



Earthworm species effect on *Lolium perenne* phosphorus uptake: a field experiment

Laura Ferron

► To cite this version:

Laura Ferron. Earthworm species effect on *Lolium perenne* phosphorus uptake: a field experiment. Life Sciences [q-bio]. 2018. dumas-02080794

HAL Id: dumas-02080794

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02080794>

Submitted on 27 Mar 2019

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

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

Année universitaire : 2017-2018

Master Biologie, Agrosiences

Parcours Amélioration, Production,
Valorisation du végétal

Option : Fonctionnement et gestion des
agrosystèmes

Rapport de stage

- ☐ d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- ☒ de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- ☐ d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Earthworm species effect on *Lolium perenne* phosphorus uptake: a field experiment

Par : Laura FERRON



Soutenu à Rennes le 28/06/2018

Devant le jury composé de :

Président : Matthieu CAROF

Enseignant référent : Edith LE CADRE

Maîtres de stage : Jan-Willem VAN GROENIGEN et
Hannah VOS

Rapporteur : Anne JAFFREZIC

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celles d'AGROCAMPUS OUEST et l'université de Rennes 1

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation « Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France » disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Acknowledgments

First, I would like to thank my supervisors Jan Willem van Groenigen and Hannah Vos. This study was a wonderful opportunity for me. Your supervision was perfect. I have learnt a lot of very different skills during those six months.

I would also like to thank Gerwin Koopmans as he was part of this project.

I have been well advised and helped in the lab by Tamás Salánki, Willeke van Tintelen, Miranda Vlag, Gerlinde Vink and Wim Pape.

The staff from Unifarm has always been helpful and enthusiastic in facing all the technical challenges. My thoughts are going especially to John van der Lippe, Frans, Julia, David and Henk.

I would also like to thank the whole Soil Quality group for their friendship and their support. I am especially grateful for your help: Anna-Reetta Salonen, Natalie Oram, Rima Porre, Mirjam Breure, Gwen Flageul van Dijk, Susan Klinkert, Ye Tian, Mirza Haque and finally Dimitris Syminelakis who will take over this study.

I am grateful to my family and my friend that have supported me in this adventure. One person in particular has been very supportive during those six months; heel veel bedankt Mees!

Table of content

1	Introduction	1
2	State of the art.....	2
2.1	Phosphorus dynamics in soil	2
2.2	Mineral P fertilizer	3
2.3	Plant strategies to acquire P	4
2.4	Association with Arbuscular Mycorrhiza Fungi.....	4
2.5	Earthworms.....	5
3	Material and methods	7
3.1	Experimental design.....	7
3.2	Soil description.....	7
3.3	Column description and management	7
3.4	Earthworms.....	8
3.5	Grass analysis	8
3.6	Soil analysis	9
3.7	Statistical analysis	9
4	Results.....	10
4.1	Plant analyses.....	10
4.2	Soil Analyses.....	11
5	Discussion	11
5.1	Plant analyses.....	11
5.1.1	Shoot biomass.....	11
5.1.2	Shoot nutrients	12
5.1.3	AMF colonization	13
5.2	Soil analyses	13
5.2.1	P in soil.....	13
5.2.2	PH.....	13
5.2.3	Carbon.....	14
5.2.4	Ionic strength.....	14
6	Conclusion.....	14
6.1	Summary	14
6.2	Outlook.....	14
6.3	Recommendations	15
7	References	16
8	Annexe I: French translation.....	23

1 Introduction

Soil quality is a concept that has been defined many times and is still under discussion (Bünemann *et al.*, 2018). The most recognized definition is probably the one of Doran and Parkin (1994): “the capability of a soil to function within ecosystem boundaries to sustain biological productivity, maintain environmental quality, and promote plant and animal health”. Food production is one of the most important ecosystem services of soils (Adhikari and Hartemink, 2016). In the light of the growing world population, food demands will increase and therefore a sustainable management of soil is required. Moreover, a sustainable soil fertility depends on a good management of soil nutrients (FAO, 2015).

