmentation croissante de sa population. En Europe, le moyen-âge marque une nouvelle évolution car elle entraîne de nombreuses innovations dans le domaine agricole dont l'une des plus importantes est la charrue. Elle permet dès le VIII^e siècle la mise en culture des sols lourds et argileux de l'Europe du Nord. La charrue est un outil lourd qui nécessite des attelages de bœufs puis de chevaux permettant progressivement d'alléger le travail du paysan. D'autres innovations viendront compléter cette révolution agricole médiévale. Par exemple, le fumier des animaux était utilisé pour amender les champs et la herse, qui ne servait jusqu'alors qu'à désherber, était utilisée pour recouvrir les semis. De plus, l'assolement triennal est mis en place afin d'associer la culture des céréales et l'élevage des bovins (Duby, 1962). L'historien Jacques Heers (1965) souligne une amélioration des conditions de vie des paysans avec une alimentation relativement riche et variée dans les campagnes médiévales d'Occident. Cependant, si le développement de la métallurgie permet d'améliorer considérablement l'équipement agricole, elle entraîne également le développement de techniques « non durables » avec l'utilisation de matériaux non renouvelables (Baddache, 2010).

Les catastrophes naturelles du moyen-âge entraîneront l'adoption de premières mesures en faveur de l'environnement comme la protection des forêts par Philippe VI de Valois en 1346. Mais c'est seulement à partir de 1650, que débute en Europe une nouvelle évolution agricole basée sur l'apparition de travaux

pionniers en agronomie favorisant un nouveau mode de production. En effet, des visionnaires agronomes comme par exemple Olivier de Serres, qui publie un essai en 1599 « Théâtre d'Agriculture et Mesnage des Champs » inspiré de ses propres expérimentations et dans lequel il préconise la suppression de la jachère et son remplacement par un semis de légumineuses comme la luzerne, plante riche en azote qui restaure la fertilité des sols et permet d'alimenter le bétail. Cependant l'historien Jacques Heers (1965) écrivait que ce progrès agronomique n'était pas linéaire avec une situation alimentaire pour les paysans qui continuait à se détériorer.

Selon un article de l'Encyclopédie « Botanique », écrit en 1751, les innovations techniques basées sur la « mécanique du laboureur » n'ont fait aucun progrès jusqu'au début du XVIIIe siècle. Il faut attendre le Siècle des Lumières pour voir une nouvelle évolution agricole, avec la volonté d'améliorer l'agriculture en faisant usage de la science. Ainsi, en 1757, la première société royale d'agriculture, du commerce et des arts est fondée par les Etats de Bretagne avec l'émergence de nouveaux auteurs qui ambitionnent d'améliorer l'agriculture par la recherche en s'appuyant à la fois sur l'étude des phénomènes naturels et le savoir faire pratique et technique des paysans (Denis, 1994). Une concurrence se met alors en place entre chimistes (Home, 1757; Fourcroy, 1782) et naturalistes (Linne, 1751; Daubenton, 1751) afin de s'accaparer cette nouvelle discipline.

Cela marque un tournant dans la révolution industrielle du XIXe siècle avec le développement de nouveaux domaines agricoles comme l'économie, la chimie ou encore la botanique. Ainsi, dans la continuité des travaux des naturalistes, se développe la stratégie de l'acclimatation des espèces étrangères intéressantes économiquement et la création de nouvelles « variétés » qui aboutiront finalement aux résultats des travaux des sélectionneurs. Certains chimistes de ce même siècle, Davy (1814), Liebig (1846), ou encore Basset (1858), affirment que les sciences agricoles doivent avoir recours aux sciences chimiques, accompagnant ainsi le développement de l'industrie et du commerce des engrais. A l'inverse Chaptal (1823), pense que les lois chimiques qui régissent l'inerte doivent être séparées des lois vitales qui régissent le vivant, autorisant une certaine autonomie de la science de l'agriculture par rapport à la chimie. Pendant ces mêmes années, en 1876, une circulaire adressée aux préfets a été introduite par le ministère de l'Agriculture, elle stipule : « l'introduction d'un matériel perfectionné dans une ferme (...) est véritablement une œuvre de progrès et d'humanité et c'est ce but que le Gouvernement de la République s'attache à poursuivre ». L'introduction de la mécanisation, voit le nombre de paysans diminuer alors que la taille des exploitations tend à augmenter. Ce phénomène est permis par l'apparition de la motorisation avec l'introduction de la moissonneuse en France par Mc Cormick (1851), puis des premiers tracteurs à moteur à explosion (1875).

La révolution industrielle a permis le développement de la mécanisation et l'utilisation des engrais, puis au XXe siècle c'est le développement des pesticides de synthèse qui débute (Zeidler, 1874; Muller, 1939), profitant du développement de la chimie organique et de la recherche sur les armes chimiques

pendant la première guerre mondiale. Ces innovations techniques et chimiques permettent aux campagnes d'accéder à l'autosuffisance alimentaire tout en limitant la pénurie de main-d'œuvre, attirée en ville par la révolution industrielle (Lefebure & Baraton, 2006). La mécanisation, l'utilisation des engrais et des pesticides deviennent une des priorités du plan Monnet. Se mettent en place alors les groupes internationaux qui approvisionnent les nouvelles coopératives, elles-mêmes soutenues par les banques. Pour répondre à la demande grandissante, l'informatique et la technologie s'accaparent une partie du marché agricole. L'ensemble de cette révolution a conduit à la fois à l'augmentation très importante des gains de productivité mais aussi à la dégradation des sols et de la biodiversité (Fig. 2). Avec l'utilisation massive des ressources fossiles qui va de paire avec la dégradation de l'environnement et l'épuisement des ressources naturelles, le XXIe siècle ouvre une nouvelle ère évolutionnaire que l'on pourrait qualifier de révolution agro-écologique.

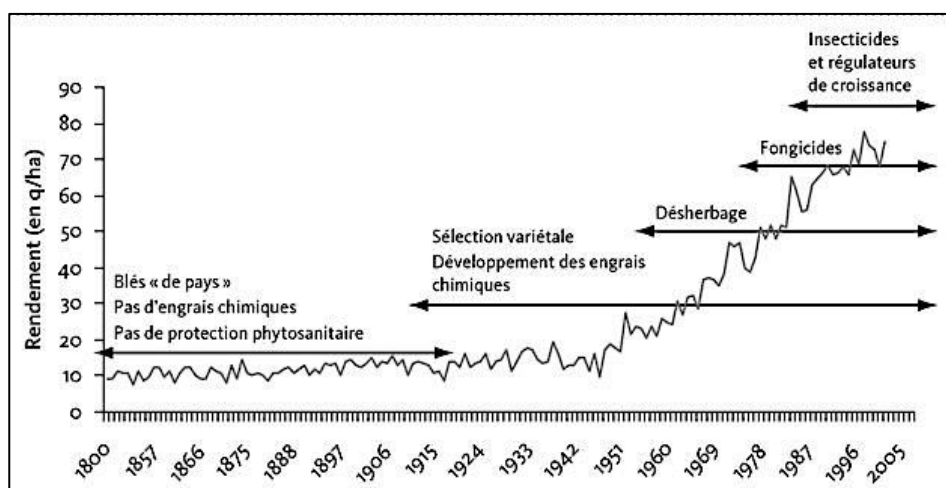


Fig. 2. Evolution des rendements (en quintaux/ ha) de 1800 à 2005 en fonction du développement de la mécanisation et de l'agrochimie (issue de Abecassis & Bergez, 2009).

L'agriculture, par l'intensification des modes de production alimentaire, a donc favorisé la croissance des populations humaines depuis le néolithique, il y a 10 000 ans, mais a aussi transformé les écosystèmes de la planète avec la surexploitation des terres et l'utilisation massive d'intrants et de pesticides. En effet, les scientifiques ont mis en évidence que ce mode de production intensive a mis en péril la biodiversité et la santé humaine, en étant responsable à la fois de la pollution des sols, des nappes phréatiques et des cours d'eau souterrains ainsi que de la désertification des sols (Robertson et al., 2000; Horrigan et al., 2002; Beaudoin et al., 2005). Compte tenu de l'accroissement démographique actuel et futur et des conséquences de l'agriculture intensive sur l'environnement et le réchauffement climatique, le défi d'aujourd'hui et de demain consiste et consistera à adopter des nouvelles stratégies de gestion agricole plus durables. Les pratiques culturales, telles que le travail du sol, les couverts végétaux en inter-culture, la fertilisation ou encore les pesticides, font partie intégrante des décisions de gestion que les chercheurs et agriculteurs doivent intégrer dans le but de conserver les sols et protéger

l'environnement et la santé humaine. Selon Lal et al. (2011), il est impératif de mettre l'accent sur la façon dont les décisions peuvent contribuer à l'atténuation et à l'adaptation au changement climatique en utilisant des pratiques durables. Ces pratiques permettront à la fois de réduire l'érosion des sols, de limiter la perte de biodiversité et de contribuer au maintien de la santé du sol et de la productivité végétale. Ce sont les choix des pratiques culturales, qui, en maximisant la production agricole tout en minimisant les effets sur la qualité des sols et de l'eau, qui permettront aux systèmes agricoles d'être plus durables et assureront la sécurité alimentaire.

Nombre de chercheurs, dont Pankhurst et al. (1997), ont montré il y a une vingtaine d'années des liens directs entre les activités de gestion anthropique et la durabilité des systèmes en lien avec les changements climatiques, les ressources en eau, en sol et les impacts potentiels sur la production et la sécurité alimentaire (Godfrey et al., 2010). Quinn (1993) a montré que les problèmes de durabilité sont le résultat de l'abandon des principes écologiques pour nourrir les Hommes qui se considèrent non soumis aux lois de la nature. Aujourd'hui la Science doit être au service de l'humanité et des écosystèmes dont elle dépend (Doran & Safley, 1997). Le sol est une ressource vivante dont « l'état de santé » est crucial à la fois pour la production des denrées alimentaires et pour l'équilibre et les services des écosystèmes (Doran et al., 1996). La qualité des sols détermine la durabilité des systèmes agricoles (Acton & Gregorich, 1995), la qualité de l'environnement (Pierzynski et al., 1994), la santé des plantes, des animaux et des Hommes (Habern, 1992), ainsi que la résilience des systèmes (i.e. sensibilité des agrosystèmes à des contraintes extérieures, principalement d'origine anthropique, et l'aptitude de ces agrosystèmes à retourner à l'état initial). La santé des sols peut être définie selon sa capacité de fonctionner dans le temps. La gestion de l'utilisation des terres, par la mise en place de pratiques culturales intensives, influence les services écosystémiques du sol et donc sa capacité à produire durablement. La prise en compte d'approches pour évaluer la qualité et la santé du sol par la détermination de bio-indicateurs a permis et permettra aux chercheurs d'orienter les agriculteurs vers la mise en place de pratiques culturales durables. En d'autres termes, les décisions de gestion et d'utilisation des terres qui pèsent sur la santé des sols doivent être prises en s'appuyant sur différents indicateurs souterrains et aériens, qui réalisent des fonctions multiples dans les sols, et non sur des indicateurs uniques, qui réalisent des fonctions uniques, comme la productivité des cultures.

Dans ce manuscrit, je commencerai par un premier chapitre qui présentera sous la forme d'un état de l'art : 1/ la gestion des pratiques culturales permettant de restaurer la qualité et d'atténuer, voire stopper, la dégradation des sols ; 2/ le choix des indicateurs édaphiques et aériens qui réalisent de multiples fonctions dans les sols et permettent d'évaluer sa qualité ; 3/ Les effets des pratiques culturales sur les indicateurs édaphiques et 4/ Les conséquences de ces effets sur les indicateurs aériens. Le deuxième chapitre présentera une étude menée dans des conditions contrôlées, en mésocosme et sera divisée en deux sous-parties. La première sous-partie de ce chapitre consistera à évaluer le rôle de la

fertilisation azotée sur les effets non ciblés du glyphosate sur les indicateurs édaphiques. La seconde sous-partie de ce chapitre permettra à la fois d'identifier les effets de la gestion du glyphosate et de la fertilisation azotée sur les indicateurs édaphiques, aériens et leurs interactions respectives. Le troisième et le quatrième chapitre seront consacrés à des études de terrain. Le troisième chapitre sera focalisé sur les combinaisons des pratiques culturales : le travail du sol, les couverts végétaux et la fertilisation azotée et leurs effets sur les indicateurs édaphiques : les spores de mycorhizes, la réponse fonctionnelle des communautés microbiennes, le carbone, l'azote et le phosphore du sol. Le quatrième chapitre sera consacré à l'étude de trois pratiques culturales : le travail du sol, la fertilisation azotée et l'herbicide S-metolachlore, ainsi que leurs effets sur les indicateurs édaphiques, aériens et leurs interactions. Pour finir, le chapitre cinq sera une discussion des résultats obtenus, et abordera les perspectives issues de l'ensemble de ces études (Fig. 3).

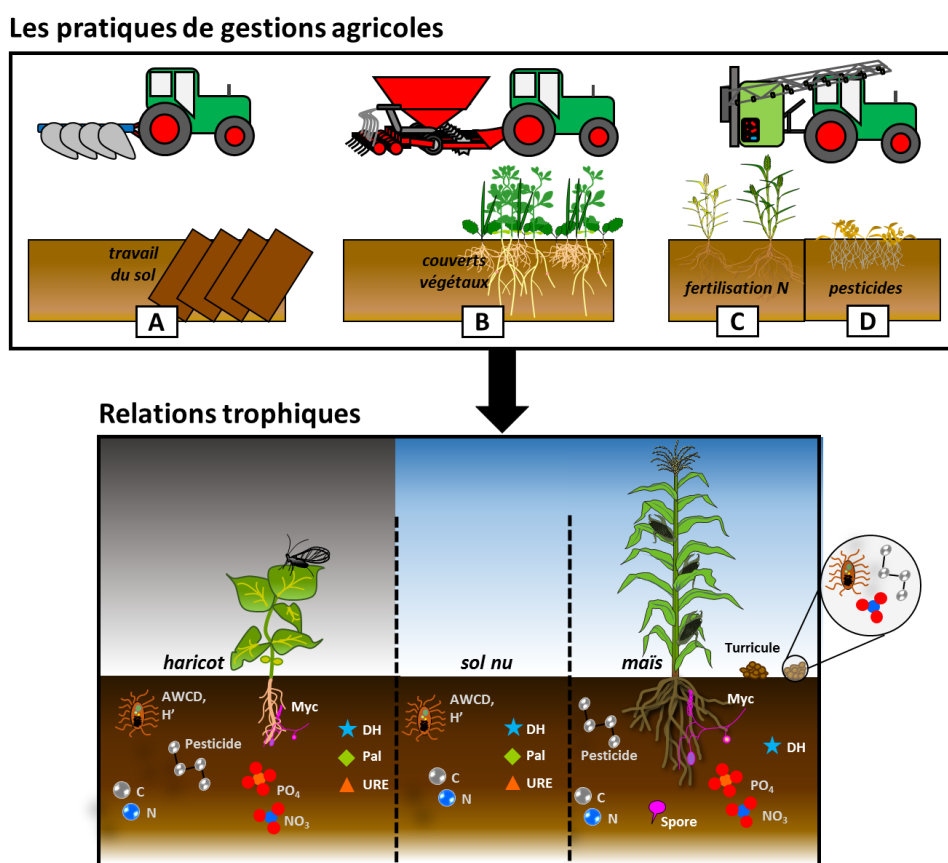


Fig. 3. Schématisation des effets (rectangle du haut) de quatre pratiques de gestion agricole (A. travail du sol, B. couverts végétaux d'inter-culture, C. fertilisation azotée, D. herbicides) pouvant influencer les fonctions physicochimiques et biologiques (rectangle du bas) dans les agrosystèmes.

Références bibliographiques

- Abecassis J., Bergez J. 2009. Les filières céréalières : organisation et nouveaux défis, Éditions Quae.
- Acton, D.F., Gregorich, L.J. 1995. The health of our soils: Toward sustainable agriculture in Canada. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa.
- Amouretti, A.C., Comet, G. 1993. Hommes et techniques de l'Antiquité à la Renaissance, Ed. Armand Colin.
- Badache, F. 2010. Le développement durable. Collection Eyrolles Pratique.
- Beaudoin, N., Saad, J.K., Laethem, C.V., Machet, J.M., Maucorps, J., Mary, B. Nitrate leaching in intensive agriculture in Northern France: Effect of farming practices, soils and crop rotations. *Agr. Ecosyst. Environ.* 111: 292-310.
- Callens, S. 1998. Développement durable et territoires. In « *Cauvin, J. Naissance de l'agriculture, Paris, CNRS éditions, pp. 302.* ».
- Cauvin, J. 1998. Naissance de l'agriculture. Paris, CNRS éditions, pp. 302.
- Denis, G. 1994. Les maladies des plantes, 1750-1800, controverses et dominances. Thèse Univ. Paris-I, pp. 1300.
- Doran, J.W., Sarrantoni, M., Liebig, M. 1996. Soil health and sustainability. In « *Sparks, D.L. ed. Advances in Agronomy, 56, Academic Press, New York* ».
- Doran, J.W., Safley, M. 1997. Defining and assessing soil health and sustainable productivity. In « *Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.), Biological Indicators of Soil Health. CAB International, Wallingford, pp. 250-256* ».
- Duby, G. 1962. L'économie rurale et la vie des campagnes dans l'Occident médiéval, Flammarion.
- Godfrey, H.C.J., J.R. Beddington, I.R. Crute, L. Haddad, D. Lawrence, J.F. Muir, J. Pretty, S. Robinson, S.M. Thomas, and C. Toulmin. 2010. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327:812-818.
- Habern, J. 1992. Viewpoint: a soil health index. *J. Soil Water Conserv.* 47: 6.
- Heers, J. 1965. Le travail au Moyen Âge.
- Horrigan, L., Lawrence, R.S., Walker, P. 2002. How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environ. Health Perspect.* 110(5): 445-456.

Lal, R., Delgado, J.A., Groffman, P.M., Millar, N., Dell, C., Rotz, A. 2011. Management to mitigate and adapt to climate change. *J. Soil Water Conserv.* 66(4): 276-285.

Pankhurst, C., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. 1997. Biological indicators of soil health. CAB International, pp 1-28.

Pierzynski, G.M., Sims, J.T., Vance, G.F. 1994. Soils and environmental quality. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Quinn, D. 1993. *Ishmael*. Bantam Books, New York.

Robertson, G.P., Paul, E.A., Harwood, R.R. 2000. Greenhouse gases in intensive agriculture: Contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science*, 289: 1922-1925.

CHAPITRE I.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

« Notre agriculture n'arrivera à tout son développement que guidée, conseillée par la science ; c'est à celle-ci de marcher en avant, de surmonter les obstacles, d'aplanir la voie et de la rendre d'un parcours assez facile pour que l'on n'hésite pas à l'y suivre: trouver, répandre, appliquer, telle est la devise du savant qui se voue aux études agronomiques. »

Pierre Paul Déhérain, *agronome français*, 1874

Chapitre I. Synthèse bibliographique

1. La gestion des pratiques culturales pour atténuer la dégradation des sols, restaurer leur qualité et limiter les pollutions environnementales

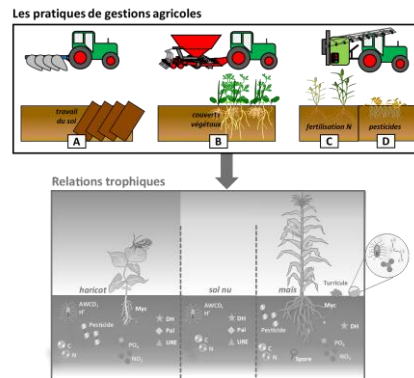


Fig. 4. Schéma illustrant les différents compartiments de l'agrosystème abordés au cours de la thèse. Les pratiques culturales. Cf. Figure 3 page 22.

La qualité d'un sol est requise pour la production durable des cultures alimentaires destinées à nourrir une population humaine qui devrait atteindre les 10 milliards en 2050 (INED, 2015 ; Glenn et al., 2014). Pendant des siècles et plus particulièrement pendant la période industrielle, les Hommes ont exploité le sol sans penser aux conséquences environnementales et humaines. En effet, les Hommes ont souvent réduit la définition du sol à un simple support physique inerte. Mais en réalité, le sol régit diverses fonctions éco-systémiques essentielles telles que la décomposition, la transformation des déchets organiques, la médiation des cycles nutritifs et influence des populations d'organismes qui en dépendent (Singh & Ryan, 2015). Le sol n'est donc pas un support inerte, il est la base d'un cycle de vie sur notre planète (Soltner, 1972). Pourtant, l'expansion et l'intensification de la culture sont parmi les changements mondiaux prédominants de ce siècle (Matson et al., 1997). L'intensification de l'agriculture par les systèmes intensifs du labour, l'absence de couverts végétaux et l'ajout de produits chimiques a causé à la fois l'érosion du sol à grande échelle (Govers et al., 1996) et la perte de carbone dans les sols (Khan et al., 2007) mais a aussi contribué à modifier les interactions biotiques et les modes de disponibilité des ressources dans les écosystèmes (Matson et al., 1997). L'utilisation de stratégies de gestion écologiques peut accroître la durabilité de la production agricole, l'objectif de ces gestions étant de restaurer la qualité des sols pour en atténuer sa dégradation. Alors que les rendements des cultures ont été l'objectif prioritaire dans le passé, c'est aujourd'hui la durabilité des systèmes qui est devenue l'objectif prioritaire face à la sensibilisation de l'accroissement démographique et au potentiel limité des terres à produire toujours plus (Singh & Ryan, 2015). Dans cette partie, nous allons présenter les principales pratiques culturales qui ont été expérimentées au travers ma thèse.

1.1. Gestion du travail du sol et des couverts végétaux pour atténuer l'érosion et stocker le carbone organique des sols

Travail du sol. La dégradation des sols et la diminution de la productivité constituent une menace pour la durabilité agricole (Lal, 1993). Les méthodes de travail du sol et de couverture végétale font partie intégrante de la gestion agronomique. Elles permettent de savoir si elles affectent l'utilisation durable des ressources du sol par leur influence sur la stabilité, la résilience et la qualité du sol. La stabilité du sol désigne sa capacité à « subir » des changements sous des perturbations naturelles ou anthropiques. La résilience du sol se réfère à la capacité du sol à restaurer ses processus biologiques et écologiques après une perturbation (Lal, 1997). Le concept de qualité du sol a été suggéré par plusieurs auteurs (Karlen et al., 1994b) comme un outil d'évaluation de la durabilité à long terme des pratiques agricoles.

De plus, l'accélération du réchauffement climatique est aujourd'hui considérée comme une menace pour nos sociétés et les sociétés futures. C'est un problème majeur dont les causes premières sont liées aux activités anthropiques. Or, de nombreux chercheurs ont mis en évidence que l'intensification de l'agriculture était un facteur important pouvant influencer à la fois les émissions de gaz à effet de serre et le stockage de carbone dans les sols (Metherell et al., 1995). Une stratégie importante consiste à restaurer les terres dégradées par l'érosion et à trouver des pratiques écologiquement intensives pour la production agricole permettant d'atténuer l'effet de serre et de stocker le carbone dans les sols (Lal, 1993, 1997) (Fig. 5).

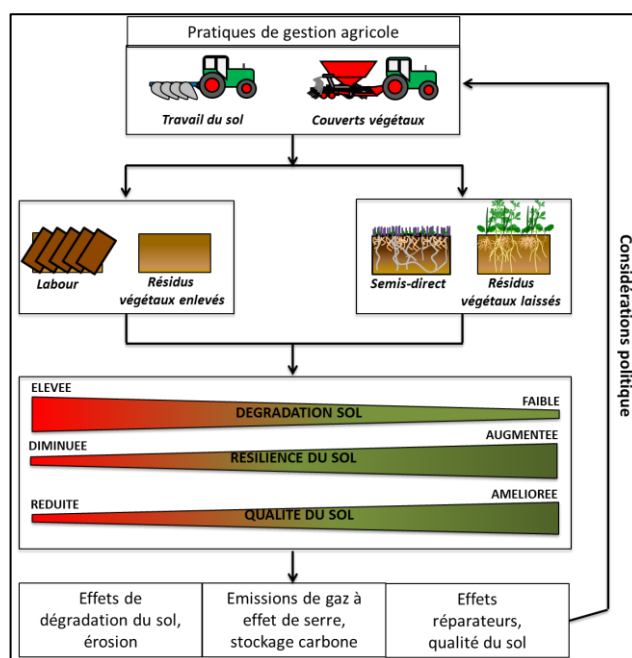


Fig. 5. Interactions entre la dégradation, la résilience et la qualité du sol influencées par les méthodes de travail du sol et de couverture végétale (modifié à partir de Lal, 1997).

La diminution de la teneur en matière organique (MO) due à la minéralisation importante se produisant dans les sols labourés affecte négativement la qualité du sol en réduisant les taux d'infiltration, les capacités de rétention d'eau, des nutriments, et le biotope du sol (Van Oost et al., 2000). En effet, si la gestion du sol par l'utilisation de la charrue a permis de limiter le développement des adventices et d'améliorer la production agricole, elle a également entraîné la dégradation des sols, et ce de façon encore plus forte qu'elle était associée à l'usage de la herse rotative et de l'émiettement important qu'elle induit sur la structure du sol. Ainsi, l'érosion des sols entraîne une réduction de la productivité (Verity & Anderson, 1990) et des dommages écologiques significatifs en épuisant la biodiversité édaphique (Lal, 1991). Des études récentes ont rapporté que l'érosion par le labour est au moins aussi importante que l'érosion hydrique (Montgomery, 2007) entraînant une perte des sols. Afin de réduire l'érosion des sols, des pratiques alternatives ont été mis en place comme le travail minimal ou l'absence de travail du sol (semis-direct). Ces pratiques permettent de laisser au moins 30 % des résidus de culture sur le sol et permettaient d'augmenter à la fois les teneurs en MO dans les horizons superficiels mais aussi les teneurs en nutriments (azote, phosphore, cations échangeables) (Lal, 1976). De plus, les parcelles non labourées présentaient des taux d'infiltration supérieurs limitant ainsi le ruissellement, ainsi qu'une réduction de la formation de croûte de battance. Ces pratiques ont donc été décrites comme favorables pour réduire le taux d'érosion dans les sols comparativement au travail profond faisant usage de la charrue (Lal, 1976 ; Montgomery, 2007). Néanmoins, les bénéfices proposés par l'agriculture de conservation des sols dépendent du délai depuis lequel l'usage du labour annuel dans la rotation a été abandonné. En effet, la mise en place des améliorations structurales et des réseaux biologiques repose sur l'absence de perturbation majeure sur le long terme. Cependant, les systèmes de culture sans labour ne permettant pas de déstructurer annuellement les sols, ils sont sujets à la compaction générée par le trafic du matériel de semis et de récolte en surface.

A cet égard, la gestion des ressources du sol et particulièrement celle du carbone organique total du sol (COT) ou matière organique (MO) a été montrée comme extrêmement importante (Matson et al., 1997). La perte de MO avec l'utilisation du travail intensif, par le biais du labour, est l'une des conséquences de dégradation du sol. Pourtant, la MO est une composante essentielle de la qualité du sol puisqu'elle fournit le substrat organique et permet la libération des nutriments essentiels pour la croissance végétale et la biodiversité du sol. De plus, la MO joue un rôle critique dans le maintien de la structure du sol et sa capacité à retenir l'eau du sol et à limiter l'érosion (Matson et al., 1997). Des études menées sur le long terme ont montré que les pratiques conventionnelles entraînaient une diminution des stocks de carbone dans les sols alors que l'absence de travail du sol entraînait une modification de la répartition du C organique avec des niveaux plus élevés dans la couche supérieure du sol (Chan et al., 1992 ; Metherell et al., 1995 ; Melero et al., 2006 ; Dimassi et al., 2013). Dans la zone tempérée, les pertes de matière organique sont les plus rapides au cours des 25 premières années de mise en culture,

avec des pertes de 50% du C d'origine. La réduction du C organique peut s'accompagner de pertes significatives en N total, en calcium (Ca) échangeable et en magnésium (Mg) et réduire l'activité biologique et la stabilité des agrégats (Chan et al., 1992).

Cependant, les pertes de C du sol peuvent être compensées par l'augmentation des résidus de culture et l'utilisation de pratiques moins intensives comme le semis-direct (Fig. 6). Si le semis-direct n'augmente pas toujours la teneur en C dans les sols dans les horizons profonds (0-50cm), la plupart des chercheurs ont montré une augmentation du C dans les horizons superficiels (0-5cm) (Metherell et al., 1995). En raison de l'absence de perturbation du sol, de l'apport de résidus de culture dans les horizons superficiels, la gestion à partir de l'absence de travail du sol par l'utilisation du semis-direct semble être une stratégie adaptée pour restaurer la fertilité des sols. De nombreuses études ont montré que le semis-direct sous couvert végétal permettait de conserver et/ou restaurer la qualité du sol (Arshad et al., 1990 ; Karlen et al., 1994a, 1994b ; Aziz et al., 2013), avec des gains potentiels de l'ordre de + 1 % de la teneur initiale en MO annuellement.

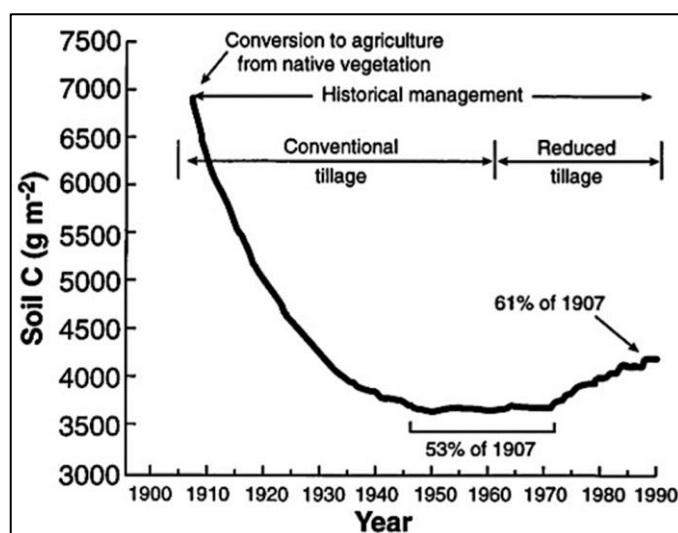


Fig. 6. Simulation des changements des teneurs en carbone total du sol (0-20cm) selon les pratiques agricoles dans une région des États-Unis cultivée avec du maïs (modifié à partir de Donigian et al., 1994). La période à laquelle la concentration en carbone du sol est de 53 % correspond à l'adoption d'une réduction du travail du sol.

Couverts végétaux. Des études ont souligné l'importance de l'association de pratiques de gestion agricoles dans le but d'accroître la restauration de la qualité des sols et d'atténuer leur dégradation. Ainsi, la présence d'un couvert végétal en inter-culture et l'absence de travail du sol sont deux gestions agricoles qui ont été décrites comme durables car elles permettent d'améliorer la fertilité du sol et d'accroître son potentiel à représenter un puits de dioxyde de carbone atmosphérique (Matson et al., 1997). Les couverts végétaux en inter-culture constituent également une ressource importante pour le sol. La gestion des résidus, la quantité et la qualité de la biomasse appliquée au sol (i.e. processus discontinu de fourniture organique en surface), ainsi que la rhizodéposition (i.e. processus continu

d'exsudation de substances organiques par les racines des plantes) ont un impact significatif sur la qualité et la résilience des sols, la productivité agronomique et les émissions de gaz à effet de serre des sols dans l'atmosphère (Matson et al., 1997). La gestion des résidus de culture permet non seulement d'améliorer l'infiltration de l'eau mais aide aussi à stabiliser le sol à partir du développement d'un système racinaire efficace (Curran, 2006). Le choix des espèces contribue également à améliorer la fertilité des sols et à diminuer les externalités négatives (i.e. contaminations environnementales). Par exemple, des études ont montré que l'utilisation d'espèces végétales comme la moutarde ou le radis (famille des *Brassicaceae*) sont capables de piéger les nitrates anioniques du sol. Ainsi, leur utilisation comme couvert végétal entre deux cultures principales permet de limiter la lixiviation des nitrates qui ne sont pas retenus par le complexe argilo-humique (CAH) lui aussi électronégatif, et donc de diminuer la contamination des eaux souterraines (Curran, 2006). De même, des études ont montré que l'utilisation d'espèces végétales comme le trèfle ou la vesce (famille des *Fabaceae*) en inter-culture permettait de fixer, en association avec des bactéries fixatrices (famille des *Rhizobiaceae*), l'azote atmosphérique. Une fois restituées au sol, ces plantes fourniront un surplus en azote et autres nutriments pour les cultures principales, limitant ainsi en contrepartie l'utilisation des engrais azotés de synthèse qui sont source de pollution environnementale (Dabney et al., 2001 ; Heckman et al., 2009 ; Brust, 2010 ; Mbutia et al., 2015). En plus de limiter la pollution, les cultures de couverture présentent de nombreux autres avantages par rapport à un sol non couvert entre deux cultures principales. A titre d'exemple, elles permettent de contrôler l'érosion du sol en fournissant une protection au sol et en réduisant l'impact des gouttes de pluie sur les agrégats en surface du sol, ainsi que les processus de ruissellement. Aussi, de nombreux chercheurs ont montré que les cultures de couverture permettaient d'augmenter le taux de MO dans les sols et donc permettaient d'accroître le potentiel de séquestration du carbone (Kern & Johnson, 1993). Il a été montré que l'augmentation de MO et les apports de nutriments (azote, phosphore, potassium) dans les parcelles gérées avec amendements organiques améliore la stabilité des agrégats du sol lorsque les résidus végétaux se dégradent comparativement à des parcelles gérées essentiellement par l'apport d'engrais minéraux (Mader et al., 2002 ; Mbutia et al., 2015). La stabilité des agrégats contribue à une plus grande perméabilité et aération du sol, mais permet aussi d'augmenter la capacité d'absorption et de rétention de l'eau, la capacité d'échange avec les cations favorisant ainsi l'émergence et la croissance des cultures (Curran, 2006). Enfin les cultures de couverture, en améliorant les propriétés physico-chimiques du sol, comme la stabilité des agrégats, la teneur en COT, la capacité d'échange cationique (CEC), et l'infiltration de l'eau, favorisent le développement de certains organismes bénéfiques du sol (biomasse microbienne, vers de terre) (Dabney et al., 2001 ; Mader et al., 2002). Certains de ces organismes sont capables de dégrader rapidement les couverts végétaux frais permettant ainsi d'améliorer le recyclage de la MO et accroître la disponibilité en éléments nutritifs (Fontaine et al., 2003). Par exemple, une étude réalisée par Galvez et al. (1995) a mis en évidence que

les cultures de couverture telles que les légumineuses et les graminées pouvaient augmenter l'inoculation naturelle des sols en champignons mycorhiziens.

Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence qu'une mauvaise gestion des cultures de couverture peut éclipser ses avantages. Par exemple, les cultures de couverture, lorsqu'elles sont positionnées en association avec les cultures principales, peuvent agir comme des adventices en générant des concurrences pour la lumière, l'humidité, les nutriments et l'espace (Kandel et al, 1997) et si elles sont mal gérées, les applications d'herbicides peuvent augmenter (Griffin et Dabney, 1990). Elles peuvent également entraîner des problèmes parasites en abritant des insectes ou des nématodes vecteurs de maladies racinaires ou foliaires (Snod-grass et al., 1984). Ainsi, c'est le choix dans la gestion des cultures de couverture par les agriculteurs qui permettra d'améliorer la qualité du sol et de l'eau. C'est pourquoi de nombreuses recherches s'accordent à dire qu'une compréhension des agrosystèmes, dans leur ensemble est essentielle à la détermination de systèmes agricoles efficaces (Mader et al., 2002). Ainsi, la gestion des résidus de récolte, favorisant l'accumulation du C et de l'N dans les sols, doit être associée à des pratiques durables, comme le travail minimal du sol mais aussi une diminution des apports de produits de synthèse (intrants, pesticides) afin de limiter la dégradation des sols et de sa biodiversité, la pollution environnementale, et de favoriser le stockage du carbone dans les sols.

1.2. Gestion des intrants de synthèse pour améliorer la santé du sol et limiter les contaminations environnementales.

Les engrais azotés. Historiquement, le développement des civilisations allait de paire avec la fertilité des sols qui était capable de fournir suffisamment d'éléments nutritifs aux plantes afin de satisfaire la demande alimentaire (Singh & Ryan, 2015). Mais au cours du dernier siècle, c'est le quadruplement de la population mondiale qui a entraîné un changement dans la gestion des sols et des cultures, avec une augmentation des interventions anthropiques afin d'accentuer l'exportation par les rendements dans les agrosystèmes (Lal & Stewart, 2010). L'utilisation des engrais minéraux commerciaux a été le principal facteur d'augmentation de la productivité végétale (hors légumineuses), permettant d'assurer la sécurité alimentaire mondiale jusqu'à présent (Singh & Ryan, 2015). Plus de 7 milliards de personnes vivent aujourd'hui grâce à l'augmentation de la production végétale dépendante de l'utilisation d'engrais azotés issus du procédé Haber-Bosch développé au début des années 1900 (Erisman et al., 2008). La consommation mondiale totale d'engrais a atteint 178,9 Millions de tonnes (Mt), dont l'azote détient la part de marché la plus importante car c'est l'élément le plus déterminant pour augmenter les rendements dans les grandes cultures (Singh & Ryan, 2015) (Fig. 7). Dans ce contexte et pour déterminer des modes de gestion durables maintenant la qualité du sol et de l'environnement, de nombreuses études ont étudié la manière dont les intrants azotés peuvent affecter les propriétés édaphiques.

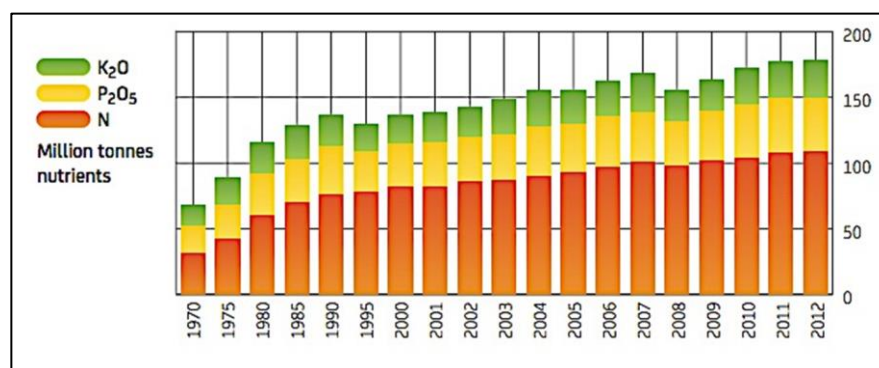


Fig. 7. Consommation annuelle mondiale d'azote (N), phosphore (P₂O₅), potassium (K₂O) dans les intrants de synthèse (issue de : IFA, 2015).

Il est aujourd'hui bien connu qu'une fertilisation déséquilibrée conduit à la dégradation du sol due à une potentielle réduction de la biomasse racinaire, de la teneur en MO des sols, entraînant ainsi une réduction de la structure des sols et par conséquent une réduction des rendements des cultures. Egalement, l'application de quantités d'engrais nutritifs supérieure aux besoins de la culture pour une croissance optimale peut nuire à la qualité du sol que ce soit d'un point de vue physico-chimique (MO, acidification) mais aussi biologique (Singh & Ryan, 2015).

Dans un premier temps nous parlerons des effets des intrants azotés sur la physique des sols. Des études ont montré que la perte en MO du sol, indicateur clé de la santé des sols, était due aux intrants azotés (Recous et al., 1995 ; Khan et al., 2007 ; Mulvaney et al., 2009). En effet, l'application d'engrais azotés peut affecter la MO des sols soit en l'augmentant par l'intermédiaire de la croissance des plantes et donc de la biomasse de la litière ; soit en la diminuant par le biais des transformations microbiennes de la litière et des formes endogènes de C organique (Recous et al., 1995). Des études menées sur le long terme ont donc voulu savoir si l'utilisation des engrais azotés synthétiques entraînait un déclin de la MO dans les sols mais les réponses obtenues restaient contradictoires. D'un côté, Khan et al. (2007) ainsi que Mulvaney et al., (2009) ont montré que l'application continue d'engrais N entraînait une perte nette d'N et de C organique dans les sols. Parallèlement, Glendining & Powlson (1995) ont montré l'inverse, avec une augmentation de la teneur en N organique du sol suite aux applications d'intrants azotés sur le long terme. Afin de répondre à cette controverse, Ladha et al. (2011) ont recueilli des données provenant de 114 expériences à long terme localisées partout dans le monde et ont conclu que l'approche suivie par Khan et al. (2007) et Mulvaney et al. (2009) ne tenait pas compte des changements dans le temps du C et de l'N organique, lorsque aucun engrais n'avait été appliqué. Plus récemment Geisseler & Scow (2014) et Körschens et al. (2013) ont constaté que, sur des expériences long-terme et à travers le monde, l'utilisation adéquate et équilibrée des engrais minéraux entraînait une augmentation de la MO du sol par rapport aux parcelles ne recevant pas d'engrais. Cependant, même si le phénomène des pertes de C et N du sol n'est pas généralisable, il n'en demeure pas moins que la gestion intensive

du sol, caractérisée par une forte utilisation des engrais azotés et une exportation importante de biomasse aérienne, peut conduire à un déclin de la MO du sol, entraînant un déclin de son fonctionnement et de la productivité des cultures (Mulvaney et al., 2009). Ainsi c'est la gestion de l'N endogène du sol qui peut dicter l'efficacité de l'apport des engrais azotés ainsi que les quantités de C et d'N pouvant être perdues du système sol/plante.

De même, il a été montré que les transformations de l'N dans le sol pouvaient engendrer une acidification locale lorsque le pouvoir tampon du sol, c'est à dire sa capacité à résister à des variations acido-basiques, était faible. Ainsi, selon le climat, le pouvoir tampon du sol, mais aussi la forme de l'intrant azoté ajoutée, les apports d'engrais azotés peuvent avoir un effet néfaste sur la qualité chimique du sol (Guo et al., 2010). En effet, au cours du processus d'acidification, les sols libèrent des cations basiques (calcium (Ca) et magnésium (Mg)) qui au fil du temps vont s'épuiser et permettront la libération de l'aluminium (Al^{3+}) en provenance des minéraux du sol à des concentrations souvent toxiques pour les plantes (Mossor-Pietraszewska, 2001). De plus, l'acidification du sol conduit indirectement à une plus faible immobilisation de l'N par les bactéries du sol (Venterea et al., 2004), entraîne un changement dans la structure des communautés microbiennes impactant les mécanismes d'évolution des MO du sol (décomposition et minéralisation de la MO, recyclage des éléments nutritifs) (Velthof et al., 2011) et pour finir, peut conduire à une augmentation des émissions de gaz à effet de serre (oxydes d'N NO_x , N_2O , NH_3) (Denman et al., 2007). Enfin, une application d'engrais N à des quantités supérieures aux besoins des cultures peut entraîner la lixiviation des nitrates et des cations (Ca, Mg) vers les eaux souterraines, les lacs et les rivières conduisant à une pollution des eaux.

Les pollutions atmosphériques du sol et des eaux peuvent avoir un impact négatif sur les écosystèmes terrestres et entraîner la réduction à la fois de la biodiversité végétale (Galloway et al., 2003) et de la biodiversité microbiennes et animales des sols (Schimel et al., 2005). En effet, le concept de santé des sols prend en compte le biote du sol mais aussi les interactions biotiques qui s'y produisent. Des recherches ont montré que des quantités excessives d'engrais peuvent nuire à la santé des sols en affectant l'intégrité des communautés biologiques des sols (Hartmann et al., 2015). L'N est au même titre que le C un des principaux facteurs limitant de l'activité microbienne (Schimel et al., 2005 ; Kuzyakov & Xu, 2013). Même si les apports d'intrants azotés peuvent venir équilibrer les pertes « naturelles » de l'N endogène et permettre de satisfaire la capacité fonctionnelle du système sol, la surconsommation des engrais azotés affectera les communautés biologiques du sol en endommageant leurs habitats et leurs fonctions (He et al., 2012 ; Hartmann et al., 2015 ; Verzeaux et al., 2016).

Pour atténuer les effets néfastes des engrais azotés sur le sol, l'adoption d'autres pratiques de gestion doit être engagée. Ainsi, la diminution de l'utilisation des engrais azotés, adaptée aux besoins de la culture, peut être objectivée en remplaçant progressivement l'utilisation des engrais de synthèse par de l'N biologique issu de différents processus écologiques de type mutualistes (e.g. fixation

symbiotique, endophytes diazotrophes, mycorhizes) ou individuels (e.g. fixation libre), et en adoptant simultanément des pratiques de perturbation minimale du sol pour améliorer sa santé et limiter les contaminations environnementales.

Les pesticides. Ils regroupent différentes préparations phytosanitaires destinées à lutter contre des organismes jugés nuisibles. Parmi ces préparations, les insecticides ont fait leur apparition dans les années 1960 dans la plupart des pays technologiquement avancés, suivis par les fongicides et les herbicides dans les années 1970-80 (Aktar et al., 2009). Le marché des pesticides a connu un essor considérable, notamment en agriculture, tant les bénéfices étaient nombreux. A titre d'exemple, le contrôle des ravageurs et des adventices a permis de limiter les pertes de rendements et a ainsi contribué à améliorer la productivité agricole pour un ensemble de cultures alimentaires (blé, maïs, orge, betterave, riz...) (Warren, 1998 ; Behera & Singh, 1999) mais a aussi bénéficié à l'agriculteur en dégageant des marges économiques supplémentaires (Webster et al., 1999). Pourtant, malgré leurs avantages, l'utilisation massive des pesticides a entraîné des conséquences sur la santé de l'Homme et de son environnement (Savonen, 1997 ; Kole et al., 2001). La pollution par les pesticides a été principalement perçue au travers sa présence dans les eaux et les denrées alimentaires avec la mise en place de normes visant à déterminer les teneurs maximales de résidus dans les aliments mais aussi dans les eaux souterraines (CEE, 1976 ; CEE, 1980 ; Barriuso et al., 1996). Pour les sols, il n'existe pas de normes à proprement parler mais uniquement des valeurs guides pour la gestion des sites contaminés (Gourdon et al., 1994). Pourtant la pollution des sols est une réalité qui peut affecter leur utilisation durablement. Les activités agricoles, mais aussi la gestion paysagère des villes et villages, ou encore le jardinage, font partie des sources principales entraînant la contamination des sols par les polluants organiques. Le devenir dans le sol d'un pesticide est un paramètre très important car, outre sa toxicité propre, qui dépend de sa concentration et de la nature de la cible, sa rétention par le sol et sa persistance sont des facteurs qui conditionnent le caractère polluant (Barriuso et al., 1996a). Selon Calvet (1989), la rétention d'une molécule organique par le sol dépend des interactions avec les constituants organiques et minéraux des sols ; et selon Fournier et al. (1997), la persistance d'un polluant est la résultante d'un ensemble de processus de dissipation, physico-chimiques et biologiques. La prévision des risques de pollution dépend donc de ces deux facteurs qui dépendent de la durée de demi-vie et du coefficient d'adsorption des pesticides permettant de les classer par rapport à leur caractère polluant (Jury et al., 1987). D'une manière générale, moins un produit est mobile dans le sol, moins il représentera de risque de pollution des nappes. De même, plus un produit est persistant plus il aura la possibilité de contaminer son environnement.

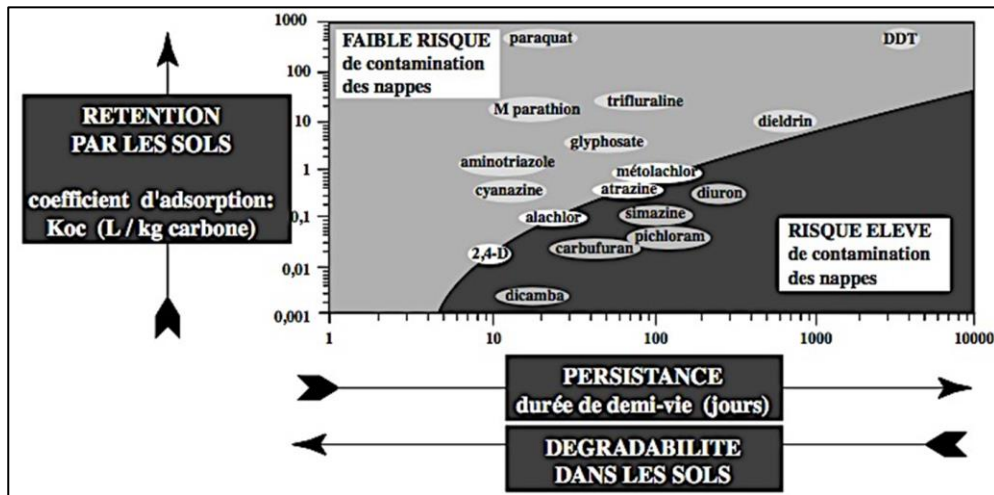


Fig. 8. Estimation des risques potentiels de contamination des nappes par lixiviation des pesticides à l'aide d'un modèle numérique simple pour une situation pédo-climatique donnée. Le niveau de risque élevé correspond à des résultats simulant un transfert d'au moins 0,1 % de la quantité appliquée à plus de 3 mètres de profondeur (issu de Barriuso et al., 1996a).

La **figure 8** modélise le risque de pollution, faible ou élevé, basé sur les propriétés des sols (densité, porosité, teneur en MO, drainage...) (Jury et al., 1987). Le devenir des pesticides dans les sols dépend donc de la rétention et de la persistance des pesticides mais aussi du sol lui-même. En effet après un apport de molécules pesticides sur un sol, ces dernières se retrouvent dans les trois fractions (solide, liquide, gazeuse) que composent le sol et leur devenir dépend des constantes d'équilibre (adsorption, désorption et volatilisation) contrôlées par l'état de ces trois fractions, mais aussi des conditions pédo-climatiques (Barriuso et al., 1996b). La phase solide contribue à adsorber et désorber le pesticide et va permettre la formation de « résidus facilement dégradables » jusqu'à la formation de « résidus liés ». Dans le cas des « résidus facilement dégradables », ils peuvent se retrouver rapidement dans les phases liquide et gazeuse du sol, et constituent par ce biais la part du polluant disponible. Cette part disponible peut être dégradée par les microorganismes du sol et/ou par les phénomènes physico-chimiques (photolyse, catalyse, hydrolyse...). L'apparition de métabolites entraîne un changement de la structure chimique du pesticide et conduit à une modification de leur toxicité et leur comportement (Benoit, 1994). De plus, les pesticides non dégradés et/ou leurs métabolites peuvent être entraînés en profondeur contribuant alors à la contamination des eaux profondes (Barriuso et al., 1994a). Dans le cas des « résidus liés » dans les sols, les taux peuvent atteindre jusqu'à 90 % des quantités initialement appliquées (Calderbank, 1989). Ces « résidus liés » peuvent être considérés comme un processus de dissipation contribuant à l'élimination du pesticide. Pourtant, selon une étude réalisée par Barriuso et al., (1994b), la nature de la MO du sol impliquée dans la formation de ces « résidus liés » va conditionner le devenir mobile et dégradé de ces résidus. Certaines expériences ont montré que les « résidus liés » pouvaient être remobilisés par la flore ou la faune du sol ou par des modifications physico-chimiques

(Demon, 1994). Dans le cas des produits phytosanitaires appliqués au sol, la disponibilité du pesticide va conditionner son absorption par des organismes vivants, étape qui conditionne son efficacité phytosanitaire (Barriuso et al., 1996a). A l'inverse, la dispersion des polluants par le ruissellement, la lixiviation, ou la volatilisation, est responsable de la contamination de l'environnement (Fig. 9).

De nombreuses recherches ont montré que selon le produit et la concentration utilisés, les pesticides peuvent non seulement contaminer l'environnement mais aussi entraîner une perte de la fertilité des sols (Frankenberger et al., 1991 ; Fabra et al., 1997 ; Aktar et al., 2009). En effet, il a été montré que l'utilisation répétée et accrue de plusieurs produits chimiques sur le sol conduisait à une perte d'organismes bénéfiques qui, à terme, pourrait se solder par une diminution du recyclage des nutriments du sol dont les plantes dépendent (Martens & Bremner, 1993 ; Savonen, 1997 ; Pell et al., 1998 ; Zabaloy et al., 2008 ; Cycon et al., 2013 ; Mukherjee et al., 2016). La plupart des pesticides utilisés en agriculture sont donc néfastes pour les organismes non cibles, que ce soit les microorganismes impliqués dans les cycles biogéochimiques comme vu précédemment, mais aussi pour des organismes bénéfiques pour les plantes (vers de terre, insectes pollinisateurs) (Pimentel, 1995 ; Romeis et al., 2008 ; Pelosi et al., 2014) ainsi que pour les algues, les poissons, les oiseaux et autres espèces sauvages qui se trouvent à proximité des champs traités (Ambrosie et al., 1978 ; Little, 1990 ; Shafiei & Costa, 1990 ; Aktar et al., 2009). En plus d'avoir contaminé l'ensemble des compartiments que sont l'eau, l'atmosphère, le sol, dans le monde entier, la plupart des pesticides ont été jugés comme néfastes pour la santé humaine (World health organization Genève, 1990 ; Margni et al., 2002 ; Aktar et al., 2009) même si il existe des difficultés à évaluer complètement les risques pour la santé humaine qui dépendent d'un grand nombre de variables (e.g. sexe, âge, statut social (Aktar et al., 2009)). Aujourd'hui, l'impact économique des pesticides sur les espèces non visées (y compris les humains) a été estimé à 8 milliards de dollars par an dans les pays en développement (Aktar et al., 2009).

Des études ont été réalisées dans l'objectif de déterminer les effets de chaque produit individuel sur le sol et son environnement selon des conditions pédoclimatiques précises. La plupart des conclusions s'entendent à dire qu'il est essentiel d'adopter des pratiques de gestion durables tant sur le plan des pesticides que pour d'autres pratiques culturales. Les indicateurs « clés de voûte » qui jouent un rôle dans la fertilité et la santé du sol et qui sont sensibles aux pratiques de gestion agricole doivent faire partie intégrante de la recherche scientifique qui vise à déterminer quelles sont les gestions agricoles durables à adopter pour atténuer la dégradation des sols, restaurer leur qualité, et limiter les pollutions environnementales.

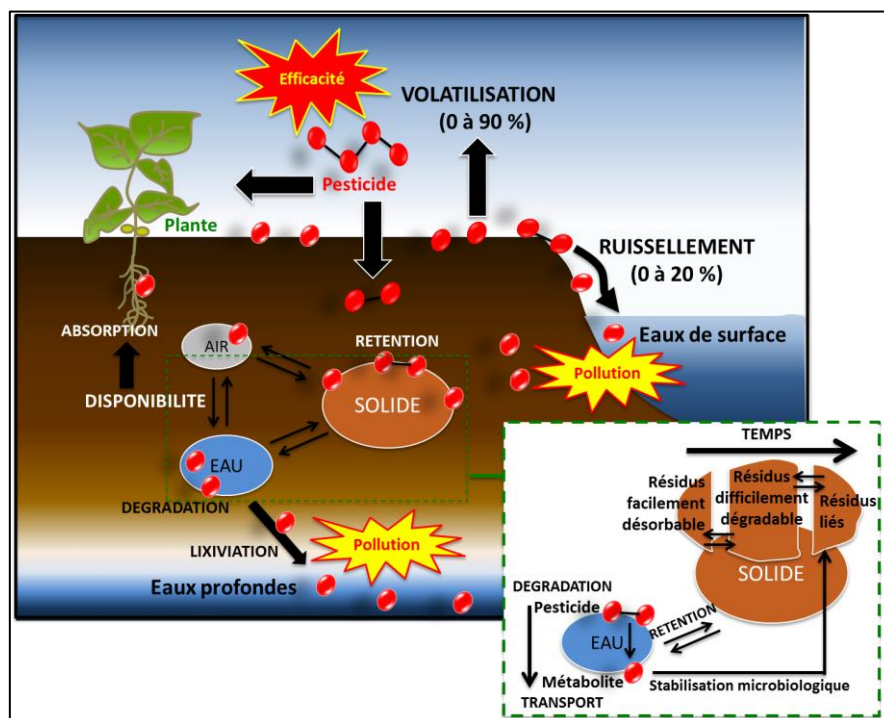


Fig. 9. Processus impliqués dans le devenir des pesticides dans les sols conditionnant leur disponibilité et par conséquent conditionnant leur caractère polluant (modifié à partir de Barriuso et al., 1996a). Le rectangle en pointillé vert est un grossissement entre les phases solide et liquide du sol. Il conceptualise l'évolution des différentes formes du pesticide dans le sol et explique la diminution de la disponibilité au cours du temps de par l'augmentation de la stabilisation des résidus de plus en plus difficilement extractibles (modifiée à partir de Barriuso, 1994a).

2. Evaluation de la qualité et de la santé des sols par l'utilisation des indicateurs physico-chimiques et biologiques sensibles à la gestion des pratiques culturales.

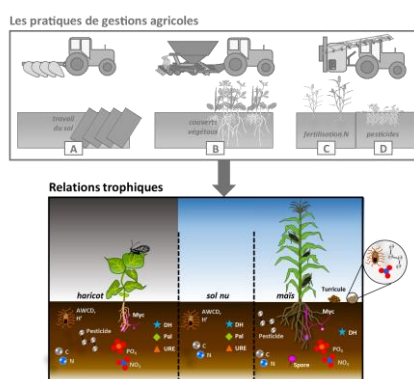


Fig. 10. Schéma illustrant les différents compartiments de l'agrosystème abordés au cours de la thèse. Les indicateurs qualitatifs souterrains et aériens. Cf. Figure 3 page 22.

La notion de qualité des sols est étroitement liée aux intérêts des Hommes (Mamy, 1993). Elle se définit comme les propriétés mesurables des sols qui influent sur leur capacité à produire des cultures ou des fonctions environnementales (Acton & Padbury, 1993). Les attributs des sols sont utiles pour

définir les critères de qualité des sols et servir d'indicateurs de changement de qualité. Les indicateurs des sols les plus sensibles à la gestion sont les plus souhaitables car ils sont souvent affectés par les processus de dégradation des sols (Arshad & Coen, 1992). Sous l'influence des pratiques culturales, la notion de qualité biologique des sols peut évoluer dans le temps (Boiffin & Monnier, 1989). L'évolution rapide des techniques de production énoncée ci dessus renvoie à la question des conséquences qu'ont ces pratiques agricoles sur la qualité et donc la santé de sols. L'appréciation de la qualité biologique des sols et de son évolution, sous l'influence des pratiques de gestion agricole, impose de mettre en place des indicateurs biologiques suivant une démarche scientifique rigoureuse (Chaussod, 1996). Le fonctionnement global du sol fait intervenir de nombreux paramètres d'ordre physique (texture, structure...), chimique (pH, teneur en MO, humidité, teneurs en composés minéraux...) et biologique qui agissent en interaction. Dans cette partie, nous allons nous focaliser sur la description des indicateurs physiques, chimiques et biologiques, aux niveaux édaphiques et aériens, qui ont été utilisés pour répondre aux objectifs de ma thèse. Ces indicateurs sur la qualité et la santé des sols ont été choisis afin de répondre à la question suivante : quels indicateurs permettent d'évaluer les effets des pratiques culturales sur la durabilité des agrosystèmes ? Ces indicateurs sont nécessaires afin de pouvoir suivre l'évolution des correctives requises dans les programmes de gestion des sols (Arshad & Coen, 1992) et doivent décrire les principaux processus écologiques dans le sol et s'assurer que les mesures effectuées reflètent les conditions telles qu'elles existent sur le terrain (Doran & Safley, 1997). Ils devraient se rapporter aux fonctions majeures de l'écosystème telles que les cycles biogéochimiques du C, de l'N et du P (Visser & Parkinson, 1992) et être des variables qui assurent des fonctions éco-systémiques. Comme l'étude réalisée par Arshad & Coen (1992), ce manuscrit examine les principaux paramètres physico-chimiques et biologiques qui peuvent servir d'indicateurs d'une modification de la qualité du sol dans des conditions agroclimatiques particulières

2.1. Les indicateurs physico-chimiques jouent un rôle dans les transformations des éléments nutritifs

Les éléments nutritifs dans les sols sont primordiaux pour la productivité des cultures. En agriculture, les flux des éléments nutritifs sont dépendants des pratiques culturales en lien avec les restitutions et les exportations de matières minérales et organiques. La plante dépend à la fois des macronutriments, nécessaires en grandes quantités (C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg) mais aussi des oligoéléments, nécessaires en petites quantités (Mo, B, Cl, Cu, Zn, Mn, Fe). Selon l'espèce végétale, les besoins pour ces nutriments seront différents et les propriétés physico-chimiques du sol joueront également un rôle dans leur biodisponibilité. Les nutriments dans le sol peuvent donc être un facteur limitant pour la croissance optimale des plantes, une quantité inférieure ou supérieure aux besoins de la

plante pouvant être préjudiciable. En effet, selon la « loi de Liebig » le niveau de croissance de la plante est limité par le facteur le plus limitant dans le sol (**Fig. 11**).

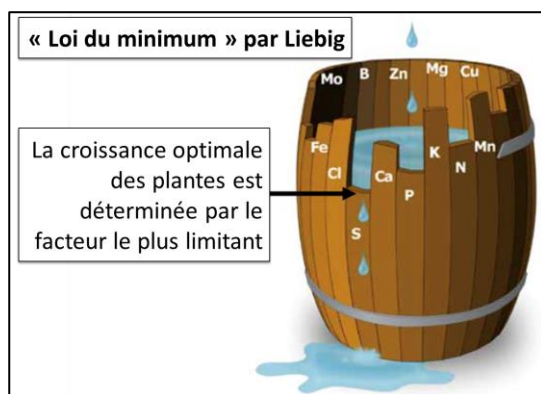


Fig. 11. « Loi du minimum » énoncée par Liebig pour la croissance des plantes pouvant être illustrée par un baril sur lequel chaque planche de bois représente un nutriment nécessaire pour la croissance des plantes. Dans ce cas, le soufre (S) est le nutriment le plus limitant (adaptée du ministère de l'agriculture, Saskatchewan, Canada).

Ainsi, le principal défi agro-écologique repose sur la gestion optimale des nutriments dans le sol qui doit prendre en compte différents indicateurs physico-chimiques permettant de maintenir des rendements suffisants tout en atténuant les impacts sur la qualité du sol et de l'environnement. En effet, selon Schoenholte et al. (2000), le concept de la qualité des sols doit comprendre l'évaluation des propriétés et des processus du sol c'est à dire la capacité du sol à fonctionner efficacement en tant que composante d'un écosystème sain. C'est pourquoi, le choix des indicateurs physico-chimiques comme indicateurs de la qualité des sols doit dépendre de leur sensibilité aux changements induit dans la gestion agricole et être facilement mesurables (Schoenholte et al., 2000).

CEC, pH, aération/humidité. La capacité d'échange cationique (CEC) se définit comme le nombre de sites d'échanges cationiques sur le CAH. Le CAH va dépendre de la quantité et du type d'argile présent dans les sols, du taux de MO ainsi que de la quantité d'oxydes de Fe, Al et Mn. Plus la CEC est élevée, plus le sol sera capable d'adsorber et de désorber les cations selon les besoins des plantes limitant ainsi les effets toxiques ou délétères d'un excès ou d'un manque d'éléments nutritifs cationiques. Les sols ayant une faible CEC sont plus vulnérables à la lixiviation des cations nutritifs augmentant les répercussions environnementales potentielles (Lal, 1999 ; Lal, 2015). Le potentiel hydrogène (pH) joue également un rôle dans le maintien de la CEC des sols (Ross et al., 1991). Ces deux paramètres peuvent également être des indicateurs des effets des pratiques sur l'activité biologique des sols, certains processus microbiens étant affectés par des changements de pH ou de CEC (Smith & Doran, 1996).

Le pH est une mesure de l'acidité du sol. Plus un sol est acide et plus la concentration en ions H^+ est élevée dans la solution du sol. A l'inverse, un sol à forte concentration en ions OH^- est caractérisé

comme un sol alcalin. Les ions hydrogène ont la particularité d'être adsorbés sur le CAH conduisant à une diminution de la capacité du sol à adsorber d'autres nutriments essentiels à la croissance des plantes ou à la stabilité structurale. Les ions hydrogène participent à de nombreuses réactions de précipitation et de dissolution. Par conséquent, ils jouent un rôle important dans la solubilité des nutriments, et sont donc par ce biais impliqués dans la nutrition et la croissance et rendement des cultures (Smith & Doran, 1996 ; Cardoso et al., 2013). Les pH plus acides sont généralement associés à une majorité d'activités fongiques tandis que les pH neutres à basiques faciliteront les activités bactériennes dans les sols. Il a été montré que des pH neutres ont une plus grande capacité à rendre disponibles les éléments nutritifs dans les sols (FAO, 2011).

L'aération est également un facteur clé qui affecte directement la qualité des sols puisqu'elle joue un rôle dans la disponibilité de nombreux nutriments dont le C, l'N, le S, le Mn et le Fe (Lee et al., 1996 ; Tan et al., 2005 ; Silva et al., 2011). Les agrégats du sol sont directement corrélés avec l'aération et la perméabilité du sol. De même, la MO et les fonctions biologiques façonnent la structure physique du sol et par conséquent, ils façonnent les processus d'infiltration de l'eau en lien avec le régime pluviométrique. En outre, ces processus sont fondamentaux pour l'approvisionnement en eau et en nutriments dans le sol (Cardoso et al., 2013). Etant donné que la teneur en eau disponible est un facteur déterminant de l'activité microbienne et de la croissance racinaire dans le sol, les propriétés physiques du sol affectant la disponibilité de l'eau et l'aération des sols affecteront également les microorganismes et les plantes (Geisseler et al., 2011). Ainsi, la diminution de l'activité microbienne du sol due à des limitations en eau peut conduire à des pertes de fonctionnalités du sol (synthèse et minéralisation de la MO, recyclage des éléments nutritifs) (Cardoso et al., 2013). Néanmoins, les effets d'un manque d'aération des sols sur les microorganismes dépendent de leur groupe métabolique. Un sol suffisamment aéré va favoriser les activités aérobies des bactéries mais aussi les champignons du sol (Cardoso et al., 2013). A l'inverse, un sol compacté ou engorgé en eau va favoriser les activités bactériennes anaérobies qui utilisent comme énergie alternative non plus l'oxygène du sol mais les ions nitrates ou sulfates. La compaction du sol est connue pour induire une diminution de la diversité et des activités microbiennes entraînant une diminution du recyclage des nutriments et de la croissance racinaire (Dick et al., 1988 ; Lee et al., 1996) La modification de l'aération des sols peut également affecter les cycles du C et de l'N (Tan et al., 2005). Les processus de dénitrification étant essentiellement anaérobies, un sol compacté peut également favoriser une perte d'N dans les sols et entraîner une augmentation des contaminations atmosphériques par la formation des gaz produits par ces activités (Jensen et al., 1996 ; Silva et al., 2011).

Turnover du C, de l'N et du P. Le cycle des nutriments joue un rôle crucial à la fois dans le renouvellement des éléments nutritifs, indispensables à la croissance des plantes, mais aussi dans le

contrôle des pollutions environnementales. En agriculture, le cycle des nutriments est basé sur les apports des matières organiques et/ou minérales, les pertes liées aux récoltes, à la transformation des éléments en gaz atmosphériques et la lixiviation et/ou au ruissellement de ces éléments vers les cours d'eau. Parmi ces cycles, ceux du C, de l'N et du P sont les plus étudiés en agriculture car le turn-over de ces éléments est l'un des piliers qui permet de déterminer la qualité des sols.

Des études ont montré que le turn-over du C influençait à la fois les changements climatiques et la sécurité alimentaire (Schlesinger & Andrews, 2000 ; Lal, 2004). C'est pourquoi dans le cadre d'une gestion agricole durable il est primordial de s'intéresser à ces éléments. La gestion de pratiques agricoles durables (Cf partie 1.) permet d'augmenter le taux de séquestration du carbone organique dans les sols compensant ainsi la perte du C par les émissions de combustions fossiles (Lal, 2004 ; Lal et al., 2011). Le turn-over du C organique du sol représente un équilibre entre les pertes et les gains de C dans les agrosystèmes. La conversion des sols « naturels » pour l'agriculture entraîne une diminution du pool de C organique pouvant aller jusqu'à 60% dans les climats tempérés et peut entraîner une dégradation de la qualité des sols et une diminution de la productivité lorsque les sorties de C sont supérieures aux entrées (Lal, 2004 ; Lal et al., 2011). La **figure 12** illustre le turn-over du C dans un sol agricole. Les taux de séquestration du C dépendent non seulement des pratiques de gestion et du climat (Hutchinson et al., 2007 ; Lugato et al., 2015) mais aussi des propriétés physico-chimiques et biologiques qui vont contribuer à la séquestration du C en MO stable (Lal, 2008 ; Schmidt et al., 2011). Le temps de séquestration du C dépend de l'équilibre entre la minéralisation et le stockage des composés carbonés qui se réalisent par le biais des activités biologiques du sol dépendantes du C pour leur métabolisme. Le piégeage des composés carbonés est également dépendant de la texture du sol et de sa capacité d'échanges des nutriments entre la solution du sol, les agrégats solides et les racines des plantes (Cf : rectangle en pointillés rouge sur la fig. 12) afin de limiter les pertes de C soluble dans les eaux. L'appauvrissement du stock de C dans la zone racinaire a été montré comme défavorable pour la productivité et la qualité environnementale. En ce qui concerne la productivité, le C organique du sol est nécessaire pour retenir l'eau et les nutriments, fournir de l'énergie aux microorganismes du sol et réduire le risque d'érosion en améliorant la structure des sols (Lal, 2004). Pour ce qui est de la qualité environnementale, le C organique du sol joue un rôle de filtre et permet de réduire les contaminations par les polluants. La stratégie de gestion du C est donc cruciale car elle permet d'augmenter la qualité des sols par la séquestration du C favorisant la plus forte productivité à l'échelle mondiale tout en atténuant l'impact de l'agriculture dans le réchauffement climatique.

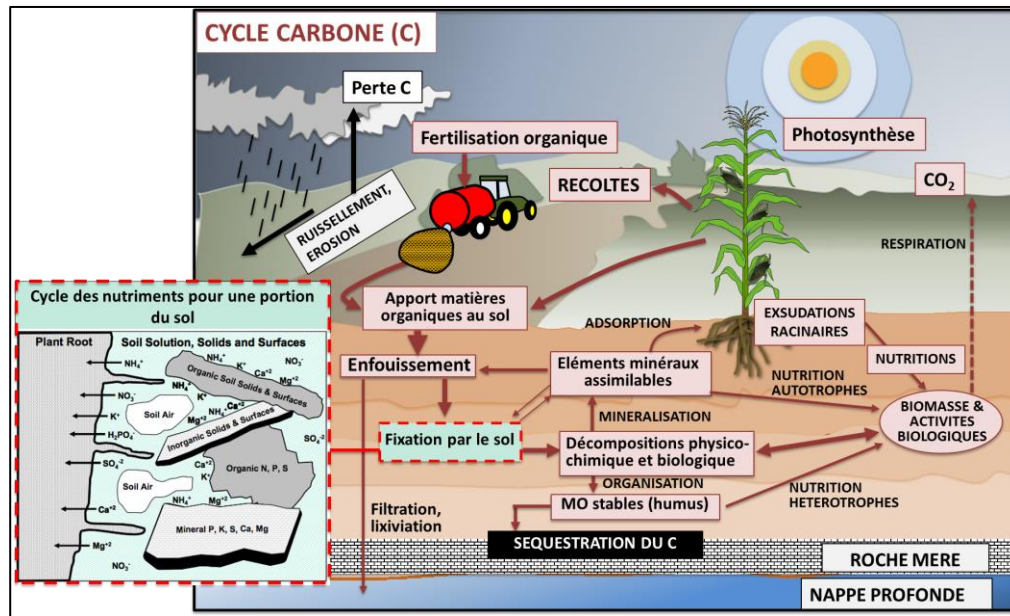


Fig. 12. Cycle du carbone en lien avec le climat, la gestion des pratiques culturales et les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol (modifiée à partir de ademe). Le carré pointillé rouge représente une portion du sol où les ions nutritifs se déplacent entre la solution du sol et les racines des plantes et sont adsorbés ou désorbés à partir des agrégats solides du sol (transformée à partir de Schimel & Schaeffer, 2012).

La gestion du C n'est pas la seule à être impliquée dans la séquestration du carbone. Schelesinger & Andrews (2000) ont montré que l'augmentation de la fixation d'azote (N) à partir de l'atmosphère pouvait conduire à séquestrer le C dans les sols. En effet, les apports organiques et minéraux influencent les activités biologiques du sol impliquées à la fois dans le stockage et le déstockage de C du sol. Pour répondre à leurs besoins énergétiques, les microorganismes ont un régime contrôlé par le ratio C:N des matières métabolisées. Par conséquent, si le ratio C:N des apports organiques est proche du besoin des microorganismes, ces derniers pourront s'autosatisfaire de la composition qualitative de ce substrat. A l'inverse, un apport de MO avec un ratio C:N supérieur aux besoins énergétiques des microorganismes peut conduire à l'immobilisation de l'N environnant, réquisitionné pour équilibrer le C:N métabolique des microorganismes qui le dégradent (exemple : pailles d'avoine et de blé avec un C:N élevé) (Magdoff & van Es, 2001 ; Hoorman & Islam, 2010). Au contraire, l'apport d'une MO caractérisée par un C:N inférieur aux besoins des microorganismes (exemple : luzerne jeune avec un C:N bas) conduit à la minéralisation nette de l'N organique contenu dans les MO anciennes et entraîne un déstockage de C et une perte d'N par volatilisation et lessivage des nitrates (Magdoff & Van Es, 2001 ; Hoorman & Islam, 2010). En conséquence, le taux de minéralisation de la matière organique récalcitrante peut dépendre en grande partie de la disponibilité en matière organique labile, influençant les émissions de CO₂ des écosystèmes terrestres (Guenet et al., 2010). Plusieurs études ont montré que les apports de MO labile (C:N faible) avaient tendance à modifier, et plus généralement à augmenter, le taux de minéralisation

des MO plus récalcitrantes (C:N élevé), on parle de priming effect (Kuzyakov et al., 2000). L'N est donc un indicateur clé pour la qualité des sols puisqu'il est en lien direct avec le C des sols (McGill & Coll, 1981), et qu'il contribue à la dynamique des populations microbiennes des sols tout en étant directement impliqué dans la croissance des plantes en agriculture.

Le cycle de l'N présenté sur la **figure 13A** montre les différentes transformations qui s'opèrent dans les sols cultivés. D'une part, la productivité des cultures est liée soit aux principales fonctions microbiennes de l'azote (e.g. minéralisation des MO, fixation de l'azote atmosphérique, mycorhizes, endophytes diazotrophes) soit à l'apport d'N minéral via la fertilisation azotée, ou encore via l'absorption d'N organique par les plantes (Nasholm et al., 2009). D'autre part, les contaminations atmosphériques et souterraines sont liées aux processus de nitrifications, dénitrifications et à la lixiviation des nitrates (**Fig. 13A**). Les principaux processus de transformation de l'azote sont réalisés par les microorganismes du sol. Tout d'abord, la minéralisation microbienne des protéines dans les agrosystèmes permet de mobiliser l'azote organique dans la biomasse microbienne du sol (Ladd & Butler, 1972). La fixation de l'azote est effectuée par de nombreux groupes microbiens et permet d'évaluer les effets de la gestion culturale sur leur diversité et leur activité. La présence de certains groupes spécialisés dans les transformations de l'azote (comme les diazotrophes, les nitrificateurs...) est indispensable dans la gestion de la qualité des sols car ils permettent d'augmenter les échanges d'azote entre le sol et les plantes et participent ainsi à augmenter la productivité (Schloter et al., 2003). La mesure de la nitrification dans les sols permet de déterminer l'oxydation chimolithotrophique de l'ammonium en nitrites puis en nitrates. Cette mesure est essentielle puisque les nitrates jouent un rôle central dans le turn-over de l'N. En effet, les nitrates sont essentiels pour les besoins énergétiques des plantes et des microorganismes qui peuvent rentrer en compétition pour cet élément (Kuzyakov & Xu, 2013).

Le phosphore (P) est un macronutriment qui est requis par les cultures et peut constituer un apport supplémentaire en agriculture au travers l'application de fertilisants phosphorés. La figure 11B illustre le turn-over du P dans les sols agricoles. L'application des engrais minéraux peut constituer la principale source de pollution environnementale car la forme immédiatement disponible du P peut être lixiviée et contaminer les eaux souterraines. La plante n'est pas capable d'adsorber le P organique et dépend donc des transformations physico-chimiques et biologiques pour assurer ses fonctions vitales dépendantes du P. Les transformations principales du P dans les sols sont la minéralisation, l'immobilisation, l'adsorption, la désorption, la dissolution et la précipitation (Frossard et al., 2000). La récolte des cultures ou la lixiviation constituent une perte importante du P présent dans les sols et peuvent entraîner une perturbation des écosystèmes (Letkeman et al., 1996). De plus, le P est fortement retenu par les sols riches en Ca, Mg, Fe ou Al. La partie labile du P constitue donc la principale source

nutritive pour les plantes mais elle est aussi plus facilement perdue par lixiviation. La teneur en P assimilable constitue donc un indicateur essentiel de la qualité des sols puisqu'il permet de mesurer la quantité de P pouvant être soit disponible pour les racines des plantes soit perdue.

Les indicateurs physico-chimiques du sol sont en interaction directe avec les indicateurs biologiques. En effet, nous venons de montrer que les approvisionnements nutritifs, nécessaires à la croissance des plantes et à l'atténuation des pollutions environnementales, dépendent de l'état physico-chimiques du sol (CEC, pH, aération) et du turn-over des éléments biogéochimiques (C, N, P). Or ces indicateurs dépendent eux-mêmes des activités biologiques pour fonctionner (Schoenholtz et al., 2000 ; Baretta et al., 2010). Nous allons donc évaluer certains indicateurs biologiques qui participent à l'évaluation de la qualité du sol.

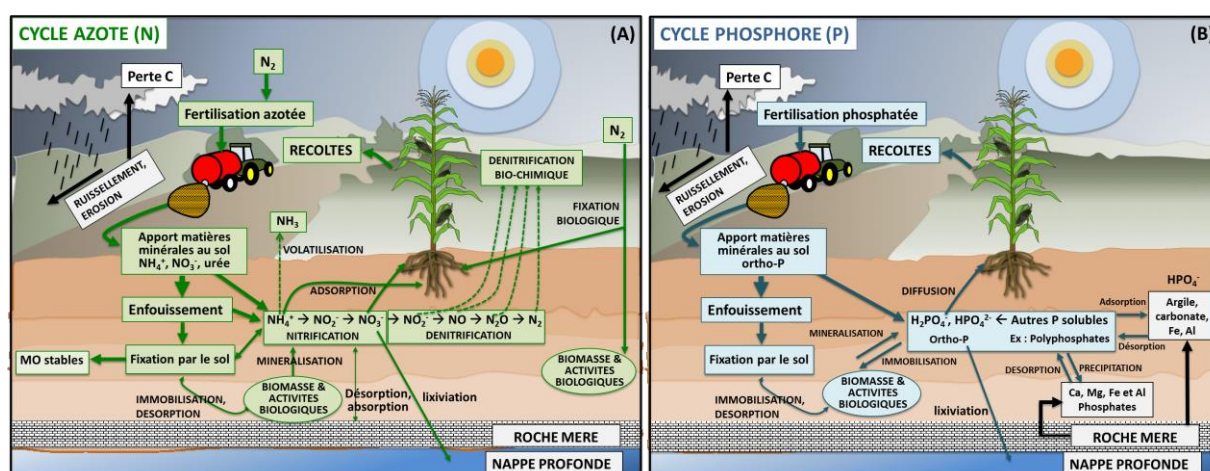


Fig. 13. Cycles de (A) l'azote et (B) du phosphore qui participent aux gains ou pertes en terme de fertilité du sol et de contaminations environnementales (modifiée à partir de Espinoza et al. et van Groenigen et al., 2015).

