

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Unité de recherche pluridisciplinaire prairies et plantes fourragères - URP3F
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Sciences pour l'environnement - Gay Lussac (La Rochelle)
Secteur de recherche : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Présentée par :
Alexandra Crème

Impacts de la gestion des prairies sur le stockage du carbone et la nature biogéochimique des matières organiques du sol

Directeur(s) de Thèse :
Abad Chabbi, Cornélia Rumpel

Soutenue le 08 juillet 2016 devant le jury

Jury :

Président	Bernard Nicolardot	Professeur des Universités, AGROSUP de Dijon
Rapporteur	Bernard Nicolardot	Professeur des Universités, AGROSUP de Dijon
Rapporteur	Joëlle Fustec	Enseignant-chercheur, École supérieure d'agriculture, Angers
Membre	Abad Chabbi	Directeur de recherche, INRA de Lusignan
Membre	Cornélia Rumpel	Directrice de recherche CNRS, INRA de Thiverval-Grignon
Membre	Annette Bertrand	Maître de conférences, Université de Caen
Membre	Katell Quénéa	Maître de conférences, Université Pierre et Marie Curie

Pour citer cette thèse :

Alexandra Crème. *Impacts de la gestion des prairies sur le stockage du carbone et la nature biogéochimique des matières organiques du sol* [En ligne]. Thèse Biologie de l'environnement, des populations, écologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2016. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées
Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006

Ecole doctorale Gay Lussac
Secteur de Recherche :
Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Présentée par :

Alexandra CREME



Impacts de la gestion des prairies sur le stockage du carbone et la nature biogéochimique des matières organiques du sol

Directeurs de Thèse :

Abad Chabbi et Cornélia Rumpel

Soutenue le 8 juillet 2016

devant la Commission d'Examen

JURY

Rapportrice : **Joelle Fustec**, enseignante chercheure, ESA Angers

Rapporteur : **Bernard Nicolardot**, professeur, AgroSup Dijon

Examinatrice : **Annette Bertrand**, Maître de Conférences, Université de Caen

Examinatrice : **Katell Quenée**, Maître de Conférences, UPMC, Paris

Directeur de thèse : **Abad Chabbi**, Directeur de Recherche, INRA, Lusignan

Directrice de thèse : **Cornélia Rumpel**, Directrice de Recherche, CNRS, Thiverval-Grignon

« Tu seras d'abord piocheur de terre, bêcheur de terre, et tu te lèveras pour arroser. »

« Faites que le rêve dévore votre vie afin que la vie ne dévore pas votre rêve. »

Antoine de Saint-Exupéry

« Une terrasse de neuf étages commence par un tas de terre. »

Lao Tseu

À ma mamie et mon papi.

REMERCIEMENTS

L'aboutissement de la thèse n'est pas que celui des trois dernières années du doctorat mais aussi celui des nombreuses années d'étude qui les ont précédées. C'est le fruit d'un cheminement vers une maturité scientifique et personnelle. En effet, il est l'heure de la récolte du fruit de ce travail qui n'aurait pu s'accomplir sans la participation de tant de personnes, de tant de compétences et de tant d'humain. C'est avec la plus profonde sincérité que je souhaite remercier chaque personne que j'ai pu rencontrer lors de cette expérience et qui y ont participé de près ou de loin.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de prendre le temps d'évaluer mon travail. Merci aux rapporteurs Joëlle Fustec et Bernard Nicoladot ainsi qu'aux examinatrices Anette Bertrand et Katell Quenée.

Un grand merci à mes directeurs Abad Chabbi et Cornélia Rumpel d'avoir il y a plus de trois ans eu confiance en moi pour mener à bien ce projet. Merci de m'avoir accompagnée tout au long, de m'avoir formée aux exigences de la recherche et permis de réaliser toutes mes recherches dans les meilleures conditions. Merci à Cornélia pour sa disponibilité, ses conseils et le solide apprentissage. Merci à Abad pour la mise à disposition des moyens financier et technique nécessaire à ce travail qui m'on fourni la liberté de mener à bien mes recherches.

Merci également à la Région Poitou Charente, au 7ieme cadre du projet européen EXPEER, à l'ADEME à travers le projet AEGES de l'appel à projet REACTIFF et au SOERE ACBB pour le financement de ces travaux de recherche. Mais aussi à l'école doctorale Gay Lussac de l'Université de Poitiers pour la gestion, les formations et l'encadrement.

Je tiens aussi à remercier tous les collaborateurs du projet AEGES, tout particulièrement Xavier Leroux, Franck Poly et Raïa Massad pour les fructueuses discussions que ce soit dans la mise en place des expérimentations ou l'interprétation des observations.

Je voudrais remercier Claire Chenu pour m'avoir permis de l'assister lors des TD, d'avoir été une excellente directrice de master mais aussi d'être un exemple.

J'en arrive à toute l'équipe technique et expérimentale du SOERE ACBB de Lusignan que je remercie pour leur travail et leur accueil et surtout Xavier et Mélanie pour leur efficacité. Je remercie

aussi toute l'unité URP3F pour leur accueil, leur appui technique et leur bonne humeur. Merci à Nathalie, Isabelle, Jean-Pierre, Annie, Eric, Serge, Lina, Gaëtan et Jean-Louis. Merci à François Gastal pour sa participation à ces recherches. Et surtout merci à Nathalie Moynet pour ces heures de formations sur le spectro et les centaines de boulettes analysées.

Je remercie aussi Maria de la Luz Mora Gil de m'avoir accueillie au sein de l'Universidad de la Frontera au Chili. Cette expérience fut riche scientifiquement et personnellement grâce à la générosité des chiliens. Merci pour l'accueil et les bons souvenirs à Cécilia, Paola, Marcela, Anita et Sharon.

On sera tous d'accord pour dire que de bonnes conditions de travail passent par une bonne entente avec les collègues. Mais à la cafet de l'aile B du bâtiment EGER c'est plus que ça, ce sont de grandes rigolades autour des fameux mots fléchés (parfois chronométrés, parfois mimés), des instants de partage autour des meilleurs gâteaux maisons, voire des réunions de famille pendant nos repas de labo. Un bon esprit régulièrement poussé jusqu'au O'Paris voire comme un ouragan jusqu'au Père fecto. Alors à tous mes collègues, IEES et ECOSYS confondus, un sincère et tendre merci.

À Romain pour avoir partagé le bureau, la danse du craquage et pour tous ses conseils. A Patricia et Valérie pour bien plus que le soutien technique et moral. Je remercie Daniel et Cyril pour leur aide technique et les analyses. À Adeline, Tuo, Cyrine et Anne que j'ai eu l'honneur d'encadrer mais qui contrairement à ce qu'on pense m'ont beaucoup appris. Merci à Sabrina, Céline, Naoise, Kevin, Christophe, Phuong, Baptiste, Suzanne, Sophie, Marco, Nimaï et à tous ceux croisés dans ces couloirs. On ne la présente plus, Madame (pardon mademoiselle) Connasse, lilipute pour certain, la femme parfaite pour d'autre, ma prof de stat et d'orthographe, ma collègue de bureau, mon amie, Justine merci pour ce moment.

Et enfin un grand merci à toute ma famille et à tous mes amis qui ont cru en moi et m'ont soutenu avant et pendant la thèse, sur lesquels je sais que je peux compter encore de très nombreuses années. Merci à mon frère, ma sœur et toute sa petite famille d'être ce qu'ils sont. Merci à mes Julie, Eve, Anaïs d'être mes fidèles amis. Merci à Yannick d'être un ami sincère mais aussi de m'avoir tant aidée tout au long de mes études (surtout en stat et en viro). Pero, réveille-toi !

Un merci particulier à Etienne mon chéri de m'avoir tant supportée (dans tout les sens du terme).

Et par-dessus tout et pour tout, merci à ma maman.

RESUME

La séquestration du carbone dans les sols réduit les effets du changement climatique, et améliore la qualité du sol. L'introduction des prairies temporaires dans le cycle des cultures pourrait améliorer les matières organiques du sol (MOS). L'objectif de la thèse était d'évaluer l'impact des modes de gestion de prairies temporaires sur la quantité, la composition et les processus de stabilisation des MOS et les émissions de gaz à effet de serre (GES).

Mes résultats montrent un arrière effet de la gestion des prairies temporaires sur les MOS après 3 ans de culture. La durée des prairies influence la quantité et la composition de la biomasse microbienne ainsi que la nature des MOS. La fertilisation en azote de la prairie est nécessaire à la séquestration du carbone dans le sol sans augmenter les émissions de GES.

Pour remplacer la fertilisation en azote minérale, des légumineuses peuvent être utilisées. En conséquence, je me suis intéressée à l'effet de la luzerne sur les formes de carbone, d'azote et de phosphore dans les sols sous mélanges luzerne-graminées. Mes résultats indiquent une absence d'augmentation du stock de carbone dans les sols sous mélanges comparés aux monocultures de graminées fertilisées, malgré une plus forte productivité de la luzerne. Les biomarqueurs moléculaires indiquent que l'introduction de la luzerne en prairie influence la dégradation des MOS plus que leur stabilisation. De plus, la luzerne influence fortement les formes du phosphore dans les sols sous mélanges.

Ainsi, lors de l'introduction de prairie dans les cycles de culture, il est important d'optimiser les modes de gestion afin de faire le bon compromis entre le stockage du carbon, les émissions de GES et l'utilisation d'engrais.

Mots clefs

Prairie temporaire, fertilisation azotée, séquestration du carbone, matière organique du sol, légumineuse

ABSTRACT

Soil carbon sequestration reduces the effects of climate change, improves soil quality and food security. Soil organic matter (SOM) could be enhanced by introduction of ley grassland into the cropping cycle. The objective of this PhD thesis was to evaluate the effect of management practices of ley grassland on the quantity, composition and stabilization processes of SOM and greenhouse gas emissions (GHG).

My data showed legacy effects of duration and fertilization of the temporary grassland phase on SOM after 3 years of cropping. The duration of grassland phase influenced the quantity and composition of the microbial biomass as well as the nature of SOM. N fertilization during the grassland phase is necessary for soil carbon sequestration in soil without increasing GHG emissions.

To replace mineral nitrogen fertilization, legumes may be used in forage production systems. Consequently, I was interested in the effect of introduction of lucerne on carbon, nitrogen and phosphorus forms in soils under lucerne-grass mixtures. My results indicate similar soil carbon stocks under mixtures and grass monocultures, despite the high productivity of lucerne. Molecular biomarkers indicated that the introduction of lucerne in grassland influenced the degradation of the SOM more than its stabilization. Moreover, the presence of lucerne influenced phosphorus forms in soils under mixtures.

In conclusion, the introduction of ley grasslands into cropping cycles requires careful evaluation of the management practices in order to optimize carbon storage, GHG emissions and nitrogen fertilizer use.

Key words

Temporary grassland, nitrogen fertilization, carbon sequestration, soil organic matter, legume

LISTE DES ABREVIATIONS

ADEME= agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie
AEGES= atténuation des émissions de gaz à effet de serre
AWCD= average well color development, développement de la couleur moyenne des puits
BNF= biological nitrogen fixation, fixation biologique de l'azote
CEC= capacity exchangeable cationic, capacité d'échange cationique
Cr = Cropland, culture
C_{initial}= carbone initial
CLPP= community-level physiological profile, profil physiologique de la communauté microbienne
C_{mic}= microbial biomass carbon, carbone de la biomasse microbienne
C_{min}= mineralized carbon, carbone minéralisé
Co/V = coumaryl/ vanillyl ratio
C6/C5= (galactose+mannose)/(arabinose+xylose) ratio
D= cocksfoot, dactyle (*Dactylis glomerata*)
DM= cocksfoot-lucerne mixture, association dactyle-luzerne
DOC= dissolved organic carbon, carbon organique dissous
EF= emission factor, facteur d'émission
F= tall fescue, fétuque (*Festuca arundinacea*)
FM= fescue-lucerne mixture, association fétuque-luzerne
desoxyC6/C5 = (rhamnose+fucose)/(arabinose+xylose) ratio
G = permanent grassland, prairie permanente
GHG, GES= greenhouse gaz, gaz à effet de serre
IN= inorganic nitrogen, azote inorganique
IP= inorganic phosphorus, phosphore inorganique
IPCC, GIEC= intergovernmental panel on climate change, groupe d'expert intergouvernemental sur l'évolution du climat
k= vitesse de minéralisation du carbone
M= lucerne, luzerne (*Medicago sativa*)
N_{dfa}= N derived from atmospheric nitrogen
N_{mic}= microbial biomass nitrogen, azote de la biomasse microbienne
N_{min}= mineralized nitrogen, azote minéralisé

ON= organic nitrogen, azote organique
 OP= organic phosphorus, phosphore organique
 PAC= politique agricole commune européenne
 PCA, ACP= principal component analyses, analyses en composante principale
 POM= particulate organic matter, matière organique particulaire
 rSOC= recalcitrant soil organic carbon, carbone organique recalcitrant du sol
 S+A= sand and stable agregats, sable et agrégats stable
 S+C= silt and clay, limon et argile
 S/V= syringyl/ vanillyl ratio
 SNF= synthetic nitrogen fertilizer, engrais azoté synthétique
 SOC= total soil organic carbon, carbone organique total du sol
 SOERE ACBB= système d'observation et d'expérimentation sur le long terme pour la recherche en environnement - agroécosystème, cycle biogéochimique et biodiversité
 SOM, MOS= soil organic matter, matière organique du sol
 TG = temporary grassland, prairie temporaire
 TG3N+ = temporary grassland fertilized of 3 years, prairie temporaire fertilisée de 3 ans
 TG6N+ = temporary grassland fertilized of 6 years, prairie temporaire fertilisée de 6 ans
 TG6N- = temporary grassland unfertilized of 6 years, prairie temporaire non fertilisée de 6 ans
 (Ac/Al)V = vanillyl acid/ vanillyl aldehyde ratio
 (Ac/Al)S = syringyl acid/ syringyl aldehyde ratio

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
RESUME	11
ABSTRACT	12
LISTE DES ABREVIATIONS	13
TABLE DES MATIERES	17
INTRODUCTION	23
I. Introduction générale	23
II. Matière organique des sols agricoles et gaz à effet de serre	25
1. Changement climatique et gaz à effet de serre	25
a. Le changement climatique	25
b. Les gaz à effet de serre	25
c. L'agriculture et les gaz à effet de serre	26
d. Les politiques de réduction de gaz à effet de serre et le sol	27
Le protocole de Kyoto	27
L'initiative 4 pour 1000	28
2. Les matières organiques du sol	30
a. Les entrées de matière organique dans le sol	30
La matière organique du sol vivante : les décomposeurs	30
La rhizodéposition	31
b. Flux de MOS et couplage des cycles biogéochimiques	31
Le cycle du carbone	31
Le cycle de l'azote	33
Le cycle du phosphore	34
c. Les biomolécules de la matière organique du sol	35
Les sucres	35
Les lignines	35
d. Transformation et processus de stabilisation des matières organiques	37
Décomposition ou dégradation de la MOS	37
Stabilisation de la MOS	37
Caractérisations chimiques des MOS	38

III. Effets des différents modes de gestion des prairies temporaires sur les matières organiques du sol **41**

1. Utilisation des terres agricoles et stockage de carbone	41
a. Stockage de carbone dans les sols	41
Augmenter les entrées de matières organiques dans les sols	42
Retarder les sorties de carbone dans les sols	43
b. Effet du changement d'utilisation des terres sur le stockage ou le déstockage du carbone des sols	43
Utilisation des terres et stocks de carbone	43
Changement d'utilisation des terres et perturbation de l'équilibre	44
2. Prairies temporaires et modes de gestion	45
a. Définition et intérêts	45
b. Gestion de la durée de la phase de prairie	46
c. Gestion de la fertilisation azotée de la phase de prairie	47

IV. Effets de différents types de fertilisation azotée sur les matières organiques et la fertilité du sol **49**

1. Engrais azotés synthétiques	49
a. Un élément clé pour l'agriculture	49
b. Source de pollution de l'environnement	49
2. Les légumineuses comme source d'azote.	50
a. La fixation biologique de l'azote	51
b. La culture des légumineuses	52
c. La luzerne : la reine des fourrages	52
3. Les avantages environnementaux des légumineuses	53
a. Les légumineuses et la qualité du sol	53
b. Les légumineuses et le phosphore du sol	54
c. Les associations légumineuses et graminées	55

V. Problématique et questions scientifiques **57**

MATERIEL ET METHODES **61**

I. Study sites **61**

1. SOERE ACBB	61
a. Site description	61
b. Soil sampling	63
2. Association 2008 experiment	63
a. Site description	63
b. Sampling	64
Forage	64
Soil	65
c. General soil parameters	65

II. Methods	66
1. Physical analyses	66
a. Soil humidity	66
b. Soil bulk density and carbon stock	66
2. Chemical analyses	66
a. Soil organic matter analyses	66
b. Lignin	67
c. Neutral non cellulosic carbohydrates	67
3. Fractionations procedures	68
a. SOM fractionation (physico-chemical)	68
b. Phosphorus fractionation (chemical)	70
4. Biological analyses	71
a. Microbial biomass	71
b. Biolog®	71
c. Potential mineralization of C and N	72
5. Calculations	73
a. Carbon balance	73
6. Statistical analyses	74

PARTIE 1. Matières organiques dans les sols sous prairies temporaires : impact de gestion contrastées de la phase prairiale **77**

I. Introduction	79
II. Résultats	81
1. Signature du carbone organique du sol	81
a. Carbone, azote et phosphore du sol	81
b. Fractionnement du carbone organique du sol	82
c. Signature et fractionnement du sucre des sols	84
d. Signature de la lignine des sols	87
2. Processus microbiens et gaz à effet de serre	87
a. Microbiologie	87
Biomasse microbienne	87
Profil physiologique de la communauté microbienne	88
b. Minéralisation potentielle du C et de l’N	91
3. Analyse globale et bilan	93
a. Analyse par composante principale	93
b. Estimation par le Bilan carbone ®	96
III. Discussion	97
1. Sols prairiaux et sols culturaux, deux systèmes différents	97
2. Arrières effets de la fertilisation azotée pendant la phase prairiale d’une prairie temporaire	100

3. Arrières effets de la durée de la phase prairiale d'une prairie temporaire	103
IV. Conclusion	105
<i>PARTIE 2. Effets de graminées et d'une légumineuse cultivées en monoculture ou en mélange sur la matière organique du sol et les formes de phosphore</i>	107
I. Abstract	108
II. Introduction	109
III. Results	111
1. Forage yields and composition	111
2. Lucerne N fixation : monoculture and mixtures	112
3. Plant C, N and P content and harvest exportation	113
4. Carbon and nitrogen forms	114
5. Phosphorus forms	115
6. Inorganic phosphorus fractions	116
7. Organic phosphorus fractions	117
8. Principal component analyses	118
IV. Discussion	121
1. Forage production : carbon, nitrogen and phosphorus budgets	121
2. Soil organic matter	122
3. Soil phosphorus	122
4. Effect of lucerne introduction on soil parameters under grasses	123
V. Conclusion	124
<i>PARTIE 3. Influence des légumineuses sur les formes du carbone organique des sols de prairie sous luzerne et associations luzerne-graminées.</i>	127
I. Abstract	128
II. Introduction	129
III. Results	131
1. Composition of roots	131
a. Carbon and nitrogen concentrations	131
b. Content and forms of root carbohydrates	131
c. Content and composition of root lignins	132
2. Composition of soil	133
a. Carbon and nitrogen stocks	133
b. Content and form of non cellulosic soil carbohydrates	134
c. Content and composition of soil lignin	134

3. Principal component analysis _____	134
IV. Discussion _____	137
1. Root chemical composition impacted by lucerne introduction into forage grassland. _____	137
2. Influence of lucerne introduction into forage grassland on soil carbon signatures _____	138
V. Conclusion _____	140
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES _____	143
BIBLIOGRAPHIE _____	153
TABLE DES ILLUSTRATIONS _____	163
FIGURES _____	163
TABLEAUX _____	166
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS _____	169
1. Publications dans les revues internationales avec facteur d'impact : _____	169
2. En préparation _____	169
3. Actes de colloque : _____	170

INTRODUCTION

I. *Introduction générale*

L'augmentation atmosphérique des gaz à effet de serre depuis l'époque préindustrielle est la principale cause du changement climatique. Cette augmentation résulte des émissions anthropiques dues à l'utilisation de combustibles fossiles comme source d'énergie et aux changements d'utilisation des terres qui touchent l'agriculture. L'agriculture est d'autant mise en cause qu'elle est grande consommatrice de carbone fossile mais aussi de fertilisants azotés dont l'application et la synthèse utilisent beaucoup d'énergie. Les émissions des gaz à effet de serre des écosystèmes agricoles résultent de l'activité microbienne impliquant les matières organiques du sol (Attard *et al.*, 2011). Pour mieux appréhender les mécanismes de stockage de carbone du sol en fonction de différentes pratiques agricoles, il faudra comprendre la dynamique des matières organiques du sol, qui peuvent être source mais également puits potentiel de carbone et d'azote. Dans la politique agricole commune européenne, l'introduction de prairies temporaires dans les cycles de culture est encouragée en raison de ses effets bénéfiques sur le stockage du carbone et, éventuellement, la réduction des émissions de gaz à effet de serre. Jusqu'à présent, on en sait peu sur l'impact à long terme des différentes pratiques de gestion des prairies sur la compartimentation, la composition et la réactivité de la matière organique du sol (MOS). C'est à travers le développement de la connaissance sur les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du phosphore et du couplage de ces cycles que nous pouvons identifier les gestions agricoles les plus favorables à maintenir voir augmenter la quantité et la qualité des MOS.

La fertilisation azotée, nécessaire pour maintenir la production agricole, non seulement engendre des émissions de N_2O mais elle est également source de pollution des eaux via les nitrates (Crews and Peoples, 2004). A l'heure actuelle, tout comme la réduction des émissions de gaz à effet de serre (GES), la réduction de l'utilisation des engrais azotés est une priorité. L'intérêt des légumineuses pour les prairies temporaires et leur effet sur les flux de l'azote dans les prairies et cultures ont été récemment soulignés par (Vertes *et al.*, 2015). Dans ce contexte les légumineuses présentent un intérêt grandissant car des études ont montré qu'elles permettent de réduire les apports en azote minéral dans les agroécosystèmes (INRA, 2013). Grâce à l'ajout de légumineuses dans le

système cultural, la fixation biologique d'azote peut agir comme une source durable d'azote pour le sol et peut compléter ou remplacer l'ajout de fertilisant et ainsi maintenir, voire améliorer la production des plantes (Carlsson and Huss-Danell 2003; Fustec *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2012). Ce processus utilisant l'énergie provenant de l'oxydation des glucides (Butterbach-Bahl *et al.*, 2011), est au cœur du couplage des cycles de l'azote, du carbone et du phosphore. Récemment il a été montré, que les composés azotés sont d'avantage impliqués dans la stabilisation du carbone dans les sols (Kleber *et al.*, 2007). Ainsi, l'introduction des légumineuses pourrait favoriser un stockage du carbone dans les sols et également changer la qualité des MOS. Toutefois, les relations entre les différents modes d'apport de l'azote (fertilisation ou fixation) et la dynamique des MOS restent à explorer.

Les objectifs de cette étude ont été multiples. Dans un premier temps nous avons tiré profit d'une expérience sur le terrain de 9 ans pour quantifier les arrières effets des prairies temporaires après les phases de culture sur la MOS, ainsi que le bilan des GES. En particulier, nous nous sommes intéressés aux modes de gestion des prairies (la fertilisation azotée et la durée). Ensuite nous avons focalisé nos recherches sur les types de fertilisation azotée des prairies : les engrais minéraux synthétiques et la fixation biologique de l'azote atmosphérique au sein d'association légumineuses-graminées. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact des deux types de fertilisation sur les formes de nutriments, en particulier le phosphore dans les sols mais aussi les formes de carbone organique des racines et du sol.

II. *Matière organique des sols agricoles et gaz à effet de serre*

1. **Changement climatique et gaz à effet de serre**

a. **Le changement climatique**

Le changement climatique se définit comme le changement statistiquement significatif des différents paramètres définissant le climat (IPCC, 2013). Le climat ce sont les familles de conditions météorologiques spécifiques à différentes régions sur des périodes de temps longues (CEA, 2013). Basé sur des données d'observation depuis des millénaires, le groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) annonce dans son 5^{ème} rapport de 2013, sans équivoque pour la première fois, le réchauffement du système climatique mondiale (IPCC, 2013). En effet, toutes les observations confirment que l'atmosphère et les océans se sont réchauffés ce qui conduit à la diminution des quantités de glace et de neige et l'élévation du niveau des mers (IPCC, 2013). La température moyenne globale a augmenté de 0,74°C en un siècle (CGDD, 2013) et le niveau des mers augmente de $3,2 \pm 0,4$ mm par an (CGDD, 2016).

Les impacts du changement climatique sont visibles dans le monde entier mais différents selon les régions du monde (IPCC, 2014). On peut déjà observer de lourds impacts sur les vies humaines à travers la production alimentaire, les inondations plus fréquentes et plus fortes dans certaines régions alors que d'autres souffrent de désertification et d'augmentation des zones arides (Vandaele *et al.*, 2010; IPCC 2014). L'augmentation des températures pourrait avoir d'autres effets comme le développement des maladies ou une forte perturbation de la biodiversité avec des migrations voire l'extinction de 20 à 30% des espèces (Vandaele *et al.*, 2010).

b. **Les gaz à effet de serre**

L'augmentation atmosphérique des gaz à effet de serre (GES) depuis l'époque préindustrielle est la principale cause du changement climatique (IPCC, 2013). L'effet de serre est un processus physique naturel qui permet à la Terre grâce à son atmosphère d'avoir une température moyenne à la surface de 15°C et qui sans ce processus ne serait que de -18°C (CEA, 2013). Parmi les gaz naturels constituant l'atmosphère de la Terre certains sont dit « gaz à effet de serre », ils ne représentent que

0,1% du volume atmosphérique et les plus importants sont la vapeur d'eau, le dioxyde de carbone (CO₂), le méthane (CH₄) et l'oxyde de diazote (N₂O) (CGDD, 2016). Ces GES ont la capacité de retenir l'énergie que la Terre reçoit des rayonnements du Soleil et ainsi plus leur concentration est élevée plus la température à la surface de la Terre augmente (CEA, 2013).

L'augmentation des GES dans l'atmosphère résulte des émissions anthropiques dues à l'utilisation de combustibles fossiles comme source d'énergie et aux changements d'utilisation des terres qui touchent l'agriculture. Entre 1750 et 2011, les concentrations atmosphériques de CO₂ ont augmenté de 40% (de 278 ppm à 390,5 ppm), celles de CH₄ de 150% (de 722 ppb à 1803 ppb) et celles de N₂O de 20% (de 271 ppb à 324,2 ppb) (IPCC, 2013).

Les émissions de CO₂ ont pour origine, outre les mécanismes naturels des écosystèmes, dus à la combustion des ressources fossiles intéressantes pour l'énergie qu'elle libère des molécules carbonées telles que du fioul, des gaz (CH₄), du bois etc. (INRA, 2013).

Ces GES sont caractérisés par un potentiel de réchauffement climatique qui évalue l'impact sur le climat pour un siècle avec le CO₂ égal à 1 comme référence. Par exemple le potentiel de réchauffement climatique du N₂O est de 296 (IPCC, 2013), cela signifie qu'il est 296 fois plus élevé que celui du CO₂ en terme d'effet de serre et de pouvoir réchauffant sur un siècle.

Il est intéressant de noter que la moitié des émissions anthropiques cumulées de CO₂ entre 1750 et 2011 ont eu lieu au cours de ces 40 dernières années et les changements tels que des phénomènes météorologiques et climatiques extrêmes ont été constatés depuis 1950 environ (IPCC, 2014) ce qui laisse présager un fort aggravement de la situation sur le long terme.

c. L'agriculture et les gaz à effet de serre

L'agriculture, la forêt et l'utilisation des terres mondiales sont des sources de GES importantes et représentent environ 24% des émissions totales et jusqu'à 80% des émissions de N₂O (IPCC, 2013). Les émissions des GES des écosystèmes agricoles résultent de l'activité microbienne impliquant les MOS (Attard *et al.*, 2011). L'agriculture est d'autant mise en cause qu'elle est grande consommatrice de carbone fossile mais aussi de fertilisants azotés dont l'application et la synthèse utilisent beaucoup d'énergie, source d'émission de CO₂. Dans le cas de la France, les émissions de GES de l'agriculture (hors consommation d'énergie) sont de 17,8% et représentent 86,6% des émissions de N₂O dont 35% liés aux émissions directes des sols agricoles (INRA 2013 et Figure 1).

La principale source de GES reste le changement d'utilisation de terre (IPCC, 2013), comme le montre la Figure 3 les processus du sol et des plantes émettent naturellement des GES et la perturbation des systèmes peut avoir des effets négatifs sur les équilibres entre les entrées et les

sorties. En effet certaines transitions vont engendrer un fort déstockage du carbone du sol en CO₂. On observe aussi des émissions de CH₄ que l'on retrouve dans les conditions anaérobiques (Figure 1 et Figure 3) telles que la gestion des zones humides ou la culture du riz mais aussi avec la fermentation entérique des vaches et la gestion des fumiers (IPCC, 2013). Enfin il y a les émissions de N₂O aussi caractéristiques de l'absence d'oxygène que l'on observe aussi dans les zones humides, de la gestion des fumiers et de l'utilisation des fertilisants synthétiques (IPCC, 2013).

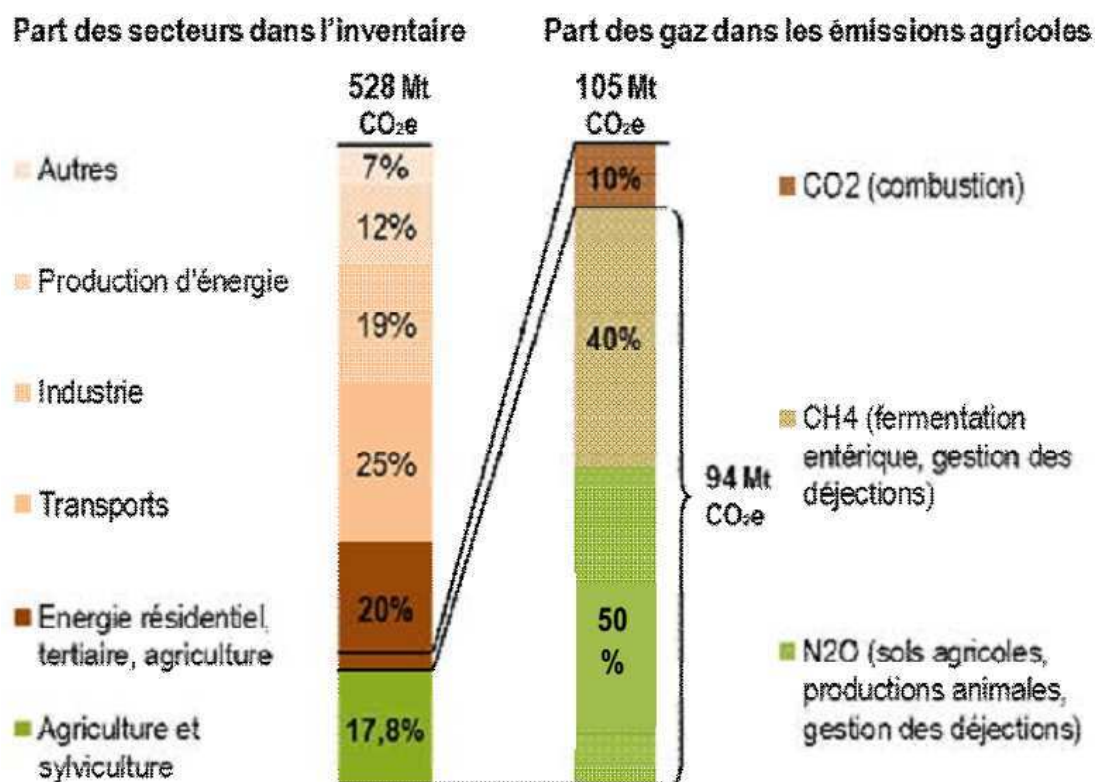


Figure 1. Source des gaz à effet de serre en France et dans son agriculture. Source :INRA 2013.

d. Les politiques de réduction de gaz à effet de serre et le sol

Le protocole de Kyoto

Depuis les années 90, la réduction des émissions de GES est devenue une priorité politique, c'est dans ce contexte que la convention cadre des nations unies sur les changements climatiques et du GIEC furent créés. Suite à cela, le protocole de Kyoto fut rédigé après négociations lors de la 3^{ème} conférence des parties en 1997 grâce aux précieuses informations apportées par le travail du GIEC dans son 2^{ème} rapport de 1995 (UNFCCC, 2014). Le protocole de Kyoto est un traité international visant à la réduction des émissions de GES d'au moins 5% par rapport aux niveaux de 1990 durant la

période d'engagement de 2008 à 2012. L'entrée en vigueur ne fut possible qu'en 2005 après la ratification d'au moins 55 parties à la convention qui comptait en 1990 au moins 55 % des émissions de CO₂ mondiale, ce qui entraîna des mises à jour (UNFCCC, 2014).

Les sols en tant que plus gros réservoir de carbone avec minimum 1500 Pg C (IPCC, 2013 et Figure 2), sont aujourd'hui au cœur des enjeux du changement climatique de par leur capacité à stocker du carbone sous forme organique mais aussi à être source de CO₂ en fonction de l'utilisation des terres (INRA, 2002). Les articles 3.3 et 3.4 du protocole de Kyoto autorisent les pays signataires à prendre en compte les activités de séquestration de carbone et ainsi les décompter de leurs émissions de GES (INRA, 2002). Ces activités concernent essentiellement le stockage de carbone dans la biomasse et les sols. L'article 3.3 favorise le reboisement des terres et l'article 3.4 traite de l'agriculture avec l'utilisation des terres, le changement d'affectation des terres et la foresterie (INRA, 2002).

Dans ce sens, l'Union Européenne a depuis 2013 (529/2013/EU) mis en place une politique de comptabilisation des sources et puits de GES par les sols. L'instauration de cette directive commence par la gestion forestière pour d'ici 2021 intégrer la gestion des terres cultivées et pâturées (ADEME, 2014).

L'initiative 4 pour 1000

La France dont les émissions de CO₂ sont faibles grâce à une politique développant le nucléaire comme source d'énergie, peut difficilement envisager de réduire ces émissions. De plus, la réduction des émissions de GES est corrélée à la croissance d'un pays (Delbosq *et al.*, 2007) ; ainsi les décisions politiques de réduction d'émissions de GES sont difficiles à mettre en place. Dans ce contexte favoriser la séquestration du carbone dans les sols pour compenser les émissions de GES semble une bonne idée d'autant que cela améliore la qualité du sol aussi d'un point de vue agronomique permettant ainsi d'améliorer la sécurité alimentaire.

En 2015 (année de la COP 21 à Paris) est née l'initiative 4 pour 1000, lancé par le ministre français de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, M. Le Foll (Figure 2). Ce concept, basé sur un calcul simple, est proposé pour la première fois en 1999 par deux chercheurs à l'INRA. D'après (Balesdent and Arrouays, 1999) « une augmentation annuelle de ce réservoir [MOS] de seulement 0,4% par an stockerait autant de carbone que la combustion de carbone fossile n'en émet. ». Dans le principe cette idée semble très encourageante mais la mise en application nécessitera un lourd travail politique et agricole.

Des verrous majeurs pour le développement des pratiques permettant l'augmentation des stocks du carbone des sols existent en ce qui concerne l'effet des pratiques agricoles sur le couplage

et découplage des cycles biogéochimiques et sur la dynamique des MOS. Pour mieux cerner la question du 4 pour 1000, nous avons besoin de plus de recherche notamment sur les processus de séquestration de carbone des sols, de sa sensibilité aux variables climatiques et agronomiques et de son impact sur le bilan de gaz à effet de serre.

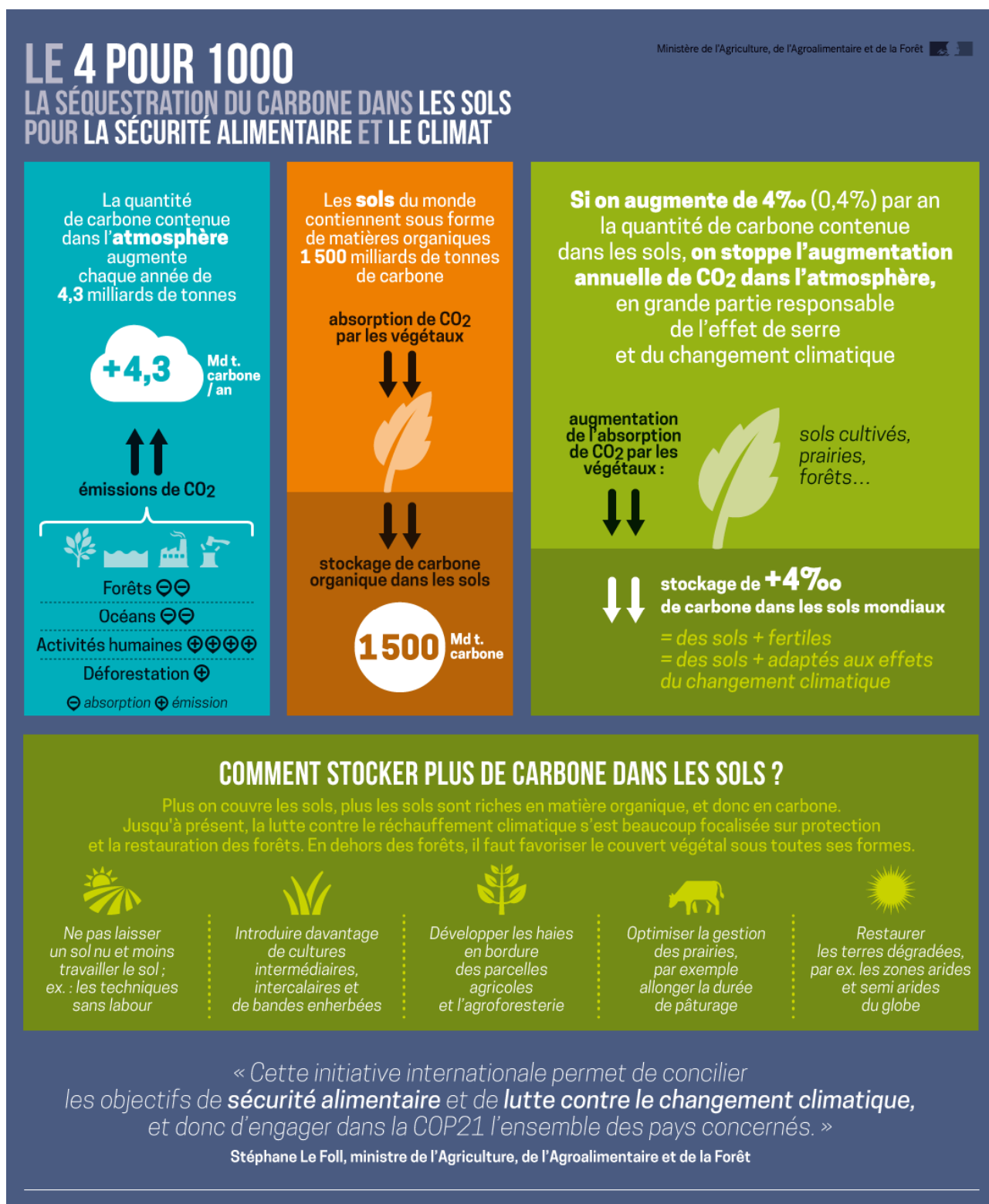


Figure 2. Infographie de l'initiative 4 pour 1000. Source : 4p1000.org

2. Les matières organiques du sol

Le sol de par les mécanismes biologiques, physiques et chimiques, peut être un puits de carbone via le stockage de matières organiques, mais aussi une source de CO₂ via leur minéralisation. En effet stocker du carbone dans le sol signifie stocker du carbone organique et plus précisément de la matière organique.

Les matières organiques du sol (MOS) sont définies comme tout ce qui est vivant ou a été vivant dans le sol (ADEME, 2014). Les MOS sont l'ensemble des molécules organiques au sein d'un continuum en perpétuel renouvellement comprenant des tissus vivants, des résidus en cour de décomposition, des molécules très complexes ou encore des composés labiles (Bernoux *et al.*, 2011). Néanmoins, dans le cadre où nous étudions la nature des MOS et les processus de stabilisation nous nous limitons aux matières organiques mortes du sol.

a. Les entrées de matière organique dans le sol

Les entrées organiques du sol sont principalement d'origine végétale mais sont aussi d'origines microbienne, fongique et animale (Calvet *et al.*, 2011). Les sources de MOS sont les organes et organismes morts tels que les feuilles et les racines de plantes, les corps d'animaux ou les microbes, mais aussi les déjections animales et la rhizodéposition (INRA, 2002). Issues du vivant, les matières organiques sont constituées de carbone, d'oxygène, d'hydrogène, d'azote mais aussi de phosphore, de soufre, etc. Chacun de ces éléments a son propre devenir au sein de cycles biogéochimiques de par des mécanismes complexes biologiques et physico-chimiques. La complexité de la dynamique des matières organique des sols réside aussi dans le couplage et découplage au cœur des réactions des cycles biogéochimiques carbone, azote et phosphore (Figure 3).

La matière organique du sol vivante : les décomposeurs

Les fractions vivantes des matières organiques du sol sont des organismes autant source de matière organique que consommateurs. Ils sont ainsi les principaux acteurs des mécanismes de biotransformation des MOS. Les organismes vivants du sol ont une biomasse correspondant à 15% du carbone du sol (Calvet *et al.*, 2011) et ils sont végétal, animal, microbien et fongique. Les végétaux sont représentés par les racines et des graines en dormance (Calvet *et al.*, 2011). Les animaux par une pédofaune de taille très diverse allant des nématodes à des vertébrés en passant par

des arthropodes, des vers de terre, des myriapodes etc. Les microorganismes du sol représentant 1 à 4% du carbone organique du sol, sont eux composés de bactéries, champignons et algues (Calvet *et al.*, 2011).

La rhizodéposition

Dans le cas d'une prairie fauchée, les parties aériennes étant récoltées la rhizodéposition est le principal processus dans l'enrichissement du sol en matière organique végétale.

La rhizodéposition comprend plusieurs processus : la décomposition des tissus racinaires et des nodules morts, l'exsudation de composés solubles, la desquamation des cellules du bord des racines et de la sécrétion de mucilage. De part ces différents processus, la nature chimique des composés végétaux enrichissant le sol est très variée. On y trouve des composés à faible poids moléculaire, comme pour les composés carbonés des sucres simples (monosaccharides) et les composés azotés des acides aminés ; mais aussi des composés à plus haut poids moléculaire tels que des sucres complexes (polysaccharides) pour le carbone et des peptides et protéines pour l'azote (Rovira, 1969). Les racines et les nodules sénescents paraissent être la principale source d'N pour le sol, d'autant que la rhizodéposition augmente avec l'âge de la plante. (Fustec *et al.*, 2010). Par ailleurs, à une échelle supérieure ces composés peuvent aussi être des débris végétaux, des cellules ou encore des tissus, qui via leur décomposition deviendront à plus ou moins long terme des composés plus labiles.

b. Flux de MOS et couplage des cycles biogéochimiques

Le cycle du carbone

Le carbone est le quatrième élément le plus abondant de la biosphère et il est un élément majeur impliqué dans les processus de la biogéosphère (Huc *et al.*, 2007). Il est présent sous différents états chimiques soit sous forme organique, soit minérale comme le CO₂ et les carbonates (Pedro, 2007). Le cycle du carbone est l'ensemble des flux de molécules carbonées entre les quatre grands réservoirs : l'atmosphère, la biosphère, l'hydrosphère et la lithosphère. Les échelles de temps varient de la minute pour les réactions biologiques aux centaines de millions d'années pour la fossilisation des OM (Pedro, 2007).

Les principaux processus biologiques du cycle du carbone sont la photosynthèse comme entrée de carbone dans la biosphère et la minéralisation comme sortie due à la respiration sous forme de CO₂ de tous les organismes vivants tels que ceux présents dans le sol (Wolf and Wagner, 2005) et Figure 3). La photosynthèse est le processus biologique spécifique aux végétaux, algues et quelques

bactéries, qui transforment le carbone minéral présent dans l'atmosphère sous forme de CO_2 en matière organique (sucres), grâce à l'énergie solaire. Alors que la respiration est le processus inverse, la re-transformation en CO_2 des matières organiques dû à leur combustion comme source d'énergie du vivant (Huc *et al.*, 2007 et Figure 3).

Dans les conditions spécifiques d'anaérobie, la respiration se fait par fermentation aussi appelée méthanisation car ce processus est émetteur de CH_4 . La respiration anaérobique peut aussi se faire par dénitrification, un processus au cœur des couplages/découplages des cycles du carbone et l'azote (Fuhrmann, 2005 et Figure 3).

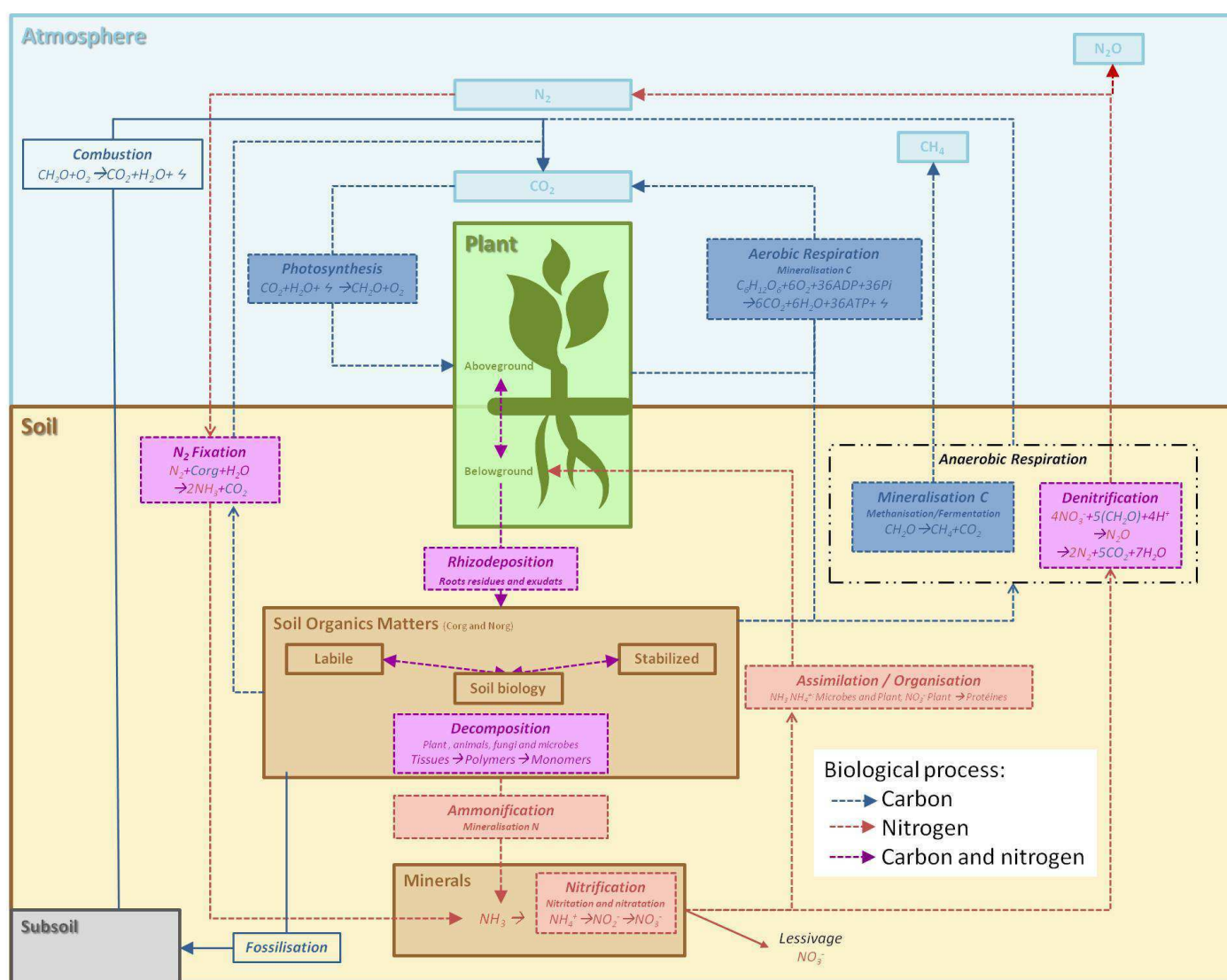


Figure 3. Couplage du cycle du carbone et de l'azote dans le continuum sol, plante et atmosphère. © Crème.

Le sol est le second réservoir du carbone sur Terre représentant minimum 1500 Pg C, après les océans qui eux stockent 40 000 Pg de carbone (IPCC, 2013). Cependant le sol reste le premier

réservoir de carbone organique de la biosphère continentale (Calvet *et al.*, 2011). Les flux naturels entre les différents compartiments du cycle du carbone sont perturbés par l'activité humaine comme la déforestation ou la combustion de carbone fossile émettant 7,8 Pg de carbone par an (IPCC, 2013) et Figure 3). Une partie de ce flux est compensée par des mécanismes tels que la dissolution du CO₂ dans les eaux océaniques, à hauteur de 2,3 Pg de carbone (IPCC, 2013). Néanmoins, une grande partie des émissions reste non-compensée, ainsi enrichissant l'atmosphère en CO₂ avec des effets dramatiques sur la température globale ainsi que le climat.

Le changement d'utilisation des terres peut aussi induire la minéralisation du carbone organique stocké dans le sol tout particulièrement en agriculture (Robert, 2002). Alors que la photosynthèse des végétaux capte le CO₂ atmosphérique, la gestion des sols agricoles et la déforestation induisent l'émission de carbone (IPCC, 2013). C'est précisément sur l'équilibre de ces processus que se joue le stockage de carbone par les sols et qu'ainsi l'utilisation des terres peut compenser les émissions de GES.

Le cycle de l'azote

L'azote étant présent dans les protéines et les acides nucléiques, il est l'un des principaux constituants des êtres vivants et un élément régulateur du fonctionnement des écosystèmes. Il est aussi, sous la forme de N₂, le principal constituant de l'atmosphère avec 78% du volume, néanmoins sous cette forme il n'est accessible que pour peu d'êtres vivants. Ainsi le cycle de l'azote naturel est limité par le processus biologique de fixation de l'azote (BNF) et le recyclage de l'azote constituant des MOS dû à l'activité des animaux et des microorganismes du sol (Figure 3). L'azote est consommable par les plantes sous la forme minérale telle que le nitrate (NO₃⁻) et l'ammonium (NH₄⁺), et par les animaux sous la forme organique telle que les protéines et les acides aminés.

L'activité humaine a perturbé également le cycle de l'azote et en particulier son couplage avec le cycle du carbone. Dans des sols agricoles, où les entrées de l'azote ont été augmentées par la fertilisation cela impacte les processus de sortie d'azote du système. On observe les phénomènes de lessivage et de lixiviation des nitrates dû à la percolation des eaux de pluie dans le sol ou encore le phénomène de dénitrification effectué par les microorganismes du sol qui consiste à consommer le NO₃⁻ du sol pour la respiration en anaérobiose et ainsi les transformer en N₂ (Figure 3). Malheureusement le processus de dénitrification peut aussi être source de N₂O s'il ne se fait pas jusqu'à la réduction totale du NO₃⁻ en N₂ (Canfield *et al.*, 2010 et Figure 3).

Le cycle du phosphore

La lithosphère grâce à l'extraction minière d'apatite ou l'altération des roches, est la seule source du phosphore de la biosphère (Lavelle, 2007 et Figure 4). Ainsi les sols peuvent présenter des quantités de phosphore très variées en fonction de la roche mère (Mullen, 2005). On le retrouve sous différentes formes : ionique avec le phosphate PO_4^{2-} (pouvant être H_2PO_4 et HPO_4^- en fonction du pH), de complexes minéraux occlus Al-P, Fe-P, Ca-P, Si-P et de phosphore organique (Lavelle, 2007). Le phosphore est peu biodisponible car les phosphates sont faiblement solubles ce qui le rend dans certains cas limitant dans le sol bien qu'il soit faiblement lessivable (Lavelle, 2007). Cependant, il est la première cause d'eutrophisation de par son utilisation agricole lors de l'érosion des sols (Lavelle, 2007).

Le phosphore est transformé par des réactions géochimiques comme biologiques (Mullen, 2005) et Figure 4). Il est présent comme le carbone et l'azote dans les biomolécules tels l'acide désoxyribonucléique, les phospholipides et l'adénosine triphosphate (Mullen, 2005). Les principales réactions biologiques permettant les flux entre les différents compartiments du cycle sont la minéralisation et l'immobilisation par la consommation (Mullen, 2005) et Figure 4). Le phosphore organique (OP) représente 30 à 50% du phosphore du sol et il est fortement corrélé au carbone organique (Mullen 2005; Kirkby *et al.*, 2011).

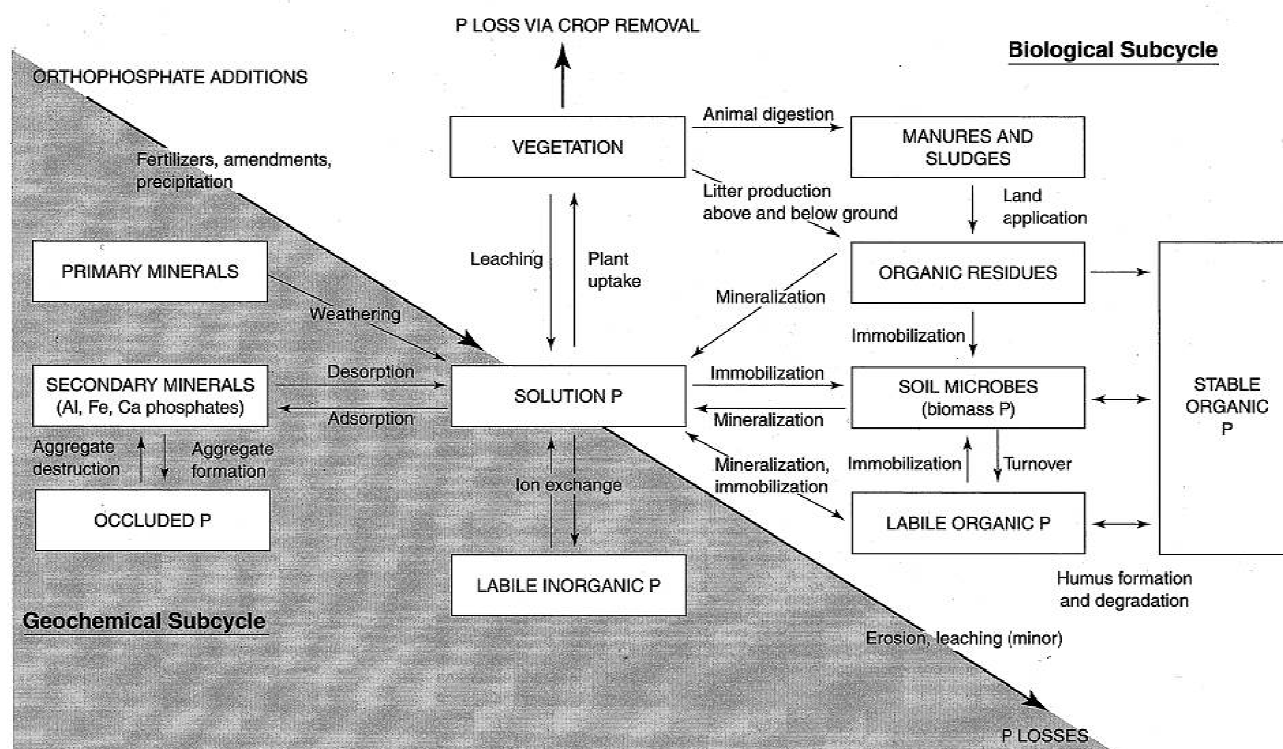


Figure 4. Cycle du phosphore. Source : Mullen 2005

c. Les biomolécules de la matière organique du sol

La MOS peut être défini par la nature chimique des molécules plus ou moins complexes, caractéristique de leur origine vivante. On va donc observer des biomolécules carbonées pouvant être exclusivement d'origine végétale avec les lignines, les tannins et les aliphatiques comprenant des lipides, cutines et subérines... mais aussi de tous les êtres vivants avec les hydrates de carbone appelés aussi les sucres ou encore des stéroïdes (Amelung *et al.*, 2008). On observe aussi des biomolécules azotées comme les acides aminés, les protéines ou les sucres aminés (Kögel-Knabner 2002; Calvet *et al.*, 2011) ou encore phosphatés avec les nucléotides (Amelung *et al.*, 2008).

De par leur nature chimique, les différentes biomolécules vont présenter une plus ou moins forte sensibilité à la dégradation (Feller and Chenu, 2012), on appelle cela la récalcitrance. La récalcitrance d'une molécule organique se définit par des caractéristiques au niveau moléculaire avec la composition élémentaire, les groupes fonctionnels et la conformation moléculaire (Sollins *et al.*, 1996). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à deux biomarqueurs : les sucres comme composés « labiles » facilement dégradables par la biomasse microbienne et les lignines tels des composés « récalcitrants » à la dégradation.

Les sucres

Les sucres représentent 50% des litières et peuvent être de deux types : de la cellulose constituée d'unités de glucose et de l'hémicellulose constituée d'unités de sucres autres que le glucose (Kögel-Knabner 2002 et Figure 5). Les polysaccharides non cellulosiques, qui composent 30% des résidus de plante (Wolf and Wagner, 2005) ont un plus faible degré de polymérisation que la cellulose (Kögel-Knabner, 2002). Les polysaccharides non cellulosiques avec un faible degré de polymérisation sont rapidement dégradés par les microorganismes du sol, on les appelle des composés labiles (Kuzuyakov *et al.*, 2000; Kögel-Knabner 2002; Rumpel and Dignac 2006). La décomposition des sucres est spécifique aux différents monomères avec les hexoses qui se dégradent plus vite que les pentoses et des temps de résidence moyens compris entre 3 et 28 ans (Amelung *et al.*, 2008).

Les lignines

Les lignines sont le second type de molécules les plus importantes dans la nature après les sucres, et le plus important composé végétal aromatique (Kiem and Kögel-Knabner, 2003; Kögel-Knabner, 2002). Elles représentent avec 5 à 35% une part conséquente des entrées de litière dans le sol (Wolf and Wagner, 2005). Les lignines sont composées de cycles aromatiques avec des

groupements fonctionnels spécifiques (Figure 6). On peut distinguer trois types de phénols constituant des lignines : coniferyl ou vanillyl (V), sinapyl ou syringyl (S) et coumaryl ou p-hydroxyle (Co). Les plantes présentent des proportions spécifiques de chacun de ces monomères phénoliques ; par exemple 1 : 1 : 1 pour la lignine des graminées contre 94 : 1 : 5 dans l'épicéa (Kögel-Knabner 2002; Thevenot *et al.*, 2010).

Les lignines grâce à leur forte aromaticité sont plus difficiles à dégrader que d'autres composés de litière. Elles sont minéralisables seulement par un nombre restreint de décomposeurs (champignon à pourriture blanche) et sont donc classées comme des composés récalcitrants (Frei, 2013; Kögel-Knabner, 2002). La décomposition des lignines est spécifique aux différents monomères qui se dégradent par ordre croissant : $V > S > Co$, avec des temps de résidence moyens compris entre 7 et 33 ans (Bahri *et al.*, 2006; Amelung *et al.*, 2008).