One of the most important of these nutrients is phosphorus (P). P is an important constituent of plants and can be a limiting nutrient for their growth (Liebig and Playfair, 1843). P is incorporated in nucleic acids, membrane phospholipids and phosphorylated intermediates of the energy metabolism (ATP) (Shen *et al.*, 2011). The main way for a plant to obtain P is to get it from the soil solution in the form of ortho-phosphates (ortho-P). However the availability of ortho-P is usually very low at any time, even though other P pools can be quite large (Fageria, He and Baligar, 2017). This is caused by the very strong binding of P to soil particles via precipitation into secondary P minerals or adsorption on clay edges for instance. These P dynamics in soil will be described in detail in paragraph 2.1.

Plants have developed several strategies to compensate for the scarcity of ortho-P ions in the soil solution. Those can be divided into two categories: (i) changing the availability of P in the root zone; (ii) increasing the root zone (Shen *et al.*, 2011). These strategies will be explained in detail in paragraph 2.3. Association with mycorrhizal fungi can also be a solution to extent the root network (Hodge, 2004). This will be further explored in paragraph 2.4.

In agrosystem P fertilizers are used to alleviate this P shortage by applying mineral or organic fertilizer. However, mineral fertilizers are only produced from rock phosphate and their stocks are thus finite (Cordell, Drangert and White, 2009). This issue will be given more attention in paragraph 2.2. Manure is the most used organic fertilizer but it leads to environmental issues when applied at too high concentrations in regions of high livestock production (Reijneveld *et al.*, 2010). Considering those drawbacks, new sources of P need to be found for plant growth in agrosystem.

Soil biota, especially earthworms, could possibly help plants getting access to the relatively unavailable pools of P. Earthworms are key organisms in the soil as they participate in nutrient cycling, especially of nitrogen (N) (Blouin *et al.*, 2013) and P (Le Bayon and Kohler-Milleret, 2009). Earthworms can affect the P availability to grass but the results depend on earthworm species (Vos *et al.*, 2014). Very different ortho-P availabilities in cast of seven different earthworm species were found in a greenhouse experiment (Vos *et al.*, in preparation). These results should still be validated under field conditions. Also, possible interactions within multi-species earthworm communities should be studied. Further information about earthworms will be given in paragraph 2.5.