2.2. Les indicateurs biologiques jouent un rôle dans la santé des sols et la productivité végétale

Les interactions entre les plantes et les activités microbiennes sont à la base de tous les écosystèmes et ont des conséquences sur le fonctionnement et la qualité des sols agricoles (Schloter et al., 2003). Les indicateurs biologiques évoluent rapidement en fonction de la gestion des pratiques culturales et sont donc très utilisés dans la recherche scientifique afin d'évaluer les effets des pratiques sur la qualité du sol et de l'environnement. La **figure 14** montre que les propriétés physico-chimiques du sol, les plantes, la microfaune et la faune du sol sont en interaction. De nombreuses substances organiques (sécrétions, mucilages, gels microbiens, lysats cellulaires...), produites par les organismes du sol, permettent de façonner la structure physique du sol et favorisent le recyclage et la disponibilité des nutriments (Schjønning et al., 2004). D'autre part, les phytophages ou parasites des cultures peuvent également être des indicateurs indirects de l'état de santé des sols puisqu'ils fournissent des informations

sur le potentiel de productivité des cultures et la capacité des plantes et du sol à lutter contre ces ravageurs. Dans cette partie, nous présenterons les principaux indicateurs biologiques qui jouent un rôle dans la santé des sols et la productivité végétale et qui ont été utilisés pour répondre aux objectifs de la thèse.

Les enzymes du sol. La mesure des activités enzymatiques permet de mettre en évidence l'état de fonctionnement d'un sol. Les enzymes du sol ont été montrées comme des indicateurs utiles pour déterminer la qualité des sols en raison de leur fonctions biochimiques dans le processus global de décomposition de la MO (Sinsabaugh et al., 1993, 2005). En effet la **figure 14A** montre que les activités enzymatiques sont nécessaires aux processus de vie des microorganismes du sol, à la stabilisation de la structure du sol, à la décomposition des déchets organiques, à la formation de la MO et au cycle des nutriments (Dick et al., 1994). Ces enzymes sont constamment synthétisées, accumulées, inactivées et/ou décomposées dans le sol jouant ainsi un rôle important dans le recyclage des nutriments essentiels en agriculture (Dick, 1997 ; Makoi & Ndakidemi, 2008). Plus particulièrement, certaines de ces enzymes sont plus sensibles à la gestion agricole des sols (perturbation des écosystèmes, pratiques agricoles, pollution xénobiotique) (Utobo & Tewari, 2014) et peuvent ainsi conduire à une modification des processus métaboliques du sol. Dick (1997) a montré qu'une bonne compréhension du rôle de ces activités enzymatiques du sol dans l'écosystème permettait une évaluation biologique intégrée des sols. C'est pourquoi, afin de mieux comprendre les rôles de l'activité et de l'efficacité de ces enzymes, trois enzymes dans les sols ont été étudiées pour diagnostiquer la qualité du sol.

La **dehydrogenase** (DH) a été choisie car c'est un bio-indicateur sensible qui a été décrit comme étant lié à la qualité et à la fertilité des sols. La DH est une enzyme intracellulaire qui reflète une activité microbienne globale contrairement aux enzymes extracellulaires qui sont elles rapidement minéralisées, adsorbées par les argiles ou immobilisées par les humus (Das et Varma, 2011). L'activité DH est donc une mesure liée à des changements quantitatifs dans les populations de microorganismes car elle est liée à la fois au métabolisme respiratoire de l'azote ainsi qu'au cycle citrate réalisés par tous les microorganismes vivants (Wolinska & Stepniewska, 2012). En effet, l'enzyme DH est connue pour oxyder la MO du sol en transférant les protons et les électrons des substrats aux accepteurs. Ces processus font partis des voies de respiration des microorganismes du sol et sont liés indirectement aux conditions d'aération/humidité du sol (Doelman & Haanstra, 1979). Les activités DH peuvent donc servir comme mesure des activités oxydantes microbiennes du sol (Trevors, 1984). Comme la DH est liée aux cellules vivantes bactériennes, son activité peut être affectée par la gestion des sols (Wolinska & Stepniewska, 2012). La mesure de DH permet donc aux chercheurs de mieux comprendre l'effet des pratiques agricoles, comme l'utilisation de la charrue, de l'azote ou encore des pesticides, sur la santé des sols (Walls-Thumma, 2000). Plusieurs études ont montré que selon le type

de gestions agricole, l'activité de DH sera plus ou moins élevée. Par exemple, Baruah & Mishra (1986) ont montré qu'il y avait une plus grande activité DH dans les sols avec des faibles concentrations en pesticides. De même, un sol engorgé en eau et pauvre en carbone organique total (COT) entraînait une diminution des activités DH comparativement aux sols plus aérés avec de plus fortes teneurs en COT (Wolinska & Stepniewska, 2012). L'activité de DH est donc un indicateur clé de la santé des sols qui doit être utilisé comme outil de diagnostic pour évaluer l'effet des pratiques de gestion agricole.

La **phosphatase** (PAS) est également un indicateur biologique important dans la gestion de la qualité des sols. En effet, l'activité PAS permet d'hydrolyser et de libérer le phosphore organique, contribuant ainsi à la nutrition des plantes et des microbes du sol (Quiquampoix & Mousain, 2005). Les champignons, les bactéries mais aussi les plantes peuvent libérer ces enzymes (Tarafdar & Chhonkar, 1978). En agriculture, ces enzymes contribuent au recyclage du phosphore et sont corrélées au stress et à la croissance des plantes (Speir & Ross, 1978). Des études ont montré que les plantes ont développé des adaptations morphologiques et enzymatiques pour tolérer une faible disponibilité en phosphate en lien avec la sécrétion des enzymes PAS (Versaw & Harrison, 2002 ; Utobo & Tewari, 2014). Tout comme la DH, les activités PAS permettent de rendre compte de l'état de santé du sol car elles sont liées aux propriétés intrinsèques du sol qui permettent une croissance optimale des plantes. Par exemple, des corrélations ont été montrées entre ces enzymes et les propriétés du sol comme le pH, l'N total, la teneur en P organique et l'argile (Turner & Haygarth, 2005).

Les pratiques de gestions agricoles vont donc influencer la présence de ces enzymes (Ndakidemi, 2006). Par exemple, Li et al. (2004) ont montré que la présence de légumineuses entraînait une augmentation des enzymes phosphatases comparativement aux céréales. Également, il a été montré que l'apport organique au sol contribuait à augmenter les activités PAS (Aon & Colaneri, 2001). Globalement, une étude réalisée par Ndakidemi (2006) a mis en avant que les pratiques de gestion qui induisent un stress de P dans la rhizosphère pouvait affecter la sécrétion des enzymes PAS. Étant donné que les activités PAS régulent l'absorption des nutriments et la croissance des plantes, leur mesure demeure essentielle pour évaluer l'influence des pratiques agricoles sur la qualité des sols.

L'**uréase** (URE) est une enzyme responsable à la fois de l'hydrolyse des engrais uréiques appliqués au sol en NH_3 et CO_2 et de l'augmentation du pH du sol (Andrews et al., 1989, 2001). Cela entraîne une perte d'N dans l'atmosphère par la volatilisation du gaz NH_3 (Simpson & Freney, 1988). Sa mesure pour déterminer la qualité d'un sol et de son environnement est donc essentielle puisqu'elle joue un rôle direct dans le cycle de l'N.

De plus, l'activité de l'URE étant liée, entre autres, à l'application d'engrais uréiques, sa mesure constitue un indicateur pertinent de l'évaluation de la performance de transformation des engrais. En effet, l'urée est la principale source d'N pour de nombreuses cultures (riz, maïs...) (Buresh et al., 1988)

mais son efficacité a été montrée comme étant relativement faible en raison de l'activité URE qui entraîne une perte importante d'N dans l'atmosphère par volatilisation (Simpson & Freney, 1988). C'est pourquoi, Rotini (1935) a montré que la mesure des activités URE permettait de réguler les apports de l'N aux plantes. D'autre part, les propriétés du sol doivent également être prises en considération puisqu'elles affectent la stabilité de ces enzymes. Par exemple, une augmentation de la stabilité de l'URE a été trouvée lorsque les sols étaient riches en MO (Burns, 1986). La température élevée ou la concentration en polluants est également un facteur qui influence positivement l'activité uréasique (Kissel & Cabrera, 1988 ; Yang et al., 2006). Afin de limiter la volatilisation de l'N et améliorer la qualité du sol et la productivité végétale, la mesure des activités URE est nécessaire (Makoi & Ndakidemi, 2008). Tout comme la DH et PAS, les activités URE sont donc des bio-indicateurs essentiels dans la gestion des pratiques culturales agricoles.

Profit physiologique au niveau communautaire (CLPP). A l'image des enzymes du sol, les CLPP permettent de rendre compte de l'état qualitatif d'un sol puisqu'ils reflètent les activités fonctionnelles microbiennes de dégradation du carbone des sols (Fig. 14B). La mesure de ces activités permet d'évaluer la capacité d'un sol à dégrader certains substrats carbonés, par un assemblage de bactéries hétérotrophes (Govaerts et al., 2007). Le maintien de ces communautés bactériennes est fondamental pour une gestion agricole durable (Insam, 2001) car elles fournissent des informations sur la diversité et les activités fonctionnelles des sols qui dépendent de la structure de la communauté (White & MacNaughton, 1997). Giller et al. (1997) ont donc admis que la mesure directe de la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes permettait de fournir des informations supplémentaires sur le fonctionnement d'un sol et indirectement sur sa qualité. La mesure permet de déterminer l'aptitude des populations microbiennes d'un sol à utiliser rapidement les substrats carbonés dans le temps (Govaerts et al., 2007). Cela permet de donner des informations qualitatives sur les fonctions métaboliques potentielles des bactéries aérobies hétérotrophes cultivables des sols (Arias et al., 2005). La gestion agricole des sols a été décrite comme influençant les processus microbiens du sol donnant lieu à des modifications dans les cycles nutritifs. La mesure des CLPP fournit donc un renseignement sur la capacité de résilience des communautés face aux stress induits par ces pratiques (Kandeler et al., 1999 ; Marx et al., 2001). Par exemple, l'absence de couvert végétal, la monoculture et la pratique du labour affectent négativement les activités (Mangalassery et al., 2015 ; Nivellet et al., 2016) et la diversité fonctionnelle microbienne (Mader et al., 2002) pouvant conduire indirectement à une diminution de la qualité des sols (Kennedy & Smith, 1995 ; Moore et al., 2007 ; Gonzalez-Chavez et al., 2010).

Les champignons mycorhiziens. Ce sont des biotrophes obligatoires qui dépendent d'un hôte végétal pour leur nutrition carbonée et pour accomplir leur cycle de développement. Le cycle de développement des champignons mycorhiziens a lieu au niveau de la rhizosphère (Fig. 14) et débute

sous forme de spores constituant la forme de conservation du champignon dans le sol. Suivant les conditions du sol, les spores peuvent germer en absence de plantes hôtes (Smith & Read, 2008). La germination se poursuit avec la croissance d'un tube germinatif, puis d'hyphes. Lorsque le champignon rencontre une plante partenaire, les hyphes vont se ramifier pour créer la symbiose avec les cellules rhizodermiques en formant un appressorium. La croissance du mycélium intra-racinaire est essentiellement inter-cellulaire et se poursuit jusqu'aux cellules corticales à l'intérieur desquelles le champignon forme des structures appelées arbuscules (Bonfante & Perotto, 1995), qui sont des hyphes hyper-ramifiées. Ce compartiment forme le symbiosome, qui donne lieu à des échanges entre la plante fournissant les substances carbonées au champignon qui, en retour, fournit le phosphore et l'N (Hamel, 2004) et la protège contre certains pathogènes (Harrier & Watson, 2004) (Fig. 14C). Les champignons mycorhiziens forment une association mutualiste avec la plupart des plantes cultivées (Strullu et al., 1991 ; Smith & Read, 1997) et leur association permet d'augmenter considérablement le volume de sol exploité par les racines, améliorant ainsi leur nutrition (Smith & Read, 1997). La quantification des spores permet d'évaluer le potentiel de colonisation d'un sol ou encore le niveau de diversité des mycorhizes (Abbott & Robson, 1991 ; Veresoglou et al., 2012). De nombreuses études ont mis en évidence les relations multi-trophiques que pouvaient exercer les champignons mycorhiziens avec d'autres indicateurs biologiques. Par exemple, ils peuvent être corrélés à l'activité PAS puisque les champignons mycorhiziens sont capables d'utiliser l'N contenu dans les acides aminés et de libérer les ions P de la MO à partir de la production d'enzymes phosphatases (Hamel, 2004). Aussi, cette dernière étude a montré que les champignons mycorhiziens avaient le potentiel d'influencer la composition et la fonction des communautés microbiennes du sol (Hamel, 2004). Pour finir, leur présence a été décrite comme améliorant la résistance aux insectes phytophages (pucerons par exemple) (Gange & West, 1994) et protégeant contre certains pathogènes racinaires (Aguilar et al., 2004). Les champignons mycorhiziens sont donc des indicateurs de la qualité des sols puisqu'ils participent activement aux recyclages des éléments nutritifs, via une implication indirecte dans la décomposition de la MO, et améliorent la nutrition des cultures colonisées (Verzeaux et al., 2016).

Plusieurs pratiques de gestion affectent leur développement, leur diversité et leur composition dans les sols agricoles (Jensa et al., 2006). La rotation des cultures, le travail du sol, l'application des pesticides et la fertilisation font parties des pratiques ayant un fort impact sur ces champignons du sol (Jensa et al., 2006 ; Verzeaux et al., 2016). Par exemple, des études ont montré que les herbicides comme l'oryzaline, la trifluraline inhibaient la croissance de certaines espèces de champignons mycorhiziens (Kelley & South, 1978 ; Aktar et al., 2009) et l'oxadiazon réduisait le nombre de spores fongiques mycorhiziennes (Moorman, 1989 ; Aktar et al., 2009). De même, des études réalisées en laboratoire ont montré que le glyphosate pouvait être toxique pour ces champignons à des concentrations inférieures à celles trouvées dans les sols après des applications conventionnelles (Estok et al., 1989 ; Aktar et al., 2009). Pour

concevoir des systèmes de gestion agricole durables, il est nécessaire de mesurer ce bio-indicateur qui permet de donner un état des lieux qualitatif et productif du sol notamment dans les systèmes à faibles apports d'intrants dans lesquels leur présence contribue à augmenter significativement les rendements des cultures (Ryan & Graham, 2002).

Les vers de terre. Comme le montre la figure 12, la structure d'un sol cultivé résulte en la formation de nombreux « points chauds » (« hotspots ») favorables aux activités biologiques. Parmi ces « points chauds », la drilosphère représente la sphère biogénique du sol créée par les vers de terre (Brown et al., 2000). Ces derniers jouent un rôle indéniable dans la dynamique du sol et sa capacité à être fertile. En effet, les vers de terre sont avant tout des décomposeurs, ils contribuent donc à la décomposition ou humification de la MO et à la formation des agrégats du sol participant ainsi à la régulation de la structure et des propriétés physico-chimiques des sols (Lavelle et al., 1992 ; Lemtiri et al., 2013). En plus de structurer le sol, les vers de terre participent au turn-over des éléments nutritifs tels que le C (Curry et al., 2007), l'N (Lavelle et al., 1992) et le P (Chapuis-Lardy et al., 1998). Par exemple, comme le montre la **figure 14D**, en interaction avec les communautés microbiennes et les propriétés intrinsèques du sol, ils participent à la minéralisation de l'azote à partir de la décomposition de la MO (Butenschoen et al., 2009). Selon le groupe écologique du vers de terre, la minéralisation de la MO est différente. Les anéciques incorporent la MO fraîche de la litière dans les horizons sous-jacents du sol (Bossuyt et al., 2006). Les endogés consomment la MO humifiée contenue dans les horizons superficiels du sol et à proximité directe des activités rhizosphériques. Les épigés sont capables d'ingurgiter de grandes quantités de terre de la litière et contribuent à modifier les communautés microbiennes des sols qui transitent dans le tube digestif (Lukkari et al., 2006). A partir de cette consommation épigénique les vers de terre acquièrent une plus grande capacité enzymatique (Curry et al., 2007), nécessaire à de nombreux processus physico-chimiques des sols (comme indiqué dans la partie ci dessus sur les enzymes du sol). Leurs productions (déjections, mucus) contribuent également à enrichir le sol (Lemtiri et al., 2013). En effet, leurs déjections (turricules) contenant de nombreuses communautés microbiennes et des éléments organiques et minéraux permettent à la fois la formation des agrégats et représentent une source nutritionnelle pour les plantes ou les microorganismes. Leurs mucus associés à l'excrétion de l'eau dans l'intestin permettent d'améliorer les activités microbiennes du sol (Barois, 1986). Enfin, leurs activités permettent la formation de nombreuses galeries dans les horizons du sol (bioturbation) favorisant l'agrégation et l'aération du sol, la redistribution de la MO dans les horizons du sol, les flux d'éléments nutritifs et d'eau ainsi que le développement des racines (Barré et al., 2009). Il existe donc des interactions importantes entre les vers de terre, les microorganismes et les activités enzymatiques du sol favorisant la dynamique de dégradation ou d'humification des MO (Garcia et al., 1992 ; Zhang et al., 2000) et la disponibilité des éléments nutritifs pour les plantes (Ortiz-Ceballos et al., 2007). Les vers de terre sont donc des bio-indicateurs de la qualité des sols et de la productivité végétale. Cependant, leur

présence peut également avoir un effet sur la production de gaz à effet de serre tel que l'oxyde nitreux (N₂O) (Rizhiya et al., 2007). En effet, l'intestin des vers de terre peut fournir des conditions idéales pour les microorganismes dénitrificateurs produisant le N₂O (Horn et al., 2003). Pour déterminer le rôle des vers de terre dans la durabilité des agrosystèmes, il faut prendre en considération les processus par lesquels les vers de terre augmentent ou diminuent le stockage des matières organiques et influencent l'absorption des nutriments par les cultures (Lemtiri et al., 2013).

La gestion des pratiques culturales fait partie intégrante des processus pouvant influencer la dynamique des vers de terre dans le sol et peut être déterminante sur les fonctions assurées par les vers de terre dans la qualité et la productivité des sols agricoles. En effet, de nombreuses études ont montré que certaines pratiques agricoles comme le labour, le drainage, l'utilisation des engrais et des pesticides et la rotation des cultures pouvaient influencer la biomasse et les activités des vers de terre (Edwards et al., 1996 ; Gaupp-Berghausen et al., 2015 ; Johnston et al., 2015). De nombreux facteurs environnementaux ainsi que les caractéristiques propres du sol interagissent avec les pratiques et, conditionnent la capacité des vers de terre à exercer des fonctions vitales pour la qualité et la productivité de sols (Johnston et al., 2015), ou au contraire à augmenter les flux de gaz à effet de serre dans l'atmosphère (Lemtiri et al., 2013). Par exemple, la pratique du labour a été montrée comme plus défavorable pour les populations d'anéciques que pour les populations d'endogés (Edwards, 1984). Eriksen-Hamel et al. (2009) ont montré que, dans les agrosystèmes frais et humides, le travail du sol pouvait induire un impact négatif important sur les populations et la biomasse des vers de terre. A l'inverse, l'apport de MO au sol a été montré comme bénéfique pour les vers de terre et les interactions qu'ils ont avec les communautés microbiennes (Kirchner et al., 1993). Ces interactions ont engendré une augmentation des flux de CO₂ associée à une perte plus importante en C gazeux dans l'atmosphère et à une augmentation de la disponibilité de l'N dans les sols pouvant conduire à une plus forte dénitrification (Lemtiri et al., 2013). Par conséquent, les changements dans les activités de la communauté des vers de terre à la suite des pratiques agricoles peuvent être utilisés comme des indicateurs de la qualité du sol et de la productivité des agrosystèmes.

Les herbivores. Contrairement aux indicateurs donnés précédemment, les herbivores ne sont pas des indicateurs directs mais indirects de la qualité du sol. En effet, les ravageurs herbivores conduisent à amener la plante à mobiliser des ressources, y compris sur des tissus éloignés des sites d'attaque (Orians et al., 2011). La plupart des réponses systémiques sont médiées par des signaux de longue distance, elles peuvent donc traverser les parties aériennes de la plante et changer l'état de résistance des racines (Heil & Ton, 2008). Ainsi, lorsque la plante est attaquée au niveau aérien, elle peut monopoliser des ressources au niveau du sol. Dans un contexte agronomique, des études ont montré que les herbivores peuvent avoir des effets délétères importants sur la croissance, la reproduction et même la survie des plantes et la conséquence est une diminution des rendements des cultures (Gange, 1990, Strauss & Zangrel 2002).

Cependant, la co-évolution entre les plantes et les herbivores a permis la mise en place de mécanismes internes et externes de compensation entraînant des modifications à la fois du métabolisme des plantes et de l'environnement végétal favorables à la croissance et au rendement des plantes malgré les dégâts occasionnés par les phytophages (McNaughton, 1983 ; War et al., 2012). Les interactions directes et indirectes entre les herbivores et les plantes sont donc essentielles pour comprendre les mécanismes écologiques mis en place par les plantes au niveau du sol pour lutter contre ces organismes nuisibles (Johnson et al., 2009 ; McKenzie et al., 2013). Des études ont montré que les facteurs de stress environnementaux (par exemples : sécheresse, CO₂, T°C) peuvent modifier les interactions trophiques (Johnson et al., 2016).

Cependant, ces facteurs ne sont pas les seuls à pouvoir modifier les interactions plante/puceron. En effet, les traits physiques, chimiques et biologiques d'une plante influencent également les interactions herbivore-plante (Awmack & Leather, 2002 ; Mace & Mills, 2015) et par conséquent influencent les performances des herbivores (taux de croissance, survie larvaire, fécondité) (Awmack & Leather, 2002 ; Zehnder & Hunter, 2008). Par exemple et même si cette réponse n'est pas généralisable, DeLucia et al. (2012) ont montré que la modification des teneurs en C:N des plantes pouvaient affecter la performance des herbivores. Ainsi, une augmentation du rapport C:N induit une diminution de la qualité des plantes hôtes pour les herbivores (Dader et al., 2016) et diminue ainsi l'appétence de l'herbivore pour ces plantes. Par conséquent, la disponibilité des éléments nutritifs du sol permettra d'améliorer la croissance et donc la qualité des plantes (métabolites primaires, C, N...) (Meyer & Root, 1996), et pourra conduire à une augmentation de l'abondance des herbivores (Zehnder & Hunter, 2008).

D'une autre manière, la pression des herbivores sur les plantes peut entraîner un changement dans la qualité des plantes hôtes et affecter plus généralement les interactions écologiques (Awmack & Leather, 2002). Ainsi, des études ont conclu que le biota du sol était intimement lié aux communautés végétales par l'herbivorie (Sylvain & Wall, 2011). Les interactions multi-trophiques « bottom-up » entre les organismes édaphiques et aériens sont cruciales car elles façonnent la structure et la diversité des communautés naturelles (Van der Putten et al., 2001) et participent à améliorer la qualité des sols et à renforcer la croissance et la défense des plantes (Gange et al., 1999 ; Kabouw et al., 2011 ; Altieri et al., 2012). Par exemple, des études ont montré que la symbiose entre les plantes et les champignons mycorhiziens arbusculaires (AMF) du sol pouvait induire des interactions avec d'autres organismes du sol (champignons pathogènes, collemboles, champignons saprophytes) (Tiunov & Scheu, 2005) mais aussi avec des organismes aériens tels que les pucerons (Gange et al., 2001). Les organismes du sol peuvent être soit bénéfiques, soit nuisibles à la plante et aux herbivores aériens associés. En agissant sur la biodégradation des nutriments, les organismes du sol peuvent accroître la qualité des tissus végétaux et donc l'aptitude des herbivores en surface (Eisenhauer et al., 2010).

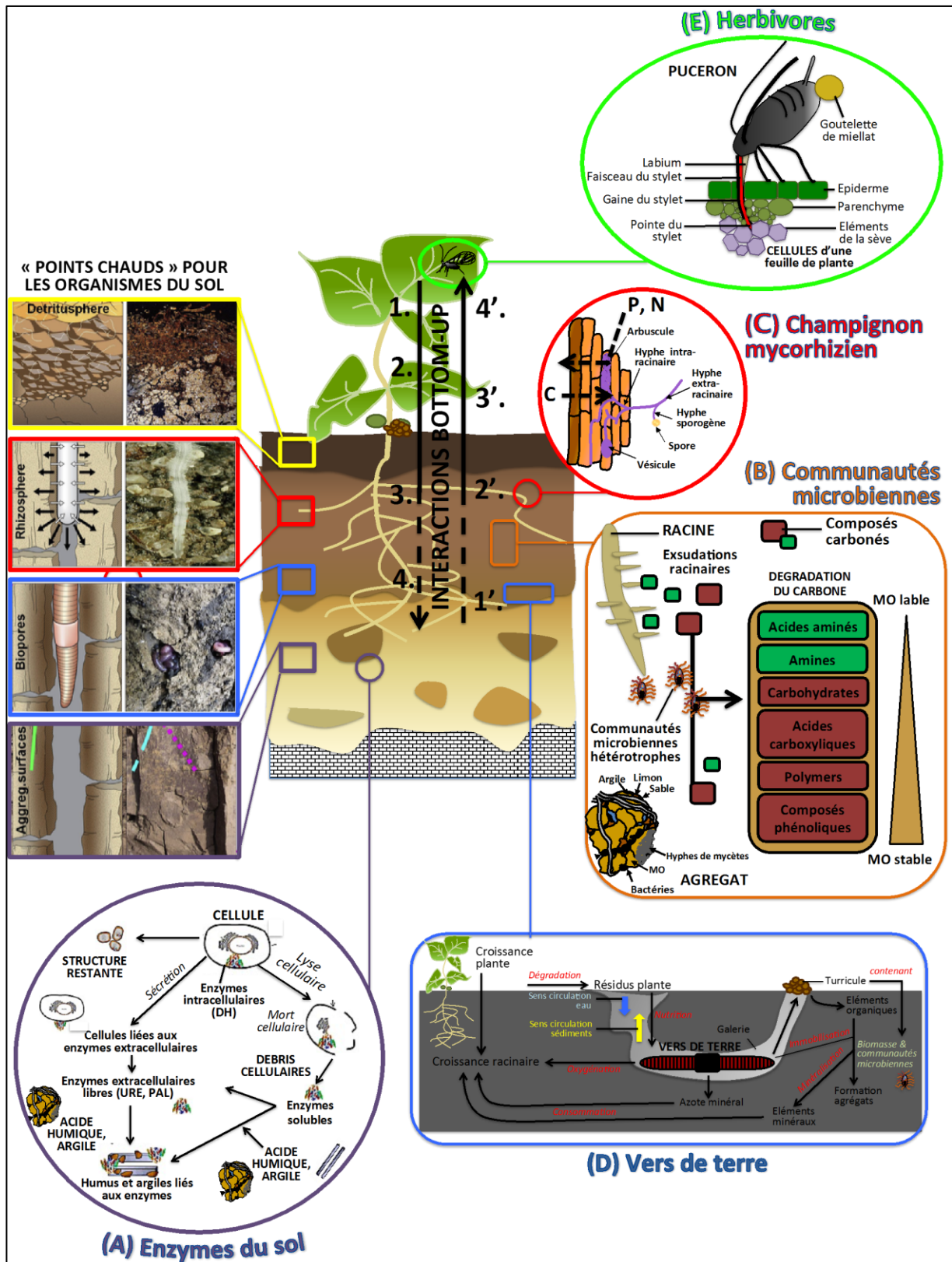


Fig. 14. Contributions directes ou indirectes des organismes édaphiques et aériens à la formation des agrégats du sol par association des particules minérales et de la matière organique sous l'action combinée de la production des exsudats racinaires des plantes (au centre) et de (A) la production d'enzymes intra et extra cellulaires dans le sol (modifié à partir de Gianfreda & Rao, 2014) ; (B) la dégradation des composés carbonés et la production des exopolysaccharides par les communautés bactériennes du sol ; (C) la production de glomaline par les

champignons mycorhiziens du sol ; (D) le tract intestinal des vers de terre et (E) la nutrition sur les feuilles des plantes par les herbivores aériens (modifié à partir de Guerrieri & Digilio, 2003). Sur la gauche de la figure sont représentés les points chauds du sol (détritosphère, rhizosphère, biopores, agrégatusphère) liés aux activités biologiques du sol (modifié à partir de Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015). Au milieu de la figure sont représentés les interactions tritrophiques entre le sol, la plante et les herbivores aériens : 1. Attaque par les herbivores ; 2. Voie de signalisation des plantes ; 3. La plante alloue de l'énergie par la sécrétion de substances racinaires pour assurer sa défense via les ressources édaphiques 4. Certains indicateurs biologiques contribuent à assurer directement ou indirectement la défense et la croissance des plantes. La réciproque est possible aussi : 1'. Les indicateurs biologiques (par exemple : les spores du sol) peuvent influencer sur le potentiel de colonisation des champignons mycorhiziens ; 2'. Les champignons mycorhiziens affectent la qualité des plantes hôtes ; 3'. Une modification des signaux à lieu vers les parties aériennes de la plante ; 4'. Le changement qualitatif des plantes entraîne une modification du comportement physiologique des herbivores.

Une étude réalisée par Kabouw et al. (2011) a montré que le développement de la population de pucerons peut être stimulé par les microorganismes du sol conduisant, selon la composition de la communauté du sol, à un changement dans les interactions entre les plantes et les animaux. La figure 12 illustre les interactions complexes qui peuvent avoir lieu entre le milieu aérien et souterrain, interactions qui sont médiées par la plante. Par exemple, la figure 14E représente un puceron en train de se nourrir du phloème d'une plante. Cette plante est elle-même implantée dans un sol au sein duquel de nombreuses activités et échanges souterrains peuvent se produire (Fig. 14A, B, C et D). Ainsi, des études ont montré que la nutrition des pucerons (Fig. 14E) pouvait influencer directement la colonisation des AMF sur leur plante hôte (Fig. 14C) (Gange et al., 1999) car les racines des plantes sont impliquées dans la dynamique entre la plante et les herbivores aériens (Kaplan et al., 2008). Réciproquement, des études ont montré que l'infection des plantes par les AMF peut avoir une cascade d'effets sur la chaîne alimentaire et les niveaux trophiques supérieurs (Gange et al., 2003). Les excréments racinaires sont la voie d'entrée des mécanismes de défense des plantes puisqu'elles permettent la mise en place de symbiose et sont impliquées dans la tolérance des plantes aux herbivores de surface (van der Putten et al., 2001). En conclusion, Yang et al. (2011) ont montré que la présence des herbivores en surface pouvait donc être un indicateur important de la qualité des sols car ils sont directement reliés à la dynamique des communautés édaphiques.

Comme pour les autres indicateurs de la qualité du sol, les pratiques culturales peuvent influencer la présence des herbivores en agriculture. Par exemple, les applications des engrais azotés et d'herbicides ont augmenté la présence des herbivores (Cisneros & Godfrey, 2001 ; Zehnder & Hunter, 2008) et modifié les interactions bottom-up (entraînant une modification des cycles biogéochimiques et biologiques du sol (Birkhofer et al., 2008)). Cette modification a été jugée néfaste pour la qualité du sol et l'environnement même si les rendements des cultures sont restés supérieurs dans ces sols comparativement aux sols non traités (Birkhofer et al., 2008). De même, la gestion de la santé des sols peut réduire la sensibilité des plantes aux phytophages, directement par médiation phytosanitaire, et

indirectement via des interactions entre la biodiversité aérienne et la biodiversité souterraine (Altieri et al., 2012).

Dans un contexte de développement durable en agriculture, il est donc important de considérer un ensemble de propriétés physico-chimiques et biologiques comme indicateurs de la qualité du sol et de l'environnement. Même si certaines pratiques de gestion agricole conduisent à améliorer certains indicateurs de la qualité des sols, elles peuvent aussi à court ou moyen terme entraîner une diminution des rendements des cultures au travers les effets délétères potentiels des engrais minéraux et des pesticides. En raison de la dépendance de l'humanité aux productions végétales, des études reliant les communautés biotiques du sol et la productivité végétale sont nécessaires pour assurer la durabilité des agrosystèmes à long terme et limiter les contaminations environnementales (Sylvain & Wall, 2011).

3. Interactions trophiques entre les biotes souterrains et aériens. Quels sont les effets de la gestion des pratiques culturales sur ces interactions écologiques ?

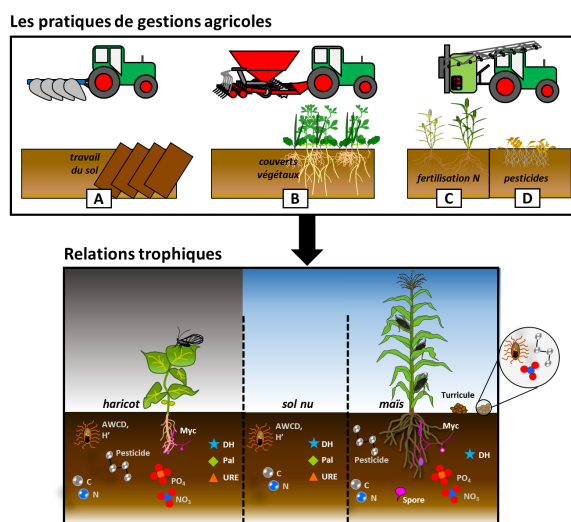


Fig. 15. Schéma illustrant les différents compartiments de l'agrosystème abordés au cours de la thèse. Les relations trophiques. Cf. Figure 3 page 22.

Les compartiments aériens et souterrains influencent les processus microbiens dans les agrosystèmes (Wardle, 2002). Les plantes en tant que producteurs fournissent le carbone organique permettant le fonctionnement des organismes souterrains tels que les décomposeurs et les organismes associés aux racines (rhizophages, pathogènes, mutualistes symbiotiques). De la même façon, certains organismes souterrains régulent directement ou indirectement la croissance des plantes et la composition de la communauté en déterminant l'offre et la qualité des éléments nutritifs disponibles (Wardle et al., 2004). Tout d'abord, l'évolution a permis aux racines des plantes et aux microbes du sol de créer de nombreuses interactions bénéfiques permettant l'acquisition énergétique réciproque de carbone par les microbes et d'azote par les plantes (Moore et al., 2003). D'autre part, il est bien connu que les

organismes du sol sont quantitativement et qualitativement sensibles à la MO (Swift et al., 1979 ; Moore et al., 2003). Les espèces végétales influencent donc la composition des communautés microbiennes autour de leurs racines (Yeates, 1999). Par exemple, la composition de la communauté végétale peut influencer spécifiquement plusieurs composantes du biote des décomposeurs (bactéries, champignons, nématodes, acariens, vers de terre) (Wardle et al., 2004). Cependant, les plantes ne sont pas les seules à influencer les interactions aériennes et souterraines. En effet, la prédation au sein de la rhizosphère a été décrite comme influençant la disponibilité des nutriments, la productivité végétale et la dynamique de la communauté aérienne (Moore et al., 2003). Les prédateurs peuvent ainsi modifier les interactions « bottom-up » de manière positive ou négative. Par exemple, les prédateurs peuvent favoriser la croissance des plantes et influencer la dynamique d'autres espèces conduisant à une stabilisation des écosystèmes. Au contraire, les prédateurs peuvent, en régulant leurs proies, modifier la libération de nutriments conduisant à une diminution de la productivité des plantes (Moore et al., 2003).

En prenant en compte un système plus global, Hamilton & Frank (2001) ont montré que les interactions trophiques aériennes ont des effets indirects sur le biote du sol en affectant les ressources que les plantes produisent. Par exemple, à court terme, l'herbivorie foliaire peut provoquer une libération accrue de carbone dans la rhizosphère, ce qui peut affecter positivement les activités microbiennes et conduire à une augmentation de la disponibilité en azote de la plante. A plus long terme, les herbivores peuvent affecter positivement (par augmentation de la matière organique labile dans les sols) ou négativement (par la production induite de défenses secondaires et la prédominance d'espèces végétales réduisant la qualité de la litière) l'accès aux ressources pour les microorganismes du sol (Stark et al., 2003). En revanche, des études ont montré que des groupes plus intimement liés aux racines des plantes, telles que les champignons mycorhiziens, peuvent être altérés par la bioagression foliaire. Ce phénomène peut s'expliquer par une réduction de l'allocation du C vers les racines (Gehring & Whitham, 1994). Réciproquement, les organismes souterrains peuvent influencer la structure de la communauté aérienne et cette régulation a été largement documentée (Fig. 16). Elle peut être néfaste pour la croissance des plantes ; par exemple la présence de parasites ou herbivores racinaires entraîne une diminution du C et des éléments nutritifs dans les tissus végétaux et diminue également la capacité d'absorption des racines, réduisant la croissance des plantes (Bever et al., 1997). Au contraire, la régulation par la présence d'organismes symbiotiques peut être positive ; par exemple, la présence de champignons mycorhiziens peut induire une augmentation des allocations des ressources nutritives pour la plante (Smith & Read, 1997). Des études ont montré que lorsque le développement de la macrofaune est défavorisé dans les sols, la décomposition de la MO par la biomasse microbienne est altérée, conduisant à une augmentation des graminées par rapport aux autres espèces végétales (Bradford et al., 2002). Les vers de terre induisent également des modifications sur la croissance végétale car ils sont impliqués dans le transport de propagules mycorrhizogènes et de graines de plantes (Toyota & Kimura, 1994), mais également au

travers la mobilisation des nutriments et l'absorption racinaire, affectant indirectement les parasites herbivores aériens. Par exemple, Scheu et al. (1999) ont montré que la performance des pucerons phytophages était supérieure lorsque les plantes hôtes étaient cultivées en présence de vers de terre (Fig. 16).

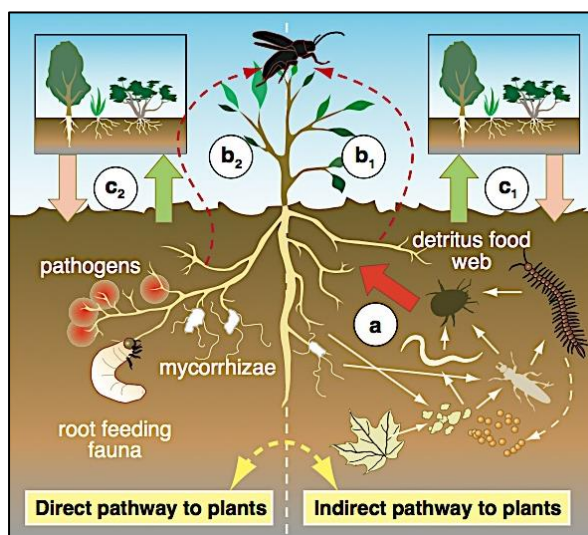


Fig. 16. Les communautés en surface sont affectées à la fois par les conséquences directes et indirectes des organismes de la chaîne alimentaire du sol. A droite : les activités d'alimentation dans le réseau trophique à partir des débris (flèches blanches fines) stimulent le renouvellement des nutriments (flèche rouge épaisse), l'acquisition des nutriments des plantes et la performance des plantes (a) et influencent ainsi indirectement les herbivores aériens (b1). A gauche : le biote édaphique exerce des effets directs sur les plantes en se nourrissant de racines et en formant des relations antagonistes ou mutualistes avec leurs plantes hôtes (mycorrhizes, faunes rhizophages, pathogènes). Ces interactions directes avec les plantes influent non seulement sur la performance des plantes hôtes elles-mêmes, mais aussi sur celle des herbivores (b2) et potentiellement leurs prédateurs. De plus, le réseau alimentaire du sol peut contrôler le développement des communautés végétales qui se succèdent à la fois directement (c2) et indirectement (c1), et ces changements peuvent influencer le biota du sol (issue de Wardle et al., 2004).

Malgré ces interactions entre les espaces aériens et souterrains, les traits éco-physiologiques (croissance, allocation du carbone, concentrations nutritives foliaires...) des espèces végétales adaptées aux conditions pédologiques seront différents de celles non adaptées et détermineront en grande partie les interactions qui en découlent. Par exemple des espèces adaptées à des conditions fertiles peuvent supporter un plus fort taux d'herbivorie avec plus de 50 % de la productivité primaire nette (PPN) retournée au sol en tant que MO labile. Alors que dans des conditions stériles, presque 100 % de la PPN des plantes retournera au sol sous forme de MO récalcitrante (Wardle et al., 2004). De plus il est admis que des sols fertiles hébergent des réseaux trophiques de décomposeurs plus larges comprenant microflore, microfaune et vers de terre alors que les sols stériles seront dominés par les champignons et les arthropodes. Même si la séquestration du C apparaît comme bénéfique pour la régulation climatique, il existe un paradoxe entre un sol fertile qui soutient d'avantage les cycles nutritifs rapides avec une faible accumulation nette de carbone dans le sol et privilégie une plus forte croissance du végétal, par

rapport à un sol moins fertile qui favorise des cycles nutritifs plus lents dans lesquels les nutriments sont conservés et la séquestration du C serait accrue (Wardle, 2002). De même, un autre paradoxe a été montré dans des recherches antérieures : la biodiversité des sols n'est pas forcément la source d'un accroissement de la productivité végétale. En outre, les effets de la diversité des décomposeurs ne sont pas forcément positifs pour la productivité végétale bien que le statut nutritif peut-être un facteur déterminant. Par exemple, Alpehi et al. (1996) ont montré que l'ajout de vers de terre peut induire une diminution de la croissance des plantes en présence d'autres organismes comme les nématodes. En revanche, Jonsson et al. (2001) ont montré que la diversité accrue de champignons ectomycorhiziens favorisait la productivité des semis dans les sols peu fertiles. Ainsi, il semblerait que les effets de la biodiversité des sols sur la productivité végétale puissent être positifs, neutres, ou négatifs et dépendent à la fois des conditions de fertilité des sols mais également des conditions climatiques (Wardle, 2002 ; Wardle et al., 2004). Les phénomènes de changements climatiques affectent le biote du sol et les interactions trophiques qui en découlent. Ainsi, des changements dans les quantités et qualités des MO issus des plantes ont été montrés (Jackson et al., 2002). Les pratiques culturales affectent les paramètres édaphiques et/ou aériens et donc peuvent avoir une forte influence sur les interactions aériennes et souterraines. Cependant, les liens qui peuvent exister entre gestion des sols et interactions trophiques sont encore mal compris et des études supplémentaires doivent être réalisées pour améliorer l'efficacité des interventions humaines en agriculture et générer des efforts pour restaurer ou conserver la qualité des sols et de l'environnement.

De manière simplifiée, la rhizosphère est le lieu d'échange privilégié des interactions entre le biote souterrain et aérien. La complexité provient des réseaux alimentaires qui s'y développent à partir des exsudats racinaires sécrétés par les racines. En effet, Moore et al. (1988) ont montré que les racines vivantes ou les détritiques forment la base d'un canal énergétique constitué à la fois par des insectes, des nématodes mais aussi par des microbes du sol. Selon la constitution des biotes autour de ces canaux, la disponibilité des nutriments pour les plantes peut être affectée. Par exemple, un canal énergétique constitué majoritairement par des bactéries permettra un turn-over rapide des nutriments dans les sols alors qu'un canal dominé par les champignons entraînera un turn-over plus lent (Coleman et al., 1983). La dominance de certaines espèces et la force des liens énergétiques qui en découlent sont fortement influencées par les perturbations du sol dont les pratiques culturales sont à l'origine. Par exemple, un ratio C:N élevé (e.g. l'apport de paille en semis direct) peut entraîner une dominance des espèces fongiques alors que les espèces bactériennes seront privilégiées dans les sols avec des ratios C:N plus bas (e.g. couverts végétaux enrichis en légumineuses). Aussi, des perturbations qui modifient l'azote disponible dans les sols (e.g. la fertilisation azotée) peuvent altérer la structure du sol induisant des modifications dans la prédominance soit des champignons soit des bactéries. Par exemple, des taux de décomposition accélérés de l'azote conduiront à une prédominance des bactéries au détriment de

certaines espèces fongiques (Doles, 2000). Les interactions trophiques qui ont lieu au sein de la rhizosphère, en modifiant la biodisponibilité des nutriments dans le sol, peuvent affecter les interactions trophiques de type top-down et bottom-up, et donc affecter la productivité végétale. A titre d'exemple, une racine qui croît va libérer des exsudats riches en carbone qui vont stimuler la croissance microbienne et attirer les prédateurs (Moore et al., 2003). Cela permet la libération importante d'azote disponible pour la plante. Les interactions mutualistes directes symbiotiques font donc partie intégrante de la rhizosphère et sont des indicateurs clés à prendre en compte dans la perturbation des sols. De même, les prédateurs dans le sol sont également de bons indicateurs de la structure des interactions trophiques faisant suite à une perturbation. Selon les applications ou non de fertilisation azotée, les herbivores aériens vont se nourrir de manière sélective sur les plantes en fonction de la concentration d'azote et/ou de composés carbonés dans le feuillage (Koricheva et al., 2000). De même, la présence de certains organismes édaphiques comme les vers de terre peut être bénéfique pour certains organismes aériens tels que les pucerons (Scheu et al., 1999). La pratique du labour en ayant un effet négatif sur les communautés de vers de terre peut donc influencer négativement les interactions trophiques. De nombreux chercheurs ont donc montré que le biote du sol peut affecter la dynamique des éléments nutritifs, la croissance des plantes et la chaîne alimentaire aérienne en conséquence. Toute perturbation occasionnée par une pratique culturale peut donc avoir des effets sur la disponibilité des nutriments et donc modifier la minéralisation des nutriments par les communautés microbiennes édaphiques, la croissance des prédateurs et les interactions trophiques « bottom-up ». En plus de connaître les effets des pratiques culturales sur les indicateurs de la qualité des sols, il est donc également indispensable de déterminer les effets de ces mêmes pratiques sur les interactions trophiques aériennes et souterraines. Cela permettra de déterminer les pratiques agricoles qui permettent le maintien d'un équilibre écologique favorisant à la fois la disponibilité des nutriments et la stabilisation des réseaux alimentaires dans les agrosystèmes.

Références bibliographiques

- Acton, D.F., Padbury, G.A. 1993. A conceptual framework for soil quality assessment and monitoring. In « O.F. Acton (Editor), *A Program to Assess and Monitor Soil Quality in Canada: Soil Quality Evaluation Program Summary (interim)*. Centre for Land and Biological Resources Research, No. 93-49, Agriculture Canada, Ottawa ».
- Aguilar, O.M., Riva, O., Peltzer, E. 2004. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 13548-13553.
- Aktar, M.W., Sengupta, D., Chowdhury, A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisc. Toxicol.* 2(1): 1-12.
- Alpei, J., Bonkowski, M., Scheu, S. 1996. Protozoa, Nematoda and Lumbricidae in the rhizosphere of *Hordeum vulgare* (Poaceae): faunal interactions, response of microorganisms and effects on plant growth. *Oecologia*, 106: 111-126.
- Altieri, A.H., Bertness, M.D., Coverdale, T.C., Herrmann, N.C., Angelini, C. 2012. A trophic cascade triggers collapse of a salt-marsh ecosystem with intensive recreational fishing. *Ecol.* 93: 1402-1410.
- Ambrosi, D., Isensee, A., Macchia, J. 1978. Distribution of oxadiazon and phosalone in an aquatic model ecosystem. *American Chem. Soci.* 26(1): 50-53.
- Andrews, R.K., Blakeley, R.L., Zerner, B. 1989. Urease: A Ni (II) metalloenzyme. In *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, ed. J. R. Lancaster, pp. 141-166. VCH Publishers, New York.
- Andrews, S.S., Carroll, C.R. 2001. Designing a soil quality assessment tool for sustainable agroecosystems management. *Ecol. Appl.* 11: 1573-1585.
- Aon, M.A., Colaneri, A.C. 2001. Temporal and Spatial Evolution of Enzymatic Activities and Physico-Chemical Properties in an Agricultural soil. *Appl. Soil Ecol.* 18: 255-270.
- Arias, M.E., Gonzalez-Perez, J.A., Gonzalez-Vila, F.J., Ball, A.S. 2005. Soil health – a new challenge for microbiologists and chemists. *Int. Microbiol.* 8: 13–21.
- Arshad, M.A., Schnitzer, M., Angers, D.A., Ripmeester, J.R., 1990. Effect of till versus no till on the quality of soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 53: 595–599.
- Arshad, M.A., Coen, G.M. 1992. Characterization of soil quality: Physical and chemical criteria. *Am. J. Alter. Agric.*, 7: 25-31.
- Awmack, C.S., Leather, S.R. 2002. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Ann. Rev. Entomol.* 47: 817–844.

Aziz, I., Mahmood, T., Islam, R. 2013. Effect of long term no-till and conventional tillage practices on soil quality. *Soil Till. Res.* 131: 28-35.

Baretta, D., Brown, G.G., Cardoso, E.J.B.N. 2010. Potencial da Macrofauna e outras variáveis edáficas como indicadores da qualidade do solo em áreas com *Araucaria angustifolia*. *Acta Zoól. Mexicana*, 2: 135-150.

Barois, I., Lavelle P. 1986. Changes in respiration rate and some physico-chemical properties of soil during transit through *Pontoscolex corethurus* (Glossoscolecidae Oligochaete). *Soil Biol. Biochem.* 18(5): 539-541.

Barré, P., McKenzie, B.M., Hallet, P.D. 2009. Earthworms bring compacted and loose soil to a similar mechanical state. *Soil Biol. Biochem.* 41(3): 656-658.

Barriuso, E., Gaillardon, P., Schavon, M. 1994a. Biodisponibilité des pesticides dans le sol. XXIV Congrès Groupe Français des Pesticides, Bordeaux, 1-11.

Barriuso, E., Benoit, P., Bergheaud, V. 1994b. Role of soil fractions in retention and stabilisation of pesticides in soils. In « *Environmental Behaviour of Pesticides and Regulatory Aspects*, Copin, A., Houis, G., Pussemier, L., Salembier, J.F. Ed. COST, European Study Service, Rixensart, Belgique, 138-143 ».

Barriuso, E., Calvet, R., Schavon, M., Soulas, G. 1996a. Les pesticides et les polluants organiques des sols. Transformations et dissipation. *Etude et Gestion des Sols*, 3(4): 279-296.

Barriuso, E., Eklo, O.M., Iglesias, E., Houot, S. 1996b. Modification de la mobilité de pesticides dans les sols après addition de matières organiques exogènes. 5èmes Journées nationales de l'étude des sols, AFES, Rennes, 99-101.

Baruah, M., Mishra, R.R. 1986. Effect of Herbicides Butachlor, 2,4-d and Oxyfluorfen on Enzyme Activities and CO₂ Evolution in Submerged Paddy Field Soil. *Plant Soil*, 96: 287-291.

Behera, B., Singh, S.G. 1999. Studies on Weed Management in Monsoon Sea- son Crop of Tomato. *Indian J. Weed Sci.* 31(1-2): 67.

Benoit, P. 1994. Rôle de la nature des matières organiques dans la stabilisation des résidus polluants organiques dans les sols. Thèse Insitut National Agronomique Paris-Grignon, pp. 209.

Bever, J.D., Westover, K.M., Antonovics, J. 1997. Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. *J. Antonovics J. Ecol.* 85: 561-573.

Birkhofer, K., Bezemer, T.M., Bloem, J., Bonkowski, M., Christensen, S., Dubois, D., Ekelund, F., Fliebbach, A., Gunst, L., Hedlund, K., Mader, P., Mikola, J., Robin, C., Setälä, H., Tatin-Froux, F., van der Putten, W.H., Scheu, S. 2008. Long-term organic farming fosters below and aboveground biota: Implications for soil quality, biological control and productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40: 2297-2308.

- Boiffin, J., Monnier, G. 1989. Evolution de certaines composantes de la fertilité sous l'influence des systèmes de culture. In : « Fertilité et systèmes de production », Sébillotte, M., Ed., INRA Editions, Paris, pp. 207-225.
- Bonfante, P., Perotto, S. 1995. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* Tansley review, 130(1): 3-21.
- Bossuyt, H., Six, J., Hendrix, P.F. 2006. Interactive effects of functionally different earthworm species on aggregation and incorporation and decomposition of newly added residue carbon. *Geoderma*, 130(1-2): 14-25.
- Bott, L.K., Robson, A.D. 1978. Growth of subterranean clover in relation to the formation of endomycorrhizas by introduced and indigenous fungi in a field soil. *New Phytol.* 81: 575-585.
- Brown, G.G., Barois, I., Lavelle, P. 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *Eur. J. Soil Biol.* 36: 177-198.
- Bradford, M.A., Jones, T.H., Bardgett, R.D. et al. 2002. Impacts of soil faunal community composition on model grassland ecosystems. *Science*, 298: 615-618.
- Brust, G. 2010. Supplying nitrogen to vegetables in organic production systems. Found at: <http://mdvegetables.umd.edu/Horticultural/index.cfm>
- Buresh, R.J., De Datta, S.K., Padilla, J.L., Samson, M.I. 1988. Effect of two urease inhibitors on floodwater ammonia following urea application to lowland rice. *SSSAJ* 52: 856-861.
- Burns, R.G. 1986. Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids. In: *Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*, ed. (Huang PM, Schnitzer M Eds), Soil Sci. Soc. Am. Madison, pp. 429-452.
- Butenschoen, O., Marhan, S., Langel R., Scheu, S. 2009. Carbon and nitrogen mobilisation by earthworms of different functional groups as affected by soil sand content. *Pedobiologia*, 52(4): 263-272.
- Calderbank, A. 1989. The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 108: 71-103.
- Calvet, R. 1989. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ. Health Persp.* 83: 145-177.
- Cardoso, E.J.B.N., Vasconcellos, R.L.F., Bini, D., Miyauchi, M.Y.H., dos Santos, C.A., Alves, P.R.L., de Paula, A.M., Nakatani, A.S., de Moraes Pereira, J., Nogueira, M.A. 2013. Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? *Sci. Agric.* 70(4): 274-289.

CEE. 1976. Directive cadre du CS 76/464/CEE, du 4 mai 1976 concernant la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la Communauté européenne. Journal Officiel des Communautés Européennes, n° L 229 du 18 mai 1976.

CEE. 1980. Directive du CD 80/778/CEE du 15 juillet 1980. Relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Journal Officiel des Communautés Européennes, n° L229/11 du 30 août 1980.

Chan, K.Y., Roberts, W.P., Heenan, D.P. 1992. Organic carbon and associated soil properties after 10 years of rotation under different stubble tillage practices. *Australian J. Soil Res.* 30, 71-83.

Chapuis-Lardy, L., Brossard M., Lavelle P., Schouller E. 1998. Phosphorus transformations in a ferralsol through ingestion by *Pontoscolex corethrurus*, a geophagous earthworm. *Eur. J. Soil Biol.* 34(2), 61-67.

Chaussod, R. 1996. La qualité des sols : Evaluation et implications. Numéro spécial, Forum « La sol, un patrimoine menacé ? », Paris, pp. 261-278.

Cisneros, J.J., Godfrey, L.D. 2001. Midseason pest status of the cotton aphid (Homoptera: Aphididae) in california cotton: is nitrogen a key factor? *Environ. Entomol.* 30(3): 501-510.

Coleman, D.C., Reid, C.P.P., Cole, C.V. 1983. Biological strategies of nutrient cycling in soil systems. In « *MacFyaden, A., Ford, E.D. editors. Advances in ecological research, 13: 1-55, Academic, London, UK* ».

Curran, W.S. 2006. Cover crops for conservation tillage systems. Conservation tillage series, Number Five: 1-8.

Curry, J.P., Schmidt, O. 2007. The feeding ecology of earthworms – a review. *Pedobiologia*, 50(4): 463-477.

Cycon, M., Wojcik, M., Borymski, S., Piotrowska-Seget, Z. 2013. Short-term effects of the herbicide napropamide on the activity and structure of the soil microbial community assessed by the multi-approach analysis. *App. Soil Ecol.* 66: 8-18.

Dabney, S.M., Delgado, J.A., Reeves, D.W. 2001. Using winter cover crops to improve soil and water quality. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 32(7&8): 1221-1250.

Dader, B., Fereres, A., Moreno, A., Trebicki, P. 2016. Elevated CO₂ impacts bell pepper growth with consequences to *Myzus persicae* life history, feeding behaviour and virus transmission ability. *Sci. Rep.* 6: 19120. doi: 10.1038/srep19120

Das, S.K, Varma, A. 2011. Chapter 2. Role of enzymes in maintaining soil health. Ed. *Soil Enzymology, Soil Biology*, 22: 25-42.

- DeLucia, E. H., Nabity, P. D., Zavala, J. A., Berenbaum, M. R. 2012. Climate change: resetting plant-insect interactions. *Plant Physiol.* 160: 1677-1685. doi: 10.1104/pp.112.204750
- Demon, M. 1994. Influence des facteurs climatiques et des constituants du sol sur la dynamique de l'atrazine. Thèse INLP. Nancy, pp. 111.
- Denman, K.L., Brasseur, G., Chidthaisong, A., Ciais, P., Cox, P.M., Dickinson, R.E., Hauglustaine, D., Heinze, C., Holland, E., Jacob, D., Lohmann, U., Ramachandran, S., da Silva Dias, P.L., Wofsy, S.C., Zhang, X. 2007. Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry, pp. 499-587. *In S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, and H.L. Miller (eds.) Climate change: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Dick, R.P., Myrold, D.D., Kerle, E.A. 1988. Microbial biomass and soil enzyme activities in compacted and rehabilitated skid trail soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52: 512-516.
- Dick, R.P., Sandor, J.A., Eash, N.S. 1994. Soil enzyme activities after 1500 years of terrace agriculture in the Colca Valley. Peru. *Agric. Ecosyst. Environ.* 50: 123–131.
- Dick, R.P. 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. *In: Pankhurst CE, Doelman, P., Haanstra, L. 1979. Effect of lead on soil respiration and dehydrogenase activity.* *Soil Biol. Biochem.* 11: 475-479.
- Dimassi, B., Cohan, J.P., Labreuche, J., Mary, B., 2013. Changes in soil carbon and nitrogen following tillage conversion in a long-term experiment in Northern France. *Agric. Ecosyst. Env.* 169: 12– 20.
- Doles, J. 2000. A survey of soil biota in the arctic tundra and their role in mediating terrestrial nutrient cycling. Thesis. University of Northern Colorado, Greeley, Colorado, USA.
- Donigian, A.S. Jr., Barnwell, T.O., Jackson, R.B., Patwardhen, A.S., Weinreich, K.B., Rowell, Chinnaswamy, R.V., Cole, C.V., 1994. Assessment of alternative management practices and policies affecting soil carbon in agroecosystems of the central United States. USEPA, Athens, GA, Publication #EPA/600/R-94/067.
- Doran, J.W., Safley, M. 1997. Defining and assessing soil health and sustainable productivity. *In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.), Biological Indicators of Soil Health.* CAB international, New York, pp. 1–28.
- Doube BM, Gupta VVSR (eds) *Biological indicators of soil health.* CABI, Wellingford, pp 121–156.
- Edwards, C.A. 1984. Changes in agricultural practice and their impact upon soil organisms. *In : Jenkins D., ed. Proceedings of ITE symposium no. 13, The impact of agriculture on wildlife, agriculture and the environment, 28-29 February and 1 March 1984, Monks Wood Experimental Station, Sawtry, Cambridgeshire, UK, 56-65.*

- Edwards, C. A., Bohlen, P. J. 1996. *Biology and ecology of earthworms*. 3rd edn, (Chapman & Hall, 1996).
- Eisenhauer, N., Horsch, V., Moeser, J., Scheu, S. 2010. Synergistic effects of microbial and animal decomposers on plant and herbivore performance. *Basic Appl. Ecol.* 11: 23-34.
- Eriksen-Hamel, N.S., Speratti, A.B., Whalen, J.K., Legere, A., Madramootoo, C.A. 2009. Earthworm populations and growth rates related to long-term crop residue and tillage management. *Soil Till. Res.* 104: 311–316.
- Erisman J.W., Sutton, M.A., Galloway, J.N., Klimont, Z., Winiwarter, W. 2008. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geosci.* 1: 636-639.
- Espinoza, L., Norman, R., Slaton, N., Daniels, M. The nitrogen and phosphorus cycle in soils. *Agriculture and Natural Resources*. University of Arkansas, Division of Agriculture. <http://www.uaex.edu>.
- Estok, D., Freedman, B. Boyle, D. 1989. Effects of the herbicides 2,4-D, glyphosate, hexazinone, and triclopyr on the growth of three species of ecto- mycorrhizal fungi. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 835-839.
- Fabra, A., Duffard, R., Evangelista, D.D.A. 1997. Toxicity of 2,4-dichlorophen- oxyacetic acid in pure culture. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 645-652.
- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L. 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biol. Biochem.* 35: 837-843.
- Food and Agriculture Organization [FAO]. 2011. *State of the World Forests*. FAO, Rome, Italy. (Technical Report).
- Fournier, J.C., Soulas, G., Parekh, N.R. 1997. Main microbial mechanisms of pesticide degradation in soil. *In Tarradellas, J. et al. (eds.) Soil Toxicology. Lewis Publishers CRC, New York, pp. 85-116.*
- Frankenberger, W.T., Tabatabai, M.A.Jr., Tabatabai, M.A. 1991. Factors affecting L-asparaginase activity in soils. *Biol. Fert. Soils* 11: 1-5.
- Frossard, E., Condron, L.M., Oberton, A., Sinaj, S., Fardeau, J.C. 2000. Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *J. Environ. Qual.* 29: 15-23.
- Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J. 2003. The nitrogen cascade. *Biosci.* 53: 341–356.
- Galvez, L., Douds, D.D., Wagoner, Jr.P., Longnecker, L.R., Drinkwater, L.E., Janke, R.R. 1995. An overwintering cover crop increases inoculum of VAM fungi in agricultural soil. *Am. J. of Alt. Agric.*

10: 152-156.

Gange, A.C., Brown, V.K., Farmer, L.M. 1990. A test of mycorrhizal benefit in an early successional plant community. *New Phytol.* 115: 85-91.

Gange, A. C., West, H. W. 1994. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and foliar-feeding insects in *Plantago lanceolata* L. *New Phytol.* 128: 79–97.

Gange, A.C., Bower, E., Brown, V.K. 1999. Positive effects of an arbuscular mycorrhizal fungus on aphid life history traits. *Oecologia*, 120: 123–31.

Gange, A.C. 2001. Species-specific responses of a root- and shoot-feeding insect to arbuscular mycorrhizal colonization of its host plant. *New Phytol.* 150: 611-618.

Gange, A.C., Brown, V.K., Aplin, D.M. 2003. Multitrophic links between arbuscular mycorrhizal fungi and insect parasitoids. *Ecol Lett.* 6: 1051–1055.

Garcia, C., Hernandez, T., Costa, F., Ceccanti, B., Ciardi, C. 1992. Changes in ATP content, enzyme activity and inorganic nitrogen species during composting of organic wastes. *Can. J. Soil Sci.*, 72(3), 243-253.

Gaupp-Berhausen, M., Hofer, M., Rewald, B., Zaller, J.G. 2015. Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. *Scientific Reports*, 5: 12886. doi: 10.1038/srep12886 (www.nature.com/scientificreports).

Gehring, C.A., Whitham, T.G. 1994. Interactions between aboveground herbivores and the mycorrhizal mutualists of plants. *Trends Ecol. Evol.* 9: 251-255.

Geisseler, D., Horwath, W.R., Scow, K.M. 2011. Soil moisture and plant residue addition interact in their effect on extracellular enzyme activity. *Pedobiologia*, 54: 71-78.

Geisseler, D., Scow, K.M. 2014. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. *Soil Biol. Biochem.* 75: 54-63.

Gianfreda, L., Rao, M.A. 2014. Enzymes in agricultural sciences. In « Soil Enzymes. OMICS Group eBooks pp. 1-18 ». <http://www.esciencecentral.org/ebooks>.

Giller, K.E., Beare, M.H., Lavelle, P., Izac, A.M.N., Swift, M.J., 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl. Soil Ecol.* 6: 3–16.

Glendining, M.J., Powelson, D.S. 1995. The effects of long- continued applications of inorganic nitrogen fertilizer on soil organic nitrogen – a review. p. 385-446. In R. Lal and B.A. Stewart (eds.) *Soil management: experimental basis for sustainability and environmental quality*. Advances in Soil Science Series. Lewis, Boca Raton, FL. USA.

Glenn, J.C., Gordon, T.J., Florescu, E. 2014. State of the future: executive summary. The Millenium Project, Washington, D.C., USA.

González-Chávez, M.A., Aitkenhead-Peterson, J.A., Gentry, T.J., Zuberer, D., Hons, F., Loeppert, R. 2010. Soil microbial community, C, N, and P responses to long-term tillage and crop rotation. *Soil Till. Res.* 106: 285–293.

Gourdon, R., Perrodin, Y., Fery, F., Cambier, P., Barriuso, E., Monediaire, G., Gouguet, J.J., Tacheix, T., Giraudel, C. 1994. Investigation sur les différentes approches de la définition et de la quantification des sites pollués. Rapport final, Contrat Association R.E.CO.R.D. N°93-503.

Govaerts, B., Mezzalama, M., Unno, Y., Sayre, K.D., Luna-Guido, M., Vanherck, K., 2007. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. *Appl. Soil Ecol.* 37, 18–30.

Govers, G., Quine, T.A., Desmet, P.J.J. and Walling, D.E. 1996. The relative contribution of soil tillage and overland flow erosion to soil redistribution on agricultural land. *Earth Surf. Process. Landforms*, 21: 929–946.

Griffin, J. L., Dabney, S.M. 1990. Preplant-postemergence herbicides for legume cover-crop control in minimum tillage systems. *Weed Tech.* 4: 332-336.

Guenet, B., Danger, M., Abbadie, L, Lacroix, G. 2010. Priming effect: bridging the gap between terrestrial and aquatic ecology. *Ecol.* 91(10): 2850-2861.

Guerrieri, E., Digilio, M.C. 2008. Aphid-plant interactions: A review. *J Plant Interact.* 3(4): 223-232.

Guo, J.H., Liu, X.J., Zhang, Y., Shen, J.L., Han, W.X., Zhang, W.F., Christie, P., Goulding, K.W.T., Vitousek, P.M., Zhang, F.S., 2010. Significant acidification in major Chinese croplands. *Science*, 327: 1008-1010.

Hamel, C. 2004. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on N and P cycling in the root zone. *Can. J. Soil Sci.* 84: 383-395.

Hamilton, E.W., Frank, D.W. 2001. Can plants stimulate soil microbes and their own nutrient supply? Evidence from a grazing tolerant grass. *Ecology*, 82: 2397-2402.

Harrier, L.A., Watson, C.A. 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Manag. Sci.* 60: 149-157.

Hartmaan, M., Frey, B., Mayer, J., Mader, P., Widmer, F. 2015. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME J.* 9: 1177-1194.

He, Y., Qi, Y., Dong, Y., Xiao, S., Peng, Q., Liu, X., Sun, L. 2012. Effects of nitrogen fertilization on

soil microbial biomass and community functional diversity in temperate grassland in inner Mongolia, China. *Clean-Soil Air Water*, 41(12): 1216-1221.

Heckman, J.R., Weil, R.R., Magdoff, F. 2009. Practical steps to soil fertility for organic agriculture, p. 139-173, *In C. A. Francis, ed. Organic farming: The ecological system. American Society of Agronomy/ Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, WI.*

Heil, M., Ton, J. 2008. Long-distance signaling in plant defence. *Trends Plant Sci.* 13: 264–272.

Hoorman, J., Islam, R. 2010. *Understanding Soil Microbes and Nutrient Cycling.* The Ohio State University.

Horn, M.A., Schramm, A., Drake, H.L. 2003. The earthworm gut: an ideal habitat for ingested N₂-producing microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(3): 1662-1669.

Hutchinson, J.J., Campbell, C.A., Desjardins, R.L. 2007. Some perspectives on carbon sequestration in agriculture. *Agr. Forest Meteorol.* 142: 288-302.

IFA. 2015. IFADATA www.ifadata.fertilizer.org/ucSearch.aspx.

Insam, H. 2001. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma*, 100: 389-402.

Jackson, R.B., Banner, J.L., Jobbagy, E.G., Pockman, W.T., Wall, D.H. 2002. Ecosystem carbon loss with woody plant invasion of grasslands. *Nature*, 418: 623-626.

Jensa, J., Wiemken, A., Frossard, E. 2006. The effects of agricultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi. *Function of soils for Human Societies and the Environment.* Geological Society, London, Special Publications, 266: 89-115.

Jensen, L.S., McQueen, D.J., Sheperd, T.G. 1996. Effects of compaction on N-mineralization and microbial-C and – N. I. Field measurements. *Soil Tillage Res.* 38: 175-188.

Johnson, S. N., Hawes, C., Karley, A. J. 2009. Reappraising the role of plant nutrients as mediators of interactions between root- and foliar- feeding insects. *Funct. Ecol.* 23: 699-706. doi: 10.1111/j.1365-2435.2009.01550.x

Johnston, A.S.A., Sibly, R.M., Hodson, M.E., Alvarez, T., Thorbek, P. 2015. Effects of agricultural management practices on earthworm populations and crop yield: validation and application of a mechanistic modelling approach. *J. Appl. Ecol.* 52: 1334-1342. doi: 10.1111/1365-2664.12501

Johnson, S. N., Erb, M., Hartley, S. E. 2016. Roots under attack: contrasting plant responses to below- and aboveground insect herbivory. *New Phytol.* 210: 413–418. doi: 10.1111/nph.13807

Jonsson, L., Nilsson, M.C., Wardle, D.A., Zackrisson, O. 2001. Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. *Oikos*, 93: 353-364.

- Jury, W.A., Focht, D.D., Farmer, W.J. 1987. Evaluation of pesticide groundwater pollution potential from standard indices of soil-chemical adsorption and biodegradation. *J. Environ. Qual.* 16: 422-428.
- Kabouw, P., Kos, M., Kleine, S., Vockenhuber, E.A., van Loon, J.J.A., van der Putten, W.H., van Dam, N.M., Biere, A. 2011. Effects of soil organisms on aboveground multitrophic interactions are consistent between plant genotypes mediating the interaction. *Entomol Exp. Appl.* 139: 197-206.
- Kandel, H.J., Schneiter, A.A., Johnson, B.L. 1997. Intercropping legumes into sunflower at different growth stages. *Crop Sci.* 37: 1532-1537.
- Kandeler, E., Stemmer, M., Klimanek, E.M. 1999. Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biol. Biochem.* 31: 261-273.
- Kaplan, I., Halitschke, R., Kessler, A., Rehill, B.J., Sardanelli, S., and Denno, R.F. 2008. Physiological integration of roots and shoots in plant defense strategies links above- and belowground herbivory. *Ecol. Lett.* 11: 841–851. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01200.x
- Karlen, D.L., Wollenhaupt, N.C., Erbach, D.C., Berry, E.C., Swan, J.B., Eash, N.S., Jordahl, J.L. 1994a. Long-term tillage effects on soil quality. *Soil Till Res.* 32: 313-327.
- Karlen, D.L., Wollenhaupt, N.C., Erbach, D.C., Berry, E.C., Swan, J.B., Eash, N.S., Jordahl, J.L. 1994b. Crop residue effects on soil quality following 10-years of no-till corn. *Soil Till. Res.* 31: 149-167.
- Kelley, W.D., South, D.B. 1978. In vitro effects of selected herbicides on growth and mycorrhizal fungi. *Weed Sci. Soc. America Meeting*. Auburn University, Auburn, Alabama: 38.
- Kennedy, A.C., Smith, K.L. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil*, 170: 75-96.
- Kern, J.S., Johnson, M.G. 1993. Conservation tillage impacts on national soil and atmospheric carbon levels. *Soil Science Society of America Journal*, 57: 200–210.
- Khan, S.A., Mulvaney, R.L., Ellsworth T.R., , Boast, C.W. 2007. The myth of nitrogen fertilization for soil carbon sequestration. Published in *J. Environ. Qual.* 36:1821-1832. doi:10.2134/jeq2007.0099
- Kirchner, M.J., Wollum II, A.F., King, L.D. 1993. Soil microbial populations and activities in reduced chemical input agroecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57(5): 1289-1295.
- Kissel, D.E., Cabrera, M.L., Ferguson, R.B. 1988. Reactions of ammonia and urea hydrolysis products with soil. *SSSAJ* 52: 1793-1796.
- Kole, R.K., Banerjee, H., Bhattacharyya, A. 2001. Monitoring of market fish samples for Endosulfan and Hexachlorocyclohexane residues in and around Calcutta. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67: 554-559.

Koricheva, J.S., Larsson, S., Haukioja, E., Keinanen, M. 2000. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos*, 83: 212-226.

Körschens, M., Albert, E., Armbruster, M., Barkusky, D., Baumecker, M., Behle-Schalk, L., Bischoff, R., Cergan, Z., Ellmer, F., Herbst, F., Hoffmann, S., Hofmann, B., Kismanyoky, T., Kubat, J., Kunzova, E., Lopez-Fando, C., Merbach, I., Merbach, W., Pardor, M.T., Rogasik, J., Rühlmann, J., Spiegel, H., Schulz, E., Tajnsek, A., Toth, Z., Wegener, H., Zorn, W. 2013. Effect of mineral and organic fertilization on crop yield, nitrogen uptake, carbon and nitrogen balances, as well as soil organic carbon content and dynamics: results from 20 European long-term field experiments of the twenty-first century. *Archives of Agronomy & Soil Science*, 59: 1017-1040.

Kuzyakov, Y., Friedel, J.K., Stahr, K. 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1485-1498.

Kuzyakov, Y., Xu, X. 2013. Competition between roots and microorganisms for nitrogen: Mechanisms and ecological relevance. *New Phytol.* 198: 656-669.

Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept & review. *Soil Biol. Biochem.* 83, 184–199. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025>.

Ladd, J.N., Butler, J.H.A. 1972. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.* 4: 19-30.

Ladha, J.K., Kesava Reddy, C., Padre, A.T., van Kessel, C. 2011. Role of nitrogen fertilization in sustaining organic matter in cultivated soils. *J. Environ. Qual.* 40: 1756-1766.

Lal, R. 1976. Soil erosion problems on Alfisols in western Nigeria and their control. IITA Monograph 1, IITA, Ibadan, Nigeria, pp. 208.

Lal, R., Fierce, F.J. 1991. The vanishing resource. In *Soil management for sustainability*. Edited by R. Lal and F.J. Fierce. Soil Water Conservation Society, Ankeny, pp. 189.

Lal, R. 1993. Tillage effects on soil degradation, soil resilience, soil quality, and sustainability. *Soil Till. Res.* 27: 1-8.

Lal, R. 1997. Residue management, conservation tillage and soil restoration for mitigating greenhouse effect by CO₂-enrichment. *Soil Till Res.* 43: 81-107.

Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science* 304: 1623-1627.

Lal, R. 2008. Carbon sequestration. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 815-830.

Schmidt, M.W.I., Torn, M.S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I.A., Kleber, M.,

- Kogel-Knabner, I., Lehmann, J., Manning, D.A.C., Nannipieri, P., Rasse, D.P., Weiner, S., Trumbore, S.E. 2011. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature*, 478: 49-56. <https://doi.org/DOI: 10.1038/nature10386>
- Lal, R., Stewart, B.A. 2010. Food security and soil quality. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Lal, R. 2011. Management to mitigate and adapt to climate change. *J. Soil Water Conserv.* 66(4): 276-285.
- Lal, R. 2015. Restoring soil quality to mitigate soil degradation. *Sustainability*, 7: 5875-5895.
- Lavelle, P., Martin, A. 1992. Small-scale and large-scale effects of endogeic earthworms on soil organic matter dynamics in soils of the humid tropics. *Soil Biol. Biochem.* 24(12): 1491-1498.
- Lee, W.J., Wood, C.W., Reeves, D.W., Entry, J.A., Raper, R.L. 1996. Interactive effects of wheel-traffic and tillage system on soil carbon and nitrogen. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 27: 3027-3043.
- Lefebure, C., Baraton, A. 2006. Les outils et travaux de la ferme. Paris : La maison rustique, pp. 159.
- Lemtiri, A., Colinet, G., Alabi, T., Cluzeau, D., Zirbes, L., Haubruge, E., Francis, F. 2014. Impacts of earthworms on soil components and dynamics. A review. *BASE*. 18(1). Open Access (<http://popups.ulg.ac.be/1780-4507>).
- Letskeman, L.P., Tiessen, H., Campbell, C.A. 1996. Phosphorus transformations and redistribution during pedogenesis of western Canadian soils. *Geoderma*, 71: 201-218.
- Li, Y., Guohua, M., Fanjun, C., Jianhua, Z., Fusuo, Z. 2004. Rhizosphere Effect and Root Growth of two Maize (*Zea mays L.*) Genotypes with Contrasting P Efficiency at ^{[[1]]}Low P Availability. *Plant Sci.* 167: 217-223.
- Little, E.E. 1990). Behavioral indicators of sublethal toxicity of rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 380-385.
- Lugato, E., Bampa, F., Panagos, P., Montanarella, L., Jone, A. 2015. Potential carbon sequestration of European arable soils estimated by modelling a comprehensive set of management practices. *Glob. Change Biol.* 20: 3557-3567.
- Lukkari, T., Teno, S., Vaisanen, A., Haimi, J. 2006. Effects of earthworms on decomposition and metal availability in contaminated soil: microcosm studies of populations with different exposure histories. *Soil Biol. Biochem.* 38(2): 359-370.
- Mace, K.C., Mills, N.J. 2015. Response of walnut aphid populations to increasing foliar nitrogen content. *Agri. Forest Entomol.* pp. 1-8. doi: 10.1111/afe.12103
- Mader, P., Fliebach, A., Dubois, D., Gunst, L., Fried, P., Niggli, U. 2002. Soil Fertility and Biodiversity

in Organic Farming. *Science*, 296: 1694. doi: 10.1126/science.1071148

Magdoff, F., van Es, H. 2001. Building soils for better crops. Sustainable Agriculture Network. pp. 230.

Makoi, J., Ndakidemi, P. 2008. Selected Soil Enzymes: Examples of their Potential Roles in the Ecosystem. *Afr. J. Biotech.* 7: 181-91.

Mamy, L., Barriuso, E., Gabrielle, B. 2016. Glyphosate fate in soils when arriving in plant residues. *Chemosphere*, 154: 425-433.

Mangalassery, S., Mooney, S.J., Sparkes, D.L., Fraser, W.T., Sjogersten, S. 2015. Impacts of zero tillage on soil enzyme activities, microbial characteristics and organic matter functional chemistry in temperate soils. *European J. Soil Biol.* 68: 9-17.

Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P., Jolliet, O. 2002. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agricult. Ecosyst. Environ.* 93: 379-392.

Martens, D.A. Bremner, J.M. 1993. Influence of herbicides on transformations of urea nitrogen in soil. *J. Environ. Sci. Health B.* 28: 377-395.

Marx, M.C., Wood, M., Jarvis, S.C. 2001. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1633–1640.

Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G., Swift, M.J. 1997. Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *Science*, 277: 504. doi: 10.1126/science.277.5325.504

Mbuthia, L.W., Acosta-Martínez, V., DeBruyn, J., Schaeffer, S., Tyler, D., Odoi, E., Mpheshea, M., Walker, F., Eash, N. 2015. Long-term tillage, cover crop, and fertilization effects on microbial community structure, activity: Implications for soil quality. *Soil Biol. Biochem.* 8: 24-34. doi:10.1016/j.soilbio.2015.06.016

McGill, W.B., Colle, C.V. 1981. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma* 26: 267-286.

McKenzie, S.W., Johnson, S.N., Jones, T.H., Ostie, N.J., Hails, R.S., Vanbergen, A.J. 2016. Root herbivores drive changes to plant primary chemistry, but root loss mitigated under elevated atmospheric CO₂. *Frontiers Plant Sci.* 7(837): 1-10. doi: 10.3389/fpls.2016.00837

McNaughton, S. J. 1993. Biodiversity and Function of Grazing Ecosystems. *In: Biodiversity and Ecosystem Function (Ecological Studies, Vol. 99)* (eds Schulze, E.-D., Mooney, H. A.), Springer-Verlag, Berlin.

Melero, S., Ruiz Porras, J.C., Herencia, J.F., Madejon, E. 2006. Chemical and biochemical properties in a silty loam soil under conventional and organic management. *Soil Till. Res.* 90: 162–170.