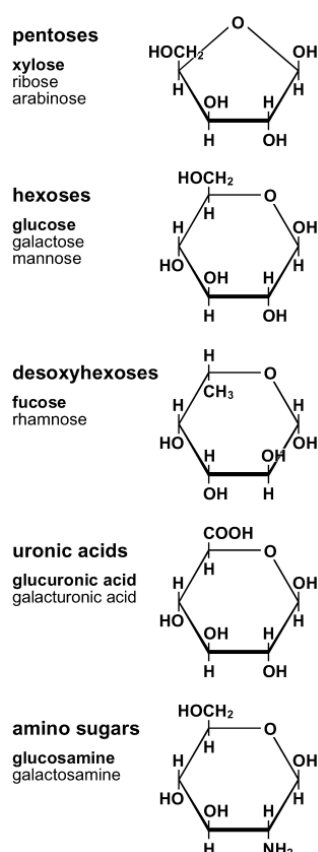


Figure 5. Structure de base des principaux monomères de sucre dans l'hémicellulose des plantes (en gras la figure en exemple et les isomères de structure).
Source : Kögel-Knabner 2002

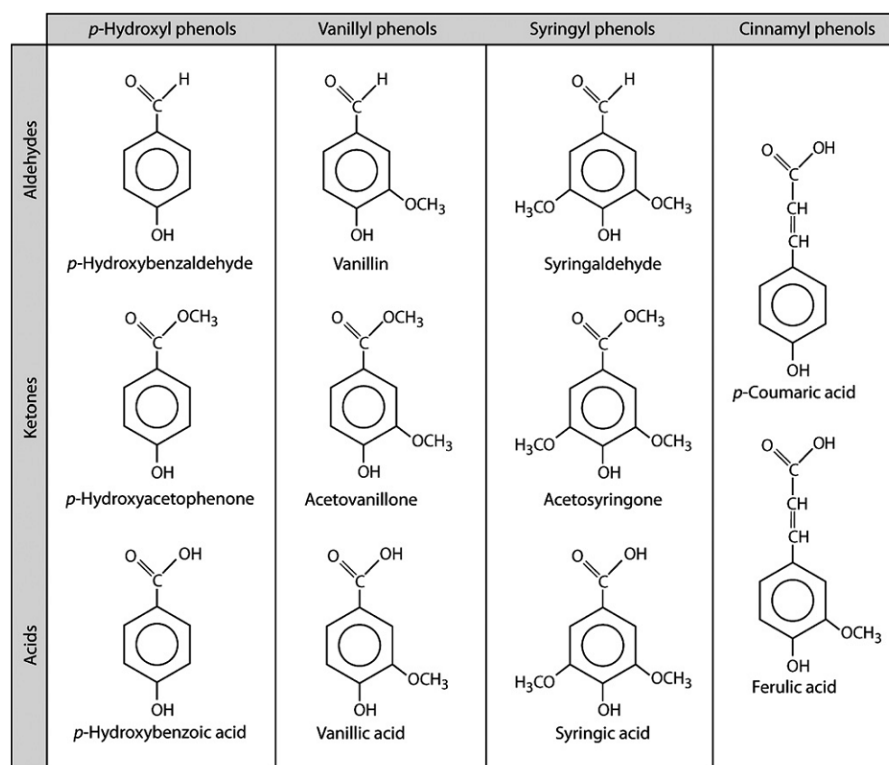


Figure 6. Les monomères de lignine libérés par l'oxydation au CuO.
Source: Thevenot *et al.*, 2010.

d. Transformation et processus de stabilisation des matières organiques

Décomposition ou dégradation de la MOS

Les MOS sont constituées de biomolécules très diverses et plus ou moins complexes caractérisées par la nature chimique et l'état de décomposition de résidus initialement vivants. Le processus de décomposition des MOS réside principalement dans leur consommation par les organismes du sol, ou plus précisément par les métabolismes cellulaires telles les réactions d'oxydation et de dépolymérisation (Sollins *et al.*, 1996). Si la nature chimique des molécules influence leur transformation dans le sol, les magnitudes des temps de résidence des sucres et des lignines sont similaires ; ce qui signifie que la récalcitrance chimique n'est pas déterminante à moyen terme du devenir de la MOS (Amelung *et al.*, 2008). En effet, influencée par la récalcitrance des biomolécules, la décomposition est aussi sensible aux conditions environnementales telles que le climat, la végétation, la nature du sol, etc. (INRA, 2002). La dégradation des MOS se traduit par la transformation biologique de molécules complexes de grande taille tels les poly-aromatiques, les glucides, les lipides ou encore les protéines, en molécules simples et plus petites tels les acides carboxyliques et les acides aminées (Sollins *et al.*, 1996). La matière organique apportée au sol est dégradée jusqu'à être minéralisée par la respiration des organismes sous forme de CO₂. Au cours des processus de dégradation, la matière organique peut être stabilisée et ne plus être accessible par les microorganismes à plus ou moins long terme.

Stabilisation de la MOS

La stabilisation de la MOS est définie comme la diminution du potentiel de sa perte par respiration, érosion, lessivage ou lixiviation et ceci a lieu à des vitesses et des degrés variables dans le temps (Sollins *et al.*, 1996).

Il a été montré que la stabilisation du carbone du sol est déterminée par la capacité microbienne à consommer les matières organiques de par les interactions des molécules issues de la décomposition avec la phase minérale du sol (Cotrufo *et al.*, 2013 et Figure 7). En effet les MOS peuvent s'adsorber sur les surfaces minérales telles que des phyllosilicates ou des Fe-, Al- et Mn-oxydes (Lützow *et al.*, 2006). On appelle cela des interactions organo-minérales, ce qui rend les MOS inaccessibles à la minéralisation microbienne (Feller and Chenu, 2012).

Les interactions organo-minérales ne sont pas les seuls processus de stabilisation des MOS, dans certains cas on peut observer une protection physique de la matière organique se traduisant par une totale inaccessibilité pour les microbes (Feller and Chenu, 2012). L'inaccessibilité spatiale est

due à l'occlusion, l'intercalation, l'hydrophobicité et l'encapsulation de la matière organique (Lützow *et al.*, 2006).

La stabilité des MOS est un état à l'équilibre entre la récalcitrance, les interactions et l'accessibilité de la matière organique face à la microbiologie (Sollins *et al.*, 1996 et Figure 7).

Caractérisations chimiques des MOS

Les MOS peuvent aussi être définies par des réservoirs présentant des dynamiques variées des plus labiles aux plus stables. Certaines définitions portent sur la caractérisation par extraction chimique comme par exemple la définition des acides humiques et fulviques (Calvet *et al.*, 2011) ou le fractionnement Hedley du phosphore (Hedley *et al.*, 1982). Néanmoins la définition des MOS par la caractérisation chimique a ses limites et la stabilité du carbone dans un sol ne peut pas toujours se résumer à une fraction extraite chimiquement (Plante *et al.*, 2011; Lutfalla *et al.*, 2013).

Comme le montre la multiplicité des définitions la matière organique n'est pas un paramètre quantifiable par une simple analyse chimique. On obtient donc la teneur en MOS par la détermination de la teneur en carbone organique du sol qui est elle quantifiable, multipliée par un facteur moyenné de 1,72 obtenu empiriquement mais variable selon les écosystèmes (Calvet *et al.*, 2011).

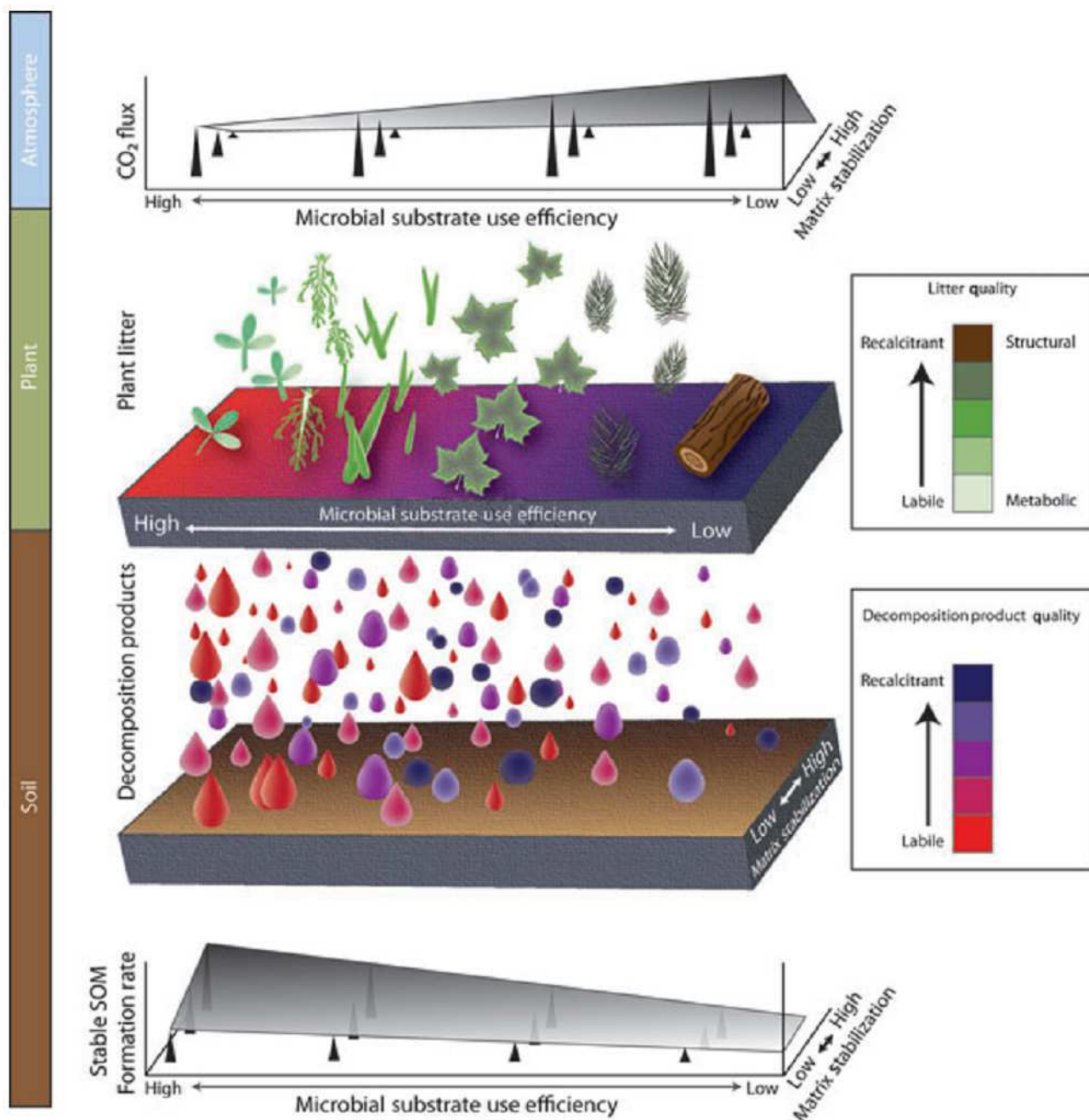


Figure 7. Microbial Efficiency - Matrix Stabilization concept; représentation des interactions entre la qualité de la litière, les émissions de CO₂ et la stabilisation de la matière organique du sol. Source : Cotrufo *et al.*, 2013.

III. Effets des différents modes de gestion des prairies temporaires sur les matières organiques du sol

1. Utilisation des terres agricoles et stockage de carbone

a. Stockage de carbone dans les sols

D'après Lal (2004), les capacités de stockage de carbone des sols agricoles et dégradés du monde est de 50 à 66% du carbone perdu historiquement et peuvent compenser 5 à 15% des émissions globales dues aux combustibles fossiles. Les processus biotiques et abiotiques influençant les stocks de carbone sont nombreux : on retrouve l'érosion, le lessivage mais aussi positivement l'apport de litière par les plantes (Lal 2004 et Figure 8).

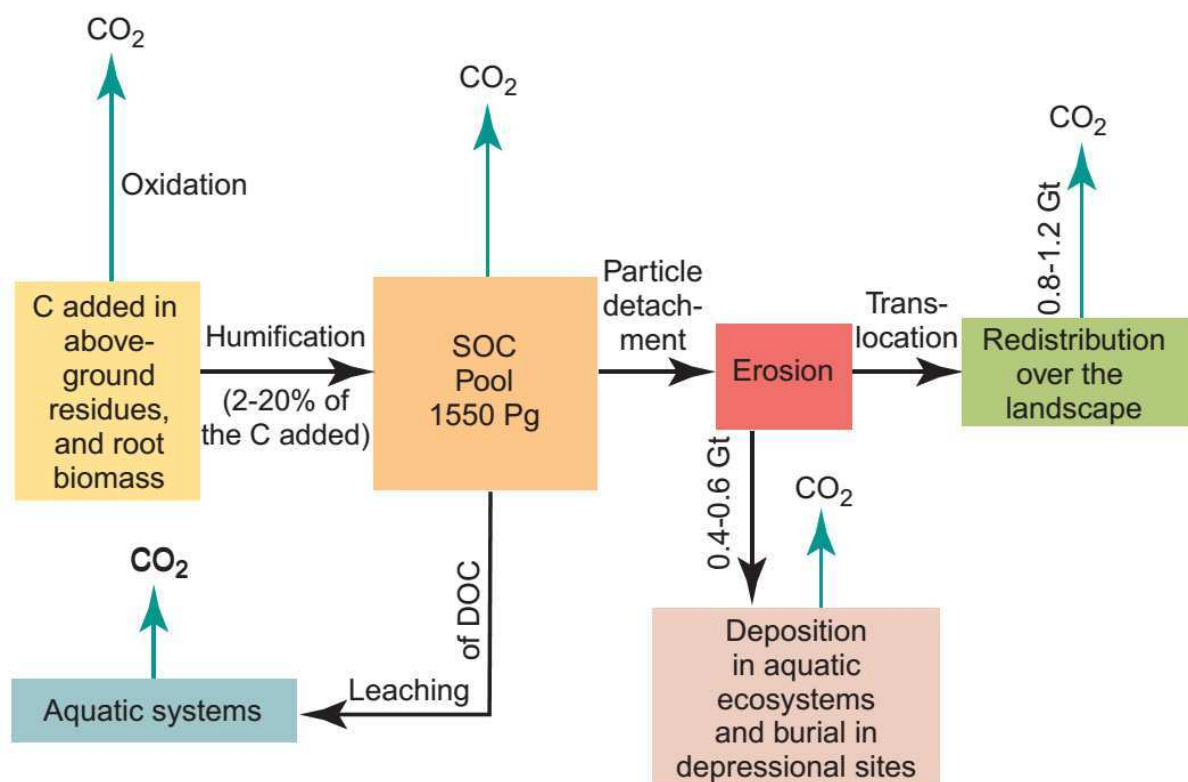


Figure 8. Processus affectant la dynamique du carbone organique du sol. Les flèches pointant vers le haut indiquent les émissions de CO₂ dans l'atmosphère. Il peut aussi y avoir en conditions anaérobies des émissions de CH₄. Source: Lal, 2004.

Stocker du carbone dans le sol est un mécanisme complexe qui joue sur l'équilibre de l'écosystème et est contrôlé par deux mécanismes : les entrées de matière organique par production primaire nette (quantité et qualité) et les sorties avec le taux de décomposition (INRA 2002; Lützow *et al.*, 2006). Certaines pratiques et technologies peuvent être adoptées pour améliorer les stocks de carbone des sols mondiaux (Paustian *et al.*, 1997; Conant *et al.*, 2001; Lal 2004).

Augmenter les entrées de matières organiques dans les sols

L'augmentation des entrées de MOS peut se faire directement par l'épandage de produits résiduels organiques tels que les fumiers ou composts ou indirectement par l'amélioration de la production de biomasse végétale. Cette augmentation de biomasse végétale peut être induite à travers de nombreuses activités anthropiques reconnues par l'INRA et leGIEC, il est envisageable de : développer les rotations culturales ; introduire des cultures intermédiaires et des bandes enherbées dans les cultures ; développer l'agroforesterie et les haies ; optimiser la fertilisation minérale et organique, la protection intégrée des cultures, l'irrigation; optimiser la gestion des prairies (INRA, 2013, 2002 et Figure 9).

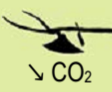
Stocker du carbone dans le sol et la biomasse		
 ✓ CO ₂	③ Développer les techniques culturales sans labour pour stocker du C dans le sol	3 options techniques : passer au semis direct continu, passer au labour occasionnel, passer au travail superficiel du sol
 ✓ CO ₂ ✓ N ₂ O	④ Introduire davantage de cultures intermédiaires, de cultures intercalaires et de bandes enherbées dans les systèmes de culture pour stocker du carbone dans le sol et limiter les émissions de N₂O	A. Développer les cultures intermédiaires semées entre deux cultures de vente dans les systèmes de grande culture B. Introduire des cultures intercalaires en vignes et en vergers C. Introduire des bandes enherbées en bordure de cours d'eau ou en périphérie de parcelles
 ✓ CO ₂	⑤ Développer l'agroforesterie et les haies pour favoriser le stockage de carbone dans le sol et la biomasse végétale	A. Développer l'agroforesterie à faible densité d'arbres B. Développer les haies en périphérie des parcelles agricoles
 ✓ CO ₂ ✓ N ₂ O	⑥ Optimiser la gestion des prairies pour favoriser le stockage de carbone et réduire les émissions de N₂O	A. Allonger la période de pâturage B. Accroître la durée de vie des prairies temporaires C. Réduire la fertilisation azotée des prairies permanentes et temporaires les plus intensives D. Intensifier modérément les prairies permanentes peu productives par augmentation du chargement animal

Figure 9. Actions promouvant la production de biomasse et le stockage du carbone dans le sol comme atténuation des émissions de gaz à effet de serre agricole. Sources : INRA 2013

Retarder les sorties de carbone dans les sols

Retarder les sorties de carbone du sol se traduit par favoriser les mécanismes de stabilisation du carbone dans le sol ou minimiser les conditions favorables à sa minéralisation.

Par exemple, les stocks de carbone sont influencés par les types de sol. On observe que les sols sableux vont stocker moins avec en moyenne 40 t C ha^{-1} alors que les sols argileux ou hydromorphes peuvent stocker jusqu'à 100 t C ha^{-1} (INRA, 2002). En effet, les conditions anaérobies des sols hydromorphes sont connues pour faiblement dégrader les entrées de MOS. Aussi la teneur en argile est un paramètre du sol corrélé au stock de carbone, la minéralisation des matières organiques du sol est ralentie par les associations organo-minérales qui rend la OM inaccessible aux microorganismes qui ne pourront donc pas la consommer et la minéraliser (Feller and Chenu, 2012; INRA, 2002).

Au-delà et grâce à la caractérisation scientifique des paramètres écosystémiques favorables au stockage du carbone dans le sol, on connaît certaines pratiques agricoles pouvant limiter les sortie de carbone comme la lutte contre l'érosion, la restauration de zones humides, les techniques de non-labour (INRA 2002; Robert 2002; Lal 2004; Soussana *et al.*, 2010; INRA 2013). En effet, le labour est reconnu comme une pratique culturale déstockant le carbone du sol (Conant *et al.*, 2007).

b. Effet du changement d'utilisation des terres sur le stockage ou le déstockage du carbone des sols

Utilisation des terres et stocks de carbone

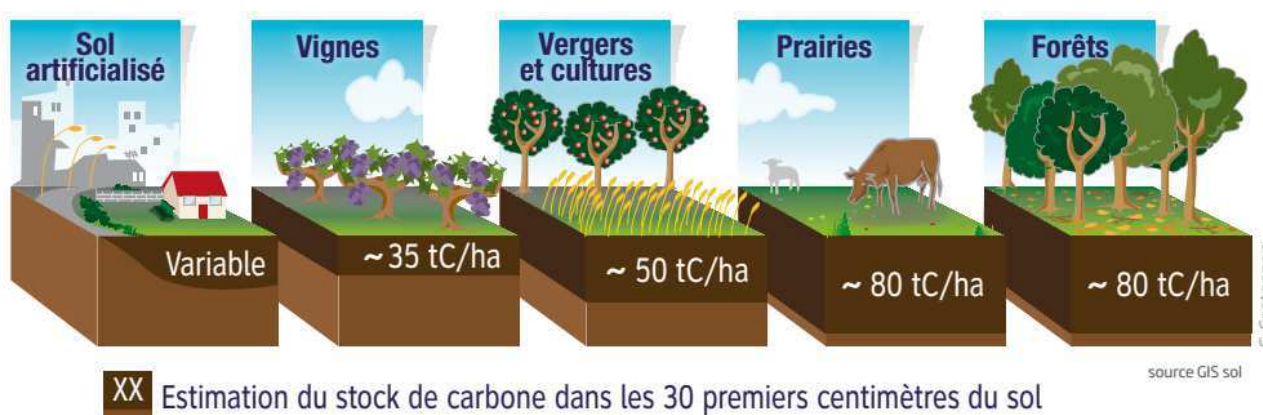


Figure 10. Changement des stocks de carbone organique selon l'utilisation des terres en France.

Source : ADEME 2014

La complexité des mécanismes mis en jeu dans le stockage du carbone dans les sols a comme conséquence que les différentes utilisations des terres et pratiques agricoles vont présenter des stocks de carbone différents (Figure 10).

Les forêts et les prairies sont des sols qui stockent beaucoup de carbone de 70 à 80 t C ha⁻¹ grâce à une végétation pérenne qui présente des apports en carbone élevés et une matière organique plus résistante à la dégradation, avec une source racinaire importante qui facilite la protection physique de la matière organique (ADEME, 2014; INRA, 2002). L'absence de travail du sol dans ces systèmes va aussi permettre une stabilisation de la matière organique par la formation d'agrégats qui la protège (INRA, 2002). Les prairies contiennent environ 20% du stock de carbone des sols mondiaux (Rumpel, 2011).

Les cultures sont des écosystèmes pouvant présenter des phases de sol nu et de labour ce qui va entraîner un stockage du carbone plus faible compris entre 45 et 50 t C ha⁻¹. Les vignes et les vergers sont des systèmes où les restitutions de matière organique au sol sont faibles mais selon la couverture du sol ou non, ils vont stocker entre 32 et 50 t C ha⁻¹ (ADEME, 2014; INRA, 2002).

Changement d'utilisation des terres et perturbation de l'équilibre

Le changement d'utilisation des terres va perturber l'équilibre de l'écosystème et donc modifier le bilan apport de MOS et les émissions de CO₂ permettant de stocker du carbone dans le sol. De ce fait, la conversion des sols forestiers et prairiaux riches en carbone en terres cultivées avec des capacités de stockage de carbone plus faibles va engendrer un déstockage du carbone du sol par minéralisation pouvant atteindre 1 t C ha⁻¹ an⁻¹ jusqu'à un état stable. Le processus inverse de stockage de carbone dans les sols est possible mais plus lent avec 0,5 t C ha⁻¹ an⁻¹ durant les 20 premières années (INRA 2002 et Figure 11).

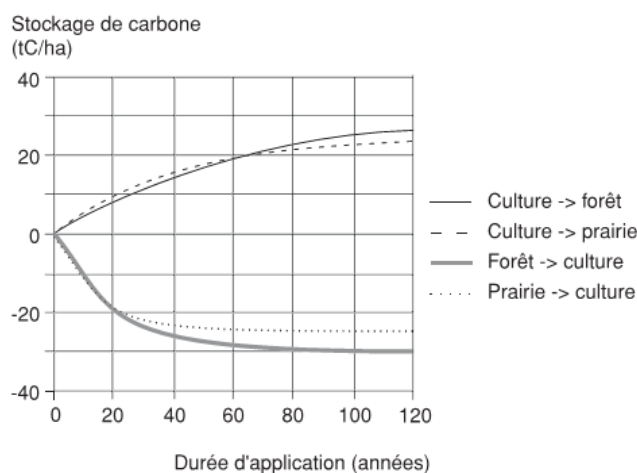


Figure 11. Changement des stocks de carbone du sol par le changement d'utilisation des terres causant le stockage et le déstockage (incertitude $\pm 40\%$). Source : INRA 2002.

2. Prairies temporaires et modes de gestion

a. Définition et intérêts

Les prairies temporaires sont des systèmes avec alternance de phase de culture et phase de prairies, soit une rotation de prairie-culture. Selon la politique agricole commune (PAC), la prairie temporaire (TG) se distingue de la prairie permanente (G) par sa durée, en effet une prairie temporaire est « toute surface en herbe ou tout couvert herbacé équivalent à l'herbe, depuis cinq ans révolus ou moins. » (MAAF, 2016). Par opposition les prairies permanentes se définissent comme « toute surface en herbe [...] depuis cinq années révolues ou plus » (MAAF, 2016).

Les prairies temporaires ont de nombreux intérêts agronomiques et environnementaux, tout particulièrement la capacité de stocker du carbone et améliorer la fertilité du sol (Kuzyakov *et al.*, 2000; Soussana *et al.*, 2004; Lal 2004; Christensen *et al.*, 2009). La conversion d'un sol cultivé en sol prairial peut améliorer les concentrations en carbone du sol de presque 5% (Conant *et al.*, 2001). En effet, elles sont classées par la PAC comme des surfaces d'intérêt écologique à maintenir dans le cadre du « paiement vert » au même titre que les surfaces en légumineuses (MAAF, 2016).

Une couverture permanente du sol peut grandement améliorer les conditions de stockage des MOS de par la réduction de phase de sol nu. Le couvert végétal diminue les pertes de carbone dues à l'érosion et augmente les entrées de litière par la décomposition de plantes implantées (INRA, 2013; Lal, 2004; Post and Kwon, 2000). L'introduction des prairies dans les cycles de cultures présente les mêmes avantages. Sous prairies, le stock des MOS est augmenté et les cycles biogéochimiques carbone, azote, phosphore sont fortement couplés (Lemaire *et al.*, 2015). Aussi l'optimisation de la gestion des prairies est le levier que nous caractériserons dans cette étude. En effet, empiriquement les prairies sont reconnues pour stocker du carbone et réduire les émissions de N₂O (Soussana *et al.*, 2004; INRA 2013). Les mécanismes du sol contrôlant cela sont peu connus et restent à être caractérisés.

Cependant, ces systèmes sont sensibles de par les répétitions d'états transitoires de stockage et déstockage de carbone (Lemaire *et al.*, 2015 et Figure 12). De plus leur capacité à stocker du carbone dépend des modes de gestion tels que le pâturage ou la fauche, le chargement animal, la durée, la fertilisation etc. (INRA, 2013; Lal, 2004).

Dans notre étude nous nous focaliserons sur des prairies fauchées. La gestion de ces systèmes est susceptible d'impacter le stockage de carbone, la composition et les processus de stabilisation des matières organiques dans le sol en modifiant les cycles du carbone, de l'azote et du phosphore

(Conant *et al.*, 2001; Sinsabaugh *et al.*, 2009; Acharya *et al.*, 2012; Lemaire *et al.*, 2015). La gestion va aussi influencer les émissions de N₂O dues à la fertilisation azotée minérale et les émissions de CO₂ dues à la consommation de carburant fossile par le matériel agricole lors des interventions au champ (INRA, 2013).

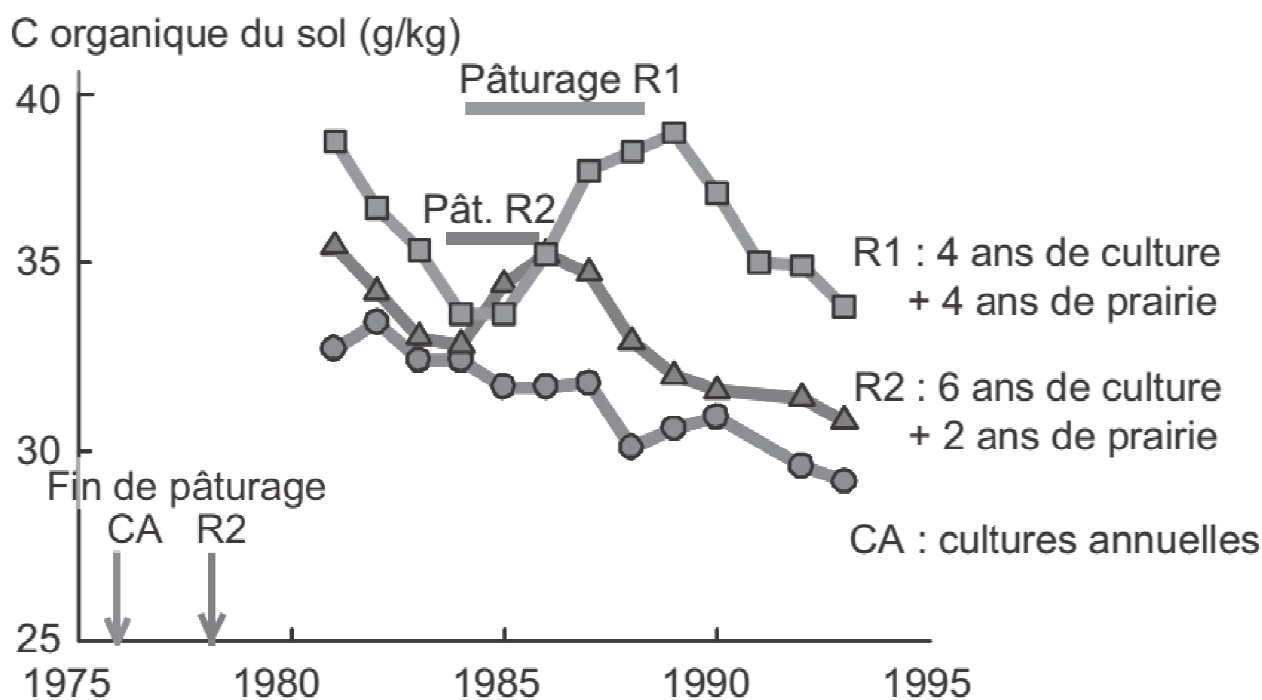


Figure 12. Effets de long terme d'une culture annuelle et de deux prairies temporaires sur le carbone organique du sol d'une expérimentation de long terme en Argentine (d'après STUDDERT *et al.*, 1997)
Source : Chabbi *et al.*, 2015

b. Gestion de la durée de la phase de prairie

« Accroître la durée des prairies temporaires » est une action qui réduit les émissions de CO₂ et N₂O et prolonge la phase de stockage de carbone par la réduction de la fréquence de retournement du sol (Soussana *et al.*, 2010; INRA 2013). Le retournement a pour effet d'activer la minéralisation des MOS par l'augmentation des pores du sol qui va induire une meilleure oxygénation (Attard *et al.*, 2011). La minéralisation du carbone engendre directement des émissions de CO₂ alors que la minéralisation de l'azote cause des émissions de N₂O indirectement par l'augmentation en azote minéral dans le sol.

L'augmentation de l'âge de la prairie semble le mode de gestion le plus important dans la séquestration du carbone de par l'augmentation des apports du système racinaire (Acharya *et al.*,

2012), qui est une composante clef de la séquestration du carbone dans les sols (Soussana *et al.*, 2004; Rasse *et al.*, 2005). Dans le cas d'une prairie fauchée, les parties aériennes étant récoltées, la rhizodéposition est le principal processus dans l'enrichissement du sol en matière organique végétale. L'étude d'Acharya *et al.* (2012) montre que la biomasse racinaire totale d'une prairie est de 0,8 g kg⁻¹ de sol sec après 1 an, pour atteindre 3 g kg⁻¹ de sol sec dans une prairie de 17 ans. Cependant, une prairie âgée de 17 ans va émettre plus de CO₂ qu'une prairie de 4 ans tout en stockant toujours du carbone, alors que celle de 4 ans n'émettra pas plus de CO₂ qu'une prairie de 1 an (Acharya *et al.*, 2012). Ainsi en fonction de leur âge, les prairies ne vont pas présenter les mêmes réponses face au stockage-déstockage du carbone en fonction de l'atteinte d'un équilibre ou encore dans une phase transitoire.

c. Gestion de la fertilisation azotée de la phase de prairie

Les engrais azotés étant source d'émissions de N₂O, la réduction de leur utilisation est un levier pour la réduction des GES des systèmes prairiaux. Or la production de biomasse nécessite une fertilisation minimum qui est elle-même nécessaire au stockage de C (INRA, 2013; Lal, 2004). L'amélioration de la gestion de la fertilisation peut améliorer la concentration en C du sol de 2% (Conant *et al.*, 2001). La question de la fertilisation des prairies est donc très complexe, pour cela elle est développée dans la partie suivante.

IV. *Effets de différents types de fertilisation azotée sur les matières organiques et la fertilité du sol*

1. **Engrais azotés synthétiques**

a. **Un élément clé pour l'agriculture**

L'azote du sol est un facteur limitant pour la production agricole de nombreux sols agricoles et la fertilisation azotée est nécessaire pour augmenter les rendements et soutenir la production alimentaire (IPCC, 2013). Jusqu'à dans les années 1950, ces contributions ont été faites uniquement à partir de produits résiduels organiques tels que les déjections animales, les résidus de récolte, le limon de rivière et la culture d'espèces légumineuses capables de fixer biologiquement l'azote atmosphérique (Crews and Peoples, 2004).

En 1908, Haber et Bosch ont découvert le procédé de production des engrais azotés synthétiques (SNF) basé sur la synthèse d'ammoniac issu de l'azote atmosphérique (Fritz Haber, 1920), en imitant artificiellement la BNF. C'est une réaction catalytique à haute pression qui nécessite beaucoup d'énergie (226 kcal par mole) pour casser la triple liaison très stable de N_2 (Zuberer, 2005).

Depuis lors, les SNF ont été largement utilisés dans l'agriculture et leur consommation a augmenté dans le monde entier pour atteindre 100-136 Tg N an⁻¹ à notre époque (Erisman *et al.*, 2011b; Peñuelas *et al.*, 2012). On estime que l'utilisation des SNF est impliquée dans la production de l'alimentation pour 48% de la population humaine (Erisman *et al.*, 2008).

b. **Source de pollution de l'environnement**

Il existe plusieurs problèmes liés à l'utilisation massive des SNF. En effet, seulement 17% de l'azote des SNF utilisés dans l'agriculture mondiale sont consommés par les humains dans les aliments (Braun, 2007). Les SNF appliqués ne sont pas entièrement consommés par les plantes et une partie est perdue sous forme soluble ou gazeuse. Ces surplus peuvent acidifier le sol, générer des pollutions de l'eau et de l'atmosphère avec un impact négatif sur la santé humaine et de l'environnement (Crews and Peoples 2004; Erisman *et al.*, 2011a). En France, les excédents sont estimés en 2010 à 0,9 Gg d'azote, sur une consommation nette de 1,9 Gg de SNF minéraux et 1,3 Gg

d'engrais organiques. Cela correspond à une moyenne de 32 kg ha⁻¹ de la superficie agricole (Snoubra, 2013). L'utilisation des SNF génère des émissions de N₂O qui ont été estimées à 2,5% des doses appliquées (Davidson, 2009) représentant environ 2,5 Tg an⁻¹ à l'échelle mondiale (Erisman *et al.*, 2008). De plus pour des cultures annuelles classiques, l'utilisation de SNF consomme 40 à 65% de l'énergie fossile utilisée dans ces systèmes par la synthèse des SNF et l'utilisation des machines lors de leur application (CGDD, 2010; INRA, 2002).

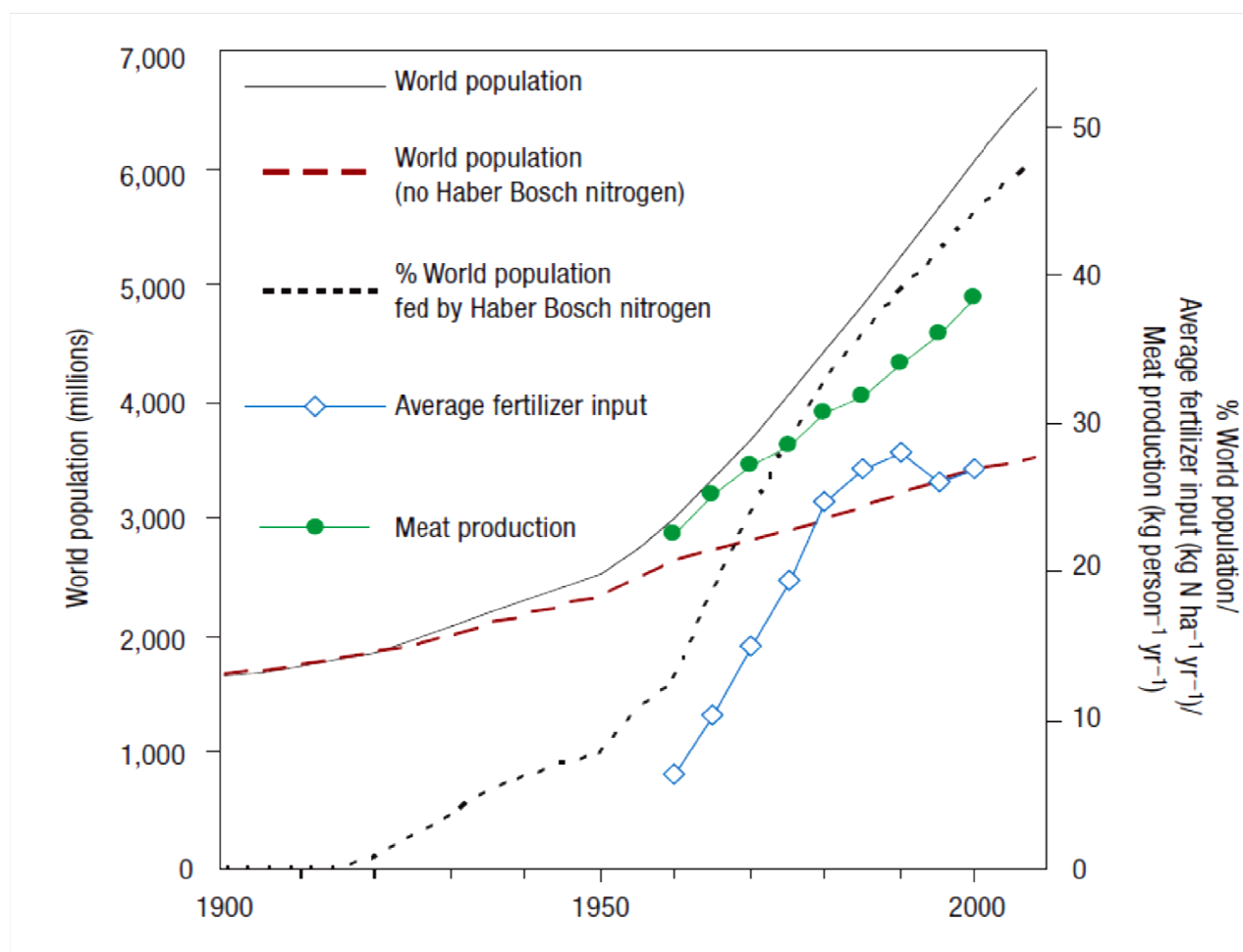


Figure 13. Evolution de la population humaine et de l'utilisation de l'azote durant le vingtième siècle. Source : Erisman *et al.*, 2008.

2. Les légumineuses comme source d'azote.

La réduction de l'utilisation des SNF est une priorité scientifique et politique depuis plusieurs années (Hardy and Havelka, 1975) tel que le montre la mise en place à l'échelle européenne de la « directive nitrates » (1991/676/CEE) ou encore la « directive cadre sur l'eau » (2000/60/CE). Le retour à la culture des légumineuses peut être une solution en agriculture fourragère pour abaisser

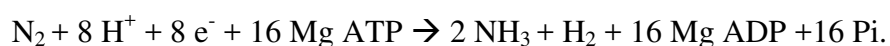
l'impact de la fertilisation azotée sur l'environnement (Crews and Peoples 2004; Soussana *et al.*, 2010; Fustec *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2012; IPCC 2013). C'est dans ce sens que l'Institut National français de la Recherche Agronomique (INRA) propose dans une étude nationale d'«accroître la part de légumineuses en grande culture et dans les prairies temporaires, pour réduire les émissions de N₂O » (INRA, 2013).

a. La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote (BNF) est le deuxième processus biologique le plus important après la photosynthèse. Ce processus est au cycle de l'azote ce que la photosynthèse est au cycle du carbone : la seule entrée dans l'écosystème.

La BNF est réalisée uniquement par des procaryotes, comprenant de nombreux types de bactéries, quelques actinomycètes (notamment *Frankia*) et des cyanobactéries. Ces microorganismes existent sous formes libres ou en association avec des plantes, des animaux ou d'autres microorganismes (Zuberer, 2005).

La BNF par les légumineuses est possible grâce à leur symbiose avec des bactéries. Une symbiose est une association entre deux organismes, bénéfiques pour les deux. Dans le cas des légumineuses, la symbiose implique un procaryote fixateur de N₂ et un eucaryote autotrophe, dans cette étude *Rhizobium meliloti* et *Medicago sativa*. Ces symbioses impliquent le développement d'une structure spéciale de la plante au niveau des racines pour accueillir le partenaire microbien : la nodosité (Graham, 2005). Dans les nodosités de racine de légumineuses, les bactéries fixatrices de N₂ bénéficient des apports de C photosynthétisé par la plante et rend l'azote disponible pour la plante sous forme minérale. Ils réduisent le N₂ atmosphérique en NH₃ puis NH₄⁺, en utilisant l'énergie de l'oxydation des glucides (Butterbach-Bahl *et al.*, 2011). La réaction de réduction du N₂ atmosphérique en deux molécules de NH₃ est due au complexe enzymatique nitrogénase constitué de deux protéines, la dinitrogénase (protéine fer-molybdène) et de la dinitrogénase réductase (protéine de fer) (Gordon A. J., 1992; Zuberer, 2005):



Chaque jour, le métabolisme des nodosités utilise 40-50% de la production photosynthétique, principalement sous forme de saccharose ce qui se traduit par autant de CO₂ respiré (Gordon A. J., 1992). Ainsi la BNF symbiotique est un processus clé dans les systèmes agricoles, qui impacte les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et aussi du phosphore.

b. La culture des légumineuses

La production de légumineuses a fortement diminué en France et elle est passée de 3,5 millions ha en 1959 à 0,5 millions ha en 2007. Ceci est le résultat d'une réduction de la diversité dans les systèmes agricoles et l'utilisation accrue de SNF. Dans l'agriculture, les légumineuses riches en protéines sont utilisées sous forme de grain pour l'alimentation humaine (haricot, fève) ou animale (pois, féverole, lupin) et sous forme de foin pour les fourragères (luzerne, trèfle)(CGDD, 2010).

c. La luzerne : la reine des fourrages

De son nom scientifique *Medicago sativa* L., la luzerne est utilisée dans l'agriculture depuis plus de 2000 ans (Rebischung and Daget, 1968) et étymologiquement alfalfa signifie « la fourrage des fourrages » (Pfitzenmeyer, 1963), connue aussi sous le nom de « reine des fourrages ». *Medicago sativa* provenant des hauts plateaux iraniens est une espèce particulièrement adaptée à la sécheresse estivale, en particulier grâce à ses racines pivotantes qui peuvent dépasser 10 m de profondeur (Pfitzenmeyer 1963). Sa variabilité génétique élevée confère un certain nombre de caractéristiques agronomiquement intéressantes. Elle est cultivée à presque toutes les latitudes et adaptée à de nombreux sols sauf ceux qui ont une forte acidité ou une forte humidité (Pfitzenmeyer, 1963).



Figure 14. Photographie de *Medicago sativa* L. Source: www.fao.org; by Dr. M. Halling.

La luzerne est une plante vivace avec une implantation durable de 3 à 5 ans (CGDD, 2010). Elle fixe de grandes quantités d'azote au cours de sa phase de croissance pouvant atteindre 300 à 400 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (Kelner *et al.*, 1997; Carlsson and Huss-Danell, 2003; Angus and Peoples 2012; Lemaire *et al.*, 2015) soit jusqu'à 90% de leur azote (Louarn *et al.*, 2015). Sa popularité est due à sa résistance à de fortes sécheresses (Sanaullah *et al.*, 2011b; Annicchiarico *et al.*, 2015) et sa productivité de biomasse élevée d'environ 60 t ha⁻¹, qui peut atteindre 80 à 100 t ha⁻¹ dans de bonnes conditions (Rebischung and Daget, 1968).

3. Les avantages environnementaux des légumineuses

L'utilisation de légumineuses en agriculture présente des avantages environnementaux multiples. Elles fournissent des habitats et de la nourriture pour la faune auxiliaire, y compris des insectes pollinisateurs. Leur introduction permet la diversification des cultures et ainsi brise les cycles de vie des parasites permettant de réduire l'utilisation des pesticides. La disponibilité directe de l'azote fixé dans les racines minimise les pertes d'azote (Crews and Peoples, 2004; Graham, 2005) et réduit le risque de pollution par lixiviation de NO₃⁻, volatilisation de NH₃ et émissions de N₂O (Crews and Peoples, 2004; IPCC, 2013).

Les légumineuses fourragères ont un impact favorable sur le sol en raison des résidus organiques du système racinaire profond. Leur introduction dans les systèmes agricoles permet d'augmenter la teneur du sol en azote par le dépôt de résidus riches en azote et l'exsudation racinaire (Fustec *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2012; Schipanski and Drinkwater 2012) qui favorisent le développement de la microfaune et de la microflore du sol (Milcu *et al.*, 2008; CGDD 2010). La présence de légumineuses peut améliorer les propriétés physiques du sol telles que la stabilité des agrégats (Angers *et al.*, 1999).

La production des légumineuses fourragères est soutenue par l'Union Européenne à travers le premier pilier de la politique agricole commune (2009/73/CE) avec une aide comprise entre 100 et 150€/ha selon les surfaces de culture (CGDD, 2010).

a. Les légumineuses et la qualité du sol

Les stocks de nutriments et le carbone du sol sont des indicateurs de la durabilité des systèmes de production agricole (Bell *et al.*, 2012). La formation des MOS et les formes de macronutriments dans le sol peuvent être influencées par la composition spécifique de la prairie

(Acharya *et al.*, 2012; Rumpel *et al.*, 2015). La dynamique de la MOS est contrôlée par la quantité et la qualité de la matière organique retournée au sol par les résidus de culture. Avec l'utilisation de la luzerne dans les systèmes de culture, la BNF peut agir comme une source durable de l'azote dans le sol et peut compléter ou remplacer l'ajout de SNF et améliorer la production végétale (Carlsson and Huss-Danell 2003; Fustec *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2012; Lemaire *et al.*, 2015). Cet effet bénéfique est visible pour la culture associée et même lors de rotation pouvant apporter entre 100 et 200 kg N minéral pour la prochaine culture (Rasmussen *et al.*, 1998; Lemaire *et al.*, 2015). Avec ses racines profondes, la luzerne peut aussi améliorer la structure et la perméabilité du sol, la diffusion du N₂ et l'activité biologique (Lemaire *et al.*, 2015).

Le transfert de l'azote des légumineuses au sol se fait principalement après la mort de la plante par retour des résidus de feuilles et de racines mais aussi pendant la vie végétale par rhizodéposition. L'azote dérivant de la rhizodéposition (en pourcentage de l'azote de la plante mature) varie de 7 à 57%. Dans le cas des prairies fauchées, la rhizodéposition (exsudation racinaire et résidus de racine) est la principale source en matière organique pour le sol. Dans les prairies de luzerne, 3 à 4,5% de l'azote fixé est libéré sous forme de composés solubles mais les racines et les nodules sénescents semblent être la principale source d'azote dans le sol, d'autant plus que la rhizodéposition augmente avec l'âge de la plante (Fustec *et al.*, 2010). Dans le sol des prairies, la rhizodéposition est un précurseur important des stocks de MOS (Rasse *et al.*, 2005) et alimente les cycle biogéochimique carbone, azote et phosphore.

b. Les légumineuses et le phosphore du sol

Même si les légumineuses sont capables de compenser l'absence d'azote dans le sol par la BNF, la disponibilité en phosphore semble limiter leur croissance (Roscher *et al.*, 2011). Les plantes impliquées dans la BNF ont généralement une plus forte demande de phosphore que celles cultivées avec une fertilisation minérale (Robson *et al.*, 1981b). De par les mécanismes biochimiques de la BNF avec une exigence en adénosine triphosphate plus élevées pour le fonctionnement de la nitrogénase (Ribet et Drevon 1996; Al-Niemi et al 1997), les légumineuses nécessitent plus de phosphore et présentent une concentration plus élevée en phosphore par rapport aux autres plantes (Smith 1992; Crews 1996; Graham 2005; Roscher *et al.*, 2011; Peñuelas *et al.*, 2012). Par conséquent, les légumineuses limitées en éléments nutritifs comme le phosphore, le molybdène ou le fer ont une capacité réduite à fixer le N₂ (Graham, 2005). Toutefois de nombreuses études ont montré qu'une forte fertilisation inhibe la BNF (Carlsson and Huss-Danell 2003; Rasmussen *et al.*, 2012). Les quantités d'acide phosphorique absorbées par la luzerne varient avec la texture et le pH du sol.

Un sol limoneux demande un plus grand apport de phosphore qu'un sol sableux (MacLean and Cook, 1955) et la consommation de phosphore par la luzerne augmente lorsque les sols acides sont chaulés (Pfitzenmeyer, 1963). La température et l'âge de la plante augmentent également l'absorption du phosphore par la luzerne (Pfitzenmeyer, 1963).

La luzerne est particulièrement connue pour épuiser le phosphore Olsen du sol (Bell *et al.*, 2012) défini comme le phosphore biodisponible pour la plante (Olsen, 1954) mais aussi d'autres formes de phosphore inorganique (IP) (Crews, 1996). Concernant les formes organiques du phosphore (OP), l'effet de la luzerne varie en fonction des études. D'après Daroub (2001) le OP du sol semble sous forme plus disponible après 4 années de culture luzerne. Mais Crews (1996) n'a pas montré d'effet sur OP total lorsque la luzerne a été cultivée en culture intermédiaire. Cependant sous luzerne la concentration en OP semble être corrélée à la concentration en carbone dans le sol (Daroub *et al.*, 2001) ce qui permet de penser qu'il y a un effet important sur la formation de MOS (Kirkby *et al.*, 2011).

Le processus de BNF illustre l'équilibre biogéochimique entre les cycles du carbone, de l'azote et du phosphore. La capacité de stockage du carbone du sol des agrosystèmes peut être limitée par l'azote et le phosphore (Peñuelas *et al.*, 2012). Dans le contexte de la rareté du phosphore et le coût élevé de la SNF, la compréhension des liens entre les cycles du carbone, de l'azote et le phosphore est une priorité environnementale et économique.

c. Les associations légumineuses et graminées

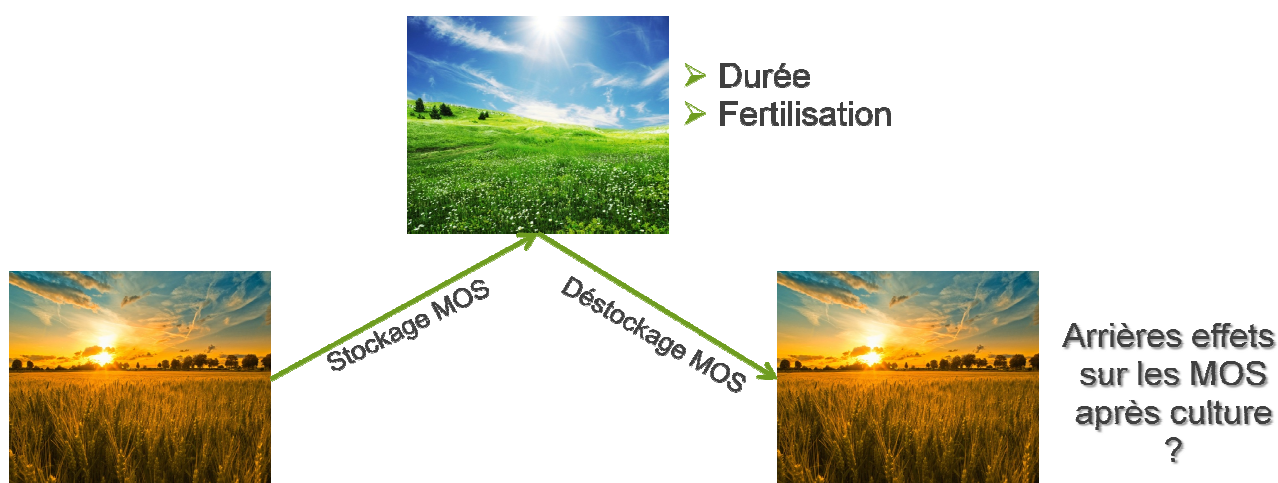
En combinant les graminées avec des légumineuses dans les systèmes fourragers, la BNF est plus efficace avec 9 à 18% d'azote fixé en plus que dans les monocultures de légumineuses (Nyfeler *et al.*, 2011; Schipanski and Drinkwater 2012) conduisant à la hausse les rendements fourragers (Rasmussen *et al.*, 2012; Schipanski and Drinkwater 2012). Cela se traduit par un stockage plus élevé d'azote et de carbone et une amélioration de la dynamique des MOS dans le mélange légumineuse-graminée par rapport aux monocultures de légumineuses (Paustian *et al.*, 1990; Fustec *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2012; Schipanski and Drinkwater 2012; Bell *et al.*, 2012). Ceci est dû à la compétition entre les plantes (Carlsson and Huss-Danell 2003; Rasmussen *et al.*, 2012) ou la facilitation (Schipanski and Drinkwater, 2012) définie en écologie comme la présence d'une ou plusieurs espèces améliorant la vie d'une autre espèce. Cette facilitation dans les associations peut être due aux différences de période de croissance des espèces de plantes, d'architecture des racines et de la capacité d'absorption de l'azote (Schipanski and Drinkwater, 2012).

Bien que l'introduction des légumineuses dans les systèmes fourragers présente des effets forts sur le couplage des cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du phosphore, leur effet sur la quantité et la qualité des MOS est peu connu.

V. *Problématique et questions scientifiques*

Ce travail de recherche a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de stockage et de déstockage du carbone dans les sols sous prairies temporaires à travers les changements de la nature des matières organiques. En particulier, nous avons étudié des sols sous prairies temporaires soumis à des modes de gestion différents des prairies pour mieux comprendre les flux de GES de ces systèmes. Pour démontrer ces effets nous avons subdivisé notre étude en 3 parties.

La première partie montre les arrières effets de différents modes de gestion des prairies temporaires sur la concentration, la composition et les processus de stabilisation des matières organiques des sols. Pour les étudier nous avons utilisé le système d'observation et d'expérimentation sur le long terme pour la recherche en environnement - agroécosystème, cycle biogéochimique et biodiversité (SOERE-ACBB). Les modes de gestion étudiés sont la durée de la prairie et la fertilisation azotée pendant la phase de prairie. Pour étudier l'arrière effet sur les propriétés de matières organiques du sol nous nous focalisons sur la fin d'une phase de culture.



Ainsi nous émettons l'hypothèse que l'introduction et la gestion des prairies temporaires dans les cycles de cultures pourraient avoir des arrières effets en termes de quantité et qualité des MOS ainsi que le fonctionnement microbien des sols. Pour étayer notre hypothèse nous cherchons à répondre à certaines questions :

- Qu'elles sont les caractéristiques types des MOS sensibles aux différences entre les sols sous cultures et sous prairies ?

- Y a-t-il un arrière effet observable après 3 ans de culture de l'introduction de prairie dans le cycle de rotation prairie-culture sur :
 - les stocks de carbone du sol, sa répartition dans les fractions du sol, sa signature moléculaire ;
 - la biomasse microbienne, son activité, son potentiel de minéralisation du carbone et de l'azote ;
 - le bilan carbone ?
- Quels sont les impacts de la durée de la phase de prairie sur ces arrière effets ?
- Quels sont les impacts de la présence ou l'absence de la fertilisation minérale azotée de la phase de prairie sur la réponse aux différents paramètres étudiés ? Est-elle nécessaire au stockage du carbone ?
- Quel est le bilan carbone des émissions de GES des prairies temporaires et de leurs différentes gestions ?

Les parties suivantes se focalisent sur la gestion de la fertilisation azotée des prairies en étudiant la réponse des MOS de prairies soumises à deux types de fertilisation azotée : BNF et SNF. Pour étudier les modalités de fertilisation, nous avons utilisé un essai expérimental appelé « association 2008 » situé au même endroit que le SOERE ACBB. Les deux parties traitent l'effet du remplacement de la fertilisation azotée par l'introduction de légumineuses dans des prairies semées.

Dans la seconde partie nous avons mis en évidence l'efficacité des associations légumineuse-graminée en terme de rendement fourrager et l'effet de ces systèmes sur la fertilité des sols par la caractérisation du carbone, de l'azote et surtout des formes de phosphore. Notre hypothèse a été que les paramètres du sol pourraient avoir des réponses contrastées sous des systèmes fourragers avec des communautés végétales différentes (monoculture de graminées, de légumineuse et associations légumineuse-graminées). Pour appuyer notre hypothèse nous cherchons à répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que la BNF peut remplacer les SNF dans des systèmes fourragers et maintenir des rendements similaires ?
- Quels sont les impacts de la BNF et les SNF sur les formes de nutriments dans les sols sous différentes communautés végétales ?
- Les quantités et les formes de phosphore du sol sont-elles impactées par le type de fertilisation (SNF et BNF) et par l'espèce de graminée utilisée pour l'association ?

La troisième et dernière partie de cette étude se concentre sur la quantité du carbone du sol des associations légumineuse-graminées et la signature moléculaire des sols et des racines. Notre hypothèse a été que la quantité et la nature des MOS sont impactées sous différentes communautés végétales dues à des apports racinaires spécifiques en ce qui concerne la quantité et la qualité. Pour corroborer notre hypothèse nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Quelle est la nature biochimique du carbone des racines extraites du sol des associations légumineuse-graminées et des monocultures de légumineuse et de graminées ?
- La signature moléculaire du sol est-elle impactée par les différentes espèces végétales cultivées en association et en monoculture ? La présence de légumineuse change t-elle les stocks de carbone et la signature des matières organiques stockées dans le sol ?

MATERIEL ET METHODES

I. *Study sites*

1. **SOERE ACBB**

a. Site description

The experimental site is the long term observatory on environmental research: agrosystems biogeochemical cycles and biodiversity (SOERE ACBB) situated at the INRA research station in Lusignan (46°25'12.91" N; 0°07'29.35" E), western France (Figure 15).



Figure 15. Photography of Lusignan temporary grassland site of SOERE ACBB. Source: soere-acbb.com

The mean annual temperature is 12°C and the mean annual precipitation is around 750 mm. The experiment was established in 2005 on a Cambisol with a loamy-clay texture and a bulk density of 1.43 g m⁻³ (Chabbi *et al.*, 2009; Moni *et al.*, 2010). At this site, ley grassland was established in the cropping cycle with 5 different treatments differentiated by fertilization and duration of grassland phase (Table 1): (1) TG3N+ was 3 years of fertilized ley, (2) TG6N+ was a 6 year fertilised ley and TG6N- is a 6 years ley without fertilization and as control there were one treatment of permanent cropland (Cr) with maize-wheat-barley rotation and one other with permanent grassland (G). Treatments were replicated 4 times in 4 separated blocs.

The species sown for Cr in April 2005 was *Zea mays* L. (maize) cultivar Texxud with a density of 85 000 grains ha⁻¹. In October 2005 *Triticum aestivum* L. (wheat) cultivar Caphorn was sown with density of 150 grains m⁻². In October 2006 *Hordeum vulgare* L. (barley) cultivar Vanessa was sown with density of 165 grains m⁻². This crop rotation of 3 years was repeated, when the soil was under permanent cropland (Cr). For ley grassland, this crop rotation was alternated with grassland phases (TG). Concerning grassland, the grasses mixture multispecies sown was *Dactylis glomerata* L. (cocksfoot) cultivar Ludac with a density of 12 kg ha⁻¹, *Festuca arundinacea* Schreb (tall fescue) cultivar Soni with a density of 10 kg ha⁻¹ and *Lolium perenne* L. (rye-grass) cultivar Milca with a density of 5 kg ha⁻¹.

Fertilization varied with years and ranged between 36 and 160 kg N ha⁻¹ year⁻¹ for cropland, between 170 and 380 kg N ha⁻¹ year⁻¹ for fertilized grassland phases. Unfertilized grassland received between 0 to 30 kg N ha⁻¹ year⁻¹.

Before the beginning of the experiment total surface had homogenized by 3 years of cropland (barley, barley and triticale).

Table 1. Experimental plan of SOERE ACBB for studied treatment and date of sampling (march 2014).