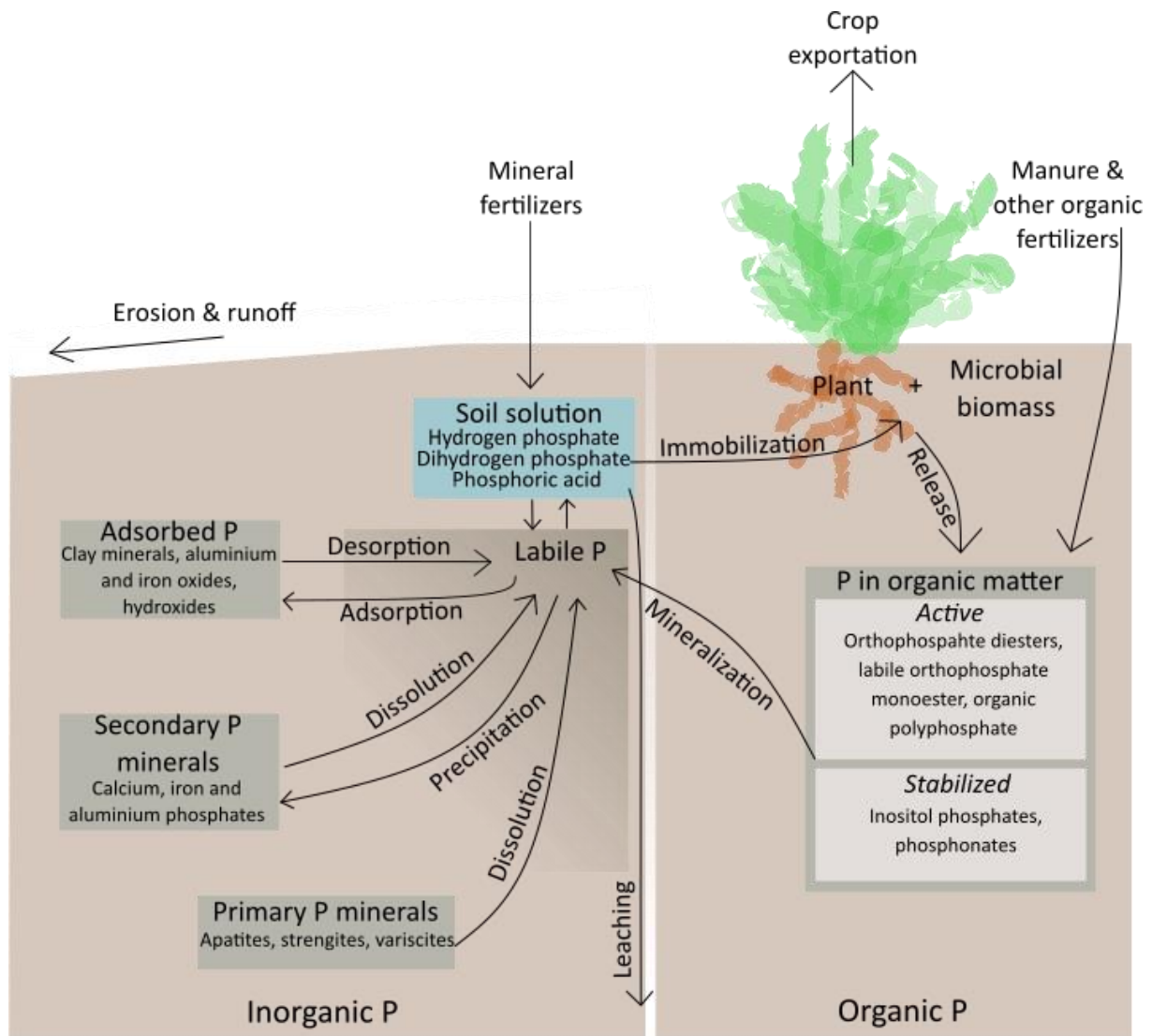


Figure 1: Phosphorus cycle in soil. Information from (Shen *et al.*, 2011; Fageria, He and Baligar, 2017)).

The aim of this study was to assess the effects of different earthworm species on plant P uptake on a soil with a low P status under field conditions. Our hypotheses were that earthworms presence would allow a higher P availability for plants and would therefore result in a greater shoot biomass (H1) as well as a greater plant P content (H2). This would be explained by a modification of the P pools in soil (H3), a change in the soil pH (H4), a change in Dissolved Organic Carbon (DOC) (H5), a modification of AMF colonization of the roots (H6) and a change in the root morphology allowing a better soil exploration (H7). The results would reflect a species effect, follow an ecological group pattern, will be affected differently in various earthworm communities and more globally, higher biomass production and better P availability are expected with higher earthworm richness.

In order to test these hypotheses a field experiment with soil columns containing a low P status soil and cultivated with perennial ryegrass (*L. perenne* L.) was set up. Five different species of earthworms were used: *Lumbricus rubellus* Hoffmeister, *L. terrestris* L., *Aporrectodea longa* Ude, *A. caliginosa* Savigny and *Allolobophora chlorotica* Savigny. Earthworm treatments included monocultures of all species as well as all combinations of 3 species and an all-species mixture. Two control treatments were earthworm-free of which one was fertilized with inorganic P as a positive control. The total study will last two growing seasons and will end in the autumn 2019. During this time, the effects of earthworms in the field on shoot biomass and P content of the plant will be assessed. To understand the potential pathways that could lead to an effect of earthworms, other soil and biological parameters will also be evaluated. This internship of 6 months focusses on setting up this experiment as well as doing the first measurements and analyses of the first growing season. Thus, only a first assessment of the hypotheses is given here when it has been possible and the results shown will probably evolve through the seasons.

The next chapter of this report is summarizing the knowledge relevant for this study. The third chapter describes the methodology applied and results are presented and thereafter discussed in the two subsequent chapters. The report ends with a conclusion summarizing the main findings, giving an outlook on what results can be expected by the end of the experiment and give some recommendations for the future management and analyses.

2 State of the art

2.1 Phosphorus dynamics in soil

P is present in a great variety of forms in the soil but most of these are unavailable for plant uptake. There are two main pools of P in soil: organic and inorganic P (Figure 1). Only inorganic P present in the soil solution is available for plant uptake. Plants take up P in the form of orthophosphate: dihydrogen phosphate (H_2PO_4^-) in acid soils and hydrogen phosphate (HPO_4^{2-}) in alkaline soils. Labile P is held on solid surfaces (metal oxides, clay edges, contained in soil organic matter) but easily released to the soil solution. All other P is considered as nonlabile, insoluble or fixed. Inorganic P in the soil solution represents a minor pool compared to labile and fixed P pools (Fageria, He and Baligar, 2017) which together represent 98% of total soil P (Filippelli, 2002).