- Metherell, K. et al., 1995. *In Soil Management and the Greenhouse Effect*, R. Lal, J. Kimble, E. Levine, B. A. Stewart, Eds. Lewis, Boca Raton, FL. 259 –270.
- Meyer, G., Root, R. 1996. Influence of feeding guild on insect response to host plant fertilization. *Ecological Entomol.* 21: 270-278.
- Montgomery, D.R. 2007. Soil erosion and agricultural sustainability. *PNAS*, 104(33): 13268-13272
- Lindstrom, M.J., Nelson, W.W., Schumacher, T.E., 1992. Quantifying tillage erosion rates due to moldboard plowing. *Soil Till. Res.* 24: 243-255.
- Moore, J.C., Walter, D.E., Hunt, H.W. 1988. Arthropod regulation of micro- and mesobiota in below-ground detrital food webs. *Ann. Review Entomol.* 33: 419-439.
- Moore, J.C., McCann, K., Setälä, H., de Ruiter, P.C. 2003. Top-down is bottom-up: does predation in the rhizosphere regulate aboveground dynamics? *Ecology*, 84(4): 846-857.
- Moore, J.C., McCann, K., Ruiter, P.C. 2007. Soil rhizosphere food webs, their stability, and implications for soil processes in ecosystems. In *The Rhizosphere-An Ecological Perspective*, Cardon, Z.G., Whitbeck, J.L. Eds. pp. 101-125. Elsevier, Burlington, Mass, USA.
- Moorman, T.B. 1989. A review of pesticide effects on microorganisms and microbial processes related to soil fertility. *J. Prod. Agric* 2(1): 14-23.
- Mossor-Pietraszewska, T. 2001. Effect of aluminium on plant and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, 48(3/2001): 673-686.
- Mukherjee, S., Tripathi, S., Mukherjee, A.K., Bhattacharyya, A., Chakrabarti, K. 2016. Persistence of the herbicides florasulam and halauxifen-methyl in alluvial and saline alluvial soils, and their effects on microbial indicators of soil quality. *European J. Soil Biol.* 73: 93-99.
- Mulvaney, R.L., Khan, S.A., Ellsworth, T.R. 2009. Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: a global dilemma for sustainable cereal production. *J. Environ. Qual.* 38: 2295-2314.
- Nations unies, Division de la population. 2015, *World Population Prospects : The 2015 Revision*, New York (<http://esa.un.org/unpd/wpp/>).
- Nasholm, T., Kielland, K., Ganeteg, U. 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol.* 182: 31-48.
- Ndakidemi, P.A. 2006. Manipulating Legume/Cereal Mixtures to Optimize the Above and Belowground Interactions in the Traditional African Cropping Systems. *Afr. J. Biotechnol.* 5(25): 2526-2533.
- Nivelle, E., Verzeaux, J., Habbib, H., Kuzyakov, Y., Decocq, G., Roger, D., et al. 2016. Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization. *Appl Soil Ecol.*

108: 147–55.

Orians, C. M., Thorn, A., Gómez, S. 2011. Herbivore-induced resource sequestration in plants: why bother? *Oecologia*, 167: 1–9. doi: 10.1007/s00442-011-1968-2

Ortiz-Ceballos, A.I., Pena-Cabriales, J.J., Fragoso, C., Brown, G.G. 2007. Mycorrhizal colonization and nitrogen uptake by maize: combined effect of tropical earthworms and velvetbean mulch. *Biol. Fertil. Soils*, 44(1): 181-186.

Pell, M., Stenberg, B., Torstensson, L. 1998. Potential denitrification and nitrification tests for evaluation of pesticide effects in soil. *Ambio*. 27: 24–28.

Pelosi, C., Barot, S., Capowiez, Y., Hedde, M., Vandebulcke, F. 2014. Pesticides and earthworms. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 34: 199–228. <http://dx.doi.org/10.1007/s13593-013-0151-z>

Pimentel, D., Harvey, C., Resosudarmo, P., Sinclair, K., Kurz, D., McNair, M., Crist, S., Shpritz, L., Fitton, L., Saffouri, R., Blair, R. 1995. Environmental and economic costs of soil erosion and conservation benefits. *Science*, 267(5201): 1117-1123.

Quiquampoix, H., Mousain, D. 2005. Enzymatic Hydrolysis of Organic Phosphorus. In « Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (eds.) *Organic Phosphorus in the Environment*, Wallingford, UK7 CAB International ».

Recous, S., Robin, D., Darwis, D., Mary, B. 1995. Soil inorganic nitrogen availability: effect on maize residue decomposition. *Soil Biol. Biochem.* 27: 1529-1538.

Rizhiya, E., Bertora, C., Petra, C.J., van Vliet, P.C.J., Kuikman, P.J., Faber, J.H., van Groenigen, J.W. 2007. Earthworm activity as a determinant for N₂O emission from crop residue. *Soil Biol. Biochem.* 39(8): 2058-2069.

Romeis, J., Bartsch, D., Bigler, F., Candolfi, M.P., Gielkens, M.C.C., Hartley, S.E., Hellmich, R.L., Huesing, J.E., Jepson, P.C., Layton, R., Quemada, H., Raybould, A., Rose, R.I., Schiemann, J., Sears, M.K., Shelton, A.M., Sweet, J., Vaituzis, Z., Wolt, J.D. 2008. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to non-target arthropods. *Nat. Biotechnol.* 26: 203-208.

Ross, D.S., Bartlett, R.J., Magdoff, F.R. 1991. Exchangeable cations and the pH-independent distribution of cation exchange capacities in Spodosols of a forested watershed. *Plant-Soil Interactions at Low pH*, 45 of the series *Developments in Plant and Soil Sciences*, pp. 81-92.

Rotini, O.T. 1935. La trasformazione enzimatica dell'urea nel terreno. *Ann. Labor. Ric. Ferm. Spallanrani.* 3: 143-154.

Ryan, M.H., Graham, J.H. 2002. Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Plant Soil*.244: 263–271.

Savonen, C. 1997. Soil microorganisms object of new OSU service. Good Fruit Grower.(<http://www.goodfruit.com/archive/1995/6other.html>).

Scheu, S., Theenhaus, A., Jones, T.H. 1999. Links between the detritivore and the herbivore system: effects of earthworms and *Collembola* on plant growth and aphid development. *Oecologia*, 119: 541-551.

Schimel, J.P., Bennett, J., Fierer, N. 2005. Microbial community composition and soil nitrogen cycling: is there really a connection? pp. 172-188. In « *R.D. Bardgett, M.B. Usher, and D.W. Hopkins (eds.) Biological diversity and function in soils. Cambridge University Press, Cambridge, UK* ».

Schimel, J.P., Schaeffer, S.M. 2012. Microbial control over carbon cycling in soil. *Front Microbiol.* 3(348): 1-8.

Schjønnning, P., Elmholt, S., Christensen, B.T. 2004. *Managing Soil Quality: Challenges in Modern Agriculture.* CAB International, Wallingford, UK.

Schlesinger, W.H., Andrews, J.A. 2000. Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry* 48: 7–20.

Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J.C. 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agric. Ecosyst. Environ.* 98: 255-262.

Schoenholtz, S.H., Van Miegroet, H., Burger, J.A. 2000. A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. *Forest Ecol. Manag.* 138: 335-356.

Shafiei, T.M., Costa, H.H. 1990. The susceptibility and resistance of fry and fingerlings of *Oreochromis mossambicus* Peters to some pesticides commonly used in Sri Lanka. *J. Appl. Ichthyol.* 6: 73-80.

Silva, R.S., da Silva, I.R., de Barros, N.F., de SaMendonça, E. 2011. Effect of compaction on microbial activity and carbon and nitrogen transformations in two oxisols with different mineralogy. *R. Bras. Ci. Solo*, 35: 1141-1149.

Simpson, J.R., Freney, J.R. 1988. Interacting processes in gaseous nitrogen loss from urea applied to flooded rice fields. In « *Proceedings of International Symposium on Urea Technology and Utilization (Pushparajah E, Husin A, and Bachik A T, Eds), pp. 281-290. Malaysian Society of Soil Science, Kuala Lumpur* ».

Singh, B., Ryan, J. 2015. *Managing Fertilizers to Enhance Soil Health.* First edition, IFA, Paris, France (www.fertilizer.org/Library).

Sinsabaugh, R.L., Antibus, R.K., Linkens, A.E., McClaugherty, C.A., Rayburn, L., Rebertus, D., Weiland, T., 1993. Wood decomposition: nitrogen and phosphorus dynamics in relation to extracellular enzyme activity. *Ecol.* 74: 1586-1593.

- Sinsabaugh, R.L., Gallo, M.E., Lauber, C., Waldrop, M.P., Zak, D.R. 2005. Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. *Biogeochemistry*, 75: 201-215.
- Smith, J.L., Doran, J.W. 1996. Measurement and use of pH and electrical conductivity for soil quality analysis. In *Methods for Assessing Soil Quality*; Doran, J.W. and Jones, A.J., eds.; SSSA Spec. Publ. 49, Sci. Soc. Amer: Madison, Wisconsin, 169-185.
- Smith, S.E., Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Deuxième édition. Academic Press, London.
- Smith, S.E., Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, Ed 3. Academic Press, New York.
- Snodgrass, G. L. Stadelbacher, E.A. 1994. Population levels of tarnished plant bugs (Heteroptera: Miridae) and beneficial arthropods following early-season treatments of *Geranium dissectum* for control of bollworms and tobacco budworms (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 23: 1091-1096.
- Soltner, D. 1972. Les bases de la production végétale. *Sciences et techniques agricoles Agronomic*, pp. 472.
- Speir, T.W., Ross, D.J. 1978. Soil Phosphatase and Sulphatase. In: *Burns, R.G. (ed.) Soil Enzymes. Academic, London, UK.*
- Stark, S., Tuomi, J., Strommer, R., Helle, T. 2003. Non-parallel changes in soil microbial carbon and nitrogen dynamics due to reindeer grazing in northern boreal forests. *Ecography*, 26: 51-59.
- Strauss, S.Y, Zangrel, A.R. 2002. Plant–insect interactions in terrestrial ecosystems. In « *Herrera C.M, Pellmyr O, editors. Plant–animal interactions. An evolutionary approach. Blackwell Science; Oxford, UK, pp. 77–106* ».
- Strullu, D.G., Plenchette, C. 1991. The entrapment of *Glomus sp.* in alginate beads and their use as root inoculum. *Mycol. Res.* 95: 1194-1196.
- Suzuki, N., Katayama, N. 2007. The use of honeydew in foraging for aphids by larvae of the ladybird beetle, *Coccinellaseptempunctata L.* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecol. Entomol.* 32: 455-460.
- Swift, M.J., Heal, O.W., Anderson, J.M. 1979. *Decomposition in terrestrial ecosystems*. Blackwell, Oxford.
- Sylvain, Z.A., Wall, D.H. 2011. Linking soil biodiversity and vegetation: implications for a changing planet. *Am. J. Botany*, 98: 517–527.
- Tan, X.; Chang, S.X., Kabzems, R. 2005. Effects of soil compaction and forest floor removal on soil microbial properties and N transformations in a boreal forest long-term soil productivity study. *For. Ecol. Manag.* 217: 158- 170.

- Tarafdar, J.C., Chhonkar, P.K. 1979. Phosphatase Production by Microorganisms Isolated from Diverse types of Soils. *Zentralbl Bakteriol Naturwiss.* 134(2): 119-24.
- Tiunov, A.V., Scheu, S. 2000. Microbial biomass, biovolume and respiration in *Lumbricus terrestris* L. cast material of different age. *Soil Biol. Biochem.* 32: 265-275.
- Toyota, K., Kimura, M. 1994. Earthworms disseminate a soil-borne plant pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. *Biol. Fertil. Soils*, 18: 32-36.
- Trevors, J.T. 1984. Dehydrogenase activity in soil: A comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biol. Biochem.* 16: 673-674.
- Turner, B., Haygarth, P. 2005. Phosphatase Activity in Temperate Pasture Soils: Potential Regulation of Labile Organic Phosphorous Turnover by Phosphodiesterase Activity. *Sci. Total Environ.* 344: 37-6.
- Utobo, E.B., Tewari, L. 2014. Soil enzymes as bioindicators of soil ecosystem status. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 13(1): 147-169.
- van der Putten, W.H., Vet, L.E.M., Harvey, J.A., Wackers, F.L. 2001. Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens and their antagonists. *Trends Ecol. Evol.* 16: 547-554.
- van Groeningen, J.W., Huygens, D., Boeckx, P., Kuyper, Th.W., Lubbers, I.M., Rutting, T., Groffman, P.M. 2015. The soil N cycle: new insights and key challenges. *Soil*, 1: 235-256.
- Van Oost, K., Govers, G., Desmet, P. 2000. Evaluating the effects of changes in landscape structure on soil erosion by water and tillage. *Landscape Ecol.* 15: 577-589.
- Velthof, G.L., Barot, S., Bloem, J., Butterbach-Bahl, K., de Vries, W., Kros, J., Lavelle, P., Olesen, J.E., Oenema, O. 2011. Nitrogen as a threat to European soil quality. p. 494-509. *In M.A. Sutton, C.M. Howard, J.W. Erismann, G. Billen, A. Bleeker, P. Grennfelt, H. van Grinsven and B. Grizzetti (eds.) The European nitrogen assessment. Cambridge University Press, Cambridge, UK.*
- Venterea, R., Groffman, P., Verchot, L., Magill, A., Aber, J. 2004. Gross nitrogen process rates in temperate forest soils exhibiting symptoms of nitrogen saturation. *Forest Ecol. Manage.* 196: 129-142.
- Veresoglou, S.D., Chen, B., Rillig, M.C. 2012. Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. *Soil Biol. Biochem.* 46: 53-62.
- Verity, G.E., Anderon, D.W. 1990. Soil erosion effects on soil quality and yield. *Can. J. Soil Sci.* 70: 471-484.
- Versaw, W.K., Harrison, M.J. 2002. A Chloroplast Phosphate Transporter, PHT2; 1, Influences Allocation of Phosphate within the Plant and Phosphate-Starvation Responses. *Plant Cell* 14: 1751-1766.

- Verzeaux, J., Alahmad, A., Habbib, H., Nivelles, E., Roger, D., Lacoux, J., Decocq, G., Hirel, B., Catterou, M., Spicher, F., Dubois, F., Duclercq, J., Tetu, T. 2016. Cover crops prevent the deleterious effect of nitrogen fertilisation on bacterial diversity by maintaining the carbon content of ploughed soil. *Geoderma* 281: 49-57.
- Verzeaux, J., Roger, D., Lacoux, J., Nivelles, E., Adam, C., Habbib, H., Hirel, B., Dubois, F., Tetu, T. 2016. In winter wheat, no till increases mycorrhizal colonization thus reducing the need for nitrogen fertilization. *Agronomy* 6: 38.
- Visser, S., Parkinson, D. 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *Am. J. Alter. Agric.* 7: 33–37.
- Walls-Thumma, D. 2000. Dehydrogenase Activity in Soil Bacteria. (<http://www.gardenguides.com/130633-dehydrogenase-activity-soil-bacteria.html>).
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., et al. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7: 1306-1320. 10.4161/psb.21663
- Wardle, D.A. 2002. *Communities and Ecosystems: Linking the aboveground and belowground components*. Princeton Univ-Press, NJ.
- Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., van der Putten, W.H., Wall, D.H. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 304: 1629-1633.
- Warren, G.F. 1998. Spectacular Increases in Crop Yields in the United States in the Twentieth Century. *Weed Tech.* 12: 752.
- Webster, J.P.G., Bowles, R.G., Williams, N.T. 1999. Estimating the Economic Benefits of Alternative Pesticide Usage Scenarios: Wheat Production in the United Kingdom. *Crop Prot.* 18: 83.
- White, D.C., MacNaughton, S.J. 1997. Chemical and molecular approaches for rapid assessment of the biological status of soils. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB, Wallingford, pp. 371–396.
- Wolinska, A., Stepniewska, Z. 2012. Chapter 8. Dehydrogenase activity in the soil environment. *Intech*. pp. 183-210. (<http://dx.doi.org/10.5772/48294>).
- World health organization Genève, 1990. *Public health impact of pesticides used in agriculture*. World Health Organization, Library Cataloguing in Publication Data.
- Yang, Z., Liu, S., Zheng, D., Feng, S. 2006. Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *J. Environ. Sci.* 18(6): 1135-1141.
- Yang, J.W., Yi, H.S., Lee, B., Lee, S., Ghim, S.Y., Ryu, C.M. 2011. Whitefly infestation of pepper

plants elicits defence responses against bacterial pathogens in leaves and roots and changes the below-ground microflora. *J. Ecol.*, 99: 46–56.

Yeates, G.W. 1999. Effects of plants on nematode community structure. *Annu. Rev. Phytophthol.* 37: 127-149.

Zabaloy, C., Garland, J.L., Go, M.A., 2008. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate , 2 , 4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region , Argentina. *Appl. Soil Ecol.* 40: 1–12. doi:10.1016/j.apsoil.2008.02.004

Zehnder, C.B., Hunter, M.D. 2008. Effects of nitrogen deposition on the interaction between an aphid and its host plant. *Ecol. Entomol.* 33: 24–30.

Zehnder, C.B., Hunter, M.D. 2009. More is not necessarily better: the impact of limiting and excessive nutrients on herbivore population growth rates. *Ecol. Entomol.* 34: 535-543.

Zhang, B.G., Li, G.T., Shen, T.S., Wang, J.K., Sun, Z. 2000. Changes in microbial biomass C, N, and P and enzyme activities in soil incubated with the earthworms *Metaphire guillelmi* or *Eisenia fetida*. *Soil Biol. Biochem.* 32(14): 2055-2062.

CHAPITRE II.

EFFETS DE LA GESTION DE LA FERTILISATION AZOTEE ET DU GLYPHOSATE SUR LES PARAMETRES EDAPHIQUES ET AERIENS ET SUR LES INTERACTIONS TROPHIQUES AERIENNES ET SOUTERRAINES

« Tous les écosystèmes terrestres se composent de composantes situées au-dessus et sous le sol qui interagissent pour influencer les processus et les propriétés au niveau de la communauté et de l'écosystème. »

David A. Wardle, 2004

Partie 1. Article 1. L'historique de la fertilisation azotée affecte-t-il, à court terme, les réponses microbiennes et les teneurs en nutriments dans les sols soumis à différentes concentrations en glyphosate ?

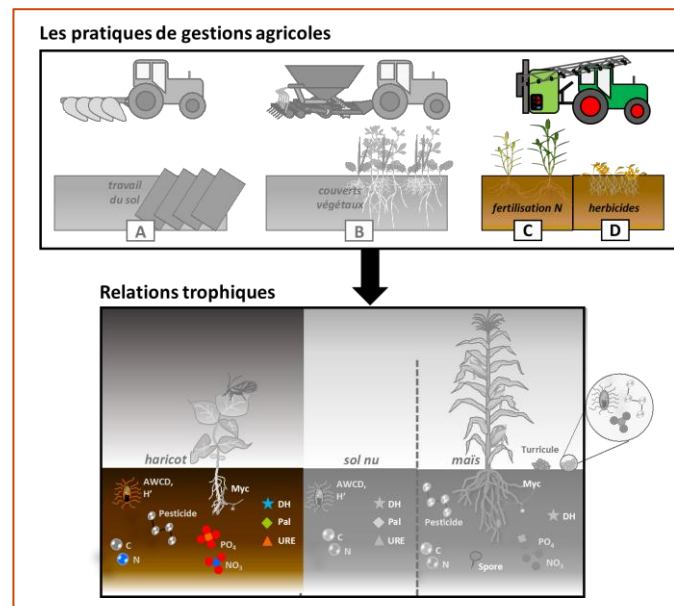


Fig. 17. Effets de la gestion de deux intrants agrochimiques : l'azote de synthèse et le glyphosate sur les indicateurs édaphiques de la qualité de sols. Cf. Figure 3 page 22.

Article n°1 (publié)



Does nitrogen fertilization history affects short-term microbial responses and chemical properties of soils submitted to different glyphosate concentrations?

Elodie Nivelles¹, Julien Verzeaux¹, Amélie Chabot², David Roger¹, Fabien Spicher¹, Jérôme Lacoux¹, Jose-Edmundo Nava-Saucedo¹, Manuella Catterou¹, Thierry Tétu^{1*}

¹Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés (EDYSAN, FRE 3498 CNRS), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, 80029, Cédex, France

²Département Sciences de la Vie et de la Terre, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, 80029, Cédex, France

Abstract

The use of nitrogen (N) fertilizer and glyphosate-based herbicides is increasing worldwide, with agriculture holding the largest market share. The agronomic and socioeconomic utilities of glyphosate are well established; however, our knowledge of the potential effects of glyphosate applied in the presence or absence of long-term N fertilization on microbial functional activities and the availability of soil nutrients remains limited. Using an *ex situ* approach with soils that did (N+) or did not (N0) receive synthetic N fertilization for 6 years, we assessed the impact of different rates (no glyphosate, CK; field rate, FR; 100 × field rate, 100FR) of glyphosate application on biological and chemical parameters. We observed that, after immediate application (1 day), the highest dose of glyphosate (100FR) negatively affected the alkaline phosphatase (AIP) activity in soils without N fertilization history and decreased the cation exchange capacity (CEC) in N0 compared to CK and FR treatments with N+. Conversely, the 100FR application increased nitrate (NO₃⁻) and available phosphorus (PO₄³⁻) regardless of N fertilization history. Then, after 8 and 15 days, the N+\100FR and N+\FR treatments exhibited the lowest values for dehydrogenase (DH) and AIP activities, respectively, while urease (URE) activity was mainly affected by N fertilization. After 15 days and irrespective of N fertilization history, the FR glyphosate application negatively affected the degradation of carbon substrates by microbial communities (expressed as the average well color development, AWCD). By contrast, the 100FR treatment positively affected AWCD, increasing PO₄³⁻ by 5 and 16% and NO₃⁻ by 126 and 119% in the N+ and N0 treatments, respectively. In addition, the 100FR treatment resulted in an increase in the average net nitrification rate. Principal component analysis revealed that the 100FR glyphosate treatment selected microbial communities that were able to metabolize amine substrates.

Overall, the lack of N fertilization in the 6 past years combined with the highest glyphosate application rate (100FR) induced the highest values of AWCD, functional diversity, NO₃⁻, PO₄³⁻ and nitrification. We concluded that the intensive use of N fertilization for 6 years may change the non-target effects of glyphosate application on enzyme activities. The functional activities, nitrification and nutrient contents were increased by glyphosate only when applied at 100 times the field application rate.

1. Introduction

Recently, studies revealed that microbial communities may provide many benefits to crops throughout their growth [1,2]. However, such potential agroecosystem services can be disturbed by several management practices such as herbicide [3] and fertilizer [4,5] applications in intensive agriculture. Consequently, microbial responses to various soil management systems and subsequent effects on nutrient cycling are currently under investigation.

One of the most studied cultural practices is nitrogen (N) fertilization, which has been shown to induce several shifts in microbial community composition and activity over short [6-9] and long-term

periods [10-12]. In general, N fertilization may reduce pH and urease, dehydrogenase and phosphatase activities, as well as microbial functional [13] and taxonomic diversity [9,11,12]. More precisely, ammonia-oxidizing archaea and bacteria can be negatively affected by N fertilization [14]. However, the consequences on N-cycling processes remain unclear since N fertilization has been reported to increase [12] and decrease [13] nitrification capacity. Such potential effects on nitrification are thus confusing since increased microbial activity may be beneficial (through greater availability of nutrients) or detrimental (through competition for nutrients with microbial populations) for plant growth [15]. Another crop management practice broadly studied is the use of herbicides, among which glyphosate is the most widespread herbicide worldwide [16]. The high popularity of glyphosate is related more to its selective utilization in transgenic glyphosate-resistant crops [17,18] than to its use as a complete herbicide between two main crops (e.g., in Europe where transgenic plants are not authorized). However, it is well known that glyphosate applications may increase yields by up to 30% in many European systems [19]. Furthermore, its replacement by plowing and other mechanical tillage operations is unfavorable for conserving soil microbial functional activity [8,20,21] or the greenhouse gases emissions budget [22]. However, the use of glyphosate for weed control in intensive agriculture is currently under debate due to its potential consequences on human health [23,24], but it has also been revealed that this herbicide may induce several non-target effects on earthworms [25] and the activities of several enzymes [26]. Overall, the potential impacts of glyphosate on soil microbiota and microbial processes remain unclear, with contrasting results. Indeed, glyphosate has been shown to induce minor or no effects on soil respiration, microbial biomass, and microbial community structure and functions, even when applied at higher doses than recommended field rates [27-31]. In parallel, stimulatory effects of microbial functional responses following glyphosate application were reported by Zabaloy et al. [29], Gomez et al. [30], Haney et al. [32] and Lane et al. [33].

Nevertheless, to our knowledge, the interaction between soil nitrogen management history and glyphosate applications has never been studied. To fill this knowledge gap, a laboratory experiment was designed to subject soil cores to three rates of glyphosate: a field rate (FR) to simulate the normal agricultural use of glyphosate, 100 times the field rate (100FR) to simulate the chemical spills that occur frequently in the fields or urban green spaces and a control (CK) without glyphosate. These three doses were chosen to determine if the microbial and chemical responses of soils treated with the field rate of glyphosate was closer to untreated or to heavily contaminated soils. Soil was sampled in a designated field station where the soil had been subjected to a 6-year crop rotation with (N+) or without (N0) N fertilizer. Soil microbial activities, functional diversity, nitrification, and nutrient availability were measured three times (1, 8 and 15 days (d)) following glyphosate application.

2. Materials and methods

2.1. Soil sampling

Sampling was conducted in November 2015 within the experimental site “La Woestyne” in Northern France (50°44'N, 2°22'E, 40 m above sea level). The owner of the land “Bonduelle company” gave permission to conduct the study on this site. The field studies did not involve endangered or protected species. Prior to 2010, the field was prepared using a chisel plough and rotary power system, fertilized conventionally, and cultivated with wheat (*Triticum aestivum*). In 2010, winter cover crops were seeded directly, and the experimental field was split into two N fertilization regimes (without (N0) or with (N+) N fertilizer). The crop rotation included green pea (*Pisum sativum* L.), maize (*Zea mays* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.), flax (*Linum usitatissimum* L.), beet (*Beta vulgaris* L.) and wheat. The N0 plot measured 7 × 8 m while the N+ plot measured 14 × 8 m. A 7-m wide corridor separated the N0 and N+ plots to avoid N contamination. The N+ regime was determined according to the N budget method [34], and the fertilizer consisted of 50% urea, 25% ammonia and 25% nitrate. Since 2010, 650 kg N ha⁻¹ have been added to the N+ plot, and the N0 plot has not been fertilized. Neither potassium-phosphate nor other elements were applied throughout the field experiment. The soil is classified as a silty clay loam with the following properties: 66% silt, 22% clay, 11% sand, 22.5 g kg⁻¹ organic matter, 0.13 g kg⁻¹ available phosphorus, 13.1 g kg⁻¹ organic C, 1.48 g kg⁻¹ total N, 11.7 cmol kg⁻¹ of cation exchange capacity and a pH of 6.28. Fifty 20-cm depth soil cores were sampled in each plot by using a 7-cm diameter auger. Soils were then mixed and sieved through a 2-mm mesh. A sub-section was then separated for chemical analyses, which were performed before beginning the laboratory experiment (T0).

2.2. Establishment of the laboratory incubation

A 15-day laboratory incubation was carried out to assess the effects of glyphosate application on the dynamics of chemical elements and microbial activities in soil without nitrogen fertilizer (N0) and in soil to which nitrogen fertilizer was applied over a period of 6 years (N+). Six replicate pots were used for each treatment combination (N0\CK, N+\CK, N0\FR, N+\FR, N0\100FR, N+\100FR), and all of them were completely randomized. For the incubation experiment, 1600 g of fresh homogenized soil at 75-80% water holding capacity (WHC) were placed into plastic pots (2.2 L). Glyphosate, in the isopropylamine salt form, was then added on plant-free soils at the following rates: control (CK) and two different doses: 0.96 mg active ingredient per kg⁻¹ soil dry weight (a.i./dw; FR) and 96 mg kg⁻¹ soil (a.i./dw; 100FR), prepared with deionized water. FR corresponds to the conventional recommended field application dose (720 g active ingredient ha⁻¹, [28,30]) for soil with a bulk density of 1.45 g cm⁻³. The 100FR treatment corresponds to 100 times the recommended field rate. CK received equal to the amount of deionized water added to the glyphosate treatments. The pots were incubated in a dark room at 22 ± 1°C for 15 days. Throughout the incubation period, the water content was held constant through weekly

water addition. After 1, 8 and 15 days of incubation, 150 g of fresh samples were collected from the pots and divided into two parts: the first part was stored at 4°C for Biolog® and chemical analyses, and the second part was stored at -20°C for enzyme activity measurements. The moisture content, pH, cation exchange capacity (CEC), total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), extractable nitrates (NO₃⁻), available phosphorus (PO₄³⁻), microbial enzyme activities (dehydrogenase (DH), alkaline phosphatase (AIP) and urease (URE)) and Community Level Physiological Profiles (CLPP) were measured.

2.3. Microbial analyses

2.3.1. Determination of enzyme activities.

Dehydrogenase activity (DH) based on the reduction of the 2,3,5 triphenyltetrazoliumchloride (TTC) to triphenyl tetrazolium formazan (TPF) was determined according to Casida [35] with some modifications [8]. Soil samples prepared with CaCO₃ (100: 1 fresh mass ratio) were mixed both in a 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) solution (3%) and in a deionized water and then incubated at 37°C for 24h in a dark room. After incubation, TPF was extracted with a solution of pure methanol. After filtration, TPF concentrations were determined by spectrophotometry at 485 nm. Alkaline phosphatase activity (AIP) was determined according to the method described by Tabatabai and Bremner [36]. Fresh soil samples were pre-incubated at 27°C for 48 h. After pre-incubation, deionized water was added to soil samples (1:1 mass ratio) and mixed. A part of soil samples was used and substrate p- nitrophenyl phosphate solution (pNPP, 1%) and borate buffer (pH 9) were added. After incubation at 37°C for 1 h, CaCl₂ (0.5 N) and NaOH (1 N) were added to stop the reaction. Finally, all samples were centrifuged at 10 000 g for 5 min. The released p-nitrophenol (pNP) was measured at 405 nm. Urease activity (URE) was determined using the method of Alef and Nannipieri [37]. A mixture of fresh soil with urea solution (79.9 mM) (1:0.5 fresh mass ratio) was incubated at 37°C for 2 h before adding KCl (2.0 M). After 30 min of agitation, the suspension was filtered. To 1 ml of filtrate were added 9 ml deionized water, 2 ml sodium dichloroisocyanurate (0.1%) and 5 ml of a mixture of 1.06 M sodium salicylate/ 0.3M sodium hydroxide/deionized water (1: 3/ 1:3/ 1: 3, vol/ vol/ vol). After decanting for 30 min at room temperature and in a dark chamber, ammonium was measured at 690 nm.

2.3.2. Community level of physiological profiles.

CLPP were assessed using Biolog Eco-Plates™ (BIOLOG, Hayward, USA) as described by Govaerts et al. [38]. The analysis of CLPP was completed within 24 hours after sampling. Briefly, 10 g of fresh soil samples were shaken for 60 min with 90 ml of sterilized saline solution (0.85% NaCl, w/v) and brought to a 10⁻³ final dilution. Each well of the Biolog EcoPlates was inoculated with 150 µl in two replicates by extract. The plates were incubated at 25°C in the dark for 196 h and read at 590 nm every 24 h. Data recorded at the exponential phase (120 h) were used to calculate the average well color

development (AWCD) following Eq (1) and Shannon index (H') following Eq (2). AWCD and H' represent the soil catabolic potential and diversity respectively.

$$AWCD = \sum ODi / 31 \quad (1)$$

Where, ODi is the optical density value from each well after subtracting both the value at day 0, to eliminate background color generated by substrates and the bacterial suspension, and the value of the blank (water).

$$H' = -\sum Pi \times \ln(Pi) \quad (2)$$

Where, Pi is the ratio of the activity on each substrate (ODi) to the sum of activities on all substrates $\sum ODi$ using an optical density (OD) of 0.25 as threshold for positive responses [39].

2.4. Chemical analyses

Moisture was measured after drying samples at 105°C for 24 h. The pH measurements were performed after shaking the dried soil with deionized water (1:5 dry mass ratio) for 45 min. The mixture was then left for 5 min and the pH recorded using a pH meter FE20-FiveEasy™ (Mettler Toledo, Switzerland). CEC was quantified by shaking the soil samples for 1 h with a solution of cobaltihexamine chloride (1.66 mol L⁻¹) (1:10 mass ratio) [40]. After filtration, optic density was measured at two wavelengths (475 and 380 nm) using an Eon spectrophotometer (BioTek Instruments Inc., USA). For TOC, TN and PO₄³⁻, sieved soil was oven-dried at 45°C for 48 h and finely ground by using a ball-mill (Retsch, MM400). TOC and TN were analyzed using a CN elemental analyzer (Flash EA 1112, Thermo Electron, Germany). Since analyses performed before the experiment setup revealed that the soil was free of carbonate, the soil total C was assumed to be equal to the TOC. The NO₃⁻ content of the soils was determined by extracting the soil samples with 2MKCl (1:5 fresh mass ratio) for 1 h on a rotary shaker. The extracts were centrifuged 10 min at 1800 x g and supernatants were analyzed by continuous flow analytical system (Alpkem flow solution IV power base, OI Analytical, USA). Taking the NO₃-N contents (NO₃⁻) before the incubation (T0) as baselines, the net nitrification rate (NIT) was calculated as follows (Eq 3):

$$NIT = (N_t - N_0) / t \quad (3)$$

Where, N0 and Nt are the NO₃-N (including NO₂-N) contents in the soil at time 0 and t days after incubation [41].

The PO₄³⁻ content was determined by extracting the soil samples with 0.5 M NaHCO₃ pH 8.5 (1:20 dry mass ratio) and was measured in the extract by colorimetric method at 882 nm [42].

2.5. Data analysis

All statistical analyses were performed using R software v. 3.1.2 (R Development Core Team, <http://www.R-project.org>, 2014). In figures and tables, differences between treatments at each

incubation time were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and a post-hoc Tukey HSD-test was used to determine the significant differences among treatments ($p < 0.05$). ANOVA and Tukey tests were performed by using the agricolae package [43]. When Bartlett and Shapiro tests revealed a lack of homoscedasticity or normality of a data set, a nonparametric Kruskal-Wallis test followed by a Conover post-hoc test ($p < 0.05$) were performed by using the PMCMR package [44]. Values given in figures and tables correspond to the average of 6 data ($n = 6$) \pm standard error (S.E).

Soil chemical and microbial properties data were analyzed by using a two-way ANOVA with (i) incubation times or fertilizer-N application and (ii) herbicide application as factors. Principal Component Analyses (PCA) were performed using vegan package [45]. For statistical analyses, the 31 substrates of Biolog EcoPlates were grouped into six substrate groups, (a) phosphate carbon, (b) amines, (c) amino acids, (d) polymers, (e) carboxylic acids, and (f) carbohydrates. These groups of carbon sources data were subjected to PCA to reduce complex multidimensional data and allow a more straightforward interpretation of results. A second PCA was performed to establish relationships among soils subjected to different treatments and multiple chemical and biological variables analyzed.

3. Results

3.1. Effects of N fertilization and glyphosate on soil enzyme activities

On the first day following glyphosate application, the highest dose (100FR; 100 times the conventional field application rate) decreased alkaline phosphatase (AIP) activity (d1, 100FR, Fig 1B) in unfertilized soil (N0), but no effects were observed for dehydrogenase (DH), and urease (URE) (Fig 1A and 1C). In parallel, soils that received N fertilization for 6 years before the beginning of the experiment exhibited lower DH (black histograms, Fig 1A) and higher AIP (black histograms, Fig 1B) values compared to unfertilized soils, irrespective of the herbicide rate.

After 8 days, the DH and AIP activities in the unfertilized soils that received the FR and 100FR glyphosate application did not differ from the control (CK), while in the fertilized soils, AIP decreased significantly in response to the FR application (Fig 1A and 1B). URE activity increased in unfertilized soils and decreased in fertilized soils in response to the 100FR application compared with CK. The unfertilized soils had significantly higher URE values than fertilized soils, irrespective of glyphosate application (Fig 1C).

After 15 days, the DH activity was similar to that measured at 8 days (Fig 1A), and the AIP values were significantly lower in the FR treatment with N fertilization compared to all other treatments (Fig 1B) revealing a combined effect of nitrogen management history and glyphosate application. The URE activity was not affected by glyphosate application but increased significantly in fertilized soils compared to unfertilized soils, irrespective of the glyphosate application rate (Fig 1C).

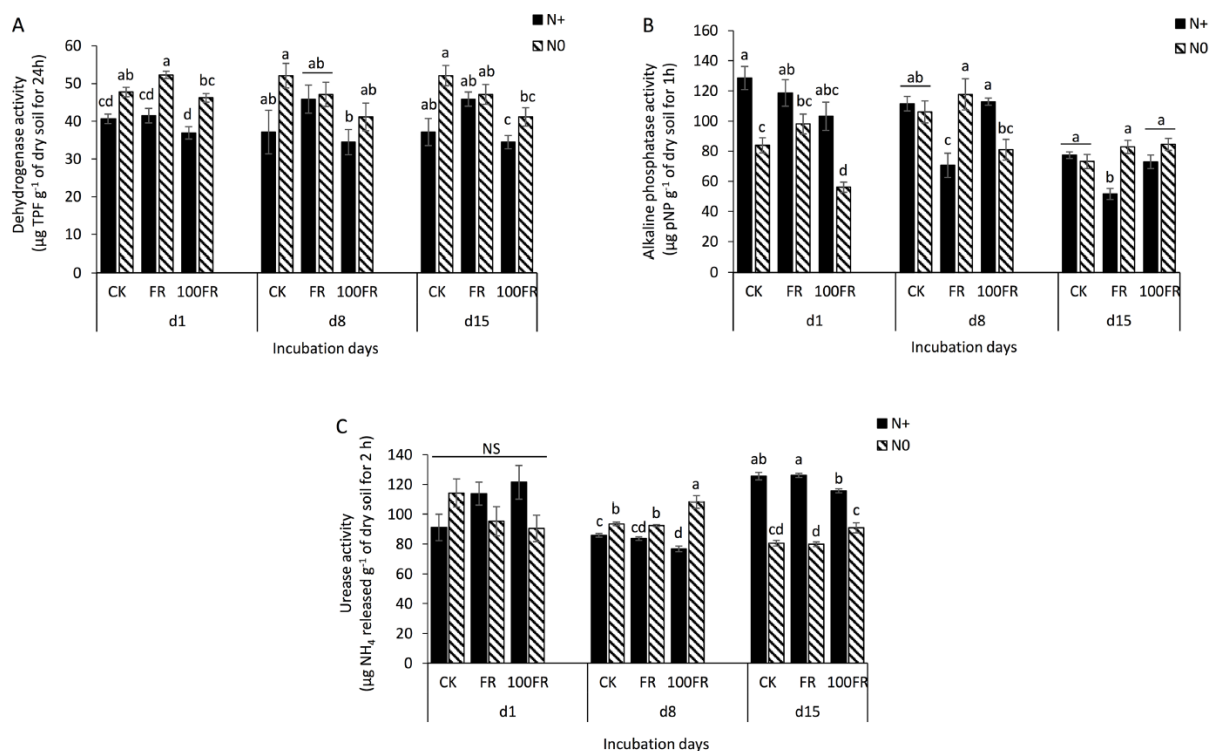


Fig 1. Enzyme activities of (A) dehydrogenase, (B) alkaline phosphatase and (C) urease in glyphosate-free and glyphosate-treated soils under two N fertilization histories. Different letters denote significant differences according to Tukey HSD test ($P < 0.05$) among all fertilization and herbicide application treatments at each incubation time (1, 8, 15 days). CK: glyphosate-free, FR: field rate, 100FR: 100 × field rate, N+: N-fertilized for 6 years, N0: unfertilized for 6 years.

3.2. Effect of N fertilization and glyphosate on C source utilization

After 1 day, no effect was observed on the microbial functional activities (AWCD) or the microbial functional diversity (Shannon index, H') in the N0 and N+ soils (Fig 2A and 2B, respectively) except for a decrease in the AWCD in the fertilized soil that received the 100FR application compared with the unfertilized and glyphosate-untreated soil (Fig 2A). After 8 days of incubation, glyphosate applications (FR and 100FR) significantly increased the AWCD in N+ soils compared to untreated soil (CK), while only the high glyphosate rate (100FR) significantly increased the AWCD in N0 soils. The highest AWCD values were measured in the unfertilized (N0) soil that received the 100FR glyphosate application (Fig 2A). In N+ soils, the lack of glyphosate (CK) resulted in the lowest values for both microbial functional activity (AWCD) and diversity (H') (Fig 2A and 2B).

Conversely, 15 days following herbicide application, the FR application led to lower values of AWCD in both N+ and N0 soils (Fig 2A) and had a negative effect on the Shannon diversity index (H') of the N0 soils. The diversity index did not differ significantly between the untreated and 100FR-treated soils. We also noted that the diversity index was higher in N0 soils following the 100FR glyphosate application compared with the other treatments except the control (CK) (Fig 2B).

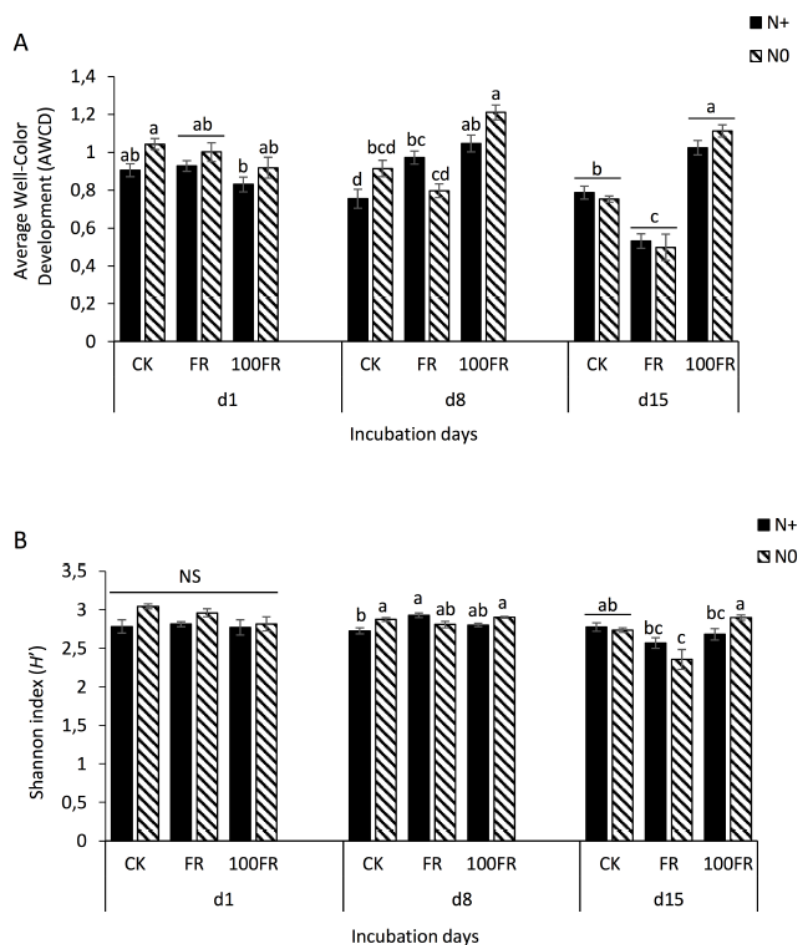


Fig 2. Values of (A) average well color development and (B) Shannon diversity index H' of culturable microbial communities on BIOLOG ecoplates of glyphosate-free and glyphosate-treated soils under two N fertilization histories. Different letters denote significant differences according to Tukey HSD test ($P < 0.05$) among all fertilization and herbicide treatments at each incubation time (1, 8, 15 days). CK: glyphosate-free, FR: field rate, 100FR: 100 \times field rate, N+: N-fertilized for 6 years, N0: unfertilized for 6 years.

Principal component analysis (PCA) was conducted using the 6 groups in which the 31 carbon substrates of Biolog EcoPlates™ (Biolog Inc., Hayward, CA, USA) were grouped (Fig 3). The first PCA axis (PC1, proportion of variance explained: 41.3%) was characterized by a gradient of increasing amino/carboxylic acids and decreasing carbohydrates and phosphate carbon. The second axis (PC2, 21.9%) was characterized by a gradient of increasing amines and decreasing polymers. It should be noted that initially (day 1), the different treatments were combined and correlated with axis 1 (negative scores). The microbial communities that were present in these soils preferentially degraded the carbohydrates and phosphate-carbon sources.

From day 8, a differentiation of the microbial communities was observed between the treatments. The 100FR glyphosate application generated positive scores for N0 soils on axis 1 and for N+ soils on axis 2. Generally, the addition of high concentration of glyphosate to soils fertilized or no with nitrogen correlated with amine-degrading microbial communities in these soils. In soils that

received synthetic N for 6-years but no glyphosate, a positive correlation was observed for microbial communities that degrade amino acids and carboxylic acids.

After 15 days of incubation, the microbial communities in the N+ soil with a high concentration of glyphosate degraded more amines, similar to the microbial communities in the N0 soils. By contrast, after 8 days, the microbial communities in the untreated CK and FR soils preferentially degraded polymers (mainly negative scores on axis 1). After 15 days, these communities preferentially degraded polymers (negative scores on axis 1) and amino and carboxylic acids (positive scores on axis 2). The low dose of glyphosate (FR) did not induce changes in the substrate degradation pattern by microorganisms compared with untreated soil (CK), irrespective of the N fertilization history.

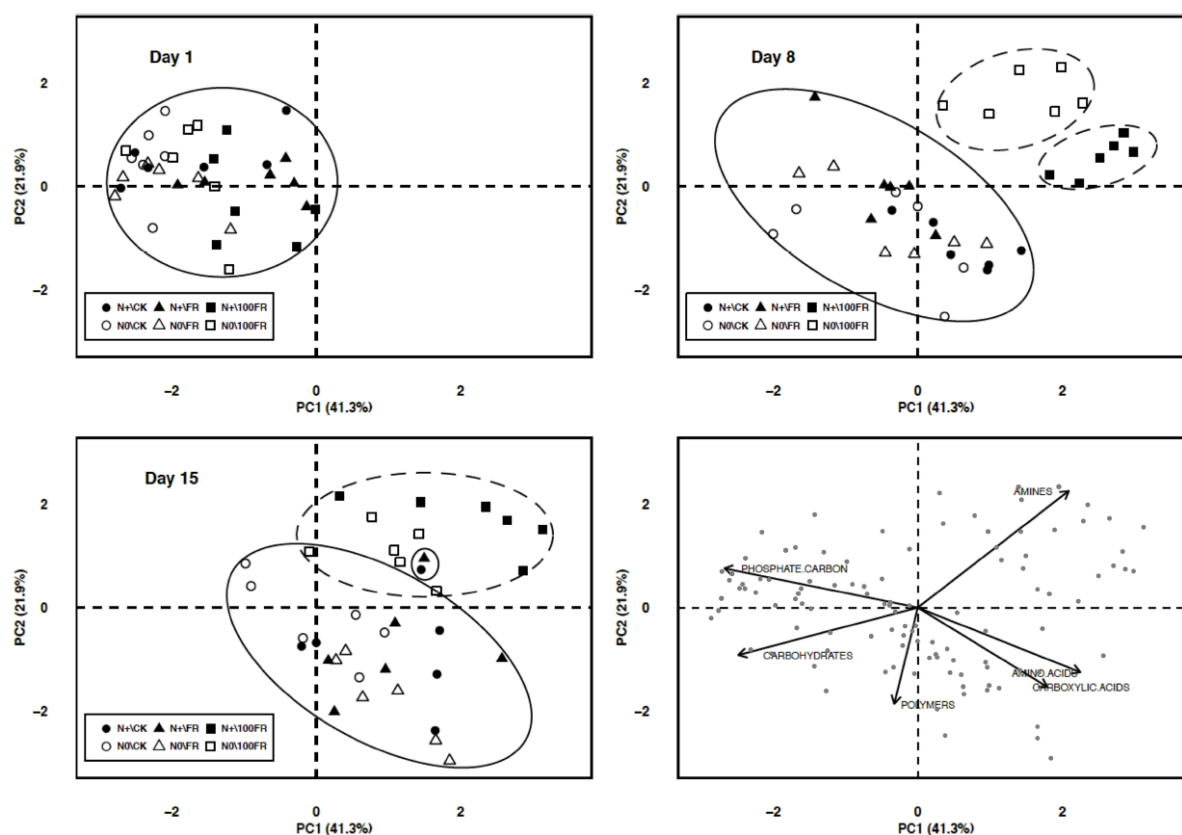


Fig 3. Principal component analysis based on the data of the carbon substrates groups from Biolg EcoPlates at each incubation time (1, 8, 15 days). N+\CK: fertilized soils and glyphosate-free (black circles), N+\FR: fertilized soils and field application rate of glyphosate (black triangles), N+\100FR: fertilized soils and 100 times the field application rate of glyphosate (black squares), N0\CK: unfertilized soils and glyphosate-free (white circles), N0\FR: unfertilized soils and field application rate of glyphosate (white triangles), N0\100FR: unfertilized soils and 100 times the field application rate of glyphosate (white squares).

3.3. Effects of N fertilization and glyphosate on soil chemical parameters

Table 1 reports the pH, soil TOC, TN, C:N, and CEC values of soils from the different treatments. Significant differences were observed on the first day following glyphosate application for TOC and CEC. Although no effect related to glyphosate treatment was observed between the N0 and N+ soils, we noted significantly higher TOC values for N0 in the glyphosate-treated soils (FR and 100FR)

compared to untreated N+ soil (CK). Conversely, a significant decrease in CEC was observed for the N0 soil treated with 100FR glyphosate compared with untreated N+ soil (CK) or soil that received the FR glyphosate application.

During the incubation, the available phosphorus (PO_4^{3-}) contents increased by 16 and 7% after 1 day, 8 and 9% after 8 days, and 5 and 13% after 15 days in the N+ and N0 soils, respectively, in response to the 100FR glyphosate treatment compared to the untreated soil (CK) (Table 1). Overall, the 100FR glyphosate treatment applied to the N0 soil (100FR/N0) resulted in the highest PO_4^{3-} content on day 1 compared to the other treatments, except for the N0 untreated soil (N0/CK), and on day 8 compared to the N+ soil with FR and without glyphosate (N+/FR and N+/CK). After 15 days, the 100FR glyphosate application resulted in the highest PO_4^{3-} content in the N+ and N0 soils compared to the other treatments. Similar trends were observed for the nitrate (NO_3^-) content (Table 1). The nitrate content increased in the soils treated with glyphosate (FR, 100FR) compared to the untreated soil (CK) for the three incubation times. After day 1 and in comparison to the untreated soil (CK), we noted an increase in soil NO_3^- of 14 and 33% for N+ and N0, respectively, in response to the FR glyphosate treatment, and of 31 and 53% for N+ and N0, respectively, in response to the 100FR glyphosate treatment. After 8 and 15 days, the values in the FR treatments were similar to those in the CK treatment. By contrast, the nitrates levels following the 100FR glyphosate application were significantly increased by 158 and 125% after 8 days and by 126 and 119% after 15 days in the N+ and N0 soils, respectively. Overall, from 1 to 8 days following glyphosate application, the 100FR glyphosate treatment significantly increased the NO_3^- content compared to the other treatments.

Table 1. Soil chemical properties measured at each incubation time (1, 8, 15 days) under two N fertilization histories and three doses of glyphosate application.

| Parameter | N fertilization | Glyphosate dose | Incubation time (days) | | |
|--------------|-----------------|-----------------|------------------------|--------------|--------------|
| | | | 1 | 8 | 15 |
| Moisture (%) | N+ | CK | 17.89 ± 0.24 | 18.34 ± 0.78 | 17.21 ± 0.33 |
| | | FR | 18.60 ± 0.42 | 17.82 ± 0.24 | 17.80 ± 0.23 |
| | | 100FR | 18.28 ± 0.12 | 17.38 ± 0.13 | 17.70 ± 0.17 |
| | N0 | CK | 19.11 ± 0.61 | 17.03 ± 1.16 | 17.83 ± 0.16 |
| | | FR | 18.66 ± 0.24 | 18.48 ± 0.21 | 18.12 ± 0.17 |
| | | 100FR | 18.34 ± 0.15 | 18.50 ± 0.18 | 17.59 ± 0.24 |
| pH | N+ | CK | 6.81 ± 0.07 | 6.89 ± 0.05 | 6.95 ± 0.05 |
| | | FR | 6.91 ± 0.05 | 6.88 ± 0.04 | 6.93 ± 0.01 |
| | | 100FR | 6.93 ± 0.03 | 6.30 ± 0.02 | 6.91 ± 0.02 |
| | N0 | CK | 6.82 ± 0.07 | 6.89 ± 0.03 | 6.96 ± 0.03 |
| | | FR | 6.87 ± 0.08 | 6.88 ± 0.04 | 6.98 ± 0.02 |
| | | 100FR | 6.86 ± 0.05 | 6.83 ± 0.03 | 6.97 ± 0.03 |

| | | | | | |
|---|----|-------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| TOC (mg kg ⁻¹) | N+ | CK | 11.33 ± 0.28 ^b | 12.05 ± 0.22 | 12.83 ± 0.13 |
| | | FR | 11.00 ± 0.30 ^{ab} | 12.81 ± 0.63 | 13.00 ± 0.35 |
| | | 100FR | 11.84 ± 0.22 ^{ab} | 13.65 ± 1.23 | 12.74 ± 0.28 |
| | N0 | CK | 12.19 ± 0.17 ^{ab} | 12.94 ± 0.61 | 13.26 ± 0.28 |
| | | FR | 12.71 ± 0.47 ^a | 12.74 ± 0.23 | 13.61 ± 0.33 |
| | | 100FR | 12.76 ± 0.38 ^a | 12.43 ± 0.29 | 13.35 ± 0.28 |
| TN (mg kg ⁻¹) | N+ | CK | 1.17 ± 0.03 | 1.24 ± 0.03 | 1.33 ± 0.03 |
| | | FR | 1.22 ± 0.03 | 1.25 ± 0.02 | 1.39 ± 0.02 |
| | | 100FR | 1.25 ± 0.07 | 1.21 ± 0.03 | 1.31 ± 0.02 |
| | N0 | CK | 1.18 ± 0.02 | 1.17 ± 0.01 | 1.38 ± 0.04 |
| | | FR | 1.20 ± 0.02 | 1.22 ± 0.03 | 1.42 ± 0.02 |
| | | 100FR | 1.27 ± 0.07 | 1.20 ± 0.02 | 1.44 ± 0.05 |
| Soil C:N | N+ | CK | 9.68 ± 0.12 | 9.91 ± 0.14 | 9.63 ± 0.22 |
| | | FR | 9.87 ± 0.24 | 10.26 ± 0.49 | 9.39 ± 0.32 |
| | | 100FR | 9.57 ± 0.30 | 11.23 ± 0.78 | 9.73 ± 0.07 |
| | N0 | CK | 10.32 ± 0.11 | 11.02 ± 0.47 | 9.63 ± 0.12 |
| | | FR | 10.60 ± 0.43 | 10.42 ± 0.11 | 9.59 ± 0.11 |
| | | 100FR | 10.10 ± 0.39 | 10.36 ± 0.21 | 9.32 ± 0.28 |
| CEC (cmol kg ⁻¹) | N+ | CK | 14.20 ± 0.43 ^a | 11.08 ± 0.17 | 11.29 ± 0.32 |
| | | FR | 13.05 ± 0.72 ^a | 10.67 ± 0.34 | 11.16 ± 0.41 |
| | | 100FR | 12.14 ± 0.77 ^{ab} | 10.91 ± 0.24 | 11.49 ± 0.32 |
| | N0 | CK | 12.66 ± 0.44 ^{ab} | 10.54 ± 0.30 | 10.48 ± 0.43 |
| | | FR | 12.64 ± 0.39 ^{ab} | 11.15 ± 0.30 | 10.45 ± 0.29 |
| | | 100FR | 10.44 ± 0.34 ^b | 11.37 ± 0.41 | 10.63 ± 0.35 |
| NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹) | N+ | CK | 5.50 ± 0.57 ^b | 7.04 ± 0.31 ^b | 8.23 ± 0.75 ^b |
| | | FR | 6.29 ± 0.30 ^b | 7.16 ± 0.75 ^b | 8.34 ± 0.22 ^b |
| | | 100FR | 7.21 ± 0.40 ^{ab} | 18.14 ± 1.13 ^a | 18.62 ± 1.14 ^a |
| | N0 | CK | 5.53 ± 0.14 ^b | 8.23 ± 0.80 ^b | 10.15 ± 0.59 ^b |
| | | FR | 7.35 ± 0.43 ^{ab} | 7.87 ± 0.67 ^b | 10.05 ± 0.19 ^b |
| | | 100FR | 8.50 ± 0.65 ^a | 18.51 ± 0.91 ^a | 22.27 ± 1.18 ^a |
| PO ₄ ³⁻ (mg kg ⁻¹) | N+ | CK | 44.31 ± 1.09 ^b | 40.95 ± 1.11 ^b | 44.73 ± 0.65 ^b |
| | | FR | 46.07 ± 0.39 ^b | 41.88 ± 1.51 ^b | 43.12 ± 0.48 ^b |
| | | 100FR | 51.47 ± 1.44 ^a | 44.40 ± 0.54 ^{ab} | 46.98 ± 0.94 ^a |
| | N0 | CK | 48.24 ± 1.32 ^{ab} | 43.87 ± 1.59 ^{ab} | 45.98 ± 0.34 ^b |
| | | FR | 44.47 ± 0.85 ^b | 44.22 ± 0.99 ^{ab} | 46.75 ± 0.43 ^{ab} |
| | | 100FR | 51.82 ± 0.59 ^a | 47.67 ± 1.56 ^a | 52.14 ± 1.41 ^a |

Mean values ± standard error of six replicates. Different letters indicate significant differences among treatments at P < 0.05. TOC: total organic carbon, TN: total nitrogen, CEC: cation exchange capacity, NO₃⁻: nitrates, PO₄³⁻: available phosphorus, N+: fertilized soils, N0: unfertilized soils, CK: glyphosate free, FR: recommended field rate of glyphosate application, 100FR: 100 times the field rate of glyphosate application.

The average net nitrification rate differed among the six soil treatments (Fig 4). Application of the glyphosate FR to unfertilized soils increased the average net nitrification rate compared to N+ soils not treated with glyphosate. The 100FR glyphosate application rate strongly increased the average net nitrification rate (which reached 1.5 mg N kg⁻¹ soil in the N0 soils) compared to other treatments, irrespective of N fertilization.

3.4. Combined interpretation of the soil properties analyzed

Table 2 shows the significant interactions (determined using two-way ANOVA) between the herbicide rate and incubation time for NO₃⁻, CEC, AWCD, AIP activity, and H' in unfertilized soils (N0) and for NO₃⁻, AWCD, and AIP and URE activities in fertilized soils (N+). Significant interactions between herbicide and fertilization were also found for AIP activity only. The incubation period was the factor that most strongly impacted the microbial measurements. The highest dose of glyphosate (100FR) affected NO₃⁻, PO₄³⁻, AWCD and DH in both fertilized and unfertilized soils and AIP activity in fertilized soils only; the N fertilization history affected PO₄³⁻, CEC, and DH and URE activities.

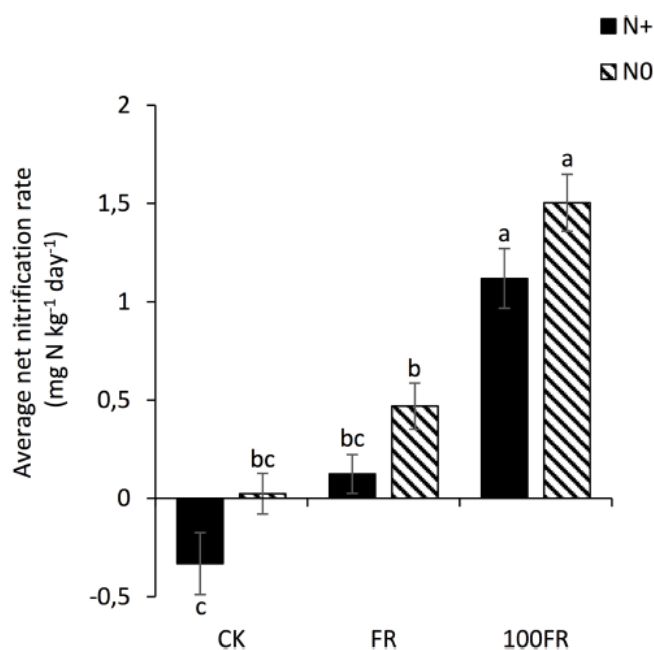


Fig 4. Average net nitrification rate in glyphosate-free and glyphosate-treated soils under two fertilization histories over a 15-days incubation period at 22°C. Different letters indicate a significant difference according to Tukey HSD test ($P < 0.05$). CK: glyphosate-free, FR: field rate, 100FR: 100 × field rate, N+: N-fertilized for 6 years, N0: unfertilized for 6 years.

Table 2. Analysis of variance for soil (microbial and chemical) properties as affected by herbicide (H), incubation time (T) or fertilizer (F) and their interactions (H × T or H × F).

| | NO ₃ ⁻ | PO ₄ ³⁻ | TOC | TN | Soil C:N | CEC | DH | AIP | URE | AWCD | H' |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Non-fertilized soils | | | | | | | | | | | |
| H | <0.001*** <i>54 %</i> | <0.001*** <i>66 %</i> | 0.307 <i>4.9 %</i> | 0.137 <i>6.1 %</i> | 0.985 <i>11 %</i> | 0.079 <i>9.3 %</i> | <0.001*** <i>56 %</i> | 0.0774 <i>36 %</i> | 0.519 <i>11 %</i> | <0.001*** <i>41 %</i> | 0.057 <i>19 %</i> |
| T | <0.001*** <i>30 %</i> | <0.001*** <i>23 %</i> | <0.001*** <i>76 %</i> | <0.001*** <i>93 %</i> | <0.001*** <i>81 %</i> | <0.001*** <i>45 %</i> | <0.001*** <i>24 %</i> | <0.001*** <i>38 %</i> | 0.011* <i>47 %</i> | <0.001*** <i>18 %</i> | <0.001*** <i>39 %</i> |
| H x T | <0.001*** <i>16 %</i> | 0.402 <i>11 %</i> | 0.861 <i>19 %</i> | 0.308 <i>0.7 %</i> | 0.492 <i>8.6 %</i> | <0.001*** <i>45 %</i> | 0.318 <i>19 %</i> | 0.015* <i>26 %</i> | 0.867 <i>41 %</i> | <0.001*** <i>41 %</i> | <0.001*** <i>42 %</i> |
| Fertilized soils | | | | | | | | | | | |
| H | <0.001*** <i>56 %</i> | <0.001*** <i>44 %</i> | 0.299 <i>16 %</i> | 0.372 <i>6.0 %</i> | 0.352 <i>12 %</i> | 0.173 <i>8.0 %</i> | 0.006** <i>33 %</i> | <0.001*** <i>18 %</i> | 0.149 <i>5.0 %</i> | <0.001*** <i>23 %</i> | 0.969 <i>0.35 %</i> |
| T | <0.001*** <i>24 %</i> | <0.001*** <i>46 %</i> | 0.013* <i>64 %</i> | <0.001*** <i>81 %</i> | 0.008** <i>59 %</i> | <0.001*** <i>78 %</i> | <0.001*** <i>52 %</i> | <0.001*** <i>67 %</i> | <0.001*** <i>78 %</i> | <0.001*** <i>14 %</i> | 0.027* <i>43 %</i> |
| H x T | <0.001*** <i>19 %</i> | 0.111 <i>10 %</i> | 0.580 <i>19 %</i> | 0.378 <i>13 %</i> | 0.278 <i>29 %</i> | 0.170 <i>14 %</i> | 0.271 <i>15 %</i> | <0.001*** <i>15 %</i> | 0.022* <i>17 %</i> | <0.001*** <i>62 %</i> | 0.055 <i>56 %</i> |
| Treatments | | | | | | | | | | | |
| H | <0.001*** <i>97 %</i> | <0.001*** <i>75 %</i> | 0.317 <i>34 %</i> | 0.337 <i>58 %</i> | 0.337 <i>0.21 %</i> | 0.157 <i>34 %</i> | <0.001*** <i>51 %</i> | 0.075 <i>22 %</i> | 0.702 <i>7.0 %</i> | <0.001*** <i>83 %</i> | 0.121 <i>37 %</i> |
| F | 0.075 <i>2.8 %</i> | <0.001*** <i>23 %</i> | 0.071 <i>48 %</i> | 0.531 <i>11 %</i> | 0.531 <i>29 %</i> | 0.014* <i>56 %</i> | <0.001*** <i>48 %</i> | 0.164 <i>8.2 %</i> | 0.018* <i>55 %</i> | 0.056 <i>9.0 %</i> | 0.098 <i>24 %</i> |
| H x F | 0.911 <i>0.2 %</i> | 0.567 <i>1.7 %</i> | 0.535 <i>18 %</i> | 0.528 <i>34 %</i> | 0.528 <i>70 %</i> | 0.568 <i>10 %</i> | 0.725 <i>1.0 %</i> | <0.001*** <i>69 %</i> | 0.137 <i>38 %</i> | 0.223 <i>8.0 %</i> | 0.104 <i>39 %</i> |

Asterisks represent significance level according to ANOVA (*P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001).

The relative percentage of variance explained for each of the factors and their interactions are shown in italics below the P values. TOC: total organic carbon, TN: total nitrogen, CEC: cation exchange capacity, DH: dehydrogenase activity, AIP: alkaline phosphatase activity, URE: urease activity, AWCD: average well color development, H': Shannon index.

PCA, performed to highlight links between soil properties, microbial community indices and treatments, indicated that two components accounted for 37.9% of the total variance (Fig 5). The first axis (PC1, proportion of variance explained: 20.2%) was positively correlated with TOC, TN, pH and was negatively correlated with CEC, moisture, and AIP activities (Fig 5). The second axis (PC2, 17.7%) was positively correlated with AWCD, C:N and was negatively correlated with DH activity. On day 1, samples were gradually separated on PC1: the most negatively correlated with PC1 were CK followed by FR, irrespective of N fertilization history, and then the fertilized soils subjected to the 100FR

treatment (soils were characterized by high values of CEC and AIP). Additionally, unfertilized soil subjected to the 100FR treatment was positively correlated with PC1 and PC2 and was characterized by high values of PO_4^{3-} , TOC, AWCD, and soil C:N. On day 8, the responses were similar, depending mainly on glyphosate concentration, regardless of N fertilization history. The CK and FR soil samples were negatively correlated with PC1 and were characterized by high values of CEC and AIP and URE activities, while the 100FR samples were positively correlated with PC2 and were characterized by high values of AWCD, H' , C:N, and PO_4^{3-} . Finally, on day 15, the CK and FR samples were positively correlated with PC1 and negatively correlated with PC2 and were characterized by high values of DH activity, pH and TN. On the contrary, the 100FR samples were positively correlated with both PC1 and PC2 and were characterized by high values of PO_4^{3-} , NIT, NO_3^- and TOC.

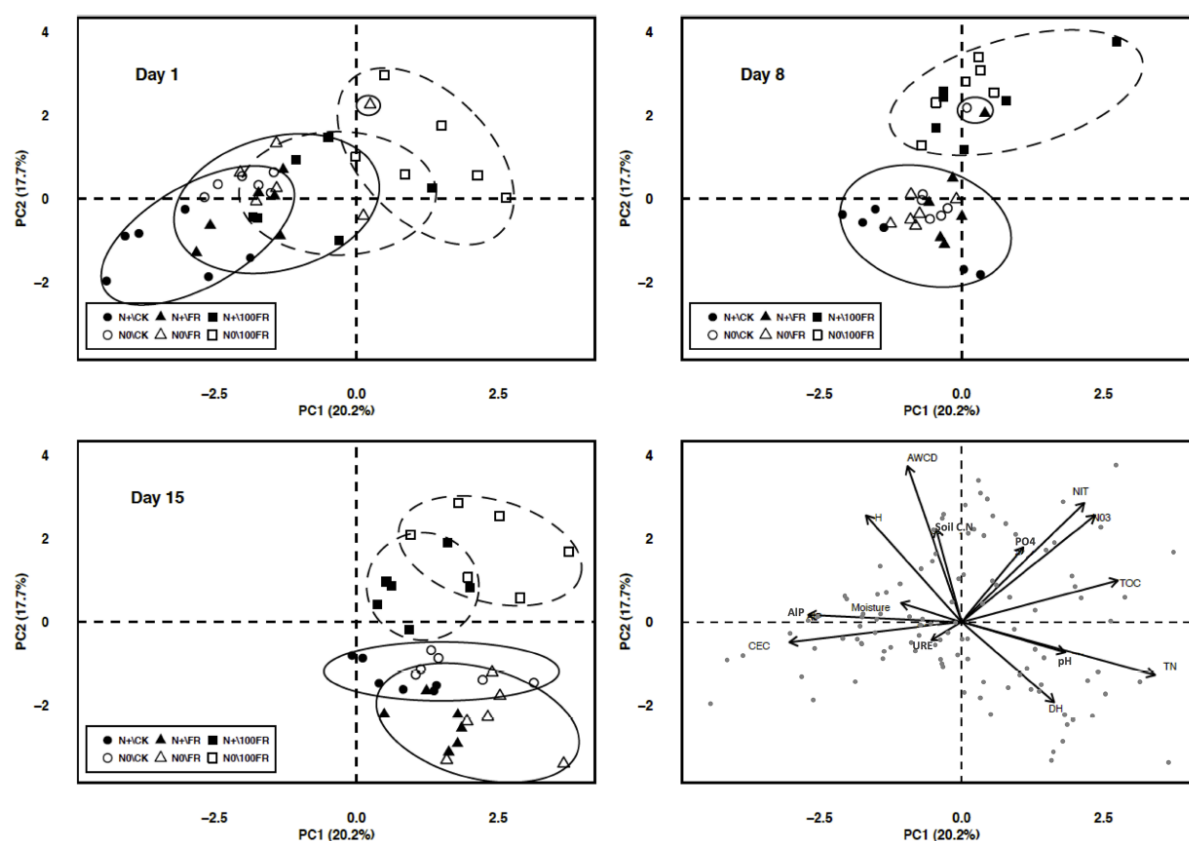


Fig 5. Principal component analysis based on correlations between soil microbial and chemical parameters at each incubation time (1, 8, 15 days). N+\CK: fertilized soils and glyphosate-free (black circles), N+\FR: fertilized soils and field application rate of glyphosate (black triangles), N+\100FR: fertilized soils and 100 times the field application rate of glyphosate (black squares), N0\CK: unfertilized soils and glyphosate-free (white circles), N0\FR: unfertilized soils and field application rate of glyphosate (white triangles), N0\100FR: unfertilized soils and 100 times the field application rate of glyphosate (white squares), DH: dehydrogenase activity, AIP: alkaline phosphatase activity, URE: urease activity, AWCD: average well color development, H' : Shannon index, CEC: cation exchange capacity, TOC: total carbon organic, TN: total nitrogen, Soil.C.N: soil C:N ratio, pH: hydrogen potential, PO_4 : available phosphorus content, NO_3 : nitrate content, NIT: average net nitrification rate, Moisture: soil moisture.

4. Discussion

Although N fertilization is used to increase the soil inorganic N content, glyphosate is not used for this purpose. However, the latter may induce non-target effects on microbial activities, leading to increased nutrient contents. Moreover, N fertilization history may affect these non-target effects of glyphosate through previous modification of microbial communities. In the present study, we determined the effect of increasing the rate of glyphosate applied to unfertilized soil and soil that was fertilized over a 6-year period. These effects were measured through soil chemical (i.e., pH, moisture, NIT, CEC, NO_3^- , PO_4^{3-} , TOC, TN, soil C:N), and biological parameters involved in biogeochemical cycles (i.e., DH: overall soil biological activity involved in nutrient cycling; AIP: enzyme activity involved in the soil P cycle; URE: enzyme activity involved in soil N cycling; AWCD: metabolic potential of soils, involved in nutrients cycling, and H' : functional diversity of the soil microbial community). The study was conducted *ex situ* to compare the short-term effect of a control (without glyphosate) and two glyphosate rates (0.96 mg kg^{-1} , 96 mg kg^{-1}) applied to soils that did or did not receive N fertilizer for 6 years. To summarize the results obtained, a conceptual figure displays the effects of all the 6 combined treatments on soil biological and chemical parameters (Fig 6).

| 15 days | DH | AIP | URE | AWCD | H' | PO4 | NO3 | NIT |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| NO\CK | Positive effect | Positive effect | Negative effect | No effect | No effect | No effect | No effect | No effect |
| N+\CK | No effect | Positive effect | Positive effect | No effect | No effect | No effect | No effect | Negative effect |
| NO\FR | No effect | Positive effect | Negative effect | Negative effect | Negative effect | No effect | No effect | No effect |
| N+\FR | No effect | Negative effect | Positive effect | Negative effect | No effect | No effect | No effect | No effect |
| NO\100FR | No effect | Positive effect | Negative effect | Positive effect | Positive effect | Positive effect | Positive effect | Positive effect |
| N+\100FR | Negative effect | Positive effect | Positive effect | Positive effect | No effect | Positive effect | Positive effect | Positive effect |

| | |
|--|-----------------|
| | Positive effect |
| | No effect |
| | Negative effect |

Fig 6. Summary of the measured effects of glyphosate application / nitrogen history combinations on soil biological and chemical parameters at 15 days following glyphosate application in the laboratory incubation. Effects of treatments on variables are coloured by green as positive, and red as negative while the absence of clear effect was coloured by blue. DH: dehydrogenase activity, AIP: alkaline phosphatase activity, URE: urease activity, AWCD: average well color development, H' : Shannon index, PO4: available phosphorus content, NO3: nitrate content, NIT: average net nitrification rate.

4.1. Nitrogen fertilization and glyphosate modify soil enzyme activities

Soil enzymes have been reported as relevant soil quality indicators and described as "biological fingerprints" to assess the process-level impacts of natural and anthropogenic activities on soils [46]. Among the three enzyme (DH, AIP, URE) activities tested, DH was the most sensitive to N fertilization history and glyphosate application rate. For example, the average application of 110 kg N ha⁻¹ year⁻¹ resulted in a significant decrease in enzyme activities compared to unfertilized soils. This is consistent with several studies that reported decreased DH under high N fertilizer concentrations (130 to 505 kg N ha⁻¹ year⁻¹), using different forms (anhydrous ammonia and urea) and applied under different climates (semi-arid sub-tropical, semi-arid and subtropical monsoon) [13,47,48]. The 100FR glyphosate application led to decreased DH activity from 15 days of incubation, regardless N fertilization history. However, the treatment with the normal field application rate of glyphosate (FR: 0.96 mg a.i ha⁻¹) did not change the DH activity compared with the control. These results are consistent with Bennicelli et al. [49], who showed that both 1 and 10 mg kg⁻¹ of glyphosate added to soils caused a decrease in DH activity that depended on the dose. However, these results are not consistent with Accinelli et al. [50], who reported stimulatory effects of glyphosate on DH activity at concentrations of 20-200 mg a.i. kg⁻¹ soil. An explanation for this discrepancy was provided by Zabaloy et al. [29], who reported that changes in DH activities following the addition of high glyphosate doses (150 mg a.i kg⁻¹) may depend on the history of herbicide application. However, N fertilization history did not significantly change the glyphosate application effects on DH activity, but we showed that lower DH values were measured in fertilized soil that received the high rate of glyphosate, indicating an interaction between nitrogen and glyphosate at a high glyphosate dose. By contrast, higher DH values were obtained in unfertilized soil at the normal glyphosate rate (0.96 mg kg⁻¹) or in the absence of glyphosate. These results indicate that the combination of N fertilization and high dose of glyphosate application (i.e. N+100FR) altered the DH activity, a relevant indicator of total microbial activity in soil [51]. Moreover, DH activity is used as a sensitive indicator for N flow and C use efficiency in agroecosystems [13,47] as well as in the utilization of soil O₂ and terminal electron acceptors [52].

Similar to DH, herbicides may interact with other enzymes such as AIP or URE, through links with active protein groups. The consequences of inhibiting AIP and URE activities include the decreased transformation of urea into CO₂ and NH₃ and a decrease in the release of PO₄³⁻ originating from organic P decomposition, which impacts soil fertility. The present study revealed that N fertilization induced noticeable effects on URE activity at 8 days (significant decrease with N fertilization) and 15 days (significant increase with N fertilization), while there was no effect of N fertilization history on AIP from 8 days following glyphosate application. These results are consistent with the study of Shen et al. [13], who revealed variations in URE activity over different times of sampling under high N conditions.

Past studies suggested that urea added at high application rates may be used as substrate by the URE enzyme and improve its activity but also revealed that changes in soil physico-chemical properties such as humus and clay contents, pH, or salinity could inhibit its activity [53,54]. The shift observed between 8 and 15 days following glyphosate application might be induced by product-feedback inhibition of enzyme activities because of the presence of a high amount of N and P [55] induced by increased microbial growth and activity due to optimal development in the laboratory incubation (22°C and constant moisture). Indeed, we showed that both N and P contents were affected by incubation time, with increased values between 8 and 15 days.

AIP activity was impacted by the glyphosate rate, N fertilization and incubation time. One day following glyphosate application, AIP activity was higher in fertilized soils. However, high levels of mineral N may inhibit AIP activity [13,56]. AIP decreased in N0 soil from 1 to 8 days following the highest dose of glyphosate application but did not change when the herbicide was applied at the field rate (FR). However, in the N+ soil, AIP decreased from 8 to 15 days following the FR glyphosate application. The combination of the low dose of glyphosate and the N fertilization history may represent potential sources of nutrients for microorganisms and may affect the biosynthesis mechanisms of enzymes by induction or repression phenomena [57]. By contrast, glyphosate applied to unfertilized soils or glyphosate applied at the high rate did not decrease AIP activity compared with the control. Overall, the results obtained in the present study are consistent with Floch et al. [26], who revealed that URE and AIP activities yielded less insight due to their fluctuations over time and their low detection rates.

4.2. Glyphosate application rate modifies soil functional responses, nitrification and nutrient contents

The effects of glyphosate may be suitably assessed by testing the ability of microbial communities to degrade the 31 carbon substrates included in Biolog EcoPlates. The results obtained in the present study revealed that glyphosate has a strong dose-dependent effect on heterotrophic communities, leading to the modification of the overall degradation activity expressed by the average well color development (AWCD). At low dose (0.96 mg kg⁻¹) and after 15 days of incubation, AWCD was lower in all soil samples regardless of N fertilization history. By contrast, the high dose of glyphosate (96 mg kg⁻¹, 100FR) significantly increased AWCD values at 8 and mainly 15 days following application. Similarly, [34] reported that high doses (50 mg kg⁻¹) of glyphosate increased AWCD 7 days after application. Other studies have also reported this dose-dependent response of microbial communities, also called “hormesis” [16]: at low dose, a stress response of sensitive microbial species may be observed, due to the “energy drain” and sarcosine catabolism (an intermediate in glyphosate degradation). Similarly, the decrease in AWCD in response to the FR glyphosate application may increase the residence time of soil carbon substrates, which are thus degraded more slowly. By contrast, the application of high glyphosate

led to increased microbial activities from 8 days in comparison with the other soils (i.e., CK and FR) because fast-growing heterotrophic bacteria were adapted to utilize it as a C nutrient source [31,58,59]. This energy gained by microorganisms was limited by N availability, while P does not constrain microbial activity [31]. Thus, we expected a higher degradation activity in fertilized soils with glyphosate addition. Unexpectedly, N fertilization did not stimulate microbial degradation activity in the presence of glyphosate. Contrariwise, we showed that the highest glyphosate dose applied to unfertilized soil led to the highest values of functional diversity compared with fertilized soil, suggesting a better degradation of C sources as a result of a wider range of microbial functions. After 15 days following glyphosate application, the lack of a significant difference between fertilized and unfertilized soils could be due to the chemical status (pH, TOC, TN, soil C:N, CEC, NO_3^- , PO_4^{3-}), which was similar, suggesting that N fertilization history did not change the soil physicochemical properties before glyphosate application. Thus, glyphosate has a short-term effect on microorganisms that degrade C sources, which is greater than the long-term effect of N fertilization. On the other hand, C derived from glyphosate degradation is not the only source of interest in the herbicide since it contains other major elements potentially used as a nutrient source by microorganisms. Busse et al. [27] reported that C, N and P atoms, which comprise the glyphosate molecule, may be readily available to microorganisms that are capable to degrade these molecules.