		2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Cr	Cropland	Maize	Wheat	Barley	Maize	Wheat	Barley	Maize	Wheat	Barley	Maize
TG3N+	TG fertilized, 3 years	Maize	Wheat	Barley	Grassland	N +		Maize	Wheat	Barley	
TG6N+	TG fertilized, 6 years				Grassland	N +		Maize	Wheat	Barley	
TG6N-	TG unfertilized, 6 years				Grassland	N -		Maize	Wheat	Barley	
G	Permanent grassland				Grassland	N +					

b. Soil sampling

The first ten centimeters of soil were sampled in March 2014, nine years after implantation of the experiment. All treatments except permanent grassland were at the end of one cropland rotation. For each treatment, we sampled 2 cores of 10 cm depth from each of the 4 blocs, one disturbed with manual auger and one undisturbed with PVC cylinder of 4 cm diameter. The soil samples were air-dried and sieved at 2mm and an aliquot grounded for chemical analysis. Fresh samples were used for biological analysis.

2. Association 2008 experiment

a. Site description

The experimental site is situated at the INRA research station in Lusignan (46°25'12.91" N; 0°07'29.35" E), western France. Mean annual temperature is 12°C and mean annual precipitation is around 750 mm. The experiment was established in 2008 on a Cambisol with a loamy-clay texture (Chabbi *et al.*, 2009; Moni *et al.*, 2010) and a bulk density of 1.43 g cm⁻³. The bulk density did not vary between treatments after the installation of the experiment. General soil parameters are presented in Table 2. This soil was sown at the end of summer 2008 with three species in monoculture or in mixture, including the following treatments: three monocultures of lucerne (*Medicago sativa* L., cultivar *Harpe*), cocksfoot (*Dactylis glomerata* L., cv *Accord*) and tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb, cv *Noria*) and two legume-grass mixtures (50:50) composed of cocksfoot/lucerne (*D. glomerata*/*M. sativa*) and tall fescue/lucerne (*F. arundinacea*/*M. sativa*). The plots were sown at a total seed rate of 25 kg ha⁻¹. Grass-lucerne mixtures were sown at a seed rate of 12.5 kg ha⁻¹ per species. The treatments were established on 2.5 m x 5 m plots and arranged in four blocks. In the plots without lucerne, synthetic nitrogen fertilizer (NH₄NO₃) was applied at a rate of 165 kg ha⁻¹ year⁻¹. The same phosphate and potassium fertilization rates were applied to all plots corresponding to 40 and 100 kg ha⁻¹ yr⁻¹ for P and K respectively. The plots had been previously cultivated with maize during the year 2007 and with wheat from winter 2007 to July 2008.



Figure 16. Photography of “association 2008” experiment. © Crème.

b. Sampling

Forage

Grasses were mowed 4 times per year between May and November. The forage biomass was collected on 7.5 m², and weighed after drying at 60°C. In 2012, an aliquot was ground for elemental analyses. The proportion of grass and lucerne in forage mixtures was evaluated by near infra-red spectroscopy (Petersen *et al.*, 1987). Nitrogen fixation was estimated using the theoretical nitrogen content of lucerne (Lemaire *et al.*, 1985), its contribution to aboveground biomass as well as the % of its nitrogen derived from atmospheric nitrogen (Ndfa). Ndfa ranged from 0.65 for pure legume to 0.80 when legume was associated to graminaceous species. These values had been determined with the plants $\delta^{15}\text{N}$ signature for lucerne grown as monoculture or in mixture with graminaceous species using another trial on an adjacent field at the same site, with lucerne monocultures and grass-lucerne mixtures grown under similar conditions (mowing, no mineral fertilization (Louarn *et al.*, 2015)). We consider the error associated to our estimates is minimal and similar for all treatments.

Soil

For soil analyses, we sampled the first 30 cm of 3 out of 4 blocks in March 2013, 4.5 years after implantation of the experiment, with a mechanical auger (7cmØ, 30cm). For each treatment, we sampled 2 cores from each of the 15 plots. The soil samples were air-dried and sieved at 2 mm and an aliquot was ground for elemental analyses.

Three additional cores (5cmØ, 30cm) were taken in July 2013 from each block to determine bulk density as ratio of the mass of oven-dried soil (105°C) to the bulk volume of soil.

c. General soil parameters

General soil parameters (Table 2) were determined at the INRA analytical laboratory in Arras: soil pH was measured after suspension of soil in water (1:5 weight/volume). Conductivity was measured in the same soil water extract at 25°C. Cation exchange capacity (CEC) was determined after extraction of soil with a 50 mM cobalt hexamine chloride solution. Exchangeable Mg was measured by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy and exchangeable Na by atomic adsorption spectroscopy.

Inorganic nitrogen (IN) was determined colorimetrically as the sum of nitrate-N and ammonium-N after extraction of soil with a 0.5 M KCl solution (1:5 weight/volume). Plant available phosphorus (Olsen P) was determined colorimetrically after extraction with a 0.5 M NaHCO₃ solution at pH 8.5 (1:20 weight/volume) (Olsen, 1954)

Table 2. pH, conductivity, cation exchange capacity (CEC) and exchangeable Mg (CEC Mg) as well as sodium (CEC Na) in soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) monocultures and their mixtures (DM and FM). Data are presented as mean of 3 replicates.

	pH	Conductivity mS cm ⁻¹	CEC cmol+ kg ⁻¹	CEC Mg cmol+ kg ⁻¹	CEC Na cmol+ kg ⁻¹
M	6.68 ^{ab}	0.046 ^a	7.47 ^a	0.752 ^{ab}	0.029 ^{ab}
F	6.76 ^a	0.046 ^a	7.89 ^a	0.708 ^b	0.025 ^{bc}
FM	6.65 ^{ab}	0.045 ^a	7.90 ^a	0.812 ^a	0.027 ^{abc}
D	6.62 ^{ab}	0.046 ^a	7.64 ^a	0.694 ^b	0.024 ^c
DM	6.59 ^b	0.047 ^a	7.70 ^a	0.726 ^{ab}	0.030 ^a

^{abc} Different letters indicate significant differences between treatments

II. *Methods*

1. Physical analyses

a. Soil humidity

The soil humidity was determined after drying of fresh soil. Briefly, 5 g of moist soil were weighed (M_m), dried at 105 °C for 48 hours and weighed again (M_d).

The mass humidity (θ) was determined as follows: $\theta = \frac{M_m - M_d}{M_d}$.

b. Soil bulk density and carbon stock

Soil carbon stock ($t\ ha^{-1}$) was determined by multiplication of the carbon soil concentration ($mg\ g^{-1}$) with the depth of the layer p (cm) and the soil bulk density d ($g\ cm^{-3}$). Therefore, *soil C stock* = $C \cdot p \cdot d$ (Mathieu and Pieltain, 1998).

The soil bulk density was the weight of the solid phase (M_s , dried soil at 105°C) on cylinder total volume (V) of sampled soil : $d = M_s/V$ (Mathieu and Pieltain, 1998).

2. Chemical analyses

a. Soil organic matter analyses

Total carbon and nitrogen contents of plant and soil samples were determined using an elementary analyzer (Flash EA, Thermo Electron Corporation, Bremen, Germany). No carbonate was present in the soil, therefore soil carbon is considered to be exclusively organic. Soil organic nitrogen (ON) was calculated as difference between total nitrogen and IN content.

Total soil phosphorus (P) was determined with the ignition method (Walker and Adams, 1958) using the modifications introduced by Ivanoff *et al.*, (1998). Briefly 0.5 g of dry soil was ignited for 1 h at 550°C before extraction during 24 h by shaking with sulphuric acid (H_2SO_4) for total phosphorus extraction. A second replicate of 0.5 g of dry soil was only extracted with 30 mL of 1 M H_2SO_4 for 24 hours for inorganic phosphorus (IP) determination. The suspensions were centrifuged at 17000 g for 10 min and the supernatants analyzed. The orthophosphate content in each

extract was measured as acid molybdenum complex colorimetrically with detection at 880 nm (Murphy and Riley, 1962). The organic phosphorus (OP) content was determined by difference.

b. Lignin

Lignin content of bulk soils was determined after alkaline cupric oxide (CuO) oxidation (Hedges and Ertel, 1982; Kogel and Bochter, 1985) and quantification of the released monomers by gas chromatography. Briefly, oxidation was carried out with CuO under high temperature (172°C) and alkaline conditions (2 M NaOH) using 500 mg of soil, 250 mg of CuO, 50 mg of ammonium ferrous hexahydrate and 50 mg of glucose. After cooling the samples, 0.5 mL of the recovery standard Ethylvanillin (60 mg L⁻¹) was added to assess losses during the purification procedure. Thereafter, samples were acidified with 5 M HCl before removal of humic acids by centrifugation (10 minutes at 17000 g) and solid-phase extraction of the phenolic oxidation products using C18 reversed phase columns. The phenols were derivatised with BSTFA and quantified as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography with a HP gas chromatograph (HP GC 6890) equipped with a flame ionization detector and a SGE BPX-5 column (50 m length, 0.25 mm inner diameter, 0.32 µm coating). Samples were injected in split mode (1:10). The GC oven temperature was programmed at 100°C during 2 min, then from 100°C to 172°C with a heating rate of 8°C min⁻¹, from 172 to 184°C at 4°C min⁻¹, and from 184 to 300°C at a rate of 10°C min⁻¹.

The content, origin and state of decomposition of lignin was characterized by this method. The total lignin concentration in the sample is represented by the sum of phenolic oxidation products vanillyl (V), syringyl (S) and p-coumaryl (Co) with their acid (Ac), aldehyde (Al) and ketone side chains. Thus, the concentration of V phenols was the sum of the concentrations of vanillin, acetovanillone and vanillic acid. S phenols concentration was the sum of syringaldehyde, acetosyringone and syringic acid. The Co phenols concentration was estimated as the sum of ferulic and p-coumaric acids. We calculated several ratios using the phenol monomers ((Ac/Al)_V, (Ac/Al)_S, Co/V and S/V ratio) in order to determine the state of degradation and origin of soil lignin.

c. Neutral non cellulosic carbohydrates

Neutral non cellulosic carbohydrates concentration concentrations were determined for bulk soil and fractions. Their concentration in DOC was determined by difference. Monomers of neutral non cellulosic carbohydrates was determined after trifluoric acid hydrolysis by gas chromatography after reduction-acetylation after a method introduced by Rumpel and Dignac (2006) and modified by

Eder et al (2010). The analysis was performed using 500 mg of air-dried and ground soil samples. Hydrolysis was carried out at 105°C for 4 h with 5 mL of 4 M TFA. After cooling the samples, 0.5 mL of the recovery standard methylglucose (3 g L^{-1}) was added and the soil was removed by filtration through glass fiber filters (Whatman GF/C 0.45 μm). After evaporation of TFA using a vacuum speedvac (Thermo scientific, USA), the sugars were re-dissolved in 0.9 μL $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ and the internal standard myo-inositol (1.75 g L^{-1}) was added. Reduction of aldoses to alditols was performed at 40°C for 1 h 30 after addition of 1 mL of sodium borohydride (NaBH_4) in dimethylsulfoxide (20 g L^{-1}). After cooling, acetylation was carried out by addition of 0.2 mL acetic acid. Thereafter, 2 mL of acetic anhydride were added and methylimidazole (0.2 mL) was used as a catalyst of the reaction. After 10 min, the reaction was stopped by addition of 10 mL ice-cold distilled water. The derivatised monosaccharide units were extracted by liquid—liquid extraction using a vortex mixer following addition of 1 mL dichloromethane. The gas chromatographic measurements of the monosaccharides in dichloromethane were performed with a HP GC 6890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector operating in split mode (1:10). Separation of the monosaccharide units was achieved with a 60 m fused silica capillary column (SGE BPX 70, 0.32 mm internal diameter, 0.25 μm film thickness) and the following temperature program: from 200 to 250°C at 8°C min^{-1} and 15 min isothermal at 250°C. Carrier gas was Helium with a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . The injector was kept at 250°C and the detector at 260°C. The concentrations of individual sugars were calculated based on the total ion current of the recovery standard methylglucose and the internal standard myo-inositol. The non cellulosic sugar content of the samples was determined as sum of monosaccharides released: pentoses (C5:xylose, ribose and arabinose), hexoses (C6:glucose, galactose and mannose), and desoxyhexoses (fucose and rhamnose) (Kögel-Knabner, 2002). To determine the plant and microbial origin of soil carbohydrates, the ratios C6/C5 and desoxyC6/C5 were calculated. The decay degree of plant-derived sugars was determined by the ratio of xylose/mannose (Oades, 1984).

3. Fractionations procedures

a. SOM fractionation (physico-chemical)

Fractionation of soil was carried out following a procedure combining physical and chemical methods. This fractionation method was introduced by Zimmermann *et al.*, (2007) and modified by Poeplau *et al.*, (2013). It yields five fractions of soil organic carbon (SOC), suitable to represent

pools of the RothC model. Two fractions, particulate organic matter (POM) and dissolved organic carbon (DOC) represent labile carbon, two fractions (silt and clay (S+C) and sand and stable aggregate (S+A)) are considered as slow pools, and one fraction belongs to the recalcitrant pool (oxidation resistant SOC (rSOC)).

Briefly, 30 g of soil were dispersed in 150 mL of deionized water using an ultrasonic probe with an output calibrated to output energy of 22 J mL^{-1} with a power of 20 W to break down macro-aggregates. The soil suspension was sieved over a $63 \mu\text{m}$ sieve with a minimum of 2 liters of deionized water. The fraction $> 63 \mu\text{m}$ was freeze dried and separated by density fractionation into POM and S+A. For this we added 30 ml of sodium polytungstate solution at a density of 1.8 g cm^{-3} and stirred 1 hour followed by centrifugation for 15 minutes at 1000 g. The floating POM fraction and the submerged S+A fraction were separated and recovered, after vacuum filtration using glass fiber filters (Whatman GF/C $0.45 \mu\text{m}$). They were rinsed with deionized water, freeze dried and grounded. After wet sieving, the suspended fraction $< 63 \mu\text{m}$ was filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ filter with pressure pump at 2 bars. We determined the DOC concentration using a total organic carbon analyzer (TOC 5050A Shimadzu). The solid residue corresponding to the S+C fraction was freeze dried and grounded. The rSOC fraction was determined by sodium hypochlorite oxidation of the S+C fraction. To do so, 4 g of the S+C fraction were suspended in 100 mL of NaOCl 6%, briefly stirred and adjusted to pH 8 with concentrated HCl. The reaction was taking place for 18 hours at 25°C . Thereafter, the solid residue was recovered after centrifugation (15 min at 1000 g), and washed with deionized water. This oxidation procedure was repeated twice and the rSOC fraction was freeze-dried and grounded. All solid residues obtained for POM, S+A, S+C and rSOC were analysed for their carbon and nitrogen concentration with an elemental analyzer (CHN NA 1500, Carlo Erba).

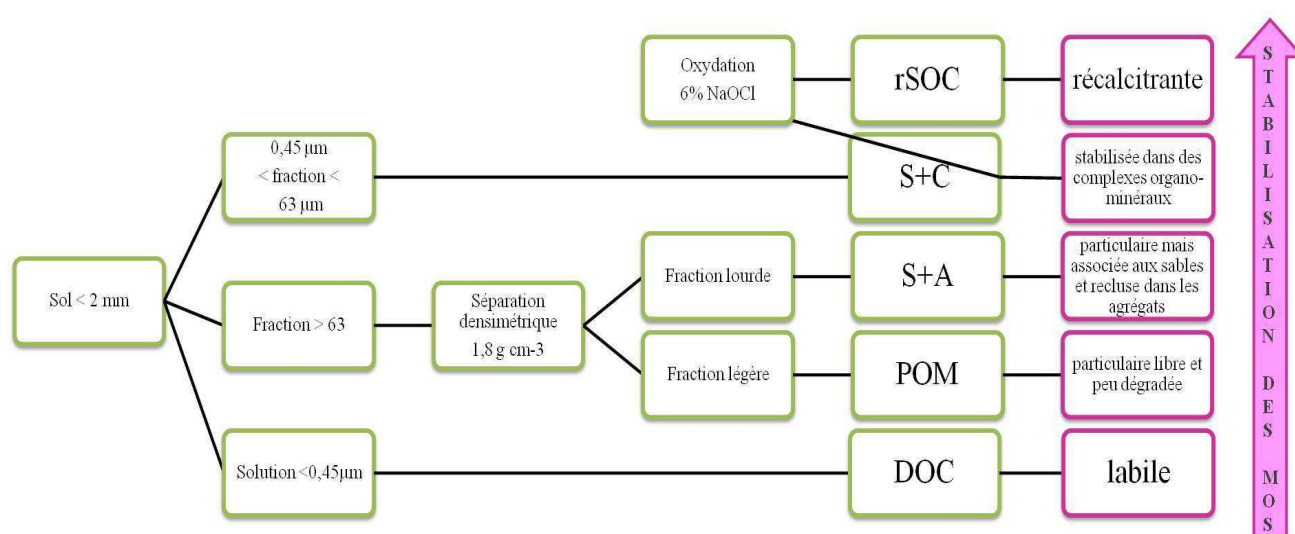


Figure 17. Zimmerman fractionation procedure.

b. Phosphorus fractionation (chemical)

Fractionation of soil phosphorus was carried out with the Hedley method (Hedley *et al.*, 1982) using the modifications introduced by Ivanoff *et al.* (1998). We performed a successive chemical extraction of soil phosphorus from soluble to residual. Briefly 0.5 g of dry soil were extracted sequentially by shaking for 16 hours with 30 mL of (1) distilled water, (2) 0.5 M NaHCO₃ at pH 8.5, (3) 1 M HCl, and (4) 0.1 M NaOH. The suspensions were centrifuged at 17000 g for 10 min and the supernatants analysed for total phosphorus and IP. The residues were dried at 60°C and used for subsequent extractions. Residual phosphorus remaining after extraction step (4) was extracted, after calcination of the residue for 1 h at 550°C, with 1 M sulphuric acid (H₂SO₄) during 24 h.

The chemical fractionation scheme is intended to quantify fractions of different availability. The phosphorus extracted with H₂O is dissolved phosphorus. The NaHCO₃ extractable phosphorus represents IP and OP adsorbed on mineral surfaces. Both fractions are most probably available to microorganisms and plants (Cross and Schlesinger 1995; Ivanoff *et al.*, 1998) and contain phosphates, simple phosphate monoesters, phospholipids and deoxyribose nucleic acid (Turner and Leytem, 2004). The HCl extract contains IP in form of calcium phosphates (Turner and Leytem, 2004) and IP, which is occluded within sesquioxides (Cross and Schlesinger, 1995) but does not contain any OP (Ivanoff *et al.*, 1998). With the NaOH solution, we extracted OP (Ivanoff *et al.*, 1998) and IP associated with Al, Fe and SOM (Turner and Leytem, 2004). Residual phosphorus remaining after the 4 extractions is highly resistant to chemical attack and comprises insoluble OP as well as IP (Cross and Schlesinger 1995; Ivanoff *et al.*, 1998).

The IP content was measured colorimetrically in each extract as acid molybdenum complex with detection at 880 nm (Murphy and Riley, 1962). The total phosphorus concentration was measured with the same methods after digestion with potassium persulfate and sulfuric acid at hot temperature. OP content was determined by difference.

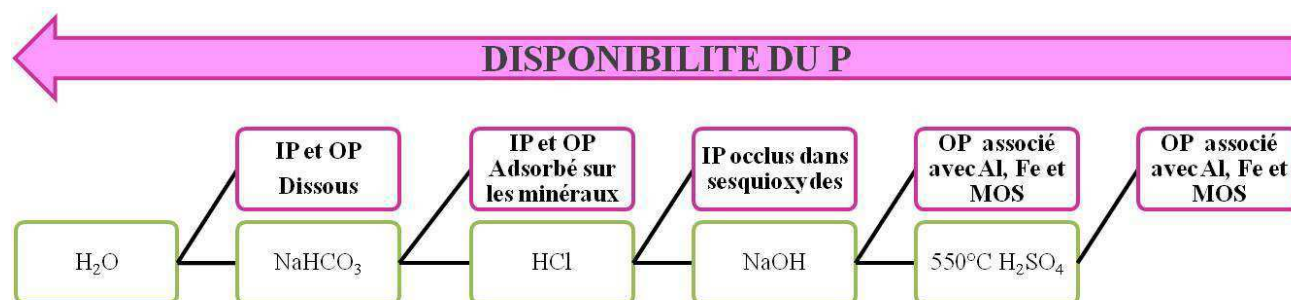


Figure 18. Hedley fractionation procedure.

4. Biological analyses

a. Microbial biomass

Microbial biomass was determined on fresh soil samples by the chloroform fumigation-extraction method (Vance *et al.*, 1987). Briefly, the fumigation-extraction technique is based on fumigation of soil with chloroform (CHCl_3) for 16 hours, which allows lysis of microbial cells. Dissolved carbon and nitrogen were extracted from fumigated soil and an unfumigated control with a 0.03 M K_2SO_4 solution (1:4 weight/volume). The extracts were filtered at 0.7 μm and freeze dried. carbon and nitrogen of the dry extracts were determined with an elemental analyzer (CHN NA 1500, Carlo Erba). Microbial carbon (C_{mic}) and nitrogen (N_{mic}) were calculated as difference between fumigated and non fumigated soil and multiplication by a factor of 2.64 for carbon (Vance *et al.*, 1987) and 1.85 for nitrogen (Brookes *et al.*, 1985).

b. Biolog®

The metabolic activity of microbial communities was analyzed with Biolog® Ecoplates (Biolog Inc., Hayward, CA, USA). This method is used to assay the stability of a microbial population and also to assess the impact of environmental variables. This technique allows to characterize the community-level physiological profiles (CLPP) of soil microbes.

Briefly, this method consists of subjecting soil solution to different substrates, which may be used by microorganism. A microplate of 96 wells prefilled with 31 most used carbon substrates (amines, carbohydrates, complex carbon, carboxylic acids, amino acids, carbon phosphates and polymers) in triplicate and with empty well as control is amended with soil solution. Detection of microbial activity is carried out colorimetrically tetrazolium chloride, which turns from colorless to violet formazan with microbial respiratory activity by C substrate oxidation (Stefanowicz, 2006).

A soil solution was prepared with 10 g of fresh soil and 90 mL of ringer solution $\frac{1}{4}$ diluted and stirring 20 minutes with glass beads. The soil solution was diluted $1:10^{-4}$ by adding distilled water and 150 μL were inoculated into each Biolog® Ecoplates. One microplate was used as control and filled with pure ringer solution $\frac{1}{4}$ diluted. The microplates were incubated 7 days at 20°C and the absorbance was measured at 590 nm with spectrophotometer (Xenius, Safas SA, Monaco) at the days 3, 4, 5, 6 and 7. Absorbance values obtained for each well was corrected for blank with corresponding well of the ringer solution control plate. The mean value of the whole plate was define

as average well color development (Garland and Mills, 1991). To observe increase or decrease of a microbial community response, we choose an average well color development (AWCD) near to the asymptote of color development (Stefanowicz, 2006), thus data for the day near to 0.6.

The change in the pattern of CLPP are represented and compared in PCA of average well color development for each substrate (Garland and Mills, 1991).

To characterize the substrates richness and evenness (degree of use), we calculated the Shannon index with P_i the ratio between optical densities of substrate i and the sum of all substrate optical density in microplate and n number of substrates (Stefanowicz, 2006):

$$Shannon\ index = - \sum_{i=1}^n P_i \ln(P_i)$$

c. Potential mineralization of C and N

The carbon and nitrogen potential mineralization (C_{min} and N_{min}) of soils was determined under controlled conditions. The fresh soil sieved at 4 mm was incubated at field moisture in three replicates of 30 g and one of 50 g for the last step (around 140 g in total) in jars of 1 liter at 20°C for 56 days. All samples were pre-incubated for 2 days under the same condition and the atmosphere was flush with CO₂ free atmosphere at the beginning of the experiment. To avoid anaerobic conditions, the atmosphere was regularly flushed with CO₂ free synthetic air.

The accumulated CO₂ concentration was measured at 0, 1, 3, 7, 10, 14, 21, 28, 42 and 56 days with micro gas chromatograph (Agilent 590). Carbon mineralization was modeled with R (Studio Version 0.98.1062) by first order exponential model of one carbon pool using the following equation:

$$C(t) = C_0(1 - e^{(-kt)})$$

where $C(t)$ is the cumulative amount of carbon mineralized after time t (% C_0), C_0 is the initial amount of organic carbon, t is the incubation time (day) and k is the carbon mineralization constant rate (day⁻¹).

The soil was collected at 7, 14, 28 and 56 days to follow the nitrogen mineralization. The inorganic nitrogen (IN) of each sampled determined several times during incubation was determined on fresh soil as is described below.

5. Calculations

a. Carbon balance

Carbon balance was calculated with the method “Bilan Carbone ®” developed by French agency of environment and energy management (ADEME) to estimate GES emission of diverse activities as productions or company, community, territory and also agriculture (ADEME, 2010).

This method uses emissions factors (EF) which can be estimated by calculating GES emissions such using N fertilization data or land use of cultivated areas. This EF allows converting different variables of the systems to kg equivalent carbon (kg equC) according to global warming potential of each GES. Calculated with molecular weight and stoichiometry 1 kg of CO₂ correspond to 0.273 kgequC (=12/44). The global warming potential is the potential of the GESs to impact the climate for a century with the CO₂ used as reference is equal to 1. For example, the global warming potential of N₂O is 296 (IPCC, 2013) indicating that it is 296 times stronger than CO₂ in terms of global warming in a century and 1 kg of N₂O correspond to 80.7 kg equC (=296*12/44).

To calculate the carbon balance of land use on 1 ha basis we estimated four sources of GES: the production of input (fertilizer and pesticides), the soil N₂O emission due to nitrogen fertilizer application, fuel combustion of agricultural equipments and amortization of agricultural equipment.

The first two parameters were directly calculated with the level of agrochemical applied and their EF determined in function of their characteristics. The GES emitted by production of the fertilizer ammonium nitrate 33.5% was calculated as 1.693 kgequC emitted by kg of nitrogen spread (incertitude 30 %). Afterward it was estimated that the soil N₂O emission due to nitrogen fertilization corresponded to 3.27 % of nitrogen spread. Therefore as seen above, each kg of N₂O emitted correspond to 80.7 kgequC.

For the pesticides, EFs are recapitulated in Table 3 and incertitude for all pesticide was 20%. When we didn't have a specific EF for the molecules applied, we used a mean EF (Table 3).

Concerning the fuel combustion of agricultural equipments and amortization of agricultural equipment we used the estimation by land use with EF of each cultivated area. The fuel combustion was estimated similar for maize, wheat and barley with CO₂ emission of 73 kgequC per ha and of 47 kgequC per ha for grassland. At last the CO₂ emission of agricultural equipment amortization was estimated at 30 kgequC per ha for maize, wheat and barley and 7 kgequC per ha for grassland (ADEME, 2010).

Table 3. Emission factors for pesticides according to (ADEME, 2010).

Active molecule	Emission Factors
	kg _{equC} emitted by kg of active molecule spread
Mean herbicide	2.46
Fluroxypyr	5.97
Glyphosate	4.79
Ioxynil	2.62
Isoproturon	2.92
MCPA	1.27
Mecoprop P	2.36
Mean fungicide	1.65
Fepropimorphe	1.69
Tebuconazole	1.69
Mean insecticide	6.88

6. Statistical analyses

The statistical analyses were carried out with R (Studio Version 0.98.1062). Significance was declared at $p < 0.05$. For the Kruskal-Wallis test we used the package agricolae and for principal component analysis (PCA) the package FactoMineR.

A two-way Anova was used followed by Tukey HSD post hoc test for sugar and lignin data. The first factor accounted for different treatments, while the second factor was the analytical series, which impacted significantly the results.

For all SOERE data (Part I) we test with two ways Anova followed by Tukey HSD post hoc test, the first factor was the treatments and the second factors the field plot.

PARTIE 1. Matières organiques dans les sols sous prairies temporaires : impact de gestion contrastées de la phase prairiale

I. *Introduction*

L'augmentation atmosphérique des gaz à effet de serre (GES) depuis l'époque préindustrielle est la principale cause du changement climatique (IPCC, 2013). Favoriser la séquestration du carbone dans les sols à hauteur de 4 ‰ par an pourrait d'après Balesdent et Arrouays (1999) compenser les émissions de GES à l'échelle de la France. De plus la séquestration du carbone dans le sol améliore sa qualité d'un point de vue agronomique en permettant d'améliorer les rendements avec un impact sur la sécurité alimentaire (Lal, 2004).

Dans la politique agricole commune européenne, l'introduction de prairies temporaires dans les cycles de cultures est encouragée en raison de nombreux intérêts agronomiques et environnementaux, tout particulièrement la capacité de stocker du carbone dans des sols arables et, éventuellement, la réduction des émissions de GES (Bremer *et al.*, 1994; Soussana *et al.*, 2004; Lal 2004). Toutefois, le changement d'utilisation des terres va perturber l'équilibre de l'écosystème et donc modifier le bilan par les apports de matières organiques et les émissions de CO₂. Les conséquences de ces changements sur la quantité, la nature et la dynamique des MOS sont peu connues. En particulier, très peu d'études se sont intéressées aux arrières effets sur les propriétés des MOS induits par des prairies temporaires après plusieurs années de culture.

De plus, la capacité du sol sous prairies fauchées à stocker du carbone dépend des modes de gestion tels que le pâturage ou la fauche, le chargement animal, la durée, la fertilisation etc. (Lal, 2004). Les gestions différentes de ces systèmes sont susceptibles d'impacter la composition et les processus de stabilisation des matières organiques dans le sol en modifiant les cycles du carbone, de l'azote et du phosphore (Conant *et al.*, 2001; Acharya *et al.*, 2012; Lemaire *et al.*, 2015). Ils peuvent également influencer les émissions de GES dues à la fertilisation azotée minérale et la consommation de carburant fossile par le matériel agricole lors des interventions au champ (INRA, 2013, 2002). Dans notre étude nous abordons les arrières effets induits par deux types de gestion des prairies temporaires : la durée et la fertilisation de la phase de prairie.

Les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du phosphore dans le sol sont intimement liés à la nature des entrées de matières organiques du sol, qui peuvent être influencées par les modes de gestion agricole (Kirkby *et al.*, 2013; Rumpel *et al.*, 2015; Lemaire *et al.*, 2015). Pour mieux appréhender les mécanismes de stockage de carbone du sol en fonction de différentes pratiques agricoles, il faudrait comprendre la dynamique des matières organiques du sol, qui peuvent être source mais également puits potentiel de carbone et d'azote. L'amélioration de cette

compréhension passe par l'étude de la nature des MOS et en particulier par l'étude des biomarqueurs.

Afin de déterminer la signature moléculaire des MOS nous avons analysé la quantité et la composition des polysaccharides et des lignines des sols qui de par leur nature contrastée, se comportent différemment quand ils sont ajoutés au sol. Nous avons également utilisé d'autres indicateurs des formes de MOS comme les ratios C/N et C/P car les MOS stabilisées présentent plus d'azote et de phosphore par unité de carbone (Kirkby *et al.*, 2013). Ces différents indicateurs sous forme de ratio peuvent nous apporter des informations sur l'état de dégradation des MOS mais aussi sur la signature initiale des matières organiques apportées au sol (Oades 1984; Kögel 1986; Guggenberger *et al.*, 1994; Bahri *et al.*, 2006). L'arrière effet de la gestion des prairies sur les processus de stabilisation des MOS a été appréhendé par l'analyse de la distribution de carbone et d'azote dans des fractions physico-chimiques. Les émissions des GES des écosystèmes agricoles résultent de l'activité microbienne impliquant les matières organiques du sol (Attard *et al.*, 2011). De plus, le carbone de la biomasse microbienne est un indicateur sensible des propriétés biologiques dues aux changements de mode cultural (Carter, 1991). Dans ce sens nous avons caractérisé le carbone et l'azote de la biomasse microbienne (C_{mic} et N_{mic}), le profil physiologique de la communauté microbienne (CLPP) ainsi que la capacité de minéralisation du carbone et de l'azote du sol, afin de déterminer un arrière effet de la gestion des prairies temporaires sur le fonctionnement microbien, qui peut impacter la nature et la stabilisation des MOS (Cotrufo *et al.*, 2013).

Ainsi nous émettons l'hypothèse que l'introduction et la gestion des prairies temporaires dans les cycles de cultures pourraient avoir des arrières effets en termes de quantité et qualité des MOS et en terme de fonctionnement microbien des sols comme facteur influant la stabilisation des MOS.

II. *Résultats*

1. **Signature du carbone organique du sol**

a. Carbone, azote et phosphore du sol

Les concentrations en carbone du sol sont comprises entre 9,14 et 16,83 mg g⁻¹, et celle d'azote entre 1,01 et 1,65 mg g⁻¹ (Table 4). Les plus faibles concentrations ont été observées pour le sol sous prairie temporaire de 6 ans non fertilisée (TG6N-) et les plus élevées pour le sol sous prairie permanente (G). le carbone et l'azote suivent le même profil avec en ordre décroissant G > TG3N+ > TG6N+ > Cr > TG6N-. De ce fait les ratios C/N ne sont pas significativement différents (Table 4).

Les concentrations en phosphore du sol varient entre 827,3 et 1135,8 µg g⁻¹ respectivement pour TG6N- et G (Table 4) et n'évoluent pas de la même façon que le carbone et l'azote du sol. Ainsi, le ratio C/P varie en fonction des traitements avec 18,4 pour G, ce qui est significativement plus élevé par rapport aux autres traitements. Les concentrations en phosphore du sol dans ces traitements sont comprises entre 11,1 et 13,5 µg g⁻¹. De plus le ratio C/P des TG ne se distingue pas de Cr, mais TG6N+ est significativement supérieur à TG6N- (Table 4). Alors que les concentrations en OP comprise entre 354,9 et 533,3 µg g⁻¹ ne varient pas significativement, les concentrations du sol en IP variant de 392,8 à 605,7 µg g⁻¹ sont significativement plus élevées pour TG3N+ et plus faible pour G. Ils révèlent G comme le plus faible et TG3N+ comme le plus élevé (Table 4). Il est intéressant de noter même si cela n'est pas significatif, que G possède la plus faible concentration en IP et la plus élevée en OP.

Les concentrations du sol en azote inorganique (IN) comprises entre 4,3 et 11,6 µg g⁻¹ ne montrent pas de différence entre les traitements de prairie temporaire et la culture. Par contre pour la concentration en IN, celle-ci est fortement supérieure dans les sols de G par rapport aux autres traitements (Table 4). Les concentrations en NH₄⁺ situées entre 0,7 et 4,9 µg g⁻¹ ne sont pas significativement différentes en raison d'une grande variabilité pour G. Celles en NO₃⁻ comprises entre 3,5 et 6,6 µg g⁻¹ décroissent suivant l'ordre G > TG6N+ > TG3N+ > TG6N-> Cr (Table 4).

Table 4. Soil characteristics for permanent cropland (Cr), temporary grassland of 3 years fertilized (TG3N+), of 6 years fertilized (TG6N+), of 6 years unfertilized (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.

	C	N	C/N	P	C/P	IP	OP	IN	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺
	mg g ⁻¹	mg g ⁻¹		µg g ⁻¹		µg g ⁻¹	µg g ⁻¹	µg g ⁻¹	µg g ⁻¹	µg g ⁻¹
Cr	11.33 ^c	1.22 ^c	9.3 ^a	979.9 ^{ab}	11.6 ^{bc}	539.7 ^{ab}	440.2 ^a	4.3 ^b	3.5 ^b	0.8 ^a
TG3N+	12.97 ^b	1.39 ^b	9.4 ^a	1135.8 ^a	11.7 ^{bc}	605.7 ^a	530.1 ^a	5.8 ^b	5.1 ^{ab}	0.7 ^a
TG6N+	12.25 ^{bc}	1.27 ^c	9.8 ^a	915.6 ^{ab}	13.5 ^b	430.4 ^{ab}	485.3 ^a	7.0 ^b	6.0 ^a	1.0 ^a
TG6N-	9.14 ^d	1.01 ^d	9.0 ^a	827.3 ^b	11.1 ^c	472.3 ^{ab}	354.9 ^a	5.7 ^b	4.9 ^{ab}	0.8 ^a
G	16.83 ^a	1.65 ^a	10.2 ^a	926.1 ^{ab}	18.4 ^a	392.8 ^b	533.3 ^a	11.6 ^a	6.6 ^a	4.9 ^a

^{abcd} Different letters indicate significant differences Anova 2 ways and Tukey HSD post hoc test results between treatments.

b. Fractionnement du carbone organique du sol

Les résultats du fractionnement du sol sont présentés dans la Figure 19. La majorité du carbone du sol est contenue dans la fraction limon et argile (S+C) avec 65 à 78% du carbone organique total du sol (SOC) (Figure 19). La seconde plus grande fraction est la matière organique particulaire (POM) contenant 10 à 20 % du SOC, suivie par la fraction sable et agrégats stables (S+A), qui est comprise entre 6 et 13% de SOC (Figure 19). Les fractions avec la plus faible contribution de SOC sont le carbone organique dissous (DOC) avec 2% et la fraction récalcitrante (rSOC) avec 1% du SOC (Figure 19).

La distribution du carbone dans les fractions du sol est impactée par les traitements. G montre une proportion significativement plus élevée dans les POM avec 19,9% du SOC, compensée par une proportion significativement plus faible de (S+C)-rSOC avec 65,4% du SOC (Figure 19). Cependant les sols de TG et de Cr ne montrent pas de différence significative de la distribution du carbone dans les fractions. Le carbone des fractions DOC et S+A ne montre pas de différence significative selon les traitements (Figure 19).

Il n'y a pas seulement la répartition du carbone dans les fractions qui change avec les traitements mais aussi le ratio C/N de la matière organique (Table 5). Le C/N des POM compris entre 17,8 et 22,2 est le plus élevé pour Cr et TG6N-, et le plus faible pour TG3N+ et G qui ne se différencie d'aucun traitement (Table 5). Pour la fraction S+A, le ratio C/N est plus faible et varie de 11,1 à 15,7 avec cette fois l'inverse : Cr le plus faible et TG3N+ le plus élevé (Table 5). La fraction

S+C révèle les ratios C/N les plus faibles avec des valeurs comprises entre 8,9 pour TG6N- comme Cr et 9,4 pour G (Table 5). La fraction rSOC, qui est la plus récalcitrante montre des C/N compris entre 9,1 et 13,9 et on observe deux groupes avec le plus élevé pour TG3N+ et G, et le plus faible avec TG6N-, TG6N+ et Cr (Table 5).

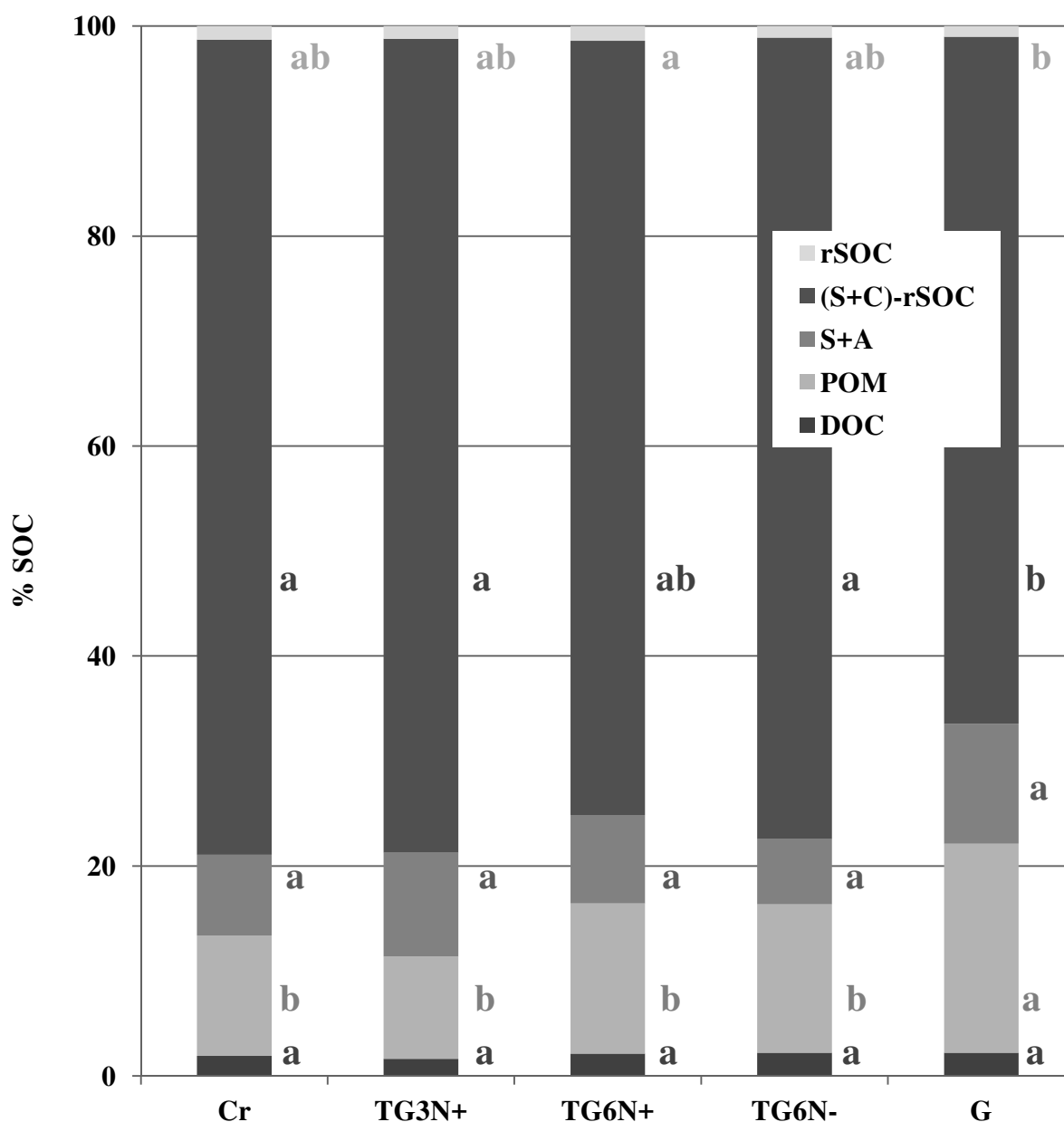


Figure 19. Soil organic carbon fractions for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.

^{ab} Different letters indicate significant differences for Anova 2 ways and Tukey HSD post hoc test results between treatments.

Table 5. C/N ratio of soil fractions for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.

	POM C/N	S+A C/N	S+C C/N	rSOC C/N
Cr	22.2 ^a	11.1 ^b	8.9 ^{bc}	10.7 ^b
TG3N+	17.8 ^b	15.7 ^a	9.2 ^{ab}	13.9 ^a
TG6N+	20.5 ^{ab}	12.5 ^{ab}	9.0 ^{bc}	10.1 ^b
TG6N-	21.7 ^a	11.9 ^{ab}	8.9 ^c	9.1 ^b
G	18.8 ^{ab}	13.2 ^{ab}	9.4 ^a	13.2 ^a

^{abc} Different letters indicate significant differences for Anova 2 ways and Tukey HSD post hoc test results between treatments.

c. Signature et fractionnement du sucre des sols

Table 6. Sugar signature of soil under permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.

	content (% C)	concentration (mg g ⁻¹)	C6/C5*	desoxyC6/C5*	xylose /mannose
Cr	38.3 ^b	4.29 ^{bc}	2.92 ^a	0.37 ^a	0.23 ^c
TG3N+	34.8 ^c	4.50 ^b	2.61 ^{ab}	0.30 ^b	0.26 ^{bc}
TG6N+	37.6 ^{bc}	4.61 ^b	2.37 ^b	0.33 ^b	0.31 ^b
TG6N-	43.1 ^a	3.94 ^c	2.90 ^a	0.29 ^b	0.23 ^c
G	35.5 ^{bc}	5.98 ^a	1.51 ^c	0.22 ^c	0.60 ^a

^{abcd} Different letters indicate significant differences for Anova 2 ways and Tukey HSD post hoc test results between treatments. * refers to the ratio of microbial C6 sugars over plant-derived C5 sugars

Les concentrations en hydrate de carbone du sol comprises entre 3.94 and 5.98 mg g⁻¹ décroissent dans l'ordre suivant G > TG6N+ > TG3N+ > Cr > TG6N- (Table 6). Cela révèle un arrière effet de la fertilisation et de la durée des prairies temporaires. Les concentrations en sucre du sol de G sont significativement plus élevées que ceux de tous les autres traitements. Mais normalisée au C du sol la réponse des traitements change. La teneur en sucre comprise entre 34.8 et 43.1% du carbone est similaire dans les sols de tous les traitements sauf pour TG6N- qui a une valeur plus élevée (Table 6). De plus, la teneur en sucre du sol sous TG3N+ est avec 34.8 % du carbone significativement plus faible que celle du sol sous Cr (38.3 % du carbone, Table 6). Un ratio C6/C5 supérieur à 2 pour les sols de Cr et TG indique que les sucres sont principalement d'origine microbienne (Table 6). La variation des ratios C6/C5 et desoxyC6/C5 révèle une signature spécifique

des traitements, avec les sols sous G présentant les valeurs les plus faibles (C6/C5 : 1.51 et desoxyC6/C5 : 0.22) et les sols sous Cr les plus élevés (C6/C5 : 2.92 and desoxyC6/C5 : 0.37). Les sols sous des TG ont des ratios desoxyC6/C5 similaires entre eux mais intermédiaires de G et Cr, alors que pour les ratios C6/C5 ratio seul TG6N+ se différencie significativement de Cr pour être intermédiaire entre Cr et G avec 2.37 (Table 6).

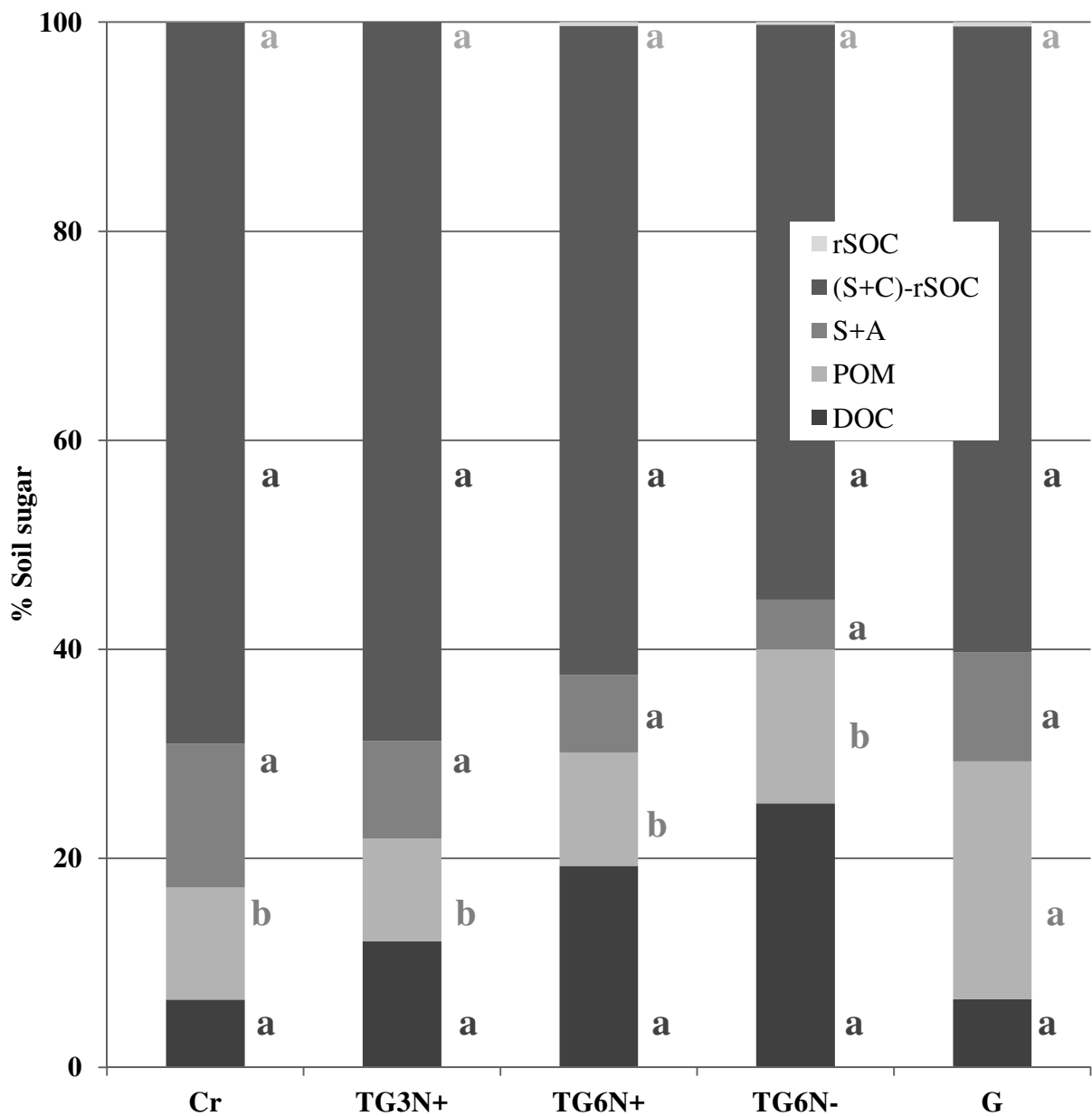


Figure 20. Soil sugar fractions for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.

^{abcd} Different letters indicate significant differences for Anova 2 ways and Tukey HSD post hoc test results between treatments.

Table 7. Sugar fraction signature's of soil under permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.

	POM			S+A			S+C		
	C6/C5*	desoxyC6/C5*	xylose/mannose	C6/C5*	desoxyC6/C5*	xylose/mannose	C6/C5*	desoxyC6/C5*	xylose/mannose
Cr	0,40 ^b	0,02 ^a	3,44 ^{ab}	9,29 ^a	0,01 ^a	0,12 ^b	3,75 ^a	0,20 ^a	0,15 ^b
TG3N+	0,59 ^b	0,03 ^a	2,07 ^{bc}	1,45 ^b	0,01 ^a	0,36 ^{ab}	3,46 ^a	0,24 ^a	0,20 ^b
TG6N+	0,85 ^a	0,01 ^a	1,33 ^c	3,04 ^{ab}	0,09 ^a	0,33 ^b	4,68 ^a	0,26 ^a	0,16 ^b
TG6N-	0,48 ^b	0,02 ^a	2,50 ^{bc}	2,08 ^b	0,00 ^a	0,35 ^{ab}	3,45 ^a	0,08 ^a	0,21 ^b
G	0,39 ^b	0,02 ^a	4,02 ^a	1,26 ^b	0,07 ^a	0,72 ^a	2,15 ^a	0,22 ^a	0,37 ^a

^{abc} Different letters indicate significant differences for HSD Tukey test results between treatments.

* refers to the ratio of microbial C6 sugars over plant-derived C5 sugars

La distribution des hydrates de carbone parmi les différentes fractions est présentée dans la Figure 20. La majorité des sucres est contenue dans S+C avec 54 à 69 % des sucres totaux du sol (Figure 7). La seconde principale fraction est la fraction POM contenant 10 à 23% des sucres du sol, suivi par le DOC qui représente entre 6 et 25 % des sucres du sol (Figure 20). Les plus faibles contributions sont observées pour la fraction S+A avec 5 à 10% des sucres du sol et rSOC qui contribue à moins de 0,4% des sucres du sol (Figure 20). Dans rSOC, le galactose est le seul monomère de sucre détecté. Seule la fraction POM révèle des variations significatives entre traitements. Elle montre les teneurs les plus élevées dans le sol de G (Figure 20). Cependant la composition des monomères de sucre diffère entre les traitements (Table 7).

Le ratio C6/C5 de la fraction POM indique que les sucres de cette fraction sont majoritairement dérivés des plantes en particulier dans les sols sous Cr, G et TG6N- (Table 7). Le ratio xylose/mannose des POM est le plus élevé dans Cr et G avec 3,44 et 4,02 respectivement (Table 7). Les sols de TG montrent des teneurs en sucre significativement plus faibles que G (Figure 20) mais les ratios sont similaires parmi les POM extraites (Table 7). Les ratios C6/C5 indiquent une origine microbienne des sucres dans la fraction S+A, particulièrement pour le sol sous Cr qui montre une valeur élevée de 9,29 (Table 7). Le ratio xylose/mannose de la fraction S+A est le plus élevé pour le sol de G avec 0,72 et le plus faible pour le sol de Cr avec 0,12 (Table 7). Des valeurs intermédiaires sont notées pour les POM extraites des sols sous TG. La fraction S+C ne montre aucune différence dans la composition des monomères de sucre sauf un ratio xylose/mannose élevé pour G (Table 7).

d. Signature de la lignine des sols

Les concentrations en lignine du sol sont comprises entre 0,20 et 0,35 mg g⁻¹ et ne différencient pas pour les deux extrêmes G et Cr. Cependant, tous les traitements de TG montrent des valeurs significativement plus faibles que G avec TG6N- montrant la plus faible (Table 8). Normalisée avec la concentration en carbone du sol, la teneur en lignine est comprise entre 1,9 et 2,4% du carbone et ne montre pas de différence entre les traitements (Table 8). Le ratio Ac/Al de la vanilline et du syringyl ne révèle pas de signature de la lignine différente pour les sols de G, Cr et TG sauf une différence non attendue du ratio (Ac/Al)_S pour TG3N+ et TG6N+ (Table 8). Le ratio Co/V permet de différencier l'état de dégradation de la lignine entre G et Cr en montrant une réponse intermédiaire des TG. TG3N+ montre encore une réponse inattendue avec des Co/V et S/V élevés. Cependant en général, il n'y a pas de tendance d'arrière effet des ratios S/V des sols (Table 8).

Table 8. Lignin signature of soil for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.

	content (% C)	concentration (mg g ⁻¹)	(Ac/Al)V	(Ac/Al)S	Co/V	S/V
Cr	2.4 ^a	0.27 ^{ab}	0.45 ^a	0.54 ^{ab}	0.46 ^b	1.40 ^b
TG3N+	1.9 ^a	0.25 ^b	0.39 ^a	0.51 ^b	0.66 ^a	1.60 ^a
TG6N+	2.0 ^a	0.25 ^b	0.48 ^a	0.56 ^a	0.52 ^{ab}	1.40 ^b
TG6N-	2.2 ^a	0.20 ^b	0.46 ^a	0.52 ^{ab}	0.50 ^{ab}	1.43 ^{ab}
G	2.1 ^a	0.35 ^a	0.47 ^a	0.52 ^{ab}	0.66 ^a	1.29 ^b

^{abc} Different letters indicate significant differences for HSD Tukey test results between treatments.

2. Processus microbiens et gaz à effet de serre

a. Microbiologie

Biomasse microbienne

Le carbone et l'azote de la biomasse microbienne du sol (Cmic et Nmic) sont présentés dans le Table 9. Nmic est compris entre 20,1 et 28,2 µg g⁻¹ et ne montre pas de différence significative entre les traitements. Alors que le Cmic mesuré de 160,7 à 274,8 µg g⁻¹ montre des différences avec par ordre décroissant G > TG6N+ > TG3N+ > Cr > TG6N- (Table 9). Les TG fertilisées sont

intermédiaires entre Cr et G eux mêmes significativement différents avec G le plus élevé. Cmic et Nmic ne suivant pas les mêmes variations, le ratio Cmic/Nmic est le plus élevé pour G (Table 9).

Table 9. Microbial parameters for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.

	Cmic µg g⁻¹	Nmic µg g⁻¹	Cmic/Nmic	Biolog ® Shannon index	Biolog ® AWCD
Cr	170.7 ^b	20.1 ^a	8.7 ^b	3.00 ^a	0.589 ^a
TG3N+	215.0 ^{ab}	25.7 ^a	8.5 ^b	2.96 ^a	0.607 ^a
TG6N+	242.9 ^{ab}	22.3 ^a	11.0 ^a	2.89 ^a	0.557 ^a
TG6N-	160.7 ^b	21.0 ^a	7.7 ^b	2.93 ^a	0.589 ^a
G	274.8 ^a	28.2 ^a	9.7 ^{ab}	2.99 ^a	0.607 ^a

^{abcd} Different letters indicate significant differences for Anova 2 ways and Tukey HSD post hoc test results between treatments.

Profil physiologique de la communauté microbienne

Les résultats de la méthode Biolog® révélant le profil physiologique de la communauté microbienne (CLPP) sont montrés sous forme d'une analyse en composante principale (ACP) dans la Figure 21 puis l'utilisation des substrats via l'indice de Shannon et développement moyen de la couleur des puits (AWCD) dans le Table 9. Le développement moyen de la couleur des puits compris entre 0,557 et 0,607 ne montre aucune différence significative entre les traitements (Table 9). De même l'indice de Shannon, compris entre 2,89 et 3,00 montre que l'utilisation des différents substrats carbonés par les communautés microbiennes des sols étudiés ne diffère pas (Table 9).

L' ACP des CLPP explique 48,51% de la variabilité des données avec 35,02% pour la première dimension et 13,49% pour la seconde dimension (Figure 21). La dimension 1 est fortement corrélée ($r > 0,7$) à plusieurs acides carboxyliques (4-Hydroxy Benzoic Acid, D-glucosaminic Acid, Itaconic Acid), mais aussi à de nombreux acides aminés (L-Threonine, Glycyl-L-Glutamic Acid, L-Asparagine, L-Phenylalanine), un polymère (tween 40) et les deux amines utilisés (Table 10). La dimension 2 est surtout corrélée à des sucres et un polymère le Tween 80 (Table 10). Cependant les individus ne révèlent pas de différenciations des traitements (Table 10)

Les analyses statistiques des résultats de la méthode Biolog® ne révèlent aucune différence de réponse physiologique de la communauté microbienne en fonction des traitements.

Table 10. Correlation of variables and treatments with dimension 1 and 2 of PCA of Biolog® analysis for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). r : Pearson's regression coefficient, p-value <0.05.

Dimension 1 (35.02%)		Dimension 2 (13.49%)	
treatment	estimate (p-value)	treatment	estimate (p-value)
-		-	
variable	r	variable	r
Carboxylic Acids		Carbohydrates	
4-Hydroxy Benzoic Acid	0.80	β-Methyl-D-Glucoside	0.62
D-glucosaminic Acid	0.75	D-Xylose	0.59
Itaconic Acid	0.70	D-Cellobiose	0.59
γ-Hydroxybutyric Acid	0.66	N-Acetyl-D-Glucosamine	0.56
α-Ketobutyric Acid	0.52	i-Erythritol	0.48
D-Malic Acid	0.48	Phosphorylated chemicals	
D-galacturonic Acid	0.47	Glucose-1-Phosphate	0.56
Amino Acids		Amino Acids	
L-Threonine	0.79	L-Arginine	-0.47
Glycyl-L-Glutamic Acid	0.79	Amine	
L-Arginine	0.75	Putrescine	-0.48
L-Phenylalanine	0.71	Carboxylic Acids	
L-Asparagine	0.68	D-galacturonic Acid	-0.52
L-Serine	0.57	Polymers	
Polymers		Tween 80	-0.71
Tween 40	0.78		
Glycogen	0.68		
α-Cyclodextrin	0.64		
Amine			
Phenylethylamine	0.76		
Putrescine	0.76		
Carbohydrates			
D-Mannitol	0.67		
D-Xylose	0.59		
α-D-Lactose	0.54		
i-Erythritol	0.49		
Phosphorylated chemicals			
D,L-α-Glycerol Phosphate	0.65		

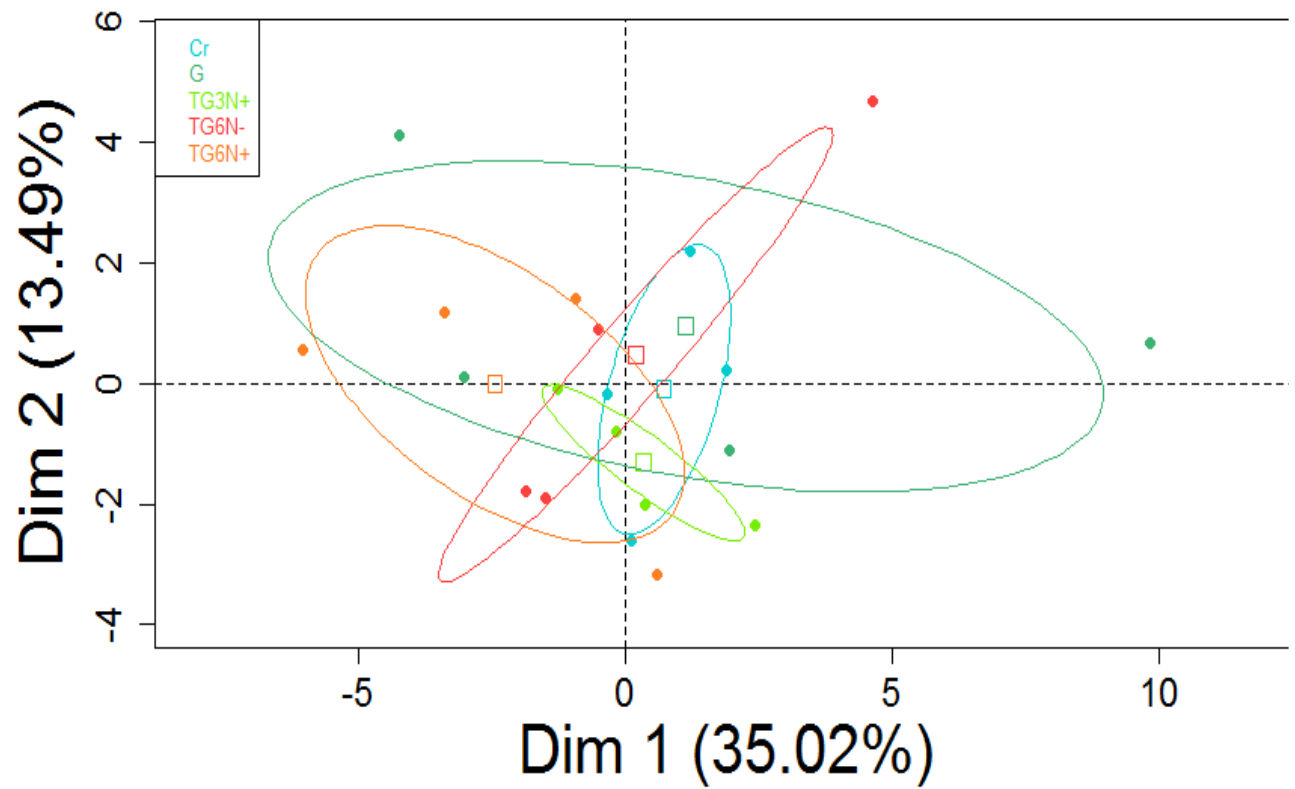


Figure 21. PCA individual factor map of Biolog® analysis for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). r : pearson's regression coefficient.

b. Minéralisation potentielle du C et de l’N

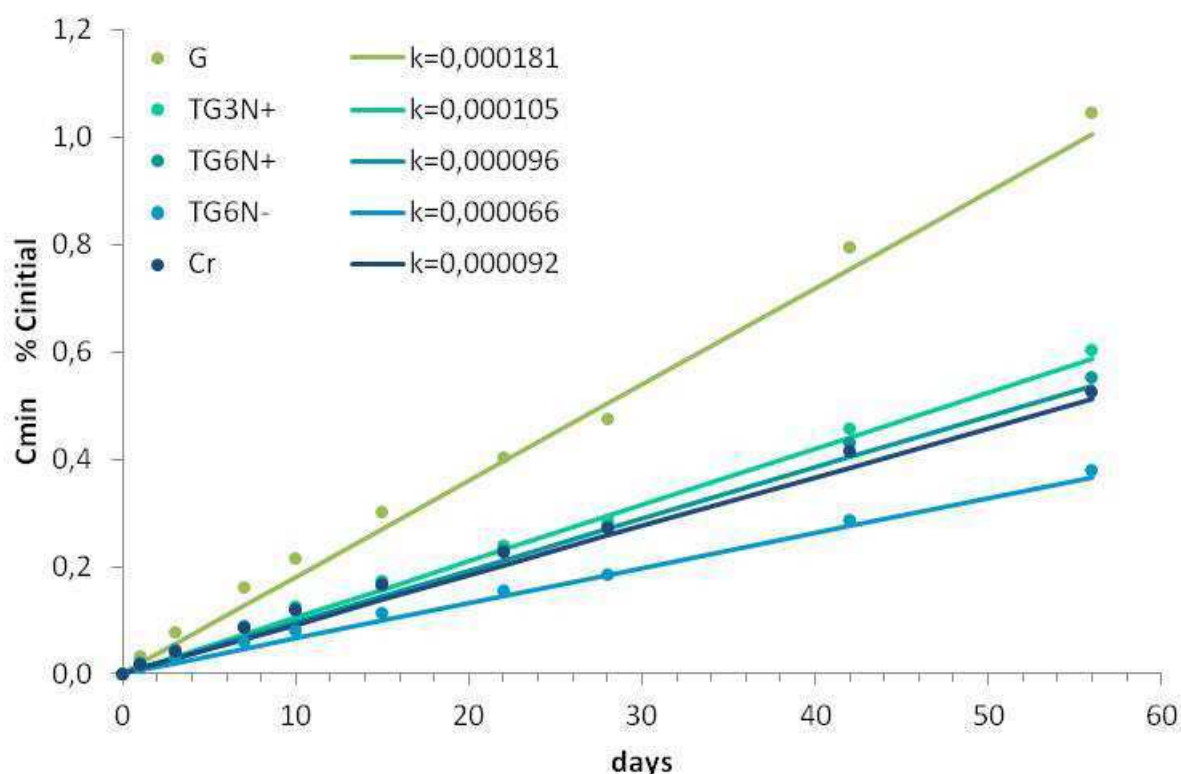
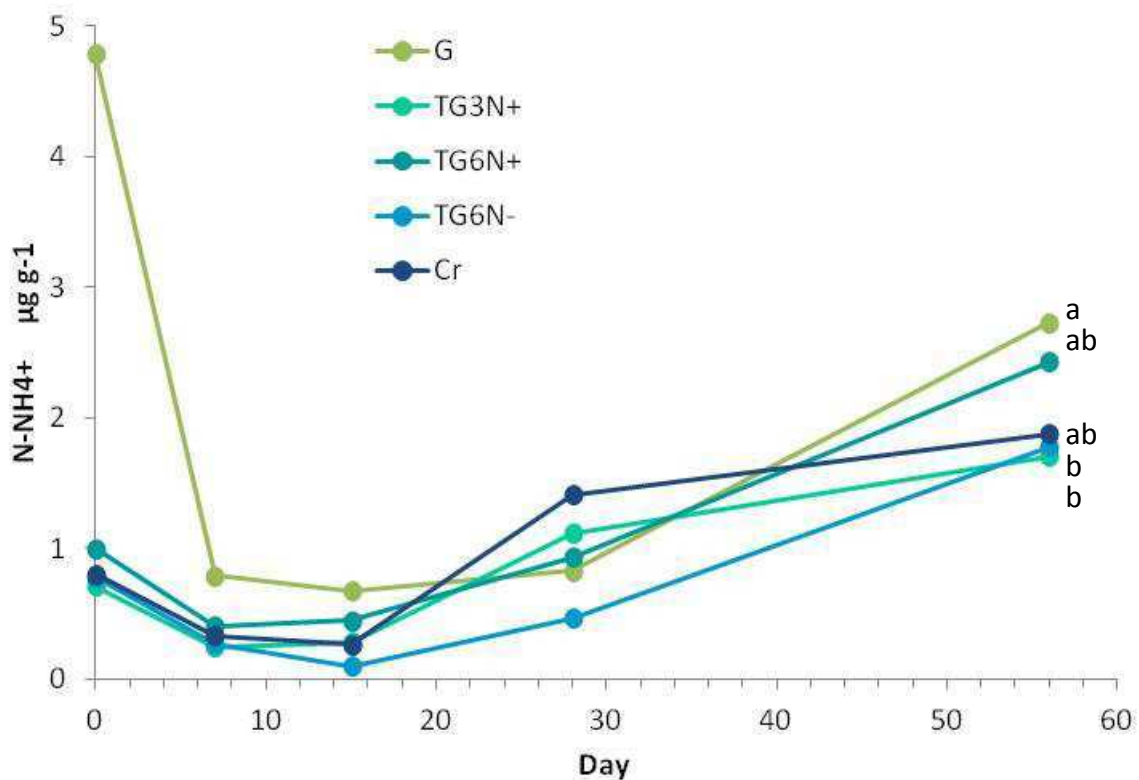
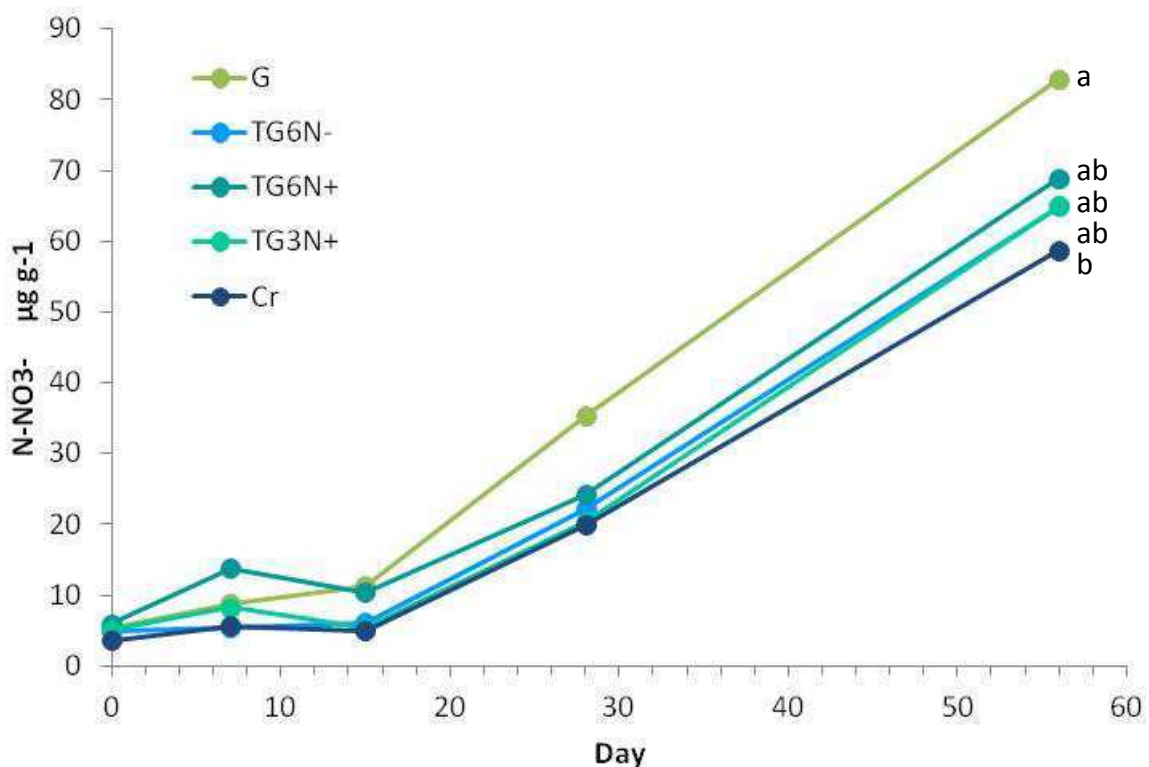


Figure 22. Potential mineralization in 56 days of soil carbon with observed (point) and simulated data (line) of soil under permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). With k the C mineralization constant rate use for simulation ($C(t) = C_0(1 - e^{-kt})$) and (a)(b) different letters indicate significant differences for Anova 2 ways and Tukey HSD post hoc test results between treatments of k. Data are presented as mean of 4 replicates.

Les résultats des mesures de minéralisation potentielle du carbone sont présentés dans la Figure 22. Le carbone minéralisé (Cmin) sous forme de CO₂ au cours de l’incubation en milieu contrôlé est exprimé en % du carbone initial (Cinitial) des sols et est compris au bout de 56 jours entre 3,8 et 10,5 % Cinitial. Afin de traiter statistiquement les résultats, nous avons simulé les données observées à l’aide d’un modèle à un réservoir de carbone dit labile et ainsi obtenu k, la constante de vitesse de minéralisation du carbone. Seule la vitesse de minéralisation du carbone des sols de G est significativement plus élevée que celles des autres traitements (Figure 22).



a.



b.

Figure 23. Potential mineralization and organization in 56 days of soil inorganic nitrogen for ammonium (top) and nitrate (bottom) of soil under permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). (a)(b) Different letters indicates significant differences for Anova 2 ways and Tukey HSD post hoc test results between treatments per day. Data are presented as mean of 4 replicates.

Sur les mêmes sols, la minéralisation potentielle de l'ammonium et du nitrate a été suivie en parallèle durant 56 jours et les résultats sont montrés dans la Figure 23. Avec des concentrations initiales en IN du sol comprises entre 4,3 et 11,6 $\mu\text{g g}^{-1}$, seule la prairie permanente se différencie de la culture avec les teneurs les plus élevées (Table 4). Pour les concentrations initiales en ammonium comprises entre 0,7 et 4,9 $\mu\text{g g}^{-1}$, la prairie permanente et la culture ne se différencient pas bien que le sol sous prairie permanente soit le plus élevé (Table 4).

Lors des 15 premiers jours, on observe une diminution de la teneur en ammonium des sols, avec des valeurs comprise entre 0,1 et 0,7 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ sol}$ (Figure 23 Top). Ensuite, on observe une augmentation du N-NH_4^+ min du sol atteignant 1,7 à 2,4 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ sol}$ en 56 jours pour les sols sous Cr (Figure 23 Top). On observe que cette ré-augmentation est plus ou moins rapide en fonction des traitements mais seul le jour 56 montre des différences significatives. En effet, la ré-augmentation du N-NH_4^+ min pour G ne compense pas la diminution précédente ce qui est significativement plus faible que le N-NH_4^+ min dans les sols de Cr et TG6N+ (Figure 23 Top).

Contrairement au NH_4^+ , les concentrations en NO_3^- augmentent pendant l'incubation dans les sols de tous les traitements de 3,5-6,0 à 58,7-83,0 $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ soil}$ (Figure 23 bottom). Le sol du traitement G montre significativement une accumulation de nitrate plus élevé que le sol Cr, sans différence significative pour les prairies temporaires (Figure 23 bottom).

3. Analyse globale et bilan

a. Analyse par composante principale

Une analyse en composantes principales a été effectuée sur les paramètres des sols évalués dans cette étude, les dimensions 1 et 2 représentent 45,83% de la variabilité (Figure 24). La dimension 1 représente 32,99% de la variabilité des échantillons et elle est fortement corrélée ($r > 0,8$) positivement aux concentrations en sucres, carbone, azote des sols, aux ratios xylose/mannose du sol et de la fraction S+C et au Cmin en 56 jours lors des incubations et négativement aux ratios des sucres C6/C5 et desoxyC6/C5, à la constante de vitesse de minéralisation du carbone k et la teneur en carbone de la fraction (S+C)-rSOC (Table 11). La dimension 2 représente 12,84% de la variabilité et elle est corrélée ($r > 0,6$) négativement à la concentration en phosphore du sol, aux

ratios de lignine S/V, Co/V (négativement) et (Ac/Al)S (positivement) et enfin au ratios C/N de la fraction rSOC (Table 11). D'après la dimension 1, la prairie permanente est significativement différente de l'ensemble des traitements, alors que d'après la dimension 2 (négativement) c'est la prairie temporaire fertilisée de 3 ans qui est différente des autres modalités (Table 11). Sur le plan des individus (Figure 24), la modalité G est nettement différenciée des autres traitements ayant subi les trois dernières années une rotation de culture. Néanmoins au sein de ce groupe, les gestions des prairies temporaires se distinguent entre elles mais seule la prairie fertilisée de 6 ans est différente de la culture avec une tendance à tendre vers la prairie permanente. Il était inattendu que la prairie temporaire de 3 ans se comporte complètement différemment de la prairie de 6 ans et ne présente pas un état intermédiaire entre la culture et la prairie de 6 ans fertilisée (Figure 24).

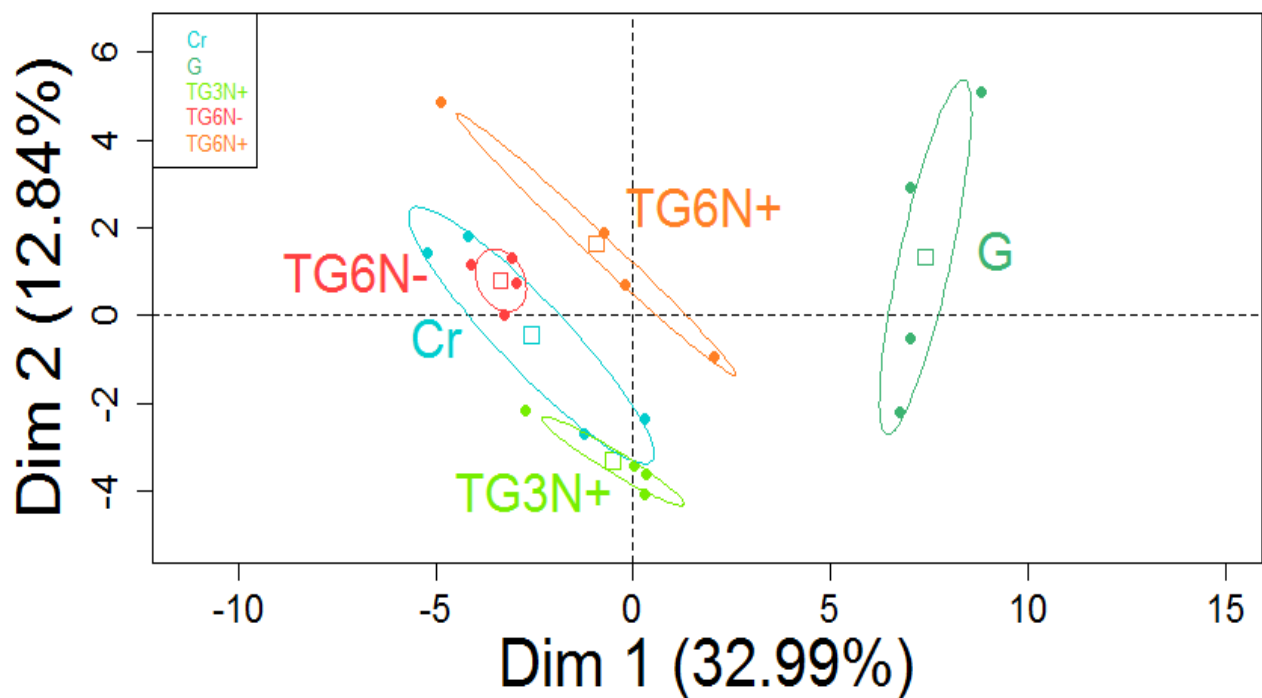


Figure 24. PCA individual factor map for analysis of soil parameters for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented with 4 replicates.

Table 11. Correlation of variables and treatments with dimension 1 and 2 of PCA for analysis for soil under permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). r : Pearson's regression coefficient, p -value <0.05.

Dimension 1 (32.99%)		Dimension 2 (12.84%)	
treatment	estimate (p-value)	treatment	estimate (p-value)
G	7.398045 (2.24e-07)	TG3N+	-3.318906 (0.0026)
variable	r	variable	r
Sugars signature		lignin signature	
Sugar	0.94	(Ac/Al)S	0.76
Xylose/mannose	0.93	(Ac/Al)V	0.56
Sugar/C	-0.59	S/V	-0.77
desoxyC6/C5	-0.74	Co/V	-0.78
C6/C5	-0.95	elemental composition	
elemental composition		C/P	0.51
C	0.93	P	-0.80
N	0.85	SOM fractionation	
C/P	0.77	DOC	0.63
C/N	0.71	rSOC C/N	-0.66
Sugar fractionation		Sugar fractionation	
S+C xylose/mannose	0.83	DOC sugar	0.46
S+A xylose/mannose	0.72	(S+C)-rSOC sugar	-0.54
POM xylose/mannose	0.64	Sugars signature	
POM sugar	0.62	Sugar/C	0.50
rSOC sugar/C	0.47	microbiology	
S+A sugar	0.46	Cmic/Nmic	0.45
S+A desoxyC6/C5	0.45		
POM C6/C5	-0.44		
DOC sugar	-0.59		
S+C C6/C5	-0.58		
Potential SOM mineralization			
Cmin	0.81		
NO ₃ ⁻ min	0.77		
Nmin	0.77		
NH ₄ ⁺ min	-0.52		
KI C	-0.90		
SOM fractionation			
S+C C/N	0.74		
POM	0.62		
rSOC C/N	0.50		
(S+C)-rSOC	-0.70		
microbiology			
Cmic	0.72		
Nmic	0.63		
lignin signature			
lignin VSC	0.70		

b. Estimation par le Bilan carbone ®

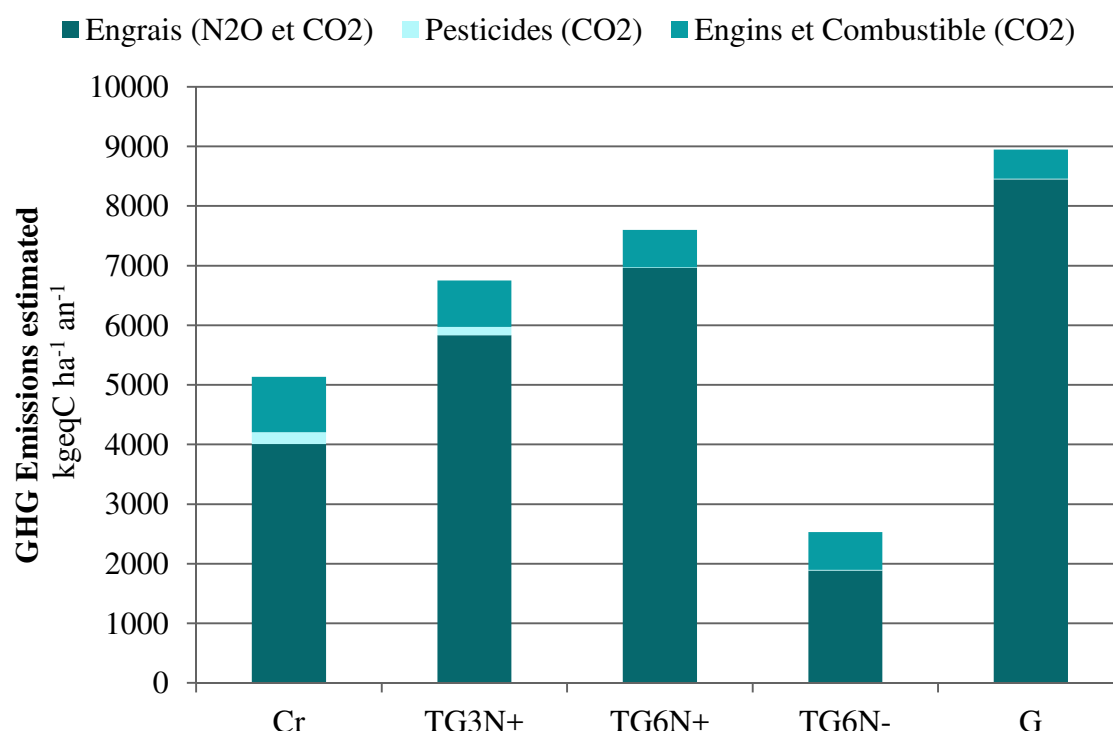


Figure 25. Carbon balance (Bilan Carbone ®) according to sink domains for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Uncertainty between 20 and 50%.

Le Bilan carbone® effectué d'après la méthode de l'ADEME est représenté dans la Figure 25 selon 3 types de source des émissions de gaz à effet de serre (GES) : les fertilisants azotés, les pesticides et les engins agricoles et combustibles. Rapportées en $\text{kgeqC ha}^{-1} \text{an}^{-1}$, les émissions de GES sont comprises entre 2532 et 8945 avec dans l'ordre décroissant $G > TG6N+ > TG3N+ > Cr > TG6N-$ (Figure 25). La principale source de GES sont les fertilisants azotés par leur production émettrice de CO_2 et leur application au sol émettrice de N_2O . Les émissions de GES dues aux fertilisants représentent 81 à 94% des émissions totales évaluées et suivent donc la même tendance que les émissions totales et sont fortement influencées par les itinéraires techniques dépendant des gestions des prairies (Figure 25). TG6N- est la modalité dont la gestion est la moins émettrice de GES alors que la prairie par sa forte consommation en fertilisant est la plus émettrice (Figure 25). Les engins agricoles et les combustibles consommés sont le second poste émetteur de GES avec des valeurs comprises entre 486 pour G et 927 $\text{kgeqC ha}^{-1} \text{an}^{-1}$ pour Cr (Figure 25). Les pesticides sont le plus faible poste d'émissions de GES avec 10 à 198 $\text{kgeqC ha}^{-1} \text{an}^{-1}$ (Figure 25). On observe les plus grandes valeurs pour Cr et TG3N+ où les proportions de culture dans la rotation sont les plus élevées.

III. *Discussion*

1. **Sols prairiaux et sols cultureux, deux systèmes différents**

Après 9 ans, les sols de prairie présentent un stock de carbone significativement plus élevé avec 24 t C ha^{-1} que les sols de culture avec 16 t C ha^{-1} sur les 10 premiers centimètres de sol, ce qui est cohérent avec la littérature (Guggenberger *et al.*, 1994; INRA 2002; Soussana *et al.*, 2004; Lal 2004). Il en est de même pour l'azote qui augmente dans les sols de prairie permanente mais pas la concentration en phosphore qui ne diffère pas entre les sols de culture et de prairie permanente. Ceci s'explique par l'absence de l'ajout de phosphore depuis le début de l'expérimentation donc aucune différence d'apport entre les traitements. Ainsi, le ratio C/N est similaire entre 9,3 pour Cr et 10,2 pour G comme observé par d'autres auteurs (e.g. Carter *et al.*, 1998) alors que le C/P diffère beaucoup avec 11,6 pour Cr et 18,4 pour G. De plus, le faible ratio C/P dans les sols de culture pourrait indiquer une MOS moins stabilisée (Kirkby *et al.*, 2013).

Le sol de prairie et le sol de culture ne possèdent pas la même signature biogéochimique, avec un phosphore plus organique dans les sols prairiaux et plus inorganique dans les sols de culture ce qui est en accord avec la littérature (e.g. Hedley *et al.*, 1982). Ceci laisse penser à une augmentation de MOS car la formation d'OP est due à l'immobilisation de l'IP via l'assimilation par les plantes qui revient au sol sous forme de litière végétale (Condron and Tiessen 2005; Mullen 2005). Cet apport est en général plus grand dans les prairies que les cultures dû à l'export de biomasse pendant la récolte et un plus fort développement des racines (Hedley *et al.*, 1982; Acharya *et al.*, 2012). De plus, une plus faible concentration en OP du sol sous culture se traduit par un phosphore moins disponible sur le long terme pour les plantes (Hedley *et al.*, 1982).

La répartition du carbone organique total du sol (SOC) au sein des compartiments (pools) avec des temps de résidence contrastés diffère entre les sols de culture et de prairie permanente. La MOS extraite dans la fraction POM est la matière organique particulaire libre et peu dégradée, celle de S+A est aussi particulaire mais associée aux sables et recluse dans les agrégats mais non stabilisée dans des complexes organo-minéraux comme dans la fraction S+C. Effectivement la proportion de matière organique particulaire (POM) est plus élevée dans les sols sous prairie comparée à celle sous culture. Ce qui peut être expliqué par une plus faible minéralisation de matière organique fraîche due au couvert permanent du sol (Soussana *et al.*, 2004). Ceci est corroboré avec une plus forte

proportion de sucres dans les POM qui représente 23% des sucres du sol pour G contre 11% pour Cr, le surplus de carbone stocké dans les sols de prairie, par rapport aux sols de culture, semble être un carbone organique plus frais. Cette plus grande proportion de MOS fraîche dans le sol de prairie permanente s'accompagne d'une plus faible proportion de carbone dans la fraction limon et argile (S+C) avec 65% SOC dans les sols G contre 78% SOC pour les sols de culture. Ceci peut s'expliquer par deux processus (Guggenberger *et al.*, 1994), (1) par l'apport plus grand et constant de MOS fraîche dans les prairies permanentes dû aux racines du couvert végétal permanent (Post and Kwon 2000; Acharya *et al.*, 2012) et (2) par une meilleure accessibilité des POM aux microorganismes dans les sols de culture. En effet, la minéralisation des MOS est favorisée par la déstructuration des agrégats du sol lors des labours répétés de par la dé-protection physique des MOS (Guggenberger *et al.*, 1994; Post and Kwon 2000; Kristensen *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2009; Attard *et al.*, 2011). Ainsi, les processus de dégradation dans les sols de culture sont accélérés et permettent de plus rapidement réduire la fraction POM pour transférer le carbone qu'elle constitue dans la fraction S+A (Post and Kwon, 2000). Néanmoins les indicateurs de l'état de dégradation des POM ne sont pas significativement différents pour les sols de culture et de prairie contredisant l'hypothèse de Soussana *et al.*, (2004) présumant que les POM sont chimiquement plus stables dans les sols de prairie. D'ailleurs la teneur en sucre est plus importante dans les POM et pour la majorité d'origine végétale (Oades, 1984). Il semblerait donc qu'un plus grand apport de POM dans les systèmes prairiaux soit l'explication. D'autant que les concentrations en sucres non celluloses du sol sont plus élevées dans le sol sous prairie avec 5,98 mg g⁻¹ que dans le sol sous culture avec 4,29 mg g⁻¹ mais la teneur en % carbone du sol reste similaire. Effectivement les POM sont connues pour être sensibles aux modes de culture et au labour de par leur forte capacité à améliorer les conditions pour la dégradation microbienne (Post and Kwon, 2000).

Les concentrations et les teneurs en lignines des sols ne changent pas entre la culture et la prairie permanente. Les teneurs en lignines proches des 2 % carbone du sol ne semblent pas être caractéristiques entre ces deux types de sols. En effet les résultats ne montrent pas de différence significative alors que dans certains cas les sols de prairie sont plus riches en lignine (Guggenberger *et al.*, 1994; Lobe *et al.*, 2002) et dans d'autres les sols de culture (Rumpel and Chabbi, 2010). Les différences concernant les ratios caractérisant les lignines peuvent être dues à deux choses, (1) l'altération des composés de lignine mais aussi (2) la différence de signature des résidus végétaux apportés au sol (Kögel 1986; Lobe *et al.*, 2002). D'après (Lobe *et al.*, 2002), le ratio Co/V des racines de maïs (4,1) et du blé (1,3) est plus élevé que celui de graminées de prairie (1,1). Ainsi le ratio Co/V des lignines plus faible dans les sols de culture comparable aux observations de

(Guggenberger *et al.*, 1994) pour le ratio S/V, n'est pas dû à la signature des apports de litière et peut nous permettre de penser que la lignine aussi est plus dégradée dans les sols prairiaux par rapport aux sols de culture (Kögel 1986; Bahri *et al.*, 2006). D'autres études révèlent une lignine plus dégradée dans les sols sous culture qu'en prairie (Lobe *et al.*, 2002; Rumpel and Chabbi, 2010).

Les ratios C/N des fractions les plus stables S+C et rSOC et le ratio xylose/mannose des fractions S+A et S+C significativement plus élevées dans les sols sous prairie comparés à ceux sous culture, indiquent une MOS moins dégradée avec une contribution plus forte du carbone d'origine végétale pour les sols de prairie comparée à celle sous culture (Oades 1984; Kirkby *et al.*, 2013).

Par ailleurs, les ratios C6/C5 de la fraction S+A qui montrent une forte majorité de sucres d'origine microbienne dans les sols de culture par rapport aux sucres de la prairie intermédiaire entre microbien et végétal (Oades, 1984), nous laissent envisager que ces caractéristiques des sols sous culture favorisent l'activité microbienne et donc la minéralisation.

Le carbone de la biomasse microbienne (Cmic) est nettement plus élevé dans les sols sous prairie permanente. Ces résultats peuvent être expliqués par un pool microbien plus grand dans les sols prairiaux que dans les sols cultureux influencé par les entrées de litière et la rhizodéposition (Carter *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 2007; Attard *et al.*, 2016). Le Cmic des sols de prairie plus élevé se traduit par une minéralisation potentielle du C aussi significativement plus élevée avec une vitesse de minéralisation du C (k) deux fois plus grande (Haynes, 2005). Néanmoins, ces modifications ne s'assortissent pas avec une modification du profil physiologique de la communauté microbienne. L'augmentation de carbone du sol serait donc le premier paramètre contrôlant la vitesse de minéralisation du C du sol (k, $R^2=0,82$), par augmentation de sources de carbone pour la respiration microbienne (Haynes, 2005) sans changer les capacités de minéralisation de différents types de carbone de la communauté microbienne.

En ce qui concerne la minéralisation de l'azote on observe au début de l'expérience une diminution dans tous les traitements de la concentration en ammonium du sol. Cette diminution peut s'expliquer par différents processus : l'organisation de l'azote minéral sous forme de matière organique par la consommation de microorganismes du sol, la nitrification soit la transformation par les microbes en nitrate ou la volatilisation (Recous, *et al.*, 1997). Le potentiel de minéralisation des nitrate après 56 jours n'est pas différent dans les sols sous les deux sols culture et prairie. Cependant, en termes de minéralisation totale, les quantités minéralisées dans le sol de prairie sont plus élevées due à la concentration du sol plus élevée. Ceci est cohérent avec la plus importante taux de minéralisation reporté pour les prairies par rapport au culture (Attard *et al.*, 2016). Ainsi, avec le

même potentiel la prairie plus riche minéralise en quantité beaucoup plus d'azote. Néanmoins, la lixiviation des nitrates dans les sols de prairie est reconnu pour être faible de par l'utilisation rapide des nitrates et de l'ammonium par les microbes et les racines (Kunrath *et al.*, 2015; Lemaire *et al.*, 2015), favorisant la production de biomasse végétale et donc l'apport de carbone au système (Christensen *et al.*, 2009).

L'analyse en composantes principales de l'ensemble des paramètres du sol nous permet de distinguer par la première composante les sols prairiaux et culturaux. Aussi la concentration en sucre et son état de dégradation, les concentrations en carbone et azote, le potentiel de minéralisation du carbone semblent être les paramètres du sol, parmi ceux que nous avons étudiés, sensibles au changement d'utilisation des terres entre les sols de culture et de prairie.

Les prairies présentent une capacité à stocker plus de carbone dans les sols que les cultures principalement grâce à une augmentation des apports de litière et ce malgré une dégradation des MOS plus élevée et une stabilisation plus faible. Toutefois, les estimations d'émissions de GES à effet de serre en kgeqC, prenant en compte l'utilisation du matériel agricole ainsi que la synthèse des engrais et des pesticides, annoncent les prairies permanentes comme le système le plus émetteur et essentiellement à cause des engrais azotés. Les estimations sont en accord avec les résultats mesurés par Senapati *et al.*, (submitted) montrant des émissions de N₂O plus élevées dans les prairies que dans les cultures de par une plus forte fertilisation. La difficulté est désormais de comprendre les mécanismes influençant les MOS dans l'alternance de ces deux systèmes différents et la complexité des influences de modes de gestion des phases de prairies. Tout particulièrement la fertilisation qui semble être à l'origine d'émissions de GES et la durée nécessaire à l'établissement d'un nouveau système.

2. Arrières effets de la fertilisation azotée pendant la phase prairiale d'une prairie temporaire

Il est important de rappeler que les effets notables de la gestion de la fertilisation azotée de la prairie dans cette étude ont été des arrières effets sur les paramètres du sol après trois ans de culture. La prairie temporaire de 6 ans fertilisée ne semble pas avoir un arrière effet sur les stocks de carbone, d'azote et de phosphore du sol, contrairement aux attentes et aux résultats précédents de la littérature (Christensen *et al.*, 2009; Lemaire *et al.*, 2015).

La prairie temporaire non fertilisée présente les stocks de carbone et d'azote les plus faibles de tous les traitements après 9 ans. De plus les sols de prairie non fertilisée présentent après 3 ans de culture, une signature en nutriments différente avec les ratios C/N et C/P les plus faibles. Ainsi, en plus d'un stockage de carbone plus faible, cela révèle une MOS plus dégradé avec une contribution plus forte du carbone microbien (Kirkby *et al.*, 2013). Cela peut s'expliquer par les interactions entre les molécules phosphorées et azotées du sol. En effet, il a été démontré que l'apport de fertilisants azotés au sol augmente l'absorption en phosphore des plantes par l'augmentation de leur productivité, qui les amène à la solubilisation du phosphore stocké dans le sol (Adams 1980; Dodd *et al.*, 2012). Nous pouvons émettre comme hypothèse que la limitation en azote pourrait augmenter les pertes de phosphore par lessivage dues à la diminution d'absorption par les plantes et donc une réduction de l'organisation du phosphore au sein de la MOS, mais peut-être une réduction de la formation de MOS (Knicker, 2011). Cette hypothèse est en accord avec la proportion d'IP plus élevée dans le traitement TG6N- avec 57% ce qui est plus élevé que dans les sols culturaux.

La signature des sucres des sols semble aussi être un paramètre des MOS impacté par la gestion de la fertilisation après 3 ans de culture. Les concentrations en sucre du sol de prairie non fertilisée sont les plus faibles mais normalisées au carbone du sol elles sont les plus élevées. Aussi les polysaccharides sont à majorité microbiens, comme l'indiquent les ratios des monomères et plus dégradés dans ces sols et tout particulièrement dans la fraction POM confirmant la sensibilité aux modes de gestion de cette fraction du SOC (Post and Kwon, 2000). Par contre la fertilisation de la prairie temporaire n'a aucun effet sur les teneurs ou concentration en lignine bien que la teneur en lignine du sol soit sensible à la fertilisation azotée (Kiem and Kögel-Knabner, 2003). Il est intéressant de noter que les composés dits labiles comme les sucres, qui contrôlent lors de la phase initiale de décomposition des MOS (Rumpel *et al.*, 2015), montrent un arrière effet de la fertilisation après 3 ans de culture, alors que la lignine reconnue comme récalcitrante ne présente pas de différence. Cela va dans le sens des études récentes qui remettent en question l'idée que le turnover des MOS est linéairement corrélé au niveau de complexité moléculaire, c'est à dire à la récalcitrance des MOS. La dynamique des MOS est plus influencée par les paramètres physiques et microbiologiques du sol (Sollins *et al.*, 1996; Kiem and Kögel-Knabner 2003; Amelung *et al.*, 2008; Cotrufo *et al.*, 2013). Toutefois, dans notre cas les caractéristiques microbiennes montrent peu d'arrière effets. Nous avons constaté un arrière effet de la gestion de prairie en ce qui concerne la quantité et le rapport C/N de la biomasse microbienne et la minéralisation de l'azote, alors qu'aucun effet n'a été observé pour la quantité et l'utilisation microbienne du compartiment carbone.

Les processus de stabilisation des MOS ne semblent pas être modifiés, ce qui indiquent une répartition du carbone organique et des sucres similaires pour la prairie temporaire fertilisée, celle non fertilisée et la culture. Toutefois, les prairies temporaires fertilisées montrent des propriétés intermédiaires entre la prairie permanente et la culture, un résultat déjà observé par d'autres études (e.g. Soussana *et al.*, 2004). Ce profil est aussi celui qui ressort de l'ACP incluant tous les paramètres du sol étudiés. Ainsi, la fertilisation de la phase de prairie est une pratique, qui semble sensible aux mêmes paramètres distinguant un sol de culture d'un sol de prairie. L'absence de fertilisation azotée de la prairie temporaire ne permet pas au sol de changer ses caractéristiques tendant vers un sol prairial comme on peut l'observer pour les sols des prairies temporaires fertilisées. Cela montre que la fertilisation des prairies temporaires est nécessaire à la séquestration de MOS et de phosphore (Conant *et al.*, 2001; Lal 2004; Knicker 2011; Rumpel *et al.*, 2015).

Par contre le bilan des émissions de GES estimé en kgeqC mets en évidence que le système de prairie temporaire non fertilisée est celui qui émettrait le moins de GES. De plus, la prairie temporaire fertilisée présente un bilan d'émissions de GES intermédiaire entre la culture et la prairie permanente. Ces résultats s'expliquent par le fait que le facteur d'émissions du N_2O déterminé par le GIEC est calculé sur la base des apports en engrais azotés (Soussana *et al.*, 2004; ADEME 2010).

3. Arrières effets de la durée de la phase prairiale d'une prairie temporaire

Les arrières effets de la durée de phase de prairie sont visibles mais semblent particulièrement difficiles à comprendre de par la notion d'état transitoire du sol entre un sol de type culture et un sol de prairie. Certaines variables du sol étudiées suivent un profil révélant un effet progressif de l'âge des prairies temporaires, avec les prairies temporaires intermédiaires entre le témoin culture et le témoin prairie continue. Certaines variables ont une réponse inattendue de la durée de la phase de prairie avec un effet non progressif en fonction de l'âge et une réponse indépendante pour la prairie temporaire de 3 ans. Dans une étude Acharya *et al.*, (2012) a aussi observé une réponse inattendue de la biomasse racinaire dans la prairie de 3 ans expliquée par un problème de méthode. Au vu des résultats, cela pourrait révéler la particularité d'une prairie avec une durée de quelques années seulement (< 6 ans).

Ces deux types de réponse sont très bien illustrés par l'ACP des paramètres du sol. On décrit une première composante distinguant la prairie permanente des modalités étant en culture les trois années précédentes. La seconde composante distingue significativement la prairie de 3 ans des autres modalités. Ainsi elle révèle les paramètres du sol sensibles à l'état transitoire qui présente des arrières effets différents comparée à la prairie de 6 ans tels l'état de dégradation des lignines, les concentrations en phosphore et la DOC.

La prairie temporaire de 3 ans permet de stocker plus d'azote, de carbone et de phosphore dans les sols par rapport à la culture mais aussi par rapport à la prairie de 6 ans (non significatif pour le carbone et le phosphore entre TG3N+et TG6N+). Et même si on n'observe pas de variation des ratios C/N et C/P du sol, ni de la répartition du carbone dans les fractions étudiées, la signature des MOS au sein des compartiments physiques est différente. Par ce fait le C/N des fractions du sol de la prairie de 3 ans, nous affirme que la MOS est moins dégradée pour les POM mais plus dégradée dans S+A et rSOC par rapport au sol de culture permanente (Kirkby *et al.*, 2013). Pourtant l'état de dégradation des fractions des MOS de la prairie de 6 ans ne se différencie pas de celui de la culture. Aussi la signature des lignines de par un ratio (Ac/Al)S plus faible et un S/V plus grand dans les sols sous prairie de 3 ans par rapport au sol sous prairie de 6 ans montre une lignine moins dégradée (Kögel 1986; Bahri *et al.*, 2006). Il est intéressant de constater que dans ce cas où nous étudions l'effet de la durée de la phase prairie, les sucres du sol ou même des fractions ne présentent aucune différence alors que la signature des lignines est moins dégradée, réponse contraire à l'effet de la

fertilisation de la phase de prairie. Ainsi la plus grande proportion de MOS observée dans la prairie la plus courte semble être sous forme particulière, non dégradée et moins stabilisée que celle des sols de la prairie de 6 ans.

Tout de même, l'augmentation de la durée de la phase de prairie semble avoir un arrière effet sur les concentrations en nitrate du sol. L'augmentation en nitrate observée pour les prairies temporaires plus longues pourrait avoir l'effet d'améliorer les rendements de la culture suivante à fertilisation égale (Christensen *et al.*, 2009).

Il sera très intéressant d'observer le devenir sur le long terme de ces stocks de MOS faiblement stabilisées car en fonction de l'âge, les prairies ne vont pas présenter les mêmes réponses face au stockage-déstockage du carbone. En particulier, la réponse des prairies aux perturbations pourrait être différente suivant leur état : transitoire du système ou l'atteinte d'un équilibre. Cet équilibre semble pouvoir être atteint rapidement après quelques années, mais cela dépend conjointement des facteurs tels que le climat, le sol mais aussi le carbone du sol initial (Conant *et al.*, 2001). Dans notre cas une signature prairiale des sols semble être atteinte après 6 ans de prairie temporaire.

IV. *Conclusion*

Cette étude analyse la nature biomoléculaire et la stabilisation des MOS dans les sols de prairie en comparaison à ceux de culture, ainsi que les arrières effets de la gestion de la phase de prairie lorsqu'elle est introduite dans une rotation de culture. Les sols de prairie présentent une capacité à stocker plus de carbone que les sols de culture principalement grâce à une augmentation des apports de litière et ce malgré une stabilisation des MOS plus faible. Ainsi contrairement aux attentes, la prairie temporaire de 6 ans fertilisée ne semble pas avoir un arrière effet sur les stocks de carbone, d'azote et de phosphore du sol mais présente une signature des MOS intermédiaire entre la prairie permanente et la culture. La gestion de la fertilisation azotée comme de la durée de la phase de prairie présente des arrières effets sur les MOS. La fertilisation azotée des prairies temporaires semble nécessaire à la mise en place des mécanismes améliorant les MOS et particulièrement les sucres du sol mais aussi à la réduction des pertes en phosphore. Les MOS ont une réponse inattendue de la gestion de la durée de la phase de prairie avec un effet non progressif en fonction de l'âge pour certaines variables. On observe une réponse indépendante pour la prairie temporaire de 3 ans qui permet de stocker plus d'azote, de carbone et de phosphore dans les sols par rapport à la culture mais aussi par rapport à la prairie de 6 ans. Les arrières effets de la gestion différente de la durée de phase de prairie semblent particulièrement difficiles à comprendre de par la notion d'état transitoire entre un sol sous culture et un sol de prairie.

PARTIE 2. Effets de graminées et d'une légumineuse cultivées en monoculture ou en mélange sur la matière organique du sol et les formes de phosphore

Article publié dans Plant and soil (2016) ; DOI 10.1007/s11104-015-2740-x

Effects of grasses and a legume grown in monoculture or mixture on soil organic matter and phosphorus forms

CREME Alexandra^{1,2}, RUMPEL Cornélia^{2,3}, GASTAL François⁴, MORA GIL, Maria de la Luz⁵, CHABBI Abad^{1,2}.

1 : INRA, UR P3F, 86600 Lusignan, France.

2 : INRA, ECOSYS UMR INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78850 Thiverval-Grignon, France.

3 : CNRS, IEES UMR, UPMC, CNRS, UPEC, IRD, INRA, 78850 Thiverval-Grignon, France.

4: INRA, UE FERLUS, 86600 Lusignan, France

5: BIOREN-UFRO, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

I. *Abstract*

Legume use in forage production may replace mineral fertilizer N input by biological nitrogen fixation in grass-legume mixtures. However, these systems may also have high phosphorus requirements. The aim of the study was to determine the amount and composition of C, N and P forms in grassland soil under two different graminaceous species grown in monoculture or in mixture with a legume.

Cocksfoot and tall grass fescue were grown for four years as N-fertilized (165 kg ha^{-1}) monocultures or in mixture with N_2 -fixing lucerne. We analyzed for forage yields, soil organic matter (SOM) storage, and soils' content of soluble as well as insoluble mineral and organic N and P forms.

Our data showed higher forage yields on plots with lucerne compared to plots with N fertilized graminaceous species. Lucerne proportion in mixtures changed from 40% to more than 80% after 4 years. Despite similar SOM contents, we observed changes of soluble and insoluble N and P forms. Inorganic P consumption by lucerne seemed to be reduced in mixtures and storage of organic P enhanced in some cases.

Different plant species and mixtures may have specific effects on soil parameters related to organic matter most probably due to plant specific rhizosphere effects. Negative effects of legumes on soil P may be attenuated when grown in mixture with grass. Ultimately, the effect of N-fertilizer replacement by legumes on SOM and nutrient forms may depend on the graminaceous species used for the mixture.

II. *Introduction*

Nitrogen (N) is limiting crop production of many agricultural soils, and N addition is needed to increase yields and sustain food production (IPCC, 2013). Because of the severe environmental impacts of synthetic N fertilizer in intensive agricultural systems (Robertson and Vitousek, 2009), the reduction of their use is a scientific and political priority (Erisman *et al.*, 2011b). It has been suggested that returning to cultivation of leguminous plants, able to fix atmospheric dinitrogen by means of symbiosis with *Rhizobium* (biological nitrogen fixation – BNF), may be an alternative solution to enrich soil with nitrogen (Crews and Peoples, 2004; IPCC, 2013). For example, lucerne (also known as alfalfa, *Medicago sativa* L.), a major forage legume, accumulates during its growth phase from 300 to 400 kg N ha⁻¹yr⁻¹ (Kelner *et al.*, 1997; Carlsson and Huss-Danell 2003; Angus and Peoples 2012).

Although legumes are able to compensate by BNF for the absence of fertiliser N, soil phosphorus (P) availability may limit their growth (Roscher *et al.*, 2011). Leguminous plants with the capacity of BNF generally have higher P demands than graminaceous ones grown with mineral N fertiliser (Robson *et al.*, 1981a). Lucerne is known to deplete plant available soil P (Olsen P) (Bell *et al.*, 2012) and other inorganic phosphorus (IP) forms (Crews, 1996). Results concerning the effect of lucerne on organic soil phosphorus (OP) forms are contradictory. While (Daroub *et al.*, 2001) found a higher OP content in available form after 4 years of lucerne cultivation, (Crews, 1996) did not observe any effect on total OP when lucerne was cultivated as intercrop. Also OP seems to be correlated to carbon (C) in soil under lucerne (Daroub *et al.*, 2001) and may therefore be involved in the formation of soil organic matter (SOM). In intensively used grasslands, BNF may favour biogeochemical coupling between C and N cycles and thus accumulation of SOM (Paustian *et al.*, 1990), while there is a danger to uncouple these cycles with synthetic N fertiliser use, leading to shorter residence times of soil C (Rumpel *et al.*, 2015; Soussana and Lemaire, 2014). However, the C storage capacity of intensively used soils may also depend on the presence and availability of P (Kirkby *et al.*, 2014).

When combining grasses with legume species in grassland systems, BNF may be more efficient with 9% to 18% more N fixed as compared to legume monocultures (Nyfeler *et al.*, 2011; Schipanski and Drinkwater 2012). Thus the effect of leguminous plants on soil C and nutrient stocks may even be stronger when grown in mixture as compared to monocultures (Paustian *et al.*, 1990; Fustec *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2012; Schipanski and Drinkwater 2012; Bell *et al.*, 2012).

However, the linkages between aboveground plant communities and nutrient forms present in soil have rarely been investigated. Recent studies showed that mixtures with different legume species may have contrasting effects on soil N status (Li *et al.*, 2015) and plant N nutrition (Louarn *et al.*, 2015). These studies revealed non linear effects related to species specific interactions. We thus hypothesised that different grass species could have contrasting effects on soil parameters, when grown in mixture with a legume.

In this study we analysed topsoil under two grasses – cocksfoot also known as orchard grass (*Dactylis glomerata*) and tall fescue (*Festuca arundinacea*) – which were grown for 4 years in monoculture or associated with lucerne (*Medicago sativa*) in grass-legume mixtures. Grass monocultures received synthetic N fertiliser, while BNF was the sole N source for grass-legume mixtures. The aim of this study was to evaluate the effect of monocultures and different grass-legume associations on SOM storage and forms of major nutrients. We hypothesized that plant communities with and without legume, especially through the replacement of N fertilisation by BNF, could have contrasting effects on biomass production and soil nutrient forms, which in turn could impact quantity and composition of SOM. We analyzed for forage production, N fixation, soils organic and inorganic C, N, and P contents as well as their soluble forms.

III. *Results*

1. Forage yields and composition

Forage yields for lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F), and their mixtures (cocksfoot/lucerne, DM; tall fescue/lucerne, FM) during the 4-year-experiment are presented in Figure 26. The data show that forage production in the first year of the experiment was similar in grass monocultures and grass-lucerne mixtures, ranging between 9379 kg ha⁻¹ and 12371 kg ha⁻¹(+/- 25 kg ha⁻¹). After 4 years, significantly higher forage yields were recorded for all treatments with lucerne as compared to grass monocultures. Forage yields of mixtures increased by 47% for tall fescue/lucerne and by 110% for cocksfoot/lucerne mixtures (Figure 26). Lucerne contribution to forage from mixtures increased during the experiment from 30-40% in 2009 to more than 85% in 2012 (Figure 27).

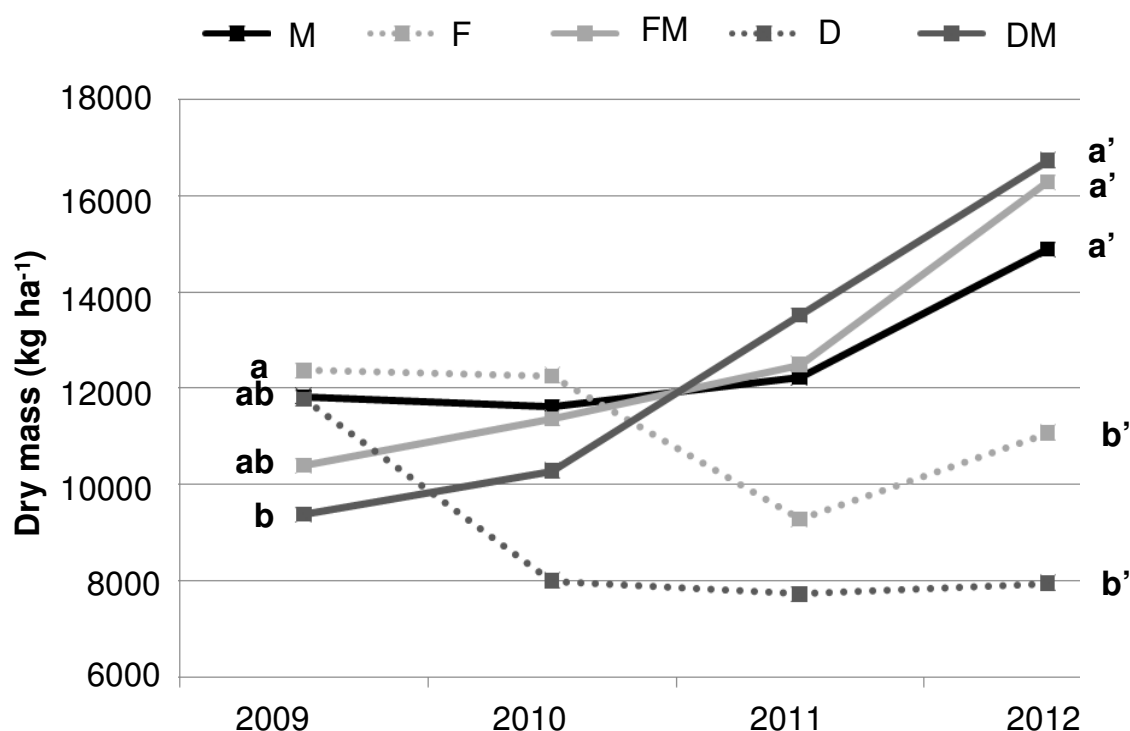


Figure 26. Forage yield for lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) during the 4 year experiment; Data obtained in the first year and last year of the experiment were subjected to statistical analyses. Different letters indicate significant differences between treatments (n=4; a,b 2009 et a',b' 2012).

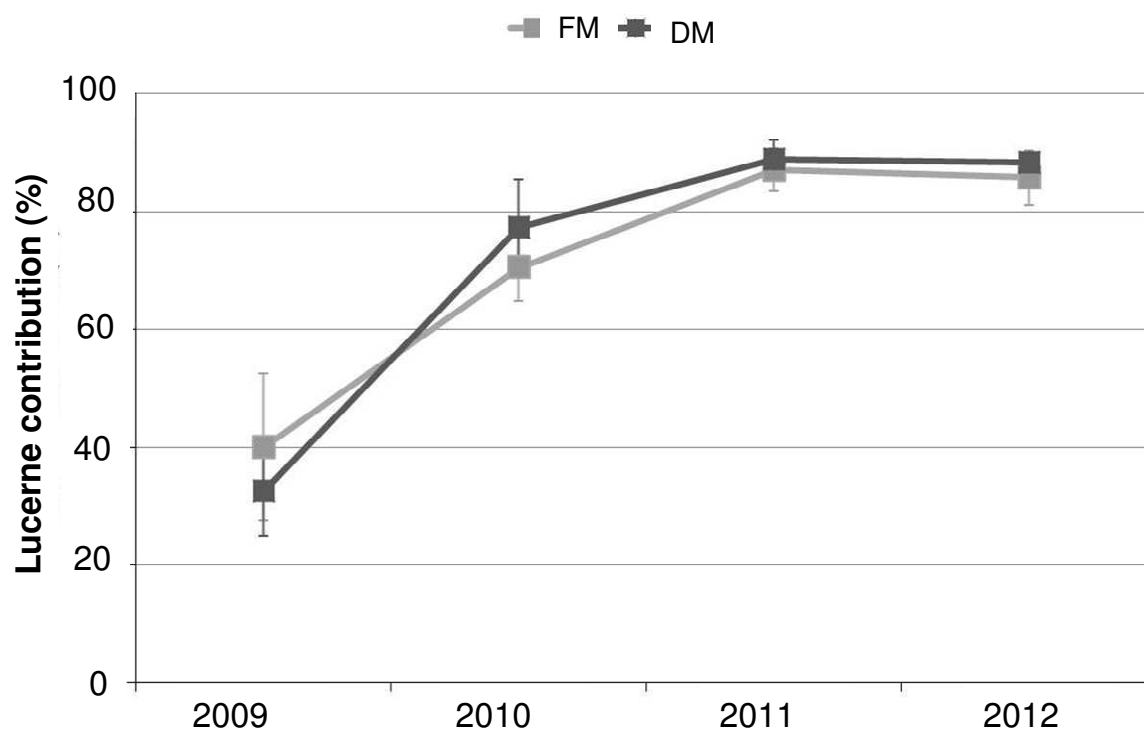


Figure 27. Development of lucerne contribution to legume-grass mixtures (cocksfoot/lucerne (DM) and tall fescue/lucerne (FM)) during the four year experiment. Data are presented as mean and standard deviation (n=4).

2. Lucerne N fixation : monoculture and mixtures

The amount of N fixed by lucerne monocultures was between 227 and 280 kg ha⁻¹ and increased slightly during the 4 year experiment (Figure 28). In mixtures, calculated N input by BNF in the fourth year was between 335 and 354 kg ha⁻¹, whereas monocultures received through fertilization 165 kg ha⁻¹ (Table 12). Lucerne monocultures and grass mixtures received thus through BNF much higher N additions as compared to grass monocultures through N-fertilization. However, the amount of N added by BNF varied during the four year period. For mixtures, it increased during the experimental period (Figure 28).