The principal component analysis (PCA) performed (Fig 3) on the biological substrate groups revealed a higher degradation of amines in soil treated with the high glyphosate rate, especially without N fertilization. Muñoz-leoz et al., [3] suggested that SO_4^{2-} from NPK fertilizers could reduce the microbial use of ethofumesate as an S source. Based on a similar approach, we suggest that the N contained in urea fertilizer used in the present study could reduce the microbial use of glyphosate isopropylamine salts as an N source in N-fertilized soils treated with 100FR glyphosate. Secondly, the AWCD increased and more precisely, amine degradation was positively correlated with the PO_4^{3-} and N- NO_3^- available forms, suggesting that glyphosate may be used as a P and N source by microorganisms able to achieve biological cleavage. These results are supported by previous studies, which stated that glyphosate was mainly used as a P than as an N or C source [15]. Van Eerd et al. [60] revealed that several gram-negative and gram-positive bacterial strains may use glyphosate-P, Sumalan et al. [59] stated that glyphosate could represent an additional source of C, N or P for microbial communities and Klimek-Ochab et al. [61] reported that glyphosate could be used as an N source by some fungal genera. In our study, we show that the high dose of herbicide application stimulated the activity of microbial communities (AWCD, Fig 2), which were able to degrade more amines (Fig 3).

Additionally, several studies revealed that the soil NO_3^- concentration and nitrification rate could be used as suitable indicators of disturbance in N transformations [41,62]. Thereby, in our study, both higher N- NO_3^- concentrations and higher average net nitrification rates measured in the soil that

received the high glyphosate treatment could be partly attributed to the deleterious effect of the herbicide on sensitive strains or to the oxidation of ammonium by surviving nitrifying bacteria (e.g., *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*). Our results are consistent with studies of Munson et al. [63] and Vitousek and Matson [64], who showed a large increase in nitrification, N mineralization and potential nitrate losses due to reduced immobilization of N by microorganisms following herbicide application. We suggest that increased N availability is potentially involved in greater nutrient uptake by plants, thus generating a paradox in the use of herbicide application which, in parallel to represent environmental concerns (especially safety concerns), may also induce a specific N supply contributing to plant productivity.

5. Conclusions

From our 15-day laboratory experiment, performed to elucidate the effects of glyphosate application on soil microbial responses and nutrient content under two levels of historic N fertilization, we conclude that: 1) The normal concentration of glyphosate that is used by farmers in the field (FR, 0.96 mg kg⁻¹) induced a decrease in the functional microbial activity, suggesting low degradation of carbon substrates (potentially leading to reduced losses of C stocks by mineralization); 2) when applied to unfertilized soils, the FR dose of glyphosate decreased also soil functional diversity H', while only phosphatase activity was decreased by FR dose in soils fertilized over 6 years; 3) a 100-fold increase in the glyphosate rate (96 mg kg⁻¹) changed the bacterial community responses, resulting in increased release of nutrients from 8 to 15 days following application; 4) the application of glyphosate to soil that received nitrogen fertilization for 6 years was deleterious for enzyme activities, but this depended on the dose and the incubation time; 5) the application of glyphosate to soils that did not receive nitrogen fertilizer increased soil NO₃⁻ and PO₄³⁻ contents through a probable action on the communities that degraded the herbicide; and 6) the long term application of nitrogen fertilization positively affected urease activity. We secondly conclude that microbial and chemical responses of soils treated with the field rate of glyphosate application resemble to the response of untreated soils, and is, by against, strongly different to highly contaminated soils (100FR dose). However, our laboratory incubation being performed on plant-free soils, the extrapolation for glyphosate use in the field remains limited since herbicide application on living roots prospected soils could lead to different data. There is thus an urgent need to set up experiments assessing the field impacts of glyphosate herbicide on soil microflora.

Acknowledgments

Guillaume Chenu is thanked for its technical assistance. Laurent Gutierrez and HerveÂ Demailly from the Regional Center of Molecular Biology Resources are thanked for having allowed the access to incubation room.

Author Contributions

Conceptualization: EN JENS MC TT.

Formal analysis: EN.

Funding acquisition: TT.

Investigation: EN JV AC DR FS JL JENS MC.

Methodology: EN JENS MC TT.

Resources: JENS MC TT.

Supervision: JENS MC TT.

Validation: EN JV FS JENS MC TT.

Visualization: EN JV.

Writing ± original draft: EN.

Writing ± review & editing: EN JV FS MC TT.

References

1. Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Loccoz YM, Muller D, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Plant Sci.* 2013; 4:1-19.
2. Bruto M, Prigent-combaret C, Muller D, Moe Y. plant-beneficial functions in plant related Proteobacteria. *Sci Rep.* 2014; 4:6261:1-10.
3. Muñoz-leoz B, Garbisu C, Antiguëdad I, Ruiz-romera E. Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities. *Soil Biol Biochem.* 2012; 48:125-34.
4. Brown LR. Feeding nine billion. In *State of the world 1999: A Worldwatch Institute report on progress toward a sustainable society*, edited by Brown L.R., Flavin C., and French H., et al. New York: W.W. Norton & Company. 1999; 115-32.
5. Smil V. Nitrogen and Food Production: Proteins for Human Diets. *Ambio.* 2002; 31(2):126-31. PMID:12078001
6. Zhao S, Qiu S, Cao C, Zheng C, Zhou W, He P. Responses of soil properties, microbial community and crop yields to various rates of nitrogen fertilization in a wheat-maize cropping system in north-central China. *Agric Ecosyst Environ.* 2014; 194:29-37.
7. Tian W, Wang L, Li Y, Zhuang K, Li G, Zhang J, et al. Responses of microbial activity, abundance, and community in wheat soil after three years of heavy fertilization with manure-based compost and inorganic nitrogen. *Agric Ecosyst Environ.* 2015; 213:219-27.
8. Nivelles E, Verzeaux J, Habbib H, Kuzyakov Y, Decocq G, Roger D, et al. Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization. *Appl Soil Ecol.* Elsevier B.V.; 2016; 108:147-55.
9. Verzeaux J, Alahmad A, Habbib H, Nivelles E, Roger D, Lacoux J, et al. Geoderma Cover crops prevent the deleterious effect of nitrogen fertilisation on bacterial diversity by maintaining the carbon content of ploughed soil. *Geoderma.* 2016; 281:49-57.

10. Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol Biochem.* 2003; 35:453-61.
11. Sun R, Zhang X-X, Guo X, Wang D, Chu H. Bacterial diversity in soils subjected to long-term chemical fertilization can be more stably maintained with the addition of livestock manure than wheat straw. *Soil Biol Biochem.* 2015; 88:9-18.
12. Zhou J, Guan D, Zhou B, Zhao B, Ma M, Qin J, et al. Influence of 34-years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in northeast China. *Soil Biol Biochem.* 2015; 90:42-51.
13. Shen W, Lin X, Shi W. Higher rates of nitrogen fertilization decrease soil enzyme activities, microbial functional diversity and nitrification capacity in a Chinese polytunnel greenhouse vegetable land. *Plant Soil.* 2010; 337:137-50.
14. He J, Shen J, Zhang L, Zhu Y, Zheng Y, Xu M, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environ Microbiol.* 2007; 9:2364±74. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01358.x> PMID: 17686032
15. Partoazar M, Hoodaji M, Tahmourespour A. The effect of glyphosate application on soil microbial activities in agricultural land. *Afr J Biotechnol.* 2011; 10(83):19419-24.
16. Allegrini M, Celina M, GoÂmez V. Science of the Total Environment Ecotoxicological assessment of soil microbial community tolerance to glyphosate. *Sci Total Environ.* Elsevier B.V.; 2015; 533:60-8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.096> PMID: 26150308
17. Duke SO, Powles SB. Glyphosate-Resistant Crops and Weeds: Now and in the Future. *AgBioForum.* 2009; 12:346-57.
18. Bonny S. Herbicide-tolerant Transgenic Soybean over 15 Years of Cultivation: Pesticide Use, Weed Resistance, and Some Economic Issues. The Case of the USA. *Sustainability.* 2011; 3:1302-22.
19. O'Keeffe MG. The control of *Agropyron repens* and broad-leaved weeds pre-harvest of wheat and barley with the isopropylamine salt of glyphosate. *Proceedings 1980 British Crop Protection Conference-Weeds, Brighton.* 1980; 53-60.
20. Sheibani S, Ahangar AG. Effect of tillage on soil biodiversity. *J Novel Appl Sci.* 2013; 2(8):273-81.
21. Mangalassery S, Mooney SJ, Sparkes DL, Fraser WT, SjoÈgersten S. Impacts of zero tillage on soil enzyme activities, microbial characteristics and organic matter functional chemistry in temperate soils. *Eur J Soil Biol.* 2015; 68:9-17.
22. Reicosky DC. Tillage and gas exchange. En: Lal R. (ed.). *Enc Soil Sci* Boca Raton, Fla.: Taylor & Francis. 2002; 1333-1335.
23. Buffin D, Topsy J. Health and environmental impacts of glyphosate: The implications of increased use of glyphosate in association with genetically modified crops. *Pesticide Action Network, UK.* 2011.

24. Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini GE. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(6):716-20. <https://doi.org/10.1289/ehp.7728> PMID: 15929894
25. Gaupp-berghausen M, Hofer M, Rewald B, Zaller JG. Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. *Nat Publ Gr. Nature Publishing Group*; 2015; 1-9.
26. Floch C, Chevremont A, Joanico K, Capowiez Y, Criquet S. European Journal of Soil Biology Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog O Ecoplates. *Eur J Soil Biol.* 2011; 47(4):256-63.
27. Busse MD, Ratcliff AW, Shestak CJ, Powers RF. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biol Biochem.* 2001; 33:1777-89.
28. Weaver MA, Krutz LJ, Zablutowicz RM, Reddy KN. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. *Pest Manag Sci.* 2007; 63:388-93. <https://doi.org/10.1002/ps.1351> PMID: 17348071
29. Zabaloy C, Garland JL, Gomez MA. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2, 4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Appl Soil Ecol.* 2008; 40:1-12.
30. Gomez E, Ferreras L, Lovotti L, Fernandez E. Original article Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *Eur J Soil Biol.* 2009; 45(2):163-7.
31. Zabaloy MC, Gomez E, Garland JL, Gomez MA. Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. *Appl Soil Ecol.* 2012; 61:333-9.
32. Haney RL, Senseman SA, Hons FM, Zuberer DA. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sci.* 2000; 48:89-93.
33. Lane M, Lorenz N, Saxena J, Ramsier C, Dick RP. Pedobiologia International Journal of Soil Biology The effect of glyphosate on soil microbial activity, microbial community structure, and soil potassium. *Pedobiologia. Int J Soil Biol.* 2012; 55(6):335-42.
34. Machet JM, Dubrulle P, Louis P. Azobil®: a computer program for fertiliser N recommendations based on a predictive balance sheet method. In: Scaife A. Proceedings of the 1st Congress of the European Society of Agronomy, 5th-7th December 1990, Paris, France. Colmar, France: ESA/INRA/CEC. 1990.
35. Casida L, Klein D, Santoro T. Soil Dehydrogenase Activity. *Soil Sci.* 1964; 98:371-76.
36. Tabatabai MA, Bremner JM. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of phosphatase activity. *Soil Biol Biochem.* 1969; 1:301-7.
37. Alef K, Nannipieri P. Urease activity. In: Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Eds Alef K. and Nannipieri P. Academic Press. 1995; London, 576.
38. Govaerts B, Mezzalama M, Unno Y, Sayre KD, Luna-Guido M, Vanherk K, et al. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. *Appl Soil Ecol.* 2007; 37:18-30.

39. Garland JL. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 1997; 24:289-300.
40. Ciesielski H, Sterckeman T, Santerne M, Willery J. A comparison between three methods for the determination of cation exchange capacity and exchangeable cations in. *Agronomie EDP sci.* 1997; 17(1):9-16.
41. Man L, Zucong CAI. Effects of chlorothalonil and carbendazim on nitrification and denitrification in soils. *J Environ Sci [Internet]. The Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences. J Environ Sci.* 2009; 21(4):458-67.
42. Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS, Dean LA. Estimation of available phosphorus in soils by the extraction with sodium bicarbonate; *Circ.* 939; US Dep of Agric. 1954.
43. De Mendiburu F. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research.* Version 1.2-4. 2016. <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu>
44. Pohlert T. *PMCMR: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums.* Version 4.1. <http://cran.r-project.org/>. 2016.
45. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, et al. *Vegan: Community Ecology Package* Version 2.3-2. <http://cran.r-project.org/>. 2015.
46. Utobo EB, Tewari L. Soil enzymes as bioindicators of soil ecosystem. *Appl Ecol Env Res.* 2015; 13 (1):147-69.
47. Deng SP, Parham JA, Hattey JA, Babu D. Animal manure and anhydrous ammonia amendment alter microbial carbon use efficiency, microbial biomass, and activities of dehydrogenase and amidohydrolases in semiarid agroecosystems. *Appl Soil Ecol.* 2006; 33:258-68.
48. Masto RE, Chhonkar PKAÄ, Singh D, Patra AK. Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long-term field trial on a sub-tropical inceptisol. *Soil Biol Biochem.* 2006; 38:1577-82.
49. Bennicelli RP, Wolińska A, Stępniewska Z, Bogudzińska M. Influence of pesticide (glyphosate) on dehydrogenase activity, pH, Eh and gases production in soil (laboratory conditions). *Int Agrophysics.* 2009; 23:117-22.
50. Accinelli C, Screpanti C, Dinelli G, Vicari A. Short-time effects of pure and formulated herbicides on soil microbial activity and biomass. *Int J Environ An Ch.* 2002; 82, 8-9.
51. Dick WA, Tabatabai MA. Significance and potential use of soil enzymes. In: Metting FB Jr (ed) *Soil microbial ecology: application and environmental management.* Marcel Dekker, New York. 1992; 99-110.
52. Caravaca F, Masciandaro G, Ceccanti B. Land use in relation to soil chemical and biochemical properties in a semiarid Mediterranean environment. *Soil Till Res.* 2002; 68:23-30.
53. Tabatabai MA. Soil enzymes. In: W.A. Dick (Ed.), *Methods of Soil Analysis, 2. Microbiological and Biochemical Properties.* Soil Sci Soc Am., Madison, 1994; 775-833.
54. Schloter M, Dilly O, Munch JC. Indicators for evaluating soil quality. *Agr Ecosyst Environ.* 2003; 98:255-62.

55. Dick RP. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. in: Doran, et al. (Eds.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Soil Sci Soc Am, Madison. 1994; 107-24.
56. Karaca A, Cetin SC, Turgay OC, Kizilkaya R. Soil Enzymes as Indication of Soil Quality. 2010. In Shukla G. and Varma A., *Soil Enzymology*, Soil Biol. 22.
57. Singh BK, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol Rev.* 2006; 30:428-71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x> PMID: 16594965
58. Ratcliff AW, Busse MD, Shestak CJ. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Appl Soil Ecol.* 2006; 34:114-24.
59. Sumalan R, Alexa E, Negrea M, Dehelean C. Researches concerning the structure and activity of edaphic microflora community when glyphosate is added. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*. Tom. XVI, 2009; 2:142-5.
60. Van Eerd LL, Hoagland RE, Zablotowicz RM, Hall JC. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed sci.* 2003; 51:472-95.
61. Klimek-ochab M, Klimek M, Lejczak B, Kafarski P, Forlani G. Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate-utilizing strain of *Penicillium chrysogenum* Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate-utilizing strain of *Penicillium chrysogenum*. *Pest Manag Sci.* 2001; 57:815-21. <https://doi.org/10.1002/ps.366> PMID: 11561407
62. Cernohlavkova J, Jarkovsky J, Hofman J. Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils. *Ecotox Environ Safe.* 2009; 72:80-5.
63. Munson AD, Margolis HA, Brand DG. Intensive silvicultural treatment: impacts on soil fertility and planted conifer response. *Soil Sci Soc Am J.* 1993; 57:246-55.
64. Vitousek PM, Matson PA. Disturbance, nitrogen availability, and nitrogen losses in an intensively managed loblolly pine plantation. *Ecology.* 1985; 66:1360-76.

Partie 2. Article 2. Effets de l'application du glyphosate et de la fertilisation azotée sur les facteurs édaphiques et aériens et les conséquences sur les interactions aériennes et souterraines.

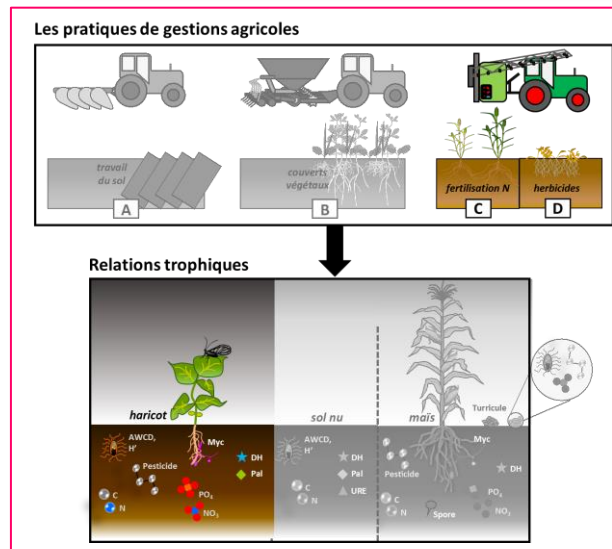
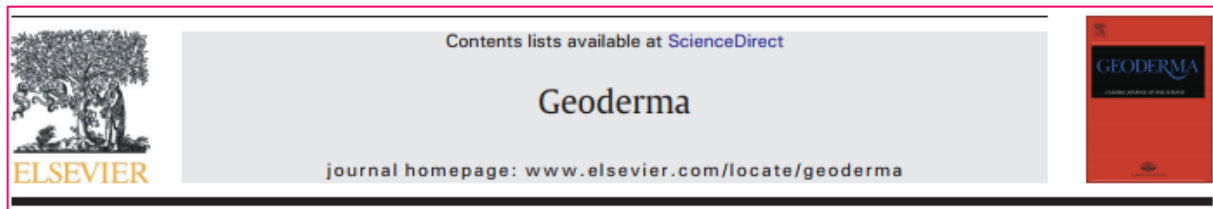


Fig. 18. Effets de la gestion de deux produits agrochimiques : l'azote de synthèse et le glyphosate sur les indicateurs édaphiques qualitatifs, la productivité végétale et les interactions trophiques. Cf. Figure 3 page 22.

Article n°2 (en revision)



Effects of glyphosate application and nitrogen fertilization on the soil and the consequences on aboveground and belowground interactions

Elodie Nivelles¹, Julien Verzeaux¹, Amélie Chabot², David Roger¹, Quentin Chesnais¹, Arnaud Ameline¹, Jérôme Lacoux¹, Jose-Edmundo Nava-Saucedo¹, Thierry Tétu^{1*}, Manuella Catterou¹

¹Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés (EDYSAN, FRE 3498 CNRS), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, 80029, Cédex, France

²Département Sciences de la Vie et de la Terre, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, 80029, Cédex, France

Abstract

The application of nitrogen (N) and herbicides are commonly used to fertilize crops and protect them against weed development, but are also considered as soil and environment pollutants. Even so, the individual and combined non-target effects of N fertilizers and herbicides on multitrophic interactions within agrosystems are not well known. From soil samples collected in the field, we examined the effects of the direct application of glyphosate and/or N fertilization on microbial activities and soil nutrient status. In addition, we investigated the increase in biomass and, nutrient acquisition of the bean (*Phaseolus vulgaris*) and the consequences of the applications of N and glyphosate on the performance of the herbivore aphid (*Aphis fabae*). From soils that did (N+) or did not receive (N0) synthetic N fertilization over a 6-year period, we assessed the effects of glyphosate (CK, without glyphosate; FR, field rate of glyphosate) and N fertilization (N+, with N fertilization; N0, without N fertilization) applications in a mesocosm experiment for 75-days. Following the 75 day treatment, the biological and physiological consequences, both belowground and aboveground were determined. The growth of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and dehydrogenase activity, were negatively affected following N+ fertilization and the application of the FR of glyphosate, whilst in the absence of glyphosate, alkaline phosphatase (AIP) activity was reduced. Functional microbial responses were unaffected by both N or glyphosate, even when applied in combination. Conversely, the N fertilization significantly increased the nitrate content (NO_3^-) in the CK soils and the total N in the FR soils, compared to CK\N0 and FR\N0 soils. The combined effects of glyphosate and nitrogen fertilization (FR\N+) significantly decreased the soil C:N ratio, but significantly increased nitrification compared to CK\N0 and FR\N0 soils. The FR\N+ treatments positively affected plant performance, improving the total chlorophyll, sucrose, ammonium, amino acid content, and pod biomass, compared to the CK\N0 and FR\N0 soils. Unlike glyphosate, which did not appear to exert an effect when applied alone or in combination, N fertilization significantly increased aphid nymph survival. The non-metric multidimensional scale allowed us to establish belowground and aboveground interactions with glyphosate and N fertilization. We conclude that glyphosate and N fertilization have negative effects on soil microflora and potential pests, but do not necessarily affect belowground and aboveground interactions, and may offer equal or superior benefits to crop productivity.

Keywords: Nitrogen Fertilization; Glyphosate Herbicide; Enzyme Activities; Arbuscular Mycorrhizal Fungi; Soil Nutrients; Plant Performance; Aphid Nymph Survival

1. Introduction

Within a framework focused on sustainable agriculture, linking belowground and aboveground organisms in agrosystems and their response to high anthropic pressure induced by agricultural practices

is a major concern. Recently, profound effects of belowground communities on aboveground insects through plant-mediated interactions have been highlighted (Bardgett and Wardle, 2010). Among the most commonly applied inputs within agrosystems are fertilizers and herbicides. Many studies report their intentional and unintended effects on trophic interactions at the aerial and soil levels within agrosystems (Birkhofer et al., 2008).

Mineral fertilizers, especially nitrogen (N), have been a major contributor to the impressive crop yield increases realized since the 1950s (Robertson and Vitousek, 2009). N may also be considered as a limiting factor for the growth of both plant and soil organisms (Mattson, 1980), including belowground microbial communities (Demoling et al., 2007) and the N content of a plant is one of the characteristics that is vitally important to herbivores (Mattson, 1980) in terrestrial ecosystems. In a similar manner to mineral fertilizers, pesticides may induce changes in belowground communities, modifying crop nutrient acquisition and thus relationships between plants and aboveground communities through a bottom-up effect (Saska et al., 2016).

Glyphosate (N-phosphonomethylglycine) is a systematic non-selective herbicide, which is the most widely used in the world to control weeds in crops (Helander et al., 2012). Glyphosate acts by inhibiting the activity of 5-*enol*pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), an enzyme found in plants, bacteria and fungi (Padgett et al., 1995), some of which play key roles in soil nutrient cycling (Feng et al., 2005). Glyphosate has been shown to be rapidly decomposed by microorganisms in soil (Giesy et al., 2000) and risks of glyphosate toxicity to non-target organisms are controversial. Degradation of glyphosate depends on the composition and properties of the soil (Gimsing et al., 2007), climate conditions (Helander et al., 2012), and management practices of phosphate fertilizers (Bott et al., 2011). The primary product formed from glyphosate metabolism is aminomethylphosphonic acid (AMPA) which has great environmental persistence and mobility in soil (Kjaer et al., 2005), and is also toxic to non-target organisms (Damin and Trivelin, 2011).

Soil processes related to phosphorus (P), carbon (C) and N cycles and soil quality indicators such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), community-level physiological profiles (CLPP), alkaline phosphatase (AIP) and dehydrogenase (DH) activities, have been found to be very sensitive to the presence of agrochemicals (Ahtiainen et al., 2003; Goverde et al., 2000).

AMF are obligate symbionts, often working in cooperation, based on the exchange of C from the plant and P delivered by the fungi (Smith and Smith, 2011). AMF may be able to modulate the resilience of ecosystems to abiotic stresses such as nutrient deficiency, drought (Garrido et al., 2010), and biotic stresses such as plant herbivores (Shah et al., 2008; Koricheva et al., 2009). AMF are thus important ecosystem drivers (Veresoglou et al., 2012) that can improve plant growth, N uptake (Verzeaux et al., 2016), and P uptake (Goverde et al., 2000). Recent studies have shown conflicting results about the effect of glyphosate on AMF root colonization, ranging from increases to decreases or

neutral effects (Malty et al., 2006; Ronco et al., 2008; Druille et al., 2013). Overall, glyphosate and N fertilization can affect soil microbial activities (such as AMF growth and colonization), which are known to create changes in foliar chemistry (increased plant P content, but reduced N) and may thus influence plant-herbivore interactions (Wurst et al., 2004).

In addition, studies have shown that interactions between belowground microbial activity and aboveground herbivore performance can occur (Tao and Hunter, 2012). Short-term changes in the nutrient quality of crop plants induced by the application of fertilizers can influence herbivore populations (Garratt et al., 2010; Tao and Hunter, 2012), and changing the ratio of macronutrients in plants can affect herbivore feeding and performance (Sternner and Elser, 2002). Indirectly, colonization by AMF positively (Gange et al., 1999) or negatively (Koricheva et al., 2009) affects herbivore performances, depending on both the herbivore and fungal species present.

A variety of carbon-containing compounds including accumulated herbicides are available for soil microorganisms, thus influencing the transformations of plant nutrients in the soil (Das et al., 2003). The community level physiological profile (CLPP) has been used in a variety of environments to assess the catabolic capacities among microbial communities (Lowit et al., 2000; Gomez et al., 2004). The responses of the CLPP and some soil enzymes can vary widely depending on the level of N fertilization. For example, several researchers have shown that high levels of N fertilization increased (Olander and Vitousek, 2000; Kalembasa and Symanowicz, 2012), or decreased (Shen et al., 2010; Kalembasa and Symanowicz, 2012) both DH and AIP activities and microbial functional diversity (Sarathchan et al., 2001). Additionally, optimum applications of N fertilizer had a neutral effect on microbial functional activities (Lupwayi et al., 2012).

The potential perturbation of soil microbial communities and their processes has attracted interest because of the mode of action of glyphosate (Carlisle and Trevors, 1988). Glyphosate having a low C:N ratio (3:1), the excessive organic N compared to microbial demand may be readily mineralized by heterotrophic microorganisms, thus enhancing microbial activity (Haney et al., 2000). However glyphosate can be toxic for microorganisms, such as certain strains of nitrogen-fixing bacteria (Damin and Trivelin, 2011). It has been shown that glyphosate has no significant effect on soil microbial activity at the recommended field rate as compared to a 100 fold higher dose (Ratcliff et al., 2006). Moreover, glyphosate is traditionally considered to be a herbicide with relatively low ecological and toxicological side effects on terrestrial ecosystems (Giesy et al., 2000) but the impact of the application of glyphosate-based herbicides on insect herbivores, such as aphids, has been studied only rarely (Saska et al., 2016).

Inputs are often studied separately in agrosystems without considering whether they can act individually or together. In addition, studies have mainly focused on the effects of inputs either on the belowground or aboveground compartment (Barnard et al., 2006). The objective of this study was to assess the individual and combined effects of N fertilization and glyphosate applications on

belowground and aboveground parameters of plants grown under laboratory conditions. Using this approach, we hypothesize that: 1) N fertilization and treatment with glyphosate can have synergistic and/or antagonistic effects on certain soil microbial activities (e.g. AMF, CLPP, soil enzymes) and the nutrient status of the soil; 2) The changes in belowground microbial activities may modulate both plant nutrient acquisition, plant biomass, and the performance of aboveground herbivores through bottom-up processes.

2. Materials and Methods

2.1. Field experiment and soil sampling

Sampling was conducted in November 2015. The soil was collected from the experimental site “La Woestyne” in Northern France (50°44’N, 2°22’E, 40 m above sea level). Prior to the establishment of the experiment in 2010, the field was prepared using a chisel plough and a rotary power system, fertilized conventionally, and cultivated with wheat (*Triticum aestivum* L.). In 2010, winter cover crops (including *Vicia sativa*, *Vicia faba*, *Trifolium alexandrinum*, *Phacelia tanacetifolia*, *Avena sativa* and *Linum usitatissimum*) were sown directly, and the experimental field was split into two N fertilization regimes (without or with N fertilizer). Between 2010 and 2015, the crop rotation in each plot included green pea (*Pisum sativum* L.), maize (*Zea mays* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.), flax (*Linum usitatissimum* L.), beet (*Beta vulgaris* L.) and wheat. All crops were sown by using a no-till system and following a winter cover crop except wheat, which was sown directly after the maize harvest. The plot without N measured 7 × 8 m while the plot with N measured 14 × 8 m. A 7-m wide corridor separated the two plots to avoid N contamination. N fertilization in the field was determined according to the N budget method (Machet et al., 1990), and the fertilizer used consisted of 50 % urea, 25 % ammonia and 25 % nitrate. Since 2010, a cumulative amount of 650 kg N ha⁻¹ was added to the plot with N, while the plot without N was not fertilized. Since the beginning of the experiment, both plots were frequently treated with glyphosate applications for weed control. The soil is classified as a silt loam with the following properties: 66.8 % silt, 21.2 % clay, 12 % sand. Fifty 20-cm depth soil cores were randomly sampled in each plot by using a 7-cm diameter auger. Fresh soils sampled in each plot were mixed and sieved through a 5-mm mesh. A sub-sample was then separated out, air-dried and sieved (2 mm) for chemical analyses, which were performed before the beginning of the mesocosm experiment (T0).

2.2. Establishment of the mesocosm experiment

A 75-day mesocosm experiment was carried out to assess the aboveground and belowground effects of glyphosate and N fertilization applications on soil nutrients content, microbial activities in the soil, plant performance (*Phaseolus vulgaris*), and aphid nymph survival (*Aphis fabae*) in soil without (N0) or with nitrogen fertilizer (N+). For the mesocosm experiment, 1600 g of fresh homogenized soil

with a 75-80 % water holding capacity (WHC) was placed into plastic pots (2.2 L volume, 15.5 cm high). The 12 pots were completely randomized, and three replicates were used for each treatment combination. At T0, glyphosate, in the isopropylamine salt form, was applied to the soil surface in the following doses: zero control (CK) and 0.96 mg active ingredient per kg dry weight soil (a.i./dw; FR), prepared with deionized water. FR corresponds to the conventional recommended field application rate (720 g active ingredient ha⁻¹) for soil with a bulk density of 1.45 g cm⁻³. CK received equal to the amount of deionized water added to the glyphosate treatments. The pots were incubated in a dark room at 22 ± 1°C for 15 days. At T7 (7 days) and T14 (14 days), 150 g of fresh soil samples were manually collected from throughout the pots for chemical analysis (Supplementary Fig. 1). At T15 following glyphosate application and just before sowing of the beans, 798.75 mg KNO₃ kg⁻¹ of soil were applied in the liquid form in the N+ pots. *Phaseolus vulgaris* seeds were sown on day T15 and a long cycle of light (16 h light at 380 μmol m⁻² s⁻¹) was set up to reproduce summer days. Watering was adjusted to water uptake by the plants to ensure similar moisture conditions in microcosms with fast growing plants. At T75, aphids, plants (including root system), and soils were collected. From each replicated pot, the living aphids were put into Eppendorf tubes and frozen. The root system was kept intact as much as possible. Plant roots and plant aboveground biomass were weighed and dried separately before the measurement of C and N contents. The central leaf of the intermediate stage from each plant was stored at – 80 °C in the dark until biochemical analyses (chlorophyll, sugars, starch, ammonium and total amino acids). The soil samples were kept at 4°C one week prior to analysis. The moisture content, pH, total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), extractable inorganic N (NO₃⁻), available phosphorus (PO₄³⁻), cation exchange capacity (CEC), and microbial enzyme activities (dehydrogenase (DH), alkaline phosphatase (AIP), and Community Level Physiological Profiles (CLPP)) of the soil were measured.

2.3. Measurements of plant parameters

2.3.1. Percentage of root colonization

The AMF colonization of the beans was monitored in 30 root subsamples of 1 cm length per plant and the roots were stained with trypan blue according to Koske and Gemma (1989). Mycorrhizal infection was quantified using the method of McGonigle et al. (1990), with 150 intersections counted for each sample.

2.3.2. Analyses of aboveground biomass

The aboveground biomass was collected manually from each pot. The leaf samples were immediately stored at – 80 °C in the dark until analysis, and then the leaf metabolites were extracted by mashing with liquid nitrogen and divided with three analytical replicates. Chlorophyll of leaves was extracted in the dark with 3 mL of acetone (80 %) at 0°C. The chlorophyll content was calculated using spectrophotometric measurements (Eon spectrophotometer, BioTek Instruments Inc., USA) at

wavelengths of 470, 645, and 663 nm. Acetone (80%) was used as a control and shown as 1 mg of chlorophyll per 1 g of fresh leaves. The method to determine the starch, and sugar contents was based on that described by Ni et al. (2009), with some modifications. Total starch in each sample was quantified using 30 μ L of the insoluble carbohydrate fraction using a kit from Boehringer Mannheim (R-Biopharm, Darmstadt, Germany). To quantify soluble sugars, amino acids, and starch, about 100 mg of leaves were extracted with 80 % ethanol (v/v) (2 hours, 4°C, with agitation), and centrifuged at 12.000 g (2 min, 4 °C). The supernatant was extracted and then a second and third extraction were carried out on the pellet with 60 % ethanol and water (2h, 4°C, with agitation), respectively. After centrifugation, the combined supernatants that included all the soluble molecules were collected for quantification of total soluble and reducing sugars, and stored at – 20 °C for amino acid and ammonium determinations. The sugar concentrations were determined enzymatically using the D-Glucose/D-fructose/Sucrose kit (R Biopharm, Mannheim, Germany; Bergmeyer, 1974) and were expressed as mg of sugar per g of dry leaves. The total amino acids were determined using the method described by Rosen (1957). The precipitates were stored at –20 °C before the determinations of starch. The starch content was measured by drying the pellet at 100 °C to remove the residual ethanol and placed in water at 100 °C to release enzymes, amylose and amylopectin. The starch concentration was determined enzymatically using α -amylase and amyloglucosidase with acetate buffer according to the published protocol of Smith and Zeeman (2006). The fresh biomass was weighed and a representative subsamples was dried at 65°C for 96 hrs to determine the dry matter content. Metabolite concentrations were calculated on the basis of dry weight.

Freeze-dried, above-ground biomass samples were ground to a powder and approximately 1 mg was weighed into tin capsules. C and N were measured using an elemental analyser (Flash EA 1112, Thermo Electron, Germany).

2.4. Measurements of soil parameters

2.4.1. Chemical analyses

Soils were passed through a 2 mm sieve and oven-dried at 45°C for 48 hrs. Moisture was measured after drying samples at 105°C for 24 hrs. The pH was measured after shaking the dried soil with deionized water (1:5 dry mass ratio) for 45 min. The mixture was then left for 5 min and the pH was recorded using a FE20-FiveEasy™ pH meter (Mettler Toledo, Switzerland). CEC was quantified by shaking the soil samples for 1 h with a solution of hexammine cobalt chloride (1.66 mol L⁻¹) (1:10 mass ratio) (Ciesielski et al., 1997). After filtration, absorbance was measured at two wavelengths (475 and 380 nm) using an Eon spectrophotometer (BioTek Instruments Inc., USA). For TOC, TN and PO₄³⁻, sieved soil was finely ground by using a ball-mill (Retsch, MM400). TOC and TN was analyzed using a CN elemental analyzer (Flash EA 1112, Thermo Electron, Germany). Since initial analyses revealed

that the soil was free of carbonate, the soil total C was assumed to be equal to the TOC. The NO_3^- content of the soils was determined by extracting the soil samples with 2 M KCl (1:5 fresh mass ratio) for 1 h on a rotary shaker. The extracts were centrifuged for 10 min at 4000 rpm and the supernatants were analyzed by a continuous flow analytical system (Alpkem flow solution IV power base, OI Analytical, USA). Taking the $\text{NO}_3\text{-N}$ contents (NO_3^-) before the incubation (T_0) as baselines, the net nitrification rate (NIT) was calculated as follows (Eq. 1):

$$NIT = (N_t - N_0)/t \quad (1)$$

where, N_0 and N_t are the $\text{NO}_3\text{-N}$ (including $\text{NO}_2\text{-N}$) contents of the soil at time 0 and t after incubation (Man and Zucong, 2009).

The PO_4^{3-} content was determined by extracting the soil samples with 0.5 M NaHCO_3 pH 8.5 (1:20 dry mass ratio) and was measured in the extract using the colorimetric method at 882 nm (Olsen et al., 1954).

The analysis of glyphosate and AMPA (aminomethylphosphonic acid - the major degradation product of glyphosate) concentrations in soils was performed by Eurofins laboratories (France, www.eurofins.fr/env) using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

2.4.2 Microbial analyses

2.4.2.1. Determination of enzyme activities

Dehydrogenase activity (DH) based on the reduction of the 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) to triphenyl tetrazolium formazan (TPF) was determined according to the method initially described by Casida (1964) with some modifications (Nivelle et al., 2016). Soil samples prepared with CaCO_3 (100:1 fresh mass ratio) were mixed both in a 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) solution (3 %) and in deionized water, and then incubated at 37°C for 24 hrs in a dark room. After incubation, TPF was extracted with a solution of pure methanol. After filtration, TPF concentrations were determined by spectrophotometry at 485 nm. Alkaline phosphatase activity (AIP) was determined according to the method described by Tabatabai and Bremner (1964). Fresh soil samples were pre-incubated at 27 °C for 48 hrs. After pre-incubation, deionized water was added to soil samples (1:1 mass ratio) and mixed. A part of the soil samples was used, and substrate *p*-nitrophenyl phosphate solution (pNPP, 1 %) and borate buffer (pH 9) were added. After incubation at 37°C for 1 hr, CaCl_2 (0.5 N) and NaOH (1 N) were added to stop the reaction. Finally, all samples were centrifuged at 10.000 *g* for 5 min. The released *p*-nitrophenol (*p*-NP) was measured at 405 nm.

2.4.2.2. Community level of physiological profiles

CLPP were assessed using Biolog EcoPlates™ (BIOLOG, Hayward, USA) as described by Govaerts et al. (2007). The analysis of CLPP was started within 24 hours after sampling. Briefly, 10 g of fresh soil samples were shaken for 60 min with 90 mL of sterilized saline solution (0.85 % NaCl, w/v) and brought to a 10^{-3} final dilution. Each well of the Biolog EcoPlates was inoculated with 150 μL

from each extraction that included three replicates. The plates were incubated at 25°C in the dark for 196 hrs and read at 590 nm every 24 hrs. Data recorded at the exponential phase (120 hrs) were used to calculate the average well color development (AWCD) and Shannon index (H'). AWCD and H' represent the soil functional activity and diversity respectively.

2.5. Measurements of aphid parameters

A colony of *Aphis fabae* was initiated from a single apterous parthenogenetic female (provided in 2016 by the National Agricultural Research Institute of Colmar, France). The insects were maintained on faba bean (*Vicia faba*) inside ventilated plastic cages (360 x 240 x 110 mm) in growth chambers under controlled conditions (20 ± 1°C, 60 ± 5% relative humidity, and a 16L:8D photoperiod at 2 klux) to induce parthenogenesis. Twenty-four hours before the start of the aphid experiment, adult aphids were placed on *Vicia faba* leaves in 9 cm diameter Petri dishes containing agar. At T68 (week 10), nine aphid nymphs of *A. fabae* of less than 12 hours taken from the aphid culture were enclosed in 7 small clip cages (made from ventilated 3.5 cm diameter Petri dishes, attached to either side of a hair clip) placed on intermediately-aged leaves of each *P. vulgaris* plant. Every 24 hrs, the number of living and dead aphids were counted during one week. At T75 (week 11), the living aphids were collected, stored at -80°C and then lyophilized for C and N analyses (Flash EA 1112, Thermo Electron, Germany).

2.6. Data analysis

All statistical analyses were performed using R software v. 3.1.2 (R Development Core Team, <http://www.R-project.org>, 2014). For statistical analyses, the 31 Biolog substrates were both non-grouped into AWCD and H' and grouped into (1) phosphate carbon (2) amines, (3) amino acids, (4) polymers, (5) carboxylic acids, and (6) carbohydrates. In figures and tables, differences between treatments were performed by a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by a Conover post-hoc test ($p < 0.05$). Tests were performed using the PMCMR package (Pohlert et al., 2016). A Tukey test was performed using the “agricolae” package (Mendiburu, 2016). Values presented in figures and tables correspond to the average of three data ($n = 3$) ± standard error (S.E). The Cox model was used to compare the effects of treatments on the survival rate of aphid nymphs (*Aphis fabae*), depending on the number of days following bean (*Phaseolus vulgaris*) infestation, according to an ANOVA test. Values are means ($n=162$).

Correlations between environmental variables (soil parameters), plant and aphid performances were computed using Spearman's rank correlation coefficient (“Hmisc” package). A non-metric multidimensional scaling (NMDS) of the plot × plant and aphid responses matrix was employed to visualize the differences in the performance of the plant and aphid performances among treatments, in addition to the Bray-Curtis distance and the “vegan” package in R. To see how these compositional

differences were related to environmental variables, the significant impacting variables were subsequently fitted onto the NMDS ordination using the ‘envfit’ function in the “vegan” package (Oksanen et al., 2016). Soil, plant and aphid parameter data were analyzed using a two-way ANOVA with (i) glyphosate and (ii) fertilizer as factors.

3. Results

3.1. Negative effects of glyphosate and/or N fertilisation on soil enzymes and arbuscular mycorrhizal fungi

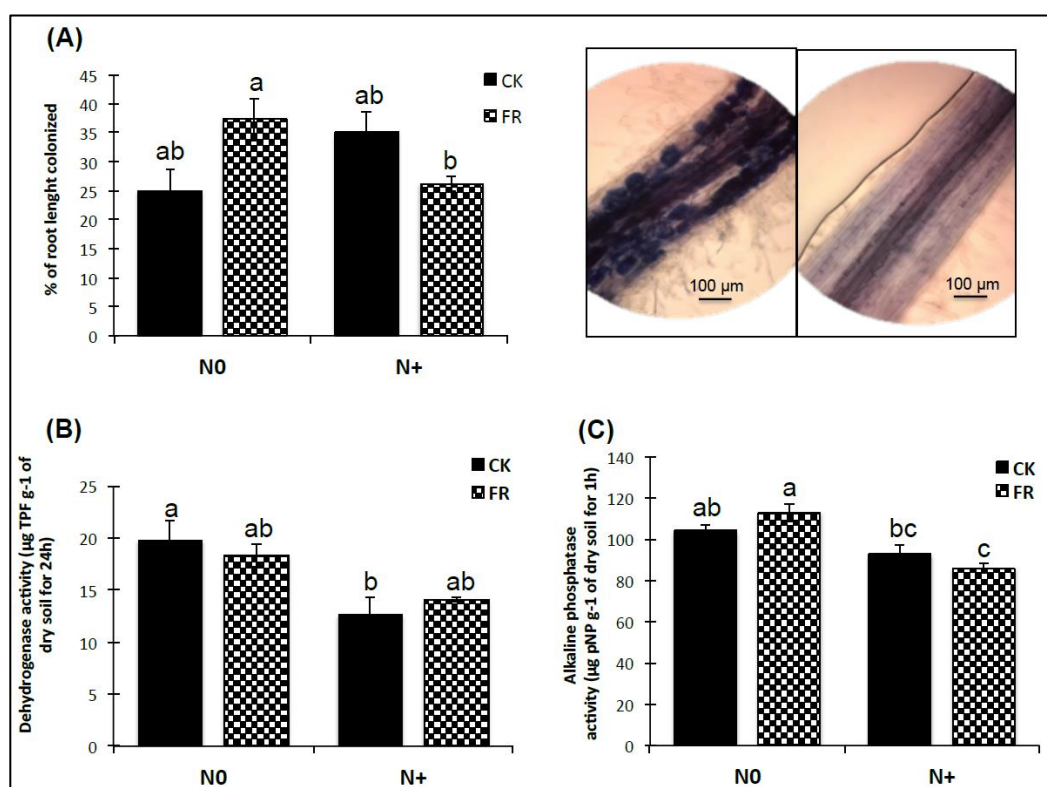


Fig.1. After 11 weeks (T75), effects of the glyphosate and nitrogen fertilizer applications on (A) percentage of root length colonized by arbuscular mycorrhizal fungi of soil collected from mesocosms without (control, CK) or with (field rate, FR) glyphosate herbicide and without (N-) or with (N+) nitrogen fertilizer application (inset shows a common bean root colonized (left photo) or not (right photo) by arbuscular mycorrhizal fungi), soil (B) dehydrogenase activity and, (C) alkaline phosphatase activity. Vertical bar represent mean values (n=3) ± SE. The vertical bars with different lower-case letters are significantly different from each other at $p < 0.05$ according to Conover test posthoc.

Soil enzyme activities and AMF were significantly affected by the different treatments (Fig. 1). For the field application rate of glyphosate (FR), we observed a significant increase ($p = 0.038$) in the percentage of root length colonized by AMF following growth of the bean plants in nitrogen-free soil (FR/N0), compared to the root length colonized following growth in fertilized (FR/N+) soil (Fig. 1A). There was a significant increase ($p = 0.040$) in the DH activity determined in untreated soil (CK/N0) compared to the activity in N fertilized soil, which had not been treated with glyphosate (CK/N+)

(Fig.1B) . There was a significant increase ($p = 0.024$) in AIP activity determined in non-fertilized soils that had received a FR dose of glyphosate, compared to N fertilized soils, irrespective of whether glyphosate had been applied. Also AIP activity was significantly greater in non-fertilized soils, which had not received treatment with glyphosate (CK/N0), compared to soils receiving both N fertilization and glyphosate (FR/N+) (Fig, 1C).

There was no effect of the different treatments on functional responses (AWCD, $p = 0.48$; H', $p = 0.37$) (data not shown).

3.2. Positive effects of glyphosate and/or N fertilisation on soil nutrient content, bean growth, and nutrient status of plant

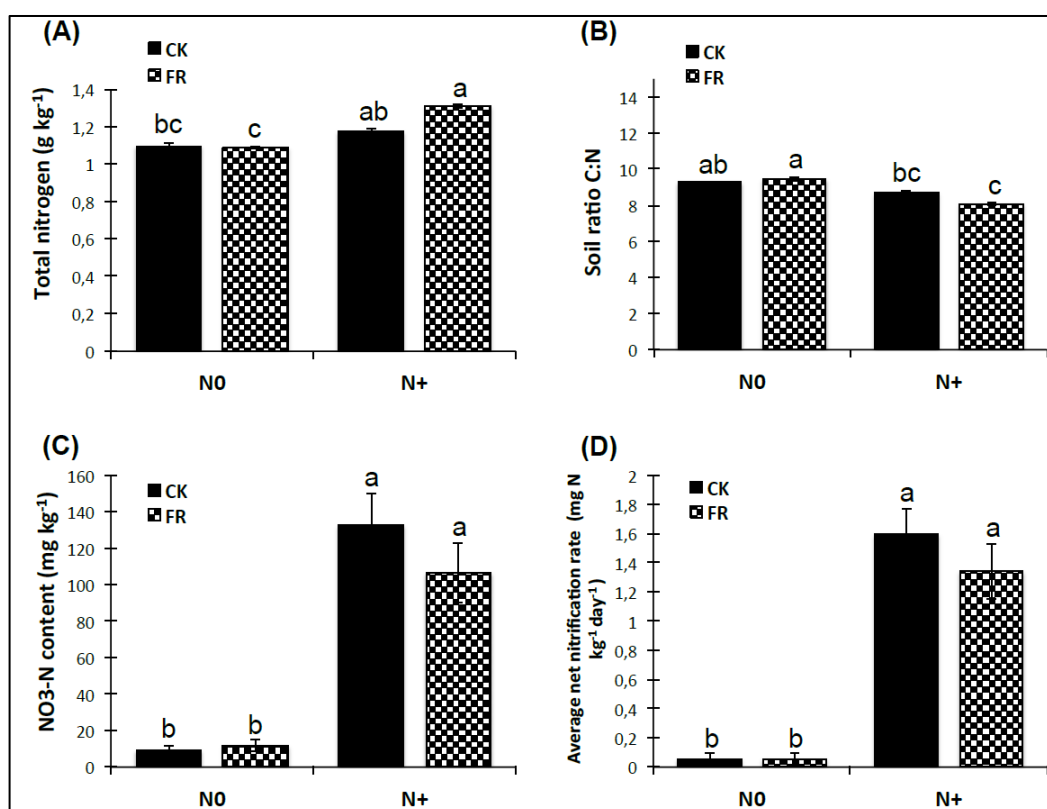


Fig. 2. (A) Total nitrogen content, (B) ratio soil C:N, (C) nitrate content and (D) average nitrification rate measured in soils collected from mesocosms without (control, CK) or with (field rate, FR) glyphosate herbicide and without (N-) or with (N+) nitrogen fertilizer application. Vertical bar represent mean values (n=3) ± SE. The vertical bars with different lower-case letters are significantly different from each other at $p < 0.05$ according to Conover test posthoc.

There were significantly higher levels of total nitrogen (TN) ($p = 0.015$) in soils receiving both fertilizer and glyphosate (FR/N+) compared to non-fertilized (N0) soils irrespective of whether glyphosate had been applied (CK or FR), and higher levels of N in CK/N+ soils compared with FR/N0 soils (Fig.2A). Fig. 2B shows exactly the inverse of Fig. 2A concerning the C:N ratio ($p = 0.014$). There were significantly higher levels of nitrate ($p = 0.024$) in soils that had been fertilized with N (CK/N+

and FR/N+), as compared to unfertilized soils (CK/N0 and FR/N0) (Fig.2C). There was a significant increase ($p = 0.024$) in the average net nitrification rate in fertilized soils (N+) compared to non-fertilized soils (N0), irrespective of whether glyphosate had been applied (CK or FR) (Fig.2D).

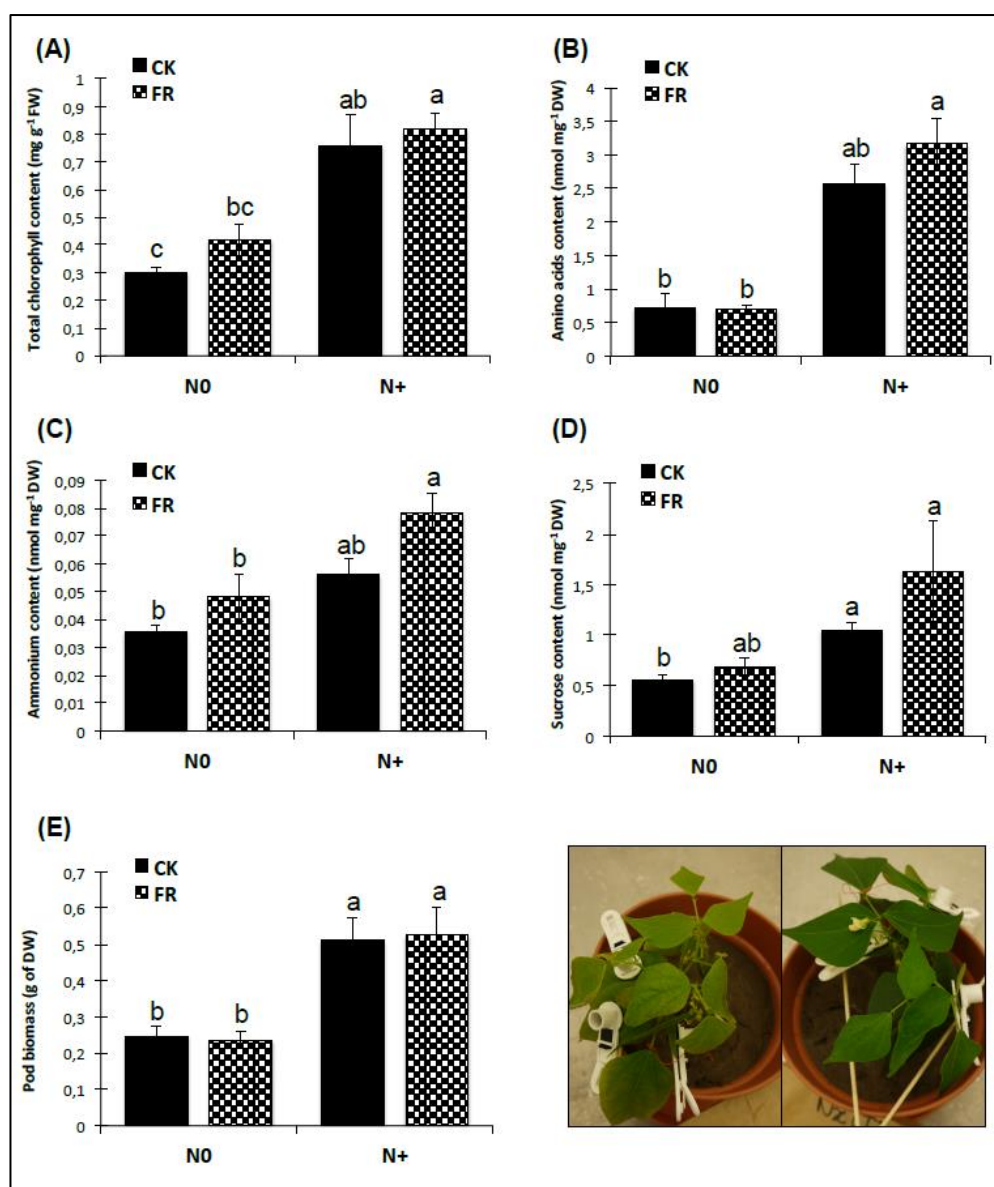


Fig. 3. Total chlorophyll content (Chlorophyll $a + b$; mg g⁻¹ FW) (B) amino acids, (C) ammonium, (D) sucrose, and (E) pod biomass measured in common bean collected from mesocosms without (control, CK) or with (field rate, FR) glyphosate herbicide and without (N-) or with (N+) nitrogen fertilizer application. Vertical bar represent mean values ($n=3$) \pm SE. The vertical bars with different lower-case letters are significantly different from each other at $p < 0.05$ according to Conover test posthoc. Inset shows two bean leaves with more (right photo) or less (left photo) of total chlorophyll content pigments.

Overall, plants that received both glyphosate and N fertilizer had significantly higher levels of total chlorophyll (Fig. 3A, $p = 0.022$), amino acids (Fig. 3B, $p = 0.025$), and ammonium (Fig. 3C, $p = 0.033$) compared to non-fertilized (N0) plants without or with the application of glyphosate (CK or FR).

Significantly higher levels of sucrose (Fig. 3D, $p = 0.047$) were found in plants that had received the N+ treatments (CK/N+ and FR/N+) compared to plants that did not receive either fertilization or glyphosate (CK/N0). Higher dry weights of bean pods were harvested from plants that had received nitrogen fertilization (CK/N+ and FR/N+) compared to non-fertilized plants (CK/N0 and FR/N0).

3.3. Positive effects of N fertilisation on survival rate of nymphs

The Cox model showed the significant difference between N0 and N+ fertilization ($p = 0.008$) (Fig. 4). The results showed no significant effect of glyphosate alone ($p = 0.820$) nor of a coupled effect of glyphosate and N fertilizer ($p = 0.750$) on the survival of the nymph aphids.

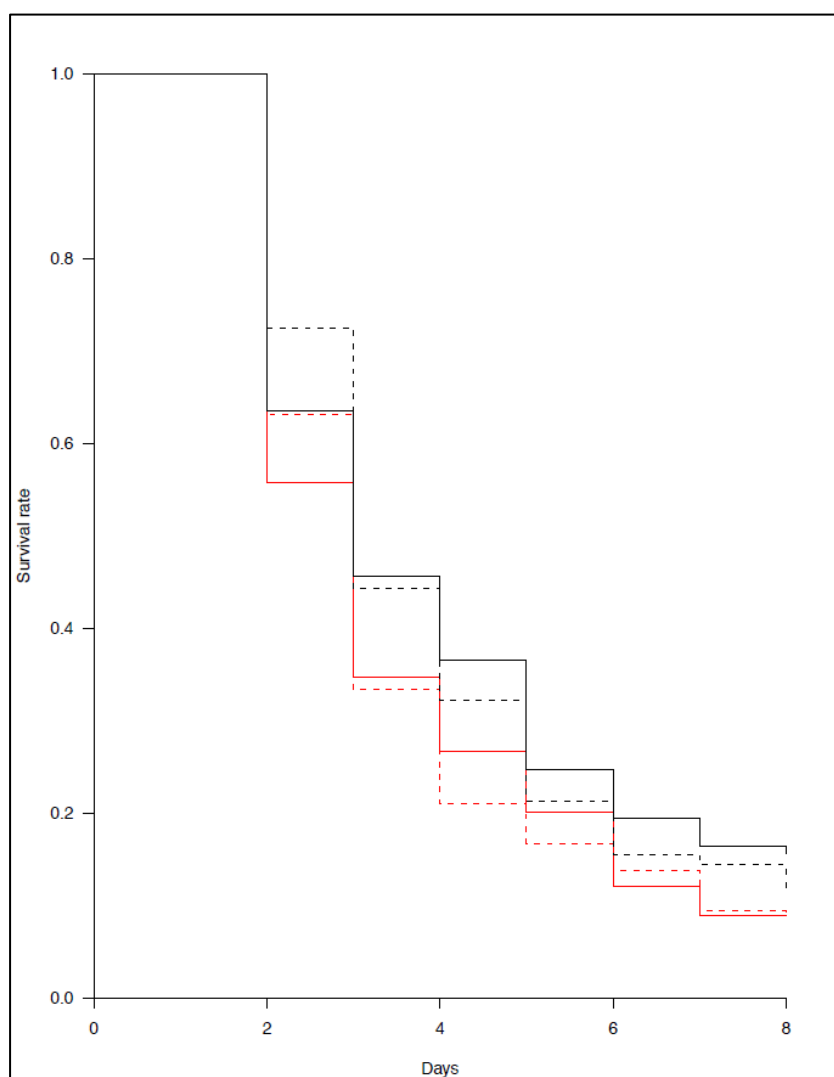


Fig. 4. Effect of glyphosate and/or N fertilisation on survival rate of aphid (*Aphis fabae*) nymph depending on the number of days following bean infestation of (*Phaseolus vulgaris*). In legend: black full line: CK/N+: without glyphosate\ with nitrogen fertilisation; Red full line: CK/N0: without glyphosate\ without nitrogen fertilisation; Black dotted line: FR/N+: with glyphosate\ with nitrogen fertilisation; Red dotted line: FR/N0: with glyphosate\ without nitrogen fertilisation.

3.4. Linking above-ground and below-ground interactions

Significant effects of glyphosate were found on the C:N ratio of the soil, the TN, and the ammonium content of the leaves (Table 1). Similarly, values of NIT, AIP, DH, C:N ratio of the soil, TN, CEC, NO_3^- and all above-ground parameters were significantly affected by N fertilization. Finally, significant effects of glyphosate and N fertilizer were determined on the microbial degradation of carboxylic acids, C:N ratio of the soil, TN, and AMF.

Overall, DH was positively correlated with AIP ($r^2 = 0.70, p < 0.01$) and C:N in soil ($r^2 = 0.75, p < 0.01$), and negatively correlated with NO_3^- ($r^2 = -0.90, p < 0.001$), NIT ($r^2 = -0.89, p < 0.001$), sucrose content ($r^2 = -0.74, p < 0.01$), and nymph survival ($r^2 = -0.77, p < 0.01$), while AIP was negatively correlated with pod biomass ($r^2 = -0.77, p < 0.01$), starch ($r^2 = -0.68, p < 0.05$), chlorophyll ($r^2 = -0.71, p < 0.01$), ammonium ($r^2 = -0.72, p < 0.01$), and amino acid content ($r^2 = -0.71, p < 0.01$) of plants (data not shown). Consistently, CEC was negatively correlated with AWCD ($r^2 = -0.66, p < 0.05$) and with the carboxylic acid degradation ($r^2 = -0.67, p < 0.05$), whilst amine degradation was positively correlated with TOC ($r^2 = 0.75, p < 0.01$). H⁺ was negatively correlated with total sugars ($r^2 = -0.66, p < 0.05$) and sucrose content ($r^2 = -0.71, p < 0.01$). TOC was only positively correlated with plant C ($r^2 = 0.68, p < 0.05$), aboveground biomass ($r^2 = 0.69, p < 0.01$), root biomass ($r^2 = 0.65, p < 0.05$), and total biomass ($r^2 = 0.67, p < 0.05$). Nitrate content, nitrification rate, and total nitrogen were positively correlated with plant nutrient status (plant C, plant N, sucrose, ammonium, amino acids) and yield of plant (pod biomass, aboveground biomass, root biomass), and negatively correlated with the C:N ratio in both the plant and the soil. The survival of aphid nymphs was positively correlated with NO_3^- ($r^2 = 0.75, p < 0.01$), NIT ($r^2 = 0.73, p < 0.01$), and negatively correlated with DH activities ($r^2 = -0.77, p < 0.01$).

The NMDS showed that only nitrogen fertilization had an overall effect on all parameters ($p=0.003$). Specifically, the N fertilized soils irrespective of the glyphosate treatments (CK/N+ and FR/N+) were characterized by an increase in the aboveground yield of the beans (total biomass, aboveground biomass, and pod biomass), and the concentrations of some plant nutrients (total sugar, starch, sucrose, chlorophyll, ammonium, amino acids, plant nitrogen, and plant carbon) and of nymph survival. In contrast, CK\N0 and FR\N0 were strongly separated from other treatments, and were characterized by an increase in root biomass, photosynthesis, plant and aphid C:N ratio. The first axis clearly divided N0 and N+ treated soils, probably initially due to the different responses of plants, AMF, and aphids between these treatments, and secondly due to a positive correlation with AIP ($p < 0.05$) activity, DH activity, soil C:N ratio ($p < 0.01$). Conversely, N+ treatment was correlated positively with TN and NO_3^- content ($p < 0.01$) (Fig. 5).

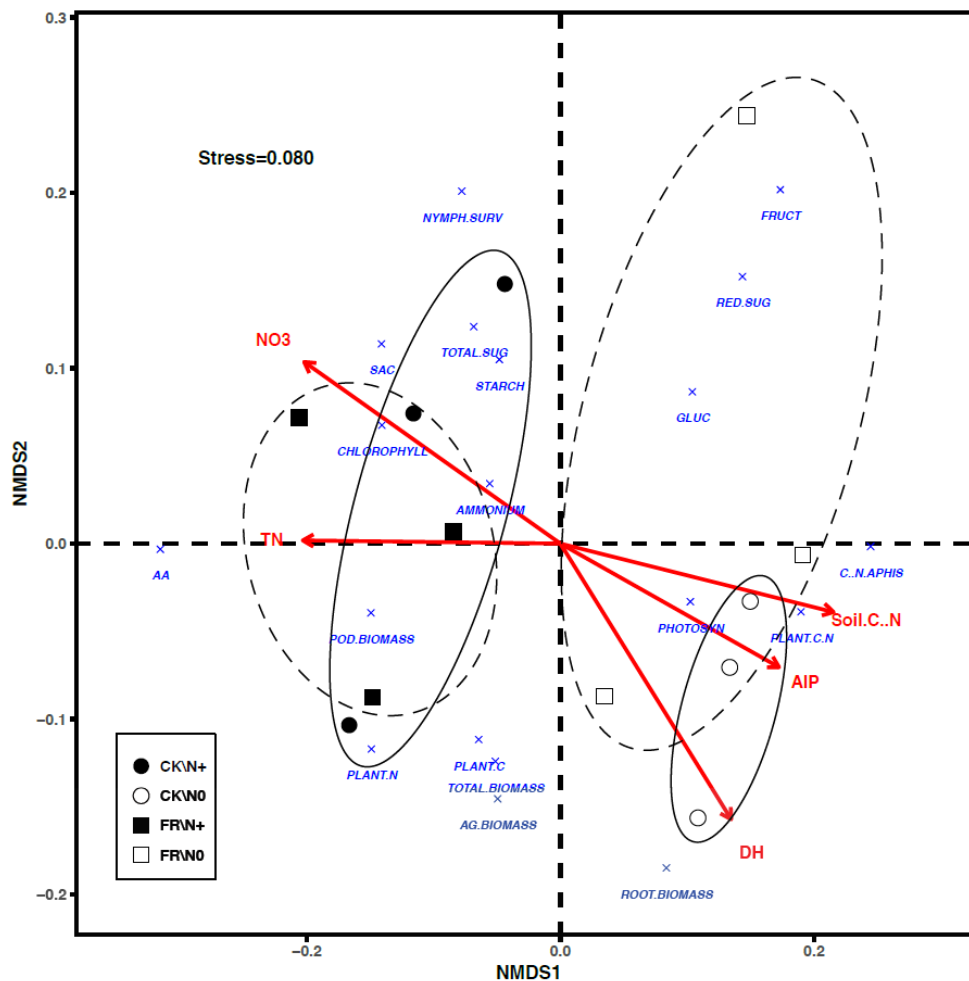


Fig. 5. NMDS diagram defined by the first two axes showing the ordination of the 12 plots (4 treatments × 3 replicates) and 20 plant and aphid parameters. Only environmental variables significantly fitting onto NMDS axes are shown ($p < 0.05$). NYMPH. SURV: survival rate of nymph aphid; TOTAL.SUG: leaf total sugar content; STARCH: leaf starch content; SAC: leaf sucrose content; CHLOROPHYLL: leaf chlorophyll content; AMMONIUM: leaf ammonium content; AA: leaf amino acid content; POD.BIOMASS: plant pod biomass; PLANT.C: plant carbon content; PLANT.N: plant nitrogen content; TOTAL.BIOMASS: plant total biomass; AG.BIOMASS: plant aboveground biomass; ROOT.BIOMASS: plant root biomass; PHOTOSYN: plant photosynthesis; PLANT.C.N: ratio plant C:N; GLUC: leaf glucose content; RED.SUG: leaf reducing sugars content; FRUCT: leaf fructose content; C.N.APHIS: aphid ratio C:N; NO₃: soil nitrate content; TN: soil total nitrogen; DH: soil dehydrogenase activity; AIP: soil alkaline phosphatase activity; Soil.C..N: ratio soil C:N. CK\N+: without glyphosate\with nitrogen fertilisation; CK\N0: without glyphosate\without nitrogen fertilisation; FR\N+: with glyphosate\with nitrogen fertilisation; FR\N0: with glyphosate\without nitrogen fertilisation.

4. Discussion

Overall, the results show that in soils that have not been subjected to N fertilization, there were increases in microbial activities, regardless of the application of glyphosate. However when N fertilization and glyphosate were combined, there was a reduced effect on belowground activities. Conversely, in soils that had been fertilized with N, there was an increase in the nitrogen nutrients in the soil, the primary metabolites of the plants and also the survival of the aphid larvae. Glyphosate combined

with N fertilization had a neutral or synergistic effect on the wide range of belowground and aboveground parameters discussed below.

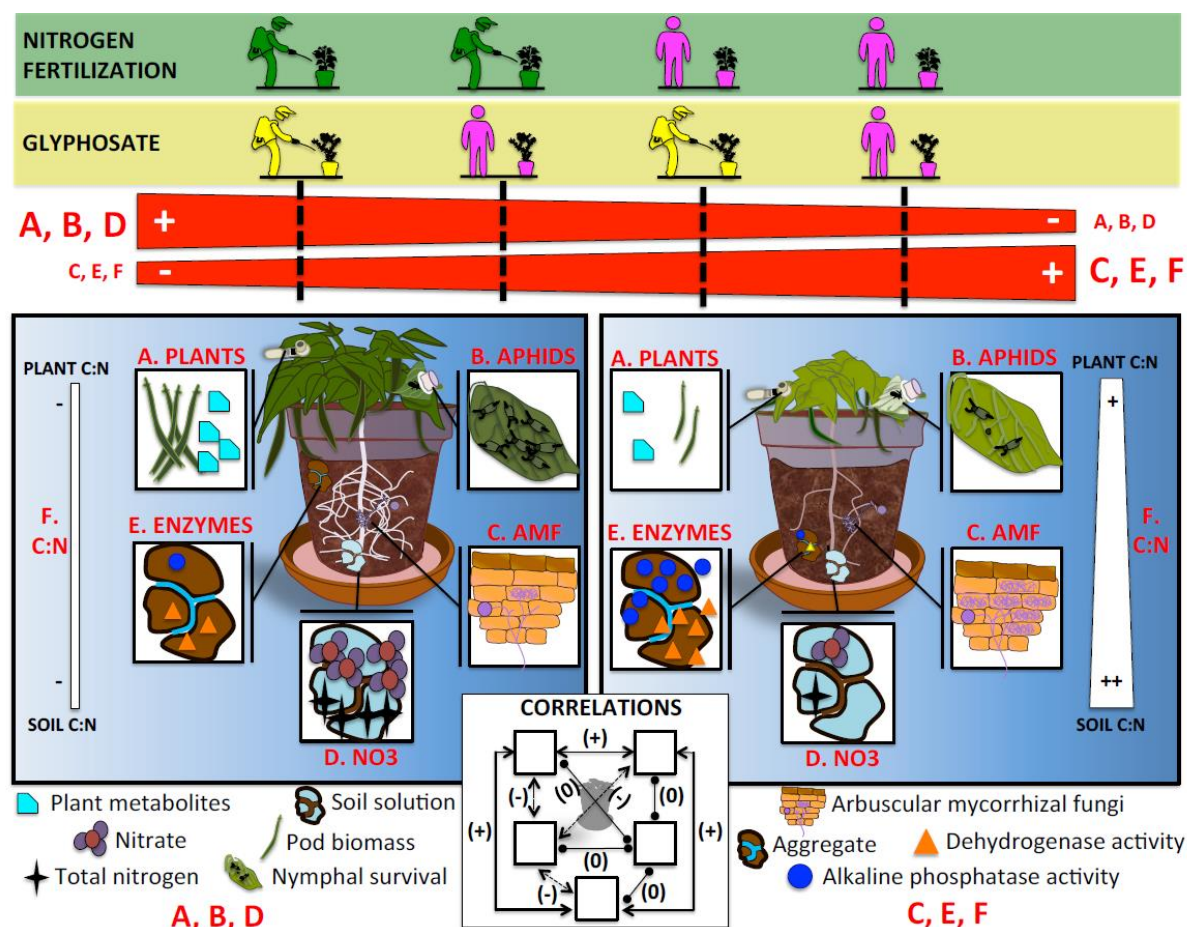


Fig. 6. The two rectangles summarize the effects of glyphosate and/or nitrogen fertilisation on soil, plant and aphid parameters. The square in the bottom center of the figure represents the links between the aboveground and belowground interaction: (0) no correlation; (+) positive correlation; (-) negative correlation. In legend: the color pictograms representing personages and plants symbolize the treatments as follow: yellow color: glyphosate, green color: nitrogen fertilisation, pink color: water. Abbreviations in figure: P: Phosphorus, C: carbon, N: nitrogen, C/N -: low C:N ratio, C/N +: high C:N ratio, C/N ++: highest C:N ratio, AMF: Arbuscular Mycorrhizal Fungi.

4.1. Effects of chemical inputs on below- and above-ground parameters

4.1.1. Effects of nitrogen fertilisation

As shown in Table 1 and Fig. 1, nitrogen (N) fertilization did not affect AMF. These results disagree with other studies which have shown that N fertilization can reduce root colonization by AMF (Egerton-Warburton and Allen, 2000; Verzeaux et al., 2016), but this depends on several factors especially host specificity, and soil N:P ratio (Johnson et al., 2003). By contrast, soil enzyme activities (dehydrogenase (DH) and alkaline phosphatase (AIP)) were negatively affected by N fertilization. In agreement with other research, N fertilization has been shown to inhibit both the DH activity (Shen et al., 2010) and the AIP activity (Ajwa et al., 1999; Shen et al., 2010; Kalembasa and Symanowicz, 2012).

These results suggest that these two enzymes can be used as indicators of ecological changes caused by N fertilization and management practices, as supported by research by Ajwa et al. (1999).

Table 1. Analysis of variance for soil (microbial and chemical), plant and aphid properties as affected by glyphosate (G), or fertilizer (F) and their interactions (G × F).

| BELOW-GROUND PARAMETERS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|------------------------------|-----------------|---------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------|------------------------------|-----------------|---------------|---------------|-------------|
| Treat-ments | NIT | AIP | DH | CARB. ACIDS | SOIL C:N | TN | CEC | NO3 | AMF | | | |
| G | 0.385 | 0.838 | 0.943 | 0.984 | 0.0290 * | 0.000449 *** | 0.0771 | 0.358 | 0.728 | | | |
| F | 5.67.10 ⁻⁷ *** | 0.000323 *** | 0.00195 ** | 0.681 | 1.04*10 ⁻⁶ *** | 1.04*10 ⁻⁶ *** | 0.0453 * | 1.95*10 ⁻⁵ *** | 0.712 | | | |
| G * F | 0.415 | 0.052 | 0.303 | 0.0234 * | 0.00196 ** | 0.000345 *** | 0.152 | 0.152 | 0.00651 ** | | | |
| ABOVE-GROUND PARAMETERS | | | | | | | | | | | | |
| | NYMPH SURV | T. BIOM | POD BIOM | AA | AMMO-NIUM | STARCH | T. SUGARS | SAC | CHL. | PLANT C:N | PLANT N | PLANT C |
| G | 0.760 | 0.669 | 0.968 | 0.345 | 0.0267 * | 0.0722 | 0.154 | 0.280 | 0.246 | 0.267 | 0.423 | 0.575 |
| F | 0.0453 * | 0.0297 * | 0.00114 ** | 5.11*10 ⁻⁵ *** | 0.00272 ** | 0.0183 * | 0.0342 * | 0.044 * | 0.000152 *** | 0.00162 ** | 0.00930 ** | 0.0177 * |
| G * F | 0.139 | 0.304 | 0.815 | 0.339 | 0.469 | 0.0871 | 0.571 | 0.505 | 0.692 | 0.940 | 0.432 | 0.330 |

Stars represent significance level according to ANOVA (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001). NIT: average nitrification rate, AIP: alkaline phosphatase activity, DH: dehydrogenase activity, CARB. ACIDS: microbial degradation of carboxylic acids, SOIL C:N: ratio soil C:N, TN: total nitrogen, CEC: cation exchange capacity, NO3-: soil nitrate content, AMF: arbuscular mycorrhizal fungi, NYMPH SURV: survival rate of nymph aphid, T. BIOM: plant total biomass, AA: leaf amino acid content, AMMONIUM: leaf ammonium content, STARCH: leaf starch content, T.SUGARS: leaf total sugar content, SAC: leaf sucrose content, CHL: leaf chlorophyll content, PLANTC:N: ratio plant C:N, PLANT N: plant nitrogen content, PLANT C: plant carbon content.

This study demonstrated the positive effect of N fertilization on nitrification, soil nutrient content such as nitrates (NO₃⁻), total nitrogen (TN) (Fig. 2), plant nutrient status (amino acids, total sugars, sucrose, chlorophyll, plant carbon (C), plant N, starch, ammonium), and plant yield (total biomass, pod biomass, aboveground biomass) (Fig. 3). The increase in nutrient levels in leaves by the addition of nitrogen may increase carbon flow to the roots and promote chemoorganotrophs capable of degrading the organic matter of the soils (Moreira and Siqueira, 2006). In addition, N fertilization stimulated an increase in the NO₃ content of the soil, which has been shown to be a major pathway of N nutrition for soybeans (Nelson et al., 1984).

There was a positive effect of N fertilization on the survival of aphid nymphs (Fig. 4). These results are consistent with some studies showing that the response of aphids to an increase in N was positive. Other studies are consistent with our results and have shown that N fertilizer use can have an impact on insect populations directly through at least two pathways in crop plants: nutritional status and

plant defense. An improved nutritional status of plants can enhance insect population growth (Awmack and Leather, 2002) because N is a macronutrient known to be limiting for phytophagous insects (Behmer, 2009).

4.1.2. Effects of glyphosate

After 11 weeks (T75), AMF, which are ecologically and physiologically important to many plant communities, were not affected by the application of glyphosate (Table 1). These results are inconsistent with Druille et al. (2013) who have shown that individually, glyphosate can reduce root colonization by AMF. These contrary results can be explained by several factors including application rates, growth stage of the crop and application site of glyphosate (Malty et al., 2006). Indeed Druille et al., 2013 have shown that the direct application of glyphosate at the field rate to the soil results in a lower reduction of the arbuscules compared to an indirect application of glyphosate to the foliage of plants, and it is the direct application that was carried out in this study. These results also show that glyphosate applied alone had no effect on plant C metabolites, thus limiting the potential of modifying plant-fungal communication. In addition, enzymatic activities were not affected by the application of glyphosate. In agreement with other studies, we suggest that the field rate used is insufficient to have an effect on the activities of DH and AIP (Ratcliff et al., 2006).

The application of glyphosate affected the TN content and the C:N ratio of the soil, as well as the ammonium (NH_4^+) content of the plants (Table 1). Glyphosate can affect processes of the N cycle that are mediated by the microbiota and can change the metabolism of N inside the plant, depending on the transformations of nitrogen by soil microbes (Grossbard, 1985; Haney et al., 2002). For instance, it was shown that the herbicide ammonium glufosinate inhibits the incorporation of NH_4^+ in organic compounds and causes a build-up of ammonium content in plant tissue. A part of the accumulated NH_4^+ can be exuded through the roots (Damin and Trivelin, 2011). Our results agree with the literature, which is why we suggest that glyphosate increased the TN content of the soil leading to a decrease of the incorporation of NH_4^+ -N into amino acids in the plant tissues. Then, a greater exudation of this ion by the roots may decrease the soil C:N ratio. The overall decrease in TN and TOC (total organic carbon) observed in the Supplementary Fig. 1 between 14 and 75 days following herbicide application may be explained by an increased mineralization of organic material under high temperature and frequent soil humidification in the mesocosm (Mikha et al., 2005; Fontaine et al., 2011).

There was no effect of glyphosate on biomass and yield of beans and on aphid performance. Our results are in disagreement with other studies (Lipok, 2009; Saska et al., 2016). Indeed, Lipok (2009) reported that *Aphis fabae* reproduction was reduced when aphids were reared on plants (*Faba bean*) sprayed by the field dose of glyphosate, indicating systemic effects of the herbicides on the aphids. The previous disagreements may be explained by the contrasted glyphosate application patterns. In our study, glyphosate has been applied to the soil 75 days before aphid performance measurements.

Therefore, the available literature does not provide sufficient data for understanding the indirect consequences of glyphosate on pests.

4.1.3. Combined effects of nitrogen and glyphosate

The combined applications of N fertilizer and glyphosate inhibited only AMF, but also increased the microbial degradation of carboxylic acids. Our results therefore suggest that the combination of N and glyphosate, as well as the inhibition of the phosphatase alkaline activity, may lead to a reduction in the percentage of arbuscules, the main place for nutrient exchanges with the host plant (Smith and Gianinazzi-Pearson, 1988) and may impact upon plant community function as well (Hayman, 1982). The stabilization of phosphorus levels and the increase of total nitrogen and nitrates under glyphosate plus N fertilization indicates an imbalance between nitrogen and soil phosphorus, two important elements controlling the AMF community response (Egerton-Warburton and Allen, 2007).

To summarize (Fig. 6), the combination of agrochemicals can have antagonistic, neutral or synergistic effects on the belowground and aboveground parameters. Indeed, the results show that N fertilizer plus glyphosate can have an antagonistic effect on AMF, AIP and the soil ratio C:N; a neutral effect on DH activity, NO₃ content, nitrification and sucrose content and a synergistic effect on TN, total chlorophyll, amino acids, ammonium and pod biomass. The interactions between the belowground and aboveground parameters are discussed in the following section. Changes in belowground microbial activities may modulate both plant nutrient acquisition, plant biomass, and the performance of aboveground herbivores through bottom-up processes (Fig. 6).

4.2. Belowground and aboveground linkages with nitrogen fertilization and glyphosate applications

4.2.1. Interactions between soil and plant physiology

The correlations between all parameters (data not shown) and NMDS (Fig. 5) highlight the important contribution of a N fertilizer compared to the contribution of glyphosate on certain soil variables (TN, NO₃, C:N ratio) as well as on soil enzyme activities (DH and AIP) and the differentiated consequences that this may have on the performance of plants.