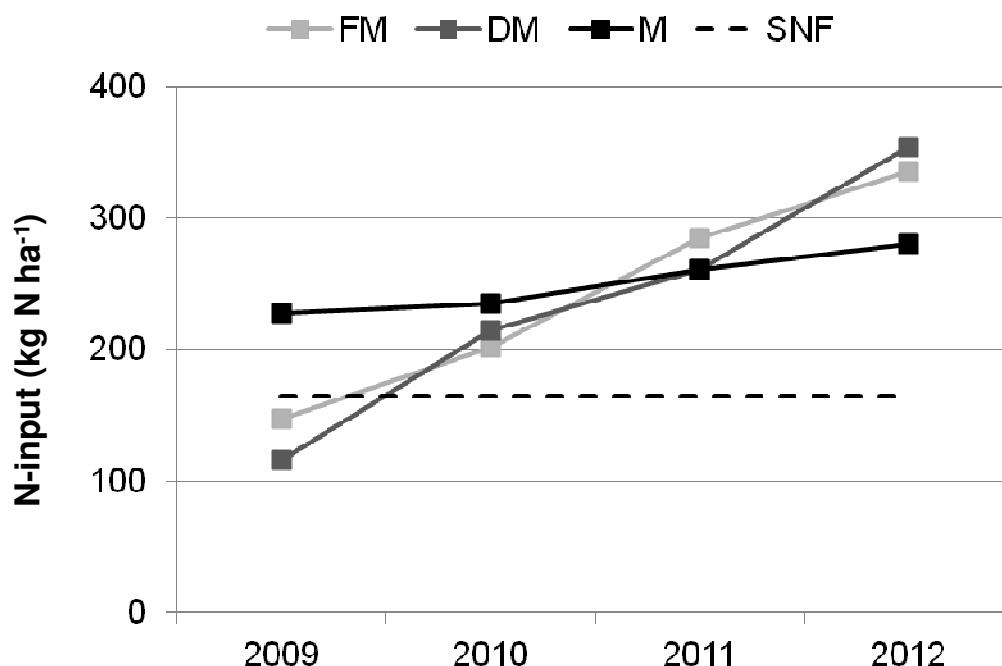


Figure 28. Amount of nitrogen added to soil by BNF under lucerne monoculture (M), cocksfoot/lucerne (DM) and tall fescue/lucerne (FM) mixtures as well as the amount of mineral N fertilizer input to soil under grasses monocultures (D and F) during the four year experiment.

3. Plant C, N and P content and harvest exportation

The C concentration of forage was analyzed in the last year of the experiment. It ranged between 432.6 and 441.4 g kg⁻¹ and was lowest for lucerne grown in monoculture (Table 12). However, due to the higher forage yields, the C exported by harvest was with 3593 and 4664 kg C ha⁻¹ lower for grass monocultures than for lucerne monoculture (Table 12). For mixtures, C export was much higher than for monocultures and the highest export was recorded for cocksfoot/lucerne mixture with 7179 kg C ha⁻¹ (Table 12).

Lucerne showed with 34.5 g kg⁻¹ and 5.4 g kg⁻¹ the highest N and P contents. Its N content was up to three times higher than those of grasses, while its P content was more than doubled as compared to tall fescue (Table 12). Consequently forage from grass monocultures showed higher C/N and C/P ratios than forage from lucerne monoculture or mixtures. The contrasting N and P contents resulted in very different export of these elements from the treatments. While cocksfoot and tall fescue monocultures showed similar N export with 94-104 kg N ha⁻¹, P export was significantly higher for cocksfoot monoculture than for tall fescue monoculture. P and N export were highest for

cocksfoot/lucerne mixture followed by lucerne monoculture and tall fescue/lucerne mixture (Table 12). For lucerne monoculture and cocksfoot/lucerne mixture the P and N export in 2012 largely exceeded the annual input (Table 12).

Table 12. Forage characteristics of biomass harvested from all treatments: lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) in the last year of the experiment (2012). Data are presented as mean of 3 replicates.

	C	N	P	C/N	C/P	C export	N input	N export	P input	P export
	gkg ⁻¹	gkg ⁻¹	gkg ⁻¹			kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹
M	432.6 ^c	34.5 ^a	5.4 ^a	12.5	80	6022 ^b	280	483 ^{ab}	40	75 ^b
F	437.5 ^{ab}	9.7 ^c	1.9 ^e	45.1	230	4664 ^c	165	104 ^c	40	20 ^c
FM	438.5 ^{ab}	24.6 ^b	3.6 ^d	17.8	121	6823 ^{ab}	335	383 ^b	40	56 ^c
D	441.4 ^a	11.6 ^c	4.3 ^c	38.1	102	3593 ^c	165	94 ^c	40	35 ^d
DM	435.8 ^{bc}	30.7 ^a	4.9 ^b	14.2	88	7179 ^a	354	506 ^a	40	81 ^a

4. Carbon and nitrogen forms

Table 13. Carbon forms in soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment. Data are presented as mean of 6 replicates.

	C	Cmic	C/N
	mg g ⁻¹	μg g ⁻¹	
M	12.2 ^a	114.7 ^{ab}	9.7 ^b
F	13.0 ^a	128.2 ^a	10.1 ^a
FM	13.2 ^a	104.0 ^{ab}	9.9 ^{ab}
D	13.0 ^a	114.4 ^{ab}	10.0 ^a
DM	12.7 ^a	103.2 ^b	9.8 ^b

^{ab}Different letters indicate significant differences between treatment

The soil C and N forms are presented in Table 13 and Table 14. Soil C contents ranged between 12.2 and 13.2 mg g⁻¹ (Table 13) while soil N contents ranged between 1.25 and 1.33 mg g⁻¹ (Table 14). Both were not significantly different between the treatments. Similar to Cmic, Nmic showed a trend to higher concentrations under grass monoculture than under mixtures (Table 13 and Table 14). The mineral N content was very low compared to total N, implying that most soil N was present in organic form (Table 14). The ammonium concentrations ranged between 6.33 and 7.59 μg g⁻¹ and were similar for all treatments, whereas nitrate concentrations were lower for soil under tall

fescue compared to soil under treatments with lucerne and cocksfoot (Table 14). In the case of soil under tall fescue/lucerne mixture greatly increased nitrate concentrations were noted compared to soils under monocultures.

Table 14. Nitrogen forms in soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment. Data are presented as mean of 6 replicates.

	N mg g ⁻¹	IN µg g ⁻¹	N-NH₄⁺ µg g ⁻¹	N-NO₃⁻ µg g ⁻¹	Nmic µg g ⁻¹
<i>M</i>	1.25 ^a	8.47 ^{ab}	6.33 ^a	2.14 ^{bc}	7.0 ^a
<i>F</i>	1.29 ^a	8.15 ^b	6.35 ^a	1.80 ^c	8.7 ^a
<i>FM</i>	1.33 ^a	9.34 ^{ab}	6.79 ^a	2.55 ^a	7.1 ^a
<i>D</i>	1.30 ^a	9.60 ^a	7.14 ^a	2.46 ^{ab}	7.5 ^a
<i>DM</i>	1.31 ^a	10.02 ^a	7.59 ^a	2.43 ^{ab}	7.1 ^a

^{abc}Different letters indicate significant differences between treatments

5. Phosphorus forms

Soil P was analysed using the Hedley fractionation method, which allows for the quantification of organic and inorganic forms of soluble and insoluble P. Total soil P content (sum of all Hedley fractions, Table 15) ranged between 649 to 728 µg g⁻¹ and decreased in the order of cocksfoot > tall fescue > lucerne. A trend towards lower soil P content under mixtures as compared to grass monocultures could also be noticed (Table 15).

The soil IP content (sum of inorganic Hedley fractions, Table 15) ranged between 388 and 459 µg g⁻¹ and followed a similar pattern as total soil P. It represented approximately 60% of total P and it was highest under N-fertilized grass monocultures (Table 15). Soils under lucerne showed the lowest IP concentrations (Table 15).

The soil OP content (sum of organic Hedley fractions, Table 15) was lowest in soil under lucerne monoculture with 256 µg g⁻¹ and showed with 281 µg g⁻¹ the highest content in soil under cocksfoot/lucerne mixture. It represented almost 40% of total P and the soils under grass monocultures showed the lowest OP contribution. The highest OP contribution was noted in soil under lucerne monoculture and cocksfoot/lucerne mixture.

Approximately 25% of total P was present in the residual fraction. The concentrations of Olsen P were between 105 and 121 µg g⁻¹ and did not vary significantly between treatments.

Table 15. Phosphorus forms (sum of Hedley fractions and Olsen P) in soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment. Data are presented as mean of 6 replicates.

	P Olsen content μgg^{-1}	Total P^β content μgg^{-1}	IP^δ content μgg^{-1}	OP^³ content μgg^{-1}	IP^δ distribution % of total P	OP^³ distribution % of total P
M	105 ^a	649 ^d	388 ^c	256 ^b	60.6 ^{bc}	39.4 ^{ab}
F	107 ^a	697 ^{bc}	436 ^b	261 ^b	62.5 ^a	37.5 ^c
FM	109 ^a	680 ^{cd}	423 ^b	257 ^b	62.2 ^{ab}	37.8 ^{bc}
D	121 ^a	728 ^a	459 ^a	269 ^{ab}	63.1 ^a	36.9 ^c
DM	113 ^a	711 ^{ab}	431 ^b	281 ^a	60.5 ^c	39.5 ^a

^β P : sum of phosphorus determined in Hedley fractions

^δ IP : sum of inorganic phosphorus determined in Hedley fractions

^³ OP : sum of organic phosphorus determined in Hedley fractions.

6. Inorganic phosphorus fractions

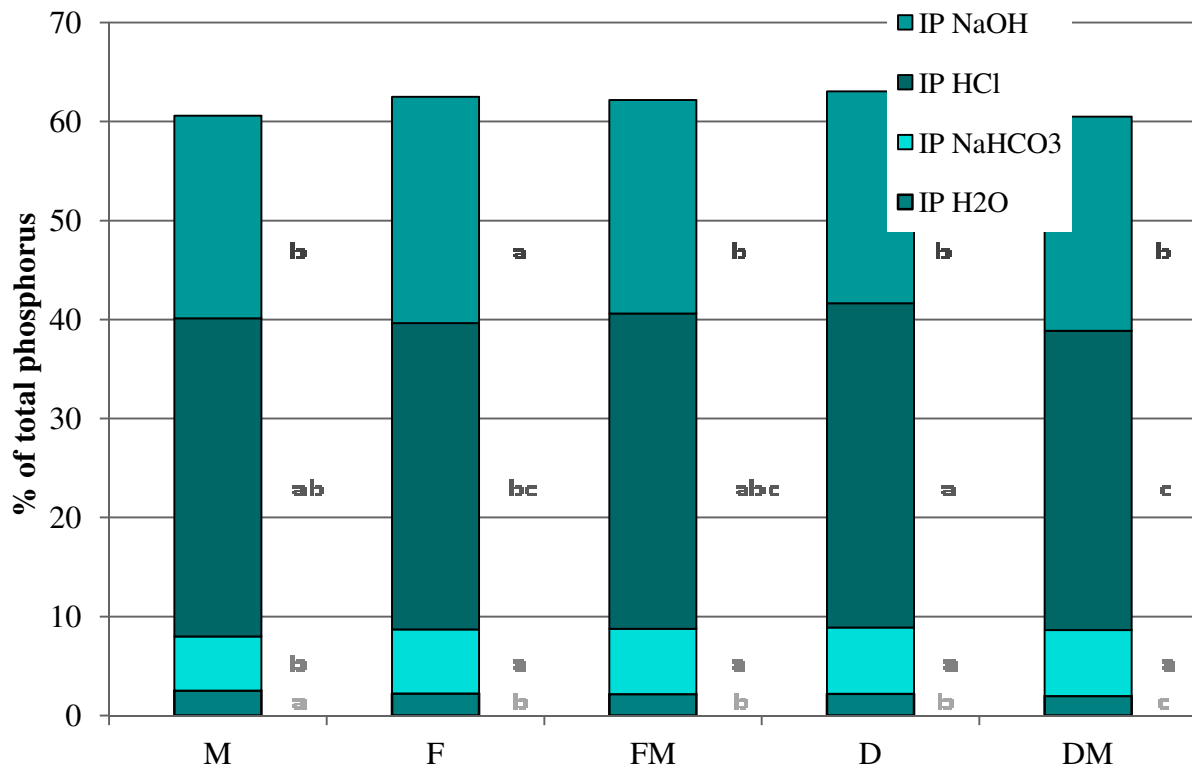


Figure 29. IP fractions in soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment. Different letters indicate significant differences between treatments (n=6).

The contribution of IP fractions to total P (sum of Hedley fractions) decreased in the order $\text{HCl} > \text{NaOH} > \text{NaHCO}_3 > \text{H}_2\text{O}$ (Figure 29). Differences in the contribution of IP fractions were noted between soils under lucerne and grass monocultures. The contributions of IP_{NaOH} and $\text{IP}_{\text{NaHCO}_3}$ were lower under lucerne while that of $\text{IP}_{\text{H}_2\text{O}}$ was higher. In soil under mixtures, no

consistent trend could be observed between different grass species. In soil under tall fescue/lucerne mixture only the contribution of IP_{NaOH} was slightly lower compared to soil under tall fescue monoculture, whereas under cocksfoot/lucerne mixture IP_{H_2O} and IP_{HCl} were decreased compared to soil under cocksfoot monoculture.

7. Organic phosphorus fractions

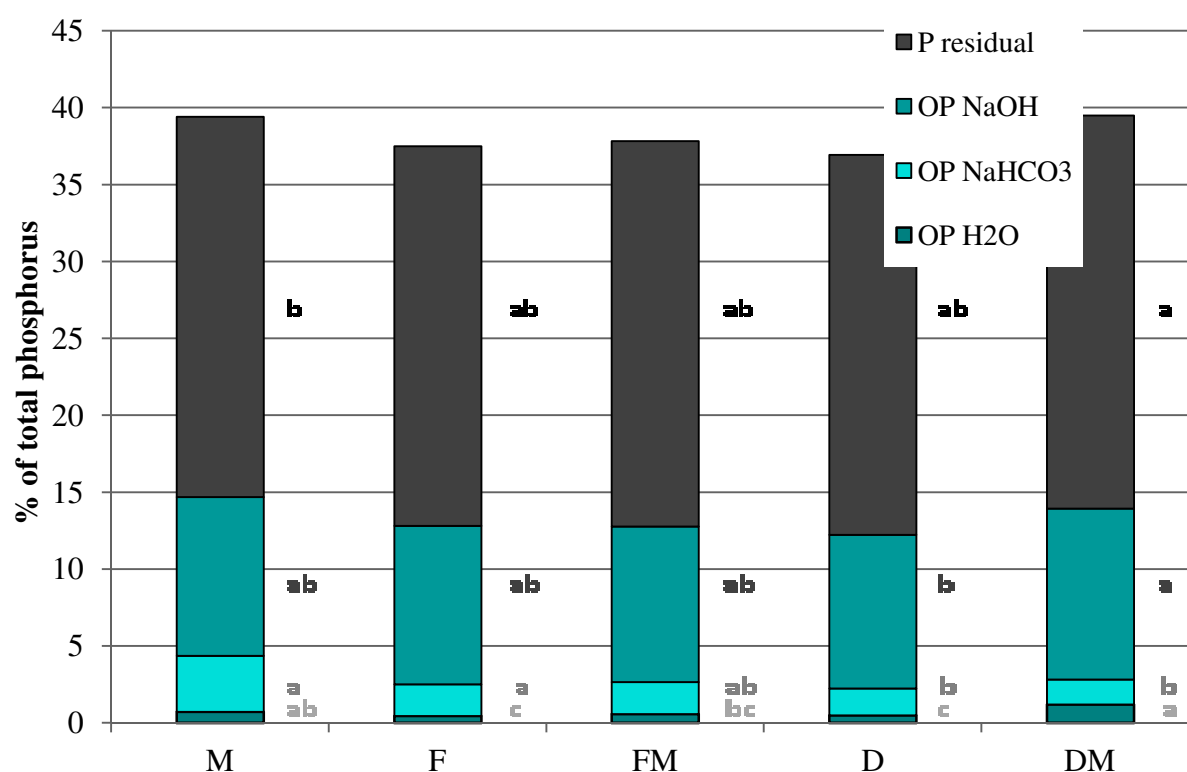


Figure 30. OP fractions in soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment (n=6). Different letters indicate significant differences between treatments (n=3).

The contribution of soluble OP fractions to total P (sum of Hedley fractions) decreased in the order $NaOH > NaHCO_3 > H_2O$ (Figure 30). Differences in the contribution of OP fractions in soil under lucerne compared to grass monocultures included lower OP_{H_2O} and a tendency to lower OP_{NaHCO_3} . No difference of OP forms was noted in soil under tall fescue/lucerne mixture compared to tall fescue monoculture. In contrast, soil under cocksfoot/lucerne mixture showed higher OP_{H_2O} and OP_{NaOH} contribution as compared to soil under cocksfoot monoculture. Thus similar to IP forms,

no consistent changes could be observed for grass-legume mixtures in comparison to their monocultures.

8. Principal component analyses

Principal component analyses (PCA) were carried out with all soil parameters (Figure 31). The first two components explain 48.45% of the total variability. The representation of treatments in the PCA plan shows clear separation of the three monocultures. Soils under mixtures with lucerne were both different from soils under lucerne monocultures, but they showed greater variability as compared to soils under grass monocultures.

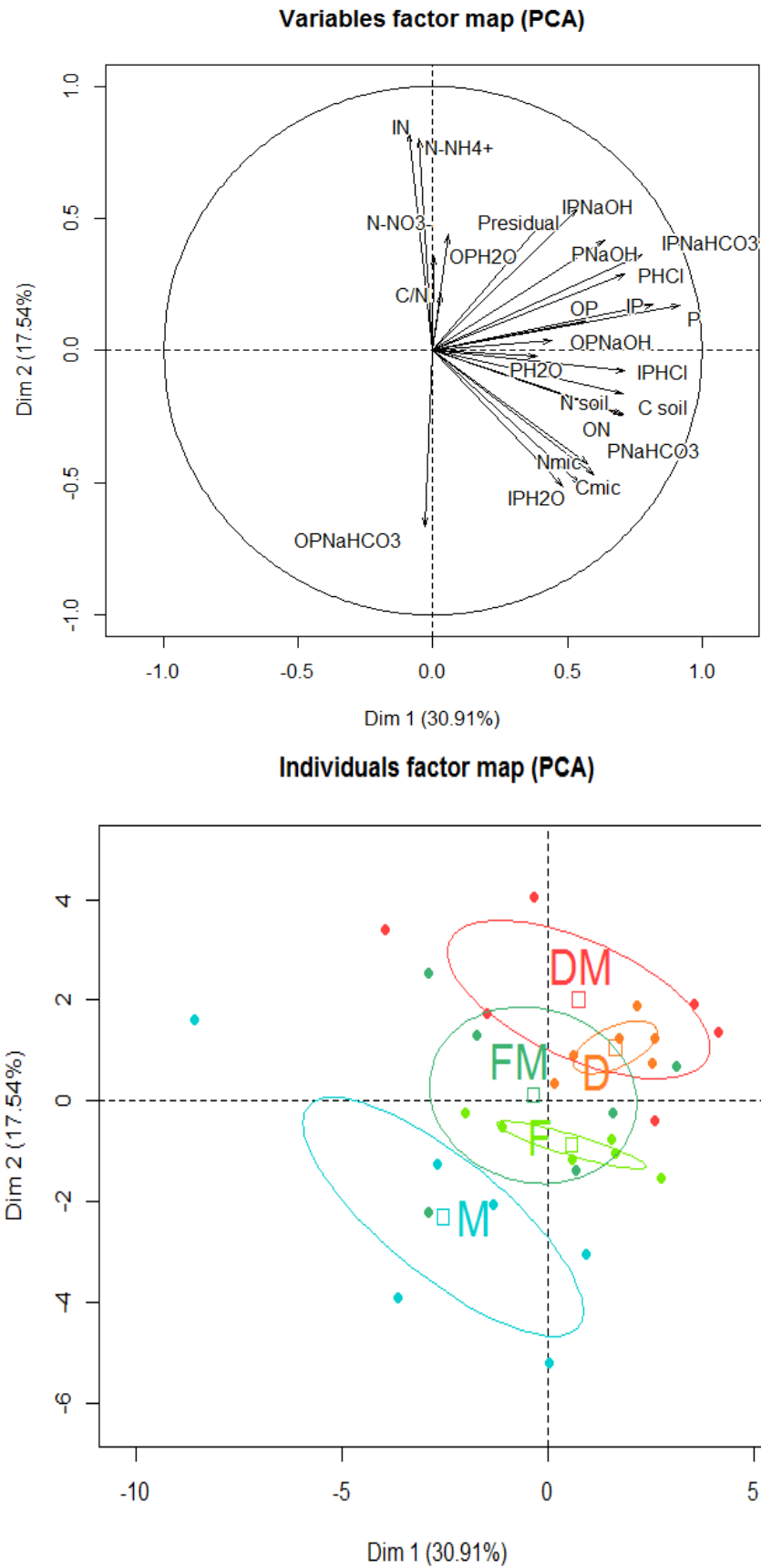


Figure 31. PCA of soil data recorded after 4 years of treatment under lucerne (M), cocksfoot (D) and fescue (F) and their mixtures (DM and FM).

IV. *Discussion*

1. **Forage production : carbon, nitrogen and phosphorus budgets**

Forage production was lowest for grass monocultures and increased for treatments with lucerne, which may be related to higher N input by BNF than mineral fertilization. Forage yields of lucerne treatments were in the range of values observed by other authors (Louarn *et al.*, 2015; Schipanski and Drinkwater, 2012). They were lower than those observed by others for grass monocultures probably due to the low amounts of N-fertilizer used compared to intensively managed grasslands (Oomes, 1990). High forage yield for lucerne compared to grass monocultures and increase of lucerne proportion during the trial despite similar available N concentrations might be explained by their greater resistance to water stress (Sanaullah *et al.*, 2011a; Annicchiarico *et al.*, 2015), which strongly affected our experiment during last years' summers. Indeed, in 2010 and 2011, annual precipitation was with 650 mm lower than usual, with very dry summer months. This assumption is further supported by previous work of (Sanaullah *et al.*, 2012) who showed experimentally (using $^{14}\text{CO}_2$ pulse labeling) the capacity of legume species to attenuate drought effects by rhizosphere processes.

BNF of lucerne increased with the age of the plants, as observed by (Kelner *et al.*, 1997). Mixture with grass increased forage yields as compared to lucerne monoculture in accordance with higher rates of BNF under grass/legume mixtures as compared to legume monoculture (Rasmussen *et al.*, 2012). This was explained by competition for soil N and also facilitation of soil N uptake between different species for example due to different root systems (Carlsson and Huss-Danell, 2003; Schipanski and Drinkwater, 2012) and N transfer between legumes and grasses (Louarn *et al.*, 2015). The availability of soil N was found to be related to the proportion of legumes in the mixture with an optimum at 1:1 (Li *et al.*, 2015), suggesting that our data represent lower than optimum availability, as legume proportion in the last year was 80%. This may be the reason why no trend towards higher soil nitrate concentration was noticed in cocksfoot/lucerne mixture. A different observation was made, when lucerne was grown in mixture with tall fescue. Under this treatment the soil nitrate concentration significantly increased as compared to fescue monoculture, showing that the nitrate demand of tall fescue is compensated by increased availability following N-input by BNF. Additionally, nitrogen mineralization could have been increased due to complex interactions influencing nitrogen mineralization and immobilization in soil under grass-legume mixtures as

compared to soil under monocultures (Barrios *et al.*, 1997; Marcial Redin, 2014). Our study shows that these complex interactions, which may stimulate the active microbial community differently in soils under the treatments with and without legume, may in soils under mixtures be influenced by the type of grass used for the mixture.

Similar to other studies (Fustec *et al.*, 2010), forage N content was increased in the presence of lucerne, whereas C content of forage from mixtures was similar to those of forage from grass monocultures. In treatments with lucerne, N and P export was in all cases higher than the input. However, the amount of exported nutrients from mixtures depended on the associated grass species. In lucerne monocultures and grass-lucerne mixtures with cocksfoot N and P export in 2012 greatly exceeded the input, while mixture with tall fescue seemed to decrease these exports. This may be explained by species-related differences in N uptake, as well as N transfer mechanisms, e.g. direct root transfer or transfer via rhizodeposition (Louarn *et al.*, 2015) and contrasting root exudation stimulating differently microbial activity (Sanaullah *et al.*, 2011a) and hence N availability in the rhizosphere. This suggests that grassland management and in particular species choice may influence harvesting exports from the system.

2. Soil organic matter

Soil and microbial C and N concentrations were similar for all treatments. This is in contrast to other studies showing increased soil C and N stocks in the presence of lucerne (Paustian *et al.*, 1990) as well as increased soil C_{mic} and N_{mic} contents (Li *et al.*, 2012). Unchanged C and N stocks under lucerne were also noted by (Bell *et al.*, 2012), and explained by export of aboveground biomass through harvest. Also we can think that only four years of experiment was not enough to see significant variations. Despite the similar soil C and N contents, the C/N of soil showed significant variations between treatments. It was lower in soil under lucerne compared to grass monoculture, reflecting the pattern of plant C/N.

3. Soil phosphorus

Soil P storage followed different dynamics depending on the plant species used for the treatment. The lowest soil P content was recorded under lucerne despite same P fertilizer input as in the other treatments. Soil P tended to be lower under mixtures as compared to monocultures. This

illustrates the high P consumption by legumes (Smith 1992; Crews 1996; Roscher *et al.*, 2011; Peñuelas *et al.*, 2012) and subsequent export with the harvested biomass.

The high consumption of soil P by lucerne was most visible for IP, which showed the lowest contribution to the soil P pool because of its availability to plants (Condrón and Tiessen, 2005). Soil IP content was lowest under lucerne followed by cocksfoot/lucerne and tall fescue/lucerne mixtures. However the depletion of IP is less severe under mixtures compared to lucerne monoculture and therefore seems to be attenuated by grass presence.

In addition to contrasting IP content, the distribution of IP fractions was slightly different in soil under treatments with and without lucerne. In soil under tall fescue/lucerne mixture the IP_{NaOH} fraction was reduced as compared to soil under tall fescue monoculture, while under cocksfoot/lucerne mixture the IP_{HCl} , which is an important P source for lucerne (Daroub *et al.*, 2001), was lower than in soil under cocksfoot monoculture.

The distribution of P fractions was different and sometimes contradictory in soil under grass monocultures and grass/lucerne mixtures. Higher soil OP in presence of lucerne (Daroub *et al.*, 2001) was visible only when comparing cocksfoot/lucerne mixture to cocksfoot monoculture (Figure 30). This treatment showed higher contribution of OP_{H_2O} , which is considered to be mobile and easily available in soil and an environmentally relevant fraction (Turner and Leytem, 2004). Moreover, higher contribution of OP_{NaOH} was observed, which is considered as a stable OP form (Cross and Schlesinger, 1995). Despite its stable nature, this pool may be involved in short term microbial transformation processes (Oberson *et al.*, 1996), which may be affected by the presence of legumes (Daroub *et al.*, 2001). The IP consumed by plants may be immobilized as OP and returned with belowground plant litter (Condrón and Tiessen, 2005; Mullen, 2005). In soil under lucerne, these processes may lead to accumulation of soil OP (Daroub *et al.*, 2001). Even if OP is less available for plants in the short term, it may be accessible to the microbial biomass and become available with time. However, the impact of lucerne on soil P forms under mixtures may depend on the grass species used, which may change P speciation probably related to plant specific traits.

4. Effect of lucerne introduction on soil parameters under grasses

To analyze the effect of lucerne or grass monocultures and their mixtures on chemical parameters related to SOM, we carried out a principal component analyses (PCA) with all soil parameters. Clear separation of the three monocultures in the PCA plan may be explained by the fact that different plant species have contrasting effects on soil properties. Plant species may alter soil

properties due to biophysical and biogeochemical processes occurring in the rhizosphere, which are poorly understood (Hinsinger *et al.*, 2009). For example, it has been shown that grasses and legume species have different effects on the diversity of root associated microorganisms (Grayston *et al.*, 1998), amount of microbial biomass, amount and composition of exudates released into the rhizosphere (Sanaullah *et al.*, 2011a) as well as mycorrhiza colonization (Barea *et al.*, 1989). Our study shows that these effects may lead after four years of grassland installation to contrasting soil characteristics under different species.

Our PCA further indicates that soil parameter under the two mixtures were similar. However, soil under lucerne monoculture is differentiated from all others treatments indicating that plant mixtures have different effect on soil properties than monocultures (Sanaullah *et al.*, 2011a; Sanaullah *et al.*, 2012). Further studies are necessary to elucidate specific plant traits determining the mechanisms underlying these effects.

V. *Conclusion*

This study analyzed the effect of forage grasses grown in monoculture or mixture with a legume on forage yield, soil organic matter and soil P forms. Highest forage yields were recorded for mixtures, which received also the highest N-input through BNF. Mixtures showed differences in soil P forms and other soil parameters depending on the associated grass species. Our results indicate that different plant species have specific effects on soil C/N ratios, N and P forms and content. In the presence of lucerne we observed higher soil NO_3^- and OP content as well as lower IP content. It seems that cocksfoot/lucerne mixture is doing better in terms of forage yield and OP content than tall fescue/lucerne mixture. The mechanisms underlying these effects still need to be elucidated but they may most probably be related to plant specific rhizosphere effects. Mixture with graminaceous species could attenuate high IP consumption by lucerne and may lead to storage of OP. Ultimately, the impact of legumes on SOM and soil nutrient status may depend on the graminaceous species used for the mixture.

PARTIE 3. Influence des légumineuses sur les formes du carbone organique des sols de prairie sous luzerne et associations luzerne-graminées.

Article soumis dans Plant and soil

Biogeochemical nature of grassland soil organic matter under plant communities with two nitrogen sources

CREME Alexandra^{1,2,3}, CHABBI Abad^{1,2}, GASTAL François⁴, RUMPEL Cornelia^{2,3}

1 : INRA, UR P3F, 86600 Lusignan, France.

2 : INRA, ECOSYS UMR (INRA-AgroParisTech, Université Paris Saclay), 78850 Thiverval-Grignon, France.

3 : CNRS, UPMC, IEES UMR (UPMC, CNRS, UPEC, IRD, INRA), 78850 Thiverval-Grignon, France.

4 : INRA, UE FERLUS, 86600 Lusignan, France.

I. *Abstract*

Legumes are used in forage agriculture to replace mineral N fertilizer by biological N fixation. We hypothesised that N addition through biological N fixation may have different effects on SOM quantity and composition than mineral N fertilization. The aim of this study was to examine the influence of lucerne introduction in grasslands on C stocks and roots' and soils' molecular C signatures.

Lucerne, cocksfoot and tall fescue were grown for four years as monocultures or mixtures. Grass monocultures were N-fertilised (SNF), while lucerne monoculture and mixtures received N through biological N₂ fixation (BNF). We analysed quantity and composition of (1) non cellulosic neutral sugars after acid hydrolysis and (2) lignin after CuO oxidation of roots isolated from soil and soil samples taken from 0-30 cm depth.

Our data showed species-specific chemical signatures for roots extracted from soil. Lucerne presence increased the roots' N content and lowered their lignin/N ratio. Four years of contrasting root input (amount and chemical composition) did not impact SOM stocks as they were similar in all treatments. We observed different chemical signatures for soil under mixtures as compared to lucerne monoculture. In particular, the state of SOM degradation was enhanced under mixtures.

Higher litter input with better quality in soils receiving BNF did not increase SOM storage. When lucerne was grown in mixture with grass we observed more degraded lignin and carbohydrate signatures as compared to monocultures. Therefore, we suggest that lucerne introduction into grassland influences OM degradation more than its stabilization. After four years, SOM molecular signatures were little influenced by type of N fertilization and showed little difference among the treatments despite species specific root composition.

II. *Introduction*

In the actual agricultural context, nitrogen (N) fertilisation of soil is necessary to maintain crop production and sustain food production (IPCC, 2013), but negative environmental impact of synthetic nitrogen fertiliser (SNF) invites us to consider alternative agricultural practices (Crews and Peoples, 2004). N fertilisation in forage agricultural systems may be achieved by biological nitrogen fixation (BNF) through the use of leguminous plants. For example, Lucerne (*Medicago sativa*) introduction into grasslands, may be able to replace SNF, while maintaining soil organic matter (SOM) content and forage production (Paustian *et al.*, 1990; Fustec *et al.*, 2010; Crème *et al.*, 2016). This practice may be a solution for lowering the environmental as well as economic cost of N fertilization (Crews and Peoples, 2004; Graham and Vance, 2003; IPCC, 2013). In forage systems with legumes, N addition to soil through BNF of atmospheric dinitrogen by means of symbiosis with *Rhizobia*, may be important and reach globally between 12 and 25 Tg N yr⁻¹ (Herridge *et al.*, 2008). As a result, soil N is likely to increase with BNF and soil C may be enhanced due to higher plant biomass production (Carlsson and Huss-Danell 2003; Mortenson *et al.*, 2004; Fustec *et al.*, 2010; Schipanski and Drinkwater 2012).

The biogeochemical cycles of C and N in soil are intimately linked with the nature of organic matter input, which may be influenced by the cultivation of gramineous or leguminous plants (Rumpel *et al.*, 2015). In particular, root derived compounds could control soil organic matter dynamics and carbon sequestration (Kuzyakov *et al.*, 2000; Rasse *et al.*, 2005). Plant species through root exudation and rhizodeposition may influence the sugar and lignin signatures of soil (Thevenot *et al.*, 2010; Vranova *et al.*, 2013). Sugars represent 50% of plant residues, and may be of two types: cellulose consisting of glucose units and hemicellulose, consisting of sugar units other than glucose (Kögel-Knabner, 2002). Non-cellulosic polysaccharides, which compose up to 30% of plant residues (Wolf and Wagner, 2005) have a lower degree of polymerization than cellulose (Kögel-Knabner, 2002). Lignin is the second most important plant litter compound and the most important aromatic plant constituent (Kiem and Kögel-Knabner, 2003; Kögel-Knabner, 2002). It represents with up to 35% a consequent part of plant litter input into soil (Wolf and Wagner, 2005). Lignin is composed of aromatic rings of three types (coniferyl, sinapyl and p-coumaryl), whose contribution depends on the plant species (for example 1:1:1 for grass lignin against 94:1:5 in spruce) (Kögel-Knabner 2002; Thevenot *et al.*, 2010).

Due to their contrasting nature, polysaccharides and lignins behave differently when added to soil. Non-cellulosic polysaccharides with a low degree of polymerization are rapidly degraded by soil microorganisms. They are thus labile compounds (Kuzyakov *et al.*, 2000; Kögel-Knabner 2002;

Rumpel and Dignac 2006). In contrast, aromatic lignin molecules are more difficult to degrade. They are mineralizable only by a restricted number of decomposers (white-rot fungi) and may therefore be classified as recalcitrant compounds (Frei, 2013; Kögel-Knabner, 2002).

It has been suggested that microbial carbon use efficiency depending on plant litter chemistry may be an important control of SOM formation (Cotrufo *et al.*, 2013). In addition to chemistry, the fate of plant litter compounds added to soil depends on nutrient availability with higher degradation rates (Cotrufo *et al.*, 2013) but also higher C sequestration when nutrients are added (Kirkby *et al.*, 2014). For example, soil lignin content may be influenced by N fertilization (Kiem and Kögel-Knabner, 2003) as well as N mineralization potential (Vahdat *et al.*, 2011). The replacement of SNF by BNF through legume introduction into forage systems changes the type, timing and location of N input and may therefore affect SOM decomposition as well as its stabilisation. Moreover, fodder grasslands with legumes receive plant litter input of contrasting quality as compared to grassland without legumes. Indeed, litter of leguminous species is characterized by lower C/N ratios as compared to grasses (Vahdat *et al.*, 2011), and may thus show different degradation kinetics (Sanaullah *et al.*, 2010). In addition different plant species associations may influence SOM formation as well as available N and P forms in a contrasting manner (Angers and Mehuys 1989; Pérès *et al.*, 2013; Kirkby *et al.*, 2014; Crème *et al.*, 2016). Up to now, little is known about the nature of OM in grassland soils under different species associations with and without legumes.

In this study, we addressed the influence of lucerne association with grass species (cocksfoot and tall fescue) on SOM under forage grassland requiring annual N input. The aim of the study was to quantify C storage and to characterize the chemical nature of C stocks in soil under fertilized grass monocultures as compared to those under legume monoculture and legume-grass mixtures five years after their establishment. We hypothesized that SOM composition may depend on chemistry of root litter input and that it may therefore be contrasting under different plant species and particularly under legumes versus grasses. We analyzed for roots' and soils' lignin as well as carbohydrate content and composition.

III. *Results*

1. **Composition of roots**

a. Carbon and nitrogen concentrations

Carbon and Nitrogen concentrations of roots ranged between 293.9 and 344.5 mg g⁻¹ for C and 7.53 and 12.84 mg g⁻¹ for N (Table 16). They were impacted by treatments, showing increased C concentrations when roots were separated from soil under mixtures as compared to grass monocultures. Similar observations were made for N concentrations of roots, which were lowest when they were separated from soil under grass monocultures. This also led to reduction of C/N ratios in roots sampled from soil under lucerne and lucerne-grass mixtures as compared to grass monocultures (Table 16).

Table 16. Soil C and N stocks and roots' elemental composition for lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM). Data are presented as mean of 6 replicates.

	soil C stock (t ha ⁻¹)	soil N stock (t ha ⁻¹)	Root C (mg g ⁻¹)	Root N (mg g ⁻¹)	Root C/N
<i>M</i>	52.4 ^a	5.4 ^a	344.5 ^b	12.84 ^a	26.8 ^d
<i>F</i>	56.0 ^a	5.6 ^a	344.3 ^b	7.53 ^c	46.2 ^a
<i>FM</i>	56.9 ^a	5.7 ^a	370.2 ^a	12.81 ^{ab}	29.2 ^c
<i>D</i>	55.9 ^a	5.6 ^a	293.9 ^c	9.08 ^c	33.0 ^b
<i>DM</i>	54.9 ^a	5.6 ^a	340.8 ^b	12.38 ^b	27.5 ^{cd}

^{abcd} Different letters indicate significant differences between treatments - Kruskal Wallis test.

b. Content and forms of root carbohydrates

Sugar content of root tissues isolated from soil ranged between 40 and 50.4 % of C without significant differences between treatments (Table 17a). We observed no differences in contribution of C6 and C5 monomers for roots under the different treatments. However, the desoxyC6/C5 ratio showed a treatment effect (Table 17a). It was higher for roots separated from soil under lucerne and lucerne-grass mixtures as compared to grass monocultures (Table 17a).

Table 17. Sugar signature of soil and roots for lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM). Data are presented as mean of 6 replicates for soil and 3 replicates for roots.

a. Root sugar content and composition

	content (% C)	concentration (mg g ⁻¹)	C6/C5*	desoxyC6/C5*
M	50.4 ^a	150.4 ^a	0.31 ^a	0.080 ^a
F	39.9 ^a	152.4 ^a	0.32 ^a	0.033 ^{bc}
FM	40.4 ^a	138.9 ^a	0.33 ^a	0.077 ^a
D	41.2 ^a	144.7 ^a	0.31 ^a	0.026 ^c
DM	44.4 ^a	140.1 ^a	0.32 ^a	0.053 ^b

b. Soil sugar content and composition

	content (% C)	concentration (mg g ⁻¹)	C6/C5*	desoxyC6/C5*	xylose /mannose
M	37.1 ^a	4.5 ^{ab}	2.33 ^a	0.57 ^a	0.40 ^a
F	35.7 ^{ab}	4.6 ^a	1.83 ^a	0.36 ^b	0.68 ^a
FM	33.4 ^{abc}	4.4 ^{ab}	2.40 ^a	0.34 ^{bc}	0.31 ^a
D	29.7 ^c	3.9 ^b	2.08 ^a	0.28 ^c	0.65 ^a
DM	30.9 ^{bc}	4.0 ^b	2.62 ^a	0.36 ^b	0.38 ^a

^{abc} Different letters indicate significant differences between treatments - HSD Tukey test.

* refers to the ratio of microbial C6 sugars (mannose and galactose) over plant-derived C5 sugars (arabinose and xylose)

c. Content and composition of root lignins

The lignin C content of roots separated from soil under lucerne was with 3.47 % C lower as those of roots separated from soil under grass species, which showed a lignin content of 6.34 % C for fescue and 5.30 % C for cocksfoot (Table 18a). Lignin content of roots separated from soil under monocultures was significantly different for all species and decreased in the order fescue > cocksfoot > lucerne. Consequently the roots separated from soil under lucerne-grass mixtures showed lower lignin contents as compared to roots separated from soil under grass monocultures; this difference was significant for lucerne-fescue mixture only (Table 18a). The lignin parameters (Ac/Al)_V and (Ac/Al)_S did not indicate differences, while Co/V and S/V ratios showed contrasting values for roots separated from soil under the different treatments. The Co/V ratio was higher for roots separated from soil under lucerne-cocksfoot mixture (DM: 1.01) as compared to cocksfoot monoculture (D: 0.55), whereas the S/V was differentiated for roots separated from soil under lucerne-fescue mixture

(FM: 1.14) as compared to roots separated from soil under fescue monoculture (F: 1.72). The lignin/N ratio of roots was highest in soils under the two graminaceous monocultures. It decreased for roots sampled from soil under treatments characterized by lucerne presence (Table 18a).

Table 18. Lignin signature of soil and roots for lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM). Data are presented as mean of 6 replicates for soil and 3 replicates for roots.

a. Roots lignin content and composition

	content (% C)	concentration (mg g ⁻¹)	(Ac/Al) _V *	(Ac/Al) _S *	Co/V*	S/V*	Lignin/N
M	3.47 ^c	12.0 ^b	0.16 ^a	0.14 ^b	0.17 ^b	0.96 ^c	0.93 ^c
F	6.34 ^a	21.8 ^a	0.16 ^a	0.16 ^{ab}	0.52 ^b	1.72 ^a	2.93 ^a
FM	3.76 ^c	13.9 ^b	0.18 ^a	0.19 ^{ab}	0.49 ^b	1.14 ^b	1.11 ^c
D	5.30 ^{ab}	15.5 ^b	0.20 ^a	0.21 ^a	0.55 ^b	1.17 ^b	1.75 ^b
DM	4.49 ^{bc}	15.3 ^b	0.18 ^a	0.18 ^{ab}	1.01 ^a	1.24 ^b	1.23 ^c

b. Soil lignin content and composition

	content (% C)	concentration (mg g ⁻¹)	(Ac/Al) _V *	(Ac/Al) _S *	Co/V*	S/V*	Lignin/N
M	2.1 ^a	0.26 ^a	0.36 ^c	0.62 ^a	0.31 ^{ab}	1.44 ^{ab}	0.20 ^a
F	2.0 ^{ab}	0.26 ^a	0.36 ^c	0.56 ^{ab}	0.36 ^a	1.55 ^a	0.21 ^a
FM	1.7 ^{abc}	0.22 ^{ab}	0.95 ^a	0.44 ^{ab}	0.18 ^{bc}	0.94 ^c	0.17 ^{ab}
D	1.6 ^{bc}	0.21 ^{ab}	0.54 ^b	0.54 ^{ab}	0.33 ^a	1.27 ^b	0.16 ^{ab}
DM	1.2 ^c	0.16 ^b	1.04 ^a	0.41 ^b	0.16 ^c	0.82 ^c	0.12 ^b

^{abc} Different letters indicate significant differences between treatments - HSD Tukey test.

* refers to acid to aldehyde ratios of Vanillyl and Syringyl lignin monomers (Ac/Al)_V, S and to ratios between different lignin monomers (Coumaryl, Vanillyl and Syringyl).

2. Composition of soil

a. Carbon and nitrogen stocks

Carbon stocks ranged between 52 and 57 t ha⁻¹ without significant differences between the treatments (Table 16). N stocks were about 10 times lower with 5.4 to 5.7 t ha⁻¹. All treatments presented similar N stocks (Table 16).

b. Content and form of non cellulosic soil carbohydrates

Soil non cellulosic carbohydrate concentrations ranged between 3.9 and 4.6 mg g⁻¹ (Table 17b). Highest soil sugar C content was recorded under lucerne with 37.1 % of total C, but there was no significant impact of lucerne, when we compared soil under grass monocultures with those under lucerne-grass mixtures (Table 17b). No significant differences were noted for the C6/C5 ratio of soil under the different treatments. The desoxyC6/C5 ratio in soil ranged between 0.28 and 0.57 (Table 17b), and was highest for soil under lucerne. Soil under lucerne-cocksfoot mixture showed higher ratios than soil under cocksfoot monoculture (Table 17b), indicating higher concentration of microbial sugars in the presence of lucerne.

c. Content and composition of soil lignin

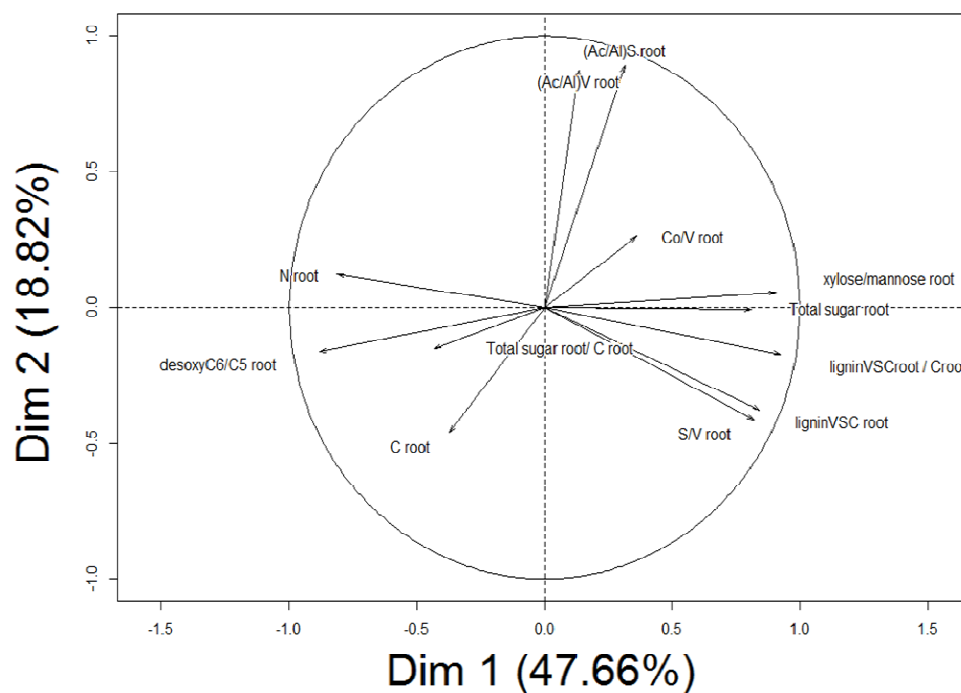
Soil lignin concentrations ranged between 0.16 and 0.26 mg g⁻¹ (Table 18b). The highest lignin content was observed for soil under lucerne with 2.1 % of total C and the lowest content was recorded for soil under lucerne-cocksfoot mixture with 1.2 % of total C (Table 18b). Soil under the three monocultures showed significantly lower (Ac/Al)_v ratios than those under the two lucerne-grass mixtures (Table 18b). Conversely, the S/V ratios were higher for soil under monocultures than under lucerne-grass mixtures (Table 3b). The lignin/N ratios tended to be lower in soil under lucerne-grass mixtures as compared to those under grass monocultures (Table 18b).

3. Principal component analysis

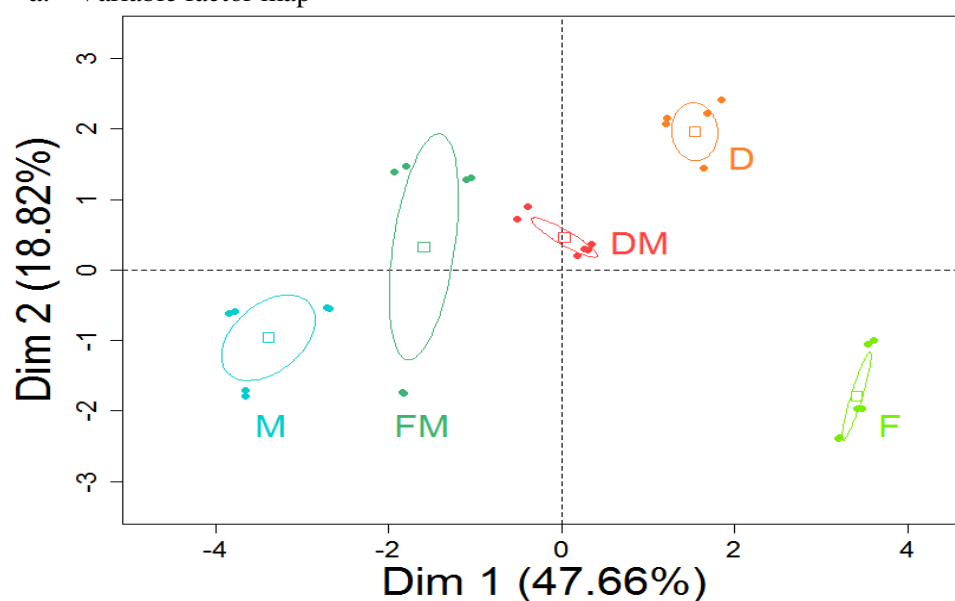
Principal component analysis (PCA) was carried out separately for root parameters (Figure 32) and soil parameters (Figure 33).

For roots, the first two components explained 66.48% of the total variability (Figure 32). The first dimension (47.66%) was related positively to lignin parameters (ligninVSC content and concentration and S/V ratio) (Figure 32a) and also to sugar parameters (concentration and xylose/mannose ratio). Negative correlations with this axis were noted for root N and desoxyC6/C5 ratio. The second dimension (18.82%) was related positively to (Ac/Al)_v and (Ac/Al)_s ratios (Figure 32a). The representation of treatments in the PCA plan showed clear separation of the five treatments with lucerne-grass mixtures being intermediate between grass and lucerne monocultures.

For soil, the first two components explained 63.19% of the total variability (Figure 33). The first dimension (35.74%) was related to soil lignin parameters (positively to ligninVSC, Co/V, S/V, (Ac/Al)_S and negatively to (Ac/Al)_V) (Figure 33a). The second dimension (27.45%) was related positively to soil C and N concentration and negatively to sugar parameters (concentration, content and desoxy C6/C5 ratio) (Figure 33a). The individual representation of treatments in the PCA plan showed clear separation of the lucerne-grass mixtures and the lucerne monoculture along the first axis. Grass monocultures showed no specific pattern.

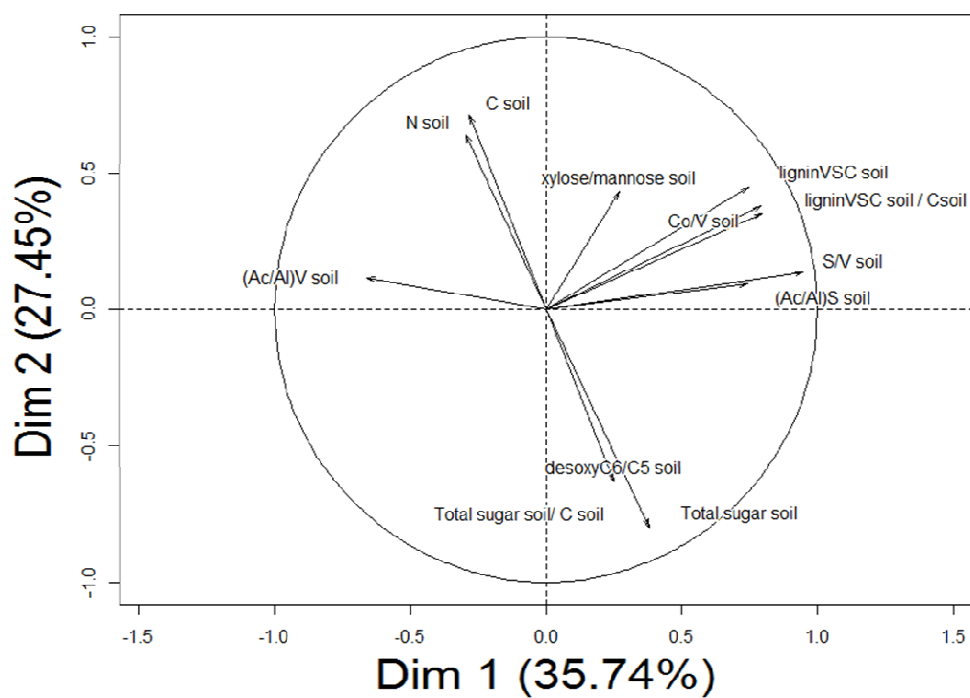


a. Variable factor map

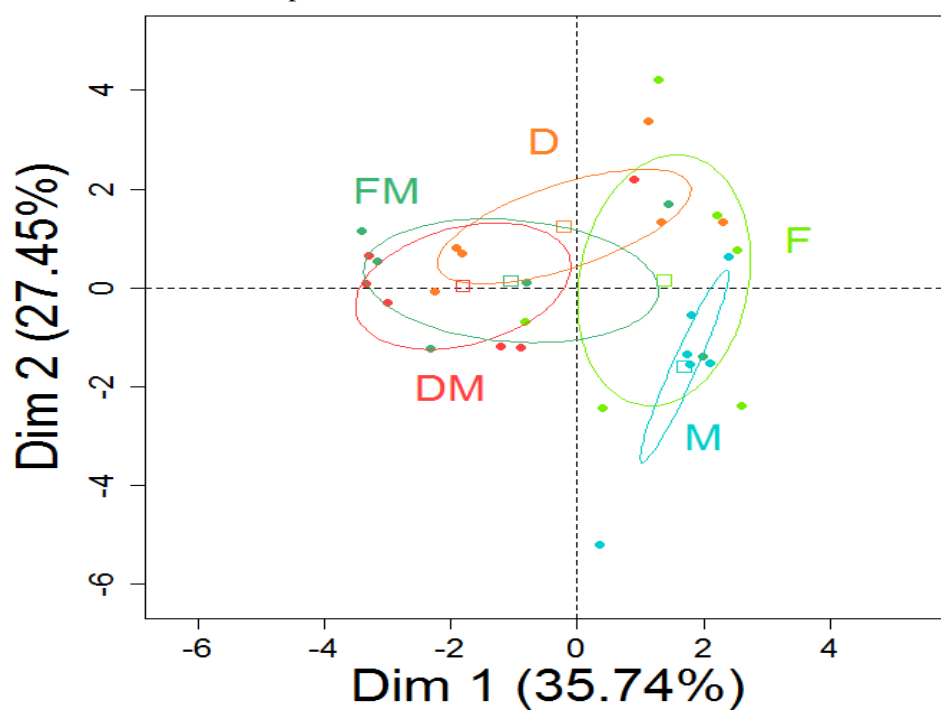


b. Individual factor map

Figure 32. Principal component analysis for roots separated from soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM).



a. Variable factor map



b. Individual factor map

Figure 33. Principal component analysis for soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM).

IV. *Discussion*

1. **Root chemical composition impacted by lucerne introduction into forage grassland.**

The C content of roots depended on grassland composition (mixture versus monocultures), while the roots' N content was characteristic for plant functional groups (legume and grass). In agreement with results from other authors (Pellerin *et al.*, 2010; Vahdat *et al.*, 2011; Fustec *et al.*, 2010), the roots' N content was much higher for lucerne root tissue as compared to grass root tissues, therefore leading to lower C/N ratios of roots separated from soil under lucerne or lucerne grass mixtures as compared to roots separated from soil under grass monocultures.

Our results indicated root sugar contents ranging between 39.9 and 50.4% of C. Despite the similar roots' total sugar content for all plants, our results suggested a species specific sugar signature. Indeed, while the C6/C5 ratios were similar for all roots, the desoxyC6/C5 ratio was higher, when roots were isolated from soil under lucerne or mixtures as compared to roots isolated from soil under grasses, suggesting microbial transformation. In general, this ratio indicates the degree of microbial processing in soil due to the decomposition of plant derived C5 sugars and synthesis of microbial derived desoxyC6 sugars during decomposition (Murayama, 1984). Higher desoxyC6/C5 ratio for lucerne root tissue suggests that there is an increase of metabolic microbial sugars most probably related to the presence of active bacteria in root nodules.

The lignin concentration of roots separated from soil ranged between 12.0 and 21.8 mg g⁻¹. Lower values were recorded for lucerne roots as compared to grasses. These results are in contrast with the literature (Van Soest 1964; Thomas and Asakawa 1993; Krämer *et al.*, 2012), which indicates higher lignin concentration for lucerne than grasses analyzed by the detergent fiber Van Soest method. We suggest that these contrasting observations may be explained by methodological differences. The Van Soest lignin fraction may contain tannin, suberin, cutin and other aliphatic molecules, while those are not determined with the CuO oxidation method (Rasse *et al.*, 2005; Thevenot *et al.*, 2010).

Lignin content of lucerne roots was with 3.4% of total C lower than in grass roots, consistent with results from other authors (Pellerin *et al.*, 2010). Therefore, the lignin content of roots isolated from soil under mixtures were lower as compared to those isolated from soil under grass

monocultures. In addition, grass roots showed significant differences in terms of monomer composition and lignin/N ratios.

These differences led to a clear separation of roots isolated from soil under the different treatments, when the data were analyzed by PCA. We thus suggest that roots separated from soil have a species specific chemical signature able to differentiate gramineous as well as leguminous forage plants.

2. Influence of lucerne introduction into forage grassland on soil carbon signatures

Our results indicated a soil content of non-cellulosic carbohydrates between 29.7 and 37.1% of C. Although the highest sugar content in soil under lucerne is in agreement with other studies (Angers and Mehuys, 1989), the sugar content of soil under lucerne-grass mixtures was not higher than those of soil under grass monocultures most probably because the sugar content of root tissues did not show any differences. A similar pattern was noted for soil lignin, which was higher under lucerne but not significantly with concentrations ranging between 0.16 and 0.26 mg g⁻¹.

Sugars are a group of molecules that occur both in plants as well as in microorganisms. Plant sugars are characterized mainly by pentoses (C5) while microbial sugars show higher hexose (C6) content (Oades, 1984). Thus, the C6/C5 ratio increases with higher contribution of microbial sugars. The majority of soil sugars may be of microbial origin, when C6/C5 > 2, while they are of plant origin, when C6/C5 < 0.5 (Oades, 1984). The C6/C5 ratios for soils indicated a tendency towards more important contribution of microbial-derived sugars under lucerne than under grasses. This is in agreement with the highest desoxyC6/C5 ratio recorded in soil under lucerne and cocksfoot-lucerne mixture and may indicate more intensive decomposer activity in soils under lucerne and mixtures than in soil under grass monocultures. The soil lignin signature under lucerne and mixtures supported this hypothesis. Indeed, significantly higher (Ac/Al)_v ratios and significantly lower Co/V and S/V ratios were noted for lucerne grass mixtures as compared to grass monocultures, which revealed higher state of lignin decomposition (Kögel 1986; Bahri *et al.*, 2006).

According to the literature, legumes are characterized by high root biomass production (Fornara and Tilman 2008; Milcu *et al.*, 2008), which is in agreement with the high yield of aboveground biomass for lucerne and grass lucerne mixtures, observed in this experiment (Crème *et al.*, 2016). Therefore, the belowground biomass and thus also the lignin concentration in soil under mixtures should be higher than in soil under grass monocultures. Our results are contradictory as

they indicate a similar or even lower lignin content and concentration in all soils under mixtures. Moreover the state of lignin degradation was significantly increased under mixtures as compared to grass monocultures. Therefore, advanced lignin degradation state and similar content despite high input may suggest more rapid lignin and thus plant litter degradation under mixtures, due to higher N availability. Higher N availability for OM degradation under lucerne is most probably related to intimate association of N and C within the plant tissue and also timing of N release. C and N cycles are tightly coupled in soils receiving BNF. Mineral N addition through SNF may not be able to stimulate OM degradation in a similar way, as the state of lignin degradation was lower in soil under grass monocultures. It is interesting to note that all monocultures showed similar lignin degradation regardless the type of N fertilization, suggesting that inter-specific plant and microbial interactions in the rhizosphere related to competition for nutrients among different plant species may strongly influence litter degradation and hence SOM formation.

Recently it was shown that microbial use efficiency determines soil C stabilization through microbial decomposition products and their interaction with the soil mineral phase (Cotrufo *et al.*, 2013). The C use efficiency differs largely between simple metabolic compound such as carbohydrates and complex structural compound such as lignins (Melillo *et al.*, 1982; Cotrufo *et al.*, 2013). However, the degradability of plant litter compounds may depend on their structure as a function of plant species in addition to overall litter chemistry (Pellerin *et al.*, 2010; Thevenot *et al.*, 2010). Lucerne lignin may be more leachable and biodegradable than that of cocksfoot residues (Pellerin *et al.*, 2010), because it consists of simpler carbon forms and is associated with nitrogen-rich compounds. Thus, the lignin/N ratio was higher for grass roots as compared to lucerne roots or roots isolated from soil under mixtures. This ratio was found to be related to the degradability of grass litter (Rasse *et al.*, 2005) and an indicator of N release during the decomposition (Thomas and Asakawa 1993; Vahdat *et al.*, 2011; Frei 2013). Low lignin/N ratios may increase the N mineralization and release (Bruulsema and Christie, 1987) as well as lignin degradation (Melillo *et al.*, 1982; Sanaullah *et al.*, 2010; Vahdat *et al.*, 2011). Therefore low ratios of lucerne roots may be an indicator for better resource quality, which may increase microbial use efficiency. Their addition to soil may thus lead to increasing OM and lignin degradation (Milcu *et al.*, 2008), suggesting increased microbial use efficiency and in turn SOM stabilization. However, after the four years experiment we could not observe enhanced C and N sequestration under lucerne or mixtures, despite a soil favouring the formation of organo-mineral interactions (high clay content). Instead we observed a molecular signature indicating more degraded SOM under mixtures (see above). Legume effects on decomposition were also noted by Saar *et al.*, (2016), who indicated negative priming of

grass root decomposition in legume grass mixtures. We therefore suggest that in the rhizosphere of living plant communities there are additional parameters at work most probably related to interspecific competition between plants and microbes, which are determining the ultimate fate of plant litter in soil.

The molecular C signature of soil under lucerne was separated in the PCA plan from those under lucerne grass mixtures according to the first axis being related to the lignin parameters. This suggests that plant community composition affects SOM composition, when legumes are used in forage grasslands. However, grass species did not have any influence on the C signature of soil under the two different mixtures. This is in contrast to the phosphorus signature, which separated the mixtures in the PCA plan according to the grass species used (Crème *et al.*, 2016).

V. *Conclusion*

In this study we analyzed the influence of legume introduction into grasslands on root chemistry and soil C characteristics. By the determination of neutral sugar and lignin contents and compositions of lucerne and grass roots extracted from soil under monoculture or mixtures, we identified species-specific root signatures. In contrast, SOM chemical signatures were different only among lucerne monoculture and mixtures. Lucerne impact was most probably related to lower lignin/N ratio of their root tissues, which may have enhanced OM degradation when grown in mixture with grasses. In particular we noted more degraded lignin in soil under mixtures and similar SOM storage despite higher biomass input under lucerne monoculture and mixtures. We thus suggest that lucerne presence influenced OM degradation more than its stabilization. Our results show that after 4 years, different plant species have limited influence on chemistry of SOM despite contrasting root composition. We conclude that litter degradation may be enhanced in soil under lucerne, when associated to gramineous species.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'introduction de prairies temporaires dans les cycles de culture est encouragée en raison de nombreux intérêts agronomiques et environnementaux, tout particulièrement la capacité à stocker du carbone dans des sols arables et, éventuellement la réduction des émissions de gaz à effet de serre (GES) (Bremer *et al.*, 1994; Soussana *et al.*, 2004; Lal 2004). Mais l'étude des bénéfices de ces systèmes nécessite des expérimentations sur le long terme comme celles mises en place dans le cadre du SOERE ACBB. Car même si les prairies temporaires sont reconnues pour améliorer la structure et la fertilité du sol ainsi que d'interrompre le cycle de vie des maladies et des insectes nuisibles, ces systèmes sont sensibles de par la répétition d'états transitoires de stockage et déstockage de carbone (INRA 2002; Lemaire *et al.*, 2015). Ainsi, nous avons caractérisé de nombreux paramètres du sol non pas après l'introduction de la prairie mais à la suite de la phase de culture afin d'observer les arrières effets et les impacts réels sur le long terme des matières organiques dans des sols (MOS) des prairies temporaires et de leur gestion.

De plus, des gestions différentes de ces systèmes sont susceptibles d'impacter la composition et les processus de stabilisation des MOS en modifiant les processus de couplage et découplage des cycles du carbone, de l'azote et du phosphore (Conant *et al.*, 2001; Lal 2004; Kirkby *et al.*, 2013; Chabbi *et al.*, 2015; Rumpel *et al.*, 2015; Lemaire *et al.*, 2015). Dans notre étude nous nous focalisons sur deux modalités de gestion des prairies temporaires : la durée et la fertilisation de la phase de prairie. Au-delà de l'effet de l'absence ou de la présence de fertilisation azotée par engrais, nous avons étudié également un mode alternatif de fertilisation azotée des fourrages. En effet, l'utilisation des légumineuses dans la production de fourrage peut remplacer l'apport d'engrais minéraux azotés (SNF) source de pollution, par la fixation biologique de l'azote (BNF) dans les mélanges graminées-légumineuses (Crews and Peoples 2004; IPCC 2013; INRA 2013; Crème *et al.*, 2016).

Avec l'objectif de mieux comprendre les mécanismes de stockage et de déstockage à travers les changements de la nature des MOS sous prairies temporaires soumises à une gestion différente et

mieux comprendre les flux de GES de ces systèmes, nous avons réparti notre étude en 3 parties. Dans un premier temps nous caractérisons les arrières effets après les phases de culture sur la MOS des prairies temporaires gérées différemment pour la fertilisation azotée et la durée. Ensuite nous avons focalisé nos recherches sur la réponse du système fourrager et des formes de MOS à la fertilisation par SNF ou BNF dans des monocultures et des associations légumineuse-graminées. Et enfin nous avons évalué l'impact sur la nature du carbone organique des racines comme source majeure impactant la nature des MOS des deux modes de fertilisation azotée contrastées de la prairie.

Quels sont les arrières effets en termes de quantité et qualité des MOS ainsi que de fonctionnement microbien des sols de la gestion des prairies temporaires ?

Les sols de prairies présentent une capacité à stocker plus de carbone que les sols de cultures principalement grâce à une augmentation des apports de litière (Christensen *et al.*, 2009) et ce malgré une stabilisation plus faible des MOS. En effet, le labour répété dans les sols culturaux augmenterait la dégradation des MOS dans les fractions les plus fraîches et favoriserait la transformation des MOS vers les fractions les plus stables (Guggenberger *et al.*, 1994; Post and Kwon 2000; Kristensen *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2009; Attard *et al.*, 2011). D'après l'étude de nombreux paramètres du sol, nous distinguons clairement les sols prairiaux et culturaux comme deux systèmes différents, particulièrement de par les concentrations en sucre et leurs états de dégradation, les concentrations en carbone et azote, et la vitesse de minéralisation potentielle du carbone du sol. Le fonctionnement microbien des sols de prairie par rapport au sol de culture semble impacté essentiellement par une augmentation de la biomasse microbienne et la vitesse de minéralisation du carbone. Ces modifications sembleraient être une réponse proportionnelle à l'augmentation de carbone du sol car le profil physiologique des communautés microbiennes n'est pas impacté.

Contrairement aux attentes, la prairie temporaire de 6 ans fertilisée ne semble pas avoir un arrière effet sur les stocks de carbone, d'azote et de phosphore du sol mais présente une signature des MOS intermédiaire entre la prairie permanente et la culture. La gestion de la fertilisation azotée comme de la durée de la phase de prairie présente des arrières effets sur les MOS mais pas sur le fonctionnement microbien.

La fertilisation azotée des prairies temporaires semble nécessaire à la mise en place des mécanismes améliorant les MOS (Conant *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 2009; Knicker 2011) et

particulièrement les sucres du sol mais aussi à la réduction des pertes en phosphore du sol (Adams 1980; Dodd *et al.*, 2012).

Les MOS ont une réponse inattendue de la gestion de la durée de la phase de prairie avec un effet non progressif en fonction de l'âge pour certaines variables. Les arrières effets de la durée de la phase de prairie semblent particulièrement difficiles à comprendre de par la notion d'état transitoire entre un sol de type culture et un sol de prairie. On observe une réponse indépendante pour la prairie temporaire de 3 ans qui permet de stocker plus d'azote, de carbone et de phosphore dans les sols par rapport à la culture mais aussi par rapport à la prairie de 6 ans. La plus grande quantité de MOS de la prairie temporaire de 3 ans peut s'expliquer par une lignine moins dégradée que la prairie de 6 ans mais aussi une MOS moins dégradée et moins stabilisée. Une certaine durée de la phase de prairie semble nécessaire à l'établissement d'un nouveau système sol, dans notre cas une signature prairiale des sols semble être atteinte après 6 ans de prairie temporaire.

Afin d'affiner la compréhension de cette particularité de la prairie de 3 ans, il faudrait étudier la nature des MOS à la sortie de phase de prairie qui pourrait révéler des effets, qui ne sont plus visibles après la phase de culture.

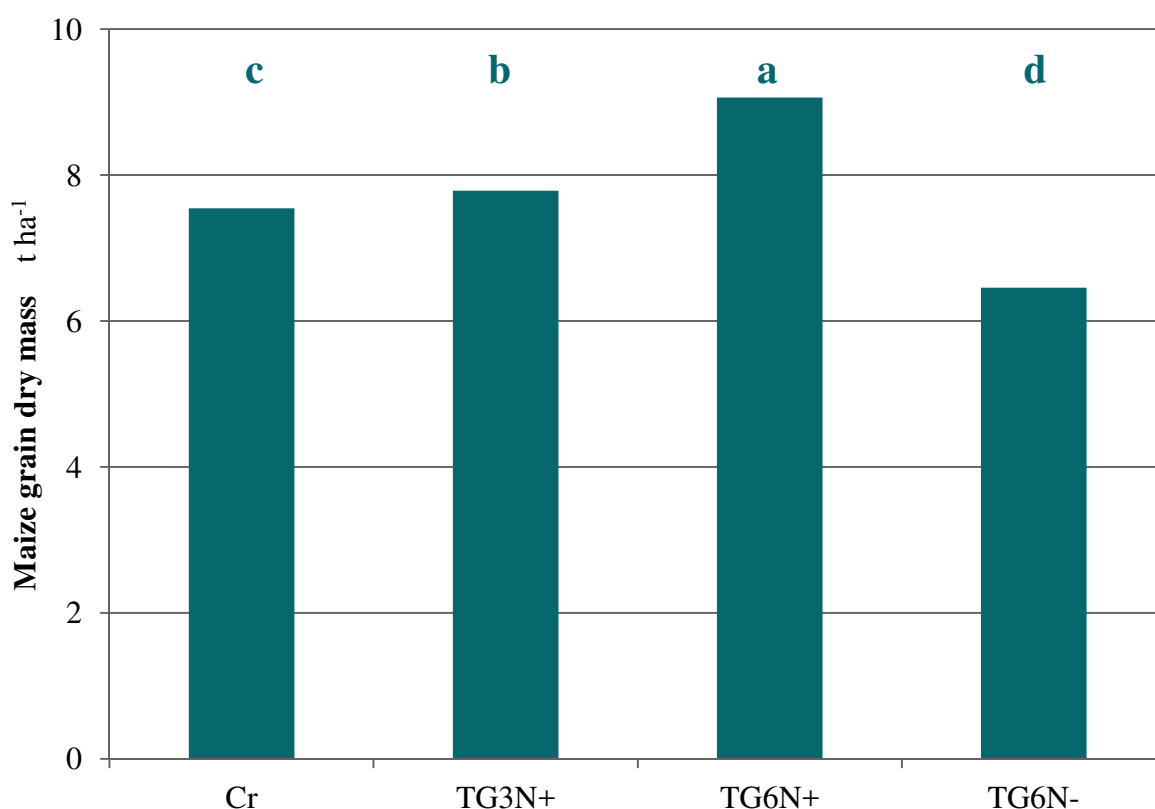


Figure 34. Maize grain yield in 2011 for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+) and 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-).

^{abcd} Different letters indicate significant differences for Anova 2 ways and Tukey HSD post hoc test results between treatments.

Au-delà des caractéristiques des MOS, les rendements de culture de maïs suivant la phase de prairie en 2011, semblent présenter des arrière effets significatifs de l'insertion de prairie dans les rotations de culture mais aussi de différente gestion des prairies temporaires (Figure 34). Ces résultats vont dans le sens de l'hypothèse posée précédemment, soit l'augmentation des nitrates de la prairie temporaire la plus longue aurait l'effet d'améliorer les rendements de la culture suivante à fertilisation égale (Christensen *et al.*, 2009). Ces résultats confirment aussi que l'introduction de prairie dans les rotations de culture peut améliorer le système et que l'efficacité dépend de la gestion de la phase de prairie (Soussana *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*, 2015), mais qu'une prairie de 3 ans ne permet pas une efficacité optimum contrairement à la prairie de 6ans. De plus une fertilisation azote est nécessaire afin de maintenir voire augmenter les stocks de MOS.

Néanmoins l'évolution de ces systèmes sur plus d'un cycle de prairie temporaire de 9 ans reste une inconnue surtout en ce qui concerne l'effet de la durée de la phase de prairie, de l'inertie du système. Ainsi par la suite, nous souhaitons modéliser les pools de C du sol et le devenir des stocks de C sur le long terme des différentes gestions de prairie temporaire avec le modèle RothC grace aux fractions déterminés par la methode de Zimmermann *et al.*, (2007).

Les teneurs en carbone initiales pouvant être un facteur explicatif du stockage des MOS (Conant *et al.*, 2001), nous compléterons notre analyse d'une étude de la variation spatiotemporelle de l'évolution des stocks de carbone sur le SOERE ACBB pour un cycle de prairie temporaire (2005-2014) avec 530 prélèvements de 90 cm de profondeur divisés en 3 couches de 30 cm.

Les bilans carbone des systèmes de culture et de prairie, effectués avec la méthode ADEME, estiment les prairies comme le système le plus émetteur de GES et essentiellement à cause d'une plus grande fertilisation azotée source de N₂O (Galloway *et al.*, 2008; IPCC 2013). Ainsi l'augmentation de proportion de prairie dans la rotation semble augmenter les émissions de GES. Cela dit on remarque aussi, même si la proportion est plus faible, que cela réduit l'utilisation de matériel agricole et de combustible fossile mais aussi des pesticides qui génèrent des formes de pollutions différentes mais non négligeables pour les sols (CGDD, 2015).

Cependant, ces estimations ne semblent pas bien représenter les réels processus d'émission de GES des sols. En effet cette étude fut réalisée dans le cadre d'un projet plus global nommé Atténuation d'Emissions de Gaz à Effet de Serre (AEGES, appel à projet REACTIFF de l'ADEME). Dans ce projet, en parallèle des études de la MOS, une seconde équipe a mesuré sur les mêmes sols les communautés microbiennes dénitrifiantes et leurs potentiels de dénitrification, quand une

troisième équipe mesura les émissions de CO₂ et N₂O aux champs. Ces résultats ont montré que les émissions de CO₂ du sol ne sont pas significativement différentes entre les traitements (Figure 35). Mais les émissions de N₂O ne suivent pas la logique des estimations du bilan carbone, elles sont quasi nulles pour les sols prairiaux et plus fortes pour les prairies temporaires que pour la culture, significativement pour la prairie temporaire de 3 ans (Figure 35). Même si ces mesures effectuées sur seulement 14 jours ne représentent pas des bilans sur l'année, elles permettent de mettre en évidence que les processus contrôlant les émissions de N₂O sont bien plus complexes et pas simplement proportionnels à la fertilisation azotée. Les interactions entre les processus et paramètres biotiques et abiotiques du sol contrôlant ces émissions sont encore peu connus (Butterbach-Bahl *et al.*, 2013). Ainsi nous espérons que le couplage des données de la caractérisation des MOS, de la microbiologie du sol et des émissions de GES mais aussi les nombreux paramètres suivis sur un dispositif expérimental de long terme comme le SOERE ACBB, nous permettra de mieux comprendre les mécanismes contrôlant ces émissions et améliorer leurs modélisations. Dans ce contexte, nous souhaitons aussi nous focaliser sur la transformation des MOS lors du labour du sol reconnu comme un mécanisme déstockant les MOS de par la modification de nombreuses caractéristiques abiotiques mais aussi biotiques (Conant *et al.*, 2007).

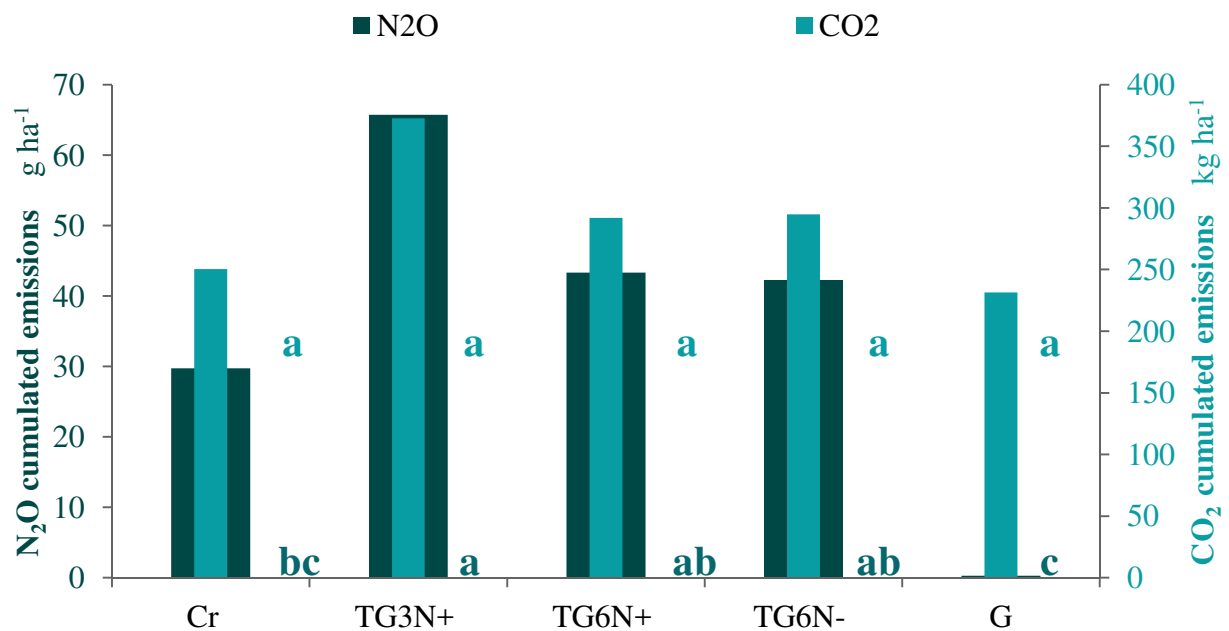


Figure 35. Measurement of soil GHG emissions cumulated in 14 days in marsh 2014 for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G).

^{abc} Different letters indicate significant differences for Anova 2 ways and Tukey HSD post hoc test results between treatments.

Toutefois, les émissions de N_2O restent sensibles à la fertilisation (Conant *et al.*, 2001; Soussana *et al.*, 2004) et il paraît essentiel d'améliorer la gestion de la fertilisation azotée par la réduction d'utilisation de SNF dans les prairies. L'introduction de légumineuse source d'azote via la BNF, est une alternative intéressante et qui a été proposée afin de minimiser les impacts environnementaux de la fertilisation (Crews and Peoples 2004; INRA 2013; Vertes *et al.*, 2015). De fait, la disponibilité directe d'azote fixé dans les racines minimise les pertes d'azote (Crews and Peoples, 2004; Graham, 2005) et réduit le risque de pollution par lessivage de NO_3^- , volatilisation de NH_3 et émissions de N_2O (Crews and Peoples, 2004; IPCC, 2013), même si dans certains cas, les légumineuses semblent pouvoir augmenter les émissions de N_2O comme les SNF (Niklaus *et al.*, 2016). De plus les légumineuses sont connues pour améliorer le stock du carbone du sol (Paustian *et al.*, 1990; Fustec *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2012; Schipanski and Drinkwater 2012) mais elles sont également des consommatrices importantes de phosphore et ainsi sensibles à la disponibilité en phosphore du sol (Graham and Vance 2003; Peñuelas *et al.*, 2012).

Quels sont les effets sur les rendements fourragers, les MOS et les formes de phosphore du remplacement des SNF par la BNF grâce à des communautés végétales différentes ?

La luzerne en monoculture ou en association avec des graminées montre des rendements supérieurs aux monocultures de graminées. Dans notre étude cela pourrait être dû à deux éléments : (1) l'apport d'azote plus grand par la BNF que par le SNF mais aussi (2) la résistance à la sécheresse de la luzerne (Sanaullah *et al.*, 2011a; Annicchiarico *et al.*, 2015).

Cependant contrairement aux attentes, les stocks de carbone et de l'azote du sol ne sont pas améliorés par la luzerne que ce soit en monoculture ou en association. Cela pourrait s'expliquer par l'exportation des parties aériennes lors de la récolte du fourrage (Bell *et al.*, 2012). Le phosphore du sol est même plus faible dans les sols sous luzerne que ce soit en monoculture ou en association de par la forte consommation de phosphore caractéristique des légumineuses (Smith 1992; Crews 1996; Roscher *et al.*, 2011; Peñuelas *et al.*, 2012). En effet les rendements importants en présence de luzerne, se traduisent par une plus forte exportation des nutriments azote et phosphore, tout particulièrement dans les associations luzerne-dactyle où cela dépasse les apports.

La forte consommation de phosphore par la luzerne est le plus visible sous forme de IP de par sa meilleure biodisponibilité pour les plantes (Condron and Tiessen, 2005). Tout particulièrement le IP extrait au HCl s'avère comme source pour la luzerne (Daroub *et al.*, 2001). Cependant cet épuisement du phosphore des sols sous luzerne semble atténué par la présence des graminées dans les

associations. Aussi dans les sols sous association luzerne-dactyle on observe une plus grande proportion d'OP (Daroub *et al.*, 2001) probablement due à un retour au sol par la litière végétale (Condrón and Tiessen, 2005), soit un phosphore plus disponible sur le long terme (Hedley *et al.*, 1982).

Nos résultats révèlent que des plantes d'espèces différentes ont des effets spécifiques sur les formes et les teneurs en MOS, probablement de par des effets distincts de la rhizosphère des plantes. Néanmoins les impacts des légumineuses en association sur la MOS et les nutriments paraissent dépendre de l'espèce de graminée.

Tout pris en compte, il reste intéressant de noter que même si les stocks de C et N ne sont pas améliorés, ils sont maintenus et cela sans le travail, le coût économique et environnemental de la fertilisation de synthèse par SNF. Et même plus, les légumineuses grâce à la BNF semblent pouvoir compenser l'absence de fertilisation par SNF en termes de production fourragère. Enfin, l'association luzerne-dactyle apparaît comme le meilleur système en termes de rendement mais aussi d'OP du sol.

Il semblerait que les capacités de séquestration du carbone dans les sols des prairies résident dans les mécanismes de transformation des racines (Rasse *et al.*, 2005; Acharya *et al.*, 2012), mais aussi dans les caractéristiques spécifiques aux plantes de la rhizosphère (Crème *et al.*, 2016). Ainsi caractériser la nature biomoléculaire des racines en tant que source majeure de MOS dans les prairies fauchées pourrait nous aider à mieux comprendre la signature des MOS.

La signature moléculaire des MOS est-elle impactée par les différentes espèces végétales cultivées en association et en monoculture ?

Les concentrations en azote sont plus élevées dans les racines de luzerne que dans celles de graminées (Pellerin *et al.*, 2010; Fustec *et al.*, 2010; Vahdat *et al.*, 2011) avec un C/N plus faible dans les racines extraites des sols sous luzerne en association, comme en monoculture. En dépit de teneurs en sucre des racines similaires pour toutes les communautés végétales, leurs signatures mettent en évidence la présence de sucre microbien dans les racines de luzerne probablement lié à la présence de bactéries actives dans les nodules des racines. Les racines de luzerne semblent moins riches en lignine que les racines de graminées mais surtout présentent un ratio lignine/N plus faible révélant une plus forte dégradabilité des tissus (Melillo *et al.*, 1982; Sanaullah *et al.*, 2010; Vahdat *et al.*, 2011). Ainsi, la signature biomoléculaire des racines semble spécifique à chaque communauté végétale étudiée.

Malgré cela, la signature moléculaire des MOS ne semble pas influencée par celle des racines des communautés végétales. Les sols sous luzerne en monoculture et association sont plus riches en sucre et la signature des biomolécules laisse penser à une MOS plus dégradée.

Ainsi cette activité des décomposeurs plus active et le faible ratio lignine/N, indique que la lignine de la luzerne pourrait être plus biodégradable que celle des résidus de graminées (Pellerin *et al.*, 2010), grâce à des molécules carbonées plus simples et associées avec des composés riches en azote. En effet, l'efficacité d'utilisation du carbone diffère largement entre les composés métaboliques simples et les composés de structure complexe (Cotrufo *et al.*, 2013). Cependant les stocks de carbone et d'azote sont similaires pour toutes les communautés végétales. Ainsi, la plus forte dégradation des racines de luzerne pourrait être compensée par une plus forte production racinaire (Fornara and Tilman 2008; Milcu *et al.*, 2008).

La présence de la luzerne influencerait la dégradation des MOS plus que leur stabilisation et cette dégradation est augmentée quand la luzerne est associée à des graminées. Cependant, les graminées n'ont pas d'influence sur les signatures du carbone du sol dans les associations ce qui contraste avec la signature du phosphore.

Pour appuyer les conclusions de cette étude il serait intéressant de déterminer les différents réservoirs de carbone du sol pour étudier la stabilisation de ces MOS plus dégradées sous luzerne et le devenir des stocks de carbone du sol par modélisation avec RothC.

A l'inverse caractériser la signature moléculaire des racines des prairies temporaires, tout particulièrement le ratio lignine/N, pourrait aider à comprendre la dégradabilité des sources de MOS et son devenir dans ces sols.

En conclusion, les prairies temporaires ont le potentiel de répondre à un certain nombre de problématiques environnementales et cela sans réduire la productivité agricole des systèmes (Lemaire *et al.*, 2015). Toutefois, leur gestion est cruciale et nécessite d'être optimisée.

BIBLIOGRAPHIE

- Acharya, B.S., Rasmussen, J., Eriksen, J., 2012. Grassland carbon sequestration and emissions following cultivation in a mixed crop rotation. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 153, 33–39. doi:10.1016/j.agee.2012.03.001
- Adams, F., 1980. Interactions of phosphorus with other elements in soils and in plants. *The Role of Phosphorus in Agriculture* 655–680.
- ADEME, 2014. Carbone organique des sols : L'énergie de l'agro-écologie, une solution pour le climat.
- ADEME, 2010. Chapitre 6 - Prise en compte des autres produits entrants: produits servant aux activités agricoles, d'élevage, et agro-alimentaires, in: *Bilan Carbone® guide des facteurs d'émissions*.
- Amelung, W., Brodowski, S., Sandhage-Hofmann, A., Bol, R., 2008. Chapter 6 Combining Biomarker with Stable Isotope Analyses for Assessing the Transformation and Turnover of Soil Organic Matter, in: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 155–250.
- Angers, D.A., Edwards, L.M., Sanderson, J.B., Bissonnette, N., 1999. Soil organic matter quality and aggregate stability under eight potato cropping sequences in a fine sandy loam of Prince Edward Island. *Canadian Journal of Soil Science* 79, 411–417.
- Angers, D.A., Mehuys, G.R., 1989. Effects of cropping on carbohydrate content and water-stable aggregation of a clay soil. *Canadian Journal of Soil Science* 69, 373–380. doi:10.4141/cjss89-037
- Angus, J.F., Peoples, M.B., 2012. Nitrogen from Australian dryland pastures. *Crop and Pasture Science* 63, 746–758.
- Annicchiarico, P., Barrett, B., Brummer, E.C., Julier, B., Marshall, A.H., 2015. Achievements and Challenges in Improving Temperate Perennial Forage Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34, 327–380. doi:10.1080/07352689.2014.898462
- Attard, E., Le Roux, X., Charrier, X., Delfosse, O., Guillaumaud, N., Lemaire, G., Recous, S., 2016. Delayed and asymmetric responses of soil C pools and N fluxes to grassland/cropland conversions. *Soil Biology and Biochemistry* 97, 31–39. doi:10.1016/j.soilbio.2016.02.016
- Attard, E., Recous, S., Chabbi, A., De Berranger, C., Guillaumaud, N., Labreuche, J., Philippot, L., Schmid, B., Le Roux, X., 2011. Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. *Global Change Biology* 17, 1975–1989. doi:10.1111/j.1365-2486.2010.02340.x
- Bahri, H., Dignac, M.-F., Rumpel, C., Rasse, D.P., Chenu, C., Mariotti, A., 2006. Lignin turnover kinetics in an agricultural soil is monomer specific. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1977–1988. doi:10.1016/j.soilbio.2006.01.003
- Balesdent, J., Arrouays, D., 1999. Usage des terres et stockage de carbone dans les sols du territoire français. Une estimation des flux nets annuels pour la période 1990-1999. *COMPTE RENDUS-ACADEMIE D AGRICULTURE DE FRANCE* 85, 265–277.
- Barea, J.M., El-Atrach, F., Azcon, R., 1989. Mycorrhiza and phosphate interactions as affecting plant development, N₂-fixation, N-transfer and n-uptake from soil in legume-grass mixtures by using a ¹⁵N dilution technique. *Soil Biology and Biochemistry* 21, 581–589. doi:10.1016/0038-0717(89)90133-8
- Barrios, E., Buresh, R.J., Kwesiga, F., Sprent, J.I., 1997. Light Fraction Soil Organic Matter and Available Nitrogen following Trees and Maize. *Soil Science Society of America Journal* 61, 826. doi:10.2136/sssaj1997.03615995006100030016x

- Bell, L.W., Sparling, B., Tenuta, M., Entz, M.H., 2012. Soil profile carbon and nutrient stocks under long-term conventional and organic crop and alfalfa-crop rotations and re-established grassland. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 158, 156–163. doi:10.1016/j.agee.2012.06.006
- Bernoux, M., Chenu, C., Blanchart, E., Eglin, T., Bispo, A., Bardy, M., King, D., 2011. Le programme GESSOL 2: Impact des pratiques agricoles sur les matières organiques et les fonctions des sols. *Etude et Gestion Des Sols* 18, 137–145.
- Braun, E., 2007. Reactive Nitrogen in the Environment: Too Much Or Too Little of a Good Thing. UNEP/Earthprint.
- Bremer, E., Janzen, H.H., Johnston, A.M., 1994. Sensitivity of total, light fraction and mineralizable organic matter to management practices in a Lethbridge soil. *Canadian Journal of Soil Science* 74, 131–138.
- Brookes, P.C., Landman, A., Pruden, G., Jenkinson, D.S., 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 837–842. doi:10.1016/0038-0717(85)90144-0
- Bruulsema, T.W., Christie, B.R., 1987. Nitrogen contribution to succeeding corn from alfalfa and red clover. *Agronomy Journal* 79, 96–100.
- Butterbach-Bahl, K., Baggs, E.M., Dannenmann, M., Kiese, R., Zechmeister-Boltenstern, S., 2013. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368, 20130122–20130122. doi:10.1098/rstb.2013.0122
- Butterbach-Bahl, K., Gundersen, P., Ambus, P., Augustin, J., Beier, C., Boeckx, P., Dannenmann, M., Gimeno, B.S., Ibrom, A., Kiese, R., Kitzler, B., Rees, R.M., Smith, K.A., Stevens, C., Vesala, T., Zechmeister-Boltenstern, S., 2011. Nitrogen processes in terrestrial ecosystems, in: *The European Nitrogen Assessment*. Cambridge University Press.
- Calvet, R., Chenu, C., Houot, S., 2011. Les matières organiques des sols: rôles agronomiques et environnementaux. Éditions France Agricole, Paris, France.
- Canfield, D.E., Glazer, A.N., Falkowski, P.G., 2010. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science* 330, 192–196. doi:10.1126/science.1186120
- Carlsson, G., Huss-Danell, K., 2003. Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant and Soil* 253, 353–372.
- Carter, M., Gregorich, E., Angers, D., Donald, R., Bolinder, M., 1998. Organic C and N storage, and organic C fractions, in adjacent cultivated and forested soils of eastern Canada. *Soil and Tillage Research* 47, 253–261. doi:10.1016/S0167-1987(98)00114-7
- Carter, M.R., 1991. The influence of tillage on the proportion of organic carbon and nitrogen in the microbial biomass of medium-textured soils in a humid climate. *Biology and Fertility of Soils* 11, 135–139. doi:10.1007/BF00336378
- CEA, 2013. Le climat, Livret thématique.
- CGDD, 2016. Chiffres clés du climat France et Monde.
- CGDD, 2015. Sols et environnement, chiffres clés, Repères.
- CGDD, 2013. Chiffres clés du climat France et monde.
- CGDD, 2010. La culture des légumineuses.
- Chabbi, A., Kögel-Knabner, I., Rumpel, C., 2009. Stabilised carbon in subsoil horizons is located in spatially distinct parts of the soil profile. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 256–261. doi:10.1016/j.soilbio.2008.10.033
- Chabbi, A., Senapati, N., Giostri, A., Vertes, F., Carrozi, M., Lemaire, G., Gastal, F., Recous, S., Klumpp, K., Massad, R.S., Rumpel, C., 2015. Performances des rotations à base de cultures fourragères en termes de gaz à effet de serre (GES) et bilan carbone. *Fourrages* 241–248.

- Christensen, B.T., Rasmussen, J., Eriksen, J., Hansen, E.M., 2009. Soil carbon storage and yields of spring barley following grass leys of different age. *European Journal of Agronomy* 31, 29–35. doi:10.1016/j.eja.2009.02.004
- Conant, R.T., Easter, M., Paustian, K., Swan, A., Williams, S., 2007. Impacts of periodic tillage on soil C stocks: A synthesis. *Soil and Tillage Research* 95, 1–10. doi:10.1016/j.still.2006.12.006
- Conant, R.T., Paustian, K., Elliott, E.T., 2001. Grassland Management and Conversion into Grassland: Effects on Soil Carbon. *Ecological Applications* 11, 343–355. doi:10.1890/1051-0761(2001)011[0343:GMACIG]2.0.CO;2
- Condon, L.M., Tiessen, H., 2005. Interactions of organic phosphorus in terrestrial ecosystems, in: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), *Organic Phosphorus in the Environment*. CABI.
- Cotrufo, M.F., Wallenstein, M.D., Boot, C.M., Denef, K., Paul, E., 2013. The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Global Change Biology* 19, 988–995. doi:10.1111/gcb.12113
- Crème, A., Rumpel, C., Gastal, F., Gil, M. de la L.M., Chabbi, A., 2016. Effects of grasses and a legume grown in monoculture or mixture on soil organic matter and phosphorus forms. *Plant and Soil* 1–12. doi:10.1007/s11104-015-2740-x
- Crews, T.E., 1996. The supply of phosphorus from native, inorganic phosphorus pools in continuously cultivated Mexican agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 57, 197–208. doi:10.1016/0167-8809(95)01013-0
- Crews, T.E., Peoples, M.B., 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 102, 279–297. doi:10.1016/j.agee.2003.09.018
- Cross, A.F., Schlesinger, W.H., 1995. A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. *Geoderma* 64, 197–214. doi:10.1016/0016-7061(94)00023-4
- Daroub, S.H., Ellis, B.G., Robertson, G.P., 2001. Effect of cropping and low-chemical input systems on soil phosphorus fractions. *Soil Science* 166, 281–291.
- Davidson, E.A., 2009. The contribution of manure and fertilizer nitrogen to atmospheric nitrous oxide since 1860. *Nature Geoscience* 2, 659–662. doi:10.1038/ngeo608
- Delbosc, A., Keppler, J.H., Leseur, A., 2007. Croître sans réchauffer (No. 10). *caisse des dépôts mission climat*.
- Dodd, R.J., McDowell, R.W., Condon, L.M., 2012. Using nitrogen fertiliser to decrease phosphorus loss from high phosphorus soils.
- Eder, E., Spielvogel, S., Kölbl, A., Albert, G., Kögel-Knabner, I., 2010. Analysis of hydrolysable neutral sugars in mineral soils: Improvement of alditol acetylation for gas chromatographic separation and measurement. *Organic Geochemistry* 41, 580–585. doi:10.1016/j.orggeochem.2010.02.009
- Erisman, J.W., Galloway, J., Seitzinger, S., Bleeker, A., Butterbach-Bahl, K., 2011a. Reactive nitrogen in the environment and its effect on climate change. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 3, 281–290. doi:10.1016/j.cosust.2011.08.012
- Erisman, J.W., Sutton, M.A., Galloway, J., Klimont, Z., Winiwarter, W., 2008. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience* 1, 636–639. doi:10.1038/ngeo325
- Erisman, J.W., van Grinsven, H., Grizzetti, B., Bouraoui, F., Powlson, D., Sutton, M.A., Bleeker, A., Reis, S., 2011b. The European nitrogen problem in a global perspective, in: *The European Nitrogen Assessment: Sources, Effects and Policy Perspectives*. Cambridge University Press, pp. 9–31.
- Feller, C., Chenu, C., 2012. Les inter-actions bio-organo-argileuses et la stabilisation du carbone dans les sols. *Etude et Gestion Des Sols* 19, 235–248.

- Fornara, D.A., Tilman, D., 2008. Plant functional composition influences rates of soil carbon and nitrogen accumulation. *Journal of Ecology* 96, 314–322. doi:10.1111/j.1365-2745.2007.01345.x
- Frei, M., 2013. Lignin: Characterization of a Multifaceted Crop Component. *The Scientific World Journal* 2013, 1–25. doi:10.1155/2013/436517
- Fritz Haber, 1920. Nobel prize in chemistry 1918: The Synthesis of Ammonia from Its Elements.
- Fuhrmann, J.J., 2005. Microbial metabolism, in: *Principles and Applications of Soil Microbiology*. pp. 189–217.
- Fustec, J., Lesuffleur, F., Mahieu, S., Cliquet, J.-B., 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30, 57–66. doi:10.1051/agro/2009003
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erismann, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A., 2008. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* 320, 889–892. doi:10.1126/science.1136674
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2351–2359.
- Gordon A. J., 1992. Carbon metabolism in the legume nodule, in: *Carbon Partitioning: Within and between Organisms.*, Environmental Plant Biology Series. BIOS SCIENTIFIC PUBLISHERS.
- Graham, P.H., 2005. Biological dinitrogen fixation: Symbiotic. *Principles and Applications of Soil Microbiology* (Eds. DM Sylvia, JJ Fuhrmann, PG Hartel & DA Zuberer) 405–432.
- Graham, P.H., Vance, C.P., 2003. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology* 131, 872–877. doi:10.1104/pp.017004
- Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D., Edwards, A.C., 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 369–378. doi:10.1016/S0038-0717(97)00124-7
- Guggenberger, G., Christensen, B. t., Zech, W., 1994. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soil: I. Lignin and carbohydrate signature. *European Journal of Soil Science* 45, 449–458. doi:10.1111/j.1365-2389.1994.tb00530.x
- Hardy, R.W.F., Havelka, U.D., 1975. Nitrogen Fixation Research: A Key to World Food? *Science* 188, 633–643. doi:10.1126/science.188.4188.633
- Haynes, R.J., 2005. Labile Organic Matter Fractions as Central Components of the Quality of Agricultural Soils: An Overview, in: *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 221–268.
- Hedges, J.I., Ertel, J.R., 1982. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Analytical Chemistry* 54, 174–178. doi:10.1021/ac00239a007
- Hedley, M.J., Stewart, J.W.B., Chauhan, B.S., 1982. Changes in Inorganic and Organic Soil Phosphorus Fractions Induced by Cultivation Practices and by Laboratory Incubations1. *Soil Science Society of America Journal* 46, 970. doi:10.2136/sssaj1982.03615995004600050017x
- Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil* 311, 1–18. doi:10.1007/s11104-008-9668-3
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., Young, I.M., 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* 321, 117–152. doi:10.1007/s11104-008-9885-9
- Huc, Ourisson, Albrecht, Gaillardet, 2007. Cycle du carbone, in: *Cycles biogéochimiques et écosystèmes continentaux*, ACADEMIE DES SCIENCES. EDP Sciences.
- INRA, 2013. Quelle contribution de l’agriculture française à la réduction des émissions de gaz à effet de serre ?
- INRA, 2002. Stocker du carbone dans les sols agricoles de France ?
- IPCC, 2014. Fifth Assessment Report - Synthesis Report.
- IPCC, 2013. Fifth Assessment Report WG1.

- Ivanoff, D.B., Reddy, K.R., Robinson, S., 1998. chemical fractionation of organic phosphorus in selected histosols. *Soil Science* 163, 36–45.
- Kelner, D.J., Vessey, J.K., Entz, M.H., 1997. The nitrogen dynamics of 1-, 2- and 3-year stands of alfalfa in a cropping system. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 64, 1–10. doi:10.1016/S0167-8809(97)00019-4
- Kiem, R., Kögel-Knabner, I., 2003. Contribution of lignin and polysaccharides to the refractory carbon pool in C-depleted arable soils. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 101–118. doi:10.1016/S0038-0717(02)00242-0
- Kirkby, C.A., Kirkegaard, J.A., Richardson, A.E., Wade, L.J., Blanchard, C., Batten, G., 2011. Stable soil organic matter: A comparison of C:N:P:S ratios in Australian and other world soils. *Geoderma* 163, 197–208. doi:10.1016/j.geoderma.2011.04.010
- Kirkby, C.A., Richardson, A.E., Wade, L.J., Batten, G.D., Blanchard, C., Kirkegaard, J.A., 2013. Carbon-nutrient stoichiometry to increase soil carbon sequestration. *Soil Biology and Biochemistry* 60, 77–86. doi:10.1016/j.soilbio.2013.01.011
- Kirkby, C.A., Richardson, A.E., Wade, L.J., Passioura, J.B., Batten, G.D., Blanchard, C., Kirkegaard, J.A., 2014. Nutrient availability limits carbon sequestration in arable soils. *Soil Biology and Biochemistry* 68, 402–409. doi:10.1016/j.soilbio.2013.09.032
- Kleber, M., Sollins, P., Sutton, R., 2007. A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: self-assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry* 85, 9–24. doi:10.1007/s10533-007-9103-5
- Knicker, H., 2011. Soil organic N - An under-rated player for C sequestration in soils? *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1118–1129. doi:10.1016/j.soilbio.2011.02.020
- Kögel, I., 1986. Estimation and decomposition pattern of the lignin component in forest humus layers. *Soil Biology and Biochemistry* 18, 589–594. doi:10.1016/0038-0717(86)90080-5
- Kogel, I., Bochter, R., 1985. Characterization of lignin in forest humus layers by high-performance liquid chromatography of cupric oxide oxidation products. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 637–640. doi:10.1016/0038-0717(85)90040-9
- Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 139–162.
- Krämer, M., Weisbjerg, M.R., Lund, P., Jensen, C.S., Pedersen, M.G., 2012. Estimation of indigestible NDF in forages and concentrates from cell wall composition. *Animal Feed Science and Technology* 177, 40–51. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.07.027
- Kristensen, H., Deboz, K., McCarty, G., 2003. Short-term effects of tillage on mineralization of nitrogen and carbon in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 979–986. doi:10.1016/S0038-0717(03)00159-7
- Kunrath, T.R., de Berranger, C., Charrier, X., Gastal, F., de Faccio Carvalho, P.C., Lemaire, G., Emile, J.-C., Durand, J.-L., 2015. How much do sod-based rotations reduce nitrate leaching in a cereal cropping system? *Agricultural Water Management* 150, 46–56. doi:10.1016/j.agwat.2014.11.015
- Kuzyakov, Y., Domanski, G., others, 2000. Carbon input by plants into the soil. Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163, 421–431.
- Lal, R., 2004. Soil Carbon Sequestration Impacts on Global Climate Change and Food Security. *Science* 304, 1623–1627. doi:10.1126/science.1097396
- Lavelle, G., 2007. Cycle des principaux nutriments (azote, phosphore et soufre) à l'échelle planétaire, in: *Cycles biogéochimiques et écosystèmes continentaux*, ACADÉMIE DES SCIENCES. EDP Sciences.
- Lemaire, G., Cruz, P., Chartier, M., Gosse, G., 1985. Etude des relations entre la dynamique de prélèvement d'azote et la dynamique de croissance en matière sèche d'un peuplement de luzerne 5, 685–692.

- Lemaire, G., Gastal, F., Franzluebbers, A., Chabbi, A., 2015. Grassland–Cropping Rotations: An Avenue for Agricultural Diversification to Reconcile High Production with Environmental Quality. *Environmental Management* 56, 1065–1077. doi:10.1007/s00267-015-0561-6
- Li, J.H., Jiao, S.M., Gao, R.Q., Bardgett, R.D., 2012. Differential Effects of Legume Species on the Recovery of Soil Microbial Communities, and Carbon and Nitrogen Contents, in Abandoned Fields of the Loess Plateau, China. *Environmental Management* 50, 1193–1203. doi:10.1007/s00267-012-9958-7
- Li, Q., Song, Y., Li, G., Yu, P., Wang, P., Zhou, D., 2015. Grass-legume mixtures impact soil N, species recruitment, and productivity in temperate steppe grassland. *Plant and Soil* 1–15. doi:10.1007/s11104-015-2525-2
- Lobe, I., Du Preez, C.C., Amelung, W., 2002. Influence of prolonged arable cropping on lignin compounds in sandy soils of the South African Highveld. *European Journal of Soil Science* 53, 553–562. doi:10.1046/j.1365-2389.2002.00469.x
- Louarn, G., Pereira-Lopès, E., Fustec, J., Mary, B., Voisin, A.-S., de Faccio Carvalho, P.C., Gastal, F., 2015. The amounts and dynamics of nitrogen transfer to grasses differ in alfalfa and white clover-based grass-legume mixtures as a result of rooting strategies and rhizodeposit quality. *Plant and Soil* 389, 289–305. doi:10.1007/s11104-014-2354-8
- Lutfalla, S., Chenu, C., Barré, P., 2013. Are chemical oxidation methods relevant to isolate a soil pool of centennial carbon? *Biogeochemistry* 118, 135–139. doi:10.1007/s10533-013-9910-9
- Lützw, M. v., Kogel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., Flessa, H., 2006. Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions - a review. *European Journal of Soil Science* 57, 426–445. doi:10.1111/j.1365-2389.2006.00809.x
- MAAF, 2016. LA RÉFORME DE LA PAC. Ministère de l’Agriculture, de l’Agroalimentaire et de la Forêt.
- MacLean, A.J., Cook, R.L., 1955. The effect of soil reaction on the availability of phosphorus for alfalfa in some eastern Ontario soils. *Soil Science Society of America Journal* 19, 311–314.
- Marcial Redin, S.R., 2014. How the chemical composition and heterogeneity of crop residue mixtures decomposing at the soil surface affects C and N mineralization. *Soil Biology and Biochemistry online*. doi:10.1016/j.soilbio.2014.07.014
- Mathieu, C., Pieltain, F., 1998. Analyse physique des sols: méthodes choisies. Tec & Doc Lavoisier.
- Melillo, J.M., Aber, J.D., Muratore, J.F., 1982. Nitrogen and Lignin Control of Hardwood Leaf Litter Decomposition Dynamics. *Ecology* 63, 621. doi:10.2307/1936780
- Milcu, A., Partsch, S., Scherber, C., Weisser, W.W., Scheu, S., 2008. Earthworms and legumes control litter decomposition in a plant diversity gradient. *Ecology* 89, 1872–1882. doi:10.1890/07-1377.1
- Moni, C., Rumpel, C., Virto, I., Chabbi, A., Chenu, C., 2010. Relative importance of sorption versus aggregation for organic matter storage in subsoil horizons of two contrasting soils. *European Journal of Soil Science* 61, 958–969. doi:10.1111/j.1365-2389.2010.01307.x
- Mortenson, M.C., Schuman*, G.E., Ingram, L.J., 2004. Carbon Sequestration in Rangelands Interseeded with Yellow-Flowering Alfalfa (*Medicago sativa* ssp. *falcata*). *Environmental Management* 33, S475–S481. doi:10.1007/s00267-003-9155-9
- Mullen, M.D., 2005. Phosphorus and Other Elements, in: *Principles and Applications of Soil Microbiology* (Eds. DM Sylvia, JJ Fuhrmann, PG Hartel & DA Zuberer). pp. 463–488.
- Murayama, S., 1984. Changes in the monosaccharide composition during the decomposition of straws under field conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 30, 367–381. doi:10.1080/00380768.1984.10434702
- Murphy, D.V., Stockdale, E.A., Poulton, P.R., Willison, T.W., Goulding, K.W.T., 2007. Seasonal dynamics of carbon and nitrogen pools and fluxes under continuous arable and ley-arable rotations in a temperate environment. *European Journal of Soil Science* 58, 1410–1424. doi:10.1111/j.1365-2389.2007.00946.x

- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27, 31–36. doi:10.1016/S0003-2670(00)88444-5
- Niklaus, P.A., Le Roux, X., Poly, F., Buchmann, N., Scherer-Lorenzen, M., Weigelt, A., Barnard, R.L., 2016. Plant species diversity affects soil–atmosphere fluxes of methane and nitrous oxide. *Oecologia*. doi:10.1007/s00442-016-3611-8
- Nyfelner, D., Huguenin-Elie, O., Suter, M., Frossard, E., Lüscher, A., 2011. Grass–legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 140, 155–163. doi:10.1016/j.agee.2010.11.022
- Oades, J.M., 1984. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant and Soil* 76, 319–337. doi:10.1007/BF02205590
- Oberson, A., Besson, J.M., Maire, N., Sticher, H., 1996. Microbiological processes in soil organic phosphorus transformations in conventional and biological cropping systems. *Biology and Fertility of Soils* 21, 138–148.
- Olsen, S.R., 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate.
- Oomes, M.J.M., 1990. Changes in dry matter and nutrient yields during the restoration of species-rich grasslands. *Journal of Vegetation Science* 1, 333–338.
- Paustian, K., Andren, O., Clarholm, M., Hansson, A.-C., Johansson, G., Lagerlof, J., Lindberg, T., Pettersson, R., Sohlenius, B., 1990. Carbon and Nitrogen Budgets of Four Agro-Ecosystems With Annual and Perennial Crops, With and Without N Fertilization. *The Journal of Applied Ecology* 27, 60. doi:10.2307/2403568
- Paustian, K., Andrén, O., Janzen, H.H., Lal, R., Smith, P., Tian, G., Tiessen, H., Van Noordwijk, M., Woomer, P.L., 1997. Agricultural soils as a sink to mitigate CO₂ emissions. *Soil Use and Management* 13, 230–244. doi:10.1111/j.1475-2743.1997.tb00594.x
- Pedro, G., 2007. Cycles biogéochimiques et écosystèmes continentaux, ACADÉMIE DES SCIENCES. EDP Sciences.
- Pellerin, B.A., Hernes, P.J., Saraceno, J., Spencer, R.G.M., Bergamaschi, B.A., 2010. Microbial Degradation of Plant Leachate Alters Lignin Phenols and Trihalomethane Precursors. *Journal of Environment Quality* 39, 946. doi:10.2134/jeq2009.0487
- Peñuelas, J., Sardans, J., Rivas-ubach, A., Janssens, I.A., 2012. The human-induced imbalance between C, N and P in Earth's life system. *Global Change Biology* 18, 3–6. doi:10.1111/j.1365-2486.2011.02568.x
- Pérès, G., Cluzeau, D., Menasseri, S., Soussana, J.F., Bessler, H., Engels, C., Habekost, M., Gleixner, G., Weigelt, A., Weisser, W.W., Scheu, S., Eisenhauer, N., 2013. Mechanisms linking plant community properties to soil aggregate stability in an experimental grassland plant diversity gradient. *Plant and Soil* 373, 285–299. doi:10.1007/s11104-013-1791-0
- Petersen, J.C., Barton, F.E., Windham, W.R., Hoveland, C.S., 1987. Botanical Composition Definition of Tall Fescue-White Clover Mixtures by Near Infrared Reflectance Spectroscopy1. *Crop Science* 27, 1077. doi:10.2135/cropsci1987.0011183X002700050050x
- Pfitzenmeyer, C., 1963. La luzerne: culture et fertilisation. Editions SEDA.
- Plante, A.F., Fernández, J.M., Haddix, M.L., Steinweg, J.M., Conant, R.T., 2011. Biological, chemical and thermal indices of soil organic matter stability in four grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1051–1058. doi:10.1016/j.soilbio.2011.01.024
- Poeplau, C., Don, A., Dondini, M., Leifeld, J., Nemo, R., Schumacher, J., Senapati, N., Wiesmeier, M., 2013. Reproducibility of a soil organic carbon fractionation method to derive RothC carbon pools. *European Journal of Soil Science* 64, 735–746. doi:10.1111/ejss.12088
- Post, W.M., Kwon, K.C., 2000. Soil carbon sequestration and land-use change: processes and potential. *Global Change Biology* 6, 317–327. doi:10.1046/j.1365-2486.2000.00308.x
- Rasmussen, J., Sørengaard, K., Eriksen, J., 2012. N₂-fixation and residual effect of four legume species and four companion grass species. *European Journal of Agronomy*.

- Rasmussen, P.E., Douglas Jr, C.L., Collins, H.P., Albrecht, S.L., 1998. Long-term cropping system effects on mineralizable nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1829–1837.
- Rasse, D.P., Rumpel, C., Dignac, M.-F., 2005. Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Plant and Soil* 269, 341–356. doi:10.1007/s11104-004-0907-y
- Rebischung, Daget, 1968. *Plantes de prairies et fourrages annuels*. Paris : Techniques agricoles.
- Recous, LOISEAU, MACHET,, MARY, 1997. Transformations et devenir de l'azote de l'engrais sous cultures annuelles et sous prairies.
- Robert, M., 2002. La séquestration du carbone dans le sol pour une meilleure gestion des terres, Food and agriculture organization. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome.
- Robertson, G.P., Vitousek, P.M., 2009. Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource. *Annual Review of Environment and Resources* 34, 97–125. doi:10.1146/annurev.enviro.032108.105046
- Robson, A., O'hara, G., Abbott, L., 1981. Involvement of Phosphorus in Nitrogen Fixation by Subterranean Clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Functional Plant Biology* 8, 427–436.
- Robson, A.D., O'hara, G.W., Abbott, L.K., 1981. Involvement of phosphorus in nitrogen fixation by subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Functional Plant Biology* 8, 427–436.
- Roscher, C., Thein, S., Weigelt, A., Temperton, V.M., Buchmann, N., Schulze, E.-D., 2011. N₂ fixation and performance of 12 legume species in a 6-year grassland biodiversity experiment. *Plant and Soil* 341, 333–348. doi:10.1007/s11104-010-0647-0
- Rovira, A.D., 1969. Plant root exudates. *The Botanical Review* 35, 35–57.
- Rumpel, C., 2011. Carbon storage and organic matter dynamics in grassland soil, in: *Grassland Productivity and Ecosystem Services*. CABI.
- Rumpel, C., Chabbi, A., 2010. Response of bulk chemical composition, lignin and carbohydrate signature to grassland conversion in a ley-arable cropping system. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 88, 173–182.
- Rumpel, C., Crème, A., Ngo, P.T., Velásquez, G., Mora, M.L., Chabbi, A., 2015. The impact of grassland management on biogeochemical cycles involving carbon, nitrogen and phosphorus. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15, 353–371. doi:10.4067/S0718-95162015005000034
- Rumpel, C., Dignac, M.-F., 2006. Gas chromatographic analysis of monosaccharides in a forest soil profile: Analysis by gas chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis and reduction–acetylation. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1478–1481. doi:10.1016/j.soilbio.2005.09.017
- Sanaullah, M., Blagodatskaya, E., Chabbi, A., Rumpel, C., Kuzyakov, Y., 2011a. Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition. *Applied Soil Ecology* 48, 38–44. doi:10.1016/j.apsoil.2011.02.004
- Sanaullah, M., Chabbi, A., Leifeld, J., Bardoux, G., Billou, D., Rumpel, C., 2011b. Decomposition and stabilization of root litter in top- and subsoil horizons: what is the difference? *Plant and Soil* 338, 127–141.
- Sanaullah, M., Chabbi, A., Lemaire, G., Charrier, X., Rumpel, C., 2010. How does plant leaf senescence of grassland species influence decomposition kinetics and litter compounds dynamics? *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 88, 159–171.
- Sanaullah, M., Chabbi, A., Rumpel, C., Kuzyakov, Y., 2012. Carbon allocation in grassland communities under drought stress followed by ¹⁴C pulse labeling. *Soil Biology and Biochemistry* 55, 132–139. doi:10.1016/j.soilbio.2012.06.004
- Schipanski, M.E., Drinkwater, L.E., 2012. Nitrogen fixation in annual and perennial legume-grass mixtures across a fertility gradient. *Plant and Soil* 1–13.
- Senapati, N., Chabbi, A., Giostri, A., Yeluripati, J.B., Smith, P., n.d. Modelling nitrous oxide emissions from mown-grass and grain-cropping systems : Testing and sensitivity analysis of DailyDayCent using high frequency measurements.