The Fig. 2, Fig. 3, and Fig. 5 show that the addition of N fertilizer led, after 11 weeks (T75), to a significant increase in the levels of soil TN, NO₃, and nitrification rates. These increases stimulated a greater synthesis of nutrients (sucrose, starch, amino acids, chlorophyll, and ammonium) required for plant growth and biomass (aboveground, pod) production. In parallel with our results, Winter and Rostàs (2010) showed that photosynthetic efficiency, leaf N, and soluble protein content were significantly decreased in N deficient plants, whereas root biomass was increased. Streeter (1972) showed that the activity of nitrate reductase increased during the pod-filling stages in connection with an increase of nitrate in the soil. In the N⁺ treated plants, NO₃⁻ assimilation has constituted an important role in N

nutrition by providing the N complement required by plant growth. Our results suggest that the increase in TN in fertilized soils is derived from the assimilation and metabolism of N into the microbial biomass (Kuzyakov and Xu, 2013).

Interestingly, Fig. 5 showed that the absence of N fertilization led to increased enzyme activities (DH and AIP) and to an increase in the C:N ratio, parameters negatively correlated with nitrate levels, soil nitrification and certain physiological traits of the plant (pod biomass, amino acids, chlorophyll, and ammonium). These results are in agreement with Akmal (2012) who showed that enzymatic activities were negatively correlated with nitrate levels in soil. Moreover, it has been shown that a decrease in the levels of inorganic N in soils may lead to greater interspecific competition between soil microorganisms and plant roots (Kuzyakov and Zu, 2013), thus reducing the accessibility of plants to nutrient resources. In agreement with other studies, we showed that the increase in the C:N ratio could improve enzyme activities and promote nutrient retention, and thus reduces the availability of N for the plant (Heijboer et al., 2016), because C availability is known as a limiting factor for microbial growth (Wardle, 1992). Ajwa et al. (1999) showed a link between the activities of DH and the C input via root mass, which could be at the origin of the improvement of the microbial activities. Our results partially corroborate the study of Ajwa et al. (1999), as the data show a positive correlation between amine degradation by microorganisms and root biomass (Fig.5; $r^2 = 0.61$). In addition, the absence of N fertilizer allowed for an expansion of the plant root system and an increase in the enzyme activities.

In connection with a study carried out by Kalembasa and Symanowicz (2012), we suggest that the high values of biochemical indicators (enzymes activities, AMF) in soils having received a very low dose of N input (N0) may have maintained the trophic balance between microbial activities (soil enzymes, AMF) and plant roots. In the long term this balance could be favorable to the ecological stability of unfertilized agrosystems.

We can note that the low dose of glyphosate added more than 90-days before the final measurements did not induce major significant differences between the different treatments. Even if we accept that the addition of glyphosate to unfertilized soils can promote the synthesis of some carbon-rich sugars (glucose, fructose) and chlorophyll, it is detrimental for other nutrients rich in nitrogen (amino acids, ammonium) and thus contributes to a significant loss of bean biomass (Roth, 2009; Zilli et al., 2009). These authors have demonstrated that glyphosate application has been shown to strongly reduce root nodulation and thus nitrogen acquisition of the bean plant. Contrary to our hypotheses, we have seen no positive effect of microbial activities (DH, AIP, AMF, CLPP) on plant nutrient acquisition, plant biomass, or soil N content.

4.2.2. Interactions between soil, plant physiology and aphid performance

N fertilization alone or with glyphosate lead to an increase in soil nutrient content and the immediate availability of nitrate for plants. The consequences were a decrease in microbial activities and an increase in aerial biomass and primary plant metabolites suggesting an increase in appetite and therefore pressure of herbivores. Numerous studies have shown that mycorrhizal fungi associated with plants may alter above-ground interactions between plants and herbivores (Vanette & Rasmann, 2012). In our study, the reduction in the amount of AMF did not affect the performance of the aphids but N fertilization altered the plant-aphid relationship independent of any indirect consequences on AMFs. Our results are consistent with Koschier et al. (2007), who showed that cucumber root colonization by AMF did not affect host acceptance and development of another piercing/sucking insect, the thrips species *Frankliniella occidentalis*.

The data presented in Fig. 5 show the interactions between plant physiology and nymph survival. Compared to unfertilized pots, the increase of soil TN and nitrification of the soil, as well as increased plant nutrient status in fertilized pots led to enhanced nymph survival. Other research has agreed with our results, as Mahdavi-Arab et al. (2014) found that aphid performance increased with higher plant biomass and depended upon plant growth conditions, while Bogaert et al. (2016) reported that N fertilization was related to increased aphid performance through improvement of plant nutrient status. The nutrient status can be related to the availability of dietary N (free amino acids) in the phloem, a limiting factor for aphids growth and reproduction (Dixon 1998).

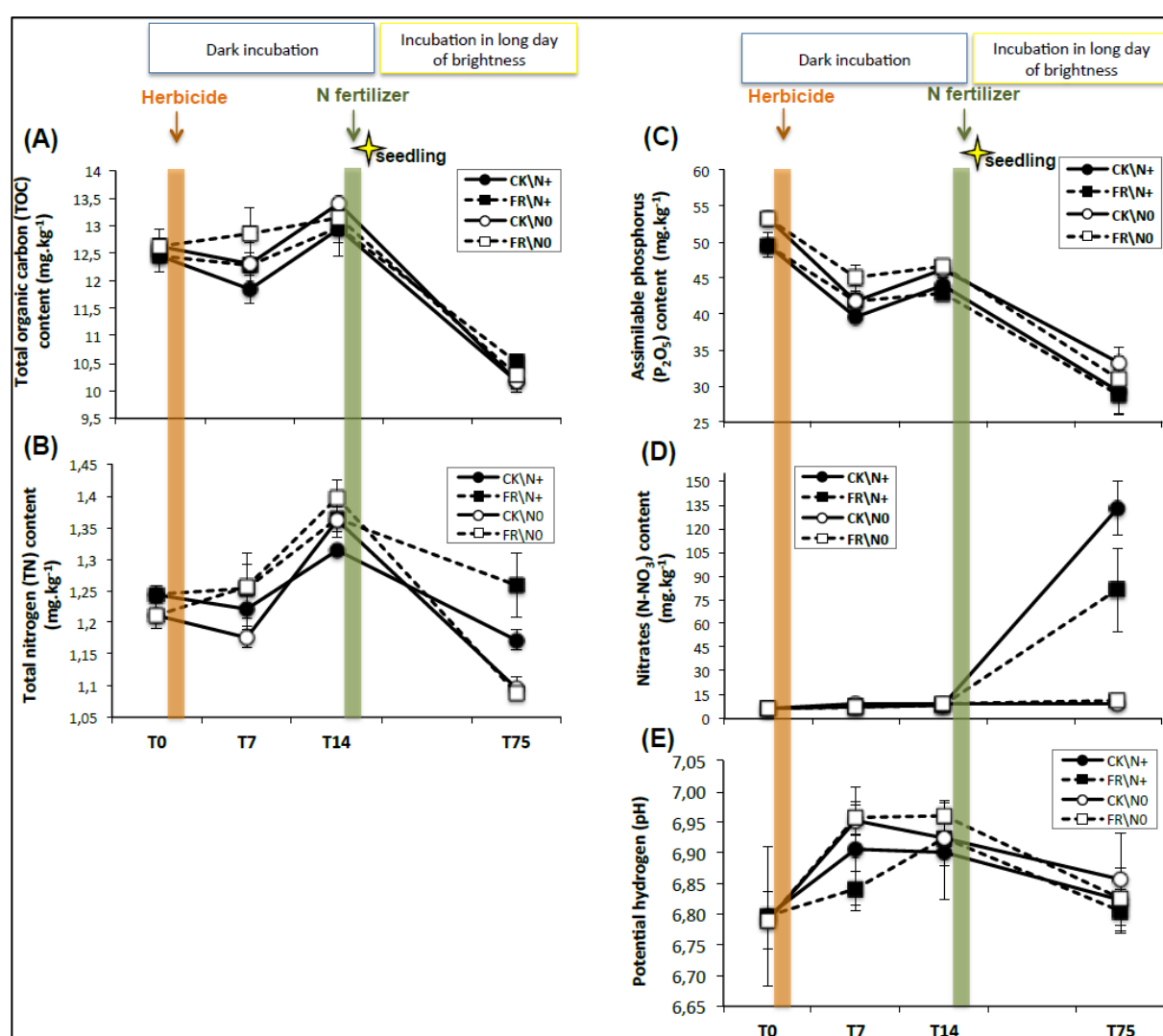
The result presented here show a bottom-up effect, as the increase in the C:N ratio of the soil is itself correlated with the increase in the C:N ratios of the plant and of the aphids. Thus limiting N in the soil (high C:N) may limit the acquisition and remobilization of N in the plant and the aphid that feeds on it (high C:N). Indeed, improved plant nutritional quality such as increased leaf N content (i.e. decreased C:N ratio) has been reported to induce higher herbivore development (Awmack and Leather, 2002; Zehnder and Hunter, 2008) and population growth rate (Gratton and Denno, 2003).

Thus, our results confirmed that N fertilization plays a central role in bottom-up relationships by creating an imbalance between the C and N levels of soil, which is detrimental to soil enzyme activities, but does not lead to a decrease in the performance of plants and aphids. There is no evidence of a link between soil enzyme activity and, subsequent aphid performance.

5. Conclusion

In agriculture, crop productivity enhancement through the use of synthetic fertilizers and pesticides has often been over-emphasized, neglecting the potential services ensured by bottom-up interactions from the soil. In the present study, we have observed: (1) no effects of N fertilization on belowground microbial parameters such as soil functional activity (AWCD), functional diversity (H' index); (2) negative effects on enzyme activities (DH, AIP) and AMF, with neutral and antagonist effects

when N fertilization were applied in combination with glyphosate. Conversely, our results demonstrated increased levels of belowground (total nitrogen, nitrate content) and aboveground (plant metabolites, yield and nymph survival of the herbivorous *Aphis fabae*) following N application to the soil, with neutral or synergetic effects when N was applied in combination with glyphosate. Thus, it seems that there exists both belowground and aboveground linkages between nitrogen fertilization and glyphosate applications. The diversity of organic inputs through mixed cover crop residues and the improvement of AMF cycle through the supply of permanent living roots must be assessed in further research to develop new agricultural practices that prevent soils from deleterious effects of intensive chemical inputs.



Supplementary Fig. 1: Environmental soil before and after the application of glyphosate and nitrogen fertilizer (Black round and solid line: CK\N+, without herbicide \ with N fertilisation; Black square and dashed line: FR\N+, with herbicide \ with N fertilisation; White round and solid line: CK\N-, without herbicide \ without N fertilisation; White square and dashed line: FR\N-, with herbicide \ without N fertilisation). (A) total organic carbon, (B) total nitrogen, (C) available phosphorus content, (D) nitrate content and (E) potential hydrogen (N=3, mean±SE). Orange band marks period of herbicide application; green band marks period of N fertilizer application; Yellow star marks the date of sowing.

| Parameters | N fertilization | Glyphosate herbicide | Days after application | | | |
|---|-----------------|----------------------|------------------------|-------|-------|-------|
| | | | T0 | T7 | T14 | T75 |
| Glyphosate ($\mu\text{g kg}^{-1}$ D.M) | N+ | CK | < 40 | < 40 | < 40 | < 40 |
| | | FR | < 960 | < 800 | < 300 | < 145 |
| | N0 | CK | < 40 | < 40 | < 40 | < 40 |
| | | FR | < 960 | < 400 | < 400 | < 150 |
| AMPA ($\mu\text{g kg}^{-1}$ D.M) | N+ | CK | < 60 | < 60 | < 60 | < 60 |
| | | FR | < 100 | < 100 | < 200 | < 200 |
| | N0 | CK | < 40 | < 40 | < 50 | < 50 |
| | | FR | < 100 | < 100 | < 100 | < 150 |

Supplementary Fig. 2: Concentrations of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) measured in soils collected from mesocosms without (control, CK) or with (field rate, FR) glyphosate herbicide and without (N-) or with (N+) nitrogen fertilizer application. These analyses were performed at the four times of growth in the mesocosm: 0, 7, 14 and 75 days.

Acknowledgements

Research in this work is part of the collaborative project VEGESOL funded by Bonduelle and Syngenta companies in partnership with the University of Picardy Jules Verne. Guillaume Chenu is thanked for its technical assistance. Laurent Gutierrez and Hervé Demailly from the Regional Center of Molecular Biology Resources are thanked for having allowed the access to the mesocosm room. Nicole Bochet of the National Institute for Agronomic Research (INRA) of Colmar is thanked for providing the clones of *Aphis fabae*. Lyla Rotschild is thanked for her language review of the manuscript. Prof. Peter J. Lea is thanked for its critical reading of the manuscript. The Ph.D. studies of Elodie Nivelles are funded by a scholarship from the French Ministry of Higher Education and Research.

References

- Ahtiainen, J.H., Vanhala, P., Myllymaki, A., 2003. Effects of different plant protection programs on soil microbes. *Ecotox. Environ. Safe.* 54, 56-64.
- Ajwa, H.A., Dell, C.J., Rice, C.W., 1999. Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soil as related to burning and nitrogen fertilization. *Soil Biol. Biochem.* 31, 769–777.
- Akmal, M., Altaf, M.S., Hayat, R., Hassan, F.U., Islam, M., 2012. Temporal changes in soil urease, alkaline phosphatase and dehydrogenase activity in rainfed wheat field of Pakistan. *J. Anim. Plant*

- Sci., 22(2), 457–462.
- Awmack, C.S., Leather, S.R., 2002. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 817–844.
- Bardgett RD & Wardle DA (2010) *Aboveground–Belowground Linkages, Biotic Interactions, Ecosystem Processes, and Global Change*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Barnard, R., Barthes, L., Leadley, P.W., 2006. Short-term uptake of 15 N by a grass and soil microorganisms after long-term exposure to elevated CO₂. *Plant Soil.* 91–99. doi:10.1007/s11104-005-2553-4
- Behmer, S.T., 2009. Insect Herbivore Nutrient Regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 165-187. doi:10.1146/annurev.ento.54.110807.090537
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F., Stork, H., 1974. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1196-1201; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London.
- Birkhofer, K., Bezemer, T.M., Bloem, J., Bonkowski, M., Christensen, S., Dubois, D., Ekelund, F., Fließbach, A., Gunst, L., Hedlund, K., Mader, P., Mikola, J., Robin, C., Setälä, H., Tatin-Froux, F., Van der Putten, W.H., Scheu, S. 2008. Long-term organic farming fosters below and aboveground biota: Implications for soil quality, biological control and productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2297-2308.
- Bogaert, F., Chesnais, Q., Catterou, M., Rambaud, C., Doury, G., Ameline, A., 2017. How the use of nitrogen fertiliser may switch plant suitability for aphids: the case of *Miscanthus*, a promising biomass crop and the aphid pest *Rhopalosiphum maidis*. *Pest Manag. Sci.* 73, 1648–1654. 10.1002/ps.4505.
- Bott, S. et al. (2011) Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilized by phosphate fertilization. *Plant Soil.* 342, 249–263.
- Carlisle, S.M., Trevors, J.T., 1986. Effect of the herbicide glyphosate on respiration and hydrogen consumption in soil. *Water, Air, Soil Pollut.* 27, 391–401.
- Casida, L., Klein, D., Santoro, T., 1964. Soil Dehydrogenase Activity. *Soil Sci.* 98, 371-376.
- Ciesielski, H., Sterckeman, T., Santerne, M., Willery, J., 1997. A comparison between three methods for the determination of cation exchange capacity and exchangeable cations in soils. *Agronomie EDP sci.* 17 (1), 9-16.
- Damin, V., Trivelin, P., 2011. *Herbicides Effect on Nitrogen Cycling in Agroecosystems, Herbicides and Environment*, Dr Andreas Kortekamp (Ed.), ISBN: 978-953-307-476-4
- De Mendiburu, F., 2016. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. Version 1.2-4. <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu>
- Demoling, F., Figueroa, D., Ba, E., 2007. Comparison of factors limiting bacterial growth in different

- soils. *Soil Biol. Biochem.* 39(10), 2485-2495. doi:10.1016/j.soilbio.2007.05.002
- Dixon, A.F.G., 1998. *Aphid Ecology: An Optimization Approach*. Chapman & Hall, U.K.
- Druille, M., Omacini, M., Golluscio, R.A., Cabello, M.N., 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi are directly and indirectly affected by glyphosate application. *Appl. Soil Ecol.* 72, 143–149. doi:10.1016/j.apsoil.2013.06.011
- Egerton-Warburton, L.M., Allen, E.B., 2000. Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along an anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecol. Appl.* 10(2), 484-496. doi:10.1890/1051-0761(2000)010
- Egerton-Warburton, L.M., Johnson, N.C., Allen, E.B., 2007. Mycorrhizal community dynamics following nitrogen fertilization: a cross-site test in five grasslands. *Ecol. Monogr.* 77(4), 527–544.
- Feng, P.C.C., Baley, G.J., Clinton, W.P., Bunkers, G.J., Alibhai, M.F., Paulitz, T.C., Kidwell, K.K., 2005. Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17290–17295.
- Fontaine, S., Henault, C., Aamor, A., Bdioui, N., Bloor, J.M.G., Maire, V., Mary, B., Revaillet, S., Maron, P.A., 2011. Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biol. Biochem.* 43, 86–96.
- Gange, A.C., Lindsay, D.E., Ellis, L.S., 1999. Can arbuscular mycorrhizal fungi be used to control the undesirable grass *Poa annua* on golf courses? *J Appl. Ecol.* 36, 909–919.
- Garratt, M.P.D., Leather, S.R., Wright, D.J., 2010. Tritrophic effects of organic and conventional fertilisers on a cereal-aphid-parasitoid system. *Entomol. Exp. Appl.* 134, 211-219.
- Garrido, E., Bennett, A.E., Fornoni, J., Strauss, S.Y., 2010. Variation in arbuscular mycorrhizal fungi colonization modifies the expression of tolerance to above- ground defoliation. *J Ecol.* 98, 43-49.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167, 35–120.
- Gimsing, A.L., Szilas, C., Gimsing, A.L., Szilas, C., Borggaard, O.K., 2007. Sorption of glyphosate and phosphate by variable-charge tropical soils from Tanzania Sorption of glyphosate and phosphate by variable-charge tropical soils from Tanzania. *Geoderma.* 138, 127-132. doi:10.1016/j.geoderma.2006.11.001
- Gomez, E., Garland, J., Conti, M., 2004. Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Appl. Soil Ecol.* 26, 21–30.
- Govaerts, B., Mezzalama, M., Unno, Y., Sayre, K.D., Luna-Guido, M., Vanherk, K., 2007. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. *Appl Soil Ecol.* 37, 18-30. doi:10.1016/j.apsoil.2007.03.006
- Goverde, M., van der Heijden, M.G.A., Wiemken, A., Sanders, I.R., Erhardt, A., 2000. Arbuscular

- mycorrhizal fungi influence life history traits of a lepidopteran herbivore. *Oecologia*.125, 362–369. doi:10.1007/s004420000465
- Gratton, C., Denno, R.F., 2003. Seasonal shift from bottom-up to top-down impact in phytophagous insect populations. *Oecologia*. 134, 487–495.
- Grossbard, E., Atkinson, D., 1985. *The Herbicide Glyphosate*. Butterworths, London.
- Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., Zuberer, D.A., 2000. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sci.* 48, 89-93.
- Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., 2002. Effect of Roundup Ultra on Microbial Activity and Biomass from Selected Soils. *J. Environ. Qual.* 31, 730–735.
- Hayman, D.S., 1982. *Endomycorrhizae*, In interactions between non- pathogen soil microorganisms and plants. Eds. Elsevier. Amsterdam. 401–442.
- Heijboer, A., Hein, F.M., Ruiter, P.C. De, Bracht, H., Kowalchuk, G.A., Bloem, J., 2016. Plant biomass , soil microbial community structure and nitrogen cycling under different organic amendment regimes ; a 15 N tracer-based approach. *Appl. Soil Ecol.* 107, 251–260. doi:10.1016/j.apsoil.2016.06.009
- Helander, M., Saloniemi, I., Saikkonen, K., 2012. Glyphosate in northern ecosystems. *Trends Plant Sci.* 979, 1–6. doi:10.1016/j.tplants.2012.05.008
- Johnson, N.C., Rowland, D., Egerton-warburton, L.M., 2003. Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. *Ecology.* 84(7), 1895-1908. doi:10.1890/0012-9658(2003)084
- Kalembsa, S., Symanowicz, B., 2012. Enzymatic Activity of Soil after Applying Various Waste Organic Materials, Ash, and Mineral Fertilizers. *Pol. J. Environ. Stud.* 21(6), 1635–1641.
- Kjær, J., Olsen, P., Ullum, M., Grant, R., 2005. Leaching of glyphosate and amino-methylphosphonic acid from Danish agricultural field sites. *J. Environ. Qual.* 34, 608-620.
- Koricheva, J., Gange, A.C., Jones, T., 2009. Effects of mycorrhizal fungi on insect herbivores: a meta-analysis. *Ecol.* 90, 2088-2097.
- Koschier, E.H., Khaosaad, T., Vierheilig, H., 2007. Root colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and enhanced phosphorous levels in cucumber do not affect host acceptance and development of *Frankliniella occidentalis*. *J Plant Interact.* 2(1), 11-15.
- Koske, R.E., Gemma, J.N., 1989. A modified procedure for staining roots to detect mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92, 486–488.
- Kuzyakov, Y., Xu, X., 2013. Competition between roots and microorganisms for nitrogen: Mechanisms and ecological relevance. *New Phytol.* 198, 656-669. doi:10.1111/nph.12235
- Lipok, J. 2009. Dual action of phosphonate herbicides in plants affected by herbivore - model study on black bean aphid *Aphis fabae* rearing on broad bean *Vicia faba* plants. *Ecotoxicol. Environ. Safety*

72, 1701–1706.

- Lowit, M.B., Blum, L.K., Mills, A.L., 2000. Determining replication for discrimination among microbial communities in environmental samples using community-level physiological profiles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32, 97-102.
- Lupwayi, N.Z., Lafond, G.P., Ziadi, N., Grant, C.A., 2012. Soil microbial response to nitrogen fertilizer and tillage in barley and corn. *Soil Till. Res.* 118, 139–146. doi:10.1016/j.still.2011.11.006
- Machet, J.M., Dubrulle, P., Louis, P., 1990. Azobil®: a computer program for fertiliser N recommendations based on a predictive balance sheet method. In: Scaife A. Proceedings of the 1st Congress of the European Society of Agronomy, 5th-7th December 1990, Paris, France. Colmar, France: ESA/INRA/CEC.
- Malty, J.d.S., Siqueira, J.O., Moreira, F.M.d.S., 2006. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira.* 41, 285–291.
- Mahdavi-Arab, N., Meyer, S.T., Mehrparvar, M., Weisser, W.W., 2014. Complex Effects of Fertilization on Plant and Herbivore Performance in the Presence of a Plant Competitor and Activated Carbon. *Plos-one* 9(7), 1-10. doi:10.1371/journal.pone.0103731
- Man, L., Zucong, C.A.I., 2009. Effects of chlorothalonil and carbendazim on nitrification and denitrification in soils. *J. Environ. Sci.* 21, 458–467. doi:10.1016/S1001-0742(08)62292-5
- Mattson, W.J., 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 11, 119–161.
- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L., Swan, J. a., 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115, 495–501. doi:10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x
- Mikha, M.M., Rice, C.W., Milliken, G.A., 2005. Carbon and nitrogen mineralization as affected by drying and wetting cycles. *Soil Biol. Biochem.* 37, 339–347.
- Moreira, F.M., Siqueira, J.O., 2006. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2. ed. Lavras: UFLa.
- Nelson D.R., Belleville, R.J., Porter, C.A., 1984. Role of nitrogen assimilation in seed development of soybean. *Plant Physiol.* 74, 128-133.
- Ni, Z., Kim, E.D., Ha, M., Lackey, E., Liu, J., Zhang, Y., Sun, Q., Chen, J., 2009. Altered circadian rhythms regulate growth vigor in hybrids and allopolyploids. *Nature.* 457(7227), 327-331. doi:10.1038/nature07523.
- Nivelle, E., Verzeaux, J., Habbib, H., Kuzyakov, Y., Decocq, G., Roger, D., Lacoux, J., Duclercq, J., Spicher, F., Nava-Saucedo, J.-E., Catterou, M., Dubois, F., Tetu, T., 2016. Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization. *Appl. Soil Ecol.* 108, 147–155. doi:10.1016/j.apsoil.2016.08.004

- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2015. Vegan: Community Ecology Package Version 2.3-2. <http://cran.r-project.org/>.
- Olander, L.P., Vitousek, P.M., 2000. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry*. 49, 175–190.
- Olsen, S. R., Cole, C. V., Watanabe, F. S. and Dean, L. A., 1954. Estimation of available phosphorus in soils by the extraction with sodium bicarbonate; Circ. 939; U.S. Dep. of Agric.
- Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., Lavallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B., Kishore, G.M., 1995. (1995) Development, Identification, and Characterization of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line. *Crop Sci.* 35, 1451–1461.
- Pohlert, T., 2016. PMCMR: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums. Version 4.1. <http://cran.r-project.org/>.
- Ratcliff, A.W., Busse, M.D., Shestak, C.J., 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Appl. Soil Ecol.* 34, 114–124. doi:10.1016/j.apsoil.2006.03.002
- Robertson, G.P., and P.M. Vitousek. 2009. Nitrogen in agriculture: Balancing an essential resource. *Ann. Rev. Energ. Env.* 34, 97-125.
- Ronco, M.G., Ruscitti, M.F., Arango, M.C., Beltrano, J., 2008. Glyphosate and mycorrhization induce changes in plant growth and in root morphology and architecture in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 83, 497–505.
- Rosen, H., 1957. A Modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 67, 10-15.
- Roth, G. 2009. Soybean nodulation issues. *Field Crop News* 9, 21. <http://fcn.agronomy.psu.edu/>
- Sarathchandra, S.U., Ghani, A., Yeates, G.W., Burch, G., Cox, N.R., 2001. Effect of nitrogen and phosphate fertilizers on microbial and nematode diversity in pasture soils. *Soil Biol. Biochem.* 33, 953–964.
- Saska, P., Skuhrovec, J., Lukas, J., Chi, H., Tuan, S.J., Honek, A., 2016. Treatment by glyphosate-based herbicide alters life history parameters of the rose-grain aphid *Metopolophium dirhodum*. *Sci. Rep.* 6, 27801. doi: 10.1038/srep27801
- Shah, M.A., Reshi, Z., Rashid, I., 2008. Mycorrhizal source and neighbour identity differently influence *Anthemis cotula* L. invasion in the Kashmir Himalaya, India. *Appl. Soil Ecol.* 40, 330-337.
- Shen, W., Lin, X., Shi, W., 2010. Higher rates of nitrogen fertilization decrease soil enzyme activities, microbial functional diversity and nitrification capacity in a Chinese polytunnel greenhouse vegetable land. *Plant Soil.* 337, 137–150. doi:10.1007/s11104-010-0511-2

- Smith, S.E., Gianinazzi-Pearson, V., 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular–arbuscular mycorrhizal plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 221–244.
- Smith, A.M., Zeeman, S.C., 2006. Quantification of starch in plant tissues. *Protocol* 1(3), 1342–1345. doi:10.1038/nprot.2006.232
- Smith, S.E., Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystems scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 227–250.
- Sterner, R., Elser, J., 2002. *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Streeter, J.G., 1972. Nitrogen nutrition of field-grown soybean plants. I. Seasonal variations in soil nitrogen and nitrogen composition of stem exudate. *Agron. J.* 64, 311–314.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969. Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1, 301–307.
- Tao, L., Hunter, M.D., 2012. Does anthropogenic nitrogen deposition induce phosphorus limitation in herbivorous insects? *Glob. Change Biol.* 18, 1843–1853.
- Vannette, R.L., Rasmann, S., 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi mediate below-ground plant–herbivore interactions: a phylogenetic study. *Funct. Ecol.* 26, 1033–1042. doi: 10.1111/j.1365-2435.2012.02046.x
- Veresoglou, S.D., Chen, B., Rillig, M.C., 2012. Soil Biology & Biochemistry Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. *Soil Biol. Biochem.* 46, 53–62. doi:10.1016/j.soilbio.2011.11.018
- Verzeaux, J., Roger, D., Lacoux, J., Nivellet, E., Adam, C., Habbib, H., Hirel, B., Dubois, F., Tetu, T. 2016. In winter wheat, no-till increases mycorrhizal colonization thus reducing the need for nitrogen fertilization. *Agronomy*. 6, 38, 5–9. doi:10.3390/agronomy6020038
- Wardle, D.A., 1992. A comparative-assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 67, 321–358.
- Winter, T.R., Rostás, M., 2010. Nitrogen deficiency affects bottom-up cascade without disrupting indirect plant defense. *J. Chem. Ecol.* 36, 642–651. doi:10.1007/s10886-010-9797-z
- Wurst, S., Dugassa-gobena, D., Langel, R., Bonkowski, M., Scheu, S., Wurst, S., 2004. Combined effects of earthworms and vesicular – arbuscular mycorrhizas on plant and aphid performance. *New Phytol.* 163, 169–176. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01106.x
- Zehnder, C. B., Hunter, M.D., 2008. Effects of nitrogen deposition on the interaction between an aphid and its host plant. *Ecol. Entomol.* 33, 24–30.
- Zilli, J.E., Ribeiro, K.G., Campo, R.J., Hungria, M., 2009. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield. *Rev. Bras. Cienc. Solo.* 33, 917–923.

Résumé des principaux résultats du chapitre II.

Les points forts de l'article 1 sont :

1. Le glyphosate appliqué à la dose au champ diminue la réponse fonctionnelle microbienne conduisant à augmenter le temps de dégradation des résidus organiques.
2. L'application de 100 fois la dose au champ de glyphosate stimule les réponses fonctionnelles microbiennes et augmente la teneur en nutriments du sol, indépendamment de l'historique de fertilisation azotée.
3. L'historique de fertilisation azotée modifie les effets du glyphosate sur les enzymes du sol.

Les points forts de l'article 2 sont :

1. La fertilisation azotée diminue les activités enzymatiques du sol bien qu'elle augmente la nitrification, la teneur en nutriments dans le sol et la plante et les performances des pucerons.
2. La combinaison du glyphosate et de la fertilisation azotée a des effets synergiques sur la teneur en azote organique du sol, la teneur en ammonium dans les feuilles et le rendement des haricots.
3. La combinaison glyphosate plus fertilisation azotée inhibe le potentiel de colonisation des champignons mycorhiziens.

| Art. 1 | DH | AIP | URE | AWCD | H' | PO4 | NO3 | NIT |
|-----------|----|-----|-----|------|----|--------|---------|-----|
| NO/ CK | | | | | | | | |
| N+/ CK | | | | | | | | |
| NO/ FR | | | | | | | | |
| N+/ FR | | | | | | | | |
| NO/ 100FR | | | | | | | | |
| N+/ 100FR | | | | | | | | |
| Art. 2 | DH | AIP | AMF | NO3 | TN | PLANTE | PUCERON | |
| NO/ CK | | | | | | | | |
| NO/ FR | | | | | | | | |
| NX/ CK | | | | | | | | |
| NX/ FR | | | | | | | | |

Fig. 19. Schéma récapitulatif qui illustre les grandes tendances des effets des pratiques agricoles sur les indicateurs mesurés pour les articles 1 et 2 de la thèse. En gris : pas d'effet par rapport au témoin N0/CK (absence de fertilisation azotée, absence de glyphosate) ; rouge clair : effet négatif léger par rapport au témoin ; rouge : effet négatif significatif par rapport au témoin ; vert clair : effet positif léger par rapport au témoin ; vert : effet négatif significatif par rapport au témoin. DH : déshydrogénase ; AIP : phosphatase alcaline ; URE : uréase ; AWCD : activités fonctionnelle microbienne ; H' : diversité fonctionnelle microbienne ; PO4 : teneur en phosphore assimilable ; NO3 : teneur en nitrates ; NIT : nitrification sol ; AMF : champignons mycorhiziens ; TN : azote total sol ; PLANTE : teneurs en éléments nutritifs du haricot ; PUCERON : survie larvaire *Aphis fabae*.

CHAPITRE III.

EFFETS DE LA GESTION DU TRAVAIL DU SOL, DES COUVERTS VEGETAUX ET DE LA FERTILISATION AZOTEE SUR LA REPONSE FONCTIONNELLE MICROBIENNE EDAPHIQUE

« L'agroécologie est pour nous bien plus qu'une simple alternative agronomique. Elle est liée à une dimension profonde du respect de la vie sous toutes ses formes et doit permettre d'instaurer une vision différente de la vie en conciliant nécessités vitales et sauvegarde du vivant pour aujourd'hui et les générations futures. »

Pierre Rabhi, *agriculteur, écrivain et penseur français*, 2007

Partie 1. Article 3. L'abondance de spores de champignons mycorhiziens arbusculaires est favorisée par 6 années de non-labour et est corrélée avec les paramètres environnementaux dans un sol limono-argileux

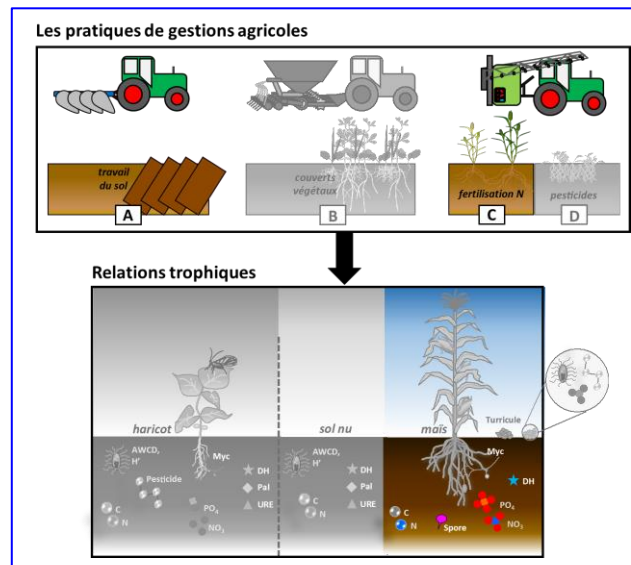


Fig. 20. Effets de la gestion de deux pratiques culturales, le travail du sol et la fertilisation azotée sur les indicateurs qualitatifs du sol. Cf. Figure 3 page 22.

Article n°3 (publié)



Article

Spore Density of Arbuscular Mycorrhizal Fungi is Fostered by Six Years of a No-Till System and is Correlated with Environmental Parameters in a Silty Loam Soil

Julien Verzeaux^{1,†}, Elodie Nivelles^{1,†}, David Roger¹, Bertrand Hirel², Frédéric Dubois¹ and Thierry Tetu¹

¹ Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés (EDYSAN, FRE 3498 CNRS UPJV), Laboratoire d'Agroécologie, Ecophysiologie et Biologie intégrative, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, Amiens CEDEX 80039, France; julienverzeaux@gmail.com (J.V.); elodienivelles@gmail.com (E.N.); david.roger@u-picardie.fr (D.R.); frederic.dubois@u-picardie.fr (F.D.); thierry.tetu@u-picardie.fr (T.T.)

² Adaptation des Plantes à leur Environnement, Unité Mixte de Recherche 1318, Institut Jean-Pierre Bourgin, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Versailles-Grignon, R.D. 10, Versailles CEDEX F-78026, France

[†] These authors contributed equally to this work.

Abstract: Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play major roles in nutrient acquisition by crops and are key actors of agroecosystems productivity. However, agricultural practices can have deleterious effects on plant–fungi symbiosis establishment in soils, thus inhibiting its potential benefits on plant growth and development. Therefore, we have studied the impact of different soil management techniques, including conventional moldboard ploughing and no-till under an optimal nitrogen (N) fertilization regime and in the absence of N fertilization, on AMF spore density and soil chemical, physical, and biological indicators in the top 20 cm of the soil horizon. A field experiment conducted over six years revealed that AMF spore density was significantly lower under conventional tillage (CT) combined with intensive synthetic N fertilization. Under no-till (NT) conditions, the density of AMF spore was at least two-fold higher, even under intensive N fertilization conditions. We also observed that there were positive correlations between spore density, soil dehydrogenase enzyme activity, and soil penetration resistance and negative correlations with soil phosphorus and mineral N contents. Therefore, soil dehydrogenase activity and soil penetration resistance can be considered as good indicators of soil quality in agrosystems. Furthermore, the high nitrate content of ploughed soils appears to be detrimental both for the dehydrogenase enzyme activity and the production of AMF spores. It can be concluded that no-till, by preventing soil from structural and chemical disturbances, is a farming system that preserves the entire fungal life cycle and as such the production of viable spores of AMF, even under intensive N fertilization.

Keywords: tillage; nitrogen fertilization; arbuscular mycorrhizal fungi; spore density; microbial activity

1. Introduction

Symbiosis between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plants arose on earth more than 400 million years ago [1]. The roots of the majority of land plant species are colonized by these fungi, extending the prospecting capacity of plants into the surrounding soil through mycorrhizosphere (a network formed by root-like extensions of the fungi known as hyphae), where the fungal spores are also formed [2]. It is commonly accepted that AMF develop obligate symbioses with at least 65% of vascular plants [3], including a large number of cereals grain crops and legumes, thus increasing their ability to acquire nutrients. However, AMF are particularly sensitive to physical, chemical, and biological disturbances caused by human activities that limit their establishment in agrosystems. Although it has been shown that tillage (through aggregate disruption [4]) and N fertilization can reduce the colonization of crops by arbuscular mycorrhizal fungi [5–7], our knowledge of the factors that determine the successful establishment of an AMF symbiosis remains limited. Spore density of AMF together with the level of hyphal growth and branching are critical for successful root colonization [6,8]. The density of spores has been defined as an early and useful indicator of AMF colonization potential [9]. Spore

density determines the capability of AMF to resist ecological and physical disturbances, such as periods during which suitable host plants are not present or following intensive tillage, as they both limit the ability of AMF to colonize the subsequent cultivated crops [10]. In addition, among AMF species, there are different levels of tolerance to the disruption of hyphae resulting from tillage [11]. Inoculation with AMF spores has recently been shown to increase plant growth [12] and the expression of nitrate and phosphate transporter genes in wheat roots [13]. Moreover, inoculation can be used to offset tillage effects on the number of indigenous spores. However, there is still a paucity of knowledge concerning the potential ecological impact resulting from propagule inoculation [6], as such methods could increase the competition between inoculated fungi and previously established indigenous AMF communities [14]. Therefore, the implementation of alternative farming practices that promote natural production of viable AMF spores, and thus the occurrence of an efficient symbiosis with crop plants, needs to be studied further. The aim of this study was to evaluate the impact of alternative farming practices on AMF spore density in order to propose if such practices could be a way to increase root mycorrhizal colonization and thus crop mineral nutrient use efficiency in the context of agricultural sustainability.

2. Results and Discussion

Monitoring the effects of contrasting agrosystems, both in terms of mineral fertilization and tillage practices on AMF development could lead to a better understanding of such an important biological process and improve soil fertility. In the present work, the effect of tillage under zero or optimal N fertilization on AMF spore density was investigated over a six-year period. Moreover, we have examined if there was any relationship between the AMF spore density and soil chemical as well as biological parameters.

When multiple comparisons were performed using the Conover post-hoc tests, soil DH activity was significantly higher (35%) in the absence of tillage and N fertilization (Table 1). In ploughed soils, the concentration of PO_4^{3-} was also slightly higher, but only in the absence of N fertilization. We also observed that both plant NO_3^- and soil soluble NO_3^- contents were approximately 3- and 2-fold higher, respectively, in ploughed soils as compared to those managed under no-till (NT) conditions, irrespective of the N fertilization regime. The higher NO_3^- content found in the water collected from lysimeters suggests that inorganic N availability for microorganisms was higher in ploughed soils during the inter cropping period. The lower soil NO_3^- content in the NT plots could result from a greater uptake by soil microorganisms. Moreover, it has been shown that substantial amounts of soil inorganic N can be taken up by microorganisms [15] and that NT enhances microbial biomass as compared to conventional tillage (CT) [16]. Another hypothesis is that increased mineralization of soil organic matter pools, caused by the annual moldboard ploughing [17,18], leads to an accumulation of NO_3^- in CT plots. However, the

DH enzyme activity, which reflects the metabolic state of microorganisms in soils [19], was higher in NT and N0 plots as compared to those that were ploughed or fertilized. The finding that NT-N0 soils, characterized by the lowest concentration of nutrients (i.e., available phosphorus and nitrate), are also the most microbiologically active is supported by the results obtained by Nivelles et al. [20], and is consistent with those obtained by Das et al. [21], who also observed that the DH enzyme activity was approximately twice as high under NT than under CT conditions.

The highest value of penetration resistance (SPR) was obtained under NT conditions in N-fertilized soils (1.265 MPa), while the lowest value was found in ploughed soils without N fertilization (0.57 MPa) (Table 1). Such a result is not surprising as the upper soil layer under NT conditions is more compact [22], while annual moldboard ploughing destroys soil structure by mechanical aggregate disruption [4]. In contrast, annual moldboard ploughing could cause a strong subsoil compaction through the formation of a plough pan at a depth of 25–30 cm [23,24]. Such a soil compaction is a major agronomic concern that is detrimental for root system growth, soil aeration, and water infiltration. However, in our study, values for SPR at the 0–20 cm depth soil horizon under NT are not a problem from an agronomic point of view, as they do not reach levels that could limit crop production potential [25]. One can also hypothesize that the increased SPR induced by N fertilization in NT soils could be due either to chemically induced changes in soil physical properties or to changes in root development under low or high N fertilization inputs.

Table 1. Impact of tillage and nitrogen fertilization on the biological, chemical, and physical parameters of soil at a depth of 0–20 cm.

| Soil Parameter | H (p) | NT-N0 | NT-NX | CT-N0 | CT-NX |
|---|---------------|--------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| DH ($\mu\text{g TPF g}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$) | 7.35 (0.042) | 12.58 \pm 1.22 a | 8.35 \pm 1.6 b | 8.22 \pm 0.36b | 7.63 \pm 0.55 b |
| NO_3^- s (mg kg^{-1}) | 12.93 (0.005) | 2.91 \pm 0.06 b | 3.35 \pm 0.18 b | 11.25 \pm 1.12a | 8.49 \pm 1.21 a |
| NO_3^- w (mg L^{-1}) | 13.26 (0.004) | 18.13 \pm 2.04 b | 27.62 \pm 3.67 b | 44.67 \pm 2.65a | 61.76 \pm 3.81a |
| PO_4^{3-} (mg kg^{-1}) | 8.28 (0.040) | 38.08 \pm 2.21 b | 41.58 \pm 2.11 ab | 51.37 \pm 2.38a | 42.55 \pm 3.45 ab |
| TN (g kg^{-1}) | NS | 1.18 \pm 0.04 | 1.21 \pm 0.06 | 1.18 \pm 0.02 | 1.25 \pm 0.07 |
| TOC (g kg^{-1}) | NS | 11.54 \pm 0.48 | 11.75 \pm 0.51 | 12.04 \pm 0.19 | 11.59 \pm 0.89 |
| C:N ratio | 7.57 (0.048) | 9.74 \pm 0.12 b | 9.74 \pm 0.16 b | 10.17 \pm 0.08a | 9.29 \pm 0.31 b |
| SPR (MPa) | 12.11 (0.007) | 0.88 \pm 0.06 b | 1.265 \pm 0.08 a | 0.57 \pm 0.08c | 0.83 \pm 0.04 bc |

In H: Values of the Kruskal-Wallis test with its probability in brackets. Different letters a, b and c indicate significant differences between treatments according to the Conover post-hoc test ($P < 0.05$), following a significant Kruskal-Wallis test. NS = not significant. CT: conventional tillage; NT: no-till; NX: with mineral N fertilization; N0: without N fertilization. NS: not significant. DH: dehydrogenase activity, NO_3^- s: nitrates extracted from soil, NO_3^- w: nitrates analyzed in soil solution, PO_4^{3-} : available phosphorus, TN: total nitrogen, TOC: total organic carbon, C:N ratio: carbon to nitrogen ratio, SPR: soil penetration resistance. Values correspond to the mean \pm standard error of soil parameters among the four treatments.

Spore density was approximately two-fold higher ($p < 0.01$) after six years of experimentation under NT conditions irrespective of the N fertilization regime (Figure 1A). In contrast, under conventional ploughing less AMF spores were present in the soil, notably when mineral N fertilization occurred. It has already been shown that both spore density and AMF colonization are representative markers of the effect of tillage on AMF biological activity. For example, in comparison to CT, NT had

a positive impact on both AMF colonization of wheat roots [7] and AMF spore density [26]. The lower density of AMF spores in CT treatments could be explained by hyphal networks disturbance resulting from ploughing [26]. However, Hu et al. [27] did not find any impact of tillage on AMF spore density in a sandy-loam soil in a temperate monsoon climate, which could be due to specific physical characteristics of such type of soil. In agreement with our results, Curaqueo et al. [28] showed that there was a larger density of AMF spores after six years of experimentation under NT conditions as compared to CT. However, after four additional years of NT, Curaqueo et al. [28] observed a reduction in the density of spores, likely due to instability of the favorable soil characteristics when NT was extended. Moreover, the results of Curaqueo et al. [28] were obtained under a continuous durum wheat–maize rotation, without any cover crop between the two main crops and with a cultivation system based on the use of intensive urea and triple super phosphate fertilization. It is therefore difficult to compare Curaqueo et al. results [28] with those obtained in the present investigation since we used cover crops as a healthier agronomic practice instead of fertilizer application. Indeed, it has been observed that the addition of mineral P fertilizers usually decreases the densities of AMF spores and hyphae under different soil and climatic conditions [29,30]. In the present study, cover crops containing leguminous species were cultivated between the main crops during winter periods. Therefore, cultivating mixtures of cover crops including leguminous species, which are known to be effective AMF hosts within the tripartite symbiosis with rhizobia [31,32], appears to be beneficial for a more efficient fungal colonization.

We observed a significant decrease of spore density in CT under high N fertilization conditions. In the present study, N fertilization consisted in the application of urea, ammonium, and nitrate. Cornejo et al. [33] emphasized the importance of the type of applied fertilizer on spore density in an andosol, since the authors observed that, compared to an ammonium-based fertilization, there were more spores of *Glomus etunicatum* in soils fertilized with NO_3^- . In our study, we can only speculate that the frequent application of urea and ammonium in CT-NX plots may induce deleterious effects on the AMF life cycle, thus limiting the density of viable spores. Such a result is consistent with the findings of Bhadalung et al. [34], Egerton-Warburton and Allen [35], and Mbutia et al. [36], who showed that the use of ammonium sulfate plus triple superphosphate or ammonium nitrate caused a decrease in the total density of AMF spores and in the level of expression of AMF biomarkers. This decrease is probably due to a lower root colonization of potential hosts throughout the crop rotation. However, in our study, the lack of difference between N0 and NX plots in terms of spore density under NT conditions (Figure 1A) indicates that the detrimental effect of N fertilization on AMF spore density is somehow buffered by the better soil quality over the six-year period.

Further analysis of the data showed that the AMF spore density was positively correlated with soil penetration resistance ($\rho = 0.69$) and DH activity ($\rho = 0.62$) and was negatively correlated with the

nitrate content of the soil ($\rho = -0.62$) or the nitrate content present in the soil solution ($\rho = -0.76$) (Figure 1B).

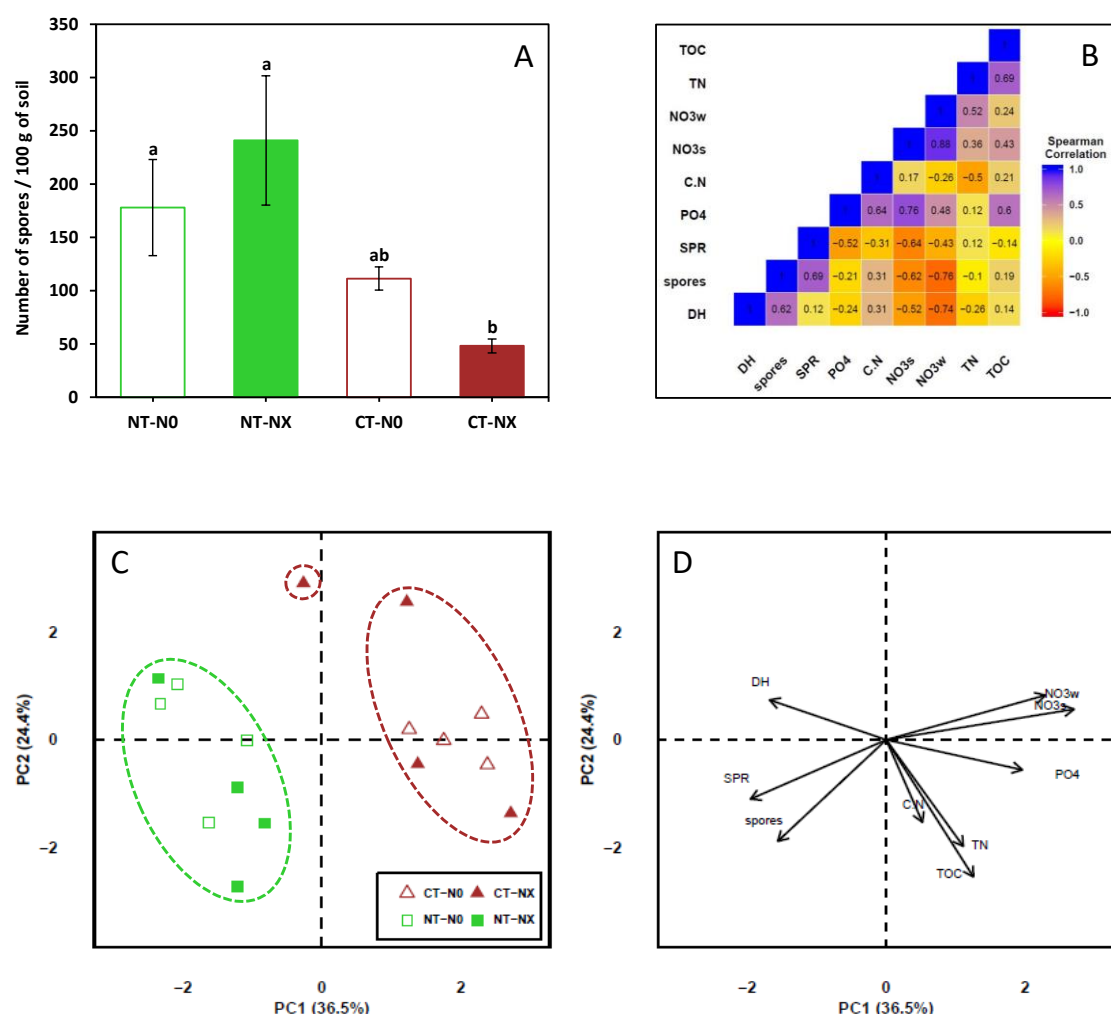


Fig. 1. (A) Average number of spores per 100 g of soil \pm standard error in each of the four treatments. Letters indicate differences among treatments according to a Conover post-hoc test ($P < 0.05$) following a significant Kruskal-Wallis test ($P < 0.01$). (B) Spearman correlations between measured parameters. Values of Spearman correlations are colored by blue as positive, red as negative, and yellow as neutral. Numbers in the squares are correlation coefficients. Factor map of the individuals (C) and variables (D) as obtained by principal component analysis based on spore density, dehydrogenase activity, soil penetration resistance and nutrient content. The green circle (----) groups samples collected in no-tilled soils while brown circles (----) group samples collected in ploughed soils. CT-N0: conventional tillage without nitrogen fertilization, CT-NX: conventional tillage with nitrogen fertilization, NT-N0: no-till without nitrogen fertilization, NT-NX: no-till with nitrogen fertilization, spores: spore density, DH: dehydrogenase activity, SPR: soil penetration resistance, NO₃w: NO₃⁻-N content measured from soil solution collected in lysimeters, NO₃s: NO₃⁻-N content extracted from soil samples, PO₄: soil available phosphorus, TN: soil total nitrogen, TOC: soil total organic carbon, C.N: soil carbon:nitrogen ratio.

The results of the correlation studies are further supported by the principal component analysis (PCA) on which the first axis (36.5% of explained variance) clearly separated ploughed soils from those managed under NT (Figure 1C). Interestingly, in NT-managed soils, there was a high DH, SPR, and spore density, irrespective of the N fertilization regime. In contrast, annually ploughed soils were

characterized by a high phosphate and nitrate content (Figure 1D). Although a positive correlation between AMF spore density and alkaline phosphatase activity has already been reported in the literature [27], such a positive correlation has never been described for soil DH activity. Nevertheless, the finding that a decrease in AMF spore density is associated with soils exhibiting the lowest value of DH activity (i.e., CT-NX) is not surprising because both parameters are known to be disrupted by intensive tillage and high levels of inorganic N [17]. In contrast, the negative correlation found between spore density and both soil and water NO_3^- content has already been observed by Egerton-Warburton and Allen [35]. These authors observed that an anthropogenic N deposition gradient, characterized by increased concentrations of soil NO_3^- , led to a significant reduction in AMF spore density. Additionally, Egerton-Warburton et al. [37] reported that the decrease in AMF productivity in N-fertilized soils was associated with an enrichment in inorganic P and a lower inorganic N/P ratio. However, in the present study, performed over six years without any addition of inorganic P, we showed that neither nitrate concentration nor the inorganic N/P ratio were related to the fertilizer management regime (Table 1). We therefore suggest that, among the tested soil parameters, CT, by strongly and permanently modifying both the soil physicochemical properties and the microbial response, is the main driver causing the decrease in AMF spore density. Such a decrease is even more important under optimal N fertilizer input.

3. Materials and Methods

3.1. Site Description and Experimental Design

The field experiment was conducted at the La Woestyne experimental site, in Northern France (50°44' N, 2°22' E, 40 m above sea level). The average annual air temperature and total rainfall were 10.5 °C and 675 mm, respectively, with amounts of rainfall relatively homogeneous across the four seasons, these values being considered as normal for the region. The silty loam soil particle size composition was as follows: 66.7% silt, 21.2% clay, and 12% sand. The soil pH of 6.7 was homogeneous in the entire field.

Prior to the establishment of the field experiment in 2010, the field was managed with chisel ploughing and a rotary power system. In order to study the effect of tillage and N fertilization on the density of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores in soils, the experimental field was split into four replicated plots placed randomly for each of the four treatments making 16 plots in total. The four different treatments consisted of conventional tillage (CT) with nitrogen (CT-NX) or without nitrogen (CT-N0) fertilization and no-till (NT) with nitrogen (NT-NX) or without nitrogen (NT-N0) fertilization. Each experiment plot measured 2 m x 2 m and was separated from other plots by 3-m-wide corridors. The crop rotation before the sampling date consisted of wheat (*Triticum aestivum* L.) in 2011, bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in 2012, wheat in 2013, green peas (*Pisum sativum* L.) in 2014, and maize (*Zea*

mays L.) in 2015 for the entire field. As maize was grown for silage, all the aboveground material was removed from the field. Bean and pea haulm as well as wheat straw, were mechanically ground and returned to the soil. In the whole field, winter cover crops were cultivated each year between the growing seasons of the major crops except in 2013 before wheat. The cover crop mixture was composed of 60 seeds m⁻² of oats (*Avena sativa L.*), 200 seeds m⁻² of phacelia (*Phacelia tanacetifolia Benth.*), 80 seeds m⁻² of flax (*Linum usitatissimum L.*), 50 seeds m⁻² of vetch (*Vicia sativa L.*), 30 seeds m⁻² of faba bean (*Vicia faba L.*), and 400 seeds m⁻² of Egyptian clover (*Trifolium alexandrinum L.*). All cover crop seeds were mixed and simultaneously sown in line using a conventional seeder. Each year, cover crops were sown immediately after the harvest of the previous crop and were terminated by grinding following a frost period. Before the main crops were sown, cover crop residues were buried by annual conventional moldboard ploughing to a depth of 30 cm in CT plots and left on the soil surface in NT plots. In the NX plots, wheat received 160 kg of N ha⁻¹ in 2011 and 2013, bean received 80 kg of N ha⁻¹ in 2012 and maize received 108 kg of N ha⁻¹ in 2015 (50% urea, 25% ammonium, 25% nitrate). In 2014, green peas did not receive any N fertilization in NX plots in accordance with European policies. The amount of N fertilizer applied under NX conditions was determined according to the N budget method [38]. The N0 plots were not fertilized with N for the whole 6 years of the experiment. Apart from N, no additional fertilizer was added to the experimental fields.

3.2. Sample Collection and Analyzes

In April 2016 (6 years after the beginning of the different soil management practices) during the intercropping period (before sowing of the subsequent main crop), three 0–20-cm-deep soil cores were randomly collected using an auger 5 cm in diameter from each of the 16 plots. In each of the four replicated plots for each of the four treatments, the three soil cores were pooled to form a single sample. The pooled soil samples were then homogenized and sieved using a 2 mm mesh.

Plant-available nitrate (NO₃⁻) was extracted from 20 g of fresh soil with 100 mL of 2 M KCl. After shaking for 1 h, the extracts were centrifuged for 10min at 4000 rpm, and the supernatants were analyzed by using an AlpkemFlowSolution IV continuous flow analytical system (Alpkem, Wilsonville, VT, USA). One week before soil sampling, 3 lysimeters (Sdec France, Reignac-sur-Indre, France) were inserted at a 20 cm depth in each of the 16 plots to extract the soil solution. Samples used to measure NO₃⁻ content in the soil solution were collected simultaneously with the soil samples. The 3 samples of soil solution collected from the 3 lysimeters were pooled to form a single sample in each of the 16 plots. The NO₃⁻ content in the pooled soil samples solution was directly analyzed with the Alpkem Flow Solution IV continuous flow analytical system. Soil phosphorus (PO₄³⁻) was extracted with 0.5 M NaHCO₃, pH 8.5, and quantified using the colorimetric method described by Olsen et al. [39]. Total soil carbon (TOC) and total soil N (TN) contents were determined using an elemental analyzer Flash

EA 1112 series (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) after drying at 35 °C for 48 h and ball-milled using a grinder MM 400 (Retsch, Haan, Germany). The soil C:N ratio corresponds to the ratio TOC on TN.

Soil dehydrogenase activity (DH) was measured as described by Casida et al. [40]. Soil sub-samples were adjusted with CaCO₃ to a final mass ratio of 100:1 (soil:CaCO₃) using 5.94 g of fresh soil. One mL of 3% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution and 2.5 mL of ultrapure water were added to the soil sub-samples. After mixing, the tubes were incubated at 37 °C for 24 h. The resulting triphenylformazan (TPF) was extracted with 30 mL of pure methanol by stirring for 1 min. The solution was then filtered in a dark room and the intensity of TPF was measured at 485 nm using an Eon spectrophotometer (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). The AMF spore density was determined using the sucrose extraction method described by McKenney and Lindsey [41]. Only bright, apparently viable spores were counted on a gridded Petri dish under a binocular stereomicroscope.

Near the soil sampling areas, penetration resistance (SPR) was measured with a penetrometer (Eijkelkamp, Giesbeek, The Netherlands) fitted with a 60 deg and 1 cm² base area cone. Measuring the resistance to penetration of the soil was executed according to the manufacturer's instructions by applying the electronic penetrometer together with a datalogger, allowing for immediate storage and processing of the data in the datalogger.

3.3. Statistical Analysis

All statistical analyzes were performed using R software, v. 3.1.2 (R Development Core Team, 2014 [42]). Mean values are given with their standard error. Because of the low number of replicates, spore density was compared among treatments by using a non-parametric Kruskal–Wallis one-way analysis of variance followed by a Conover post-hoc test whenever significant (PMCMR package, [43]). A principal component analysis (PCA) including spore density, DH, SPR, and soil chemical parameters was performed using the vegan package [44].

4. Conclusions

To summarize, this work demonstrates that NT under continuous cover cropping system is an agricultural practice that maintains a chemical and a biological soil environment that is favorable for AMF spore production. Such an environment appears to be a key factor for increasing the potential of root mycorrhizal colonization and thus for enhancing mineral nutrient use efficiency in crop plants.

Acknowledgments: Peter J. Lea is thanked for its critical reading of the manuscript. This research was funded by Bonduelle and Syngenta companies within the framework of the collaborative project VEGESOL with the University of Picardy Jules Verne.

Author Contributions: J.V., E.N., and D.R. performed all the experiments. J.V. and E.N. computed data and wrote the manuscript. T.T., F.D., and B.H. have supervised the work and have participated in the interpretation and critical discussion of the results.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Selosse, M.A.; Strullu-Derrien, C.; Martin, F.M.; Kamoun, S.; Kenrick, P. Plants, fungi and oomycetes: A 400-million year affair that shapes the biosphere. *New Phytol.* 2015, 206, 501–506.
2. Jansa, J.; Wiemken, A.; Frossard, E. The effects of agricultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi. *Geol. Soc.* 2006, 266, 89–115.
3. Brundrett, M.C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: Understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 2009, 320, 37–77.
4. Six, J.; Elliott, E.T.; Paustian, K. Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: A mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *Soil Biol. Biochem.* 2000, 32, 2099–2103.
5. Corkidi, L.; Rowland, D.L.; Johnson, N.C.; Allen, E.B. Nitrogen fertilization alters the functioning of arbuscular mycorrhizas at two semiarid grasslands. *Plant Soil* 2002, 240, 299–310.
6. Brito, I.; Goss, M.J.; de Carvalho, M. Effect of tillage and crop on arbuscular mycorrhiza colonization of winter wheat and triticale under Mediterranean conditions. *Soil Use Manag.* 2012, 28, 202–208.
7. Verzeaux, J.; Roger, D.; Lacoux, J.; Nivelles, E.; Adam, C.; Habbib, H.; Hirel, B.; Dubois, F.; Tetu, T. In winterwheat, no-till increases mycorrhizal colonization thus reducing the need for nitrogen fertilization. *Agronomy* 2016, 6, 38.
8. Schalamuk, S.; Cabello, M. Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: Possible effects on Glomeromycota diversity. *Mycologia* 2010, 102, 261–268.
9. Castillo, C.G.; Rubio, R.; Rouanet, J.L.; Borie, F. Early effects of tillage and crop rotation on arbuscular mycorrhizal fungal propagules in an Ultisol. *Biol. Fertil. Soils* 2006, 43, 83–92.
10. Oruru, M.B.; Njeru, E.M. Upscaling Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis and Related Agroecosystems Services in Smallholder Farming Systems. *BioMed Res. Int.* 2016, 2016, 4376240.
11. Jansa, J.; Mozafar, A.; Kuhn, G.; Anken, T.; Ruh, R.; Sanders, I.R.; Frossard, E. Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecol. Appl.* 2003, 13, 1164–1176.
12. Berruti, A.; Lumini, E.; Balestrini, R.; Bianciotto, V. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: Let's benefit from past successes. *Front. Microbiol.* 2016, 6, 1559.

13. Saia, S.; Rappa, V.; Ruisi, P.; Abenavoli, M.R.; Sunseri, F.; Giambalvo, D.; Frenda, A.S.; Martinelli, F. Soil inoculation with symbiotic microorganisms promotes plant growth and nutrient transporter genes expression in durum wheat. *Front. Plant. Sci.* 2015, 6, 815.
14. Janoušková, M.; Krak, K.; Wagg, C.; Štorchová, H.; Čaklová, P.; Vosátka, M. Effects of inoculum additions in the presence of a preestablished arbuscular mycorrhizal fungal community. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, 79, 6507–6515.
15. Liu, Q.; Qiao, N.; Xu, X.; Xin, X.; Han, J.Y.; Tian, Y.; Ouyang, H.; Kuzyakov, Y. Nitrogen acquisition by plants and microorganisms in a temperate grassland. *Sci. Rep.* 2016, 6, 22642.
16. Zuber, S.M.; Villamil, M.B. Meta-analysis approach to assess effect of tillage on microbial biomass and enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* 2016, 97, 176–187.
17. Van den Bossche, A.; de Bolle, S.; de Neve, S.; Hofman, G. Effect of tillage intensity on N mineralization of different crop residues in a temperate climate. *Soil Tillage Res.* 2009, 103, 316–324.
18. Pandey, C.B.; Chaudhari, S.K.; Dagar, J.C.; Singh, G.B.; Singh, R.K. Soil N mineralization and microbial biomass carbon affected by different tillage levels in a hot humid tropic. *Soil Tillage Res.* 2010, 110, 33–41.
19. Watts, D.B.; Torbert, H.A.; Feng, Y.; Prior, S.A. Soil microbial community dynamics as influenced by composted dairy manure, soil properties, and landscape position. *Soil Sci.* 2010, 175, 474–486.
20. Nivellet, E.; Verzeaux, J.; Habbib, H.; Kuzyakov, Y.; Decocq, G.; Roger, D.; Lacoux, J.; Duclercq, J.; Spicher, F.; Nava-Saucedo, J.E.; et al. Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization. *Appl. Soil Ecol.* 2016, 108, 147–155.
21. Das, A.; Lal, R.; Patel, D.P.; Idapuganti, R.G.; Layek, J.; Ngachan, S.V.; Ghosh, P.K.; Bordoloi, J.; Kumar, M. Effects of tillage and biomass on soil quality and productivity of lowland rice cultivation by small scale farmers in North Eastern India. *Soil Tillage Res.* 2014, 143, 50–58.
22. Cid, P.; Carmona, I.; Murillo, J.M. No-tillage permanent bed planting and controlled traffic in a maize-cotton irrigated system under Mediterranean conditions: Effects on soil compaction, crop performance and carbon sequestration. *Eur. J. Agron.* 2014, 61, 24–34.
23. Lipiec, J.; Hatano, R. Quantification of compaction effects on soil physical properties and crop growth. *Geoderma* 2003, 116, 107–136.
24. Bertolino, A.V.F.A.; Fernandes, N.F.; Miranda, J.P.L.; Souza, A.P.; Lopes, M.R.S.; Palmieri, F. Effects of plough pan development on surface hydrology and on soil physical properties in Southeastern Brazilian plateau. *J. Hydrol.* 2010, 393, 94–104.
25. Nawaz, M.F.; Bourrié, G.; Trolard, F. Soil compaction impact and modelling. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2013, 33, 291–309.
26. Kabir, Z. Tillage or no-tillage: Impact on mycorrhizae. *Can. J. Plant Sci.* 2005, 85, 23–29.
27. Hu, J.; Yang, A.; Wang, J.; Zhu, A.; Dai, J.; Wong, M.H.; Lin, X. Arbuscular mycorrhizal fungal species composition, propagule density, and soil alkaline phosphatase activity in response to continuous and alternate no-tillage in Northern China. *Catena* 2015, 133, 215–220.

28. Curaqueo, G.; Barea, J.M.; Acevedo, E.; Rubio, R.; Cornejo, P.; Borie, F. Effects of different tillage system on arbuscular mycorrhizal fungal propagules and physical properties in a Mediterranean agroecosystem in central Chile. *Soil Tillage Res.* 2011, 113, 11–18.
29. Douds, D.D.; Millner, P. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 1999, 74, 77–93.
30. Kahiluoto, H.; Ketoja, E.; Vestberg, M.; Saarela, I. Promotion of AM utilization through reduced P fertilization 2. Field studies. *Plant Soil* 2001, 231, 65–79.
31. De Varennes, A.; Goss, M.J. The tripartite symbiosis between legumes, rhizobia and indigenous mycorrhizal fungi is more efficient in undisturbed soil. *Soil Biol. Biochem.* 2007, 39, 2603–2607.
32. Mortimer, P.E.; Pérez-Fernandez, M.A.; Valentine, A.J. The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biol. Biochem.* 2008, 40, 1019–1027.
33. Cornejo, P.; Borie, F.; Rubio, R.; Azcon, R. Influence of nitrogen source on the viability, functionality and persistence of *Glomus etunicatum* fungal propagules in an Andisol. *Appl. Soil Ecol.* 2006, 35, 423–431.
34. Bhadalung, N.N.; Suwanarit, A.; Dell, B.; Nopamornbodi, O.; Thamchaipenet, A.; Rungchuang, J. Effects of long-term NP-fertilization on abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi under a maize cropping system. *Plant Soil* 2005, 270, 371–382.
35. Egerton-Warburton, L.M.; Allen, E.B. Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along an anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecol. Appl.* 2000, 10, 484–496.
36. Mbutia, L.W.; Acosta-Martínez, V.; De Bruyn, J.; Schaeffer, S.; Tyler, D.; Odoi, E.; Mpheshea, M.; Walker, F.; Eash, N. Long term tillage, cover crop, and fertilization effects on microbial community structure, activity: Implications for soil quality. *Soil Biol. Biochem.* 2015, 89, 24–34.
37. Egerton-Warburton, L.M.; Johnson, N.C.; Allen, E.B. Mycorrhizal community dynamics following nitrogen fertilization: A cross-site test in five grasslands. *Ecol. Monogr.* 2007, 77, 527–544.
38. Machet, J.M.; Dubrulle, P.; Louis, P. Azobil1: A computer program for fertiliser N recommendations based on a predictive balance sheet method. In Proceedings of the 1st Congress of the European Society of Agronomy, Paris, France, 5–7 December 1990.
39. Olsen, S.R.; Cole, C.V.; Watanabe, F.S.; Dean, L.A. Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate; U.S. Department of Agriculture: Washington, DC, USA, 1954.
40. Casida, L.E.; Klein, D.A.; Santoro, T. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 1964, 98, 371–376.
41. McKenney, M.C.; Lindsey, D.L. Improved method for quantifying endomycorrhizal fungi spores from soil. *Mycologia* 1987, 79, 779–782.
42. The R Project for Statistical Computing. Available online: <http://www.R-project.org> (accessed on 23 January 2017).
43. Pohlert, T. PMCMR: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums Version 4.1. 2016. Available online: <http://cran.r-project.org/> (accessed on 23 January 2017).

44. Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Kindt, R.; Legendre, P.; Minchin, P.R.; O'Hara, R.B.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; Stevens, M.H.H.; Wagner, H. *Vegan: Community Ecology Package* Version 2.3-2. 2015. Available online: <http://cran.r-project.org/> (accessed on 23 January 2017).



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Partie 2. Article 4. Réponse fonctionnelle microbienne édaphique au travail du sol, à la couverture végétale et à la fertilisation azotée

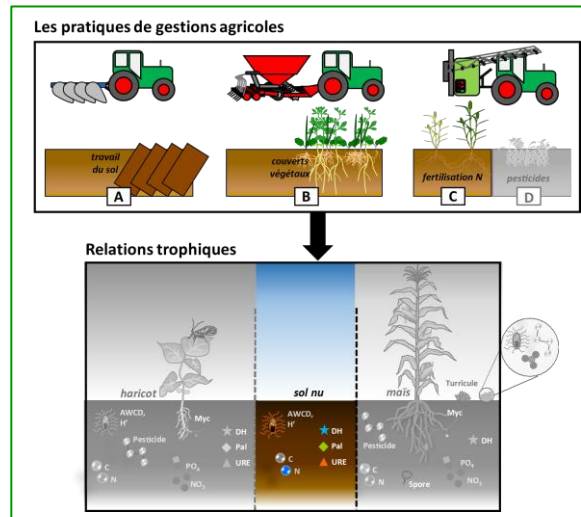
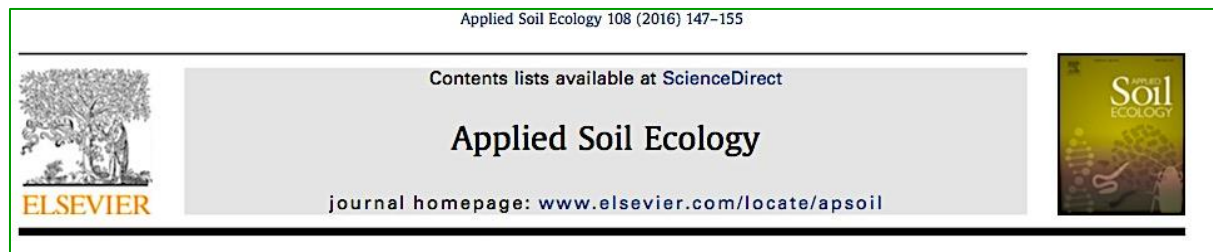


Fig. 21. Effets de la gestion de trois pratiques culturales, le travail du sol, les couverts végétaux et la fertilisation azotée sur les indicateurs qualitatifs du sol. Cf. Figure 3 page 22.

Article n°4 (publié)



Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization

Elodie Nivelles^{a,1}, Julien Verzeaux^{a,1}, Hazzar Habib^a, Yakov Kuzyakov^{b,c}, Guillaume Decocq^a, David Roger^a, Jérôme Lacoux^a, Jérôme Duclercq^a, Fabien Spicher^a, Jose-Edmundo Nava-Saucedo^a, Manuella Catterou^a, Frédéric Dubois^a, Thierry Tétu^a

^a Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés (EDYSAN, FRE 3498 CNRS UPJV), Laboratoire d'Agroécologie, Ecophysiologie et Biologie Intégrative, Université de Picardie Jules Verne, 33 Rue St Leu, 80029, Cédex, France

^b Department of Soil Science of Temperate Ecosystems, Department of Agricultural Soil Science, University of Göttingen, 37077 Göttingen, Germany

^c Institute of Environmental Sciences, Kazan Federal University, Russia

ABSTRACT

Agricultural practices such as tillage, cover crops, and nitrogen (N) fertilization affect physico-chemical and biological soil parameters. However, these factors were often studied separately and their combined effects remain unclear, especially with respect to soil microbial functional diversity and carbon (C) and N content. Thereafter, we aim to assess the links between cropping systems and functional response of microbial communities by using a large range of soil chemical and biological measurements. A 5-yr field experiment was conducted in Northern France using a combination of three factors: i) no-till (NT) vs. conventional tillage (CT); ii) with or without winter cover crops (bare fallow; cover crops with a low prevalence of legumes; cover crop with a high prevalence of legumes); and iii) with or without N fertilization.

C and N inputs from cover crops and crop residues, C and N content, enzyme activities, and microbial functional diversity in the topsoil (0–10 cm) were measured over an industrial crop rotation: wheat, pea, corn, wheat, flax. No-till combined with any of the cover crops was characterized by increased total soil organic C and N contents by more than 20% between 2010 and 2015. Dehydrogenase and urease activities were significantly greatest under NT, irrespective of the presence of cover crops. Cover crops without N fertilization under no-till led to higher microbial functional activity (faster carbohydrate and phenolic compound degradation) and diversity. Bare fallow had lower soil microbial functional diversity and C and N contents compared with soil under NT and cover crops. On the other hand, NT associated with cover crops allowed to maintain the soil in both C and N, and to promote microbial activities without N fertilization. In conclusion, winter cover crops and/or NT are sustainable agricultural practices resulting in a greater soil quality index. These results demonstrate that NT and use of standard cover crops or cover crops with legumes for 5 years under a low biomass return in industrial crop production have a positive effect on: i) upper soil C content and microbial enzymes, irrespective of N fertilization regime; ii) soil microbial functional diversity in the absence of N fertilization.

1. Introduction

Alternative farming practices such as direct seeding mulch- based cropping systems are often employed to reduce the depressive effects of intensive farming on soil fertility. These practices are known to improve ecological relations between plants, soil, and microorganisms (Chaussod 1996; Alvarez et al., 2002; Marinari et al., 2006), while conventional tillage (CT) depletes physico-chemical properties of soil (Chen et al., 2009; Mangalassery et al., 2015). Nevertheless, the response of soil carbon (C) and nitrogen (N) as well as microorganisms to different farm management patterns are still poorly understood, being dependent on many factors such as pedoclimate and crop rotation. Furthermore, the combined effects of different agricultural practices on the chemical and biological properties of soil

received little attention so far (Acosta-Martinez et al., 2011). Although no-till (NT) with cover crops has been shown to increase soil enzyme activities (SEA), microbial functional diversity (Gomez et al., 2004; Nannipieri and Eldor, 2009; Lagomarsino et al., 2009; Nautiyal et al., 2010; Mangalassery et al., 2015; Mbuthia et al., 2015), and abundance (Mathew et al., 2012), there is still a lack of information for low organic-input cropping systems (Mbuthia et al., 2015), especially for industrial crop rotations. Indeed, C inputs from cover crops and crop residues shift soil moisture (Jordan, 2004; Bayer et al., 2006), temperature (Kladivko, 2001), and pH (Reganold et al., 1987), inducing short- and medium-term responses from microbial communities. These responses result in an increase of SEA such as dehydrogenase, alkaline phosphatase, and urease, with consistent results across subtropical (Staben et al., 1997), semi-arid (Nautiyal et al., 2010), mediterranean (Marinari et al., 2006; Lagomarsino et al., 2009), and temperate (Salinas-Garcia et al., 1997; Grayston et al., 2001) biomes. In addition, cover crops have been shown to induce priming effects in rhizosphere and detritusphere hotspots, by affecting the turnover of the soil organic matter (SOM) (Kuzyakov, 2010; Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015), hence altering soil C and N contents. Increased lignin and cellulose contents, C/N ratio, as well as rhizodeposition (i.e. organic compounds released by roots during plant growth) are also considered as main factors affecting microbial communities (Marinari et al., 2000; Kusliene et al., 2014; Bais et al., 2006; Mangalassery et al., 2015). In low organic restitution cropping systems, one of the main challenges is to compensate the low biomass returned by cover crops originated-C and NT system, thus maintaining C and N contents and improving microbial functions (Mbuthia et al., 2015).

In this way, cover crop species have to be selected according to agronomic objectives, and the potential of different mixtures for improving soil quality needs to be assessed. Indeed the species composition of cover crops is a key factor determining the potential benefits to the soil following their incorporation/ mulching. Cover crops enriched in leguminous species were associated with increased soil N content, likely due to N-fixation (Mbuthia et al., 2015). Moreover, the last study reported that vetch cover crops, in comparison with wheat cover crops or bare fallow, improved soil microbial responses such as microbial biomass N or microbial respiration rates. However, according to the level of available N, the inputs of fresh C may negatively correlate with C sequestration through an induced speed-up of C decomposition (Fontaine et al., 2004). Thereby, while the addition of N through fertilizers is commonly described to increase SOM stocks by increasing the rate of residues returned to the soil, long-term application of N fertilization may also cause a SOM depletion by stimulating mineralization.

In the present study, a 5-year experiment is used to investigate, under two N fertilization rates, the combined influence of tillage and cover crops on SEA, soil microbial functional diversity (functional activities and diversity indices), total soil organic carbon (TOC), and nitrogen (TN). We hypothesized that the decrease of soil quality in an industrial crop rotation under conventional soil management could be prevented by no tillage associated with cover crops (with low/high prevalence of legumes).

Specifically in these systems, N inputs originated from leguminous cover crops could maintain C and N contents as well as microbial functional activities and diversity despite the absence of N fertilization.

2. Materials and methods

2.1. Site description

The field experiment was conducted at “La Woestyne” experimental site, in Northern France (50°44' N, 2°22' E, 40 m above sea level). The average annual air temperature and total precipitation between 2010 and 2015 were 11 °C and 620mm, respectively, with rainfall relatively homogeneous across seasons. Soil particle size composition is characterized by 668gkg⁻¹ silt, 212 g kg⁻¹ clay and 120 g kg⁻¹ sand (silty clay loam). The main characteristics of the soil before the beginning of the experiment are shown in [Table 1](#).

Table 1
Main characteristics of soil (0–10 cm) before the start of the experiment.

| Parameters (units) | |
|--|------|
| pH in H ₂ O | 6.28 |
| CEC ^a (cmol + kg ⁻¹) | 11.7 |
| P ₂ O ₅ ^b (g P kg ⁻¹) | 0.13 |
| Organic C (g C kg ⁻¹) | 13.1 |
| Total N (g N kg ⁻¹) | 1.48 |
| Soil C:N ratio | 8.85 |

^a Cation-exchange capacity (Metson method).

^b Available phosphorus (Olsen method).