- Sinsabaugh, R.L., Hill, B.H., Follstad Shah, J.J., 2009. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature* 462, 795–798. doi:10.1038/nature08632
- Smith, V.H., 1992. Effects of nitrogen: phosphorus supply ratios on nitrogen fixation in agricultural and pastoral ecosystems. *Biogeochemistry* 18, 19–35.
- Snoubra, B., 2013. Les surplus d'azote et les gaz à effet de serre de l'activité agricole en France métropolitaine en 2010. SOeS.
- soere-acbb.com, n.d. SOERE-ACBB [WWW Document]. URL <http://www.soere-acbb.com/>
- Sollins, P., Homann, P., Caldwell, B.A., 1996. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma* 74, 65–105. doi:10.1016/S0016-7061(96)00036-5
- Soussana, J.-F., Lemaire, G., 2014. Coupling carbon and nitrogen cycles for environmentally sustainable intensification of grasslands and crop-livestock systems. *Agriculture, Ecosystems & Environment, Integrated Crop-Livestock System Impacts on Environmental Processes* 190, 9–17. doi:10.1016/j.agee.2013.10.012
- Soussana, J.-F., Soussana, J.-F., Loiseau, P., Vuichard, N., Ceschia, E., Balesdent, J., Chevallier, T., Arrouays, D., 2004. Carbon cycling and sequestration opportunities in temperate grasslands. *Soil Use and Management* 20, 219–230. doi:10.1079/SUM2003234
- Soussana, J.F., Tallec, T., Blanfort, V., 2010. Mitigating the greenhouse gas balance of ruminant production systems through carbon sequestration in grasslands. *Animal* 4, 334–350. doi:10.1017/S1751731109990784
- Stefanowicz, A., 2006. The Biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. *Polish Journal of Environmental Studies* 15, 669.
- Thevenot, M., Dignac, M.-F., Rumpel, C., 2010. Fate of lignins in soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1200–1211. doi:10.1016/j.soilbio.2010.03.017
- Thomas, R.J., Asakawa, N.M., 1993. Decomposition of leaf litter from tropical forage grasses and legumes. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 1351–1361. doi:10.1016/0038-0717(93)90050-L
- Turner, B.L., Leytem, A.B., 2004. Phosphorus Compounds in Sequential Extracts of Animal Manures: Chemical Speciation and a Novel Fractionation Procedure. *Environmental Science & Technology* 38, 6101–6108. doi:10.1021/es0493042
- UNFCCC, 2014. Kyoto Protocol [WWW Document]. URL http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php
- Vahdat, E., Nourbakhsh, F., Basiri, M., 2011. Lignin content of range plant residues controls N mineralization in soil. *European Journal of Soil Biology* 47, 243–246. doi:10.1016/j.ejsobi.2011.05.001
- Van Soest, P.J., 1964. Symposium on nutrition and forage and pastures: new chemical procedures for evaluating forages. *Journal of Animal Science* 23, 838–845.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703–707. doi:10.1016/0038-0717(87)90052-6
- Vandaele, Lebreton, Faraco, 2010. GES et agriculture. Réseau action climat france et Fondation nicolas hulot piloté par ADEME.
- Vertes, F., Jeuffroy, M.-H., Louarn, G., Voisin, A.-S., Justes, E., 2015. Légumineuses et prairies temporaires: des fournitures d'azote pour les rotations. *Fourrages* 221–232.
- Vranova, V., Rejsek, K., Formanek, P., 2013. Aliphatic, Cyclic, and Aromatic Organic Acids, Vitamins, and Carbohydrates in Soil: A Review. *The Scientific World Journal* 2013, e524239. doi:10.1155/2013/524239
- Walker, T.W., Adams, A.F.R., 1958. Studies on soil organic matter: i. Influence of phosphorus content of parent materials on accumulations of carbon, nitrogen, sulfur, and organic phosphorus in grassland soils. *Soil Science* 85, 307–318. doi:10.1097/00010694-195806000-00004

- Wolf, D.C., Wagner, G.H., 2005. Carbon transformations and soil organic matter formation. *Principles and Applications of Soil Microbiology*, 2nd Edn. Prentice Hall, Upper Saddle River 285–332.
- Zimmermann, M., Leifeld, J., Schmidt, M.W.I., Smith, P., Fuhrer, J., 2007. Measured soil organic matter fractions can be related to pools in the RothC model. *European Journal of Soil Science* 58, 658–667. doi:10.1111/j.1365-2389.2006.00855.x
- Zuberer, D., 2005. Biological dinitrogen fixation: introduction and nonsymbiotic, in: *Principles and Applications of Soil Microbiology* (Eds. DM Sylvia, JJ Fuhrmann, PG Hartel & DA Zuberer). pp. 373–404.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1. Source des gaz à effet de serre en France et dans son agriculture. Source :INRA 2013.....	27
Figure 2. Infographie de l'initiative 4 pour 1000. Source : 4p1000.org	29
Figure 3. Couplage du cycle du carbone et de l'azote dans le continuum sol, plante et atmosphère. © Crème.....	32
Figure 4. Cycle du phosphore. Source : Mullen 2005	34
Figure 5. Structure de base des principaux monomères de sucre dans l'hémicellulose des plantes (en gras la figure en exemple et les isomères de structure).	36
Figure 6. Les monomères de lignine libérés par l'oxydation au CuO.	36
Figure 7. Microbial Efficiency - Matrix Stabilization concept; représentation des interactions entre la qualité de la litière, les émissions de CO ₂ et la stabilisation de la matière organique du sol. Source : Cotrufo <i>et al.</i> , 2013.....	39
Figure 8. Processus affectant la dynamique du carbone organique du sol. Les flèches pointant vers le haut indiquent les émissions de CO ₂ dans l'atmosphère. Il peut aussi y avoir en conditions anaérobies des émissions de CH ₄ . Source: Lal, 2004.....	41
Figure 9. Actions promouvant la production de biomasse et le stockage du carbone dans le sol comme atténuation des émissions de gaz à effet de serre agricole. Sources : INRA 2013	42
Figure 10. Changement des stocks de carbone organique selon l'utilisation des terres en France.	43
Figure 11. Changement des stocks de carbone du sol par le changement d'utilisation des terres causant le stockage et le déstockage (incertitude ± 40%). Source : INRA 2002.	44
Figure 12. Effets de long terme d'une culture annuelle et de deux prairies temporaires sur le carbone organique du sol d'une expérimentation de long terme en Argentine (d'après STUDDERT <i>et al.</i> , 1997) Source : Chabbi <i>et al.</i> , 2015	46
Figure 13. Evolution de la population humaine et de l'utilisation de l'azote durant le vingtième siècle. Source : Erisman <i>et al.</i> , 2008.....	50
Figure 14. Photographie de <i>Medicago sativa</i> L. Source: www.fao.org; by Dr. M. Halling.	52
Figure 15. Photography of Lusignan temporary grassland site of SOERE ACBB. Source: soere-acbb.com.....	61
Figure 16. Photography of "association 2008" experiment. © Crème.	64

Figure 17. Zimmerman fractionation procedure.....	69
Figure 18. Hedley fractionation procedure.....	70
Figure 19. Soil organic carbon fractions for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.....	83
Figure 20. Soil sugar fractions for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates...	85
Figure 21. PCA individual factor map of Biolog® analysis for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). r : pearson's regression coefficient.....	90
Figure 22. Potential mineralization in 56 days of soil carbon with observed (point) and simulated data (line) of soil under permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). With k the C mineralization constant rate use for simulation ($Ct = C0(1 - e(-kt))$) and (a)(b) different letters indicate significant differences for Anova 2 ways and Tukey HSD post hoc test results between treatments of k . Data are presented as mean of 4 replicates.	91
Figure 23. Potential mineralization and organization in 56 days of soil inorganic nitrogen for ammonium (top) and nitrate (bottom) of soil under permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). (a)(b) Different letters indicates significant differences for Anova 2 ways and Tukey HSD post hoc test results between treatments per day. Data are presented as mean of 4 replicates.	92
Figure 24. PCA individual factor map for analysis of soil parameters for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented with 4 replicates.	94
Figure 25. Carbon balance (Bilan Carbone ®) according to sink domains for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Uncertainty between 20 and 50%.	96

Figure 26. Forage yield for lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) during the 4 year experiment; Data obtained in the first year and last year of the experiment were subjected to statistical analyses. Different letters indicate significant differences between treatments (n=4; a,b 2009 et a',b' 2012).	111
Figure 27. Development of lucerne contribution to legume-grass mixtures (cocksfoot/lucerne (DM) and tall fescue/lucerne (FM)) during the four year experiment. Data are presented as mean and standard deviation (n=4).	112
Figure 28. Amount of nitrogen added to soil by BNF under lucerne monoculture (M), cocksfoot/lucerne (DM) and tall fescue/lucerne (FM) mixtures as well as the amount of mineral N fertilizer input to soil under grasses monocultures (D and F) during the four year experiment.	113
Figure 29. IP fractions in soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment. Different letters indicate significant differences between treatments (n=6).	116
Figure 30. OP fractions in soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment (n=6). Different letters indicate significant differences between treatments (n=3).	117
Figure 31. PCA of soil data recorded after 4 years of treatment under lucerne (M), cocksfoot (D) and fescue (F) and their mixtures (DM and FM).	119
Figure 32. Principal component analysis for roots separated from soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM).	135
Figure 33. Principal component analysis for soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM).	136
Figure 34. Maize grain yield in 2011 for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+) and 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-).	145
Figure 35. Measurement of soil GHG emissions cumulated in 14 days in marsh 2014 for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G).	147

TABLEAUX

Table 1. Experimental plan of SOERE ACBB for studied treatment and date of sampling (march 2014).....	62
Table 2. pH, conductivity, cation exchange capacity (CEC) and exchangeable Mg (CEC Mg) as well as sodium (CEC Na) in soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) monocultures and their mixtures (DM and FM). Data are presented as mean of 3 replicates.	65
Table 3. Emission factors for pesticides according to (ADEME, 2010).	74
Table 4. Soil characteristics for permanent cropland (Cr), temporary grassland of 3 years fertilized (TG3N+), of 6 years fertilized (TG6N+), of 6 years unfertilized (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.	82
Table 5. C/N ratio of soil fractions for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.	84
Table 6. Sugar signature of soil under permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.	84
Table 7. Sugar fraction signature's of soil under permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates.	86
Table 8. Lignin signature of soil for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates. ...	87
Table 9. Microbial parameters for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). Data are presented as mean of 4 replicates. ...	88
Table 10. Correlation of variables and treatments with dimension 1 and 2 of PCA of Biolog® analysis for permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). r : Pearson's regression coefficient, p-value <0.05.....	89

Table 11. Correlation of variables and treatments with dimension 1 and 2 of PCA for analysis for soil under permanent cropland (Cr), 3 years fertilized temporary grassland (TG3N+), 6 years fertilized temporary grassland (TG6N+), 6 years unfertilized temporary grassland (TG6N-) and permanent grassland (G). r : Pearson's regression coefficient, p-value <0.05.....	95
Table 12. Forage characteristics of biomass harvested from all treatments: lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) in the last year of the experiment (2012). Data are presented as mean of 3 replicates.	114
Table 13. Carbon forms in soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment. Data are presented as mean of 6 replicates.	114
Table 14. Nitrogen forms in soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment. Data are presented as mean of 6 replicates.	115
Table 15. Phosphorus forms (sum of Hedley fractions and Olsen P) in soil under lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment. Data are presented as mean of 6 replicates.....	116
Table 16. Soil C and N stocks and roots' elemental composition for lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM). Data are presented as mean of 6 replicates...	131
Table 17. Sugar signature of soil and roots for lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM). Data are presented as mean of 6 replicates for soil and 3 replicates for roots.....	132
Table 18. Lignin signature of soil and roots for lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM). Data are presented as mean of 6 replicates for soil and 3 replicates for roots.....	133

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

1. Publications dans les revues internationales avec facteur d'impact :

- A. Crème, C. Rumpel, F. Gastal, M.L. Mora, A. Chabbi (2016) Effects of grasses and a legume grown in monoculture or mixture on soil organic matter and phosphorus forms. *Plant Soil*, 402:117–128. doi: 10.1007/s11104-015-2740-x
- C. Rumpel, A. Crème, P.T. Ngo, G. Velásquez, M.L. Mora, A. Chabbi (2015) The impact of grassland management on biogeochemical cycles involving carbon, nitrogen and phosphorus. *J Soil Sci Plant Nutr*, 15:353–371. doi: 10.4067/S0718-95162015005000034

Soumis

- A. Crème, A. Chabbi, F. Gastal, C. Rumpel (submitted in *Plant and Soil*) Biogeochemical nature of grassland soil organic matter under plant communities with two nitrogen sources.

2. En préparation

- A. Crème, C. Rumpel, X. Le Roux, A. Romian, T. Lan, A. Chabbi (in prep) Fertilised ley grassland has a legacy effect on soil organic matter quantity and quality and microbial activities favourable to C sequestration.
- A. Crème, N. Sanapati, C. Rumpel, A. Romian, A. Chabbi (in prep) Storage C capacity of ley grassland: during 9 years and more.
- A. Crème, N. Saby, C. Rumpel, A. Chabbi (in prep) Carbon and Nitrogen spatiotemporal variation in long term experimentation of temporary grassland.

3. Actes de colloque :

- A. Crème, C. Rumpel, F. Gastal, J.P. Terrasson, D. Billiou A. Chabbi (2014) Nature biochimique de la matière organique du sol de prairie sous deux sources d'azote: engrais azoté synthétique sur monoculture de graminées et association luzerne-graminées. Les 12ieme journées d'études des Sols du 30 juin au 4 juillet 2014 au Bourget du lac ; abstract book page 194-195 (**Présentation orale**).
- A. Crème, C. Rumpel, A. Chabbi (2014) Effect of N derived from mineral fertilizer or Legume species on P forms of grassland soil. 5th Phosphorus in Soils and Plants Symposium (PSP5), du 26 au 29 Aout 2014 à Montpellier ; abstract book page 36 (**Présentation poster**).
- A. Crème, C. Rumpel, F. Gastal, A. Chabbi (2014) Effect of fertilizer replacement by introduction of legume species in grasslands on soil nitrogen, carbon and phosphorus and forage yield. 2nd Soil, Plant and Micro-organism International Symposium, du 24 au 26 novembre 2014 à Pucon au Chili ; abstract book page 8 (**Présentation orale**).
- A. Crème, C. Rumpel, A. Romian, T. Lan, R.S. Massad, A. Chabbi (2015) Effect of grassland management on soil organic matter storage and greenhouse gas emissions. SOM sympososium 2015, du 20 au 24 septembre 2015 à Göttingen en Allemagne ; abstract book page 403 (**Présentation orale**). **Déplacement financé par la bourse Demolon de l'Association Française de l'Etude des Sols (AFES).**

The impact of grassland management on biogeochemical cycles involving carbon, nitrogen and phosphorus

C. Rumpel^{1,2*}, A. Crème², P.T. Ngo³, G. Velásquez³, M.L. Mora³, A. Chabbi^{2,4}

¹CNRS, IEES (UMR UPMC-CNRS-UPEC-INRA-IRD), Campus AgroParisTech, Thiverval-Grignon, France

²INRA, UR Ecosys (UMR INRA-AgroParisTech), Campus AgroParisTech, Thiverval-Grignon, France

³Universidad de La Frontera ~ Scientific and Technological Bioresource Nucleus (BIOREN-UFRO), Temuco, Chile ⁴INRA, UR 3PF, Lusignan, France *Corresponding author: cornelia.rumpel@grignon.inra.fr

Abstract

Grassland introduction into intensively managed agricultural landscapes may enhance soil organic matter (SOM) content and ecosystem services. However, the magnitude of this effect depends on grassland management practices, and their influence on the soil system. The aim of this paper is to highlight these impacts and their consequences for SOM dynamics and element cycling. We focused in particular on the effect of different grassland management practices in terms of grazing regime, fertilization, and species choice.

While carbon, nitrogen and phosphorus cycles are more strongly coupled under grassland as compared to permanent cropping, uncoupling of elemental cycles may occur through management intensification. Grazing regime, fertilization and species choice affect elemental coupling and SOM turnover via organic matter input and rhizosphere activity to different extent, thereby resulting in contrasting SOM storage. Grazing may be more beneficial for SOM contents compared to mowing up to a certain animal density depending on soil type and pedoclimatic context. SOM storage may be increased in some cases through specific fertilizer additions, whereas in others no change was observed. Species choice, e.g. high diversity or introduction of legumes, influence element budgets and soil nutrient availability through plant physiological constraints as well as intra- or interspecific interactions. The effect of different plant species mixtures on soil parameters has rarely been elucidated.

We conclude that the impact of grassland management practices on SOM of different soil types and the resulting ecosystem services, such as C and nutrient storage need further research in contrasting pedoclimatic contexts. More studies on the controls of belowground biogeochemical cycling of elements are necessary in order to fully understand and manage belowground processes via aboveground plant communities.

Keywords: Grassland management, elemental coupling, carbon, nitrogen, phosphorus, soil organic matter

1. Introduction

By now it has become evident that intensive agriculture leads to organic matter depletion of soils (Lal, 2004), threatening the ability of agroecosystems to provide ecosystem services. Replenishing soil organic matter (SOM) pools may be possible through the adaptation of land use practices, which favor permanent soil cover and high carbon (C) input belowground (Whitmore *et al.*, 2014). One option may be the establishment of grasslands into agricultural landscapes (Franzuebbers, 2012). Grassland systems include rangelands, shrublands, pastureland, and cropland sown with pasture and fodder crops. They are important in many parts of the world, contain about 20% of the world C stocks (FAOSTAT, 2009; Ramankutty *et al.*, 2008), and have multiple functions and values in terms of ecosystem services (Conant *et al.*, 2010). Grasslands may reduce soil erosion through a permanent soil cover and dense rooting systems, thus favoring soil fertility, water quality and water retention, compared with other crops (Conant *et al.*, 2010). The high organic matter (OM) content of grassland soil is beneficial to soil quality due to its positive effects on aggregation, microbial activity and diversity as well as nutrient and water availability (Kononova, 1966; Allison, 1973; Tate, 1987).

One of the most important characteristics of the SOM pool is its response towards human interventions. In grassland systems, elemental cycles are strongly coupled (Soussana and Lemaire, 2014). However, intensive grassland management may lead to uncoupling of these cycles, leading to negative environmental impacts in terms of air and water quality (Dungait *et al.*, 2012). Grassland management is therefore most important in determining if this land use system preserves its beneficial effects in terms of

closed elemental cycles. As in grasslands, the main SOM stocks are found belowground, it is crucial to understand the effect of management strategies on the coupling via plant litter input and rhizosphere processes. Grassland management concerns species choice as well as management options, such as production versus pasture, grazing type and/or intensity and type of fertilisation, which may influence

OM input as well as its dynamics. In recent years it has become evident that maintenance and increase of SOM may be closely related to microbial C use efficiency (Cotrufo *et al.*, 2013) as well as the built up of microbial biomass (Miltner *et al.*, 2012). Recent studies indicated that microbial growth stimulated by plant input of low molecular weight dissolved organic compounds may contribute to SOM built up (Bradford *et al.*, 2013). It has been shown that microorganisms may be able to produce recalcitrant OM (Jiao *et al.*, 2010) and even easily decomposable microbial products may be subject of stabilisation by interaction with the mineral phase (Rumpel *et al.*, 2015). However, microbial turnover and subsequent SOM stabilisation by mineral interactions may have stoichiometric constraints requiring narrow C:N:P ratios (Kirkby *et al.*, 2014), which associates a nutrient cost to soil C sequestration (Richardson *et al.*, 2014). In addition to requiring nutrients, microbial built up of SOM may be counterbalanced or accentuated by priming effects, which are important processes in the plants rhizosphere (Merino *et al.*, this issue). Positive priming refers to mineralisation of otherwise stable C through shifts in microbial community composition (Fontaine *et al.*, 2003). However, in some cases the addition of organic matter to soil as well as rhizosphere processes may lead to a switch of the microbial communities with regards to the substrate they use preferentially, thereby protecting SOM from its decomposition (Kuzyakov and Gavrichkova, 2010). Plant communities are main controlling factors of these processes because they can

alter the quality of their litter input as well as their rhizosphere processes. By such alterations, they influence soil microbial activity, water and labile C availability as well as pH and nutrient cycling (Peres *et al.*, 2013; Frinzi *et al.*, 2015). In this review, we support the hypothesis that for evaluation of C storage

and nutrient availability in grassland soils, knowledge about the impact of management practices such as cutting or grazing, fertilisation and species choice on belowground processes is crucial (Figure 1). We aim to review the recent literature on different grassland management practices and their impact on the forms and turnover of carbon and major nutrients (N, P).

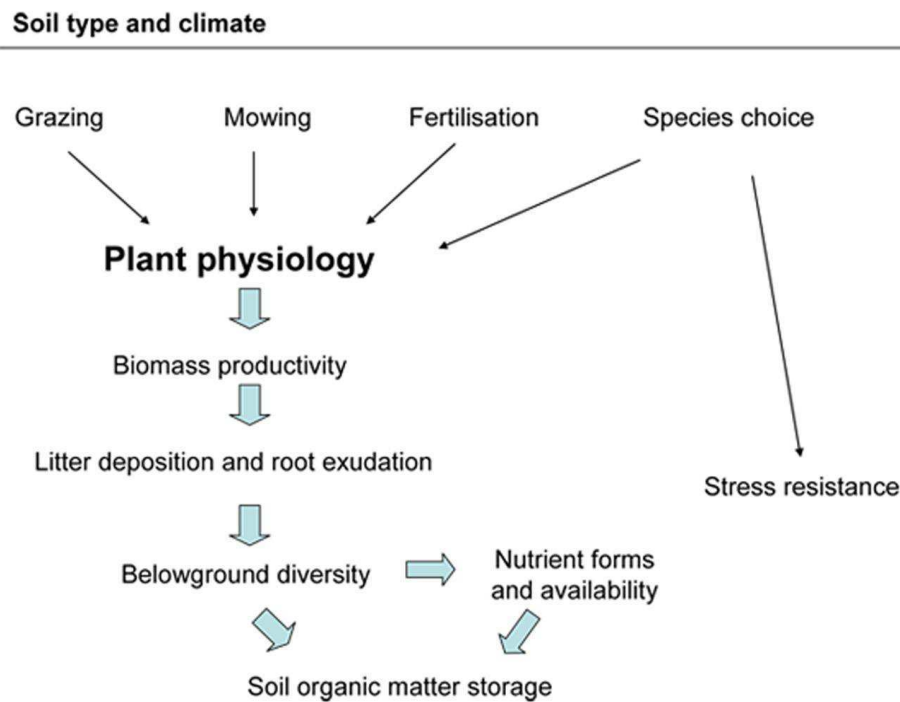


Figure 1. Grassland management effects on plant communities and potential impacts

2. Element coupling and organic matter dynamics in grassland soil

The amount of SOM stored in a given soil is determined by the balance of C, N and P entering the soil, via plant production, atmospheric deposition or fertilisation, and C, N and P leaving the soil driven by microbial processes through mineralization and leaching as CO_2 , NH_4 , NO_3 ,

PO_4 (Figure 2) as well as biomass export and erosion. Consequently, a main control on SOM storage is the PO_4 (Figure 2) as well as biomass export and erosion. Consequently, a main control on SOM storage is the amount and type of residues that are produced by plants as the primary producers in the ecosystem and the amount and type of nutrient input. In natural grassland systems, the nutrient elements N and P are coupled closely with

the C cycle through plant production via CO_2 and N and P assimilation leading to plant growth (Figure 2). After the senescence process, when plants recovered some essential nutrients, in natural systems, litter is returned to soil and microbial decomposition starts and decoupling of elemental cycles occurs through mineralisation. However, new coupling of C, N and P cycles also occurs through growth of the soil microbial biomass (Figure 2). These processes are extremely important, as they release nutrients for plant and microbial utilisation and also contribute to the accumulation of stabilized SOM (Miltner *et al.*, 2012). In general, C and N are more strongly

than C and P, due the greater limitations of plant and microbial growth by N than P and the increasing decoupling of P from N and C during SOM formation (Dungait *et al.*, 2012). This may be due to strong sorption and thus immobilization of organic and inorganic P forms to soil minerals (Cerli *et al.*, 2003). Because of its strong association with soil particles, soil erosion is one of the most important processes leading to P loss. As erosion under grassland is low due to permanent soil cover, little P loss may occur in these systems through this process (McLauchlan, 2006), while harvesting export may lead to P depletion in the long-term in unfertilised grassland soils (Pätzhold *et al.*, 2013).

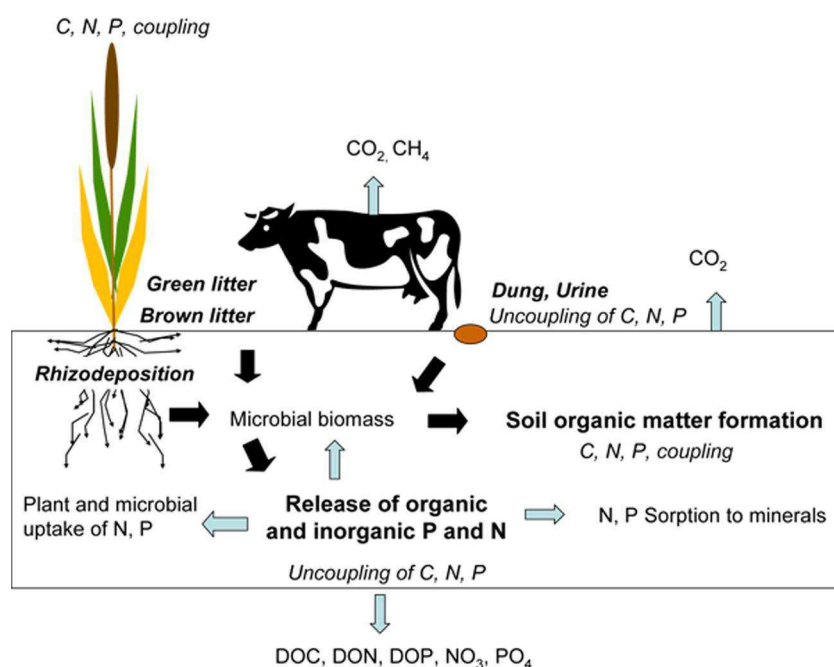


Figure 2. Processes leading to coupling and uncoupling of C, N and P cycles in grassland soil (Soussana and Lemaire, 2014; Miltner *et al.*, 2012; Sanaullah *et al.*, 2010; Dungait *et al.*, 2012; Parsons *et al.*, 2012)

In contrast, N is mobile in soil and subject to leaching losses mainly in form of nitrate if not taken up by plants and gaseous losses through denitrification and ammonia volatilization. In general nitrate leaching under grassland is greatly reduced as compared to cropland and recently it has been shown that grassland introduction into the cropping cycle reduces the amount of nitrate leached from the system (Robinson Kunrath *et al.*, 2015). However, increasingly intensive grassland management also leads to high amounts of reactive N and P present in soil, which may in some cases be released from the system through leaching and volatilisation and contribute to its negative environmental impacts (Sharpley *et al.*, 1994; Soussana and Lemaire, 2014).

Traditionally, it has been supposed that organic N and P have to be mineralised before plant uptake. In recent years it has been shown that amino acids undergo rapid mineralisation (Farrell *et al.*, 2011) as well as direct plant uptake (Hill *et al.*, 2011) in grassland soil. The turnover rates of low molecular weight organic N in grassland soils was found to be rapid, suggesting that these compounds are very important for microbial and potentially plant nutrition despite their low quantitative amounts in soil solution (Wilkinson *et al.*, 2014). Dissolved organic P also contributes in high proportion to total dissolved P losses under grassland soil especially when soils are rich in P (McDowell and Koopmans, 2006) or when they are subjected to dung input (Fuentes *et al.*, 2012). These compounds are easily available to the soil microbial biomass (Turner *et al.*, 2002) even after sorption to the mineral phase (Franson and Jones, 2007), but may also constitute a high proportion of P leached from intensively used pasture systems (McDowell and Koopmans, 2006). It is unknown, whether dissolved organic P can be taken up by plant directly from the solution. The fate of low molecular weight organic compounds containing P and N in soil is insufficiently understood (Figure 3). Studies addressing C,

N and P coupling should therefore also concentrate

on dissolved organic compounds, which are a highly dynamic compartment in grassland soils constituting a link between soil, plants and microbes.

3. Effect of grassland management on OM input

Grassland management can impact coupling and decoupling of elemental cycles through regulation of plant production via fertilisation and the grazing regime. Stoichiometry of plant residues determines the intensity of microbial decomposition, and ultimately C sequestration. Under extensive management, for example, plant N nutrition status is low leading to longer residence times of plant litter, compared to intensive management where plants have higher N nutrition status (Klump *et al.*, 2007). Thus in extensively managed systems the resulting SOM may be constituted mainly of labile particulate organic matter protected within soil aggregates and not through strong organomineral associations it may therefore be vulnerable to loss upon disturbance (Six *et al.*, 2004). OM input into grassland soil occurs in the form of above- and belowground plant tissue (Figure 2). Aboveground litter input may occur as brown senescent litter in grazed pastures (Mazzanti *et al.*, 1994). Under mowing regime, a significant proportion of aboveground plant litter is returned as fresh litter during harvest. It has been shown, that leaf litter of grassland species may be of very different quality depending whether or not it has been affected by the senescence process (Sanaullah *et al.*, 2010). The initial litter quality determines its degradation behaviour in soil. This is true for aboveground as well as belowground litter additions (Redin *et al.*, 2014). Total soluble sugar content is an important controlling factor in the earlier phase of decomposition, whereas the later stages of decomposition may be regulated by the lignin/N ratio of initial litter. It was shown that grass litter added to soil at different stages of maturity decomposes at different rates and maintains these differences for several years (Sanaullah *et al.*, 2010).

In temperate grassland systems, more than 80% of the net primary production is diverted to root production (Swift *et al.*, 1979). Herbaceous species are less deep rooting than forest vegetation or shrubs and globally ca. 40 % of all SOC in the first meter of grassland soil is found in the uppermost 20 cm (Jobbagy and Jackson, 2000). Root carbon input into soil may occur as root cell sloughing, other root debris, mucilage and root exudation. All may contribute greatly to SOM due to preferential stabilisation within the mineral matrix (Rasse *et al.*, 2005), in addition to the root chemical composition, which makes root material more difficult to decompose compared to aboveground material (Bertrand *et al.*, 2006). Rhizosphere processes, such as root turnover, rhizodeposition, root respiration and microbial response are extremely important in grassland soil. These processes may lead to stabilisation as well as destabilisation of soil carbon and nitrogen (Cheng and Kuzyakov, 2005). Plant roots may affect SOM decomposition through

(1) decreasing mineral nutrient availability to soil microorganisms due to plant uptake (Schimel *et al.*, 1989), (2) changing the physical environment in the rhizosphere (Shields and Paul, 1973), (3) increasing organic substrate supply and (4) enhancing microbial turnover due to fungal grazing. However, interactions at the rhizosphere level between soil microorganisms and roots of different plant communities are complex and remain poorly understood (Cheng and Kuzyakov, 2005). Rooting behaviour of plants and rhizosphere processes may be strongly influenced by grassland management, which can therefore impact the storage and composition of C, N and P in soil. For example, defoliation of plants by grazing and cutting stimulates root exudation, thereby increasing the quantity of rhizomicrobial communities and their activities (Pater-son and Sim, 1999; Hamilton *et al.*, 2008), leading to increased availability of P and N through positive feedback mechanisms (Hamilton and Frank, 2001).

However, this effect may be transient and last only for some days (Henry *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2004). Defoliation may also affect C flow and allocation within grasses (Kuzyakov *et al.*, 2002) as well as N fixation and allocation in legumes (Dahlin and Martensson, 2008). However, these effects have been studied up to now mainly in pot experiments, whereas their assessment under natural conditions is scarce. Defoliation under natural conditions has been assessed by isotopic labelling of defoliated grasses. It has been shown that defoliation under field conditions alters belowground

C allocation (Holland *et al.*, 1996) and stimulates rhizospheric N mineralisation, which ultimately benefits the defoliated plants (Hamilton *et al.*, 2008). It is not known, whether defoliation by grazing induces different physiological plant responses compared to cutting. In addition to above- and belowground litter, dung can constitute an important OM source in grasslands managed by grazing (Jarvis *et al.*, 1996). On a pasture with a grazing intensity of 700 cow days ha⁻¹ a⁻¹, an average of 6.4% of the grazed area is commonly covered by dung patches which provide a C input equivalent to 22.5 t C ha⁻¹ (Bol *et al.*, 2000). By grazing and depositing dung and urine, large herbivores remove carbon and nutrients and return them by excretion, leading to cycling and redistribution, which in turn influences the structure and functioning of grassland systems (Heynes and Williams, 1993) as well as OM dynamics through carbon dioxide release and OM incorporation into soil. Dung is a source of labile C, N and P, which may increase microbial biomass (Lovell and Jarvis, 1996; Hatch *et al.*, 2000) and induce priming of native organic matter (Fontaine *et al.*, 2003). Molecular studies have shown that carbohydrates constitute part of the dung-derived C in soil (Dungait *et al.*, 2009).

While dung and urine deposition occurs in well defined patches, limited information is available about the impact of this labile C on the soil biogeochemical cycles at larger scales.

Many types of grassland worldwide are managed by regular burning. Fire disrupts C, N and P cycles by releasing much C and N in gaseous form and P in mineral form. In the long-term burning tends to conserve soil P while it removes C and N (Johnston *et al.*, 2003). In addition fire-derived organic matter forms are deposited on soil. Quantification of this material in the major grassland ecosystems of the world showed a contribution between 5 and 30 % of total SOM (Rodionov *et al.*, 2010). This is high compared to agricultural soils, which do not accumulate fire-derived SOM even when subject to annual stubble burning (Rumpel, 2008). Fire-derived SOM forms are in general more difficult to degrade than plant-derived SOM due to their aromatic structure and low nitrogen content (Knicker, 2011). During fire, P is generally converted to inorganic forms, while N may be part of pyrogenic organic matter. However, the degradability of fire-derived SOM may vary according to fire conditions and chemical composition of the affected vegetation (Alexis *et al.*, 2010). Moreover, fire-derived SOM forms may influence element cycles in grassland soil through their specific nutrient adsorption and plant growth stimulating properties (Criscuoli *et al.*, 2014).

4. Impact of harvesting regime and fertilisation on soil properties and processes affecting SOM storage and nutrient forms

The SOM storage and stabilisation pathways may be influenced by grazing management of grassland ecosystems through alterations of OM input (see above) and associated soil properties. Intensive grazing leads to significantly decreased SOC stocks associated with higher bulk density in topsoils (Steffens *et al.*, 2008, 2009) and additionally to lower mean-weight diameter of water stable aggregates, lower monosaccharide contents and lower contribution of microbial-derived

sugars (Dormaer and Williams, 1998). The grazing regime (high or low intensity) greatly influences SOM dynamic (Steffens *et al.*, 2009). Intensively grazed grasslands are dominated by fast-growing species producing litter low in lignin and rich in N, which is rapidly decomposed by bacteria (Bargett *et al.*, 1998), whereas grasslands adapted to low grazing levels are dominated by slow growing species and slow litter decomposition (Michunas and Lauenroth, 1993). The two different plant communities have been reported to control SOM stocks through plant roots and their activity (Klump *et al.*, 2009). Changes in C dynamics after grazing cessation may be slow (Klump *et al.*, 2009) and not lead to C sequestration in soils, where the mineral particles are already saturated with OM (Steffens *et al.*, 2009). In contrast, light or moderate grazing does not necessarily decrease SOM contents (Cui *et al.*, 2005). Grassland management by mowing may reduce C turnover as compared to grazing (Herold *et al.*, 2014). It was found, that long-term grazing with cattle was more favourable for macroaggregation and aggregate stability and thus carbon storage than harvest by mowing (Franzluebbers *et al.*, 2000). This corresponds to the increase of net C storage measured by CO₂ fluxes in temperate grazing systems compared to mowed grasslands (Senapati *et al.*, 2014). The higher C storage was attributed to greater export by harvest under cutting regime, whereas under grazing a substantial amount of C is returned in form of dung and urine (Senapati *et al.*, 2014). However, grazing and mowing may also stimulate differently plant physiology and rhizospheric C input, thereby probably altering SOM storage in soil.

In terms of macronutrients, grasslands were found to favour the accumulation of organic P forms, which may be relatively available as compared to insoluble inorganic P forms, which accumulate during cultivation (Sharpley and Smith, 1985, Crew and Brooks, 2014).

Grazing as well as cutting seems to remove P from grassland soils (Lilienfein *et al.*, 2000; Pätzold *et al.*, 2013). Although there are few studies on P forms under different grazing regimes, a return of higher amounts of inorganic P compared to the ingested vegetation was found, suggesting transformation of organic forms in inorganic ones during the transit in the digestive tube (McDowell and Stewart, 2005). While P present in dung was found to parallel P concentrations in feed (McDowell *et al.*, 2008), grazing animals lead to substantial uncoupling of C from N and P (Soussana and Lemaire, 2014). The majority of P and N are returned to the soil by urine or dung deposition, whereas about 70% of the ingested C is emitted as CO₂ by respiration (Parson *et al.*, 2013). Intensive dairy farming may however also increase P loss in dissolved organic form (Javie *et al.*, 2010). N export from the site is usually complete in mowing systems and higher in dairy pastures compared to dry livestock ones (Parson *et al.*, 2013). The return of N and P with animal excrements by manure occurs generally in labile form, which is much more mobile compared to initial feed (see above), and increases the N and P leaching losses if applied without prior treatment (Jouquet *et al.*, 2011).

Apart from presence and absence of grazing animals, management of grassland may include the application of fertilisers (Figure 1; Table 1). Fertilisation is usually applied to counteract nutrient export and to maintain or intensify forage production. Many soils have been over fertilised in the past and therefore are high in organic matter leading to oversupply and subsequent nutrient loss from soil after grazing cessation (McGovern *et al.*, 2014). Recently it has been shown that loss of reactive P from high P soils may be reduced by manipulation of N fertilizer regime in order to stimulate P uptake through increased plant growth (Dodd *et al.*, 2014).

Due to its effect on plant production, fertilisation may impact SOM storage. However, this effect is not entirely clear. While Ammann *et al.*, (2007) concluded that conversion of arable land to grassland leads to a positive carbon balance only if the system receives extra nitrogen inputs, no relationship between the intensity of management and SOC stocks was found for Alpine grasslands (Zeller *et al.*, 1997; Bitterlich *et al.*, 1999). A review of global data sets revealed fertilised grasslands had, on average, higher SOC stocks than natural or less intensively managed systems (Conant *et al.*, 2001). While the use of N fertilisers in most managed grassland systems seems absolutely necessary to maintain grassland productivity, soil P stocks of most temperate agricultural soils seem to be sufficient. Accordingly, Nyborg *et al.*, (1997) found with increasing level of N fertilisation larger SOC contents associated with higher productivity for Canadian grasslands, while no change of SOM stocks was noted with increasing P fertiliser rates despite higher aboveground production for pastures in New Zealand (Schipper *et al.*, 2012). In some cases, N and P fertilisation may even lead to decrease of SOM stocks by increasing microbial activity and altering C substrate utilisation pattern of soil microbial communities through changes of plant biomass composition (Li *et al.*, 2014). These examples may illustrate that management effects on SOM are diverse and strongly dependent on pedoclimatic parameters (Mcsherry and Richie, 2013). (Table 1).

The mechanisms and in particular soil type effects, which lead to these contrasting results yet need to be elucidated. Moreover, the effects of different grassland management practices were assessed up to now mostly for topsoil horizons, although perennial species may affect a much larger volume of soil and greater soil depth than annual species (Beniston *et al.*, 2014).

Table 1. Contrasting effect of different management practices on element cycles and SOM storage

Management practice	Effect on soil and nutrient forms	Reference
Mowing	C and nutrient export with harvest Reduced turnover of mineral associated OC	Parson <i>et al.</i> , (2013) Herold <i>et al.</i> , (2014)
Grazing	Decoupling of N, P, C cycles with reduction of C longevity Decrease of SOM storage Stimulation of belowground activity Increase of C flux below ground	Parson <i>et al.</i> , (2013) Soussana <i>et al.</i> , (2014) Steffens <i>et al.</i> , (2008, 2009) Hamilton <i>et al.</i> , (2008) Holland <i>et al.</i> , (1996)
Fertilisation	Increase of SOM storage No change in SOM storage Decrease of SOM storage	Conant <i>et al.</i> , (2001) Schippers <i>et al.</i> , (2012) Li <i>et al.</i> , (2014)
Species diversity	Increasing aggregate stability Changes of nutrient acquisition efficiency	Peres <i>et al.</i> , (2013) Oelmann <i>et al.</i> , (2011)
Legume introduction	Decrease of aggregate stability Increase of aggregate stability Higher contribution of organic P Higher soil N and C No change in soil C and N Increased resistance to water stress	Peres <i>et al.</i> , (2013) Angers <i>et al.</i> , (1999) Crème <i>et al.</i> , submitted Fustec <i>et al.</i> , (2010), Paustrian <i>et al.</i> , (1990) Agbenin and Adeniyi (2005) Bell <i>et al.</i> , (2012) Crème <i>et al.</i> , submitted Sanaullah <i>et al.</i> , (2012)

5. Plant species and their impact on SOM and forms of macronutrients

The formation of SOM and the forms of macronutrients in soil may be influenced by species composition of grasslands. In natural grasslands, species diversity is large compared to sown ones, which are rarely composed of more than three species. Introduction of animals tends to reduce this diversity due to selective grazing and varying stress resistance of different grassland species (Bargett *et al.*, 1998). Diverse species rich grasslands are known to be characterised often by higher amounts of above-ground biomass than those consisting of few species (Hooper *et al.*, 2005). They also penetrate larger volumes of soil due to diverse and complementary root traits (Körner and Spehn, 2002). Due to increased root activity and in turn higher soil organic carbon and soil microbial biomass concentrations, aggregate stability was found to be increased in soil under grasslands with high species diversity. (Peres *et al.*, 2013). However, plant species diversity was also shown to decrease soil concentrations of plant available N due to complementary uptake (Niklaus *et al.*, 2001). This is in contrast to plant available P, which was found to be unchanged in soil solution under more diverse grasslands (Oelmann *et al.*, 2011). Diverse grasslands, seem to develop highly efficient P exploitation strategies, thereby being better prepared to respond to P limitations (Oelmann *et al.*, 2011).

The introduction of forage legumes, able to fix atmospheric nitrogen through symbiosis with *Rhizobium* into grasslands generally has a favourable impact on soil due to their deep rooting system and easy decomposable organic residues rich in nitrogen, which promote the development of micro-fauna and soil microflora. The direct availability of the fixed N to the roots minimizes nitrogen losses (Crews and Peoples 2005) and reduces the risk of NO₃ leaching,

acidification of soil, ammonia volatilization (Crews and Peoples 2004) and N₂O emissions by denitrification (IPCC 2013). The introduction of legumes in pasture systems can increase the soil N content and cycling efficiency through legume residue deposition and root exudation (Fustec *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2012; Schipanski and Drinkwater 2012). Symbiotic nitrogen fixation is the key process in N and C dynamics in agricultural systems containing legume species. It couples soil nitrogen and carbon cycles. In roots nodules of legume species, N₂ fixing bacteria benefit from carbon inputs provided by the plant and make nitrogen available to the plant in mineral form. They reduce the atmospheric N₂ in NH₃ then NH₄, using energy from the oxidation of carbohydrates (Butterbach-Bahl *et al.*, 2011). The nodule metabolism depends on carbohydrate products fixed by photosynthesis in shoots and transported to the roots. The principal compound is sucrose. Each day, the nodule metabolism uses 40-50% of all photosynthetic products and 50% of this is returned to the atmosphere as CO₂ by respiration (Gordon 1992). Legumes require more P than grasses. The high-energy cost of N₂ fixation requires adenosine tri-phosphate (ATP) and therefore P to build and maintain functioning nodules. As a consequence, legume plants show higher concentration of P compared to other plants (Tsvetkova and Georgiev, 2007) and in soil under legume, organic forms of P tend to be present in higher concentrations compared to soil under grass species (Daroub *et al.*, 2001 ; Crème *et al.*, submitted).

The transfer of N and P from the legumes to the soil occurs by returning shoot and root litter after plant death as well as root exudates during the plant life. In the case of mowed grassland, only rhizodeposition will lead to enrichment of soil organic matter due to removal of the aboveground biomass. However, even in mowed grassland part of the biomass is lost during harvesting and readily decomposable (Sanaullah

et al., 2010). In Lucerne grasslands, 3% to 4,5% of the fixed N is released as soluble compounds. However, roots and senescent nodules appear to be the main source of nitrogen in legume grasslands, especially as rhizodeposition increases with the age of the plants (Fustec *et al.*, 2010).

When combining grasses with legume species in grassland systems, N fixation is more efficient with 9% to 18% more N fixed than in legume monocultures (Nyfeler *et al.*, 2011; Schipanski and Drinkwater 2012) leading to higher the forage yields (Rasmussen *et al.*, 2012; Schipanski and Drinkwater 2012). Higher soil N and C storage and cycling efficiency under legume-grass mixture was observed compared to legume monoculture (Paustian *et al.*, 1990; Fustec *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2012; Schipanski and Drinkwater 2012; Bell *et al.*, 2012). This was explained by competition for soil N and also facilitation concerning soil N uptake between different species for example due to different root systems (Carlsson and Huss-Danell 2003; Schipanski and Drinkwater 2012) and N transfer between legumes and grasses (Louarn *et al.*, 2014). However, the effect of legume species on soil parameters under grassland associations may depend on the associated grass species (Crème *et al.*, submitted). This may explain the contrasting observations made for physical soil properties such as aggregate stability, i.e. increase under legume species (Angers *et al.*, 1999) and decrease compared to grasses (Peres *et al.*, 2013). This contrasting impact of different legume – grass associations (Table 1) may be explained by species related differences in N uptake and N transfer mechanisms (Louarn *et al.*, 2014) as well as differential root activity leading to contrasting microbial activity in the rhizosphere (Sanaullah *et al.*, 2011). In general, introduction of legume species into grasslands may be positive due to their effect on soil fertility, plant growth and stress resistance. However, legume

species are more competitive than grass species for example regarding drought resistance (Sanaullah *et al.*, 2012), making the maintenance of equilibrated mixtures a management challenge.

6. Conclusion

Although grasslands are in general favourable systems in terms of SOM storage and nutrient cycling, intensification of grassland management may decouple elemental cycles and favour losses of reactive N and P. Grazing regime and fertilisation influence biogeochemical cycling of carbon and major plant nutrients mainly through their effect on plant activity, which greatly influences rhizosphere processes and nutrient uptake or release. Elemental coupling and decoupling processes controlling SOM storage may occur via plants or microorganisms and controlled by specific fertiliser additions. Further progress is necessary in order to optimise grassland management strategies through species choice, fertilisation, and grazing intensity in order to ensure maximal ecosystem services and productivity of intensively used grassland systems. The vulnerability of the system needs to be reduced especially regarding the expected climate change scenarios. At the current stage of knowledge, we lack information about the impact of physiological plant responses to grassland management on biogeochemical C, N and P cycling in soil. In particular their effects on processes affecting SOM properties and its storage at greater depths are poorly understood. We also crucially need information about the processes controlling the stability of organic N and P forms. Management effects on SOM accumulation and availability of plant nutrients are case dependent and may be strongly related to the pedoclimatic context. More research is needed to disentangle belowground complexity, which may be controllable via management effects on plant activity.

Acknowledgements

The authors thank the French ministry of Foreign affairs and the Conicyt for financial support of collaboration between French and Chilean research groups under the framework of the ECOSSUD-CONICYT C13U02 project. P.T. Ngo acknowledges funding under the framework of the project Fondecyt Posdoctorado 3150194. A. Crème was funded by the European community's Seventh Framework programme (FP2012-2015) under grant agreement no. 262060 (ExpeER) and the Regional Council for Poitou-Charentes. Moreover, we received funding from the French agency ADEME under the framework of the REACTIFF project AEGES.

References

- Agbenin, J.O., Adeniyi, T. 2005. The microbial biomass properties of a savanna soil under improved grass and legume pastures in northern Nigeria. *Agri., Ecosys. Environ.*, 109, 245-254.
- Alexis M.A., Rumpel C., Knicker H., Leifeld J., Rasse D., Péchot N., Bardoux G., Mariotti A. 2010 : Thermal alteration of organic matter during shrubland fire: a field study. *Org. Geochem.*, 41, 690-697.
- Allison F.E. 1973. Soil organic matter and its role in crop production. (Elsevier: Amsterdam).
- Ammann, C., Flechard, C.R., Leifeld, J., Neftel, A., Fuhrer, J. 2007. The carbon budget of newly established temperate grassland depends on management intensity. *Agric. Ecosyst. Environ.* 121, 5-20.
- Angers, D.A., Edwards, L.M., Sanderson, J.B., Bissonnette, N. 1999. Soil organic matter quality and aggregate stability under eight potato cropping sequences in a fine sandy loam of Prince Edward Island. *Can. J. Soil Sci.* 79, 411-417.
- Bardgett, R.D., Wardle, D.A., Yeates, G.W. 1998. Linking above-ground and below-ground interactions: how plant responses to foliar herbivory influence soil organisms. *Soil Bio. Biochem.* 30, 1867-1878.
- Bell, L.W., Sparling, B., Tenuta, M., Entz, M.H. 2012. Soil profile carbon and nutrient stocks under long-term conventional and organic crop and alfalfa-crop rotations and re-established grassland. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 158, 156-163.
- Beniston, J.W., DuPont, S.T., Glover, J.D., Lal, R., Dungait, J.A.J. 2014. Soil organic carbon dynamics 75 years after land-use change in perennial grassland and annual wheat agricultural systems. *Biogeochem.* 127, 37-49.
- Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B., Recous, S. 2006. Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant Soil.* 281, 291-307.
- Bitterlich, W., Kaserer, M., Pottinger, C., Hofer, H.P., Cernusca, A. 1999. Effect of land-use changes on soils along the Eastern Alpine transect. In: Cernusca, A., Tappeiner, U., Bayeeld, N. (Eds.). *Land-use Changes in European Mountain Ecosystems*. Blackwell Science Ltd, Berlin, Wien, pp. 225-234.
- Bol, R., Amelung, W., Friedrich, C., Ostle, N. 2000. Tracing dung-derived carbon in temperate grassland using ^{13}C natural abundance measurements. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1337-1343.
- Bradford, M.A., Keiser, A.D., Davies, C.A., Mersmann, C.A., Strickland, M.S. 2013. Empirical evidence that soil carbon formation from plant inputs is positively related to microbial growth. *Biogeochem.* 113, 271-281.
- Butterbach-Bahl K., Gundersen P., Ambus P., Augustin J., Beier C., Boeckx P., Dannenmann M., Gimeno B.S., Kiese R., Kitzler B., Ibrom A., Rees R.M.,

- Smith K., Stevens C., Vesala, T., Zechmeister-Boltenstern, S. 2011. Nitrogen turnover processes and effects in terrestrial ecosystems. In: The European Nitrogen Assessment. ed. M.A. Sutton, C.M. Howard, J.W. Erisman *et al.*, Cambridge University Press.
- Carlsson, G., Huss-Danell K. 2003. Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant Soil*. 253, 353–372.
- Celi, L., De Luca, G., Barberis, E. 2003. Effects of interaction of organic and inorganic P with ferrihydrite and kaolinite-iron oxide systems on iron release. *Soil Sci.* 168, 479-488.
- Cheng W., Kuzyakov Y. 2005. Root effects on soil organic matter decomposition. In: S. Wright, S., Zobel, R. (Eds.), *Roots and Soil Management: Interactions Between Roots and the Soil*, Agronomy Monograph No. 48, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA, pp. 119-143.
- Conant, R.T., Paustian, K., Elliott, E.T. 2001. Grassland management and conversion into grassland: effects on soil carbon. *Ecol. Appl.* 11, 343–355.
- Conant, R.T. 2010. Challenges and opportunities for carbon sequestration in grassland systems. A technical report. *Integrated Crop Management*, 9, 1-51.
- Cotrufo, M.F., Wallenstein, M.D., Boot, C., Denef, K., Paul, E. 2013. The microbial efficiency-matrix stabilisation (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable organic matter? *Global Change Biol.* 19, 988-995.
- Crème, A., Rumpel, C., Gastal, F., Chabbi, A. Effect of nitrogen fertilizer replacement by legume on organic matter and phosphorus forms in grassland soil. *Plant Soil*, submitted.
- Crews, T.E., Brookes, P.C. 2014. Changes in soil phosphorus forms through time in perennial versus annual agroecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 184, 168-181.
- Criscuoli, I., Alberti, G., Baronti, S., Favilli, F., Martinez, C., Calzolar, F., Pusceddu, E., Rumpel, C., Viola, R., Miglietta, F. 2014 : Carbon sequestration and fertility after centennial time scale incorporation of charcoal in soils. *Plos One*. 9,3, e91114.
- Crews, T.E., Peoples M.B. 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agric Ecosyst Environ* 102, 279–297.
- Crews, T.E., Peoples, M.B. 2005. Can the synchrony of nitrogen supply and crop demand be improved in legume and fertilizer-based agroecosystems? A review. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 72, 101–120.
- Cui, X.Y., Wang, W.F., Niu, H.S., Wu, J., Wang, S.P., Schnug, E. 2005. Effect of long-term grazing on soil organic carbon content in semiarid steppes in Inner Mongolia. *Ecol. Res.*, 20, 519-527.
- Dahlin, A.S., Martensson, A.M., 2008. Cutting regime determines allocation of fixed nitrogen in white clover. *Biol. Fert. Soils.* 45, 199-204.
- Daroub, S.H., Ellis, B.G., Robertson, G.P., 2001. Effect of cropping and low-chemical input systems on soil phosphorus fractions. *Soil Sci.* 166, 281–291.
- Dodd, R.J., McDowell, R.W., Condon, L.M. 2014. Manipulation of fertiliser regimes in phosphorus enriched soils can reduce phosphorus loss to leachate through an increase in pasture and microbial biomass production. *Agric. Ecosyst. Environ.* 185, 65-76.
- Dormaer, J.F., Williams, W.D., 1998. Effect of forty-four years for grazing on fescue grassland soils. *J. Range Manag.* 51, 122-126.

- Dungait, A.J., Bol, R., Bull, I.D., Evershed, R.P., 2009. Tracking the fate of dung-derived carbohydrates in a temperate grassland soil using compound-specific stable isotope analysis. *Org. Geochem.* 40, 1210-1218.
- Dungaith, J.A.J., Cardenas, L.M., Blackwell, M.S.A., Wu, L., Withers, P.J.A., Chadwick, D.R., Bol, R., Murray, P.J., Macdonald, A.J., Whitmore, A.P., Goulding, K.W.T. 2012. Advances in the understanding of nutrient dynamics and management in UK agriculture. *Sci. Total Environ.* 39-50.
- FAOSTAT. 2009. Statistical Database 2007. Rome.
- Farrell, M., Hill, P.W., Wanniarachchi, S.D., Farrar, J.S., Bardgett, R.D., Jones, D.L. 2011. Rapid peptide metabolism: a major component of soil nitrogen cycling. *Global Biogeochem. Cycles.* 25, GB3014
- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L. 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biol. Biochem.* 35, 837-843.
- Franzluebbers, A.J., Stuedemann, J.A., Schomberg, H.H., Wilkinson, S.R. 2000. Soil organic C and N pools under long-term pasture management in the Southern Piedmont USA. *Soil Biol. Biochem.* 32, 469-478.
- Franzluebbers, A.J. 2012. The grass roots of carbon sequestration. *Carbon Management.* 3, 9-11.
- Finzi, A.C., Abramoff, R.Z., Spiller, K.S., Brzostek, E.R., Darby, B.A., Kramer, M.A., Phillips, R.P. 2015. Rhizosphere processes are quantitatively important components of terrestrial carbon and nutrient cycles. *Global Change Biology*, in press.
- Fransson, A.M., Jones, D.L. 2007. Phosphatase activity does not limit the microbial use of low molecular weight organic-P substrates in soil. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1213-1217.
- Fuentes, B., Dixon, E., Mora, M.L., Turner, B.L., Bol, R. 2012. Dissolved phosphorus composition of grassland leachates following application of dairy-slurry size fractions. *J. Plant Nutri. Soil Sci.* 175, 78-85.
- Fustec, J., Lesuffleur, F., Mahieu, S., Cliquet, J.-B. 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 57-66.
- Gordon, A.J. 1992. Carbon metabolism in the legume nodule. in *Carbon Partitioning Within and Between Organisms*. eds Pollock C.J., Farrar J.F., Gordon A.J. (Bios Scientific Publishers, Oxford, UK), pp 133-162.
- Hamilton, E.W., Frank, D.A., Hinchey, P.M., Murray, T.R. 2008. Defoliation induces root exudation and triggers positive rhizospheric feedbacks in a temperate grassland. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2865-2873.
- Hamilton, E.W., Frank, D.A. 2001. Can plants stimulate soil microbes and their own nutrient supply? Evidence from a grazing tolerant grass. *Ecology.* 82, 2397-2402.
- Hatch, D.J., Lovell, R.D., Antil, R., Jarvis, S.C., Owen, P.M., 2000. Nitrogen mineralization and microbial activity in permanent pastures amended with nitrogen fertilizer or dung. *Biol. Fert. Soils.* 30, 288-293.
- Henry, F., Vestergård, M., Christensen, S. 2008. Evidence for a transient increase of rhizodeposition within one and a half day after a severe defoliation of *Plantago arenaria* grown in soil. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1264-1267.
- Herold, N., Schoning, I., Michalzik, B., Trumbore, S., Schrumpf, M. 2014. Controls on soil carbon storage and turnover in German landscapes. *Biogeochem.* 119, 435-451.
- Haynes, R.J., Williams, P.H. 1993. Nutrient cycling and soil fertility in the grazed pasture ecosystem. *Adv. Agron.* 49, 119-199.

- Holland, J.N., Cheng, W., Crossley Jr., D.A. 1996. Herbivore-induced changes in plant carbon allocation: assessment of below-ground C fluxes using carbon-14. *Oecologia*. 107, 87–94
- Hill, P.W., Farrar, J., Roberts, P., Farrell, M., Grant, H., Newsham, K.K., Hopkins, D.W., Bardgett, R.D., Jones, D.L. 2011. Vascular plant success in a warming antarctic may be due to efficient nitrogen acquisition. *Nature Climate Change* 1, 50–53.
- Hooper, D.U., Chapin, III, F.S., Ewel, J. J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A.J., Vandermeer, J., Wardle, D.A. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol. Monographs*. 75, 3–35.
- IPCC (2013) Fifth Assessment Report - WG1.
- Jarvie, H.P., Withers, P.J.A., Bowe, M.J., Palmer-Felgate, E.J., Harper, D.M., Wasiak, K., 2010. Streamwater phosphorus and nitrogen across a gradient in rural-agricultural land use intensity. *Agric. Ecosyst. Environ.* 135, 238–52.
- Jarvis, S.C., Stockdale, E.A., Shephard, M.A., Powelson, D.S., 1996. Nitrogen mineralisation in temperate agricultural soils: processes and measurement. *Adv. Agron.* 57, 188–237.
- Jiao, N., Herndl, D.A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S.W., Kirchman, D.L., Weinbauer, M.G., Luo, T., Chen, F., Azam, F. 2010. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nature Reviews*. 8, 593–595.
- Jobbagy, E.G., Jackson, R.B. 2000. The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecol. Appli.* 10, 423–436.
- Johnson, D.W., Hungate, B.A., Dijkstra, P., Hymus, G., Hinkle, C.R., Stiling, P., Drake, B.G., 2003. The effects of elevated CO₂ on nutrient distribution in a fire-adapted scrub oak forest. *Ecol. Appli.* 13, 1388–1399.
- Jouquet, P., Boquel, E., Doan, T.T., Rocoy, M., Orange, D., Rumpel, C., Duc, T.T. 2011. Do compost and vermicopost improve macronutrient retention and plant growth in degraded tropical soils ? *Compost Sci. Utiliz.* 19, 15–24.
- Kirkby, C.A., Richardson, A.E., Wade, L.J., Passioura, J.B., Batten, G.D., Blanchard, C., Kirkegaard, J.A., 2014. Nutrient availability limits carbon sequestration in arable soils. *Soil Biol. Biochem.* 68, 402–409.
- Klumpp, K., Soussana, J.F., Falcimagne, R., 2007. Effects of past and current disturbance on carbon cycling in grassland mesocosms. *Agric. Ecosyst. Environ.* 121, 59–73.
- Klumpp, K., Fontaine, S., Attard, E., Le Roux, X., Gleixner, G., Soussana, J.-F. 2009. Grazing triggers soil carbon loss by altering plant roots and their control on soil microbial community. *J. Ecol.* 97, 876–885.
- Klumpp, K., Fontaine, S., Attard, E., Gleixner, G., Leroux, X., Soussana, J.F. 2009. How land use change shifts C-poor, productive ecosystems to C-rich unproductive ecosystems and vice versa? *J. Ecol.* 91, 867–885.
- Knicker, H. 2011. Pyrogenic organic matter in soil: Its origin and occurrence, its chemistry and survival in soil environments. *Quarter. Internat.* 243, 251–263.
- Kononova, M. 1966. *Soil Organic Matter*. 2-nd Ed. New York, Pergamon press, 544 p.
- Körner, C., Spehn, E.M. 2002. *Mountain biodiversity: A global assessment*. London: Parthenon.
- Kuzyakov, Y., Biryukova, O.V., Kuznetsova, T.V., Molter, K., Kandeler, E., Stahr, K. 2002. Carbon partitioning in plant and soil, carbon dioxide

- fluxes and enzyme activities as affected by cutting ryegrass. *Biol. Fert. Soils*. 35, 348-358.
- Kuzyakov, Y., Gavrichkova, O. 2010. REVIEW: Time lag between photosynthesis and carbon dioxide efflux from soil: a review of mechanisms and controls. *Global Change Biol.* 16, 3386-3406.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science*. 304, 1623-7.
- Li, J.H., Yang, Y.J., Li, B.W., Li, W.J., Wang, G., Knops, J.M.H. 2014. Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on soil carbon fractions in alpine meadows on the Qinghai-Tibetan plateau. *Plosone*. 9, 7, e103266.
- Lilienfein, J., Wilcke, W., Ayarza, M.A., Vilela, L., do Carmo Lima, X., Zech, W. 2000. Chemical fractionation of phosphorus, sulphur, and molybdenum in Brazilian savannah Oxisols under different land use. *Geoderma*. 96, 31-46
- Lovell, R.D., Jarvis, S.C., 1996. Effect of cattle dung on soil microbial biomass C and N in a permanent pasture soil. *Soil Biol. Biochem.* 28, 291-299.
- Louarn, G., Pereira-Lopès, E., Fustec, J., Gastal, F. 2014. The amounts and dynamics of nitrogen transfer to grasses differ in alfalfa and white clover-based grass-legume mixtures as a result of rooting strategies and rhizodeposit quality. *Plant Soil*. 1-17.
- Merino, C., Matus, F., Nannipieri, P., this issue Rhizosphere priming: effect of nutrient availability, soil enzyme activity and soil.
- Macdonald, L.M., Paterson, E., Dawson, L.A., McDonald, A.J.S. 2004. Short-term effects of defoliation on the soil microbial community associated with two contrasting *Lolium perenne* cultivars. *Soil Biol. Biochem.* 36, 489-498.
- McLauchlan, K. 2006. The nature and longevity of agricultural impacts on soil carbon and nutrients: a review. *Ecosystems*. 9, 1364-1382.
- McSherry, M.E., Ritchie, M.E. 2013. Effects of grazing on grassland soil carbon: a global review. *Global Change Biol.* 19, 1347-1357.
- McDowell, R.W., Koopmans, G.F. 2006. Assessing the bioavailability of dissolved organic phosphorus in pasture and cultivated soils treated with different rates of nitrogen fertiliser. *Soil Biol. Biochem.* 38, 61-71.
- McDowell R.W., Stewart I. 2005. An improved technique for the determination of organic phosphorus in sediment and soils by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemistry Ecology*. 21, 11-22.
- McDowell, R.W., Dou, Z., Toth, J.D., Cade-Menun, B.J., Kleinman, P.J.A., Soder, K., Saporito, L. 2008. A comparison of phosphorus speciation and potential bioavailability in feed and feces of different dairy herds using ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Environ. Qual.* 37, 741-752.
- McGovern, S.T., Evans, C.D., Dennis, P., Walmsley, C.A., Turner, A., McDonald, M.A. 2014. Increased inorganic nitrogen leaching from a mountain grassland ecosystem following grazing removal: a hangover of past intensive land-use? *Biogeochem.* 119, 125-138.
- Mazzanti, A., Lemaire, G., Gastal, F. 1994. The effect of nitrogen fertilization upon the herbage production of tall fescue swards continuously grazed with sheep. II-herbage consumption. *Grass Forage Sci.* 49, 352-359
- Michuas, D.G., Lauenroth, W.K. 1993. Quantitative effects of grazing on vegetation and soils over a global range of environments. *Ecol. Monographs*. 63, 327-366.
- Miltner, A., Bombach, P., Schmidt-Brücken, B., and Kästner, M. 2012. Soil genesis: Microbial biomass as a significant source, *Biogeochem.* 111, 41-55.