2.2. Experimental design

Prior to the experiment’s establishment, the field was conducted under chisel plough and rotary power system, fertilized conventionally, and cultivated with wheat (*Triticum aestivum*). In 2010, the experimental field was split into twelve treatments with three replicated plots placed randomly: two N fertilization regimes (without (N0) or with (Nx) N fertilization), two tillage systems (no-till (NT) or conventional tillage (CT)), and three cover crops modalities (bare fallow (bf), with cover crop enriched in leguminous species (lcc) or with standard cover crop (cc)). The 18 plots which received the treatment N0 measured 7 X 8 m while the 18 plots which received the treatment Nx measured 14 X 8 m. A 7-m width corridor separated the Nx and N0 plots in order to avoid N contamination.

During the 5-year period of the experiment, the main crop rotation pattern was wheat, pea (*Pisum sativum*), corn (*Zea mays*), wheat and flax (*Linum usitatissimum*). Wheat in 2010 and 2013 was sown in mid October at a row spacing of 12.5 cm using an AS 400 drill (Alpego, Italia) and harvested in late July, Green pea was sown in mid April at a row spacing of 17cm using a Turbosem drill (Herriau, France) and harvested in early July. Maize was sown in mid May at a row spacing of 75 cm with a

Maxima drill (Kuhn, France) and harvested in late September. Flax was sown in early April at a row spacing of 12.5cm using an AS 400 drill (Alpego, Italia) and harvested in mid July. Only wheat straws were returned as main crop residues since corn and flax were cultivated for forage and fiber respectively. The Nx regime was determined according to the N budget method (Machet et al., 1990) for each rotation crop, and the fertilizer was composed of 50% urea, 25% ammonia and 25% nitrate. Since the beginning of the experiment, 108 kg N ha⁻¹ were added to corn, 160 kg N ha⁻¹ to wheat, and 80 kg N ha⁻¹ to flax. The N0 plots received no N fertilization since 2010. Cover crops “cc” and “lcc” were composed of non-leguminous species: oats (*Avena sativa*), phacelia (*Phacelia tanacetifolia*), flax (*Linum usitatissimum*), as well as leguminous species: vetch (*Vicia sativa*), faba bean (*Vicia faba*), and Egyptian clover (*Trifolium alexandrinum*), but the lcc mixture was particularly characterized by an increase of legume seeding rates. The cc/lcc plots received 160/ 60 seeds m⁻² of oats, 600/200 seeds m⁻² of phacelia, 80/80 seeds m⁻² of flax, 25/50 seeds m⁻² of vetch, 20/30 seeds m⁻² of faba bean, and 230/400 seeds m⁻² of Egyptian clover. All cover crop seeds were mixed and simultaneously sown in line. Each year, cover crops were sown immediately after the harvest of the previous crop and were terminated by grinding following a frost period. Before the main crops were sown, cover crop residues were buried by a conventional moldboard plough to a depth of 30 cm in CT plots and left on the ground in NT plots. Crop protection against weed development and pests was ensured conventionally according to recommended local practices, and all the treatments received the same molecules and doses (see Supplementary Table 1). Neither potassium-phosphate nor other elements were applied throughout the experiment.

2.3. Analysis of nitrogen and carbon inputs from cover crop and main crop residues

During the experiment, 3 1m row of the main crop were yearly sampled at the time of harvest, within each plot. The part of the plant which is commonly returned to the soil through crop residues was separated from the rest of the aerial vegetative part (i.e. exported part). Samples were oven-dried at 65 C for 3 days, weighed, and then ground into powder for subsequent NC analysis using a Flash Elemental Analyzer 1112 series (Thermo Electron, Germany). Similarly, 3 x 1 m² of the entire vegetative part of cover crops were yearly sampled within each plot just before sowing the following main crop to measure the total aboveground biomass and NC contents using the same method. The cumulative organic inputs of N and C from both main crop residues and cover crops were calculated as the sum of C and N returned to the soil since 2010.

2.4. Soil sample collection and storage

In March 2015, six 10-cm deep soil cores were randomly collected using a 5-cm diameter auger in each of the three replicate plots by treatment. Soil sampling occurred 1year after the last plowing in CT and 3 months after the death by frost of cover crop species in cc plots in order to avoid direct effects

of soil disturbance and living roots on the measured parameters. We chose to sample to 10cm since previous studies reported it was an appropriate depth to assess the effects of N additions on microbial communities (Zeng et al., 2016), even in plowed soil (Sun et al., 2015). The six soil cores were composited together as a single sample for each replicate plot. Soil samples were immediately put into polyethylene bags, placed into coolers for transportation to the laboratory, and, after homogenization, they were divided into two subsamples. The first one was stored at 20 C and returned to 4 C within 5 days prior to analysis of SEA (Schinner et al., 2012). The second one was stored at 4 C before the determination of community level physiological profiles (CLPP), total organic carbon (TOC), and total nitrogen (TN).

2.5. Soil pH, total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN)

Soils were 2 mm-sieved and oven-dried at 45 C for 48 h. Soil pH was measured using a pH meter FE20-FiveEasy™ (Mettler Toledo, Switzerland) and a ratio of 1:5 (mass/volume) of soil to distilled water shaken for 45 min. For TOC and TN, sieved soil was finely ground with a ball-mill (Retsch, MM400) and analyzed using a CN elemental analyzer (Flash EA 1112, Thermo Electron, Germany). Since analysis performed at time of the experiment setup revealed that the soil was free of carbonate, the soil total C was assumed to be equal to the TOC. Soil TOC and TN analyzes from samples taken at the beginning of the experiment with the same sampling method as shown in 2.4 were used to calculate TOC and TN change over the 5-year period.

2.6. Soil dehydrogenase and urease enzyme activities

Before SEA measurements, visible organic residues were removed. Soil dehydrogenase activity was measured as described by Casida et al. (1964). Soil sub-samples were adjusted with CaCO₃ to a final mass ratio of 100:1 (soil:CaCO₃) using 5.94 g of fresh soil. Then, 1 mL of a solution of 3% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride and 2.5 mL of ultrapure water was added. After mixing, the tubes were incubated at 37 C for 24 h. The resulting triphenylformazan (TPF) was then extracted with 30 mL of pure methanol by stirring for 1 min. The solution was filtered in a dark room and the intensity of TPF was measured at 485 nm (Eon spectrophotometer, BioTek Instruments Inc., USA) following Tabatabai (1994). Urease activity was determined using the method of Alef and Nannipieri (1998). A mixture of 5g of fresh soil with 2.5mL of 79,9mM urea was incubated at 37 C for 2 h before adding 50 mL of 2.0 M KCl. After 30min of agitation, the suspension was filtered and a solution comprising 1 mL of filtrate, 9 mL of deionized water, 2 mL of 0.1% sodium dichloroisocyanurate and 5 mL of a mixture of 1,06 M sodium salicylate/0.3 M sodium hydroxide/deionized water (1:3/ 1:3/1:3, vol/vol/vol) was prepared. After decanting for 30 min at room temperature, ammonium was measured at 690 nm using the spectrophotometer.

2.7. Community level physiological profiles (CLPP)

The analysis of CLPP was completed within 5 days after sampling (Schinner et al., 2012) using Biolog EcoPlatesTM (Biolog Inc., Hayward, CA) containing 31 different carbon sources plus a control well, in two replications (Huynh, 2009). Five g of fresh, homogenized and organic residue-free soil was incubated with 750 mL of sterile distilled water for 48 h at 26 C. Then, 50 mL of physiological saline were added and the samples were stirred at 500 rpm for 30 min. The samples were centrifuged at 800 rpm for 10 min and recovered supernatants were centrifuged again at 3000 rpm for 5 min. Then, 150 mL of the supernatant was inoculated into each well of the Biolog EcoPlates and incubated at 25 C. Data were recorded every 24 h for 196 h at 590 nm and the data recorded at the end of the exponential phase (96 h) were used for further statistical analysis. The optical density (OD) for each well was calculated by subtracting the control well values from each plate to the OD value of the well (Garland and Mills, 1991). Microbial activity in each microplate was expressed using average well color development (AWCD) and calculated following the method of Garland and Mills (1991). The Shannon index representing the soil functional diversity was calculated using an OD of 0.25 as threshold for positive response (Garland, 1997).

2.8. Statistical analysis

All statistical analyzes were performed using R software v. 3.1.2 (R Development Core Team, <http://www.R-project.org>, 2014). Data for each parameter were analyzed using a non-parametric Kruskal- Wallis test. Multiple comparisons among treatments used the Conover post-hoc test ($P < 0.05$) and the PMCMR package (Pohlert, 2016). Values in figures and tables correspond to the average of 3 data ($n = 3$) ` standard error. For statistical analyzes, the 31 Biolog substrates were grouped into (1) phenolic compounds, (2) amines, (3) amino acids, (4) polymers, (5) carboxylic acids, and (6) carbohydrates. Finally, a redundancy analysis (RDA) was run to visualize the relationships between the 35 functional variables (31 Biolog substrates, 2 enzymatic activities, 2 functional diversity indices), the 7 environmental variables (C, N and C:N ratio inputs from residues, soil TOC, TN, pH and C:N ratio) and the 36 plots, using the vegan package (Oksanen et al., 2015). A Monte Carlo permutation test (999 permutations) was used to assess the significance of environmental variables in accounting for the observed variance of the plots. A post-hoc permutation test was further implemented using the envfit function in vegan (999 permutations) to seek the individual significance of each environmental and functional variable in accounting for the observed variance of plots.

3. Results

3.1. Carbon and nitrogen inputs from cover crop and main crop residues

In the absence of N fertilization (N0), both C and N inputs from main crops residues were significantly higher in conventional tillage with standard (CTcc) and leguminous cover crop (CTlcc) than in no till with standard cover crop (NTcc) and under bare fallow (NTbf) (Table 2). N input was also higher in conventional tillage with winter bare fallow (CTbf) than in NTbf. These differences disappeared under Nx treatments, into which only the C:N ratio of the main crop residues was significantly higher in NTcc and no till with leguminous cover crops (NTlcc) than in CTcc and CTlcc.

N, C, and C:N inputs from cover crops did not differ among treatments, irrespective of the fertilization level.

3.2. Soil chemical analyzes

Among N0 treatments, soil TOC contents increased between 2010 and 2015 in NTcc and NTlcc, whilst it did not change in NTbf, CTbf, and CTlcc, and it even decreased in CTcc. Soil TN increased in NTcc and NTlcc, showed little change in CTlcc, and decreased in NTbf, CTbf and CTcc (Fig. 1).

Under Nx fertilization, soil TOC increased in NTcc, NTlcc, and, to a lesser degree, in NTbf; it showed little change in CTlcc and CTcc, and decreased in CTbf. Regarding soil TN, the greatest (positive) values were found in NTcc and NTlcc, whilst the lowest (negative) ones were recorded in CTbf and CTcc.

The soil C:N varied from 9.5 to 10.9 and pH varied from 6.7 to 6.9 but they did not differ among treatments (results not shown).

3.3. Soil enzyme activities

A clear trend was found towards greater dehydrogenase and urease values in NT than in CT treatments, irrespective to N fertilization (Fig. 2). All NT treatments showed significantly higher dehydrogenase activity than CTlcc (under N0) or CTbf (under Nx). Urease activity was greater in NTlcc than in CTbf and CTcc under N0, and greater in NTcc than in CT plots under Nx.

Table 2
Carbon and nitrogen input from main crop residues and cover crop aboveground biomass over 5 years.

| N rate | Crop | Parameter | H (P) | NTbf (Mg ha ⁻¹) | CTbf (Mg ha ⁻¹) | NTcc (Mg ha ⁻¹) | CTcc (Mg ha ⁻¹) | NTlcc (Mg ha ⁻¹) | CTlcc (Mg ha ⁻¹) |
|--------|------------|-----------|--------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| N0 | Main crop | N input | 13.44(0.019) | 0.03 ± 0.002 ¹ a | 0.04 ± 0.003bc | 0.03 ± 0.001ab | 0.05 ± 0.005c | 0.03 ± 0.002abc | 0.04 ± 0.004c |
| | | C input | 12.88(0.024) | 2.1 ± 0.12a | 2.95 ± 0.29ab | 2.22 ± 0.14a | 3.16 ± 0.31b | 2.67 ± 0.09ab | 3.21 ± 0.13b |
| | | C:N input | NS | 79.1 ± 2.82 | 77.94 ± 2.46 | 82.98 ± 4.17 | 68.8 ± 4.41 | 78.95 ± 1.67 | 75.66 ± 5.36 |
| | Cover crop | N input | NS | | | 0.22 ± 0.02 | 0.11 ± 0.02 | 0.22 ± 0.03 | 0.2 ± 0.005 |
| | | C input | NS | | | 1.95 ± 0.189 | 1.08 ± 0.17 | 1.96 ± 0.19 | 1.79 ± 0.04 |
| | | C:N input | NS | | | 8.89 ± 0.271 | 9.9 ± 0.32 | 9.03 ± 0.31 | 8.9 ± 0.08 |
| Nx | Main crop | N input | NS | 0.06 ± 0.004 | 0.06 ± 0.004 | 0.06 ± 0.004 | 0.06 ± 0.003 | 0.06 ± 0.004 | 0.08 ± 0.004 |
| | | C input | NS | 4.24 ± 0.27 | 4.48 ± 0.27 | 4.82 ± 0.10 | 4.38 ± 0.23 | 5.29 ± 0.45 | 4.74 ± 0.07 |
| | | C:N input | 11.76(0.038) | 73.25 ± 1.51ab | 69.53 ± 0.69ab | 82.07 ± 6.24b | 71.88 ± 6.31ab | 82.01 ± 1.55b | 60.67 ± 2.96a |
| | Cover crop | N input | NS | | | 0.23 ± 0.02 | 0.21 ± 0.02 | 0.22 ± 0.04 | 0.21 ± 0.02 |
| | | C input | NS | | | 2.03 ± 0.18 | 1.89 ± 0.14 | 1.95 ± 0.25 | 1.89 ± 0.19 |
| | | C:N input | NS | | | 8.82 ± 0.10 | 9.15 ± 0.20 | 8.87 ± 0.33 | 9.01 ± 0.13 |

H: value of the Kruskal-Wallis test with the P value of significance in brackets (NS: non-significant). Letters give the result of the Conover's post-hoc test at P < 0.05. CT: conventional tillage, NT: no-till, bf: bare fallow, cc: cover crop, lcc: leguminous cover crop, N0: no nitrogen fertilization, Nx: conventional nitrogen fertilization.

¹ Standard error of the mean.

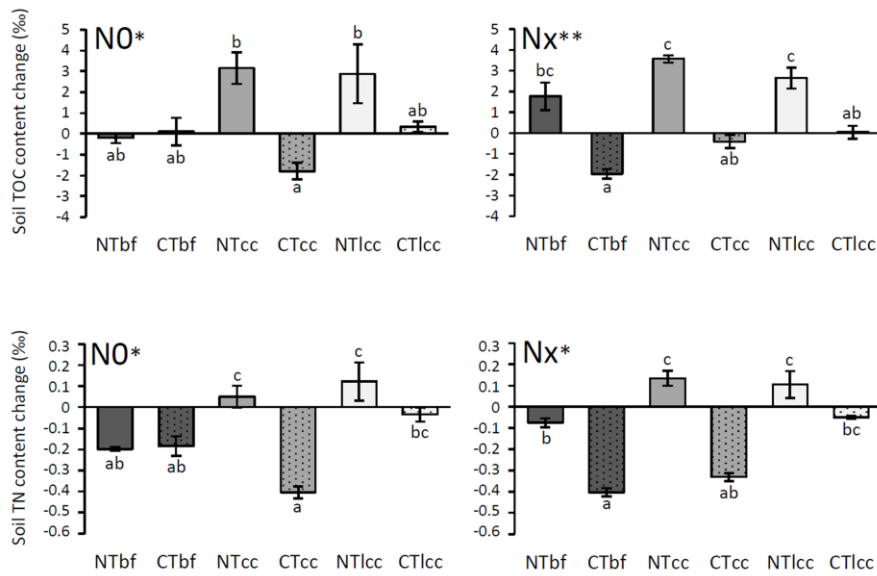


Fig. 1. Changes in soil total organic carbon (top) and total nitrogen (bottom) over the 5-year period. Stars indicate the significance level of the Kruskal-Wallis test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Bars with the same letter are not significantly different according to a Conover post-hoc test ($P < 0.05$). TOC: total organic carbon, TN: total nitrogen.

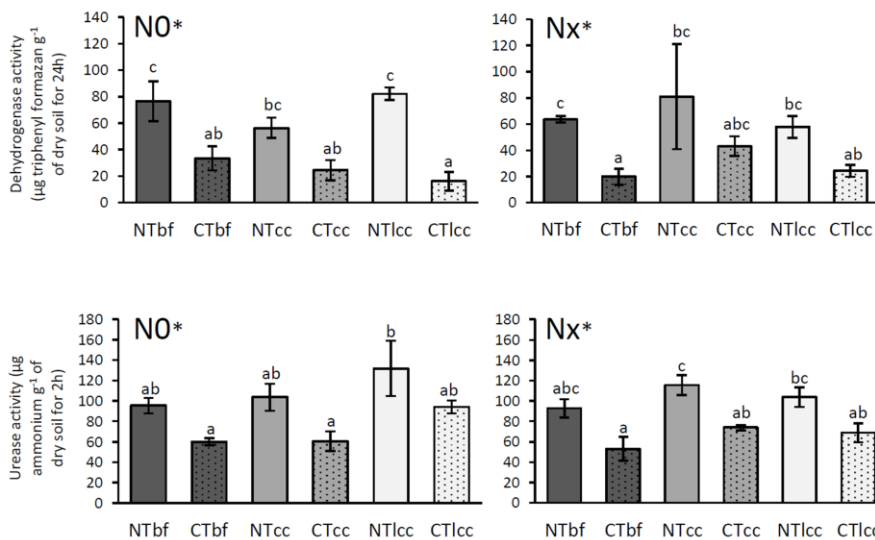


Fig. 2. Enzyme activities of dehydrogenase (top) and urease (bottom). Stars indicate the significance level of the Kruskal-Wallis test (* $P < 0.05$). Bars with the same letter are not significantly different according to a Conover post-hoc test ($P < 0.05$).

3.4. Community level physiological profiles

3.4.1. AWCD and shannon functional diversity

In the absence of fertilizer (N0), both average well color development (AWCD) and the Shannon index were the lowest in bare fallow treatments (NTbf and CTbf) (Fig. 3). In cover crop treatments, the Shannon index was similar in both CT and NT plots, whilst CTlcc showed lower AWCD values than the three other treatments. No statistically significant differences among treatments were observed under Nx.

3.4.2. Substrate used by the microbial communities

Among N0 treatments, significant differences were found for phenolic compounds, polymers, and carbohydrates, which were metabolized faster by microbial communities from cover crop treatments. Phenolic compounds were used faster by NTcc than by NTbf communities. Polymers were used faster in CTcc and NTcc than in CTbf and, to a lesser extent, in NTbf communities. Carbohydrates were used faster in NTcc and NTlcc than in bare soil treatments (NTbf and CTbf). In contrast, a lack of difference was found among treatments under Nx (data not shown).

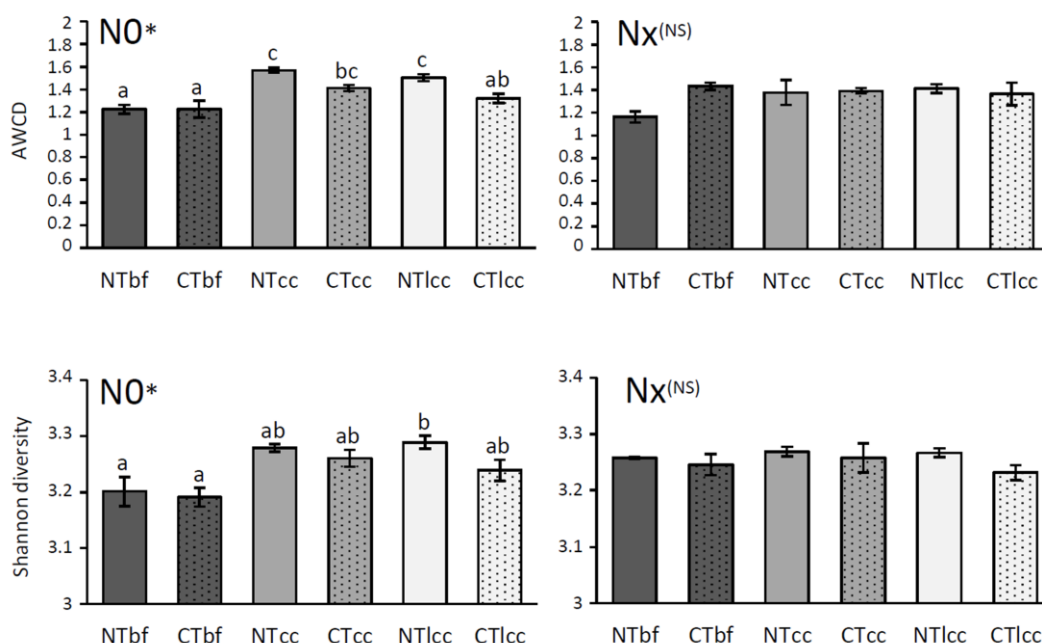


Fig. 3. Microbial functional diversity assessed by total degradation activity (top) and Shannon diversity (bottom) calculated from substrate utilization pattern (31 substrates). Stars indicate the significance level of the Kruskal-Wallis test (NS: non-significant, * $P < 0.05$). Bars with the same letter are not significantly different according to a Conover post-hoc test ($P < 0.05$). AWCD: average well color development.

3.5. Relationships between soil chemical and biological parameters

The RDA diagram defined by the first two canonical axes (adjusted $R^2 = 0.25$; cumulated explained variance by 'species data': 40.0%) revealed the relationships between experimental treatments, "functional" and environmental variables (Fig. 4). The variance in the 42 variables (31 Biolog substrates, AWCD, Shannon index, dehydrogenase activity, urease activity, and 7 environmental variables) was significantly related to differences in TOC, TN, N inputs, C:N ratio of inputs ($P < 0.001$), and C inputs ($P < 0.01$), as indicated by permutation tests. There was a clear trend towards stronger dispersion among N0 plots compared with Nx plots, suggesting a greater heterogeneity in the values of the response variables.

The first RDA axis (proportion of constrained variance explained: 63.7%) corresponded to a gradient of increasing C and N inputs (but decreasing input C:N ratio) and increasing AWCD/Shannon. It tended to separate bare fallow plots (negative scores) from no tillage-cover crop plots (most positive scores). Regarding substrate utilization preferences, this first axis mostly correlated positively with several carbohydrates (S16: a-D-Lactose, S15: Glucose-1-Phosphate, S14: D-Cellobiose, S13: N-Acetyl-D- Glucosamine, S8: b-Methyl-D-Glucoside) and polymers (S28: a-Cyclodextrin, S29: Glycogen), as well as the phenolic compound 2-Hydroxy Benzoic Acid (S30), the amine Phenylethylamine (S24), and the carboxylic acid Pyruvic Acid Methyl Ester (S1). It negatively correlated with one carbohydrate (S11: i-Erythritol). RDA axis 2 (18.6%) was associated with a gradient of increasing soil TN, TOC, dehydrogenase activity, and urease activity, and decreasing soil C:N ratio and pH (the last two were non-significant according to permutations test). It clearly separated CT (negative scores) from NT (positive scores) treatments. Among the latter, plots with cover crops receiving no fertilizer exhibited the highest scores. This axis positively correlated with the carboxylic acid a-Ketobutyric Acid (S6), the phenolics 2-Hydroxy Benzoic Acid (S30), and the carbohydrate D-Xylose (S10). It negatively correlated with the polymers Tween 40 (S26) and Tween 80 (S27), the amino- acid L-Phenylalanine (S20), and the phenolic compound 4- Hydroxy Benzoic Acid (S31).

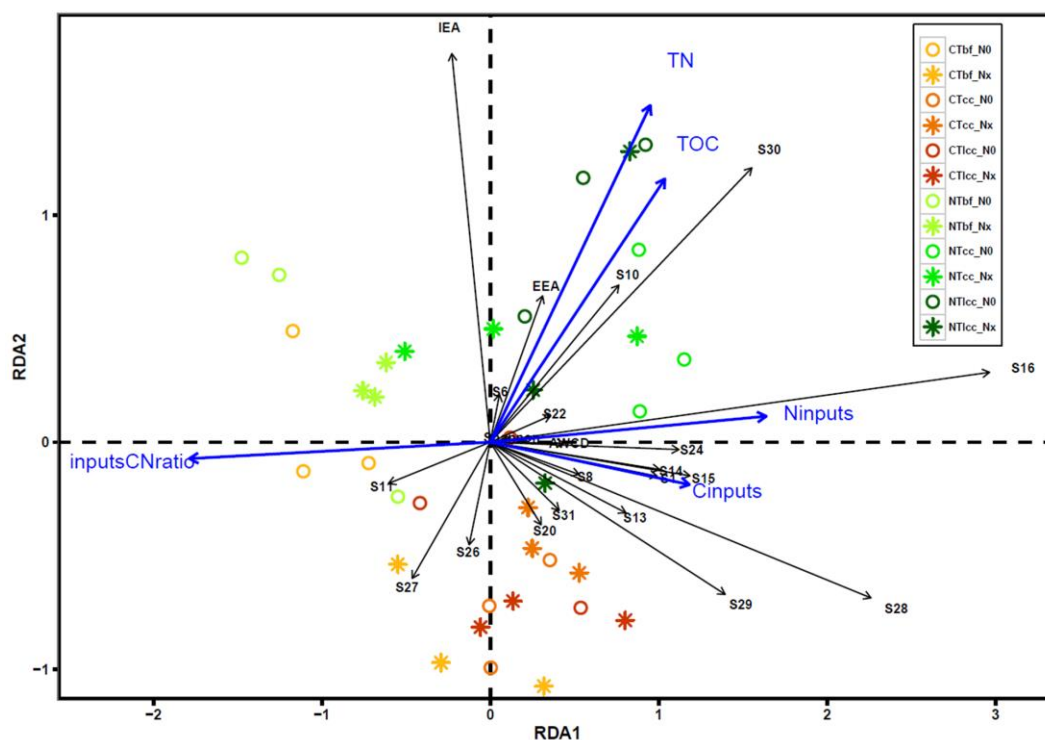


Fig. 4. Redundancy analysis (RDA) of microbial data using soil and input properties as environmental parameters (blue arrows). For the sake of simplicity, only the variables that significantly correlated with canonical axes according to a post-hoc permutation test ($P < 0.05$) are shown. TN: total nitrogen, TOC: total organic carbon, Ninputs: cumulative amount of nitrogen input from crop and cover crop residues, Cinputs: cumulative amount of carbon input from crop and cover crop residues, inputsCNratio: C:N ratio of inputs from crop and cover crops residues. Biolog substrates are carboxylic acids (S1: Pyruvic

Acid Methyl Ester, S2: D-Galacturonic Acid, S3: g-Hydroxybutyric Acid, S4: D-Glucosaminic Acid, S5: Itaconic Acid, S6: a-Ketobutyric Acid, S7: D-Malic Acid), carbohydrates (S8: b-Methyl-D-Glucoside, S9: D-Galactonic Acid g-Lactone, S10: D-Xylose, S11: i-Erythritol, S12: D-Mannitol, S13: N-Acetyl-D-Glucosamine, S14: D-Cellobiose, S15: Glucose-1-Phosphate, S16: a-D-Lactose, S17: D,L-a-Glycerol Phosphate), amino acids (S18: L-Arginine, S19: L-Asparagine, S20: L-Phenylalanine, S21: L-Serine, S22: L-Threonine, S23: Glycyl-L-Glutamic Acid), amines (S24: Phenylethylamine, S25: Putrescine), polymers (S26: Tween 40, S27: Tween 80, S28: a-Cyclodextrin, S29: Glycogen), phenolic compounds (S30: 2-Hydroxy Benzoic Acid, S31: 4-Hydroxy Benzoic Acid). AWCD: average well color development, IEA: intracellular enzyme activity (dehydrogenase), EEA: extracellular enzyme activity (urease). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Discussion

The present controlled experiment is one of the first to shed light on the combined effects of soil tillage and cover crops, under two N fertilization rates, on chemical and biological properties over an entire industrial crop rotation including cereals (wheat and corn), pea, and flax over a 5 year-period. It reveals clear trends towards (i) increased soil TN and TOC contents, and increased enzymatic activities that are also associated with the use of more diverse substrates when NT with or without N fertilizer is applied compared with CT soils; (ii) increased soil C and N inputs and functional activity/diversity of soil microbes, which are associated with the use of more diverse and complex substrates when a cover crop is associated to NT, compared with winter bare fallow. However, the single time point sampling must be taken into account within the interpretation of the discussion and conclusions related to the results obtained. Hereafter, these findings and their relevance for sustainable agriculture are discussed.

4.1. No tillage coupled with cover crops increases soil C and N contents

Increased soil C and N contents were found in both NTcc and NTlcc plots, independently from the species mixture used in cover crops and irrespective of N fertilization (Fig. 1), a beneficial impact already reported in the literature (Mazzoncini et al., 2011; Mbutia et al., 2015). Consistently, C and N inputs from cover crops were similar between the two mixtures and among treatments, indicating that a winter cover crop can compensate for the organic C and N losses associated with main crop exportation (Table 2, Verzeaux et al., 2016). NT and cover crops may enhance the soil C storage by reducing oxidative stress (Mangalassery et al., 2015) and improving aggregate stability (Martens, 2000), thus reducing the aggregate disruption induced by plowing (Six et al., 2000). Among CT plots, only the cover crops enriched in leguminous species (CTlcc) impeded the soil C and N depletion induced by intensive tillage. The use of a mulch enriched with leguminous species has indeed been shown to increase soil N and C contents in soil (Sanginga et al., 1997; Mancinelli et al., 2015), as a plausible consequence of the high N contained in their roots, stems and nodules. Consistently, the positive effect of cover crops disappears under bare fallow, since the soil N content decreased over the rotation's duration, irrespective of fertilization and tillage. The soil C content followed the same trend except in NT plots receiving N

fertilizer, where the main crop residues also exhibited the higher C: N input. Interestingly, this was the only case in which fertilization was beneficial.

4.2. No tillage increases soil enzymatic activity

NT plots exhibited greater soil enzymatic activity than CT plots through increased dehydrogenase and urease, irrespective of N fertilization (Fig. 2). This is consistent with Das et al. (2014), who found that the dehydrogenase activity, which reflects microbial activity and oxidation-reduction reactions in soil, was 107% greater under NT than under CT. In association with cover crops, NT improved urease activity as compared with CT without cover crops, a result already reported by Hamido and Kpombrekou (2009). Overall, our results are consistent with Janusauskaite et al. (2013), since SEA were mainly impacted by soil tillage among other variables. This result is explained by the greater content of organic matter and nutrient availability associated with NT, the lack of disruption of soil layers, and the less oxidizing environment, which can stabilize the pool of extracellular enzymes (e.g. urease) (Melero et al., 2009; Mangalassery et al., 2015). Soil nutrient cycling involves enzymes that are related to certain soil properties such as moisture and organic matter content. Changes in soil enzyme activity may thus affect chemical and biological properties (Bergstrom et al., 1998) and explain the positive correlation between urease activity, TOC, and TN, and to a lesser degree, between dehydrogenase and TN (Costa et al., 2013).

4.3. Cover crops increase microbial substrate use diversity in the absence of N fertilization

Microbial substrate use diversity clearly differed between N0 treatments, being the lowest in bare fallow and the greatest in cover crop-NT plots (Fig. 3). This is explained by the high contents of soil TN and TOC in the latter compared with the other treatments, which may increase the diversity of substrate-richness and thus induce more microbial enzymes (Diosma et al., 2006; Govaerts et al., 2007). This is supported by the greater metabolism of phenolic compounds and carbohydrates (under NT) and polymers (under CT) as carbon sources in plots with a standard cover crop (Fig. 4). This beneficial effect of cover crops disappears in CT treatments, suggesting that microbial functional diversity is impaired by soil tillage-induced disturbance via aggregate disruption, compaction, or buried litter (Mangalassery et al., 2015). Remarkably, neither functional diversity nor substrate preference differed among Nx treatments, indicating a functional convergence of the soil microbial community under N fertilization.

4.4. No tillage together with cover crops ensures sustainable management of agricultural soils

RDA results highlighted the combined effect of N fertilization, plowing, and winter cover crops on soil chemical properties and biological activity. Overall, treatments including both cover crops and no tillage performed the best with respect to soil C and N contents, enzymatic activity and the diversity

of substrates used as C sources, independently from N fertilization (see the top-right part of the RDA diagram on Fig. 4). In these conditions, carbohydrates were heavily used by microorganisms in the topsoil (0–10cm), which is composed of a rich organic litter and contains sugars released from its decomposition and rhizodeposits, hence conferring greater availability of these compounds for soil microbes. Carbohydrates are also known for maintaining and stimulating soil microbial activities in the rhizosphere and detritosphere (Guinina and Kuzyakov, 2015).

Oppositely, conventionally-tilled bare fallow systems negatively impacted the soil, by reducing C and N contents and enzymatic activity (see the bottom-left part of the RDA diagram in Fig. 4). In bare fallows, the high C:N ratio of inputs (i.e. close to 80) is a consequence of the incorporation of only wheat straw residues, which is not compensated for by the low C:N ratio of cover crops returned to the soil. It has been indeed shown that available N and P released from decomposition of low C:N inputs (i.e. cover crop residues) is used by microorganisms for the decomposition of high C:N inputs (i.e. main crop residues) (Schimel and Haettenschwiler, 2007). It is likely that the nutrient release following cover crop decomposition increases the soil N content and microbial activity, which in turn improves the decomposition of high C:N ratio residues. This hypothesis is supported by the legacy effect of the C:N quality of organic residues on the ability of microbial communities to decompose the subsequent amendments (Marschner et al., 2015). The higher degradation of polymers (e.g. Tween 40, Tween 80, α -Cyclodextrin and Glycogen) observed in CT plots including cover crops and in CTbf with N fertilization is also consistent with this hypothesis, since these substrates represent more stable or recalcitrant C compounds. Especially Tween 40 and Tween 80 are molecules that do not resemble plant-derived polymers (Nunan et al., 2015), but characterize processed organic matter (Grandy and Neff, 2008). Their greater use may be a consequence of the greater availability of N following N fertilization in CTbf, decomposition of cover crops in CTcc/CTlcc (Marschner et al., 2015), and/or of the aggregate disruption under plowing, which eases the accessibility of old organic matter to microorganisms (Six et al., 2000). For other polymers, such as α -cyclodextrin and glycogen, the observed higher degradation in CT can simply reflect “young” polymers originating from fresh plant inputs (Nunan et al., 2015; Grandy and Neff, 2008).

The first axis of the RDA strongly separated the plots without cover crops (i.e. CTbf, NTbf, see the left part of the RDA diagram in Fig. 4) from others. These plots were characterized by a higher C:N ratio of inputs (only wheat straws were returned to the soil) and by a higher utilization of the carbohydrate i-Erythrytol. However, the plots which received cover crops (see the right part of the RDA diagram in Fig. 4) which were characterized by lower C:N ratio of inputs, and overall, by higher C and N inputs, significantly enhanced AWCD and Shannon diversity. In the same plots, the degradation of carboxylic acid Pyruvic Acid Methyl Ester (S1), the carbohydrates D-Cellobiose (S14), Glucose-1-Phosphate (S15), and α -D-Lactose (S16), the amino acid L-Threonine (S22), and the amine

Phenylethylamine (S24), was improved. [Frac et al. \(2012\)](#) reported that an increase of soil diversity following organic inputs (i.e. cover crops in our study) resulted from the development of different microbiota. This is consistent with our study since uncovered plots are characterized by the degradation of one sugar alcohol (i-Erythrytol) compared with the large panel of substrates listed above which were preferentially degraded in covered plots.

5. Conclusions

In summary, without N fertilization, conventional tillage plus standard cover crops strongly decreased the soil CN content and markedly increased potential soil polymer degradation. Under the same N fertilization, no-tillage with standard and legume-enriched cover crops improved degradation activity of soil microorganisms (AWCD, carbohydrates and phenolic compounds degradation) and their functional diversity. These results indicate that, without N fertilization, cover crops are required to prevent C and N depletion and to maintain microbial functional activities and diversity.

Irrespectively of N fertilization, cover crops enriched with legumes prevented the strong decrease of C and N content caused by plowing. No-till combined with cover crops increases enzyme activities.

Thereby, under a crop rotation characterized by a low organic C input, a gradual reduction of synthetic N fertilizers is compensated with an increase of cover crop N input must be encouraged to reduce the risk of soil fertility depletion associated with conventional farming practices. However, it is known that soil microbial functional responses may vary seasonally, so, studies including sampling collections throughout seasons and years are required to investigate further the links between cropping systems and microbial communities' behavior at long term.

Acknowledgments

The authors thank all the students who have been involved in this work through their internships since 2009. Pierre Berrezig and Shân Williams (Université de Picardie Jules Verne) as well as Lyla Rothschild are thanked for their critical reading of this manuscript. This research was funded by Bonduelle and Syngenta companies within the framework of the collaborative project VEGESOL. The PhD studies of Elodie Nivelles are funded by a scholarship from the French Ministry of Higher Education and Research.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.08.004>.

References

- Acosta-Martinez, V., Mikha, M.M., Sistani, K.R., Stahlman, P.W., Benjamin, J.G., Vigil, M.F., Erickson, R., 2011. Multi-location study of soil enzyme activities as affected by types and rates of manure application and tillage practices. *Agriculture* 1, 4–21.
- Alef, K., Nannipieri, P., 1998. Urease activity. In: Alef, K., Nannipieri, P. (Eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Acad. Press Harcourt Brace & Company, Publishers, London, pp. 316–320.
- Alvarez, G., Chaussod, R., Cluzeau, D., Godden, B., Lemarié, C., Metzger L., Nicolardot, B., Parat, J., Salducci, X., 2002. Activités biologiques et fertilité des sols. Intérêts et limites des méthodes analytiques disponibles. « Etat et activités biologiques des sols ». ITAB, Online document.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266.
- Bayer, C., Martin-Neto, L., Mielniczuk, J., Pavinato, A., Dieckow, J., 2006. Carbon sequestration in two Brazilian Cerrado soils under no-till. *Soil Tillage Res.* 86, 237–245.
- Bergstrom, D.W., Monreal, C.M., King, D.J., 1998. Sensitivity of soil enzyme activities to conservation practices. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 1286–1295. doi:<http://dx.doi.org/10.2136/sssaj1998.03615995006200050020x>.
- Casida, L.E., Klein, D.A., Santoro, T., 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 98, 371–376.
- Chaussod, R., 1996. La qualité biologique des sols: evaluation et implications. *Etude et Gestion des Sols* 3, 261–277.
- Chen, H., Hou, R., Gong, Y., Li, H., Fan, M., Kuzyakov, Y., 2009. Effects of 11 years of conservation tillage on soil organic matter fractions in wheat monoculture in Loess Plateau of China. *Soil Tillage Res.* 106, 85–94. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2009.09.009>.
- Costa, D., Freitas, H., Paulo, J., 2013. Influence of seasons and land-use practices on soil microbial activity and metabolic diversity in the Montado ecosystem. *Eur. J. Soil Biol.* 59, 22–30. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.08.003>.
- Das, A., Lal, R., Patel, D.P., Idapuganti, R.G., Layek, J., Ngachan, S.V., Ghosh, P.K., Bordoloi, J., Kumar, M., 2014. Effects of tillage and biomass on soil quality and productivity of lowland rice cultivation by small scale farmers in North Eastern India. *Soil Tillage Res.* 143, 50–58. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2014.05.012>.
- Diosma, G., Aulicino, M., Chidichimo, H., Balatti, P.A., 2006. Effect of tillage and N fertilization on microbial physiological profile of soils cultivated with wheat. *Soil Tillage Res.* 91, 236–243.
- Fontaine, S., Bardoux, G., Abbadie, L., Mariotti, A., 2004. Carbon input to soil may decrease soil carbon content. *Ecol. Lett.* 7, 314–320.

- Frac, M., Oszust, K., Lipiec, J., 2012. Community level physiological profiles (CLPP), characterization and microbial activity of soil amended with dairy sludge. *Sensors* 12, 3253–3268.
- Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351–2359.
- Garland, J.L., 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, 289–300.
- Gomez, E., Garland, J., Conti, M., 2004. Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Appl. Soil Ecol.* 26, 21–30.
- Govaerts, B., Mezzalama, M., Unno, Y., Sayre, K.D., Luna-Guido, M., Vanherck, K., 2007. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. *Appl. Soil Ecol.* 37, 18–30.
- Grandy, S.A., Neff, J.C., 2008. Molecular C dynamics downstream: the biochemical decomposition sequence and its impact on soil organic matter structure and function. *Sci. Total Environ.* 404, 297–307.
- Grayston, S.J., Griffith, G.S., Mawdsley, J.L., Campbell, C.D., Bardgett, R.D., 2001. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 33, 533–551. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00194-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00194-2).
- Guinina, A., Kuzyakov, Y., 2015. Sugars in soil and sweets for microorganisms Review of origin, content, composition and fate. *Soil Biol. Biochem.* 90, 87–100.
- Hamido, S.A., Kpombrekou, A.K., 2009. Cover crop and tillage effects on soil enzyme activities following tomato. *Soil Tillage Res.* 105, 269–274. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2009.09.007>.
- Huynh, T.M.D., 2009. Impact des métaux lourds sur les interactions plante/ver de terre/microflore tellurique. Océan, Atmosphère. Université Paris-Est, France.
- Janusauskaite, D., Kadziene, G., Auskalniene, O., 2013. The effect of tillage system on soil microbiota in relation to soil structure. *Pol. J. Environ. Stud.* 22, 1387–1391.
- Jordan, C.F., 2004. Organic farming and agroforestry: alleycropping for mulch production for organic farms of southeastern United States. *Agrofor. Syst.* 61/62, 79–90.
- Kladivko, E.J., 2001. Tillage systems and soil ecology. *Soil Tillage Res.* 61, 61–76. Kusliene, G., Rasmussen, J., Kuzyakov, Y., Eriksen, J., 2014. Medium-term response of microbial community to rhizodeposits of white clover and ryegrass and tracing of active processes induced by ¹³C and ¹⁵N labelled exudates. *Soil Biol. Biochem.* 76, 22–33. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.05.003>.
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept & review. *Soil Biol. Biochem.* 83, 184–199. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025>.
- Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: interactions between living and dead organic matter. *Soil Biol.*

Biochem. 42, 1363–1371.

Lagomarsino, A., Moscatelli, M.C., Di Tizio, A., Mancinelli, R., Grego, S., Marinari, S., 2009. Soil biochemical indicators as a tool to assess the short-term impact of agricultural management on changes in organic C in a Mediterranean environment. *Ecol. Indic.* 9, 518–527.

Machet J.M., Dubrulle P., Louis P., 1990. Azobil¹: a computer program for fertiliser N recommendations based on a predictive balance sheet method. In: Scaife A. Proceedings of the 1 st Congress of the European Society of Agronomy, 5th–7th December 1990, Paris, France. Colmar, France: ESA/INRA/CEC.

Mancinelli, R., Marinari, S., Brunetti, P., Radicetti, E., Campiglia, E., 2015. Organic mulching, irrigation and fertilization affect soil CO₂ emission and C storage in tomato crop in the Mediterranean environment. *Soil Tillage Res.* 152, 39–51. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2015.04.001>.

Mangalassery, S., Mooney, S.J., Sparkes, D.L., Fraser, W.T., Sjogersten, S., 2015. Impacts of zero tillage on soil enzyme activities, microbial characteristics and organic matter functional chemistry in temperate soils. *Eur. J. Soil Biol.* 68, 9–17.

Marinari, S., Masciandaro, G., Ceccanti, B., Grego, S., 2000. Influence of organic and mineral fertilizers on soil biological and physical properties. *Bioresour. Technol.* 72, 9–17.

Marinari, S., Mancinelli, R., Campiglia, E., Grego, S., 2006. Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy. *Ecol. Indic.* 6, 701–711.

Marschner, P., Hatam, Z., Cavagnaro, T.R., 2015. Soil respiration, microbial biomass and nutrient availability after the second amendment are influenced by legacy effects of prior residue addition. *Soil Biol. Biochem.* 88, 169–177.

Martens, D.A., 2000. Plant residue biochemistry regulates soil carbon cycling and carbon sequestration. *Soil Biol. Biochem.* 32, 361–369. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00162-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00162-5).

Mathew, R.P., Feng, Y., Githinji, L., Ankumah, R., Balkcom, K.S., 2012. Impact of No- tillage and conventional tillage systems on soil microbial communities. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2012, 1–10. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2012/548620>.

Mazzoncini, M., Sapkota, T.B., Barberi, P., Antichi, D., Risaliti, R., 2011. Long-term effect of tillage, nitrogen fertilization and cover crops on soil organic carbon and total nitrogen content. *Soil Tillage Res.* 114, 165–174. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2011.05.001>.

Mbuthia, L.W., Acosta-Martínez, V., DeBruyn, J., Schaeffer, S., Tyler, D., Odoi, E., Mpheshea, M., Walker, F., Eash, N., 2015. Long term tillage, cover crop, and fertilization effects on microbial community structure, activity: Implications for soil quality. *Soil Biol. Biochem.* 89, 24–34. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.016>.

Melero, S., Lopez-Garrido, R., Murillo, J.M., Moreno, F., 2009. Conservation tillage: short-and long-term effects on soil carbon fractions and enzymatic activities under Mediterranean conditions. *Soil*

Tillage Res. 104, 292–298.

Nannipieri, P., Eldor, P., 2009. The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. *Soil Biol. Biochem.* 41, 2357–2369.

Nautiyal, C.S., Chauhan, P.S., Bhatia, C.R., 2010. Changes in soil physico-chemical properties and microbial functional diversity due to 14 years of conversion of grassland to organic agriculture in semi-arid agroecosystem. *Soil Tillage Res.* 109, 55–60. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2010.04.008>.

Nunan, N., Lerch, T.Z., Pouteau, V., Mora, P., Changey, F., Kätterer, T., Giusti-Miller, S., Herrmann, A.M., 2015. Metabolising old soil carbon: Simply a matter of simple organic matter? *Soil Biol. Biochem.* 88, 128–136.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O’Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2015. *Vegan: Community Ecology Package Version 2.3-2*. <http://cran.r-project.org/>.

Pohlert, T., 2016. *PMCMR: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums Version 4.1*. <http://cran.r-project.org/>.

Reganold, J.P., Elliott, L.F., Unger, Y.L., 1987. Long-term effects of organic and conventional farming on soil erosion. *Nature* 330, 370–372.

Salinas-Garcia, J.R., Hons, F.M., Matocha, J.E., 1997. Long-term effects of tillage and fertilization on soil organic matter dynamics. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61, 152–159.

Sanginga, N., Dashiell, K., Okogun, J.A., Thottapilly, G., 1997. Nitrogen fixation and nitrogen contribution in promiscuous soybeans in Southern Guinea Savanna of Nigeria. *Plant Soil* 195, 257–266.

Schimel, J.P., Haettenschwiler, S., 2007. Nitrogen transfer between decomposing leaves of different N status. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1428–1436.

Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R., 2012. *Methods in Soil Biology*. Springer.

Six, J., Elliott, E., Paustian, K., 2000. Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *Soil Biol. Biochem.* 32, 2099–2103. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00179-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00179-6).

Staben, M.L., Bezdicek, D.F., Smith, J.L., Fauci, M.F., 1997. Assessment of soil quality in conservation reserve program and wheat-fallow soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61, 124–130.

Sun, R., Zhang, X.X., Guo, X., Wang, D., Chu, H., 2015. Bacterial diversity in soils subjected to long-term chemical fertilization can be more stably maintained with the addition of livestock manure than wheat straw. *Soil Biol. Biochem.* 88, 9–18. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.05.007>.

Tabatabai, M.A., 1994. Soil enzymes. In: Weaver, R.W., Angle, S., Bottomley, P., Bezdicek, D., Smith, S., Tabatabai, A., Wollum, A. (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, Madison, pp. 775–833.

Verzeaux, J., Alahmad, A., Habbib, H., Nivelles, E., Roger, D., Lacoux, J., Decocq, G., Hirel, B., Catterou, M., Spicher, F., Dubois, F., Duclercq, J., Tétu, T., 2016. Cover crops prevent the deleterious effect of nitrogen fertilisation on bacterial diversity by maintaining the carbon content of ploughed soil. *Geoderma* 281, 49–57. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.06.035>.

Zeng, J., Liu, X., Song, L., Lin, X., Zhang, H., Shen, C., 2016. Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. *Soil Biol. Biochem.* 92, 41–49.

Résumé des principaux résultats du chapitre III.

Les points forts de l'article 3 sont :

1. Les sols conduits en semis-direct ont une teneur supérieure en spores de glomérormycètes et sont caractérisés par une activité déshydrogénase supérieure
2. La densité en spores de glomérormycètes est fortement réduite dans les sols conduits en labour avec fertilisation azotée intensive.
3. La forte diminution de la densité en spores de glomérormycètes est associée à de fortes teneurs en phosphore disponible et en nitrate.

Les points forts de l'article 4 sont :

1. Le semis direct stimule les activités enzymatiques des sols, indépendamment de la fertilisation azotée.
2. La gestion semis-direct plus couverts végétaux en inter-culture conduit à la séquestration maximale du carbone organique dans les sols, indépendamment de la fertilisation azotée.
3. L'absence de fertilisation azotée et l'apport de couverts végétaux dans les sols travaillés en semis-direct conduit aux plus hautes réponses fonctionnelles microbiennes (les activités et la diversité).

| Art. 3 | DH | NO3 | PO4 | TN | TOC |
|--------|----|-----|-----|----|-----|
| NT/ N0 | | | | | |
| NT/ NX | | | | | |
| CT/ N0 | | | | | |
| CT/ NX | | | | | |

| Art. 4 | TOC | TN | DH | URE | AWCD | H' |
|------------|-----|----|----|-----|------|----|
| NT/ bf/ N0 | | | | | | |
| CT/ bf/ N0 | | | | | | |
| NT/ cc/ N0 | | | | | | |
| CT/ cc/ N0 | | | | | | |
| NT/ bf/ Nx | | | | | | |
| CT/ bf/ NX | | | | | | |
| NT/ cc/ NX | | | | | | |
| CT/ cc/ NX | | | | | | |

Fig. 22. Schéma récapitulatif qui illustre les grandes tendances des effets des pratiques agricoles sur les indicateurs mesurés pour les articles 3 et 4 de la thèse. En gris : pas d'effet par rapport au témoin NT/N0 (absence de travail du sol, absence de fertilisation azotée) ou NT/bf/N0 (absence de travail du sol, absence de couverts végétaux, absence de fertilisation azotée) ; rouge clair : effet négatif léger par rapport au témoin ; rouge : effet négatif significatif par rapport au témoin ; vert clair : effet positif léger par rapport au témoin ; vert : effet négatif significatif par rapport au témoin. DH : déshydrogénase ; NO3 : teneur en nitrates ; PO4 : teneur en phosphore assimilable ; TN : azote total sol ; TOC : carbone organique total sol ; URE : uréase ; AWCD : activités fonctionnelle microbienne ; H' : diversité fonctionnelle microbienne.

CHAPITRE IV.

EFFETS DE L'HERBICIDE S-METOLACHLORE SUR LES PROPRIETES EDAPHIQUES DU SOL ET SUR LA PRODUCTIVITE VEGETALE DANS DES AGROSYSTEMES DIFFERENCIES

« Nous plaçons désormais la protection des sols au même plan que l'épuration de l'air et de nos ressources en eau. »

Margot Wallström, *commissaire européen chargé de
l'environnement, 2002*

Article 5. La gestion du travail du sol et de la fertilisation azotée change t-elle les potentiels effets de l’herbicide S-metolachlore sur les propriétés édaphiques et la la productivité du maïs ?

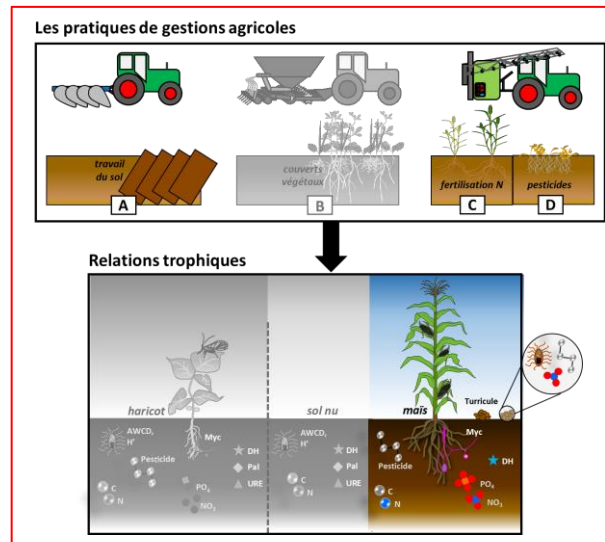


Fig. 23. Effets de la gestion du travail du sol et de la fertilisation azotée sur le devenir du S-metolachlore et sur les indicateurs qualitatifs du sol, la productivité végétale et leurs interactions. Cf. Figure 3 page 22.

Article n°5 (soumis dans *Applied Soil Ecology*)



Does tillage and nitrogen fertilization change the potential effects of the herbicide S-Metolachlor on edaphic properties and maize productivity?

Elodie Nivelles¹, Julien Verzeaux¹, David Roger¹, Jose-Edmundo Nava-Saucedo¹, Thierry Tétu^{1*}

¹Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés (EDYSAN, FRE 3498 CNRS), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, 80029, France.

Abstract

The S-Metolachlor is a selective herbicide currently found in soils and ground water and can represent a risk for human health and environment. Previous studies have reported that the physico-chemical and biological soil properties greatly differ according to the soil management adopted. In agrosystems, cultural practices can thus strongly influence the fate and potential impacts of S-Metolachlor on soil properties, environmental contamination and plant productivity. Within the framework of sustainable soil management, the present study allowed to know the impact of two applications of S-Metolachlor at field rate on edaphic properties and plant productivity. We showed that soil managements such as tillage: no till (NT) or conventional tillage (CT), and nitrogen (N) fertilization: normal dose (NX) or without N fertilization (N0) have influenced certain effects of the herbicide. With respect to the controls, the results revealed that the applications of S-Metolachlor increased the soil concentrations of the herbicide and its degradation metabolites (i.e. sulfonic acid and oxalinic acid) in all management combinations tested (CTN0, CTNX, NTN0, NTNX), except under CTNX for soil S-Metolachlor concentration. Additionally, with respect to the controls, the herbicide increased water and soil nitrate contents for soils managed in CTNX, NTN0, and NTNX. An increase in soil available phosphorus was also registered following the first application of the herbicide in soils managed under conventional tillage (CTN0, CTNX), but this effect was not confirmed after the second application. Finally, S-Metolachlor increased ammonium content in earthworm castings under fertilized soils managed under no-till (NTNX). Even so, regardless herbicide applications, the soil management systems led to contrasted values of soil chemical parameters (S-Metolachlor concentration, soil and water nitrate contents, soil available phosphorus and dehydrogenase activity), plant response parameters (total carbon (C) and N in grain and aboveground biomass of maize), as well as soil biological parameters (colonization of maize roots by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and ammonium content in earthworm castings). The NMDS performed from values obtained in plots treated by the herbicide revealed that N fertilization was the most influential practice on soil total nitrogen (TN), total organic carbon (TOC), water and soil nitrate contents, soil available phosphorus content, and soil S-Metolachlor concentrations, leading to the strongest discrimination in plant and soil biological responses. We conclude that the effects of S-Metolachlor herbicide applications on the below- and above-ground parameters may affect some parameters (i.e. nitrogen cycle), especially under fertilized (i.e. NX) or undisturbed soil (i.e. NT). However, and despite highly contrasted soil properties induced by contrasted soil managements, most of the measured parameters are not affected by the herbicide, especially for biological ones. Given the importance of selective herbicides in agrosystems, the use of S-Metolachlor in maize crops to limit competition for nutrients and light between the cultivated plant and weeds is not a worrying practice to soil preservation.

Keywords: S-Metolachlor Herbicide; Tillage; Nitrogen Fertilization; Soil Environment; Earthworm Castings; Plant Response

1. Introduction

Tillage and nitrogen (N) fertilization are some of the intensive practices which are known to provoke deleterious effects on soil, such as N leaching, reduction in soil total carbon (C) (Horrihan et al., 2002), decrease of enzyme activities (Dick, 1992; Gomez et al., 2004; Janusauskaite et al., 2013; Nivellet et al., 2016), inhibition of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) roles (Egerton-Warburton et al., 2007; Verzeaux et al., 2016) and earthworms activities (Potter et al., 1985; Chan, 2001). Consequently, the efficiency of N fertilizers on crop productivity decreases over time (Horrihan et al., 2002; Tilman et al., 2002). The known deleterious effects of these intensive cultural practices resulted in the adoption of conservation agriculture (Hobbs et al., 2008) which led to increase the use of pesticides in replacement of the mechanical suppression of weeds previously monitored by annual plowing (Matson et al., 1997).

Repeated application of herbicides that have slow degradation rates in the soil environment may lead to toxicity for non-target organisms when applied alone (Rice et al., 2002) or in combination with fertilizers (Munoz-Leoz et al., 2012). S-Metolachlor is a selective herbicide approved for control of most annual grasses in many crops and is thus widely used in maize (*Zea mays L.*) worldwide. Today, the molecule is known to have a high leaching potential into groundwater (Wu et al, 2011), and to be potentially toxic for the soil microbiota and its environment (Ismail and Shamsuddin, 2005; Ayansina and Olso, 2006; Lipsa et al., 2010).

Soil microbiota plays a key role in many ecosystem processes such as the biogeochemical cycle of nutrients and in particular the nitrogen cycle (Ahtiainen et al., 2003; Jeffery et al., 2010) and can be thus considered as relevant indicators of soil quality depletion (Epelde et al., 2008). Among these biological indicators, enzyme activities can predict the capacity of soils to maintain soil fertility (Lupwayi et al., 2010) through their involvement in the recycling of organic matter (Ekenler and Tabatabai, 2003). Dehydrogenase (DH), which reflects the metabolic state of microorganisms in soils (Watts et al., 2010), can be used as an indicator of biological redox systems and as a measure of microbial activity in soils (Saha et al., 2012). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are microorganisms that form obligate symbiosis with plant roots. They enhance the growth of many plant species by increasing the efficiency of nutrient uptake (Sylvia, 1992). Strong evidences suggest that external hyphae of AMF take up immobile nutrients such as P and other toxic substances from soil and translocate them rapidly to host plant (Smith and Read, 2008). The community level of physiological profiles (CLPP) allow the detection of multiple microbial metabolic activities (Liu et al., 2015), some of them being involved in the degradation of the herbicide (Ratcliff et al., 2006). Finally, earthworms play an important role in maintaining the ecological functions of the soil and can be thus used as

biological indicators assessing the ecological risks of toxic substances in the terrestrial environment (Rombke et al., 2005; Reinecke and Reinecke, 2007). Earthworms being potential transporters of pollutants within the soil profile, the chemical analysis of their castings deposited to the soil surface seems to be a relevant indicator of the pesticide remanence.

Currently, previous studies showed that S-Metolachlor caused greater reduction in bacterial and fungal populations (Ismail and Shamsuddin, 2005; Lipsa et al., 2010). Huang et al. (2017) reported substantial effects of the herbicide S-Metolachlor on soil urease activity. Moreover, they showed that soils characterized by low organic matter and fertility level had lower soil enzyme response (catalase, dehydrogenase, urease and cellulase) to S-Metolachlor than those characterized by high organic matter and fertility level. By contrast, other studies showed that S-Metolachlor has no effect on organic matter content and pH when combined with atrazine (Ayansina and Oso, 2006). Studies also showed that S-Metolachlor can induce negative effects on the physiology and activity of earthworms. Xu et al. (2010) showed that, in the short term, S-Metolachlor had fast effects on cellulase and catalase activities of *E. foetida*. Furthermore, studies demonstrated the bioaccumulation of metolachlor in edible species, thus raising concerns for human health (Chesters, 1989).

It is now recognized that some pesticides affected AMF development, inhibiting spore germination and/or hyphal growth (Giovannetti et al., 2006; Pasaribu et al., 2011) and led in the long term decline in crop yields (Heinonen-Tanski et al., 1986). However, literature is poor on (1) the direct effects of S-Metolachlor on soil and plant parameters and their interactions and (2) the effects of S-Metolachlor under contrasted agricultural management practices. Some early studies showed that the use of no-till (NT) in maize monoculture alters the physical structure, chemical composition and biological activities of the soil (Doran, 1982), which may be a factor in the biological transformation of pesticides (Bollag and Liu, 1990). Thus, Levanon et al. (1993) reported that increased levels of soil organic matter and microbial activities in the upper layer of no-till systems may be favorable to reduce pesticide mobility and improve biotransformation. Indeed, the capacity of a soil practice for pesticide sorption and degradation determines its efficiency for buffering their non-target impacts (Locke and Zablotowicz, 2004).

The aims of this study were to (1) analyze the direct effects of S-Metolachlor on some soil indicators and its consequences on maize physiological parameters and productivity; (2) compare the effects of S-Metolachlor under four contrasted agrosystems conducted over the past 6 years. The agrosystems were characterized by conventional tillage (CT) or no-till (NT), both being combined (NX) or not (N0) with nitrogen fertilization. We hypothesize that S-Metolachlor may induce changes in soil chemical and biological properties leading to consequences on physiological parameters and productivity of maize, but that these changes can be buffered by soil management practices.

2. Materials and Methods

2.1. Site description

The field experiment was conducted at “La Woestyne” experimental site, in Northern France (50°44'N, 2°22'E, 40 m above sea level). The average annual air temperature and total precipitation between 2010 and 2015 were 11°C and 620 mm, respectively, with rainfall relatively homogeneous across seasons. Soil particle size composition is characterized by 668 g kg⁻¹ silt, 212 g kg⁻¹ clay, and 120 g kg⁻¹ sand (silty clay loam).

Prior to the experiment's establishment, the field was conducted under chisel plough and rotary power system, fertilized conventionally, and cultivated with wheat (*Triticum aestivum*). In 2010, the experimental field was split into placed randomly with: two N fertilization regimes (without (N0) or with (Nx) N fertilization), two tillage systems (no-till (NT) or conventional tillage (CT)) and with cover crop enriched in leguminous species. Cover crops and were composed of non-leguminous species: oats (*Avena sativa*), phacelia (*Phacelia tanacetifolia*), flax (*Linum usitatissimum*), as well as leguminous species: vetch (*Vicia sativa*), faba bean (*Vicia faba*), and Egyptian clover (*Trifolium alexandrinum*). The plots received 60 seeds m⁻² of oats, 600/200 seeds m⁻² of phacelia, 80 seeds m⁻² of flax, 50 seeds m⁻² of vetch, 30 seeds m⁻² of faba bean, and 400 seeds m⁻² of Egyptian clover. All cover crop seeds were mixed and simultaneously sown in line. Each year, cover crops were sown immediately after the harvest of the previous crop and were terminated by grinding following a frost period. Before the main crops were sown, cover crop residues were buried by a conventional moldboard plough to a depth of 30 cm in CT plots and left on the ground in NT plots. Crop protection against weed development and pests was ensured conventionally according to recommended local practices, and all the treatments received the same molecules and doses. Neither potassium-phosphate nor other elements were applied throughout the experiment.

During the 6-year period of the experiment, the main crop rotation pattern was wheat, bean (*Faba bean*), wheat, pea (*Pisum sativum*), corn (*Zea mays*) and corn. Wheat in 2010 and 2012 was sown in mid October at a row spacing of 12.5 cm using an AS 400 drill (Alpego, Italia) and harvested in late July. Green pea and bean were sown in mid April and July at a row spacing of 17 and 35 cm using a Turbosem drill (Herriau, France) and harvested in early June and September respectively. Flax was sown in early April at a row spacing of 12.5 cm using an AS 400 drill (Alpego, Italia) and harvested in mid July. Only corn was cultivated for forage and other main crop residues were returned to the soil. The Table 1 shows the values of soil biological, chemical, and physical parameters on the 0-20 cm depth soil layer before the addition of S-Metolachlor.

Table 1. Values of soil biological, chemical, and physical parameters on the 0-20 cm depth soil layer before the addition of S-Metolachlor

| | CTN0 | CTNX | NTN0 | NTNX |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| DH ($\mu\text{g TPF g}^{-1} 24\text{h}^{-1}$) | 8.22 \pm 0.36 | 7.63 \pm 0.55 | 12.58 \pm 1.22 | 8.35 \pm 1.6 |
| NO3s (mg kg^{-1}) | 11.25 \pm 1.12 | 8.49 \pm 1.21 | 2.91 \pm 0.06 | 3.35 \pm 0.18 |
| NO3w (mg L^{-1}) | 44.67 \pm 2.65 | 61.76 \pm 3.81 | 18.13 \pm 2.04 | 27.62 \pm 3.67 |
| PO4 (mg kg^{-1}) | 51.37 \pm 2.38 | 42.55 \pm 3.45 | 38.08 \pm 2.21 | 41.58 \pm 2.11 |
| TN (g kg^{-1}) | 1.18 \pm 0.02 | 1.25 \pm 0.07 | 1.18 \pm 0.04 | 1.21 \pm 0.06 |
| TOC (g kg^{-1}) | 12.04 \pm 0.19 | 11.59 \pm 0.89 | 11.54 \pm 0.48 | 11.75 \pm 0.51 |
| C:N ratio | 10.17 \pm 0.08 | 9.29 \pm 0.31 | 9.74 \pm 0.12 | 9.74 \pm 0.16 |
| S-Meto (pg mL^{-1}) | 120.52 \pm 34.43 | 128.77 \pm 38.64 | 125.46 \pm 46.93 | 119.42 \pm 27.91 |
| ESA-Meto (pg mL^{-1}) | 5094.29 \pm 573.87 | 4351.25 \pm 435.24 | 5653.75 \pm 563.54 | 6304.01 \pm 741.85 |
| OXA-Meto (pg mL^{-1}) | 2301.25 \pm 228.72 | 3008.75 \pm 351.86 | 896.61 \pm 160.73 | 1262.35 \pm 242.83 |

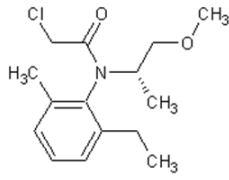
Values are means \pm standard error. DH, dehydrogenase; TPF, Triphenyltetrazolium formazan; NO3s, nitrate extractible from soil; NO3w, nitrate from soil solution; PO4, available phosphorus; TN, total nitrogen; TOC, total organic carbon; C:N ratio, ratio carbon:nitrogen; S-Meto, S-Metolachlor; ESA-Meto, sulfonic acid Metolachlor; OXA-Meto, oxanilic acid Metolachlor; CTN0, conventional tillage without nitrogen fertilization; CTNX, conventional tillage with nitrogen fertilization; NTN0, no-till without nitrogen fertilization; NTNX, no-till with nitrogen fertilization.

2.2. Experimental design

In order to study the effects of tillage, N fertilization and herbicide on the edaphic parameters and their qualitative and quantitative consequences on the productivity of agrosystems, the field experimental was split into four replicate plots for each of the eight treatments (32 plots): conventional tillage with (CTNX) or without (CTN0) N fertilization; no-till with (NTNX) or without (NTN0) N fertilization. 16 plots were treated with S-Metolachlor while 16 plots were used as non-treated controls in which a manual weeding was performed. Each plot measured 2 m \times 1 m. In mid May, 100 kg N per hectare were applied in NX plots according to the N budget method (Machet et al., 1990). At the end of May and early July, two applications of S-Metolachlor were performed on the 16 treated plots (960g L⁻¹) while the same amount of water was added to the 16 control plots. The relevant characteristics of the

S-Metolachlor (2-chloro-6'-ethyl-N- (2-methoxy-1-methylethyl)acet-o-toluidide) are listed in Table 2 (Stenersen, 2004). Maize was sown in early May at a row spacing of 75 cm with a Maxima drill (Kuhn, France) and harvested in late September (Fig. 1).

Table 2. Characteristics of the herbicide S-metolachlor

| S-Metolachlor | |
|---------------------------------|--|
| Manufacturer | Syngenta |
| Agrochemical formulation | 960 g a.i. L ⁻¹ , EC |
| Molecular formula | C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂ |
| Molecular weight | 283.80 g mol ⁻¹ |
| Chemical structure |  <p style="text-align: center;">(S)-isomer</p> |
| Water solubility | 480 mg L ⁻¹ at 25 °C |

a.i., active ingredient; EC, emulsifiable concentrate

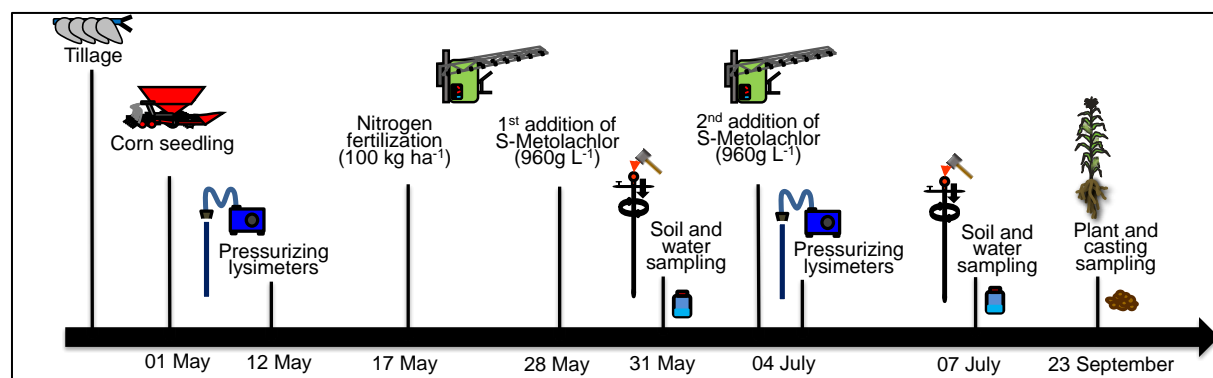


Fig.1. Chronological representation of the field experiment, from the last plowing to the maize harvest.

2.3. Measurement of soil parameters

2.3.1. Soil chemical and biological analyses

Soils were 2 mm sieved and oven-dried at 45°C for 48 hrs. Moisture was measured after drying samples at 105°C for 24 hrs. For total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN) and available phosphorus (PO₄³⁻), sieved soil was finely ground by using a ball-mill (Retsch, MM400). TOC and TN

were analyzed using a CN elemental analyzer (Flash EA 1112, Thermo Electron, Germany). Since analyses performed before the experiment setup revealed that the soil was free of carbonate, the soil total C was assumed to be equal to the TOC. The nitrate (NO_3^- -N) content of the soils was determined by extracting the soil samples with 2 M KCl (1:5 fresh mass ratio) for 1 h on a rotary shaker. The extracts were centrifuged for 10 min at 4000 rpm and supernatants were analyzed by a continuous flow analytical system (Alpkem flow solution IV power base, OI Analytical, USA). The PO_4^{3-} content was determined by extracting the soil samples with 0.5 M NaHCO_3 pH 8.5 (1:20 dry mass ratio) and was measured in the extract using the colorimetric method at 882 nm (Olsen et al., 1954).

Dehydrogenase activity (DH) based on the reduction of the 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) to triphenyl tetrazolium formazan (TPF) was determined according to Casida (1964) with some modifications (Nivelle et al., 2016). Soil samples prepared with CaCO_3 (100:1 fresh mass ratio) were mixed both in a 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) solution (3 %) and in deionized water, and then incubated at 37°C for 24 hrs in a dark room. After incubation, TPF was extracted with a solution of pure methanol. After filtration, TPF concentrations were determined by spectrophotometry at 485 nm.

2.3.2. Water chemical analyses

One week before soil sampling, 3 lysimeters were inserted at 20 cm depth in each of the 16 plots. Soil water was sampled at the same time of soil sampling. The water obtained in the 3 lysimeters by plot was composited as a single sample. Soil water NO_3^- -N content was directly analyzed with the Alpkem Flow Solution IV continuous flow analytical system.

To determine the concentrations of S-Metolachlor and its two metabolites of degradation (sulfonic acid (ESA metolachlor) and oxanilic acid (OXA metolachlor)), water sampled in lysimeters was transferred into 10 mL vials. The vials were stored at 4 ° C for one week prior to analysis. An HPLC Prominence UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatography, Shimadzu®) and a mass spectrometer 3200 Q-Traq (AB-Sciex®) were used for the extraction of S-Metolachlore and its two metabolites. The chromatographic separation was done with a chromatography column Kinetex®, C18 100 mm for positive ionisation and a column Synergi-fusion RP®, C18 50 mm for negative ionisation equipped with a SecurityGuard from Phenomenex (CA, USA). The powders of the S-Metolachlor herbicide (Syngenta®) were diluted in a mixture acetonitrile / water (90/10, v: v) in order to produce the solution at a concentration of 0.5 mg mL^{-1} . Two internal standards of Atrazine D5 (100 ng / mL) for positive ionization and Dinoseb (50 ng / mL) for negative ionization were used (Sigma-Aldrich®).

2.4. Measurement of plant parameters

2.4.1. Percentage of root colonization

AMF colonization of beans was monitored in 30 root subsamples of 1 cm length per plant. Subsamples were stained with trypan blue according to Koske and Gemma (1989). Mycorrhizal infection was quantified using the method of McGonigle et al. (1990), with 150 intersections counted for each sample.

2.4.2. Aboveground biomass at harvest

At harvest, a 3 × 1 linear meter row of maize was sampled in each plot. The part of the plant that is commonly harvested (i.e., grains) was separated from the rest of the aboveground biomass (i.e., crop residues incorporated into the soil). Samples were oven-dried at 65 °C for 3 days and subsequently weighed (± 0.1 g accuracy) to determine total aboveground biomass. Each sample was then ground into a powder prior to C and N analysis using an elemental analyser (Flash EA 1112 series, Thermo Electron, Germany).

2.5. Worm castings analysis

2.5.1. Chemical analyses

Nitrate (NO_3^- -N) and ammonium (NH_4^+ -N) were extracted from earthworm castings as previously shown in the subsection 2.3.1 and were analyzed by a continuous flow analytical system (Alpkem flow solution IV power base, OI Analytical, USA). Eurofins laboratories GfA (Germany), performed analysis of S-Metolachlor by using a liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

2.5.2. Community level of physiological profiles

CLPP was assessed using Biolog EcoPlates™ (BIOLOG, Hayward, USA) as described by Govaerts et al. (2007). The analysis of CLPP was completed within 24 hours after sampling. Briefly, 10 g of fresh soil samples were shaken for 60 min with 90 mL of sterilized saline solution (0.85 % NaCl, w/v) and brought to a 10^{-3} final dilution. Each well of the Biolog EcoPlates was inoculated with 150- μL from each extraction into three replicates. The plates were incubated at 25°C in the dark for 196 hrs and read at 590 nm every 24 hrs. Data recorded at the exponential phase (120 hrs) were used to calculate the average well color development (AWCD) and Shannon index (H'). AWCD and H' represent the soil functional activity and diversity respectively.

2.6. Data analysis

All statistical analyses were performed using R software v. 3.1.2 (R Development Core Team, <http://www.R-project.org>, 2014). The 31 Biolog substrates were grouped for AWCD and H' calculation. In figures, differences between treatments were performed by a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by a Conover post-hoc test ($p < 0.05$). Tests were performed using the PMCMR package

(Pohlert et al., 2016). A Tukey test was performed using the “agricolae” package (de Mendiburu, 2016). Values given in figures correspond to the average of 4 data ($n = 4$) \pm standard error (S.E).

Correlations between environmental variables (soil parameters), plant and worms’ castings parameters were computed using Spearman’s rank correlation coefficient (“Hmisc” package). A non-metric multidimensional scaling (NMDS) of the plot \times plant and worm responses matrix was performed to visualize the effects of the agrosystem on soil, plant and worm parameters, by using the Bray-Curtis distance and the “vegan” package in R. To see how these compositional differences were related to environmental variables, the significant impacting variables were fitted onto the NMDS ordination using the ‘envfit’ function in “vegan” package (Oksanen et al., 2015).

3. Results

3.1. Effects of S-Metolachlor applications on edaphic properties and physiological response of maize

With respect to untreated soils (control), the first and second applications of S-Metolachlor significantly increased ($p < 0.05$) S-Metolachlor concentration of unfertilized soils under conventional tillage and no-till (CTN0, NTN0) (Fig. 2A). As compared to the controls, only the second application of the herbicide led to a significant increase ($p < 0.05$) of S-Metolachlor concentration in fertilized soils managed under no-till (NTNX) (Fig. 2A). Similarly, as compared with the control, the second application of S-Metolachlor significantly increased ($p < 0.05$) the degradation of S-Metolachlor metabolites: sulfonic acid (ESA-MET) and oxanilic acid (OXA-MET) in all the soil management tested (CTN0, CTNX, NTN0, NTNX) (Fig. 2B and 2C).

As compared to untreated soils (control), the first and second applications of S-Metolachlor significantly increased ($p < 0.05$) the extractible nitrate and available nitrate in water contents under NTNX (Fig. 3B et C). In parallel, the soil nitrate contents were significantly increased ($p < 0.05$) in CTNX only after the first application and in NTN0 only after the second application of the herbicide (Fig. 3C). With respect to the controls, only the first application significantly increased ($p < 0.05$) the soil available phosphorus contents in CTNX and CTN0 (Fig. 3D).

As compared to the controls, both applications of S-Metolachlor resulted in a significant increase ($p < 0.05$) of ammonium content in earthworm castings under NTNX only (Fig 4F) at the harvest stage of maize.

3.2. Effects of soil management on edaphic properties

The concentration of S-Metolachlor was significantly higher ($p < 0.05$) in soils managed under no-till without fertilization (NTN0) with respect to annually plowed soils without N fertilization

(CTN0). After the second application of S-Metolachlor, the concentration of the molecule was significantly higher in NTN0 ($p < 0.05$) with respect to CTNX soils (Fig.2A).

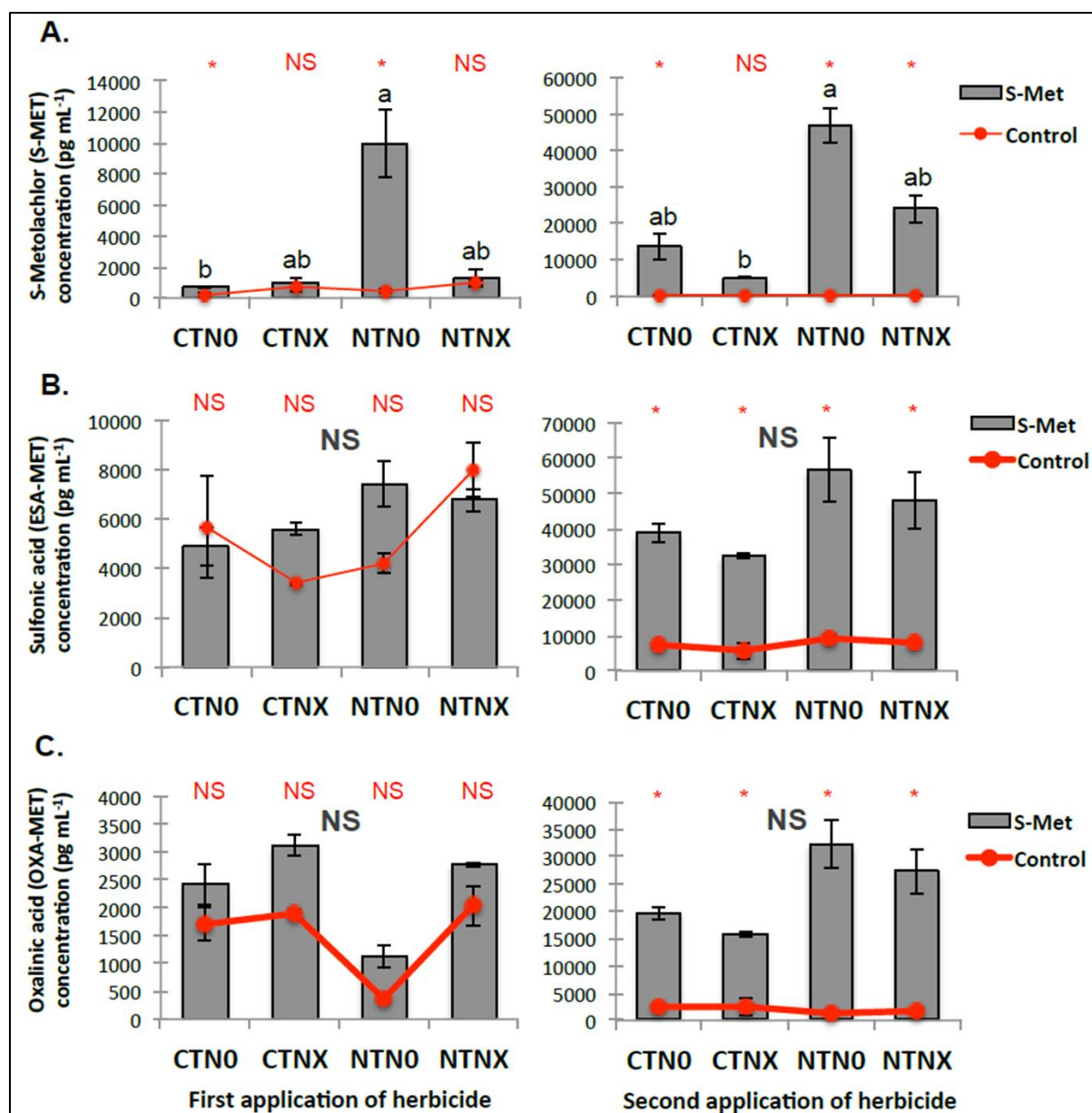


Fig. 2. Concentrations of the herbicide S-Metolachlor (A) and its degradation metabolites (B and C) in the soil solution following one or two application in the field. Values are means \pm standard error. Red stars indicate the significance level of the Mann-Whitney test between soil treated with S-Metolachlor (grey bars) and the control without herbicide (red line) ($*P < 0.05$). Letters indicate significant differences between the four soil managements treated with S-Metolachlor (grey bars) according to a Conover post-hoc test ($P < 0.05$) following a significant Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$). NS, not significant; S-Met, S-Metolachlor; ESA-MET, sulfonic acid Metolachlor; OXA-MET, oxalilic acid Metolachlor; CTN0, conventional tillage without nitrogen fertilization; CTNX, conventional tillage with nitrogen fertilization; NTN0, no-till without nitrogen fertilization; NTNX, no-till with nitrogen fertilization.

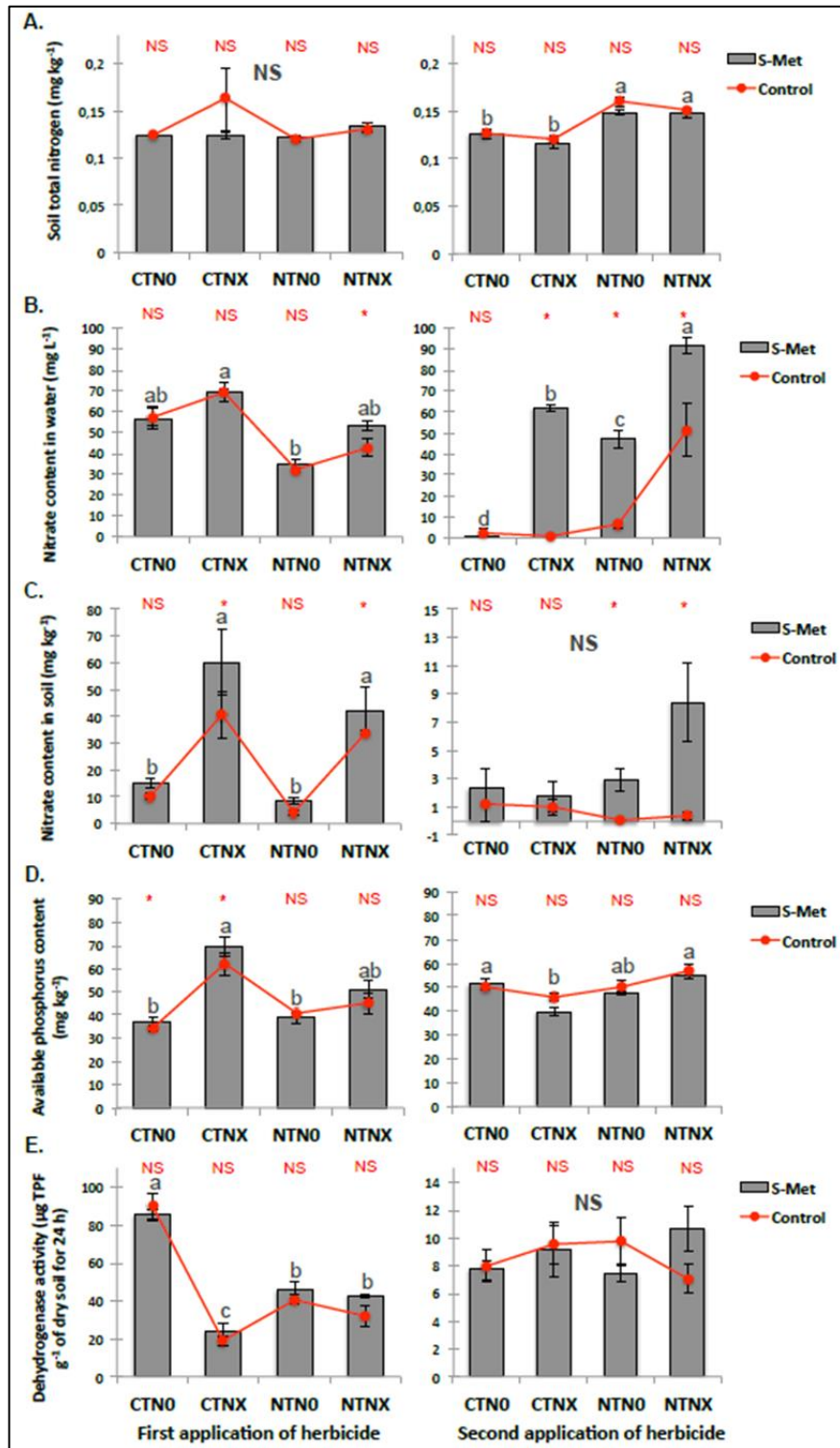


Fig. 3. Soil total nitrogen (A), nitrate (B and C), and available phosphorus (D) contents, as well as dehydrogenase activity (E) following one or two application in the field. Values are means \pm standard error. Red stars indicate the significance level of the Mann-Whitney test between soil treated with S-Metolachlor (grey bars) and the control without herbicide (red line) ($*P < 0.05$). Letters indicate significant differences between the four soil managements treated with S-Metolachlor (grey bars) according to a Conover post-hoc test ($P < 0.05$) following a significant Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$). NS, not significant; S-Met, S-Metolachlor; TPF, Triphenyltetrazolium formazan; CTNO, conventional tillage without nitrogen fertilization; CTNX, conventional tillage with nitrogen fertilization; NTNO, no-till without nitrogen fertilization; NTNX, no-till with nitrogen fertilization.

After the first application of S-Metolachlor, the water nitrate ($p < 0.05$) and soil available phosphorus contents were significantly higher ($p < 0.01$) in CTNX soils as compared to NTN0 soils (Fig. 3B and D). Also, the soil nitrate content was significantly higher ($p < 0.01$) in all the fertilized soils (NX) as compared to unfertilized soils (N0), regardless tillage management (NT vs. CT) (Fig. 3C). Conversely, the dehydrogenase activity (DH) was significantly decreased ($p < 0.01$) in CTNX soils as compared to other cropping systems (CTN0, NTN0 and NTNX). We can note that the values of DH were significantly higher in CTN0 with respect to NTNX and NTN0 (Fig. 3E).

Following the second application of S-Metolachlor, the soil total nitrogen contents was higher in NT soils ($p < 0.01$) as compared to CT soils and irrespectively of N fertilization (NX and N0) (Fig. 3A). Similarly, the water nitrate contents was higher ($p < 0.01$) in NX soils management compared to N0 and irrespectively of the tillage system (CT and NT). We can note that no-till plus N fertilization (NTNX) had the greatest values in water nitrate contents as compared to other management practices (CTNX < CTN0 < NTN0) (Fig. 3B). The soil available phosphorus contents was higher ($p < 0.01$) in CTN0 and NTNX as compared to CTNX (Fig. 3D).

3.3. Effect of soil management on earthworm castings and plant responses

Following both applications of S-Metolachlor, the plant aboveground biomass was higher ($p < 0.05$) in fertilized soils under annual plowing (CTNX) as compared to unfertilized soils (CTN0 and NTN0) (Fig. 4A). We can note a significant increase ($p < 0.05$) of grain carbon and nitrogen ($p < 0.05$) in CTNX soils as compared to NTN0 and NTNX soils respectively (Fig. 4B and C). The grain C:N ratio was significantly lower ($p < 0.05$) in CTNX compared to NTNX and CTN0 (Fig. 4D). Moreover, the percentage of root length colonized by arbuscular mycorrhizal fungi increased ($p < 0.05$) in NTN0 soils as compared to CTN0 soils (Fig. 4E). Finally, the results showed a significant increase ($p < 0.05$) of ammonium contents in the earthworm castings of soils managed under NTN0 as compared to those managed under CTN0 and CTNX (Fig. 4F).

3.4. Relationships between edaphic properties, earthworm castings and physiological response of maize

The NMDS revealed that, regardless tillage, fertilized soils (i.e. CTNX and NTNX) contained close grain and aboveground biomass, as well as nitrate content in earthworm castings (casting NO₃). By contrast, CTN0 and NTN0 soils were strongly separated. The second axis mainly separated fertilized from unfertilized plots and positively correlated with water ($p < 0.05$) and soil ($p < 0.001$) nitrate contents and soil available phosphorus content ($p < 0.01$).

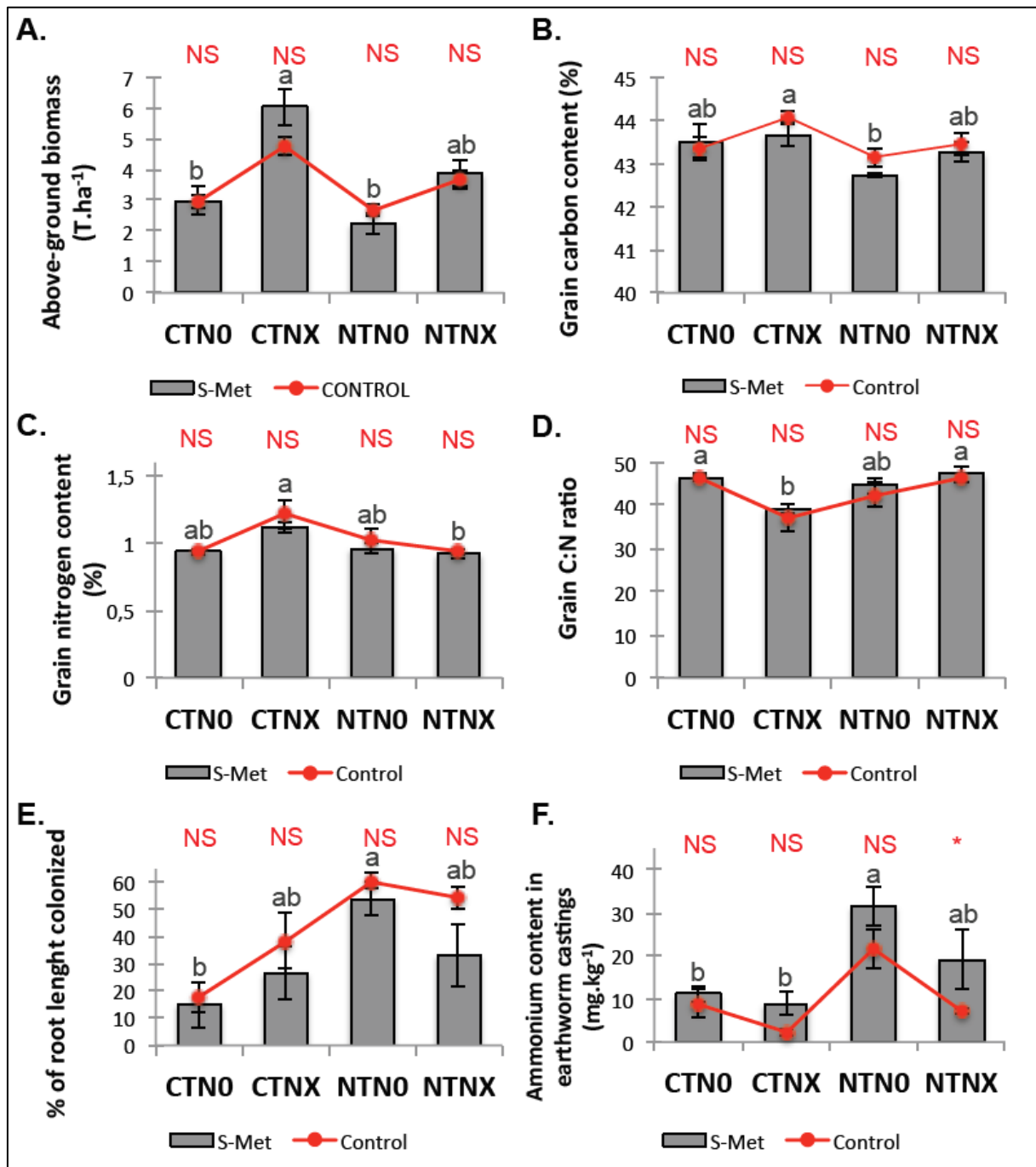


Fig. 4. Plant physiology parameters (A, B, C, and D), colonization rate of maize roots by arbuscular mycorrhizal fungi (E), and ammonium content in earthworm castings (F) at the harvest of maize crop. Values are means \pm standard error. Red star indicates the significance level of the Mann-Whitney test between soil treated with S-Metolachlor (grey bars) and the control without herbicide (* $P < 0.05$). Letters indicate significant differences between the four soil managements treated with S-Metolachlor (grey bars) according to a Conover post-hoc test ($P < 0.05$) following a significant Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$). NS, not significant; S-Met, S-Metolachlor; CTNO, conventional tillage without nitrogen fertilization; CTNX, conventional tillage with nitrogen fertilization; NTNO, no-till without nitrogen fertilization; NTNX, no-till with nitrogen fertilization.

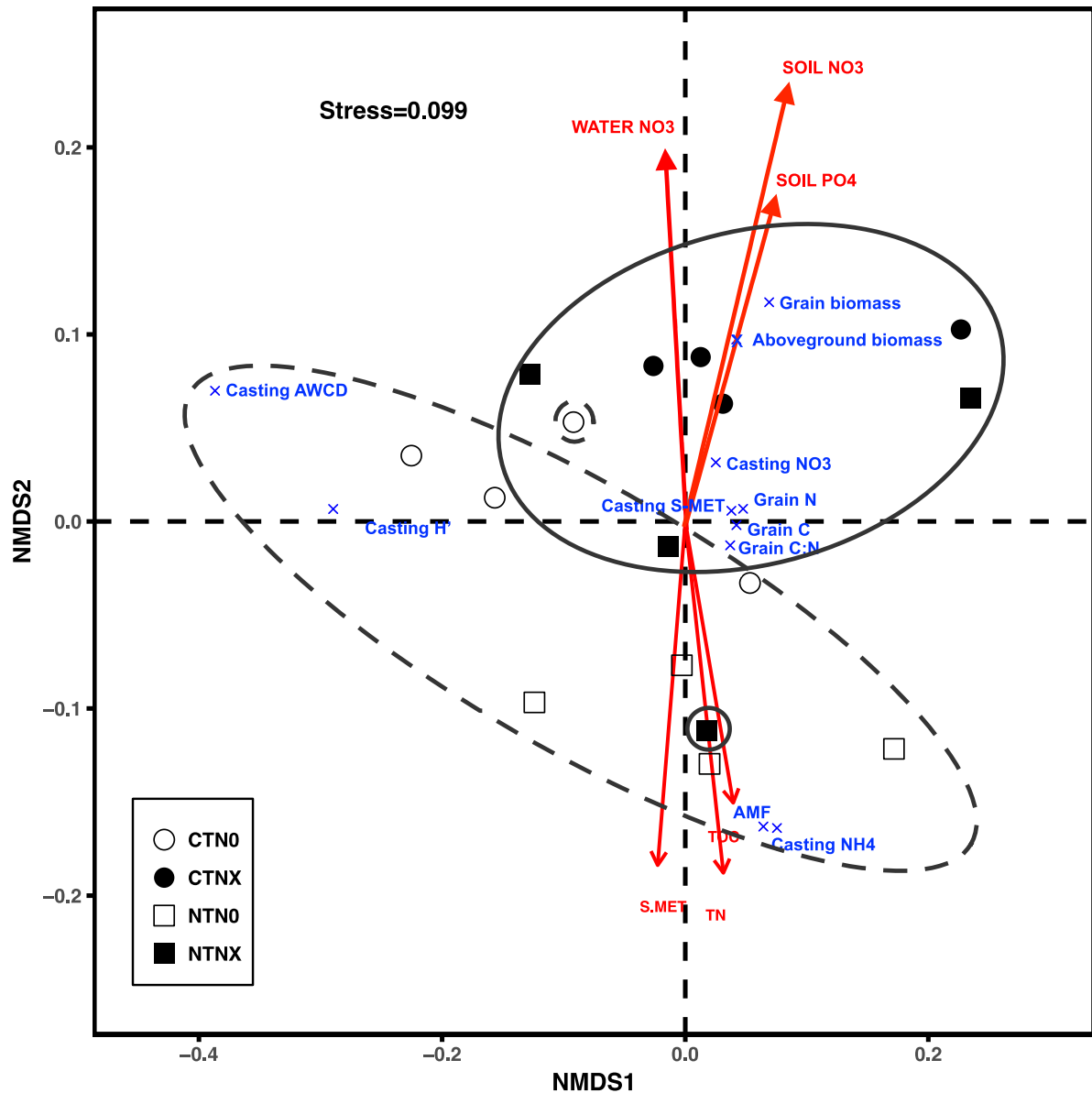


Fig. 5. Non metric multidimensional scaling (NMDS) performed from environmental (soil chemical properties) and response variables (maize physiology and productivity, as well as soil biological activities) in soils treated with S-Metolachlor. SOIL NO₃, soil extractable nitrate content; WATER NO₃, nitrate content in soil solution; SOIL PO₄, soil available phosphorus content; TOC, soil total organic carbon; TN, soil total nitrogen; S.MET, soil S-Metolachlor content; Grain biomass, grain biomass of maize at harvest stage; Aboveground biomass, total aboveground biomass of maize at harvest stage; Grain N, nitrogen content in maize grain; Grain C, carbon content in maize grain; Grain C:N, carbon:nitrogen ratio in maize grain; Casting AWCD, average well colour development in earthworm castings; Casting H', microbial functional diversity in earthworm castings; Casting NO₃, nitrate content in earthworm castings; Casting NH₄, ammonium content in earthworm castings; Casting S-MET, S-Metolachlor content un earthworm castings; AMF, colonization rate of maize roots by arbuscular mycorrhizal fungi; CTN0, conventional tillage without nitrogen fertilization; CTNX, conventional tillage with nitrogen fertilization; NTN0, no-till without nitrogen fertilization; NTNX, no-till with nitrogen fertilization.

Conversely, the second axis was negatively correlated with S-Metolachlor concentrations in soil solution ($p < 0.01$), soil total nitrogen ($p < 0.01$) and organic carbon contents ($p < 0.05$). The fertilized soils (CTNX and NTNX) were positively correlated with the second axis, due to a greater grain and

aboveground biomass. In parallel, unfertilized soils (CTN0 and NTN0) were negatively correlated with the first axis, due to greater values of microbial functional activity (casting AWCD) and diversity (casting H') in earthworm castings. CTN0 and NTN0 were also negatively correlated with the second axis, due to greater values of ammonium content in earthworm castings (casting NH₄) and colonization rate of maize roots by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The plant responses, as well as the S-Metolachlor and nitrate contents in earthworm castings were positively affected by N fertilization while the AMF, microbial functional responses and ammonium content in earthworm castings (AWCD, H', NH₄) were negatively affected by N fertilization (Fig. 5).

4. Discussion

In this study, the effects of the application of the selective herbicide S-Metolachlor on soil chemical and biological properties as well as maize productivity were tested under four contrasted cropping systems (i.e. annual plowing or no-till with or without nitrogen fertilization).

4.1. Soil chemical properties

Whatever the tillage system, one or two applications of S-Metolachlor led to increased concentrations of the herbicide and its degradation metabolites in soil, except for fertilized plowed soils for which only the degradation metabolites were increased as compared to the control. This suggests that under annual plowing system, nitrogen fertilization speeds up the degradation of the herbicide molecule in degradation metabolites (i.e. sulfonic acid and oxalinic acid). This is consistent with White et al. (2010), who have previously shown that edaphic changes induced by agricultural practices may be involved in S-Metolachlor degradation in soils. They studied the effect of fungicide applications on S-Metolachlor degradation, but, as the literature is poor on the topic, we suggest that chemical changes induced by plowing, by altering microbial activities (Nivelle et al., 2016), may critically alter the degradation of organic molecules added to the soil. Moreover, it is accepted that no-till, by accumulating organic residues and organic matter near the soil surface (Alletto et al., 2010) provides greater S-Metolachlor adsorption in the first layer of the soil profile (Youbin et al., 2009). It may result in a decreased bioavailability to microbial degradation, thus increasing the persistence of the herbicide in soil (Alletto et al., 2013). By contrast, the accumulation of organic matter in the first horizon of the soil profile may also enhance microbial biomass and activity, thus reducing metolachlor half-life (Rice et al., 2002; Wu et al., 2011). The results obtained in our study are consistent with the first the first assumption for which S-Metolachlor persistence is higher under no-till system.

The nitrate content in soil solution was increased by two applications of S-Metolachlor for all the treatments, except for conventional tillage without nitrogen fertilization, where nitrate content was close

to zero in both control and treated soils. This suggests that under annual plowing system, the last addition of nitrogen through fertilization is responsible of increased levels of nitrates, since unfertilized plowed soils are nitrate free. At the opposite, unfertilized soils under no-till revealed nitrate concentrations nearby 2-fold lower than those which received fertilization. The higher nitrate concentrations in CTNX, NTN0 and NTN1 reveals a priming role of S-Metolachlor on nitrogen mineralization. Indeed, higher values of soil extractible nitrogen were obtained in the same treatments following one or two applications of S-Metolachlor with respect to the controls.

The present study revealed that the first application of S-Metolachlor increased the content of available phosphorus in plowed soils, but this effect seems limited since values obtained following the second application showed no differences. However, regardless herbicide application, the fertilized plowed soils displayed the higher values of PO₄ following the first application of the herbicide, and the lowest values following the second application, suggesting an important lixiviation process as previously shown by nitrate analyses.

4.2. Soil biological response

Microbial degradation by fungal and bacterial activities is considered as the major pathway for metolachlor transformation in soil (Accinelli et al., 2001; Ma et al., 2006). The metolachlor is degraded by several metabolic reactions, but is not used as energy source for growth of microorganisms (Childs, 2007), except for some microorganisms that mineralize metolachlor by using the herbicide as source of carbon (Munoz et al., 2011). Thus, the addition of such product into the soil induces evident consequences on soil microbial responses than can be measured through the analysis of some soil indicators. Moreover, the herbicide persistence in soil being influenced by sorption, volatilization, leaching, and degradation processes, the management practices, by affecting edaphic properties, influence S-Metolachlor dissipation in soil (Zemolin et al., 2014). The role of earthworms, and more globally of the drilosphere (i.e. the whole soil volume under earthworm influence), in microbial processes and nutrient cycles is well documented. Indeed, it has been shown that earthworm's activities were involved in soil organic matter decomposition, through activation of microbial activities (Brown et al., 2000). The ammonium content of turricules was higher in undisturbed and fertilized soils (i.e. NTN1) that received S-Metolachlor, suggesting that the herbicide increases N mineralization of ingested organic material in these soils, thus accentuating drilospheric microbial activation. According to the results, the herbicide did not affect the dehydrogenase activity, while N fertilization, by its known depressive action on microbial activities in plowed soils (Zuber et Vilamil, 2016), led to decreased dehydrogenase activity in CTNX. Surprisingly, the higher values of dehydrogenase activity were obtained in plowed soils that did not receive N fertilization, while no till cropping systems are expected to improve microbial activities (Mangalassery et al., 2015; Nivellet al., 2016).

4.3. Plant productivity

The addition of S-Metolachlor did not affect the above-ground biomass of maize. This is not surprising since in plots that did not receive the herbicide, weeds were mechanically suppressed, thus providing equal conditions of nutrient and light access for maize than in chemically weeded soils. However, irrespectively of herbicide application, N fertilization increased aboveground biomass of maize with respect to unfertilized soils under annual plowing. Even so, N fertilization did not affect maize productivity under no tillage system. Moreover, grain yield was not significantly affected by cropping system, including N fertilization. In our study, all plots are conducted in a crop rotation including leguminous species as main crops, and legume-rich cover crop mixtures during winter periods. The N supply originated from decomposition of main crop and cover crop residues with low C:N ratio may explain why maize grain yields are not significantly decreased in absence of synthetic N fertilization. However, analyses of plant C and N contents reveal that N transfer in maize grain is improved by conventional annual plowing and N fertilization, as compared to no-till system with N fertilization. Taking into account that yields are not significantly affected by cropping system, this may also suggest that plants with higher N contents, but not higher yields have a lower N utilization efficiency. This is consistent with Habbib et al., (2016), who revealed that maize conducted under no-till with continuous cover cropping system is characterized by improved N utilization efficiency. The lack of differences in yields between fertilized and unfertilized maize may also been explained by the deleterious effect of N fertilization on arbuscular mycorrhizae (Verzeaux et al., 2016), a group of fungi highly involved in plant nutrient acquisition through establishment of root symbiosis. Indeed, soils managed under zero tillage without N fertilization since the beginning of the experiment were characterized by the highest rates of root colonization by arbuscular mycorrhizae fungi. This is consistent with a broad literature that describes the disruption of mycorrhizal networks induced by plowing, thus limiting the potential benefits provided by these fungi. In our study, the extension of the rhizosphere by the hyphosphere which is known to significantly increase the nutrient acquisition potential of plants, may have compensated the absence of N supply in soils managed under no-till.

4.4. Combined interpretation of above and below-ground parameters

The non-metric multidimensional scaling performed from soil chemical parameters as environmental data and soil microbial and plant performance as response data, revealed that fertilized soils with high mineral nutrients (i.e. nitrates and available phosphorus in CTNX and NTNX) were opposed to undisturbed and unfertilized soils characterized by high levels of organic matter and herbicide (i.e. TOC, TN and S-Metolachlor in NTN0). As expected, fertilized soils were generally

associated with higher aboveground and grain biomass. Interestingly, and as previously described by Kruskal-Wallis tests, the maize roots were more colonized by arbuscular mycorrhizae in soils subjected to no-till without N fertilization. Moreover, the same conditions provided higher ammonium content in earthworm casts. For both parameters (i.e. AMF colonization and ammonium content in earthworm casts), it reveals that higher contents of the herbicide does not disturb such biological indicators of soil quality, and that cropping system over 6 years is a predominant factor affecting soil parameters as compared to an application of S-Metolachlor. Indeed, zero tillage combined to the lack of N fertilization, by improving soil structure and chemical balance, improved AMF activities (consistent with Verzeaux et al. 2016), mineralization processes in biogenic aggregates (consistent with Wachendorf et al., 2014), total organic C and N contents (consistent with Nivelles et al., 2016), and this despite of lower vertical transfer of the molecule in the profile of probably more compacted soils (Tolon-Becerra, 2011).

5. Conclusion

Contrasted cropping systems may change the effects of the herbicide S-Metolachlor on soil chemical and biological properties. Indeed, both tillage system and nitrogen fertilization regime have modified edaphic properties regardless application of the herbicide, leading to contrasted chemical and biological environment in S-Metolachlor treated soils. Surprisingly, most of the parameters studied were not directly affected by the application of the herbicide as compared to the controls. However, S-Metolachlor increased nitrate content of soils managed under no-till characterized by higher values of total nitrogen, and increased ammonium content of earthworm casts in the same soils, but only when nitrogen fertilizers were added for 6 years. We conclude that the use of S-Metolachlor as a selective herbicide in maize crop is not a harmful agronomic practice for the soil chemical and biological parameters measured, and that the cropping system, by modifying edaphic properties, may induce contrasted effects of this molecule. Further research is needed to increase knowledge about the potential non-target effects of the S-Metolachlor in croplands.

Acknowledgements

Research in this work is part of the collaborative project VEGESOL funded by Bonduelle and Syngenta companies in partnership with the University of Picardy Jules Verne. Guillaume Decocq and Claudie Taillandier are thanked for its technical assistance. The PhD studies of Elodie Nivelles are funded by a scholarship from the French Ministry of Higher Education and Research.

References

- Accinelli, C., Dinelli, G., Vicari, A., Catizone, P., 2001. Atrazine and metolachlor degradation in subsoil. *Biology and Fertility of Soils* 33, 495-500.
- Alletto, L., Benoit, P., Bolognesi, B., Couffignal, M., Bergheaud, V., Dumény, V., Longueval, C., Barriuso, E., 2013. Sorption and mineralisation of Smetolachlor in soils from fields cultivated with different conservation tillage systems. *Soil and Tillage Research* 128, 97-103.
- Alletto, L., Coquet, Y., Benoit, P., Heddadj, D., Barriuso, E., 2010. Tillage management effects on pesticide fate in soils. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30, 367-400.
- Ahtiainen, J.H., Vanhala, P., Myllymaki, A., 2003. Effects of different plant protection programs on soil microbes. *Ecotox. Environ. Safe.* 54(1), 56-64.
- Ayansina A.D.V. and Oso, B.A., 2006. Effect of two commonly used herbicides on soil microflora at two different concentrations. *African Journal of Biotechnology* 5, 129-132.
- Bollag, J.M., Liu, S.Y., 1990. Biological transformation processes of pesticides. *Soil Sc. Soc. Am.* Pp. 169-211.
- Brown, G.G., Barois, I., Lavelle, P., 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology* 36, 177-198.
- Casida, L., Klein, D., Santoro, T., 1964. Soil Dehydrogenase Activity. *Soil Sci.* 98, 371-376.
- Chan, K.Y., 2001. An overview of some tillage impacts on earthworm population abundance and diversity-Implications for functioning in soils. *Soil Till. Res.* 57(4), 179-191.
- Chesters, G., Simsman, G.V., Levy, J., Alhajjar, B.J., Fathlla, R.N., Harkin, J.M., 1989. Environmental fate of alachlor and metolachlor. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 110, 1-74.
- Childs, G.M.F., 2007. Efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado. 70 f. Tese (Produção Vegetal) –Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- Dick, R.P., 1992. A review, Long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agric. Ecosyst. Environ.* 40, 25-36. doi, 10.1016/0167-8809(92)90081-L
- Doran, J.W., 1982. Tilling changes soil. *Crops and Soils* 34, 10-12.
- Egerton-Warburton, L.M., Johnson, N.C., Allen, E.B., 2007. Mycorrhizal community dynamics following nitrogen fertilization, a cross-site test in five grasslands. *Ecol. Monogr.* 77(4), 527–544.
- Ekenler, M., Tabatabai, M.A., 2003. Tillage and residue management effects on beta-glucosaminidase activity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 35, 871-874.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Hernández-Allica, J., Barrutia, O., Garbisu, C., 2008. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Applied Soil Ecology* 39, 299-310.
- Giovannetti, M., Avio, L., Fortuna, P., Pellegrino, E., Sbrana, C., Strani, P., 2006. At the root of the wood wide web, self recognition and non-self incompatibility in mycorrhizal networks. *Plant Signal. Behav.* 1, 1–5.
- Gomez, E., Garland, J., Conti, M., 2004. Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Appl. Soil Ecol.* 26, 21–30.
- Govaerts, B., Mezzalama, M., Unno, Y., Sayre, K.D., Luna-Guido, M., Vanherck, K., 2007. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. *Appl. Soil Ecol.* 37, 18–30.
- Habbib, H., Verzeaux, J., Nivelles, E., Roger, D., Lacoux, J., Catterou, M., Hirel, B., Dubois, F., Tetu, T., 2016. Conversion to No-Till Improves Maize Nitrogen Use Efficiency in a Continuous Cover Cropping System. *PLoS ONE* 11, e0164234.

- Heinonen-Tanski, H., Siltanen, H., Kilpi, S., Simojoki, P., Rosenberg, C., Miiikinen, S., 1986. The effect of the annual use of some pesticides on soil microorganisms, pesticide residues in the soil and carrot yields. *Pest. Sci.* 17, 135-142.
- Hobbs, P.R., Sayre, K., Gupta, R., 2008. The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363, 543-555.
- Horrigan, L., Lawrence, R.S., Walker, P., 2002. How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environ. Health Perspect.* 110, 445-456.
- Huang, J., Cui, Y., Zhou, L., Miao, H., Feng, L., 2017. Degradation of S-metolachlor and its effects on soil enzymes and microbial communities in vegetable field soil. *J Resid. Sci. Technol.* 14(1), 245-254.
- Ismail, B.S., Shamsuddin, N., 2005. Effects of alachlor and metolachlor on microbial populations in the soil. *Mal. J. Micorbiol.* 1(1), 36-41.
- Janusauskaite, D., Kadziene, G., Auskalniene, O., 2013. The effect of tillage system on soil microbiota in relation to soil structure. *Pol. J. Environ. Stud.* 22, 1387-1391.
- Jeffery, S., Gardi, C., Jones, A., Montanarella, L., Marmo, L., Miko, L., Ritz, K., Peres, G., Römbke, J., van der Putten, W., 2010. European Atlas of soil biodiversity. Luxembourg, Publication Office of the European Union. *Eur. J. Soil Sci.* 62, doi, 10.1111/j.1365-2389.2010.01335.x
- Koske, R.E.; Gemma, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 1989, 92, 486-488.
- Levanon, D., Meisinger, J.J., Codling, E.E., Starr, J.L., 1993. Impact of tillage on microbial activity and the fate of pesticides in the upper soil. *Water Air Soil Pol.* 72, 179-189.
- Lipsa, F.D., Ulea, E., Chiriac, I.P., Coroi, I.G., 2010. Effect of herbicide S-metolachlor on soil microorganisms. *Lucrari Stiintifice*, 53(2), 110-113.
- Liu, B., Li, X., Zhang, X., Wang, J., Gao, M., Effects of chlortetracycline on soil microbial communities, Comparisons of enzyme activities to the functional diversity via Biolog EcoPlates. *Eur. J. Soil Biol.* 68, 69-76.
- Locke, M.A., Zablutowicz, R.M., 2004. Pesticides in soil, Benefits and limitations to soil health. In P. Schjonning, S. Elmholt and B.T. Christensen, eds., *Managing soil quality-Challenges in modern agriculture*. CABI Publishing, UK, pp. 239-260.
- Lupwayi, N.Z., Grant, C.A., Soon, Y.K., Clayton, G.W., Bittman, S., Malhi, S.S., Zebarth, B.J., 2010. Soil microbial community response to controlled-release urea fertilizer under zero tillage and conventional tillage. *Appl. Soil Ecol.* 45, 254-261.
- Ma, Y., Liu, W.P., Wen, Y.Z., 2006. Enantioselective degradation of Rac-metolachlor and S-Metolachlor in Soil. *Pedosphere* 16, 489-494.
- Mangalassery, S., Mooney, S.J., Sparkes, D.L., Fraser, W.T., Sjogersten, S., 2015. Impacts of zero tillage on soil enzyme activities, microbial characteristics and organic matter functional chemistry in temperate soils. *Eur. J. Soil Biol.* 68, 9-17.
- Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G., Swift, M.J., 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* 277, 504-509.
- McGonigle, T.P.; Miller, M.H.; Evans, D.G.; Fairchild, G.L.; Swan, J.A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 1990, 115, 495-501.
- de Mendiburu F. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. Version 1.2-4. 2016. <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu>

- Munoz, A., Koskinen, W.C., Cox, L., Sadowsky, M.J., 2011. Biodegradation and mineralization of metolachlor and alachlor by *Candida xestobii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 619-627.
- Munoz-Leoz, B., Garbisu, C., Antiguada, I., Ruiz-Romera, E., 2012. Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 48, 125-134.
- Nivelle, E., Verzeaux, J., Habbib, H., Kuzyakov, Y., Decocq, G., Roger, D., Lacoux, J., Duclercq, J., Spicher, F., Nava-Saucedo, J.E., Catterou, M., Dubois, F., Tetu, T., 2016. Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization. *Appl. Soil Ecol.* 108, 147–155.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O’Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2015. *Vegan: Community Ecology Package Version 2.3-2*. <http://cran.r-project.org/>.
- Olsen, S. R., Cole, C. V., Watanabe, F. S. and Dean, L. A., 1954. Estimation of available phosphorus in soils by the extraction with sodium bicarbonate; *Circ.* 939; U.S. Dep. of Agric.
- Pasaribu, A., Mohamad, R.B., Awang, Y., Othman, R., Puteh, A., 2011. Growth and development of symbiotic Arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus mossea* (Nicol. and Gerd.), in alachlor and glyphosate treated soils. *Af. J. Biotechnol.* 10(55), 11520-11526.
- Pohlert, T., 2016. *PMCMR: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums Version 4.1*. <http://cran.r-project.org/>.
- Potter, D.A., Bridges, B.L., Gordon, F.C., 1985. Effect of N fertilization on earthworm and microarthropod populations in Kentucky bluegrass turf. *Agron. J.* 77, 361-312.
- Ratcliff, A.W., Busse, M.D., Shestak, C.J., 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Appl. Soil Ecol.* 34, 114–124. doi,10.1016/j.apsoil.2006.03.002
- Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2007. The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the western cape, south Africa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66(2), 244-251.
- Rice, P.J., Anderson, T.A., Coats, J.R., 2002. Degradation and persistence of metolachlor in soil: effects of concentration, soil moisture, soil depth, and sterilization. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2640-2648.
- Römbke, J., Förster, B., Jänsch, S., Scheffczyk, A., Garcia, M., 2005. Terrestrische ökotoxikologische Testmethoden für die Tropen – Teil 2, Halbfreiland- und Freilandtests sowie Risikobeurteilung. *UWSF*, 17, 85–93.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R.S., Bestervelt, L.L., 2012. Microbial siderophores, a mini review. *Journal of Basic Microbiol.* 52, 1-15.
- Si, Y., Takagi, K., Iwasaki, A., Zhou, D., 2009. Adsorption, desorption and dissipation of metolachlor in surface and subsurface soils. *Pest Management Science* 65, 956-962.
- Smith, S.E., Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, Ed 3. Academic Press, New York.
- Stenersen, J., 2004. *Chemical pesticides: mode of action and toxicology*. Boca Raton: CRC Press; p. 276.
- Sylvia, D.M. 1992. 3 Quantification of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Methods Microbiol.* 24, 53-65.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418, 671-677.
- Tolon-Becerra, A., Tourn, M., Botta, G.F., Lastra-Bravo, X., 2011. Effects of different tillage regimes on soil compaction, maize (*Zea mays* L.) seedling emergence and yields in the eastern

- Argentinean Pampas region. *Soil and Tillage Research* 117, 184–1900.
- Verzeaux, J., Roger, D., Lacoux, J., Nivelles, E., Adam, C., Habbib, H., Hirel, B., Dubois, F., Tetu, T., 2016. In winter wheat, no-till increases mycorrhizal colonization thus reducing the need for nitrogen fertilization. *Agronomy* 6, 38.
- Wachendorf, C., Potthoff, M., Ludwig, B., Joergensen, R.G., 2014. Effects of addition of maize litter and earthworms on C mineralization and aggregate formation in single and mixed soils differing in soil organic carbon and clay content. *Pedobiologia* 57, 161–169.
- Watts, D.B., Torbert, H.A., Feng, Y., Prior, S.A., 2010. Soil microbial community dynamics as influenced by composted dairy manure, soil properties, and landscape position. *Soil Science* 175, 474–486.
- White, P.M., Potter, T.L., Culbreath, A.K., 2010. Fungicide dissipation and impact on metolachlor aerobic soil degradation and soil microbial dynamics. *Science of the Total Environment* 408, 1393–1402.
- Wu, H., Yip, K., Kong, Z., Li, C.Z., Liu, D., Yu, Y., Gao, X., 2011. Removal and recycling of inherent inorganic nutrient species in mallee biomass and derived biochars by water leaching. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50(21), 12143–12151. doi, 10.1021/ie200679n
- Wu, X.M., Li, M., Long, Y.H., Liu, R.X., Yu, Y.L., Fang, H., Li, S.N., 2011. Effects of adsorption on degradation and bioavailability of metolachlor in soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 11, 83-97.
- Xu, D., Wen, Y., Wang, K., 2010. Effect of chiral differences of metolachlor and its (S)-isomer on their toxicity to earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 73, 1925-1931.
- Zemolin, C.R., Avila, L.A., Cassol, G.V., Massey, J.H., Camargo, E.R., 2014. Environmental fate of S-Metolachlor – A review. *Planta Daninha* 32, 655-664.
- Zuber, S.M., Villamil, M.B., 2016. Meta-analysis approach to assess effect of tillage on microbial biomass and enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* 97, 176–187.

Résumé des principaux résultats du chapitre IV.

Les points forts de l'article 5 sont :

1. Le S-Metolachlore augmente la teneur en nitrate des sols conduits en semis-direct indépendamment du régime de fertilisation azotée.
2. Le S-Metolachlore augmente la teneur en nitrate de la solution des sols conduits en semis-direct indépendamment du régime de fertilisation azotée, et des sols conduits en labour uniquement avec fertilisation azotée intensive.
3. Le S-Metolachlore augmente la teneur en ammonium des turricules de vers de terre sur les sols conduits en semis direct avec fertilisation azotée intensive.

| Art. 5 | PEST. | ESA | OXA | NO3 | PO4 | DH | AMF | PLANTE | VERS de TERRE |
|----------------|-------|-----|-----|-----|-----|----|-----|--------|---------------|
| NT/ NO/ MET | | | | | | | | | |
| NT/ NX/ MET | | | | | | | | | |
| CT/ NO/ MET | | | | | | | | | |
| CT/ NX/ MET | | | | | | | | | |

Fig. 24. Schéma récapitulatif qui illustre les grandes tendances des effets des pratiques agricoles sur les indicateurs mesurés pour l'article 5 de la thèse. En gris : pas d'effet par rapport au témoin NT/N0 (absence de travail du sol, absence de fertilisation azotée) ; rouge clair : effet négatif léger par rapport au témoin ; rouge : effet négatif significatif par rapport au témoin ; vert clair : effet positif léger par rapport au témoin ; vert : effet négatif significatif par rapport au témoin. PEST. : concentration en S-metolachlore ; ESA : concentration en ; OXA : concentration en ; NO3 : teneur en nitrates ; PO4 : teneur en phosphore assimilable ; DH : déshydrogénase ; VERS DE TERRE : teneurs en ammonium des turricules de vers de terre ; PLANTE : teneurs en C et N total et rendement du maïs.

CHAPITRE V.

DISCUSSION GENERALE

« Il ne fait aucun doute que le défi mondial du maintien des sols et de leur biodiversité, souvent ignoré dans les discussions scientifiques sur les problèmes environnementaux mondiaux, est de plus en plus attiré par l'importance de maintenir le fonctionnement de l'écosystème et le bien-être de l'homme. »

Richard D. Bardgett, *université de Manchester UK, 2012*

Chapitre V. Discussion générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans le champ d'étude de l'agro-écologie dont une des définitions donnée par Gliessman en 2003 est : « l'agro-écologie est l'application de l'écologie à l'étude, la conception et la gestion des agrosystèmes durables ». En d'autres termes, l'agro-écologie, à l'inverse de l'agriculture dite « industrielle », vise à déterminer quelles sont les pratiques de gestions agricoles durables, pour le sol mais aussi l'environnement, tout en continuant à maximiser les rendements des cultures. En déterminant les effets de la gestion des pratiques culturales sur les indicateurs qualitatifs édaphiques et aériens et en intégrant les interactions trophiques entre les milieux souterrains et aériens, les différents chapitres de ma thèse s'insèrent parfaitement dans le champ d'étude de l'agro-écologie.

Les différents résultats obtenus, synthétisés dans ce manuscrit, ont permis de répondre aux objectifs fixés au cours de ma thèse. Tout d'abord, ces résultats ont permis de déterminer la sensibilité de certains indicateurs qualitatifs, à intérêts agronomiques, vis à vis des pratiques culturales intensives et écologiques. Ensuite, ils ont permis de comparer les effets de chacune des pratiques culturales sur ces indicateurs mais aussi sur la productivité végétale. Enfin, les résultats nous ont permis de mettre en évidence des interactions entre les systèmes de culture et les réseaux trophiques. D'abord en montrant que des effets négatifs, neutres ou synergiques peuvent être induits lorsque deux ou plusieurs pratiques culturales sont combinées ; puis en montrant qu'il existe des interactions trophiques positives, neutres ou négatives entre les milieux souterrain et aérien.

Nous présenterons une synthèse des principaux résultats avec une restitution qui permet de répondre aux différents objectifs. Cette restitution permettra dans une première partie de déterminer à la fois la sensibilité des indicateurs vis à vis des 4 pratiques culturales expérimentées et les effets de ces pratiques sur la qualité du sol et de son environnement. Une deuxième partie restituera les effets des combinaisons culturales sur la qualité du sol et la productivité végétale et sur les interactions trophiques aériennes et souterraines. L'ensemble de cette restitution est schématisé et résumé sur la **figure 25**. Pour chacune des parties, les limites des différentes études seront abordées en lien avec le choix des pratiques culturales, des indicateurs qualitatifs mais aussi des méthodes utilisées. En conclusion, nous établirons quels types de gestion culturale étaient plus aptes à répondre à la fois aux objectifs de durabilité des agrosystèmes mais aussi aux attentes économiques des agriculteurs.

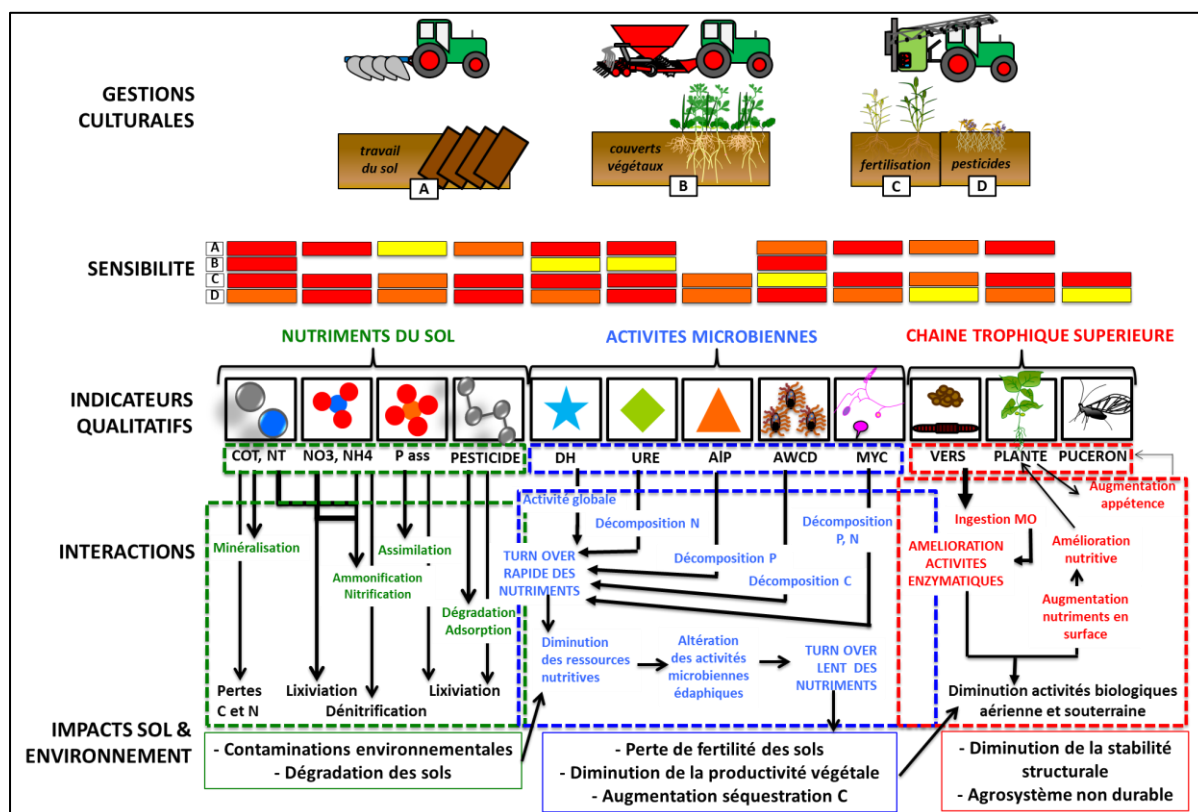


Fig. 25. Schéma résumant la sensibilité des indicateurs vis-à-vis des pratiques de gestions agronomiques issues des articles de ce manuscrit de thèse ainsi que les interactions et impacts qui peuvent se produire dans un sol. La première ligne en haut « GESTIONS CULTURALES » illustre les quatre pratiques de gestion agricole : A. le travail du sol ; B. les couverts végétaux ; C. la fertilisation azotée et D. les pesticides. La deuxième ligne « SENSIBILITE » permet de mettre en évidence la sensibilité des « INDICATEURS QUALITATIFS » de la troisième ligne vis à vis de chacune des 4 gestions A, B, C, et D (rouge : sensibilité forte, orange : sensibilité moyenne, jaune : sensibilité faible). Les indicateurs qualitatifs sont regroupés en 3 groupes : les molécules du sol (encadrées en vert), les activités microbiennes (encadrées en bleu) et des organismes de la chaîne trophique des agrosystèmes (encadrés en rouge). La quatrième ligne « INTERACTIONS » permet de montrer les principales activités et régulations entre les trois groupes du dessous et du dessus du sol. Enfin, la dernière ligne « IMPACTS SOL & ENVIRONNEMENT » permet de montrer les principaux impacts que peut engendrer l’anthropisation sur la qualité du sol et de l’environnement. COT : carbone organique total du sol, NT : azote total du sol, NO₃ : nitrate, NH₄ : ammonium, P ass : phosphore assimilable, PESTICIDE : glyphosate et S-métolachlore, DH : déshydrogénase, URE : uréase, AIP : phosphatase alcaline, AWCD : réponses fonctionnelles microbiennes, MYC : abondance en spores et colonisation racinaire par gloméromycètes, VERS : ammonium, nitrate, et activité microbienne des turricules de vers de terre, PLANTE : productivité et physiologie des plantes de haricot et maïs, PUCERON : survie larvaire d’*Aphis fabae* sur le haricot.

1. Sensibilité des indicateurs vis à vis des pratiques culturales et effets sur la qualité du sol et de son environnement

1.1. La sensibilité des indicateurs déterminée par les effets positifs, neutres ou négatifs induits par les pratiques agricoles

Glyphosate et fertilisation azotée. A travers les résultats des différents articles, nous avons pu déterminer la sensibilité des indicateurs qualitatifs vis à vis des pratiques de gestion agricole. Tout

d'abord, les **articles 1 et 2** issus d'études réalisées en mésocosme ont permis de montrer des effets positifs du glyphosate, lorsque la dose au champ était appliquée, sur les activités enzymatiques de la phosphatase alcaline (**articles 1 et 2**) et sur les activités de mycorhization (**article 2**). A l'inverse, lorsque la dose au champ était appliquée, les résultats ont montré soit des effets négatifs du glyphosate sur les activités fonctionnelles microbiennes (**article 1**) ; soit un effet neutre du glyphosate sur les indicateurs chimiques édaphiques (ie. phosphore assimilable, nitrate et nitrification) (**articles 1 et 2**) et les réponses physiologiques des plantes et des pucerons (**article 2**). On note donc une sensibilité plus importante des indicateurs biologiques édaphiques par rapport aux indicateurs chimiques édaphiques, aériens et des pucerons. Seule l'application d'une forte concentration de glyphosate a conduit à augmenter les teneurs de ces nutriments dans les sols (**article 1**) et donc augmenter la sensibilité des indicateurs chimiques du sol vis-à-vis du glyphosate.

Les résultats de l'**article 1** ont mis en exergue un effet positif de la fertilisation azotée sur les activités enzymatiques de la phosphatase alcaline et de l'uréase. Alors que les résultats de l'**article 2** ont mis en évidence un effet négatif de la fertilisation azotée sur les activités de la déshydrogénase et de la phosphatase. De même, les résultats de l'**article 2** ont montré un effet positif de la fertilisation azotée sur la teneur en nitrates du sol, les teneurs en éléments nutritifs dans les feuilles des plantes, sur le rendement des plantes ainsi que sur la survie larvaire des pucerons. Enfin, les résultats de l'**article 5** montraient un changement de l'activité des champignons mycorhiziens ainsi qu'une diminution des teneurs en herbicide sélectif suite à l'apport conventionnel d'azote de synthèse. Il semblerait donc que l'apport d'azote minéral soit une pratique agricole qui induit des modifications rapides d'un ensemble d'indicateurs biologiques et chimiques des sols. La gestion de l'azote dans les agrosystèmes doit donc faire l'objet d'études approfondies afin de pouvoir rendre compte de son impact potentiel sur la qualité du sol et de l'environnement.

Travail du sol et couverts végétaux. Les **articles 3, 4 et 5** ont permis de mettre en évidence un effet positif du semis-direct sur les activités de déshydrogénase, les mycorhizes, les teneurs en ammonium dans les turricules de vers de terre et la teneur en herbicide dans les horizons supérieurs (**articles 3, 4 et 5**) et un effet négatif sur les teneurs en phosphore dans les sols (**article 3**). A l'inverse, le labour avait un effet négatif sur l'uréase, les activités des champignons mycorhiziens, la teneur en ammonium dans les turricules de vers de terre, la teneur en herbicide dans l'horizon 0-20 cm (**articles 3, 4 et 5**) et un effet positif sur la teneur en phosphore assimilable dans les sols (**article 3**). Egalement, le labour affectait négativement la réponse fonctionnelle microbienne (**article 4**). Les apports de couverts végétaux ont permis d'améliorer les activités et la diversité des microorganismes dégradant le carbone (**article 4**). Les résultats de l'**article 5** montrent que l'apport d'un herbicide sélectif augmente les teneurs en molécules de dégradation et en nitrates dans les sols mais n'affecte pas directement les activités biologiques des sols et les rendements des plantes. La sensibilité des indicateurs biologiques vis à vis

du S-Metolachlore reste donc assez limitée. Le travail du sol et la couverture végétale semblent être deux facteurs de gestion qui influencent la dynamique du carbone et de l'azote via un changement dans les activités microbiennes de dégradation des molécules organiques et des teneurs en carbone et azote total.

| Art. 1 | DH | AIP | URE | AWCD | H' | PO4 | NO3 | NIT |
|----------|----|-----|-----|------|----|-----|-----|-----|
| N0/CK | | | | | | | | |
| N+/CK | | | | | | | | |
| N0/FR | | | | | | | | |
| N+/FR | | | | | | | | |
| N0/100FR | | | | | | | | |
| N+/100FR | | | | | | | | |

| Art. 2 | DH | AIP | AMF | NO3 | TN | PLANTE | PUCERON |
|--------|----|-----|-----|-----|----|--------|---------|
| N0/CK | | | | | | | |
| N0/FR | | | | | | | |
| NX/CK | | | | | | | |
| NX/FR | | | | | | | |

| Art. 3 | DH | NO3 | PO4 | TN | TOC |
|--------|----|-----|-----|----|-----|
| NT/N0 | | | | | |
| NT/NX | | | | | |
| CT/N0 | | | | | |
| CT/NX | | | | | |

| Art. 4 | TOC | TN | DH | URE | AWCD | H' |
|----------|-----|----|----|-----|------|----|
| NT/bf/N0 | | | | | | |
| CT/bf/N0 | | | | | | |
| NT/cc/N0 | | | | | | |
| CT/cc/N0 | | | | | | |
| NT/bf/Nx | | | | | | |
| CT/bf/NX | | | | | | |
| NT/cc/NX | | | | | | |
| CT/cc/NX | | | | | | |

| Art. 5 | PEST. | ESA | OXA | NO3 | PO4 | DH | AMF | PLANTE | VERS de TERRE |
|-----------|-------|-----|-----|-----|-----|----|-----|--------|---------------|
| NT/N0/MET | | | | | | | | | |
| NT/NX/MET | | | | | | | | | |
| CT/N0/MET | | | | | | | | | |
| CT/NX/MET | | | | | | | | | |

Fig. 26. Schéma récapitulatif qui illustre les grandes tendances des effets des pratiques agricoles sur les indicateurs mesurés pour les 5 articles de la thèse. En gris : pas d'effet par rapport au témoin (N0/CK ; NT/N0 ; NT/bf/N0 ; NT/N0/MET) ; rouge clair : effet négatif léger par rapport au témoin ; rouge : effet négatif significatif par rapport au témoin ; vert clair : effet positif léger par rapport au témoin ; vert : effet positif significatif par rapport au témoin. DH : déshydrogénase ; AIP : phosphatase alcaline ; URE : uréase ; AWCD : activités fonctionnelle microbienne ; H' : diversité fonctionnelle microbienne ; PO4 : teneur en phosphore assimilable; NO3 : teneur en nitrates; NIT : nitrification ; AMF : champignon mycorrhizien ; TOC : teneur en carbone organique; TN : teneur en azote organique ; PEST. : concentration en herbicide ; ESA : concentration acide sulfonique ; OXA : concentration acide oxalinique ; VERS de TERRE : activité des vers de terre ; PLANTE : rendement et/ou teneurs en éléments nutritifs de la plante ; PUCERON : survie larvaire.

La **figure 26** permet de mettre en évidence les effets des différentes pratiques culturales sur les indicateurs testés au cours de mes travaux de thèse, permettant ainsi de déduire leur sensibilité.

Pour résumer, nos résultats ont mis en évidence 1) Une sensibilité très importante de l'ensemble des indicateurs édaphiques (activités enzymatiques, mycorrhization, turricules de vers de terre, teneur en nutriments du sol, teneur en herbicides) et aériens (paramètres physiologiques des plantes et pucerons) vis à vis des engrais azotés ; 2) Une sensibilité forte des activités de mycorrhization, des enzymes et des réponses fonctionnelles microbiennes suite à l'apport de glyphosate ; 3) Une sensibilité des indicateurs chimiques tels que les teneurs en nitrates et en molécules de dégradation du S-métolachlore à l'apport du S-metolachlore ; 4) Une sensibilité importante des activités microbiennes et de la séquestration du carbone et de l'azote vis à vis du travail du sol et ou de la couverture végétale.

En accord avec nos résultats, de nombreuses études ont montré que les paramètres chimiques liés aux cycles Du carbone, de l'azote et du phosphore étaient de bons indicateurs de la santé des sols car ils permettent de définir les voies d'une agriculture à haute productivité tout en protégeant l'environnement. Par exemple, Schlöter et al., (2003) ont montré que l'azote était un élément clé pour la qualité des sols. L'azote biodisponible régule en effet la croissance des microorganismes mais aussi la croissance des plantes. En revanche, le nitrate (NO_3) et le protoxyde d'azote (N_2O) jouent des rôles non négligeables dans la pollution de l'environnement.

De la même manière, le carbone est un indicateur important car les sols stockent au moins trois fois plus de carbone (contenu dans la MO) que ce que l'on trouve dans l'atmosphère ou dans les plantes vivantes. Ce pool de carbone organique est sensible aux changements climatiques ou à l'environnement local. La mise en place de mesures du carbone organique, à l'aide de techniques isotopiques, spectroscopiques et d'expérimentations sur le terrain, est essentielle pour créer des modèles numériques permettant de comprendre son évolution dans les agrosystèmes. A partir de ces modèles, une étude réalisée par Schmidt et al. (2011) suggèrait qu'il était possible de simuler des rétroactions entre le changement climatique et les écosystèmes, mais aussi d'évaluer les options de gestion favorables à la séquestration du carbone, nécessaire pour limiter le réchauffement climatique. Cependant, l'étude du carbone dans les sols peut être sujette à des débats scientifiques. En effet, de récentes études ont mis en évidence que la stabilisation des MO n'était pas seulement liée à la structure moléculaire de la biomasse qui est ajoutée au sol. Ces études ont également remis en cause le concept de condensation des substances humiques en supposant que leur rôle dans le cycle de la MO était finalement marginal (Marschner et al., 2008). Ainsi, les concepts de détermination de l'évolution des MO dans les sols doivent être révisés afin de mieux comprendre le cycle du carbone et d'améliorer la capacité des chercheurs à prédire les réponses du sol vis à vis des pratiques agricoles, de la végétation, mais aussi des changements climatiques (Schmidt et al., 2011).

Enfin, le phosphore est également un nutriment clé essentiel pour évaluer la qualité de sols. A l'image de l'azote, il est un nutriment limitant pour la croissance des plantes et son cycle dépend à la fois des

activités microbiennes (mycorhizes, biomasse microbienne) mais aussi des activités des organismes supérieures qui se nourrissent des microbes du sol (par exemple les vers de terre) (Cardoso et al., 2013).

Comme nous l'avions montré dans le chapitre I, il existe des relations très étroites entre les éléments chimiques du sol et les activités biologiques. Schoenholte et al. (2000) ont montré que beaucoup de propriétés chimiques du sol influencent directement les processus microbiens via les nutriments et les applications de substrats carbonés. Ces processus déterminent la capacité des sols à contenir, alimenter et recycler les nutriments (y compris le carbone) et à permettre le mouvement et la disponibilité de l'eau. Les activités biologiques au travers les réponses des enzymes du sol, des activités microbiennes (AWCD, mycorhizes), des vers de terre, de la plante ou encore des insectes phytophages ont également été montrées comme étant sensibles aux pratiques culturales (Bending et al., 2004 ; Cardoso et al., 2013 ; Mahdavi-Arab et al., 2014 ; Johnston et al., 2015). Par exemple, Cardoso et al. (2013) ont montré que le système conventionnel de travail du sol (labour, fertilisation azotée, absence de couverts végétaux, pesticide) était considéré comme le plus agressif car la perturbation du sol est intense. En lien avec ces systèmes de nombreux chercheurs ont constaté une perte d'activité et de diversité microbienne et une augmentation des risques d'érosion (Bayer et al., 2001). A l'inverse les techniques moins agressives comme le semis-direct ont permis, dans les premiers horizons du sol, d'améliorer la qualité chimique (e.g. teneur en carbone, azote) et biologique (e.g. activités microbiennes, abondance en vers de terre) associée à la santé des sols (Babujia et al., 2010 ; Cardoso et al., 2013). Des études ont conclu que les indicateurs chimiques comme le carbone et l'azote organique sont des indicateurs sensibles aux pratiques de gestion à long terme alors que les indicateurs biologiques sont sensibles aux gestions agricoles à court terme (Nogueira et al., 2006 ; Cardoso et al., 2013). Il est donc nécessaire d'utiliser des indicateurs rapidement sensibles aux changements de pratiques afin d'anticiper les modifications majeures dans les propriétés du sol causées par l'anthropisation (Cardoso et al., 2013).

1.2. Les effets individuels des pratiques de gestion sur les indicateurs qualitatifs

Afin de résumer les effets principaux de chacune des pratiques culturales sur les indicateurs de la santé des sols, nous reprendrons les grandes tendances issues des différents articles de ce manuscrit de thèse.

Glyphosate. L'article 1 nous a permis de montrer que l'application à une dose au champ (FR) d'un herbicide total (le glyphosate) conduit à une diminution de la **réponse des activités fonctionnelles microbiennes** pouvant ainsi permettre une augmentation du stockage de carbone dans les sols. Une étude réalisée par Ramirez et al. (2012) a montré que l'application d'azote dans les sols par les activités anthropogéniques peut avoir des impacts sur la dynamique du carbone souterrain en lien avec les activités microbiennes. Ces auteurs ont montré que l'application d'azote entraînait une diminution de la

biomasse microbienne et modifiait la composition de la communauté bactérienne. En outre, ils ont montré que la gestion anthropique des sols avec l'application d'azote de synthèse diminue les activités microbiennes du sol en modifiant les capacités métaboliques des communautés bactériennes du sol. La capacité des communautés bactériennes à décomposer les réserves en carbone du sol était diminuée, conduisant à une augmentation potentielle des taux de séquestration du carbone dans certains sols. Nous suggérons donc, qu'à l'image de l'application d'azote de synthèse, l'application conventionnelle de glyphosate peut modifier les activités des communautés bactériennes et donc le potentiel de stockage de carbone. Cependant, les résultats de l'**article 1** ont mis en évidence un effet dose-dépendant du glyphosate sur les réponses fonctionnelles microbiennes. Nous suggérons que tout comme l'ajout d'azote de synthèse en excès dans les sols peut conduire à la fois à une augmentation de la lixiviation des nitrates et à une augmentation des taux de minéralisation de la MO, l'apport en excès d'une molécule organique de synthèse comme le glyphosate peut globalement conduire à une diminution de la qualité de sols.

A partir de ces suggestions, nous avons montré que des concentrations supérieures de glyphosate dans les sols stimulaient à la fois les communautés bactériennes édaphiques qui dégradent les substrats carbonés et augmentaient le taux de **nitrification** et la **teneur en nutriments dans les sols (article 1)**. Les fortes concentrations de glyphosate ajoutées ont été choisies car elles sont comparables à un désherbage chimique ou à un apport concentré de glyphosate sur de petites surfaces (par exemple : le désherbage en milieu urbain). Nous suggérons que l'application à haute concentration de glyphosate peut entraîner une augmentation de certaines activités microbiennes au détriment d'autres activités (comme l'activité biologique globale représentée par la déshydrogénase). Ces augmentations vont permettre un turn-over rapide du cycle des éléments nutritifs (carbone, azote, phosphore) pouvant conduire à une perte de ces éléments qui sera supérieure aux potentiels de remobilisation par les microorganismes, d'adsorption par les particules minérales ou d'absorption par les plantes. Ce phénomène est d'autant plus préoccupant lorsque l'apport d'une forte concentration en glyphosate est réalisé sur un sol nu ou très faiblement couvert par les végétaux.

En accord avec nos résultats, **Ratcliff et al. (2006)** ont montré que le glyphosate, appliqué à la dose au champ, n'avait pas d'effets importants sur la structure des communautés microbiennes et sur les activités bactériennes et fongiques. En revanche, une concentration élevée de glyphosate (100 fois la dose au champ) entraînait une augmentation des activités (AWCD) et de la diversité (H') totale des bactéries cultivables. Ce phénomène conduisait à un enrichissement des bactéries généralistes au détriment des communautés fongiques du sol. Ces auteurs ont conclu que la formulation commerciale du glyphosate appliquée à la dose recommandée sur le terrain n'était pas nécessairement néfaste pour une certaine partie des communautés microbiennes du sol tandis que la dose concentrée stimulait rapidement et de manière non spécifique les communautés bactériennes. Les effets potentiels non ciblés

du glyphosate sur les microorganismes du sol et leurs activités ne sont donc pas négligeables dans certaines conditions d'application. En effet, en s'intéressant au mode d'action de la molécule de glyphosate, des chercheurs ont montré qu'elle induisait une inhibition de la synthèse des protéines par la voie de l'acide shikimique dans les cellules bactériennes et fongiques et que l'un de ses adjuvants tensioactifs, l'amine de suif polyéthoxylée, pouvait être toxique pour certaines bactéries et leurs prédateurs potentiels (e.g. les protozoaires) (Franz et al., 1997 ; Tsui & Chu, 2003). En accord également avec nos résultats, Haney et al., (2000) démontrent que l'application de glyphosate (sous forme de sel isopropylamine de glyphosate) à des concentrations supérieures à la dose recommandée stimule positivement les activités microbiennes sans affecter la biomasse microbienne mesurée. Une des conséquences de cette augmentation des activités est un accroissement des taux de minéralisation du carbone et de l'azote. De plus, Alexander (1977) rapportait que le potentiel de minéralisation rapide des molécules du glyphosate pouvait induire un excès d'azote par rapport aux besoins énergétiques des microbes hétérotrophes et cet excès peut être libéré dans le sol sous forme inorganique. Nous suggérons donc que rapidement après l'apport d'une concentration élevée en glyphosate, une minéralisation rapide peut se produire avec une augmentation potentielle des teneurs en nutriments et en molécules de dégradation du glyphosate. Si ces nutriments et molécules chimiques ne sont pas rapidement dégradés par les plantes ou les microorganismes et/ou assimilés par les particules du sol, ils peuvent devenir une source de contamination du sol et de l'environnement. En effet, la transformation de l'azote en nitrates ou nitrites peut être une source de pollution de l'eau et de l'air. Le phosphore (contenu dans la molécule de glyphosate) sous sa forme assimilable peut également être source de pollution pour les nappes souterraines. Enfin, la transformation du glyphosate en métabolites de dégradation (AMPA) n'a pas été suffisamment étudiée pour considérer qu'une fois transformé, le glyphosate n'est plus une source de contamination éventuelle. Fait intéressant, malgré ces pollutions potentielles, de nombreux chercheurs ont conclu que le glyphosate qui atteint la surface du sol est rapidement dégradé par les communautés hétérotrophes des sols sans les affecter négativement, même lorsque des concentrations importantes sont appliquées (Haney et al., 2000 ; Ratcliff et al., 2006).

Néanmoins et au regard de la littérature actuelle, nous pensons qu'il est nécessaire d'améliorer les connaissances sur les effets du glyphosate sur d'autres indicateurs qualitatifs du sol et sur le devenir de la molécule et de ces métabolites de dégradation dans le sol et l'environnement à plus long terme.

Fertilisation azotée. Dans l'**article 2** de ce manuscrit de thèse, les résultats ont mis en évidence des effets négatifs de la fertilisation azotée sur **les activités enzymatiques du sol** bien que la dose conventionnelle d'azote de synthèse à permis d'augmenter la nitrification, les teneurs en éléments nutritifs dans les sols, les teneurs en nutriments dans les feuilles et les rendements, tout en augmentant le taux de survie larvaire des pucerons. Au regard de nos résultats, des corrélations significatives

évidentes entre les activités enzymatiques du sol et les propriétés chimiques ont été trouvées (Samuel, 2009), mais les effets positifs, neutres ou négatifs de la fertilisation azotée sur les enzymes du sol peuvent dépendre de différents facteurs et notamment du choix de l'activité enzymatique mesurée. Par exemple, Ajwa et al. (1999) ont indiqué que la fertilisation azotée de long terme avait augmenté les activités de β -glucosidase et de phosphatase acide alors que les activités uréasiques avaient diminué. Shen et al. (2010) ont, quant à eux, rapporté que l'apport conventionnel d'azote synthétique avait significativement diminué les activités de deshydrogénase, d'uréase et de phosphatase. En outre, les conclusions rapportées par certaines études indiquent que i) une diminution de 40 % des taux de fertilisation azotée par rapport au taux conventionnel permettait de réduire l'apport en excès d'azote non utilisé par les plantes tout en maintenant la durabilité des systèmes de culture intensive dans le delta du fleuve Yangtze en Chine (Shen et al., 2010) ; ii) les microorganismes et les plantes sont à l'origine de la sécrétion d'enzymes qui peuvent minéraliser les nutriments organiques dans les sols. En effet, Olander & Vitousek (2000) montrent que lorsque la biodisponibilité est faible, le biota du sol peut augmenter la production de ces enzymes afin d'améliorer l'apport d'azote inorganique et de phosphore nécessaire à leur croissance. La mesure des activités enzymatiques, dont celles choisies dans le cadre de cette thèse, peut donc être utilisée comme indicateur des changements écologiques causés par la fertilisation azotée (Ajwa et al., 1999) car, en plus d'être fortement sensibles aux pratiques anthropiques, les enzymes sont des acteurs fondamentaux des principales fonctions biochimiques du sol. Des études ont démontré leurs rôles de catalyseur dans plusieurs réactions importantes nécessaires aux processus de vie des microorganismes du sol (e.g. la deshydrogénase), de stabilisation de la structure physique des sols, mais aussi de recyclage des éléments nutritifs (Dick et al., 1994). Dans le cadre de notre étude, c'est sans doute leurs fonctions de formation et de décomposition de la MO dans le sol et la transformation de l'engrais uréasique appliqué dans notre champ expérimental qui font que ces trois activités enzymatiques sont fondamentalement pertinentes pour mesurer l'effet des pratiques agricoles sur l'état qualitatif d'un sol (Sinsabaugh et al., 1991 ; Makoi & Ndakidemi, 2008).

Même si nous ne montrons pas de lien direct entre la fertilisation azotée et d'autres bio-indicateurs dans l'article 2, le biota et les activités enzymatiques étant liés, les effets de la fertilisation azotée sur d'autres bio-indicateurs du sol peuvent être discutés. Les travaux de Johnson (1993) ont montré que **les champignons mycorhiziens** provenant des sols fertilisés produisaient moins d'hyphes et d'arbuscules (i.e. organes d'échange) et fournissaient donc moins de nutriments inorganiques aux plantes. Pour compenser, les champignons des sols fertilisés, produisaient plus de vésicules (i.e. organes de stockage) pour approvisionner leurs propres réserves comparativement aux champignons mycorhiziens des sols non fertilisés. Ces résultats sont conformes à l'hypothèse selon laquelle la fertilisation peut sélectionner des souches de champignons mycorhiziens qui ont des capacités de symbiose inférieures par rapport à d'autres souches adaptées aux sols non fertilisés. Les effets de la

fertilisation azotée sur **les activités des vers de terre** peuvent quant à eux être contradictoires selon les études. Par exemple, **Potter et al. (1985)** indiquaient une diminution linéaire très significative de la densité de lombrics à mesure que les taux annuels de fertilisation azotée augmentaient, tandis que **Tiwari (1993)** montrait que l'application d'engrais azotés provoquait une augmentation significative du nombre de lombrics et des turricules dans le sol. Malgré des effets contradictoires dans la littérature, plusieurs études s'accordent toutefois sur le fait qu'il existe des interactions entre la gestion des sols qui affecte les teneurs en nitrate et la densité et l'activité des lombriciens. En modifiant les concentrations en azote dans les sols, les vers de terre peuvent modifier les processus du cycle de l'azote dans les agrosystèmes. Les auteurs en concluent que les effets nets de l'activité des vers de terre peuvent varier en fonction de la pratique de gestion. Ainsi, la fertilisation azotée, en modifiant les teneurs en nitrates dans les sols, peut affecter la capacité des vers de terre à augmenter la disponibilité en azote par la réduction de l'immobilisation microbienne et par l'augmentation de la minéralisation. Enfin, en accord avec nos résultats, **Hosseini et al. (2015)** ont montré que le taux intrinsèque d'accroissement naturel des **pucerons** sur les plantes fertilisées était amélioré. Ainsi, l'abondance et le taux de croissance de la population de pucerons sont positivement corrélés avec la fertilisation azotée. Nous suggérons que la fertilisation azotée peut entraîner une augmentation de l'appétence des plantes vis-à-vis de leurs phytophages entraînant de surcroît une utilisation plus intensive des insecticides, source de pollution environnementale. Nous concluons que la mycorhization, la teneur en éléments nutritifs et les activités microbiennes des turricules de vers de terre, la physiologie des pucerons mais aussi la croissance des plantes sont des indicateurs qui sont affectés par l'azote et peuvent donc faire l'objet d'un suivi dans le cadre de la gestion durable des agrosystèmes.

Travail du sol et couverts végétaux. Les **articles 3 et 4** montraient que l'absence de travail du sol était favorable aux **activités enzymatiques** uréase et deshydrogénase ainsi qu'aux **activités des champignons mycorhiziens** et de l'activité de minéralisation de l'azote organique en ammonium dans les turricules de **vers de terre**. De même, une augmentation des teneurs en carbone et azote total était trouvée après une gestion à moyen terme (5 ans) en semis direct ; bien qu'à court terme, cette pratique ne conduisait pas à augmenter les teneurs en carbone et azote total et diminuait les teneurs en **phosphore assimilable**. Le labour, quant à lui, conduisait à diminuer les **activités biologiques** des sols et à augmenter les **teneurs en nitrate et phosphore** dans les sols. Il est bien connu que le travail du sol a des effets significatifs sur les activités biologiques et chimiques édaphiques. Par exemple, **Aziz et al. (2013)** ont montré que le semis-direct, en perturbant un minimum le sol et en laissant des débris végétaux en surface, induisait des conditions d'humidité et de température plus favorables aux activités biologiques que dans les sols labourés. Enfin, les effets positifs du semis direct sur les activités des enzymes du sol, des vers de terre et des champignons mycorhiziens ont souvent été montrés dans la

littérature. Pour ne citer qu'un exemple, [Hu et al. \(2015\)](#) montraient que les activités des champignons mycorrhiziens et de la phosphatase alcaline étaient supérieures en semis-direct comparativement au labour. Ils ont également montré que le semis-direct entraînait un maintien de la structure communautaire des champignons mycorrhiziens et jouait un rôle important dans le maintien de leurs fonctionnalités, en particulier sous semis de maïs. Ainsi, en accord avec nos résultats, [Aziz et al. \(2013\)](#) ont estimé que les indices de qualité des sols étaient significativement plus hauts en semis-direct comparativement au labour. Pour ce qui est des indicateurs chimiques, nos résultats ne vont pas dans le même sens que les deux études précédemment citées ([Hu et al., 2015](#) ; [Aziz et al., 2013](#)) qui montraient une augmentation de la teneur en phosphore assimilable, azote et carbone dans les sols en semis direct. Nous suggérons que la différence peut être due aux conditions pedo-climatiques et à la durée de l'expérimentation. Néanmoins, les conclusions de nombreux chercheurs montrent que l'utilisation inappropriée des sols et les systèmes de gestion conventionnelle tels que le labour annuel peuvent entraîner une diminution des activités biologiques, l'érosion des sols, l'épuisement de la teneur en MO et d'autres nutriments, ce qui entraîne une dégradation permanente des sols et des pertes de productivité ([Ramos et al., 2011](#)).

Les couverts végétaux ont quand à eux permis d'accélérer la dégradation de certaines classes de **substrats carbonés** (ie. composés phénoliques, polymères, carbohydrates) comparativement aux sols n'ayant pas reçu cette couverture en inter-culture. Ces résultats sont en accord avec d'autres études et notamment celle de [Nunan et al. \(2015\)](#) qui montrait qu'à long terme les communautés microbiennes dans les sols nus étaient exposées à une gamme moins diversifiée de substrats carbonés. Ces auteurs ont suggéré que les communautés présentes dans les sols en jachère nue étaient mieux adaptées à utiliser les substrats facilement oxydables avec un coût dans la production enzymatique plus faible. Ainsi, les communautés microbiennes de ces sols ne dégradent pas aussi facilement les polymères comparativement aux communautés présentes dans des sols cultivés. Alors qu'on pourrait s'attendre à ce que les communautés des sols nus (i.e. sans couverture végétale depuis 14 à 82 ans) dégradent plus facilement les composés carbonés anciens des sols, cela ne semblait pas être le cas dans l'étude de [Nunan et al., 2015](#). En accord avec notre étude, les communautés microbiennes des sols sans couverture végétale ont préférentiellement utilisé des substrats qui peuvent être minéralisés plus facilement que ceux dégradés par les communautés issues des traitements cultivés. Nous suggérons donc que la présence de couverts végétaux en inter-culture peut paradoxalement favoriser la dégradation des matériaux organiques dits « récalcitrants », en améliorant les activités de décomposition des microorganismes hétérotrophes, et ce malgré la fourniture importante de molécules organiques labiles par la restitution permanente des plantes des couverts végétaux et des cultures principales. A l'inverse, la pratique du labour ou l'absence de couverts végétaux diminue le potentiel catabolique des sols et sélectionne des communautés qui sont adaptées à la privation de MO fraîche en utilisant des substrats

qui nécessitent peu d'investissement, dont le rendement énergétique et enzymatique est relativement faible. L'étude des communautés microbiennes dégradant les différentes formes de substrats carbonés peut donc donner des indications de l'effet des pratiques culturales sur la dégradation de la matière organique du sol. Leur mesure permet d'évaluer l'influence des variables agronomiques sur les différentes fractions inertes de la MO (e.g. légères : carbohydrates, ou plus lourdes : polymères) du sol et d'évaluer de potentiels liens entre les réponses microbiennes et le stockage du carbone dans les sols.