- Nikolaus, P.A., Kandeler, E., Leadley, P.W., Schmid, B., Tscherko, D., Körner, C. 2001. A link between plant diversity, elevated CO₂ and soil nitrate. *Oecologia*. 127, 540-548.
- Nyborg, M., Molina-Ayala, M., Solberg, E.D., Izaurralde, E.C., Malhi, S.S., Janzen, H.H. 1997. Carbon storage in grassland soils as related to N and S fertilizers. In R. Lal *et al.*, (ed.) *Management of Carbon Sequestration in Soil*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp 421-432.
- Nyfelner, D., Huguenin-Elie, O., Suter, M., *et al.*, 2011. Grass-legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agric. Ecosyst. Environ.* 140, 155-163.
- Oelmann, Y., Richter, A., Rosche, C., Rosenkrzna, S., Temperton, V.M., Weisser, W.W., Wilke, W. 2011. Does plant diversity influence phosphorus cycling in experimental grasslands. *Geoderma*. 167-168, 178-187.
- Paustian, K., Andren, O., Clarholm, M., Hansson, A.-C., Johansson, G., Lagerlöf, J., Lindberg, T., Pettersson, R., Sohlenius, B. 1990. Carbon and Nitrogen Budgets of Four Agro-Ecosystems With Annual and Perennial Crops, With and Without N Fertilization. *J. Appl. Ecol.* 27, 60.
- Parsons, A.J., thronley, J.H.M., Newton, P.C.D., Rasmussen, S., Rowarth, J.S. 2013. Soil carbon dynamics: The effect of nitrogen input, intake demand and off-take by animals. *Sci. Total Environ.* 465, 205-215.
- Paterson, E., Sim, A. 1999. Rhizodeposition and C-partitioning of *Lolium perenne* in axenic culture affected by nitrogen supply and defoliation. *Plant Soil*. 216, 155-164.
- Pätzhold, S., Hejman, M., Barej, J., Schellberg, J. 2013. Soil phosphorus fractions after seven decades of fertilizer application in the Rengen grassland experiment. *J. Plant Nutri. Soil Sci.* 176, 910-920.
- Peres, G., Cluzeau, D., Menasseri, S., Soussanan, J.F., Bessler, H., Engels, C., Habekost, M., Gleixner, G., Weigelt, A., Weisser, W., Scheu, S., Eisenhauer, N. 2013. Mechanisms linking plant community properties to soil aggregate stability in an experimental grassland plant diversity gradient. *Plant Soil*. 373, 285-299.
- Ramankutty, N., Evan, A.T., Monfreda, C., Foley, J. 2008. Farming the planet: 1. Geographic distribution of global agricultural lands in the year 2000. *Global Biogeochem. Cycles* 22 GB1003
- Rasmussen, J., Sørensen, K., Eriksen, J. 2012. N₂-fixation and residual effect of four legume species and four companion grass species. *Eur. J. Agron.*
- Rasse, D.P., Rumpel, C., Dignac, M.-F. 2005. Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Plant Soil*. 269, 341-356.
- Redin M., Guénon R., Recous, S., Schmatz, R., Liberalesso de Freitas, L., Aita, C., Giacomini, S.J., 2014. Carbon mineralization in soil of roots from twenty crop species, as affected by their chemical composition and botanical family. *Plant Soil*. 378, 205-214.
- Richardson, A.E., Kirkby, C.A., Banerjee, S., Kirkegaard, J.A. 2014. The inorganic nutrient cost of building soil carbon. *Carbon Management*. 5, 265-268.
- Robinson Kunrath, T., de Berranger, C., Charrier, X., Gastal, F., de Faccio Carvalho, F.C., Lemaire, G., Emile, J.C., Durand J.L. 2015. How much do sod-based rotations reduce nitrate leaching in a cereal cropping system? *Agric. Water Management*. 150, 46-56.
- Rodionov, A., Amelung, W., Peinemann, N., Haumaier, L., Zhang, X., Kleber, M., Glaser, B., Urusevskaya, I., Zech, W. 2010. Black carbon in grassland ecosystems of the world

- Global Biogeochem. Cycles. 24, GB3013, doi:10.1029/2009GB003669.
- Rumpel, C. 2008. Does burning of harvesting residues increase the soil carbon storage ? ¿La quema de residuos de cosecha aumenta el almacenaje de carbono en el suelo?. *J. Soil Sci Plant Nutri.* 8, 44-51.
- Rumpel, C., Eusterhues, K., Kögel-Knabner, I. 2010. Non-cellulosic neutral sugar contribution to mineral associated organic matter in top-and subsoil horizons of two acid forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 42, 379-382.
- Rumpel, C., Baumann, K., Remusat, L., Dignac, M.F., Barré, P., Deldicque, D., Glasser, G., Lieberwirth, I., Chabbi, A. 2015. Nanoscale evidence of con-trasted processes for root-derived organic matter stabilization by mineral interactions depending on soil depth. *Soil Biology and Biochemistr.* 85, 82-88.
- Sanaullah, M., Chabbi, A., Lemaire, G., Charrier, X., Rumpel, C. 2010. How does plant leaf senescence of grassland species influence decomposition kinetics and litter compounds dynamics ? *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 88, 159-171
- Sanaullah, M., Blagodatskaya, E., Chabbi, A., Rumpel, C., Kuzyakov, Y. 2011. Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition. *Appl. Soil Ecol.* 48, 38-44.
- Sanaullah, M., Rumpel, C., Charrier, X., Chabbi, A. 2012. How does drought stress influence the decomposition of plant litter with contrasting quality in a grassland ecosystem? *Plant Soil.* 352, 277-288.
- Schimel, J.P., Jackson, L.E., Firestone, M.K., 1989. Spatial and temporal effects on plant microbial competition for inorganic nitrogen in a California annual grassland. *Soil Biol. Biochem.* 21, 1059-1066.
- Schipanski, M.E., Drinkwater, L.E. 2012. Nitrogen fixation in annual and perennial legume-grass mixtures across a fertility gradient. *Plant Soil*, 1–13.
- Schipper, L.A., Dodd, M.B., Pronger, J., Mudge, P.L., Upsdell, M., Moss, R.A. 2012. Decadal changes in soil carbon and nitrogen under a range of irrigation and phosphorus fertilizer treatments. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 77, 246-256.
- Senapati, N., Chabbi, A., Gastal, F., Smith, P., Mascher, N., Naisse, C. 2014. Net carbon storage measure in a mowed and grazed temperate sown grassland shows potential for carbon sequestration under grazed system. *Carbon Management.* 5. 131-144.
- Sharpley, A.N., Smith, S.J. 1985. Fractionation of inorganic and organic phosphorus in virgin and cultivated soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49, 1276-130.
- Sharpley, A.N., Chapra, S.C., Wedepohl, R., Sims, J.T., Daniel, T.C., Reddy, K.R. 1994. Managing agricultural phosphorus for protection of surface waters: issues and options. *J. Environ. Qual.* 23, 437–451
- Shields, J.A., Paul, E.A. 1973. Decomposition of ¹⁴C labelled plant material under field conditions. *Can. J. Soil Sci.* 53, 297-306.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., Denef, K. 2004. A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil Tillage Res.* 79, 7-31.
- Soussana, J.F., Lemaire, G. 2014. Coupling carbon and nitrogen cycles for environmentally sustainable intensification of grasslands and crop-livestock systems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 190, 9-17.
- Steffens, M., Koelbl, A., Totsche, K.U., Kögel-Knabner, I., 2008. Grazing effects on soil chemical and physical properties in a semiarid steppe of Inner Mongolia (PR China). *Geoderma.* 143, 63-72.

- Tate, R.L. 1987. Soil Organic Matter Biological and Ecological Effects, Wiley, Chichester, 291 pp.
- Turner, B.L., McKelvie, I.D., Haygarth, P.M. 2002. Characterisation of water-extractable soil organic phosphorus by phosphatase hydrolysis. *Soil Biol. Biochem.* 34, 27-35.
- Tsvetkova G.E., Georgiev, G.I. 2007. Changes in phosphate fractions extracted from different organs of phosphorus starved nitrogen fixing pea plants. *J. Plant Nutr.* 30, 2129–2140.
- Whitmore, A.P., Kirk, G.J.D., Rawling, B.G. 2014. Technologies for increasing carbon storage in soil to mitigate climate change. *Soil Use Management*. in press.
- Wilkinson, A., Hill, P.W., Farrar, J.F., Jones, D.L., Bardgett, R.D. 2014. Rapid microbial uptake and mineralization of amino acids and peptides along a grassland productivity gradient. *Soil Biol. Biochem.* 72, 73-85.
- Zeller, V., Kandeler, E., Mair, V. 1997. N-dynamic in mountain grassland with different intensity of cultivation. *Aust. J. Agric. Res.* 48, 217-230.

Effects of grasses and a legume grown in monoculture or mixture on soil organic matter and phosphorus forms

Alexandra Crème & Cornelia Rumpel &
François Gastal & Maria de la Luz Mora Gil &
Abad Chabbi

Received: 11 June 2015 / Accepted: 11 November 2015 / Published online: 19 December 2015
© Springer International Publishing Switzerland 2015

Abstract

Background and Aims Legume use in forage production may replace mineral fertiliser N input by biological nitrogen fixation in grass-legume mixtures. However, these systems may also have high phosphorus requirements. The aim of the study was to determine the amount and composition of C, N and P forms in grassland soil under two different graminaceous species grown in monoculture or in mixture with a legume.

Methods Cocksfoot and tall grass fescue were grown for four years as N-fertilised (165 kg ha^{-1}) monocultures or in mixture with N_2 -fixing Lucerne. We analysed for forage yields, soil organic matter (SOM) storage, and soils' content of soluble as well as insoluble mineral and organic N and P forms.

Results Our data showed higher forage yields on plots with Lucerne compared to plots with N fertilized graminaceous species. Lucerne proportion in mixtures changed from 40 % to more than 80 % after 4 years. Despite similar SOM contents, we observed changes of soluble and insoluble N and P forms. Inorganic P consumption by Lucerne seemed to be reduced in mixtures and storage of organic P enhanced in some cases.

Conclusion Different plant species and mixtures may have specific effects on soil parameters related to organic matter most probably due to plant specific rhizosphere effects. Negative effects of legumes on soil P may be attenuated when grown in mixture with grass. Ultimately, the effect of N-fertilizer replacement by legumes on SOM and nutrient forms may depend on the graminaceous species used for the mixture.

Responsible Editor: Martin Weih.

2 Crème (*) · A. Chabbi (*)
INRA, UR P3F, 86600 Lusignan,
France e-mail:
alexandra.creme@grignon.inra.fr e-
mail: abad.chabbi@lusignan.inra.fr

A. Crème · C. Rumpel · A. Chabbi

INRA, ECOSYS UMR (INRA-Agroparistech),
78850 Thiverval-Grignon, France

C. Rumpel
CNRS, IEES UMR (UPMC, CNRS, UPEC, IRD, INRA),
78850 Thiverval-Grignon, France

F. Gastal
INRA, UE FERLUS, 86600 Lusignan, France

M. de la Luz Mora Gil
BIOREN-UFRO, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

Keywords Grassland · Lucerne · Legume-grass
mixture · Soil organic matter · Phosphorus

Abbreviations

SOM Soil Organic Matter
BNF Biological Nitrogen Fixation
OP Organic Phosphorus
IP Inorganic Phosphorus
IN Inorganic Nitrogen
ON Organic Nitrogen
M Lucerne (*Medicago sativa*)
D Cocksfoot (*Dactylis glomerata*)
F Tall Fescue (*Festuca arundinacea*)
PCA Principal Component Analyses

Introduction

Nitrogen (N) is limiting crop production of many agricultural soils, and N addition is needed to increase yields and sustain food production (IPCC 2013). Because of the severe environmental impacts of synthetic N fertilizer in intensive agricultural systems (Robertson and Vitousek 2009), the reduction of their use is a scientific and political priority (Erisman *et al.*, 2011). It has been suggested that returning to cultivation of leguminous plants, able to fix atmospheric dinitrogen by means of symbiosis with *Rhizobium* (biological nitrogen fixation – BNF), may be an alternative solution to enrich soil with nitrogen (Crews and Peoples 2004; IPCC 2013). For example, Lucerne (also known as alfalfa, *Medicago sativa* L.), a major forage legume, accumulates during its growth phase from 300 to 400 kg N ha⁻¹ yr.⁻¹ (Kelner *et al.*, 1997; Carlsson and Huss-Danell 2003; Angus and Peoples 2012).

Although legumes are able to compensate by BNF for the absence of fertilizer N, soil phosphorus (P) availability may limit their growth (Graham and Vance 2003; Roscher *et al.*, 2011). Leguminous plants with the capacity of BNF generally have higher P demands than graminaceous ones grown with mineral N fertilizer (Robson *et al.*, 1981). Lucerne is known to deplete plant available soil P (Olsen P) (Bell *et al.*, 2012) and other inorganic phosphorus (IP) forms (Crews 1996). Results concerning the effect of Lucerne on organic soil phosphorus (OP) forms are contradictory. While Daroub *et al.*, (2001) found a higher OP content in available form after 4 years of Lucerne cultivation, Crews (1996) did not observe any effect on total OP when Lucerne was cultivated as intercrop. Also OP seems to be correlated to carbon (C) in soil under Lucerne (Daroub *et al.*, 2001) and may therefore be involved in the formation of soil organic matter (SOM). In intensively used grasslands, BNF may favour biogeochemical coupling between C and N cycles and thus accumulation of SOM (Paustian *et al.*, 1990), while there is a danger to uncouple these cycles with synthetic N fertilizer use, leading to shorter residence times of soil C (Soussana and Lemaire 2014; Rumpel *et al.*, 2015). However, the C storage capacity of intensively used soils may also depend on the presence and availability of P (Kirkby *et al.*, 2014).

When combining grasses with legume species in grassland systems, BNF may be more efficient with 9 % to 18 % more N fixed as compared to legume

monocultures (Nyfeler *et al.*, 2011; Schipanski and Drinkwater 2012). Thus the effect of leguminous plants on soil C and nutrient stocks may even be stronger when grown in mixture as compared to monocultures (Paustian *et al.*, 1990; Fustec *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2012; Schipanski and Drinkwater 2012; Bell *et al.*, 2012). However, the linkages between above-ground plant communities and nutrient forms present in soil have rarely been investigated. Recent studies showed that mixtures with different legume species may have contrasting effects on soil N status (Li *et al.*, 2015) and plant N nutrition (Louarn *et al.*, 2015). These studies revealed non linear effects related to species specific interactions. We thus hypothesised that different grass species could have contrasting effects on soil parameters, when grown in mixture with a legume.

In this study we analysed topsoil under two grasses – cocksfoot also known as orchard grass (*Dactylis glomerata*) and tall fescue (*Festuca arundinacea*) – which were grown for 4 years in monoculture or associated with Lucerne (*Medicago sativa*) in grass-legume mixtures. Grass monocultures received synthetic N fertilizer, while BNF was the sole N source for grass-legume mixtures. The aim of this study was to evaluate the effect of monocultures and different grass-legume associations on SOM storage and forms of major nutrients. We hypothesized that plant communities with and without legume, especially through the replacement of N fertilisation by BNF, could have contrasting effects on biomass production and soil nutrient forms, which in turn could impact quantity and composition of SOM. We analyzed for forage production, N fixation, soils organic and inorganic C, N, and P contents as well as their soluble forms.

Material and methods

Site description

The experimental site is situated at the INRA research station in Lusignan (46°25'12.91" N; 0°07'29.35" E), western France. Mean annual temperature is 12 °C and mean annual precipitation is around 750 mm. The experiment was established in 2008 on a Cambisol with a loamy-clay texture and a bulk density of 1.43 g cm⁻³ (Chabbi *et al.*, 2009; Moni *et al.*, 2010). The bulk density did not vary between treatments after the installation of the experiment. General soil parameters are presented in Table 1. This soil was sown at the end of summer 2008

Table 1 pH, conductivity, cation exchange capacity (CEC) and exchangeable Mg (CEC Mg) as well as sodium (CEC Na) in soil under Lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) monocultures and their mixtures (DM and FM). Data are presented as mean of 3 replicates

	pH	Conductivity mS cm ⁻¹	CEC cmol + kg ⁻¹	CEC Mg cmol + kg ⁻¹	CEC Na cmol + kg ⁻¹
M	6.68 ^{ab}	0.046 ^a	7.47 ^a	0.752 ^{ab}	0.029 ^{ab}
F	6.76 ^a	0.046 ^a	7.89 ^a	0.708 ^b	0.025 ^{bc}
FM	6.65 ^{ab}	0.045 ^a	7.90 ^a	0.812 ^a	0.027 ^{abc}
D	6.62 ^{ab}	0.046 ^a	7.64 ^a	0.694 ^b	0.024 ^c
DM	6.59 ^b	0.047 ^a	7.70 ^a	0.726 ^{ab}	0.030 ^a

^{abc} Different letters indicate significant differences between treatments

with three species in monoculture or in mixture, including the following treatments: three monocultures of Lucerne (*Medicago sativa* L., cultivar Harpe), cocksfoot (*Dactylis glomerata* L., cv Accord) and tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb, cv Noria) and two legume-grass mixtures (50:50) composed of cocksfoot/Lucerne (*D. glomerata*/*M. sativa*) and tall fescue/Lucerne (*F. arundinacea*/*M. sativa*). The plots were sown at a total seed rate of 25 kg ha⁻¹. Grass-Lucerne mixtures were sown at a seed rate of 12.5 kg ha⁻¹ per species. The treatments were established on 2.5 m × 5 m plots and arranged in four blocks. In the plots without Lucerne, synthetic nitrogen fertilizer (NH₄NO₃) was applied at a rate of 165 kg ha⁻¹ year⁻¹. The same phosphate and potassium fertilization rates were applied to all plots corresponding to 40 and 100 kg ha⁻¹ yr⁻¹ for P and K respectively, in the form of P₂O₅ and K₂O. The plots had been previously cultivated with maize during the year 2007 and with wheat from winter 2007 to July 2008.

Sampling

Forage

Grasses were mowed 4 times per year between May and November. The forage biomass was collected on 7.5 m², and weighed after drying at 60 °C. In 2012, an aliquot was ground for elemental analyses. The proportion of grass and Lucerne in forage mixtures was evaluated by near infra-red spectroscopy (Petersen *et al.*, 1987). N fixation was estimated using the theoretical N content of Lucerne (Lemaire *et al.*, 1985), its contribution to aboveground biomass as well as the % of its N derived from atmospheric N (Nd_{fa}). Nd_{fa} ranged from 0.65 for pure legume to 0.80, when legume was associated to graminaceous species. These values had

been determined with the plants δ¹⁵N signature for Lucerne grown as monoculture or in mixture with graminaceous species using another trial on an adjacent field at the same site, with Lucerne monocultures and grass-Lucerne mixtures grown under similar conditions (mowing, no mineral fertilization; Louarn *et al.*, 2015). We consider the error associated to our estimates is minimal and similar for all treatments.

Soil

For soil analyses, we sampled the first 30 cm of 3 out of 4 blocks in March 2013, 4.5 years after implantation of the experiment, with a mechanical auger (7 cm Ø, 30 cm). For each treatment, we sampled 2 cores from each of the 15 plots. The soil samples were air-dried and sieved at 2 mm and an aliquot was ground for elemental analyses. Three additional cores (5 cm Ø, 30 cm) were taken in July 2013 from each block to determine bulk density as ratio of the mass of oven-dried soil (105 °C) to the bulk volume of soil.

Soil analysis

General soil parameters

General soil parameters were determined at the INRA analytical laboratory in Arras: soil pH was measured after suspension of soil in water (1:5 weight/volume). Conductivity was measured in the same soil water extract at 25 °C. Cation exchange capacity (CEC) was determined after extraction of soil with a 50 mM cobalt hexamine chloride solution. Exchangeable Mg was measured by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy and exchangeable Na by atomic adsorption spectroscopy. Inorganic nitrogen (IN), was

determined colorimetrically as the sum of nitrate-N and ammonium-N after extraction of soil with a 0.5 M KCl solution (1:5 weight/volume). Plant available P (Olsen P) was determined colorimetrically after extraction with a 0.5 M NaHCO_3 solution at pH 8.5 (1:20 weight/volume) (Olsen *et al.*, 1954).

Soil organic matter analysis

Total C and N contents of plant and soil samples were determined using an elementary analyzer (Flash EA, Thermo Electron Corporation, Bremen, Germany). No carbonate was present in the soil, therefore soil C is considered to be exclusively organic. Soil organic nitrogen (ON) was calculated as difference between N and IN content. Total P, OP and IP for bulk soil were determined as sum of Hedley fractions (see below).

Microbial biomass

Microbial biomass was determined on fresh soil samples by the chloroform fumigation-extraction method (Vance *et al.*, 1987). Briefly, the fumigation-extraction technique is based on fumigation of soil with chloroform (CHCl_3) for 16 h, which allows lysis of microbial cells. Dissolved C and N were extracted from fumigated soil and an unfumigated control with a 0.03 M K_2SO_4 solution (1:4 weight/volume). The extracts were filtered at 0.7 μm and freeze dried. C and N of the dry extracts were determined with an elemental analyzer (CHN NA 1500, Carlo Erba). Microbial C (Cmic) and N (Nmic) were calculated as difference between fumigated and non fumigated soil and multiplication by a factor of 2.64 for C (Vance *et al.*, 1987) and 1.85 for N (Brookes *et al.*, 1985).

Phosphorus fractionation

Fractionation of soil P was carried out with the Hedley method (Hedley *et al.*, 1982) using the modifications introduced by Ivanoff *et al.*, (1998). We performed a successive chemical extraction of soil P from soluble to residual P. Briefly 0.5 g of dry soil were extracted sequentially by shaking for 16 h with 30 ml of (1) distilled water, (2) 0.5 M NaHCO_3 at pH 8.5, (3) 1 M HCl, and (4) 0.1 M NaOH. The suspensions were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the supernatants analysed for total P and IP. The residues were dried at 60 °C and used for subsequent extractions. Residual P

remaining after extraction step (4) was extracted, after calcination of the residue for 1 h at 550 °C, with 1 M sulphuric acid (H_2SO_4) during 24 h.

The chemical fractionation scheme is intended to quantify fractions of different availability. The P extract-ed with H_2O is dissolved phosphorus. The NaHCO_3 extractable P represents IP and OP adsorbed on mineral surfaces. Both fractions are most probably available to microorganisms and plants (Cross and Schlesinger 1995; Ivanoff *et al.*, 1998) and contain phosphates, simple phosphate monoesters, phospholipids and deoxyribose nucleic acid (Turner and Leytem 2004). The HCl extract contains IP in form of calcium phosphates (Turner and Leytem 2004) and IP, which is occluded within sesquioxides (Cross and Schlesinger 1995) but does not contain any OP (Ivanoff *et al.*, 1998). With the NaOH solution, we extracted OP (Ivanoff *et al.*, 1998) and IP associated with Al, Fe and SOM (Turner and Leytem 2004). Residual P remaining after the 4 extractions is highly resistant to chemical attack and comprises insoluble OP as well as IP (Cross and Schlesinger 1995; Ivanoff *et al.*, 1998).

The IP content was measured in each extract as acid molybdenum complex colorimetrically with detection at 880 nm (Murphy and Riley 1962). The total P concentration was measured with the same methods after digestion with potassium persulfate and sulfuric acid at hot temperature. OP content was determined by difference.

Statistical analyses

The statistical analyses were carried out with R (Studio Version 0.98.1062). For the Kruskal-Wallis test we used the package agricolae and for principal component analysis (PCA) the package FactoMineR. Significance was declared at $p < 0.05$.

Results

Forage yields and composition

Forage yields for Lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F), and their mixtures (cocksfoot/Lucerne, DM; tall fescue/Lucerne, FM) during the 4-year-experiment are presented in Fig. 1. The data show that forage production in the first year of the experiment was similar in grass monocultures and grass-Lucerne mixtures,

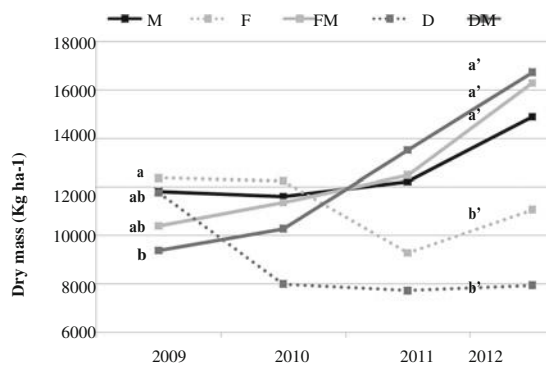


Fig. 1 Forage yield for Lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) during the 4 year experiment; Data obtained in the first year and last year of the experiment were subjected to statistical analyses. Different letters indicate significant differences between treatments ($n = 4$; a,b 2009 et a',b' 2012)

ranging between 9379 kg ha^{-1} and $12,371 \text{ kg ha}^{-1}$ ($\pm 25 \text{ kg ha}^{-1}$). After 4 years, significantly higher forage yields were recorded for all treatments with Lucerne as compared to grass monocultures. Forage yields of mixtures increased by 47 % for tall fescue/Lucerne and by 110 % for cocksfoot/Lucerne mixtures (Fig. 1). Lucerne contribution to forage from mixtures increased during the experiment from 30 to 40 % in 2009 to more than 85 % in 2012 (Fig. 2).

Lucerne N fixation: monoculture and mixtures

The amount of N fixed by Lucerne monocultures was between 227 and 280 kg ha^{-1} and increased slightly during the 4 year experiment (Fig. 3). In mixtures, calculated N input by BNF in the fourth year was between 335 and 354 kg ha^{-1} , whereas monocultures

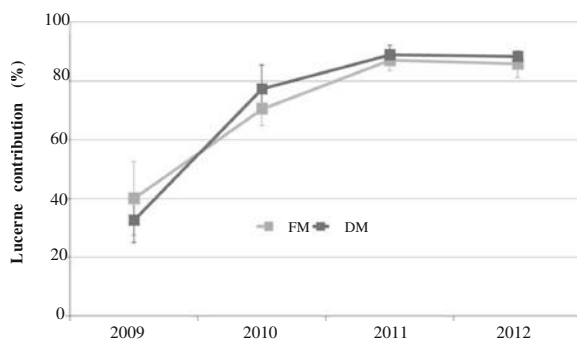


Fig. 2 Development of Lucerne contribution to legume-grass mixtures (cocksfoot/Lucerne (DM) and tall fescue/Lucerne (FM)) during the four year experiment. Data are presented as mean and standard deviation ($n = 4$)

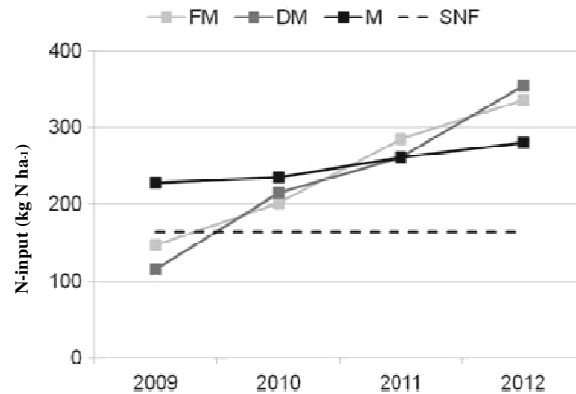


Fig. 3 Amount of nitrogen added to soil by BNF under Lucerne monoculture (M), cocksfoot/Lucerne (DM) and tall fescue/Lucerne (FM) mixtures as well as the amount of mineral N fertiliser (SNF) input to soil under grasses monocultures (D and F) during the four year experiment

received through fertilisation 165 kg ha^{-1} (Table 2). Lucerne monocultures and grassmixtures received thus through BNF much higher N additions as compared to grass monocultures through N-fertilisation. However, the amount of N added by BNF varied during the 4 year period. For mixtures, it increased during the experimental period (Fig. 3).

Plant C, N and P concentration and harvest exportation

The C concentration of forage was analysed in the last year of the experiment. It ranged between 432.6 and 441.4 g kg^{-1} and was lowest for Lucerne grown in monoculture (Table 2). However, due to the higher forage yields, the C exported by harvest was with 3593 and $4664 \text{ kg C ha}^{-1}$ lower for grass monocultures than for Lucerne monoculture (Table 2). For mixtures, C export was much higher than for monocultures and the highest export was recorded for cocksfoot/Lucerne mixture with $7179 \text{ kg C ha}^{-1}$ (Table 2).

Lucerne showed with 34.5 g kg^{-1} and 5.4 g kg^{-1} the highest N and P concentrations. Its N concentration was up to three times higher than those of grasses, while its P concentration was more than doubled as compared to tall fescue (Table 2). Consequently forage from grass monocultures showed higher C/N and C/P ratios than forage from Lucerne monoculture or mixtures. The contrasting N and P concentrations resulted in very different export of these elements from the treatments. While cocksfoot and tall fescue monocultures showed similar N export with $94\text{--}104 \text{ kg N ha}^{-1}$, P export was significantly higher for cocksfoot monoculture than for tall fescue monoculture.

Table 2 Forage characteristics of biomass harvested from all treatments: Lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) in the last year of the experiment (2012). Data are presented as mean of 3 replicates

	C	N	P	C/N	C/P	C export	N input	N export	P input	P export
	gkg ⁻¹	gkg ⁻¹	gkg ⁻¹			kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹		kg ha ⁻¹
M	432.6 ^c	34.5 ^a	5.4 ^a	12.5	80	6022 ^b	280	483 ^{ab}	40	75 ^b
F	437.5 ^{ab}	9.7 ^c	1.9 ^e	45.1	230	4664 ^c	165	104 ^c	40	20 ^e
FM	438.5 ^{ab}	24.6 ^b	3.6 ^d	17.8	121	6823 ^{ab}	335	383 ^b	40	56 ^c
D	441.4 ^a	11.6 ^c	4.3 ^c	38.1	102	3593 ^c	165	94 ^c	40	35 ^d
DM	435.8 ^{bc}	30.7 ^a	4.9 ^b	14.2	88	7179 ^a	354	506 ^a	40	81 ^a

abcde Different letters indicate significant differences between treatments

P and N export were highest for cocksfoot/Lucerne mixture followed by Lucerne monoculture and tall fescue/Lucerne mixture (Table 2). For Lucerne monoculture and cocksfoot/Lucerne mixture the P and N export in 2012 largely exceeded the annual input (Table 2).

Soil carbon and nitrogen forms

The soil C and N forms are presented in Tables 3 and 4. Soil C concentrations ranged between 12.2 and 13.2 mg g⁻¹ (Table 3) while soil N concentrations ranged between 1.25 and 1.33 mg g⁻¹ (Table 4). Both were not significantly different between the treatments. Similar to Cmic, Nmic showed a trend to higher concentrations under grass monoculture than under mixtures (Tables 3 and 4). The mineral N concentration was very low compared to total N, implying that most soil N was present in organic form (Table 4). The ammonium concentrations ranged between 6.33 and 7.59 µg g⁻¹ and were similar for all treatments, whereas nitrate concentrations were lower for soil under tall fescue compared to soil under treatments with Lucerne and cocksfoot (Table 4). In the case of soil under tall fescue/Lucerne mixture greatly

increased nitrate concentrations were noted compared to soils under monocultures.

Soil phosphorus forms

Soil P was analysed using the Hedley fractionation method, which allows for the quantification of organic and inorganic forms of soluble and insoluble P. Total soil P concentration (sum of all Hedley fractions, Table 5) ranged between 649 to 728 µg g⁻¹ and decreased in the order of cocksfoot > tall fescue > Lucerne. A trend towards lower soil P concentration under mixtures as compared to grass monocultures could also be noticed (Table 5).

The soil IP concentration (sum of inorganic Hedley fractions, Table 5) ranged between 388 and 459 µg g⁻¹ and followed a similar pattern as total soil P. It represented approximately 60 % of total P and it was highest under N-fertilized grass monocultures (Table 5). Soils under Lucerne showed the lowest IP contents (Table 5). The soil OP concentration (sum of organic Hedley fractions, Table 5) was lowest in soil under Lucerne monoculture with 256 µg g⁻¹ and showed with

Table 3 Carbon forms in soil under Lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment. Data are presented as mean of 6 replicates

	C	Cmic	C/N
	mg g ⁻¹	µg g ⁻¹	
M	12.2 ^a	114.7 ^{ab}	9.7 ^b
F	13.0 ^a	128.2 ^a	10.1 ^a
FM	13.2 ^a	104.0 ^{ab}	9.9 ^{ab}
D	13.0 ^a	114.4 ^{ab}	10.0 ^a
DM	12.7 ^a	103.2 ^b	9.8 ^b

ab Different letters indicate significant differences between treatment

Table 4 Nitrogen forms in soil under Lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment. Data are presented as mean of 6 replicates

	N	IN	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	Nmic
	mg g ⁻¹	µg g ⁻¹	µg g ⁻¹	µg g ⁻¹	µg g ⁻¹
M	1.25 ^a	8.47 ^{ab}	6.33 ^a	2.14 ^{bc}	7.0 ^a
F	1.29 ^a	8.15 ^b	6.35 ^a	1.80 ^c	8.7 ^a
FM	1.33 ^a	9.34 ^{ab}	6.79 ^a	2.55 ^a	7.1 ^a
D	1.30 ^a	9.60 ^a	7.14 ^a	2.46 ^{ab}	7.5 ^a
DM	1.31 ^a	10.02 ^a	7.59 ^a	2.43 ^{ab}	7.1 ^a

abc Different letters indicate significant differences between treatments

Table 5 Phosphorus forms (sum of Hedley fractions and Olsen P) in soil under Lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment. Data are presented as mean of 6 replicates

	P Olsen	Total P ^β	IP ^δ	OP ³	IP ^δ content	OP ³ content
	μg g ⁻¹	μg g ⁻¹	μg g ⁻¹	μg g ⁻¹	% of total P	% of total P
M	105 ^a	649 ^d	388 ^c	256 ^b	60.6 ^{bc}	39.4 ^{ab}
F	107 ^a	697 ^{bc}	436 ^b	261 ^b	62.5 ^a	37.5 ^c
FM	109 ^a	680 ^{cd}	423 ^b	257 ^b	62.2 ^{ab}	37.8 ^{bc}
D	121 ^a	728 ^a	459 ^a	269 ^{ab}	63.1 ^a	36.9 ^c
DM	113 ^a	711 ^{ab}	431 ^b	281 ^a	60.5 ^c	39.5 ^a

^β P: sum of phosphorus determined in Hedley fractions

^δ IP: sum of inorganic phosphorus determined in Hedley fractions

³ OP: sum of organic phosphorus determined in Hedley fractions

^{abc} Different letters indicate significant differences between treatments

281 μg g⁻¹ the highest concentration in soil under cocksfoot/Lucerne mixture. It represented almost 40 % of total P and the soils under grass monocultures showed the lowest OP content. The highest OP content was noted in soil under Lucerne monoculture and cocksfoot/ Lucerne mixture.

Approximately 25 % of total P was present in the residual fraction. The concentrations of Olsen P were between 105 and 121 μg g⁻¹ and did not vary significantly between treatments.

Inorganic phosphorus fractions

The content of IP fractions (sum of Hedley fractions) decreased in the order HCl > NaOH > NaHCO₃ > H₂O (Fig. 4). Differences in the IP content were noted between

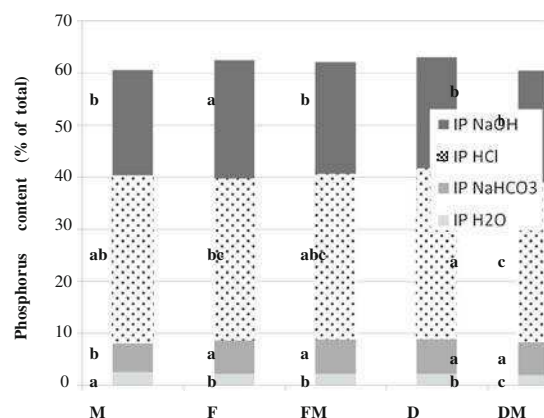


Fig. 4 IP fractions in soil under Lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment. Different letters indicate significant differences between treatments (n = 6)

soils under Lucerne and grass monocultures. The contents of IP_{NaOH} and IP_{NaHCO₃} were lower under Lucerne while that of IP_{H₂O} was higher. In soil under mixtures, no consistent trend could be observed between different grass species. In soil under tall fescue/Lucerne mixture only the content of IP_{NaOH} was slightly lower compared to soil under tall fescue monoculture, whereas under cocksfoot/ Lucerne mixture IP_{H₂O} and IP_{HCl} were decreased compared to soil under cocksfoot monoculture.

Organic phosphorus fractions

The content of soluble OP fractions (sum of Hedley fractions) decreased in the order NaOH > NaHCO₃ > H₂O (Fig. 5). Differences in the content of OP fractions in soil under Lucerne compared to grass monocultures

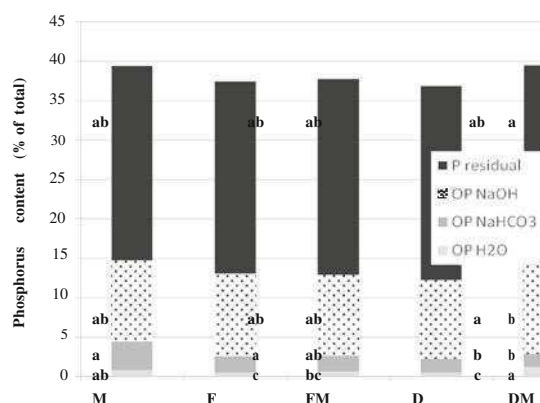


Fig. 5 OP fractions in soil under Lucerne (M), cocksfoot (D) and tall fescue (F) and their mixtures (DM and FM) after 4 years of treatment (n = 6). Different letters indicate significant differences between treatments (n = 3)

included lower OP_{H_2O} and a tendency to lower OP_{NaHCO_3} . No difference of OP forms was noted in soil under tall fescue/Lucerne mixture compared to tall fescue monoculture. In contrast, soil under cocksfoot/Lucerne mixture showed higher OP_{H_2O} and OP_{NaOH} content as compared to soil under cocksfoot monoculture. Thus similar to IP forms, no consistent changes could be observed for grass-legume mixtures in comparison to their monocultures.

Principal component analyses

Principal component analyses were carried out with all soil parameters (Fig. 6). The first two components explain 48.45 % of the total variability. The representation of treatments in the PCA plan shows clear separation of the three monocultures. Soils under mixtures with Lucerne were both different from soils under Lucerne monocultures, but they showed greater variability as compared to soils under grass monocultures.

Discussion

Forage production: carbon, nitrogen and phosphorus budgets

Forage production was lowest for grass monocultures and increased for treatments with Lucerne (Fig. 1), which may be related to higher N input by BNF than mineral fertilisation (Fig. 3). Forage yields of Lucerne treatments were in the range of values observed by other

authors (Schipanski and Drinkwater 2012; Thompson 2013; Louarn *et al.*, 2015). They were lower than those observed by others for grass monocultures probably due to the low amounts of N-fertiliser used compared to intensively managed grasslands (Oomes 1990). High forage yield for Lucerne compared to grass monocultures and increase of Lucerne proportion during the trial despite similar available N concentrations might be explained by their greater resistance to water stress (Sanaullah *et al.*, 2011; Annicchiarico *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015), which strongly affected our experiment during last years' summers. Indeed, in 2010 and 2011, annual precipitation was with 650 mm lower than usual, with very dry summer months. This assumption is further supported by previous work of Sanaullah *et al.*, (2012) who showed experimentally (using $^{14}CO_2$ pulse labelling) the capacity of legume species to attenuate drought effects by rhizosphere processes.

BNF of Lucerne increased with the age of the plants (Fig. 3), as observed by Kelner *et al.*, (1997). Mixture with grass increased forage yields as compared to Lucerne monoculture (Fig. 1) in accordance with higher rates of BNF under grass/legume mixtures as compared to legume monoculture (Rasmussen *et al.*, 2012, Fig. 2). This was explained by competition for soil N and also facilitation of soil N uptake between different species for example due to different root systems (Carlsson and Huss-Danell 2003; Schipanski and Drinkwater 2012) and N transfer between legumes and grasses (Louarn *et al.*, 2015). The availability of soil N was found to be related to the proportion of legumes in the mixture with an optimum at 1:1 (Li *et al.*, 2015), suggesting that our

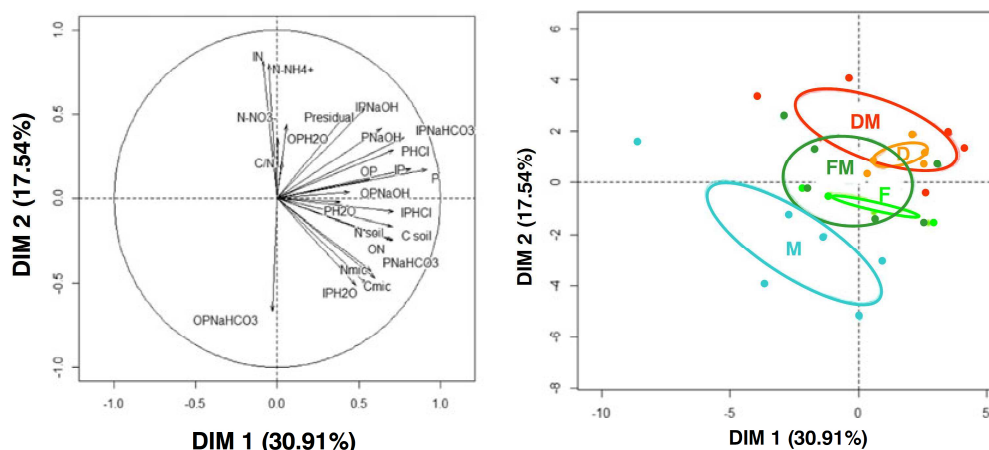


Fig. 6 PCA of soil data recorded after 4 years of treatment under Lucerne (M), cocksfoot (D) and fescue (F) and their mixtures (DM and FM)

data represent lower than optimum availability, as le-gume proportion in the last year was 80 % (Fig. 2). This may be the reason why no trend towards higher soil nitrate concentration was noticed in cocksfoot/Lucerne mixture. A different observation was made, when Lucerne was grown in mixture with tall fescue. Under this treatment the soil nitrate concentration significantly increased as compared to fescue monoculture (Table 4), showing that the nitrate demand of tall fescue is compensated by increased availability following N-input by BNF. Additionally, nitrogen mineralisation could have been increased due to complex interactions influencing nitrogen mineralisation and immobilisation in soil under grass-legume mixtures as compared to soil under mono-cultures (Barrios *et al.*, 1996; Redin *et al.*, 2014). Our study shows that these complex interactions, which may stimulate the active microbial community differently in soils under the treatments with and without legume (Regher *et al.*, 2015), may in soils under mixtures be influenced by the type of grass used for the mixture.

Similar to other studies (Fustec *et al.*, 2010), forage N concentration was increased in the presence of Lucerne (Table 2), whereas C concentration of forage from mixtures was similar to those of forage from grass monocultures. In treatments with Lucerne, N and P export was in all cases higher than the input (Table 2). However, the amount of exported nutrients from mixtures depended on the associated grass species (Table 2). In Lucerne monocultures and grass-Lucerne mixtures with cocksfoot N and P export in 2012 greatly exceeded the input (Table 2), while mixture with tall fescue seemed to decrease these exports. This may be explained by species-related differences in N uptake, as well as N transfer mechanisms, e.g. direct root transfer or transfer via rhizodeposition (Louarn *et al.*, 2015) and contrasting root exudation stimulating differently microbial activity (Sanaullah *et al.*, 2011) and hence N availability in the rhizosphere. This suggests that grassland management and in particular species choice may influence harvesting exports from the system.

Soil organic matter

Soil and microbial C and N concentrations and as a result their stocks were similar for all treatments (Tables 3 and 4). This is in contrast to other studies showing increased soil C and N stocks in the presence of Lucerne (Paustian *et al.*, 1990) as well as increased soil C_{mic} and N_{mic} contents (Li *et al.*, 2015). Un-changed C and N stocks under Lucerne were also noted

by Bell *et al.*, (2012), and explained by export of above-ground biomass through harvest. Despite the similar soil C and N concentrations, the C/N of soil showed significant variations between treatments. It was lower in soil under Lucerne compared to grass monoculture (Table 3), reflecting the pattern of plant C/N (Table 2).

Soil phosphorus

Soil P storage followed different dynamics depending on the plant species used for the treatment. The lowest soil P concentration was recorded under Lucerne despite same P fertilizer input as in the other treatments. Soil P tended to be lower under mixtures as compared to monocultures (Table 5). This illustrates the high P consumption by legumes (Smith 1992; Crews 1996; Roscher *et al.*, 2011; Peñuelas *et al.*, 2012) and subsequent export with the harvested biomass (Table 2).

The high consumption of soil P by Lucerne was most visible for IP, which showed the lowest content (Table 5) because of its availability to plants (Condrón and Tiessen 2005). Soil IP content was lowest under Lucerne followed by cocksfoot/Lucerne and tall fescue/Lucerne mixtures (Table 5). However the depletion of IP is less severe under mixtures compared to Lucerne monoculture and therefore seems to be attenuated by grass presence.

In addition to contrasting IP content, the distribution of IP fractions was slightly different in soil under treatments with and without Lucerne (Fig. 4). In soil under tall fescue/Lucerne mixture the IP_{NaOH} fraction was reduced as compared to soil under tall fescue monoculture, while under cocksfoot/Lucerne mixture the IP_{HCl}, which is an important P source for Lucerne (Daroub *et al.*, 2001), was lower than in soil under cocksfoot monoculture (Fig. 4).

The content of P fractions was different and sometimes contradictory in soil under grass monocultures and grass/Lucerne mixtures. Higher soil OP in presence of Lucerne (Daroub *et al.*, 2001) was visible only when comparing cocksfoot/Lucerne mixture to cocksfoot monoculture (Fig. 5). This treatment showed higher content of OP_{H₂O}, which is considered to be mobile and easily available in soil and an environmentally relevant fraction (Turner and Leytem 2004). Moreover, higher content of OP_{NaOH} was observed, which is considered as a stable OP form (Cross and Schlesinger 1995). Despite its stable nature, this pool may be involved in short term microbial transformation processes

(Oberson *et al.*, 1996), which may be affected by the presence of legumes (Daroub *et al.*, 2001). The IP consumed by plants may be immobilized as OP and returned with belowground plant litter (Condrón and Tiessen 2005; Mullen 2005). In soil under Lucerne, these processes may lead to accumulation of soil OP (Daroub *et al.*, 2001). Even if OP is less available for plants in the short term, it may be accessible to the microbial biomass and become available with time. However, the impact of Lucerne on soil P forms under mixtures may depend on the grass species used, which may change P speciation probably related to plant specific traits.

Effect of Lucerne introduction on soil parameters under grasses

To analyse the effect of Lucerne or grass monocultures and their mixtures on chemical parameters related to SOM, we carried out a principal component analyses (PCA) with all soil parameters. Clear separation of the three monocultures in the PCA plan (Fig. 6) may be explained by the fact that different plant species have contrasting effects on soil properties. Plant species may alter soil properties due to biophysical and biogeochemical processes occurring in the rhizosphere, which are poorly understood (Hinsinger *et al.*, 2009). For example, it has been shown that grasses and legume species have different effects on the diversity of root associated microorganisms (Grayston *et al.*, 1998), amount of microbial biomass, amount and composition of exudates re-leased into the rhizosphere (Sanaullah *et al.*, 2011) as well as mycorrhiza colonisation (Barea *et al.*, 1989). Our study shows that these effects may lead after 4 years of grassland installation to contrasting soil characteristics under different species.

Our PCA further indicates that soil parameter under the two mixtures were similar (Fig. 6). However, soil under Lucerne monoculture is differentiated from all others treatments indicating that plant mixtures have different effect on soil properties than monocultures (Sanaullah *et al.*, 2011; Sanaullah *et al.*, 2012). Further studies are necessary to elucidate specific plant traits determining the mechanisms underlying these effects.

Conclusion

This study analysed the effect of forage grasses grown in monoculture or mixture with a legume on forage yield,

soil organic matter and soil P forms. Highest forage yields were recorded for mixtures, which received also the highest N-input through BNF. Mixtures showed differences in soil P forms and other soil parameters depending on the associated grass species. Our results indicate that different plant species have specific effects on soil C/N ratios, N and P forms and content. In the presence of Lucerne we observed higher soil NO_3^- and OP content as well as lower IP content. It seems that cocksfoot/Lucerne mixture is doing better in terms of forage yield and OP content than tall fescue/Lucerne mixture. The mechanisms underlying these effects still need to be elucidated but they may most probably be related to plant specific rhizosphere effects. Mixture with graminaceous species could attenuate high IP consumption by Lucerne and may lead to storage of OP. Ultimately, the impact of legumes on SOM and soil nutrient status may depend on the graminaceous species used for the mixture.

Acknowledgments The lead author, Alexandra Crème (PhD student), was funded by the European community's Seventh Framework programme (FP2012-2015) under grant agreement no. 262060 (ExpeER) and the Regional Council for Poitou-Charentes. The research leading to these results has received funding from CNRS-INSU and ADEME under the framework of the project AEGES. We also acknowledge the Ministère des Affaires Etrangères for funding under the framework of the ECOSUD project C13U02. We would like to thank the National Research Infrastructure 'Agro- écosystèmes, Cycles Biogéochimique et Biodiversité' (SOERE-ACBB <http://www.soere-acbb.com/fr/>) for providing support during the sampling campaign. We are also grateful to Jean-Pierre Terrasson and Daniel Billiou for their technical assistance.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest We declare that we do not have any conflict of interest.

References

- Angus JF, Peoples MB (2012) Nitrogen from Australian dryland pastures. *Crop Pasture Sci* 63:746–758
- Annicchiarico P, Barrett B, Brummer EC, *et al.*, (2015) Achievements and challenges in improving temperate perennial forage legumes. *Crit Rev Plant Sci* 34:327–380
- Barea JM, El-Atrach F, Azcon R (1989) Mycorrhiza and phosphate interactions as affecting plant development, N_2 -fixation, N-transfer and n-uptake from soil in legume-grass mixtures by using a ^{15}N dilution technique. *Soil Biol Biochem* 21: 581–589

- Barrios E, Buresh RJ, Sprent JI (1996) Nitrogen mineralization intensity fractions of soil organic matter from maize and legume cropping systems. *Soil Biol Biochem* 28:1459–1465
- Bell LW, Sparling B, Tenuta M, Entz MH (2012) Soil profile carbon and nutrient stocks under long-term conventional and organic crop and alfalfa-crop rotations and re-established grassland. *Agric Ecosyst Environ* 158:156–163
- Brookes PC, Landman A, Pruden G, Jenkinson DS (1985) Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol Biochem* 17:837–842
- Carlsson G, Huss-Danell K (2003) Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant Soil* 253:353–372
- Chabbi A, Kögel-Knabner I, Rumpel C (2009) Stabilised carbon in subsoil horizons is located in spatially distinct parts of the soil profile. *Soil Biol Biochem* 41:256–261
- Condon LM, Tiessen H (2005) Interactions of organic phosphorus in terrestrial ecosystems. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (eds) *Organic phosphorus in the environment*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 295–307
- Crews TE (1996) The supply of phosphorus from native, inorganic phosphorus pools in continuously cultivated Mexican agroecosystems. *Agric Ecosyst Environ* 57:197–208
- Crews TE, Peoples MB (2004) Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agric Ecosyst Environ* 102:279–297
- Cross AF, Schlesinger WH (1995) A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. *Geoderma* 64:197–214
- Daroub SH, Ellis BG, Robertson GP (2001) Effect of cropping and low-chemical input systems on soil phosphorus fractions. *Soil Sci* 166:281–291
- Erismann JW, van Grinsven H, Grizzetti B, et al (2011) The European nitrogen problem in a global perspective. In: *European nitrogen assessment. sources effects and policy perspectives* Cambridge University Press, pp 9–31
- Fustec J, Lesuffleur F, Mahieu S, Cliquet J-B (2010) Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agron Sustain Dev* 30:57–66
- Graham PH, Vance CP (2003) Legumes: importance and constraints to greater use - update on legume utilization. *Plant Physiol* 131:872–877
- Grayston SJ, Wang S, Campbell CD, Edwards AC (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 30:369–378
- Hedley MJ, Stewart JWB, Chauhan BS (1982) Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci Soc Am J* 46:970–976
- Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil* 321:117–152
- IPCC (2013) Fifth Assessment Report - WG1
- Ivanoff DB, Reddy KR, Robinson S (1998) Chemical fractionation of organic phosphorus in selected histosols. *Soil Sci* 163:36–45
- Kelner DJ, Vessey JK, Entz MH (1997) The nitrogen dynamics of 1-, 2- and 3-year stands of alfalfa in a cropping system. *Agric Ecosyst Environ* 64:1–10
- Kirkby CA, Richardson AE, Wade LJ, Passioura JB, Batten GD, Blanchard C, Kirkegaard JA (2014) Nutrient availability limits carbon sequestration in arable soils. *Soil Biol Biochem* 68:402–409
- Lemaire G, Cruz P, Gosse G, Chartier M (1985) Etude des relations entre la dynamique de prélèvement d'azote et la dynamique de croissance en matière sèche d'un peuplement de Luzerne (*Medicago sativa* L.). *Agronomie* 5:685–692
- Li Q, Song Y, Li G, Yu P, Ping W, Zhou D (2015) Grass-legume mixtures impact soil N, species recruitment and productivity in temperate steppe grassland. *Plant Soil* 394:271–285
- Louarn G, Pereira-Lopès E, Fustec J, Gastal F (2015) The amounts and dynamics of nitrogen transfer to grasses differ in alfalfa and white clover-based grass-legume mixtures as a result of rooting strategies and rhizodeposit quality. *Plant Soil* 395: 289–305
- Moni C, Rumpel C, Virto I, Chabbi A, Chenu C (2010) Relative importance of sorption versus aggregation for organic matter storage in subsoil horizons of two contrasting soils. *Eur J Soil Sci* 61:958–969
- Mullen MD (2005) Phosphorus and other elements. In: Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer (eds) *Principles of applied soil microbiology*, pp 463–488. Pearson Prentice Hall, Upper Seattle River
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27:31–36
- Nyfele D, Huguenin-Elie O, Suter M, Frossard E, Lüscher A (2011) Grass-legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agric Ecosyst Environ* 140:155–163
- Oberson A, Besson JM, Maire N, Sticher H (1996) Microbiological processes in soil organic phosphorus transformations in conventional and biological cropping systems. *Biol Fertil Soils* 21:138–148
- Olsen S, Cole C, Watanabe F, Dean L (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA Circular Nr 939, US Gov. Print. Office, Washington, DC
- Oomes MJM (1990) Changes in dry matter and nutrient yields during the restoration of species-rich grasslands. *J Veg Sci* 1: 333–338
- Paustian K, Andren O, Clarholm M, et al., (1990) Carbon and nitrogen budgets of four agro-ecosystems with annual and perennial crops, with and without N fertilization. *J Appl Ecol* 27:60–84
- Peñuelas J, Sardans J, Rivas-ubach A, Janssens IA (2012) The human-induced imbalance between C, N and P in earth's life system. *Glob Chang Biol* 18:3–6
- Petersen JC, Barton FE, Windham WR, Hoveland CS (1987) Botanical composition definition of tall fescue white clover mixtures by near-infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci* 27:1077–1080
- Rasmussen J, Sørensen K, Eriksen J (2012) N₂-fixation and residual effect of four legume species and four companion grass species. *Eur J Agron* 36:66–74
- Redin M, Recous S, Aita C, Dietrich G, Skolaude AC, Hytalo Ludke W, Schmatz R, Giancomini SJ (2014) How the chemical composition and heterogeneity of crop residue mixtures

- decomposing at the soil surface affects C and N mineralization. *Soil Biol Biochem* 78:65–75
- Regehr A, Oelbermann M, Videla C, Echarte L (2015) Gross nitrogen mineralization and immobilization in temperate maize-soybean intercrops. *Plant Soil* 391:353–365
- Robertson GP, Vitousek PM (2009) Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. *Annu Rev Environ Resour* 34:97–125
- Robson A, O'hara G, Abbott L (1981) Involvement of phosphorus in nitrogen fixation by subterranean clover (*trifolium subterraneum* L.). *Funct Plant Biol* 8:427–436
- Roscher biodiversity experiment. *Plant Soil* 341:333–348
- Rumpel C, Crème A, Ngo PT, Valesquez G, Mora ML, Chabbi A (2015) The impact of grassland management on biogeochemical cycles involving carbon, nitrogen and phosphorus. *J Soil Sci Plant Nutr* 15:353–371
- Sanaullah M, Blagodatskaya E, Chabbi A, Kuzyakov Y (2011) Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition. *Appl Soil Ecol* 48:38–44
- C, Thein S, Weigelt A, Temperton VM, Buchmann N, Schulze ED (2011) N₂ fixation and performance of 12 legume species in a 6-year grassland
- Sanaullah M, Chabbi A, Rumpel C, Kuzyakov Y (2012) Carbon allocation in grassland communities under drought stress followed by ¹⁴C pulse labeling. *Soil Biol Biochem* 55:132–139
- Schipanski ME, Drinkwater LE (2012) Nitrogen fixation in annual and perennial legume-grass mixtures across a fertility gradient. *Plant Soil* 357:1–13
- Smith VH (1992) Effects of nitrogen: phosphorus supply ratios on nitrogen fixation in agricultural and pastoral ecosystems. *Biogeochemistry* 18:19–35
- Soussana JF, Lemaire G (2014) Coupling carbon and nitrogen cycles for environmentally sustainable intensification of grasslands and crop-livestock systems. *Agric Ecosyst Environ* 190:9–17
- Thompson D (2013) Yield and nutritive value of irrigated tall fescue compared with orchardgrass: in monocultures or mixed with alfalfa. *Can J Plant Sci* 93:799–807
- Turner BL, Leytem AB (2004) Phosphorus compounds in sequential extracts of animal manures: chemical speciation and a novel fractionation procedure. *Environ Sci Technol* 38:6101–6161
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem* 19:703–707