Dans l'**article 4**, nous démontrons que sur une période de 5 ans, l'absence de travail du sol a amélioré les **stocks de carbone et d'azote organique** dans ces systèmes contrairement aux pratiques de labour avec ou sans couverts végétaux. Ces résultats coïncident avec l'étude abondamment reprise dans la littérature de **Doran (1980)**, qui a mis en évidence que l'environnement physico-chimique et biologique du sol diffère grandement entre un travail du sol réduit et un labour conventionnel. Par exemple, un plus grand nombre de microorganismes aérobies, anaérobies, dénitrificateurs ainsi que des activités enzymatiques supérieures (e.g. déshydrogénase, phosphatase) ont été trouvés dans l'horizon de surface des sols non labourés par rapport à ceux qui le sont. De même, les résultats de l'étude de **Doran (1980)** montre également des teneurs en eau, et en carbone et azote organique supérieures dans l'horizon de surface des sols non labourés. Il suggère que l'augmentation de la réserve en azote labile peut-être liée à la biomasse microbienne supérieure dans les sols sans labour. Cependant, à des profondeurs plus élevées (jusqu'à 30 cm), les tendances s'inversent avec une augmentation des populations microbiennes, des activités enzymatiques et des teneurs en carbone et azote organique dans le labour conventionnel comparativement à la pratique du semis-direct (**Doran, 1980 ; del Galdo et al., 2003**). Etant donné que la charrue permet un retournement des différents horizons du sol, cela induit une augmentation du taux d'aération et d'infiltration de l'eau dans les horizons profonds comparativement au semis-direct. Ainsi, il est cohérent de trouver une augmentation de l'activité microbienne aérobie et de l'abondance des nitrifiants dans les horizons sous-jacents des sols conduits en labour conventionnel. Néanmoins, ces augmentations sont souvent ponctuelles et enregistrées dans un délai court à la suite de l'opération du labour. En effet, l'oxygénation des horizons profonds par le labour est un processus immédiat mais sans stabilité dans le temps. Parallèlement, les activités de dénitrification réalisées par les microorganismes aérobies ou anaérobies facultatifs étaient plus importantes dans les horizons profonds sous semis-direct comparativement aux sols labourés. Par conséquent, le taux potentiel de minéralisation et de nitrification était plus élevé sous labour conventionnel tandis que celui de la dénitrification était plus élevé avec le semis direct. Plusieurs études ont en effet conclu que l'environnement biochimique des sols en semis-direct était moins oxydatif que celui des sols soumis au labour. Ces conclusions sous-entendent qu'à long terme, une diminution de la perte de nitrates par lixiviation peut être mesurée dans les sols gérés en semis-direct, conduisant à une potentielle amélioration de l'efficacité d'utilisation des engrais azotés

par les cultures (Habbib et al., 2016) et à une diminution potentielle des contaminations par les nitrates des nappes phréatiques.

Il est à noter que les études réalisées dans le cadre de ma thèse comportent plusieurs limites. La première réside dans le fait que les mesures ont été réalisées au niveau des horizons supérieurs entre 0 et 20 cm. Or, comme nous l'avons vu dans les études de Doran (1980) et del Galdo et al. (2003), les activités microbiennes et les teneurs en carbone et azote peuvent différer grandement entre les différents horizons du sol. Ainsi, d'autres études ont été réalisées afin de mesurer l'évolution des teneurs en carbone et azote total dans les horizons 10-30 cm et 30-50 cm dans les sols conduits en semis-direct et en labour. Ces études ont été réalisées au sein de l'unité de recherche EDYSAN dans le cadre d'une autre thèse de doctorat (données non publiées). Elles démontrent que des chutes importantes des teneurs en carbone et azote total ont été observées dans l'horizon profond 30-50 cm en présence de fertilisation azotée et dans les conditions de labour sans couverture végétale d'inter-culture. Ces observations sont en accord avec les travaux de Mulvaney et al. (2009) qui suggèrent que la lixiviation des fertilisants azotés en profondeur active la minéralisation de la MO plus ancienne. Une autre limite concerne la durée de l'expérimentation et notamment pour l'article 4, qui rapporte un délai de 5 ans entre la mise en place de l'expérimentation et la comparaison des différents paramètres entre systèmes de culture. Cette durée est relativement courte du point de vue de la mise en place des processus écologiques suite à un changement d'utilisation des terres. Elle ne nous permet donc pas de conclure quand aux effets à long terme du travail du sol et des couverts végétaux sur la capacité du sol à maintenir des activités microbiennes élevées tout en continuant à stocker du carbone dans les différents horizons du sol. Enfin, la dernière limite que nous pourrions citer est le choix des indicateurs biologiques. D'autres indicateurs microbiologiques et biochimiques auraient pu être utilisés afin d'élargir les conclusions sur les changements de qualité des sols. Par exemple, Cardoso et al. (2013) ont montré que le quotient métabolique (qCO_2) est un indice qui permet de déterminer la quantité de CO_2 libérée par unité de biomasse microbienne dans le temps. Elle représente l'état métabolique des microorganismes du sol. De même d'autres indicateurs fonctionnels agissant au niveau des cycles du carbone, de l'azote et du phosphore auraient pu être choisis comme par exemple la mesure des activités protéolytiques et cellulolytiques, ou encore la mesure de la biomasse en carbone microbien par la technique de fumigation-extraction. Egalement, nous aurions pu mesurer la diversité génétique par PCR-DGGE (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant) ou via un profil PLFA (phospholipides dérivés des acides gras). L'ensemble de ces mesures permettrait de conclure plus largement sur la faculté d'un sol à conserver les processus écologiques après une perturbation (Kennedy, 1999). Cependant, comme pour tous les indicateurs microbiens, la méthodologie d'analyse est une étape délicate pouvant comporter de nombreux biais (e.g. la détermination de la biomasse microbienne via l'extraction par fumigation) et être coûteuse (e.g. mesure de la diversité génétique par PLFA). De plus, l'interprétation des indices doit

être réalisée avec prudence, avec par exemple des valeurs élevées de qCO_2 qui peuvent être attribuées au stress microbien mais également aux apports de C organique facilement dégradable qui stimulent rapidement les activités microbiennes (Dinesh et al., 2003).

Travail du sol et S-metolachlore. Tout d'abord, il est à noter que le choix d'utiliser un herbicide sélectif et non total pour l'article 5 est lié à deux facteurs. Le premier est lié à la présence de la culture de maïs dans l'expérimentation au champ, le S-metolachlore étant un herbicide utilisé dans cette culture. Le deuxième facteur se base sur de récentes études qui ont montré un manque d'information concernant les effets de cet herbicide sur le sol et l'environnement (White et al., 2010). Il y avait donc un fort intérêt à consacrer un chapitre des effets du S-metolachlore sur les indicateurs qualitatifs et le devenir de ce pesticide dans les sols dans des agrosystèmes différenciés. Les points forts de cet article 5 montrent à la fois que les deux apports du S-metolachlore ont augmenté significativement les concentrations de la molécule mère, de ses métabolites de dégradations ainsi que les teneurs en nitrate dans le sol et la solution du sol. En revanche, les résultats n'ont pas montré d'effet significatif sur les activités biologiques des sols, ni sur les rendements du maïs. Il existe très peu d'études des effets du S-metolachlore sur les indicateurs de qualité des sols. Les seules que nous avons étudié ont des résultats cohérents avec ceux obtenus dans l'article 5 de ce manuscrit de thèse, à savoir que l'apport de pesticide à la dose au champ n'est pas véritablement néfaste pour les indicateurs biologiques mesurés, mais peut conduire à une augmentation importante des teneurs en éléments chimiques non retenus (PO_4 , NO_3) par le complexe argilo-humique dans les sols. D'une part, Huang et al. (2017) ont montré que dans les sols riches en MO, le S-metolachlore induisait une augmentation de certaines activités enzymatiques du sol (catalase, déshydrogénase, uréase, cellulase). D'autre part, ils ont montré une augmentation rapide des populations microbiennes (actinomycètes, champignons et bactéries), seulement deux semaines après l'apport d'une concentration élevée en S-métolachlore. Ces auteurs suggèrent également que la gestion du S-metolachlore, et notamment de la dose à appliquer dans les champs, doit être reliée aux facteurs environnementaux (pH, température, humidité) afin d'obtenir un compromis satisfaisant entre la gestion des mauvaises herbes et le risque de contamination environnementale. D'autres auteurs ont montré que certaines souches de microorganismes (par ex. : *Klebsiella pneumoniae*) étaient particulièrement efficaces dans la dégradation rapide du S-metolachlore (Martins et al., 2007). Cela suggère la nécessité de mettre en place, à l'aide de techniques génétiques plus abouties, des études sur la croissance bactérienne en présence de l'herbicide afin de mieux comprendre la dégradation des herbicides soumises à différentes conditions abiotiques. D'autant plus que des chercheurs ont montré que certaines espèces étaient sensibles (e.g. les espèces du genre *Azotobacter*) alors que d'autres, au contraire, étaient stimulées comme certains Actinomycètes par l'application de différents herbicides (Zemolin et al., 2014). Nous suggérons donc que les microorganismes (sensibles ou au contraire utilisant les herbicides comme source d'énergie) peuvent servir de bioindicateurs fiables dans la détermination de l'impact des

herbicides sur la microflore des sols. C'est pourquoi, nous suggérons qu'il est important d'identifier les pratiques culturales qui favorisent les espèces microbiennes sensibles ou au contraire capables de dégrader efficacement les herbicides. Cela permettra de déterminer quelle gestion agronomique est la plus adaptée pour améliorer l'efficacité de dégradation des molécules phytosanitaires et donc pour limiter les potentielles contaminations environnementales. Des recherches ont montré par ailleurs que dans les écosystèmes naturels, des concentrations importantes de S-métolachlore peuvent affecter les teneurs en phosphate, ammonium et nitrate en diminuant leur assimilation nette ainsi que les taux d'absorption et de minéralisation par rapport à des concentrations moyennes (Elias & Bernot, 2014). La gestion du S-métolachlore est donc nécessaire en agriculture afin de limiter les pertes en azote et en phosphore qui peuvent également conduire à des contaminations chimiques dans les eaux souterraines. Cette préoccupation est d'autant plus forte lorsque d'autres pratiques agricoles qui sont connues pour favoriser la lixiviation des éléments chimiques sont associées à l'apport du S-métolachlore. En effet, l'effet des pratiques agricoles sur le devenir du S-métolachlore dans les sols a fait l'objet d'un certain nombre de travaux scientifiques. Par exemple, Singh (2002) ont montré que l'application d'amendements organiques et d'engrais azotés peut affecter la sorption et le déplacement des pesticides dans le sol. Les applications de MO (par exemple le fumier de vache) et d'urée ont augmenté la sorption du métolachlore dans les sols, ont réduit les pertes par lixiviation du S-métolachlore et ont diminué la mobilité du S-métolachlore. Par conséquent, dans les sols avec des teneurs en MO faibles, les applications combinées de S-métolachlore et de fumier ou d'engrais à base d'urée ont diminué la possibilité que l'herbicide puisse contaminer les eaux souterraines. D'autres travaux réalisés par White et al. (2010) ont étudié les programmes phytosanitaires conventionnels, dans lesquels les agriculteurs appliquent un herbicide au moment du semis, suivi par des applications séquentielles de fongicides après l'émergence de la culture. Les auteurs ont montré que ces gestions pouvaient modifier l'efficacité des herbicides et représenter une source de contamination forte pour l'environnement. Par exemple, ils ont montré que le fongicide chlorothalonil réduisait significativement la dissipation du S-métolachlore dans les sols par rapport à des sols qui ne recevaient que le S-métolachlore. Ils ont également observé une diminution de la teneur en métabolites de dégradation (acide oxalinique et acide sulfonique) dans les sols qui recevaient les deux traitements, suggérant que le fongicide avait une incidence sur l'activité de la glutathion-S-transférase de l'herbicide. En revanche, les impacts des produits combinés sur les communautés microbiennes du sol étaient minimes. Nous concluons que la gestion combinée de deux ou plusieurs pratiques culturales peut avant tout modifier les processus de transport et le devenir des molécules phytosanitaires dans les sols. Nos résultats corroborent avec cette conclusion même si nous n'avons pas étudié l'effet combiné de deux ou plusieurs pesticides, mais uniquement les combinaisons travail du sol-azote-pesticide.

2. Effets des combinaisons de pratiques sur la qualité du sol, la productivité végétale et les interactions trophiques aériennes et souterraines

2.1. Effets des combinaisons de pratiques sur les paramètres souterrains et aériens

Les effets d'une pratique culturale sur les indicateurs qualitatifs du sol permettent de fournir des informations quant au choix de la pratique la plus adaptée dans un contexte de développement durable. Cependant, les résultats obtenus dans les différents articles de ce manuscrit de thèse nous montrent que l'analyse individuelle d'une seule pratique sur les indices qualitatifs du sol n'est pas pertinente et ne reflète pas les conditions réelles rencontrées par la profession agricole. En effet, sur le terrain, la gestion des agrosystèmes par les agriculteurs est conduite par la réalisation de plusieurs pratiques agricoles combinées dans le temps et dans l'espace. Par exemple, la couverture végétale d'interculture, le travail du sol, les traitements phytosanitaires et les apports d'azote de synthèse en post-semis, sont des pratiques combinées qui sont réalisées au sein d'un même programme technique annuel. L'un des objectifs de ce travail de thèse était de déterminer l'influence des combinaisons culturales sur la qualité du sol et sur les potentielles contaminations environnementales. Cet objectif est nécessaire pour mettre en lumière les combinaisons culturales les plus adaptées ou au contraire les plus néfastes pour le sol et l'environnement, dans l'intérêt d'orienter les agriculteurs qui sont engagés dans une démarche de conservation des sols.

2.1.1. Effets négatifs de la combinaison de deux pratiques culturales

Les résultats de l'**article 1** ont montré que l'historique de **fertilisation azotée** a modifié les effets du **glyphosate** sur les enzymes du sol dans une expérience réalisée en mésocosme. Des résultats similaires ont été rapportés par **Munoz-Leoz et al. (2012)** qui suggèrent que la fertilisation pouvait modifier les effets non ciblés des pesticides sur les communautés microbiennes. En accord avec leurs résultats, nous avons montré dans l'**article 1** qu'il existe des effets négatifs sur la qualité du sol lorsque les engrais azotés de synthèse sont appliqués régulièrement à la dose conventionnelle et que le glyphosate est appliqué ponctuellement au cours de l'année pour la gestion des adventices. De plus, dans l'**article 2**, les résultats montraient que ces deux produits de synthèse (fertilisation azotée plus glyphosate) avaient un effet négatif sur la colonisation racinaire par les champignons mycorhiziens. Nous suggérons qu'à plus long terme, les effets négatifs de la combinaison, simultanée ou différée, des fertilisants azotés et des pesticides, peuvent conduire à une diminution de la vitesse de recyclage des nutriments dans les sols. En effet, une diminution des taux de décomposition de l'N et du P organique par les microorganismes spécifiques peut induire indirectement une augmentation de la teneur en N organique (e.g. mesurée dans l'**article 2**). La diminution du taux de minéralisation peut avoir un impact négatif sur la productivité végétale, d'autant plus lorsque les organismes symbiotiques et/ou

rhizosphériques sont directement ou indirectement touchés par la combinaison des pratiques agricoles. De même, les résultats de l'**article 4** ont permis de montrer des effets négatifs de la combinaison du **labour et de la fertilisation azotée et/ou des couverts végétaux** sur l'évolution des teneurs en carbone et azote, et sur les activités enzymatiques du sol. Ces résultats sont cohérents avec une étude réalisée par **Heidari et al. (2016)**. Ces auteurs montraient que dans les systèmes labourés, l'application des engrais chimiques diminuaient à la fois les activités enzymatiques et la biomasse du carbone microbien. Cette diminution des activités enzymatiques peut induire une diminution de la croissance des plantes car leur capacité à utiliser le phosphore inorganique est le plus souvent liée à l'activité enzymatique phosphatase qui transforme le phosphore insoluble en ions libres, biodisponibles pour les cultures. En accord avec d'autres études, nous pensons donc que la fertilisation azotée associée au travail du sol entraîne des effets négatifs sur la qualité du sol. Une solution pour palier aux effets néfastes de la fertilisation azotée et du labour tout en maintenant les niveaux de productivité des cultures principales serait de remplacer l'azote de synthèse par de l'azote organique issu de couverts végétaux caractérisés par un ratio C:N bas (e.g. intercultures à base de plantes légumineuses) et intégrés dans une rotation conduite en semis-direct sous couverture végétale permanente.

2.1.2. Effets neutres ou synergiques de deux pratiques culturales combinées

Les différents articles de ce manuscrit de thèse ont également permis de montrer des effets neutres ou synergiques entre la combinaison des pratiques culturales testées sur certains indicateurs qualitatifs. A titre d'exemple, les articles **3** et **5** montraient que le **labour et la fertilisation azotée** avaient des effets neutres sur le phosphore assimilable, les teneurs en S-metolachlore, ainsi que sur les champignons mycorhiziens du sol. De même, les pratiques du **semis-direct et de la fertilisation azotée** ont eu des effets neutres sur les teneurs en phosphore, en S-metolachlore, sur les activités des mycorhizes, sur les teneurs en éléments nutritifs et les activités microbiennes des turricules de vers de terre ainsi que sur le rendement des plantes.

Parallèlement, des effets synergiques ont été montrés dans les résultats des différents articles de ce manuscrit de thèse. Tout d'abord, l'**article 2** a mis en évidence une augmentation des teneurs en N total dans les sols et des teneurs en ammonium dans la plante lorsqu'une dose conventionnelle de **glyphosate** était appliquée sur les **sols fertilisés**. Des travaux réalisés par **Bojovic & Markovic (2009)** avaient déjà établi des corrélations entre la teneur en azote dans les sols et une plus grande teneur en azote dans les feuilles. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a établi un lien entre l'application de glyphosate et l'augmentation des teneurs en azote dans les sols fertilisés et dans la plante. En accord avec **Busse et al. (2001)**, nous suggérons que l'apport ponctuel de glyphosate peut être une source d'azote organique supplémentaire dans les sols recevant des intrants azotés de synthèse régulièrement (soit une à trois application(s) d'azote annuellement dans les sols gérés de manière

conventionnelle). L'azote organique contenu dans les molécules de glyphosate est donc une source « excédente » qui a pu être rapidement adsorbée sur les particules de sol ou immobilisée par la biomasse microbienne. Nous suggérons que dans un sol fertilisé, non limitant en azote minéral, l'apport d'une source nouvelle d'azote organique n'est pas rapidement minéralisée par les microorganismes des sols et peut donc conduire à une augmentation des teneurs en azote organique dans ces sols. En accord avec [Bojovic & Markovic \(2009\)](#) nous supposons que l'augmentation d'azote organique du sol peut ainsi être corrélée avec la teneur en ammonium dans les feuilles de haricot.

De la même façon, le **labour et la fertilisation azotée** ont eu des effets synergiques sur la productivité du maïs ([article 3](#)), et le **semis-direct et les couverts végétaux** ont amélioré la séquestration du carbone ainsi que les activités enzymatiques et fonctionnelles des sols ([article 4](#)). Ces résultats corroborent avec d'autres études, et notamment celle de [Veum et al. \(2017\)](#) qui a montré que, dans la couche superficielle du sol, la qualité biologique était supérieure lorsque les couverts végétaux étaient associés à la pratique du semis-direct comparativement à cette même pratique sans culture de couverture. De même, [Mbutia et al. \(2015\)](#) ont démontré que l'introduction de couverts végétaux en semis-direct augmentait les activités microbiennes et les teneurs en carbone, azote et phosphore dans les sols. En effet, nous pensons que l'intégration de couverts végétaux représente une source de substrats nutritifs carbonés et favorise le maintien de conditions humides favorables à la croissance des microorganismes du sol ; tandis que le semis-direct favorise la cohésion physique des agrégats et le maintien des galeries des vers de terre, tous deux favorables aux activités biologiques et essentiels au processus de stockage de la MO.

Cependant, nous avons montré que la combinaison synergique des deux pratiques de semis-direct et de couverture végétale en inter-culture peut être contrecarrée par l'intervention d'une troisième pratique agricole telle que la fertilisation azotée. En effet, si l'apport d'**azote de synthèse** dans les **sols conduits en semis-direct avec couverts végétaux** n'a pas induit de modification sur les indicateurs carbone et azote total, activités enzymatiques de déshydrogénase et d'uréase, il a néanmoins été néfaste pour les activités et la diversité fonctionnelle(s) microbienne(s). En revanche, l'application de la **fertilisation azotée dans les sols labourés et couverts** a permis de neutraliser les effets négatifs de ces deux pratiques combinées (i.e. labour plus couverture végétale) sur les indicateurs carbone et azote total, activités enzymatiques de déshydrogénase. Cela démontre l'importance de connaître les effets combinés entre les pratiques afin de reproduire au mieux les situations techniques rencontrées au champ et de pouvoir maximiser le potentiel des sols. Les résultats de l'[article 5](#) montrent d'autres cas de changements induits par une troisième pratique ajoutée dans une combinaison. Par exemple, la **fertilisation azotée, dans les systèmes gérés en labour sous application de S-metolachlore**, a neutralisé les concentrations en S-metolachlore dans la solution du sol. De même, la **fertilisation azotée dans les sols gérés en labour plus herbicide sélectif** a augmenté la teneur en nitrates ; alors que dans

les sols **gérés en semis-direct plus herbicide sélectif**, la fertilisation azotée a augmenté la teneur en ammonium dans les turricules de vers de terre.

Ces résultats ont permis de montrer l'importance d'étudier les combinaisons de pratiques agricoles sur les paramètres édaphiques et aériens. La **figure 26** permet d'illustrer les grandes tendances qui rendent compte des effets individuels ou combinés de l'ensemble des pratiques testées sur les différents indicateurs.

A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées aux effets des combinaisons culturales sur les indicateurs biologiques. Pourtant, un grand intérêt doit être accordé à ces interactions car, comme montré précédemment, les effets négatifs d'une pratique culturale peuvent être neutralisés lorsque celle-ci est associée à d'autres pratiques de gestion. A contrario, les effets positifs d'une pratique peuvent être inhibés par l'association avec une pratique néfaste pour la qualité du sol. Un exemple largement décrit dans la littérature est l'évaluation de l'interaction entre les engrais azotés et le travail du sol sur le processus de stockage du C organique dans les sols. **Alvarez (2005)** a montré que l'application d'azote de synthèse seule n'a pas amélioré la teneur en carbone organique du sol alors que l'association entre la fertilisation azotée et la restitution des résidus de culture a eu un effet significativement positif. Aussi, **Habig & Swanepoel (2015)** ont mis en évidence que les systèmes de gestion agricoles tels que les apports d'engrais, l'introduction de couverts végétaux et le travail du sol avaient des effets différents sur l'activité et l'abondance d'espèces microbiennes selon qu'ils étaient gérés individuellement ou en combinaison. A l'image de nos résultats, ces auteurs ont montré que la combinaison du semis-direct, la diversification des cultures dans la rotation, la couverture permanente du sol, et la diminution de l'usage des engrais de synthèse aboutit à la plus forte augmentation de la diversité et des activités microbiennes comparativement à chaque pratique testée individuellement. Cependant, ces mêmes pratiques associées à l'apport d'engrais ou d'herbicides ne conduisaient pas à l'amélioration significative de la diversité et des activités des communautés microbiennes du sol (**Habig & Swanepoel, 2015**). Les recherches futures doivent donc être orientées en prenant en compte la combinaison spatiale et temporelle des pratiques agricoles, ainsi que la durée nécessaire à la stabilisation des changements induits par ces combinaisons. L'ensemble de ces critères permettra de déterminer quelles pratiques de conservation des sols sont les plus pertinentes pour entretenir la fertilité et la qualité des sols dans des conditions pédoclimatiques contrastées. Il est également nécessaire de reconsidérer les systèmes agricoles dans leur intégralité, en prenant en compte non seulement les indicateurs édaphiques et aériens, mais également les interactions qui existent entre les milieux souterrains et aériens au sein des agroécosystèmes.

2.2. Interactions trophiques

Comme nous venons de le voir précédemment et dans l'objectif de conserver les sols tout en maximisant les rendements, des recherches scientifiques sont encore nécessaires. D'autant plus

qu'Abawi & Widmer (2000) ont rapporté que toutes les pratiques culturales existantes étaient connues pour affecter la qualité des sols. Par exemple, en affectant les populations de pathogènes, certaines pratiques culturales peuvent aggraver des maladies racinaires des plantes. Il est bien connu que certaines combinaisons de pratiques contribuent fortement à augmenter ou, au contraire, à diminuer les principales activités des microorganismes du sol mais aussi les populations de ravageurs et le parasitisme des cultures. Ainsi, Abawi & Widmer (2000) soulignent qu'il est nécessaire de s'assurer que les pratiques de gestion, introduites pour améliorer la qualité du sol, ne déstabiliseront pas les interactions trophiques entre le dessous et le dessus de la surface du sol. Dans ces interactions, sont compris à la fois l'abondance et la diversité totale des microorganismes, les organismes bénéfiques (champignons mycorhiziens, vers de terre) mais aussi les organismes néfastes (insectes ravageurs tels que les pucerons) aux niveaux souterrains et aériens. La plante, en jouant le rôle d'intermédiaire, peut influencer ces interactions et assurer la stabilité à long terme de la MO du sol et donc de sa qualité. Des cas d'études sur ces interactions et leurs relations avec la qualité des sols ont été présentés dans les **articles 2 et 5** de ce manuscrit de thèse.

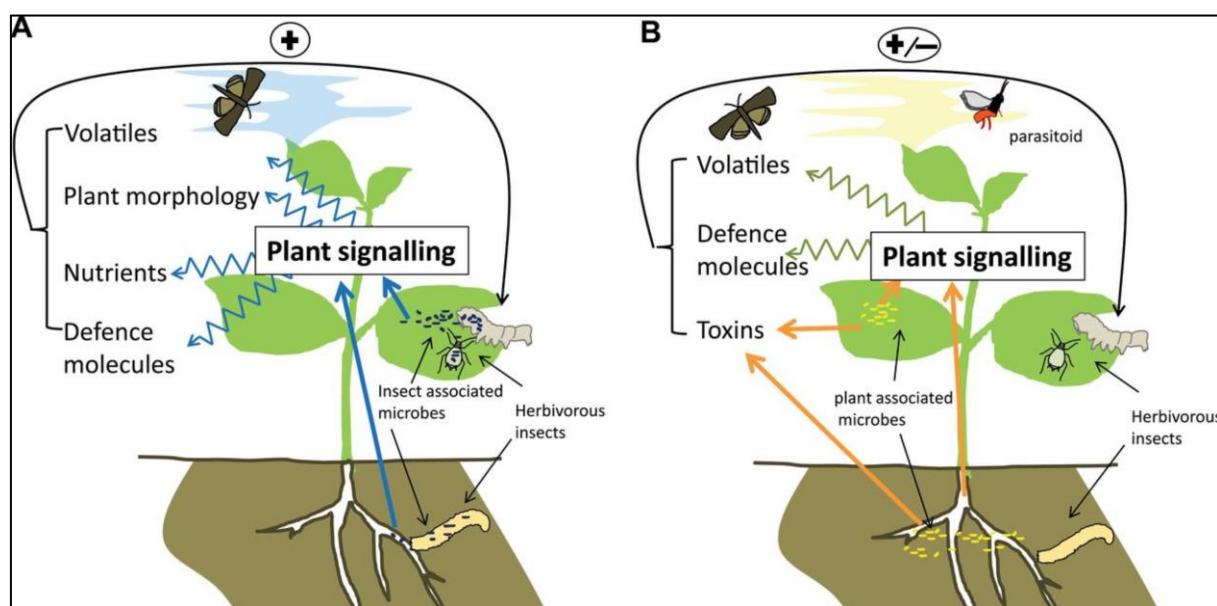


Fig. 27. Représentation schématique des interactions plantes-insectes-bactéries. (A) Les symbiotes bactériens associés à des insectes herbivores (représentés sous la forme de flèches bleues) peuvent être localisés dans divers compartiments corporels (les glandes salivaires, l'intestin, les bactériocytes ou l'hémolymphe). Certaines protéines dérivées de bactéries elles-mêmes sont sécrétées dans les plantes. Certaines bactéries peuvent également infecter systématiquement les plantes et être reconnues comme pathogènes par la plante. Les bactéries associées aux insectes interfèrent avec avec différents processus de signalisation des plantes, ce qui entraîne des altérations : de la composition volatile, de la morphologie des plantes, des nutriments et de la production de composés liés à la défense. Ces altérations ont souvent des effets positifs sur les réponses physiologiques des insectes et l'attraction des insectes adultes sur les plantes stressées. (B) Les bactéries associées aux plantes (présentées sous forme de flèches oranges), sont localisées soit dans la rhizosphère, soit dans la phyllosphère, interfèrent avec les voies de signalisation des plantes conduisant à des altérations : de la composition volatile de la plante et de la production de molécules liées à la défense. Ces altérations peuvent avoir un impact positif ou négatif sur les réponses physiologiques des insectes. Certaines bactéries associées aux plantes peuvent également produire des toxines qui agissent directement contre les insectes herbivores (issue de Sugio et al., 2014).

La mise en place d'un système expérimental sol-plante-puceron dans un milieu fermé pour l'article 2 et d'un système expérimental sol-plante-turricules de vers de terre dans un milieu ouvert pour l'article 5 nous ont permis de fournir des indications sur les interactions potentielles qui existent lorsque le sol est soumis à des perturbations. Les principaux résultats de l'article 2 (voir la figure conceptuelle correspondant à cet article) montrent qu'au sein d'un système fermé il existe des interactions entre les milieux souterrains et aériens. Par exemple, nous avons montré que la teneur en nutriments dans le sol a eu des effets positifs sur la survie larvaire des pucerons. De même, la forte teneur en nitrate dans les sols contribue à améliorer le statut nutritif de la plante *Phaseolus vulgaris*, elle même conduisant à améliorer la réponse physiologique des pucerons *Aphis fabae*. Inversement, les plus fortes activités enzymatiques mesurées dans le sol ont été associées à une plus forte diminution de la survie larvaire des pucerons. Sugio et al. (2014) ont rapporté qu'il existait des mécanismes par lesquels les microbes du sol interfèrent avec le complexe plante-insecte. Par exemple, il est connu que les microbes et leurs enzymes peuvent moduler la teneur en métabolites primaires et secondaires et/ou les systèmes de défenses des végétaux contre les insectes. De même, les microorganismes peuvent affecter la biologie des insectes, y compris leur métabolisme et leur comportement (Fig. 27).

Dans notre étude nous n'avons pas montré de relation entre la mycorhization du haricot *Phaseolus vulgaris* et la survie des pucerons *Aphis fabae*. Cependant, d'autres études ont fait état d'interactions entre les mycorhizes et les phytophages aériens. Par exemple, Babikova et al. (2014) ont montré que les interactions des plantes avec les herbivores et les champignons mycorhiziens fonctionnent dans les deux directions (ascendante et descendante). En effet, les champignons mycorhiziens jouent un rôle fondamental ascendant en augmentant l'attractivité des végétaux vis-à-vis des pucerons par la production des composés organiques volatils, alors que les pucerons ont des effets négatifs sur la formation des symbioses mycorhiziennes, la biomasse et la nutrition végétale. Ainsi, ces auteurs ont conclu que les organismes souterrains et aériens peuvent interagir au travers une modification de la qualité de leur plante hôte, sans que l'un et l'autre entrent en contact directement. Fait intéressant, nous avons montré des interactions négatives entre les enzymes déshydrogénase, phosphatase alcaline et la réponse physiologique des plantes. Cependant, nous ne pouvons préciser s'il s'agit d'enzymes qui opèrent dans la rhizosphère. Or, une étude réalisée par Gianfreda (2015) a montré que les enzymes de la rhizosphère ont une activité généralement plus élevée que les enzymes du sol environnant et peuvent ainsi diminuer la disponibilité des nutriments à portée des racines.

L'article 5 a mis en évidence que la fertilisation azotée a entraîné une augmentation des teneurs en phosphore assimilable dans le sol et des teneurs en nitrates dans le sol et la solution du sol. Des interactions positives ont également été trouvées entre ces nutriments et le rendement de la culture de maïs. Bien que, le semis direct a contribué à augmenter les teneurs en carbone et azote total du sol et la

concentration en S-metolachlore dans la solution du sol de l'horizon 0-20 cm. Les facteurs environnementaux mesurés en conditions de semis-direct ont été décrits comme ayant des interactions positives avec les activités d'ammonification des turricules de vers de terre mais aussi avec les activités de colonisation racinaire du maïs par les champignons mycorhiziens.

L'ensemble de ces résultats montre qu'un compromis doit être trouvé entre, d'un côté les applications chimiques d'azote de synthèse et de pesticides pour la croissance et la protection des plantes respectivement, et de l'autre l'amélioration des activités biologiques favorisées par des perturbations minimales et l'introduction de couverts végétaux en inter-culture. En effet, les intrants agricoles (e.g. fertilisants de synthèse, amendements organiques, pesticides) permettent de maximiser la productivité en dépit des effets non ciblés sur les organismes du sol et leurs interactions trophiques, pouvant altérer, au bilan, le rendement économique des exploitations. A l'heure actuelle, la conjoncture agricole implique d'augmenter la qualité des sols pour envisager une réduction progressive des consommations en intrants et ainsi générer des économies d'échelle. La diminution des charges et l'augmentation conséquente de la marge nette sont désormais à la base de la réussite économique des exploitations agricoles bien avant le rendement brut issu de la productivité végétale. De manière synthétique, une review de [Bünemann et al. \(2015\)](#) explique que la fertilisation azotée a des effets positifs sur la productivité végétale, des effets contrastés sur les indicateurs biologiques du sol (positif, neutre et négatif) et des effets négatifs sur certains indicateurs chimiques tels qu'une acidification importante. A terme cette acidification est néfaste pour la plupart des indicateurs biologiques clés de la qualité des sols. A l'inverse, les couverts végétaux influencent positivement la biologie des sols et la productivité végétale en générant un apport de carbone fréquent et qualitativement maîtrisé. Contrairement aux insecticides et fongicides, les herbicides n'ont montré, dans la plupart des cas, que des effets minimalistes sur les organismes du sol. Pourtant, l'association des pratiques culturales peut modifier les effets des pratiques individuelles et ainsi altérer les interactions entre les milieux souterrain et aérien (e.g. effets sur la qualité du sol, de son environnement, et sur la productivité végétale). Des connaissances accrues sur les interactions trophiques « bottom-up » doivent être intégrées dans le développement de systèmes agricoles productifs et durables. Ces interactions peuvent représenter des stratégies dans l'augmentation de la productivité des cultures ou la diminution des coûts associés à la protection des plantes contre les organismes nuisibles. L'objectif est finalement d'orienter les choix techniques permettant d'entretenir ou restaurer la qualité des sols et de l'environnement tout en maintenant des rendements suffisants pour assurer la fonction nourricière fondamentale de l'agriculture et la durabilité financière et agronomique des exploitations agricoles.

Références bibliographiques

Abawi, G.S., Widmer, T.L. 2000. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens nematodes and root diseases of vegetable crops. *App. Soil Ecol.* 15: 37-47.

Ajwa, H.A., Dell, C.J., Rice, C.W. 1999. Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soil as related to burning and nitrogen fertilization. *Soil Biol. Biochem.* 31(5): 769-777.

Alexander, M. 1977. *Introduction to soil microbiology*. 2nd ed. New-York, Wiley, pp. 225.

Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., Zuberer, D.A. 2000. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sc.* 48: 89-93.

Alvarez, R. 2005. A review of nitrogen fertilizer and conservation tillage effects on soil organic carbon storage. *Soil Use Manag.* 21(1): 38-52.

Aziz, I., Mahmood, T., Islam, K.R. 2013. Effect of long term no-till and conventional practices on soil quality. *Soil Till. Res.* 131: 28-35.

Babikova, Z., Gilbert, L., Bruce, T., Dewhurst, S.Y., Pickett, J.A., Johnson, D. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungi and aphids interact by changing host plant quality and volatile emission. *Functional Ecol.* 28: 375-385.

Babujia, L.C., Hungria, M., Franchini, J.C., Brookes, P.C. 2010. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. *Soil Biol. Biochem.* 42: 2174- 2181.

Bayer, C., Martin-Neto, L., Mielniczuk, J., Pillon, C.N., Sangoi, L. 2001. Changes in soil organic matter fractions under subtropical no-till cropping systems. *Soil Sci. Society Am. J.* 65: 1473-1478.

Bending, G.D., Turner, M.K., Rayns, F., Marx, M.C., Wood, M. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1785-1792.

Blair, J.M., Parmelee, R.W., Allen, M.F., McCartney, D.A., Stinner, B.R. 1997. Changes in soil N pools in response to earthworm population manipulations in agroecosystems with different N sources. *Soil Biol. Biochem.* 29: 361-367.

Bojovic, B., Markovic, A. 2009. Correlation between nitrogen and chlorophyll content. *Kragujevac J. Sci.* 31: 69-74.

Bunemann, E.K., Schwenke, G.D., van Zwieten, L. 2015. Impact of agricultural inputs on soil organisms-a review. *Australian J. Soil Res.* 44: 379-406.

Busse, M.D., Ratcliff, A.W., Shestak, C.J., Powers, R.F. 2001. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1777-1789.

- Cardoso, E.J.B.N., Vasconcellos, R.L.F., Miyauchi, M.Y.H., dos Santos, C.A., Alves, P.R.L., de Paula, A.M., Nakatani, A.S., de Moraes Pereira, J., Nogueira, M.A. 2013. Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? *Sci. Agric.* 4: 274-289.
- Del Galdo, I., Six, J., Peressotti, A., Cotrufo, M.F. 2003. Assessing the impact of land-use change on soil C sequestration in agricultural soils by means of organic matter fractionation and stable C isotopes. *Global Change Biol.* 9: 1204-1213.
- Dick, R.P., Sandor, J.A., Eash, N.S. 1994. Soil enzyme activities after 1500 years of terrace agriculture in the Colca Valley, Peru. *Agric. Ecosyst. Environ.* 50: 123-131.
- Dinesh, R.; Chaudhuri, S.G.; Ganeshamurthy, A.N.; Dey, C. 2003. Changes in soil microbial indices and their relationships following deforestation and cultivation in wet tropical forests. *Applied Soil Ecology* 24: 12-26.
- Doran, J.W. 1980. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. *Soil Sci. Soc. Am.* 44(4): 765-771.
- Elias, D., Bernot, M.J. 2014. Effects of atrazine, metolachlor, carbaryl and chlorothalonil on benzie microbes and their nutrient dynamics. *Plos One*, 9(10): 1-7.
- Franz, J.E., Mao, M.K., Sikorski, J.A. 1997. Glyphosate: a unique global herbicide. *In: « American Chemical Society Monograph 189, American Chemical Society, Washington, DC ».*
- Gianfreda, L. 2015. Enzymes of importance to rhizosphere processes. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15(2): 283-306.
- Habbib, H., Verzeaux, J., Nivelles, E., Roger, D., Lacoux, J., Catterou, M., Hirel, H., Dubois, F., Tetu, T. 2016. Conversion to no-till improves maize nitrogen use efficiency in a continuous cover cropping system. *PLoS ONE* 11 (10): e0164234.
- Habig, J., Swanepoel, C. 2015. Effects of conservation agriculture and fertilization on soil microbial diversity and activity. *Environ.* 2: 358-384.
- Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., Zuberer, D.A. 2000. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sc.* 48: 89-93.
- Heidari, G., Mohammadi, K., Sohrabi, Y. 2016. Responses of soil microbial biomass and enzyme activities to tillage and fertilization systems in soybean (*Glycine max L.*) production. *Front Plant Sci.* 7(1730): 1-9.
- Hosseini, A., Hosseini, M., Goldani, M., Karimi, J., Madadi, H. 2015. Effect of nitrogen fertilizer on biological parameters of the *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae) and associated productivity losses in common globe amaranth. *J. Agr. Sci. Tech.* 17: 1517-1528.

- Huang, J., Cui, Y., Zhou, L., Miao, H., Feng, L. 2017. Degradation of S-metolachlor and its effects on soil enzymes and microbial communities in vegetable field soil. *J. Resid. Sc. Technol.* 14(1): 245-254.
- Hu, J., Yang, A., Zhu, A., Wang, J., Dai, J., Wong, M.H., Lin, X. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity, root colonization, and soil alkaline phosphatase activity in response to maize-wheat rotation and no-tillage in North China, *J. Microbiol.* 53: 454–461, doi:10.1007/s12275-015-5108-2.
- Johnson, N.C. 1993. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecological App.* 3(4): 749-757.
- Johnston, A.S.A., Sibly, R.M., Hodson, M.E., Alvarez, T., Thorbek, P. 2015. Effects of agricultural management practices on earthworm populations and crop yield: validation and application of a mechanistic modelling approach. *J. Appl. Ecol.* 52: 1334-1342.
- Kennedy, A.C. 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 65-76.
- Mahdavi-Arab, N., Meyer, S.T., Mehrparvar, M., Weisser, W.W. 2014. Complex effects of fertilization on plant and herbivore performance in the presence of a plant competitor and activated carbon. *Plos One*, 9(7): 1-10.
- Makoi, J.H.J.R., Ndakidemi, P.A. 2008. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *Af. J. Biotechn.* 7(3): 181-191.
- Marschner, B., Brodowski, S., Dreves, A., Gleixner, G., Gude, A., Grootes, P.M., Hamer, U., Heim, A., Jandl, G., Ji, R., Kaiser, K., Kalbitz, K., Kramer, C., Leinweber, P., Rethemeyer, J., Schäffer, A., Schmidt, M.W.I., Schwark, L., Wiesenberg, G.L.B. 2008. How relevant is recalcitrance for the stabilization of organic matter in soils? *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 171: 91-110.
- Martins, P.F., Martinez, C.O., de Carvalho, G., Carneiro, P.I.B., Azevedo, R.A., Pileggi, S.A.V., de Melo, I.S., Pileggi, M. 2007. Selection of microorganisms degrading S-Metolachlor herbicide. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50(1): 153-159.
- Mbuthia, L.W., Acosta-Martínez, V., DeBruyn, J., Schaeffer, S., Tyler, D., Odoi, E., Mpheshea, M., Walker, F., Eash, N. 2015. Long-term tillage, cover crop, and fertilization effects on microbial community structure, activity: Implications for soil quality. *Soil Biol. Biochem.* 8: 24-34. doi:10.1016/j.soilbio.2015.06.016
- Mulvaney, R.L., Khan, S.A., Ellsworth, T.R., 2009. Synthetic Nitrogen Fertilizers Deplete Soil Nitrogen: A Global Dilemma for Sustainable Cereal Production. *Journal of Environmental Quality* 38, 2295–2314.
- Munoz-Leoz, B., Garbisu, C., Antiguada, I., Ruiz-Romera, E. 2012. Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 48: 125-134.

Nogueira, M.A., Albino, U.B., Brandão-Júnior, O., Braun, G., Cruz, M.F., Dias, B.A., Duarte, R.T.D., Gioppio, N.M.R., Menna, P., Orlandi, J.M., Raiman, M.P., Rampazo, L.G.L., Santos, M.A., Silva, M.E.Z., Vieira, F.P., Torezan, J.M.D., Hungria, M., Andrade, G. 2006. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. *Agr. Ecosyst. Environ.* 115: 237-247.

Nunan, N., Lerch, T.Z., Pouteau, V., Mora, P., Changey, F., Kätterer, T., Giusti-Miller, S., Herrmann, A.M., 2015. Metabolising old soil carbon: Simply a matter of simple organic matter? *Soil Biol. Biochem.* 88, 128–136.

Olander, L.P., Vitousek, P.M. 2000. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry*, 49(2): 175-191.

Potter, D.A., Bridges, B.L., Gordon, F.C. 1985. Effect of N fertilization on earthworm and microarthropod populations in Kentucky bluegrass turf. *Agron. J.* 77: 361-312.

Ramirez, K.S., Craine, J.M., Fierer, N. 2012. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Global Change Biol.* pp. 1-10.

Ramos, M.E., Robles, A.B., Sanchez-Navarro, A., Gonzalez-Rebollar, J.L. 2011. Soil responses to different management practices in rainfed orchards in semiarid environments. *Soil and Tillage Research* 112: 85-91.

Ratcliff, A.W., Busse, M.D., Shestak, C.J., 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils 34, 114–124. doi:10.1016/j.apsoil.2006.03.002

Samuel, A.D. 2009. Influence of long-term fertilization on soil enzyme activities. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie. Tom. XVI, 1:* 113-116.

Schoenholtz, S.H., van Miegroet, H., Burger, J.A. 2000. Forest ecology and management. *Forest Ecol. Mangem.* 138: 335-356.

Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J.C. 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Ag. Ecosyst. Environ.* 98: 255-262.

Schmidt, M.W.I., Torn, M.S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I.A., Kleber, I.K., Kogel-Knabner, I., Lehmann, J., Manning, D.A.C., Nannipieri, P., Rasse, D.P., Weiner, S., Trumbore, S.E. 2011. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature*, 478: 49-56.

Shen, W., Lin, X., Shi, W., Min, J., Gao, N., Zhang, H., Yin, R., He, X. 2010. Higher rates of nitrogen fertilization decrease soil enzyme activities, microbial functional diversity and nitrification capacity in a Chinese polytunnel greenhouse vegetable land. *Plant Soil*, 337: 137-150.

Singh, N. 2002. Organic manure and urea effect on metolchlor transport packed soil columns. *J. Environ. Qual.* 32(5): 1743-1749.

Sinsabaugh, R.L., Antibus, R.K., Linkins, A.E. 1991. An enzymatic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agric. Ecosyst. Environ.* 34: 43-54.

Sugio, A., Dubreuil, G., Giron, D., Simon, J.C. 2014. Plant-insect interactions under bacterial influence ecological implications and underlying mechanisms. *J. Expe. Botany*, pp. 3-12.

Tiwari, S.C. 1993. Effects of organic manure and NPK fertilization on earthworm activity in an Oxisol. *Biol. Fert. Soils*, 16(4): 293-295.

Tsui, M.T.K., Chu, L.M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate- based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52: 1189-1197.

Veum, K.S., Kremer, R.J., Sudduth, K.A., Kitchen, N.R., Lerch, R.N., Baffaut, C., Stott, D.E., Karlen, D.L., Sadler, E.J. 2017. Conservation effects on soil quality indicators in the Missouri Salt River Basin. *J. Soil Water Conservat.* 72(2): 26A-31A.

White, P.M., Potter, T.L., Culbreath, A.K. 2010. Fungicide dissipation and impact on metolachlor aerobic soil degradation and microbial dynamics. *Sc. Total Environ.* 408: 1393-1402.

Zemolin, C.R., Avila, L.A., Cassol, G.V., Massey, J.H., Camargo, E.R. 2014. Environmental fate of S-metolachlor –A review-. *Planta Danonha*, 32(3): 655-664.

Zhong, W., Gu, T., Wang, W., Zhang, B., Lin, X., Huang, Q., et al. 2010. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity. *Plant Soil* 326: 511–522. doi: 10.1007/s11104-009-9988-y

Conclusion générale

L'agriculture intensive a entraîné une dégradation importante des sols partout dans le monde. En effet, l'utilisation excessive des engrais de synthèse conduisant à des phénomènes d'eutrophisation, le labour, ou encore le manque de restitutions organiques, sont autant de facteurs ayant contribué à l'érosion graduelle des sols cultivés. Une prise de conscience de ces phénomènes agroécologiques a accéléré la mise en place de mesures visant à restaurer la qualité des sols. Actuellement, un suivi et une évaluation régulière des indicateurs sensibles de l'équilibre physico-chimique et biologique du sol est nécessaire pour contrôler l'effet permanent des pratiques sur la capacité des sols à fournir les services écosystémiques dont ils sont responsables.

Les différents objectifs de cette thèse ont été fixés afin de répondre aux enjeux agro-écologiques que représente l'agriculture durable, à savoir maximiser les rendements tout en réduisant les coûts énergétique et les risques potentiels que représentent les pratiques culturales intensives. Pour répondre à ces objectifs, nous avons choisi des indicateurs qualitatifs sensibles aux changements induits par les pratiques agricoles. Les principaux résultats des articles présentés dans ce manuscrit de thèse ont mis en évidence que (1) la séquestration du carbone, les activités fonctionnelles microbiennes, l'abondance en spores de champignons mycorhiziens arbusculaires, et la colonisation racinaire du maïs par ces derniers sont stimulées par le semis-direct sous couvert végétal ; (2) la fertilisation azotée induit des effets négatifs sur l'activité de déshydrogénase alors qu'elle permet d'augmenter la productivité végétale et la survie de certains parasites aériens des cultures ; (3) à la dose au champ, le glyphosate, un herbicide total, diminue les activités fonctionnelles de dégradation du carbone, affecte la teneur en azote du sol, et inhibe l'activité des champignons arbusculaires mycorhiziens uniquement lorsqu'il est appliqué sur un sol fertilisé depuis 6 ans ; (4) à la dose au champ, le S-metolachlore, un herbicide sélectif du maïs, augmente la teneur en nitrates des sols cultivés en semis-direct, sans affecter ceux gérés en labour annuel, et augmente également la teneur en ammonium des turricules de vers de terre des sols conduits en semis-direct et fertilisés depuis 6 ans.

D'une façon globale, nous mettons en évidence que ce sont essentiellement les combinaisons de pratiques culturales qui, via des modifications des indicateurs qualitatifs, peuvent modifier les effets des herbicides dans les agrosystèmes (e.g. effet combiné azote/glyphosate sur les activités de la phosphatase alcaline ; effet combiné semis-direct/azote/S-metolachlore sur la teneur en ammonium des turricules de vers de terre ; effet combiné labour/azote/S-metolachlore sur la teneur en nitrate). C'est aussi au travers ce travail de recherche de combinaisons de pratiques agronomiques que les plus fortes activités biologiques et teneurs en carbone et azote organique ont été observées en semis-direct avec

couverts végétaux et sans fertilisation azotée. Ceci permet d'élargir le champ des connaissances dans la compréhension des interactions multifactorielles pour identifier, en finalité, le bon compromis agronomique entre la productivité végétale et la protection physico-chimique et biologique des sols.

Les interactions trophiques « bottom-up » doivent également être intégrées dans le développement de systèmes agricoles productifs et durables. En effet, nous avons mis en évidence de nombreuses interactions sol-plante-écosystème aérien. Ces interactions peuvent représenter des stratégies dans l'augmentation de la productivité des cultures ou la diminution des coûts associés à la protection des plantes contre les organismes nuisibles (e.g. interactions négatives entre les activités enzymatiques du sol et la survie larvaire des pucerons *Aphis fabae*).

Des défis importants restent à relever pour élaborer des politiques nationales et internationales visant à favoriser l'émergence de systèmes de culture agro-écologiquement performants dans les pays industrialisés comme dans les pays en développement.

ANNEXES

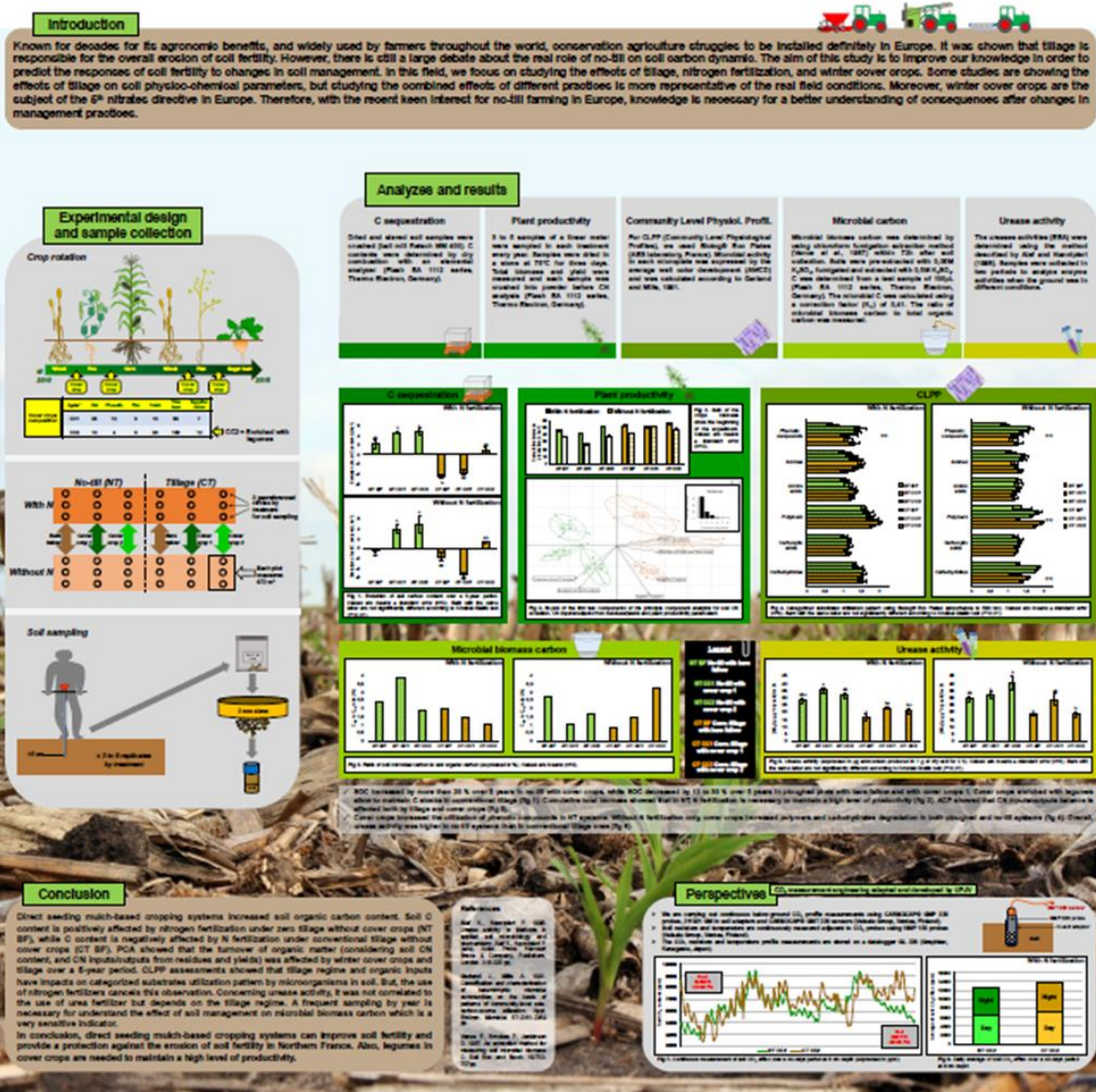
Annexe 1. Posters



Effects of cover crops and no-till system on carbon sequestration and microbial activities under two nitrogen fertilization rates in Northern France

Julien Verzeaux*, Elodie Nivelles, Hazzar Habbib, Jérôme Lacoux, David Roger, Manuella Catterou, Jérôme Duclercq, Fabien Spicher, Frédéric Dubois, Thierry Tetu

EDYSAN FRE 3498 CNRS, Agroécologie, Ecophysologie et Biologie Intégrative, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, FRANCE
*Corresponding author, E-mail address: julien.verzeaux@u-picardie.fr



NITROGEN AND GLYPHOSATE APPLICATIONS AFFECT SOIL MICROBIOTA AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF COMMON BEAN



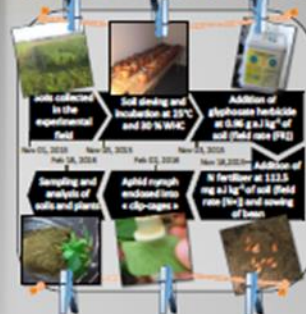
Elodie Nivelles*, Julien Verzeaux, Amélie Chabot, David Roger, Quentin Chesnais, Arnaud Ameline, Frédéric Dubois, Fabien Spicher, Jérôme Lacoux, Edmundo Nava-Saucedo, Manuella Catterou, Thierry Tétu
EDySAn FRE 3498 CNRS, Agroécologie, Ecophysiologie et Biologie intégrative, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, FRANCE

*Corresponding author, E-mail address: elodienivelles@gmail.com

INTRODUCTION

Nitrogen (N) and herbicide applications are commonly used to fertilize crops and protect them against weed development, but are also considered as soil and environment pollution sources. In soils, N fertilization is known to induce shifts in microbial community structure and its functional activities (Dionisa *et al.*, 2006). Moreover, N fertilization may decrease colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (Corlidi *et al.*, 2000), a key process in plant nutrition and agrosystem functioning. Among herbicides, glyphosate is the most used in the world, but its effects on non-target soil organisms remain unclear (Druille *et al.*, 2013). The present study aims to assess the individual and/or combined effects of N fertilization and glyphosate application on soil nutrient status, functional activities, AMF colonization, crop growth and aphid performance on common bean (*Phaseolus vulgaris*).

MATERIALS & METHODS



RESULTS

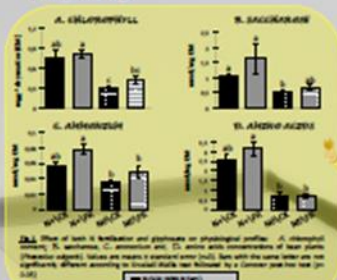


Fig. 2. Effect of both N fertilization and glyphosate on physiological profiles. A, microbial diversity; B, saccharose; C, ammonium and D, amino acids concentrations of bean plants (Phaseolus vulgaris). Values are means \pm standard error (SE). Bars with the same letter are not significantly different according to Student's t-test followed by a Dunnett post-hoc test (p < 0.05).

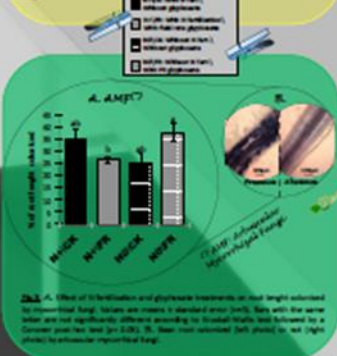


Fig. 3. Effect of N fertilization and glyphosate treatments on plant weight subjected to insecticide fog. Values are means \pm standard error (SE). Bars with the same letter are not significantly different according to Student's t-test followed by a Dunnett post-hoc test (p < 0.05). B, bean root arbuscular fungi (arbuscules) and right photo: to insecticide insecticide fog.

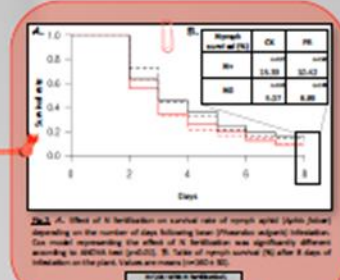
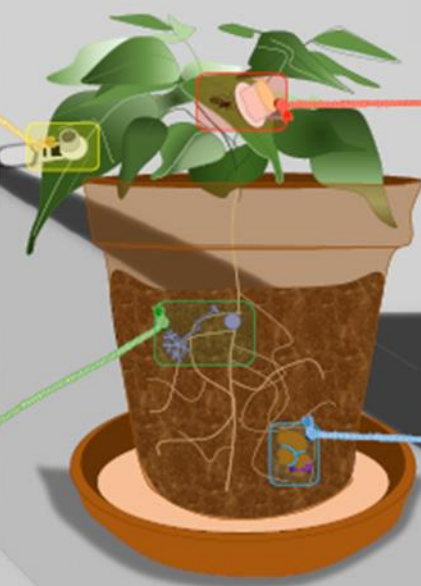


Fig. 4. Effect of N fertilization on survival rate of nymph aphid (Aphis fabae) depending on the number of days following bean (Phaseolus vulgaris) infestation. The model representing the effect of N fertilization rate significantly differed according to ANOVA test (p < 0.05). B, takes of nymph survival (%) after 8 days of infestation on the plant. Values are means \pm standard error (SE).

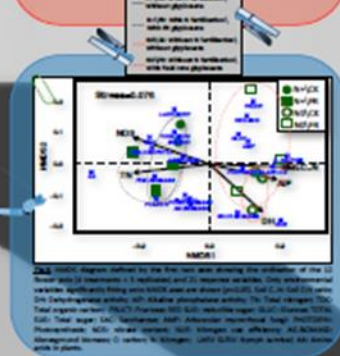


Fig. 5. Effect of N fertilization and glyphosate treatments on soil parameters. The model representing the effect of N fertilization rate significantly differed according to ANOVA test (p < 0.05). Values are means \pm standard error (SE).

CONCLUSION

- After 115 days following field rate (FR) application of glyphosate herbicide, we showed:
 - 1/ No significant effect on microbial parameters (arbuscular mycorrhizal fungi (MYC), dehydrogenase activity (DH), average well color development (data not shown) (dws))...
 - 2/ Beneficial and synergistic effects with N fertilization application on plant physiological profiles (chlorophyll, saccharose (SAC), ammonium, amino acid (AA)), pod biomass and nitrate content (NO₃)
- After 60 days following FR application of N fertilizer, we showed:
 - 1/ Significant negative effect on microbial parameters (MYC, DH and alkaline phosphatase (AIP) activities)
 - 2/ Significant positive effect on survival rate of nymph of aphids (Aphis fabae)

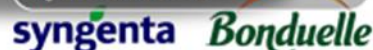
Overall, the application of the FR of N fertilization and glyphosate led to enhance plant parameters (i.e. TN, TOTAL SUGAR, STARCH, CHLOROPHYLL, SAC, POD BIOMASS, PLANT C, PLANT N, TOTAL BIOMASS...) while the absence of N fertilization led to enhance the soil parameters (MYC, DH, AIP, Soil C.N). We suggest that the addition of glyphosate counterbalances the lack of N fertilization and enhances both the plant and soil parameters.

REFERENCES

Corlidi L, Rinaldi DL, Johnson NC, Allen EB. 2000. Nitrogen fertilization affects the functioning of arbuscular mycorrhizas in two semi-arid grasslands. *Plant and Soil*, 224:197-205.
Dionisa B, Johnson N, Chhabra R, Saha P. 2006. Effect of tillage and N fertilization on individual physiological profiles of soils cultivated with wheat. *Soil and Tillage Research*, 93:259-268.
Druille M, Gauthier M, Goulet M, Gauthier EA. 2013. Glyphosate reduces species diversity and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 44:99-104.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the students who have been involved in this work through their internships since 2009. This research was funded by Bonduelle and Syngenta companies within the framework of the collaborative project VEGESOL. The PhD studies of Elodie Nivelles are funded by a scholarship from the French Ministry of Higher Education and Research.



NO-TILL INCREASES ARBUSCULAR MYCORRHIZAL PROPAGULE DENSITY AND ROOT COLONIZATION THUS REDUCING THE NEED FOR NITROGEN FERTILIZATION

Julien Verzeaux^{1*}, Elodie Nivellet¹, Cyril Grandjean¹, David Roger¹, Jérôme Lacoux¹, Bertrand Hirel², Frédéric Dubois¹, Thierry Tetu¹

¹ Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés, FRE 3426 CNRS, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, 80039 Amiens Cedex, France
² Adaptation des Plantes à leur Environnement, Unité Mixte de Recherche 1215, INRA, Centre de Versailles-Origny, R.D. 10, F-78025 Versailles Cedex, France
 * Corresponding author, E-mail address: julienverzeaux@gmail.com



ESA14
EDINBURGH
SEPTEMBER 5 - 9, 2016

syngenta Bonduelle



Introduction

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play a major role in the uptake of nutrients by agricultural plants. Nevertheless, some agricultural practices can interrupt fungal-plant signaling and thus impede the establishment of the mycorrhizal symbiosis. Up to now, we have little understanding of the factors that determine symbiosis establishment success. Soil cores (20 cm depth) and plants were sampled in a 5-year field experiment to assess the individual and combined effects of tillage and N fertilization on AMF colonization, N uptake, and productivity of wheat. Secondly, AMF spore density, soil nitrate content, and dehydrogenase enzyme activity, as well as other soil parameters were measured to assess correlative links between soil environmental variables and AMF propagule abundance.

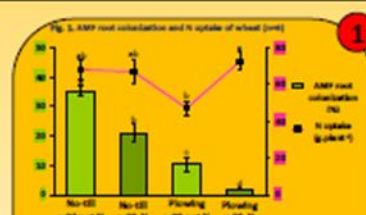
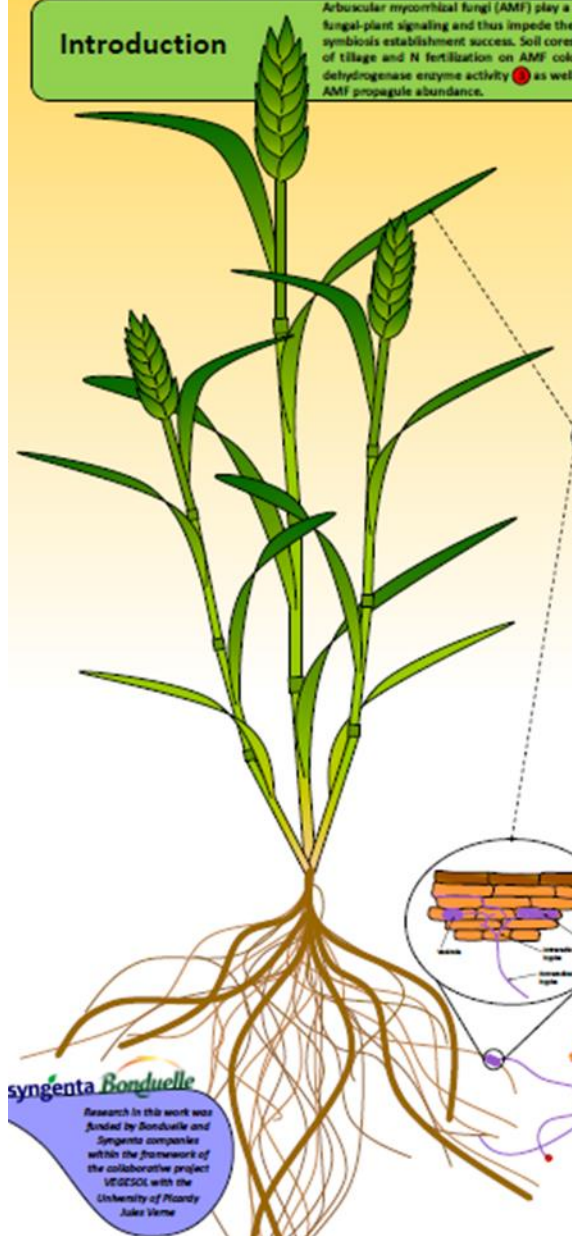


Fig. 1. AMF root colonization and N uptake of wheat (2016). Aboveground structures of plant samples (2016) were dried at 65 °C for 3 days and subsequently weighed to determine total aboveground biomass. Each sample was then ground into a fine powder for plant total N analysis using an elemental analyzer (Flash EA 1112 series, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

AMF colonization of wheat was monitored in 10 root subsamples of 2 cm length by plant (2016). Subsamples were stained with trypan blue according to Kado and Hixon (1986). Mycorrhizal infection was quantified using the method of Moutonnet et al. (2006), with 100 microscopic fields for each sample.

AMF plant above ground biomass received the same level than N uptake (2016).

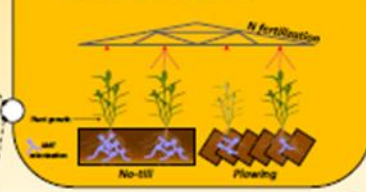


Fig. 2. Spore density (2016).

Nitrate-N was extracted from soil (2016) at a ratio of 20 g fresh soil to 100 ml 2 M KCl. After shaking for 5 h, the extracts were centrifuged for 10 min at 4000 rpm and the supernatants were analyzed on an HPLC flow solution IV continuous flow analytical system (Skalar, Breda, USA).

Soil dehydrogenase activity (DHA) was measured by the TTC/TTP method as described by Gadd et al. (1986). The spore abundance was determined by extraction according to Moutonnet and Jouany (2006). Only light, apparently viable, spores were counted.

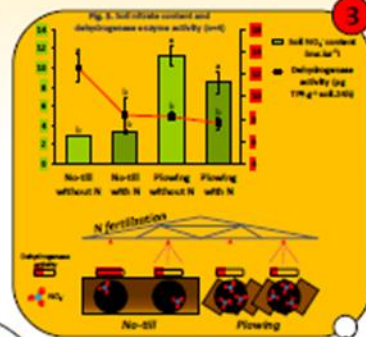


Fig. 4. Spearman correlations between AMF spore density and soil environmental variables.

| Soil Environmental Variable | AMF Spore Density | Soil Organic Carbon | Soil Total Nitrogen | Nitrate in soil solution | Nitrate extracted from soil | Soil C/N ratio | Soil Available Phosphorus | Soil Penetration Resistance | AMF spore density | Dehydrogenase activity | Spearman Correlation |
|-----------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| Soil Organic Carbon | 0.17 | 0.92 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.17 |
| Soil Total Nitrogen | 0.12 | 0.12 | 0.92 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| Nitrate in soil solution | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.92 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| Nitrate extracted from soil | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.92 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| Soil C/N ratio | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.92 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| Soil Available Phosphorus | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.92 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| Soil Penetration Resistance | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.92 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| AMF spore density | 0.92 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.92 | 0.12 | 0.17 |
| Dehydrogenase activity | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.92 | 0.12 |

Conclusion

We demonstrated that both the absence of tillage and of synthetic nitrogen fertilization improved AMF colonization of wheat roots. Moreover, under no-till conditions, N uptake and aboveground biomass production did not vary significantly between N-fertilized and N-unfertilized plots. In contrast, both N uptake and above ground biomass were much lower when N fertilizer was not added during conventional tillage. Additionally, tillage combined with nitrogen fertilization decreased significantly the AMF spore abundance, the latter being positively correlated with dehydrogenase enzyme activity and soil penetration resistance, and negatively correlated with soil available phosphorus and nitrate contents. No-till farming is thus a sustainable agricultural system that allows a gradual reduction in N fertilizer use by promoting AMF functionality and at the same time increasing N uptake.

Annexe 2. Publications

Articles scientifiques publiés ou soumis dans une revue internationale à comité de lecture

- Nivelle, E.**, Verzeaux, J., Habbib, H., Kuzyakov, Y., Decocq, G., Roger, D., Lacoux, J., Duclercq, J., Spicher, F., Nava-Saucedo, J.E., Catterou, M., Dubois, F., Tetu, T., 2016. Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization. *Applied Soil Ecology* 108, 147-155.
- Nivelle, E.**, Verzeaux, J., Chabot, A., Roger, D., Spicher, F., Lacoux, J., Nava-Saucedo, J.E., Catterou, M., Tetu, T., 2017. Does nitrogen fertilization history affects short-term microbial responses and nutrient content of soils submitted to different glyphosate concentrations? *PLoS ONE*, 12(5): e0178342.
- Nivelle, E.**, Verzeaux, J., Chabot, A., Roger, D., Chesnais, Q., Ameline, A., Lacoux, J., Nava-Saucedo, J.E., Tétu, T., Catterou, M., 2017. Effects of glyphosate application and nitrogen fertilisation on edaphic factors and consequences on above- and below- ground interactions. En révision dans *Geoderma*.
- Nivelle, E.**, Verzeaux, J., Roger, D., Nava-Saucedo, J.E., Tétu, T., Does tillage and nitrogen fertilization change the potential effects of the herbicide S-Metolachlor on edaphic properties and maize productivity? A soumettre.
- Verzeaux, J., Roger, D., Lacoux, J., **Nivelle, E.**, Adam, C., Habbib, H., Hirel, B., Dubois, F., Tetu, T., 2016. In winter wheat, no till increases mycorrhizal colonization thus reducing the need for nitrogen fertilization. *Agronomy*, 6: 38.
- Verzeaux, J., Al Ahmad, A., Habbib, H., **Nivelle, E.**, Roger, D., Lacoux, J., Decocq, G., Hirel, B., Catterou, M., Spicher, F., Dubois, F., Duclercq, J., Tetu, T., 2016. Cover crops prevent from deleterious effect of nitrogen fertilization on bacterial diversity by maintaining carbon concentration in plowed soil. *Geoderma*, 281: 49-57.
- Habbib, H., Verzeaux, J., **Nivelle, E.**, Roger, D., Lacoux, J., Catterou, M., Hirel, H., Dubois, F., Tetu, T. 2016. Conversion to no-till improves maize nitrogen use efficiency in a continuous cover cropping system. *PLoS ONE* 11 (10): e0164234.
- Verzeaux, J., **Nivelle, E.**, Roger, D., Hirel, H., Dubois, F., Tetu, T. 2017. Spore density of arbuscular mycorrhizal fungi is fostered by 6 years of no-till and is correlated with environmental parameters in a silty loam soil. *Agronomy*, 7, 38; doi:10.3390/agronomy7020038.
- Verzeaux, J., **Nivelle, E.**, Habbib, H., Dubois, F., Tetu, T., 2017. The crop rotation, a key factor for success of carbon and nitrogen sequestration in soils that have recently been converted to no-till. A soumettre.

Communications sous forme de poster dans un colloque international

Nivelle, E., Verzeaux, J., Roger, D., Chabot, A., Dubois, F., Ameline, A., Chesnais, Q., Lacoux, J., Tetu, T., Nava-Saucedo, J.E., Catterou, M., 2016. Nitrogen and glyphosate applications affect soil microbiota and physiological parameters of common bean. 14th Congress of the European Society of Agronomy, 5-9 September 2016, Edinburgh, Scotland.

Verzeaux, J., Nivelle, E., Lacoux, J., Roger, D., Catterou, M., Duclercq, J., Dubois, F., Tetu, T., 2015. Effects of cover crops and no-till system on soil carbon sequestration and microbial activities under two nitrogen fertilization rates in Northern France. 5th Symposium on Soil Organic Matter, 20-24 September 2015, Göttingen, Germany.

Verzeaux, J., Roger, D., Lacoux, J., Nivelle, E., Habib, H., Hirel, B., Dubois, F., Tetu, T., 2016. No-till increases mycorrhizal colonization in winter wheat thus reducing the need for nitrogen fertilization. 14th Congress of the European Society of Agronomy, 5-9 September 2016, Edinburgh, Scotland.

Communications orales dans un colloque national

Nivelle, E., Verzeaux, J., Habib, H., Roger, D., Lacoux, J., Spicher, F., Dubois, F., Nava Saucedo, J.E., Catterou, M., Tetu, T., 2016. Effets du travail du sol, des couverts végétaux et de la fertilisation azotée sur les activités enzymatiques, les caractéristiques microbiennes et le turn-over de la matière organique. Journées Jeunes Chercheurs, 19-20 Janvier 2016, Reims, France.

Verzeaux, J., Alahmad, A., Nivelle, E., Habib, H., Roger, D., Lacoux, J., Catterou, M., Spicher, F., Duclercq, J., Dubois, F., Tetu, T., 2016. Les couverts végétaux protègent-ils les sols labourés contre les perturbations engendrées par les fertilisants azotés de synthèse? Journées Jeunes Chercheurs, 19-20 Janvier 2016, Reims, France.

Habib, H., Verzeaux, J., **Nivelle, E.**, Catterou, M., Roger, D., Lacoux, J., Dubois, F., Tetu, T., 2016. N efficiency in Maize as affected by tillage system and N fertilizer rate. Journées Jeunes Chercheurs, 19-20 Janvier 2016, Reims, France.

Alahmad, A., Lacoux, J., Roger, D., Spicher, F., Verzeaux, J., **Nivelle, E.**, Habib, H., Catterou, M., Dubois, F., Duclercq, J., Tetu, T., 2016. Impact d'un couvert végétal permanent sur la biodiversité microbienne du sol. Journées Jeunes Chercheurs, 19-20 Janvier 2016, Reims, France.

Communication sous forme de poster dans un colloque national

Nivelle, E., Verzeaux, J., Comptour, P., Vangraefschep, A., Roger, D., Chesnais, Q., Ameline, A., Lacoux, J., Nava-Saucedo, J.E., Catterou, M., Tétu, T., 2016. Effet du glyphosate et de la fertilisation azotée sur la mycorhization du haricot (*Phaseolus vulgaris*) et la physiologie des plantes et des pucerons (*Aphis fabae*). 9ème Réunion Annuelle du Réseau "Biologie Adaptative des Pucerons et Organismes Associés", 9-10 Novembre 2016, Amiens, France.

Evaluation des effets de l'azote et des herbicides sur les indicateurs qualitatifs du sol dans des agrosystèmes contrastés

L'utilisation des fertilisants azotés et des herbicides de synthèse est aujourd'hui nécessaire pour assurer la productivité des systèmes de culture et répondre à la demande alimentaire d'une population mondiale en croissance démographique. Cependant, les effets potentiels de ces produits de synthèse sur les propriétés édaphiques et aériennes des agrosystèmes ont été décrits comme dépendants de l'environnement physico-chimique et biologique du sol sur lequel ils sont appliqués. En particulier, il semblerait que les sols non perturbés et sous couverture végétale permanente, caractérisés par des propriétés édaphiques très différenciées des sols gérés sous labour conventionnel, puissent modifier les effets non ciblés de certains herbicides. Plusieurs expérimentations au champ ainsi que deux études en conditions contrôlées ont permis de mettre en évidence que les systèmes gérés en semis-direct sous couverture végétale permanente étaient associés à une augmentation des teneurs en carbone et azote organique, des activités fonctionnelles microbiennes, de l'abondance en spores de champignons mycorhiziens arbusculaires, et de la colonisation racinaire du maïs par les champignons mycorhiziens. Deuxièmement, la fertilisation azotée a induit des effets négatifs sur certains indicateurs biologiques du sol comme l'activité de deshydrogénase alors qu'elle a permis d'augmenter la productivité végétale et le taux de survie larvaire de certains parasites aériens des cultures. Troisièmement, le glyphosate, un herbicide total, a augmenté le temps de dégradation des substrats organiques, et n'a pas eu d'effet sur l'activité des champignons mycorhiziens lorsqu'il était appliqué seul ; par contre l'application d'azote en combinaison avec le glyphosate sur un sol fertilisé depuis 6 ans a entraîné une diminution du taux de colonisation du haricot par les champignons mycorhiziens. Les engrais azotés appliqués sur le long terme sont donc capables de modifier les effets non ciblés du glyphosate. Enfin, le S-Metolachlore, un herbicide sélectif, a augmenté la teneur en nitrates des sols cultivés en semis-direct, sans affecter ceux gérés en labour annuel, et a également augmenté la teneur en ammonium des turricules de vers de terre des sols conduits en semis-direct sous couvert et fertilisés en azote de synthèse depuis 6 ans. Nous concluons que ce sont essentiellement les combinaisons de pratiques qui sont responsables des effets des herbicides sur les propriétés édaphiques et aériennes dans les agrosystèmes.

Mots-clés : Indicateurs de la qualité du sol – Carbone et azote du sol – Réponse microbienne – Désherbage chimique – Fertilisation azotée – Travail du sol – Couverts végétaux

Assessing the effects of nitrogen and herbicides on soil quality indicators in contrasted agrosystems

Nowadays, the use of synthetic nitrogen fertilizers and herbicides is required to ensure cropping systems productivity and meet the demand for food of a growing population. However, the potential effects of these synthetic products on agrosystem's below- and above-ground properties have been described to be dependent of soil physicochemical and biological characteristics on which they are applied. Especially, it seems that soils under no-till and continuous cover-cropping, characterized by contrasted edaphic properties as compared to soils managed under annual plowing, may change the non-target effects of certain herbicides. Several field experiments, as well as two mesocosm studies, evidenced that cropping systems conducted under no-till with continuous cover-cropping were associated to increased organic carbon and nitrogen contents, microbial functional activities, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spore density, and maize root colonization by AMF. Secondly, nitrogen fertilization induced negative effects on soil biological indicators such as dehydrogenase activity while it improved plant productivity and nymph survival of certain above-ground pests. Thirdly, glyphosate, a total herbicide, increased degradation time of organic substrates, while it did not change AMF activity when applied alone. However, the combination of glyphosate plus nitrogen fertilization in a soil fertilized over a 6-year period led to a decreased root colonization of bean by AMF. Thus, the long term nitrogen fertilization is capable to change the non-target effects of glyphosate. Finally, S-Metolachlor, a selective herbicide, increased nitrate content of soils subjected to no-till, while those conducted under annual plowing revealed no effect, and increased ammonium content of earthworm casts in soils managed under no-till with cover crops and nitrogen fertilization for 6 years. We conclude that the effects of herbicides on agrosystem's above- and below-ground properties are mainly due to the combination with other agricultural practices such as nitrogen fertilization.

Keywords: Soil quality indicators – Soil carbon and nitrogen – Microbial response – Herbicide application – Nitrogen Fertilization – Tillage – Cover crops