The P cycle in soil is presented in Figure 1. The two main pathways by which P can become labile are mineralization of organic P as well as desorption of inorganic P from inorganic pools. The active (labile) part of organic matter (OM) is easily decomposable and has a turnover time of less than 10 years (Haynes, 2005). Stable OM (non-labile), on the other hand, is not easily decomposable and has a much longer turnover of centuries-scaled times (Cambardella, 2005). OM has shown a competitive sorption with ortho-P, when adding OM to soil, humic and fulvic acids, for instance, will be more sorbed on clay edges. More metal bridges can also occur and the negative charge of soil surface can be increased. Mineralization can also be increased (Guppy *et al.*, 2005). Microorganisms are responsible for mineralization, which in turn is affected by cultivation practices as well as pedo-climatic parameters (Fageria, He and Baligar, 2017). Inorganic fixed P pools are divided according to the type of minerals P is bound to and differ in their ability to provide a good P source for plant growth. Primary P minerals are very stable and haven't altered substantially from the parental material they originate from. This weathering depends on climate, topography, nature of the parent material, soil biota and time (Wilson, 2004). Secondary P minerals are the weathering products of primary minerals and they are found in association with clay and fine silt (Karathanasis, 2006). The dissolution rate of P is dependent on its pool of origin: dissolution of primary P minerals by weathering is usually quite slow and can't meet plant needs (Shen *et al.*, 2011). However, release of P through this process depends on the soil development stage (Filippelli, 2002) and on the intensity of weathering (Wilson, 2004). Dissolution of secondary P minerals depends on the size of the particles involved and on pH. Phosphate ions will precipitate with iron and aluminum in acid conditions or with calcium in alkaline conditions. Adsorption and desorption processes occur only at the surface of clay minerals, aluminum and iron oxides or hydroxides (Fageria, He and Baligar, 2017). Erosion, runoff and leaching are rather uncontrolled losses from P cycling at field scale. The latter two are losses of P though the soil solution while erosion involves P bound to or incorporated in soil particles (Schoumans, 2015).

2.2 Mineral P fertilizer

Only a few countries like Morocco, China and the USA, have natural reserves of rock phosphate, the prime source of mineral P fertilizer. Global stocks of rock phosphate are estimated to be finished within 300 to 400 years (Dawson and Hilton, 2011), although some authors have predicted a shorter timeframe (Heffer, 2006; Smit *et al.*, 2009). Besides this, the demand of P fertilizers keeps on increasing: a first sign of the coming P crisis occurred in 2007-2008, when prices of rock phosphate and fertilizers temporarily increased by 700% in 14 months (Cordell, Drangert and White, 2009).

Use of P fertilizers can be a source of environmental problems. Losses of P from the agrosystem to surface water occur when fertilizers are applied in excess under certain pedo-climatic conditions. This leads to eutrophication of water bodies (Hart, Quin and Nguyen, 2004). Eventually, the water ends up in marine ecosystems, and it has been shown that the increasing use of fertilizers since the 1960's correlates to the increase of eutrophication in these areas (Nixon, 1995). Moreover, mining of phosphate rocks leads to the release of hazardous contaminants such as heavy metals, gypsum and fluoride in

the air or the aquifer and the landscape can be strongly altered after a mining event (Butusov and Jernelöv, 2013).

2.3 Plant strategies to acquire P

In order to acquire P from the soil solution at very low P concentrations, plants have high-affinity active transporters (Shen *et al.*, 2011). Besides, plants can modify the availability of P around their roots via a change of the pH of the surrounding soil. In order to counterbalance the absorption of N as either NH_4^+ or NO_3^- required for the plants metabolism, H^+ or $\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$ is released. This leads to either alkalization (uptake of NO_3^- and excretion of $\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$) or acidification (uptake of NH_4^+ and excretion of H^+) of the rhizosphere (Marschner and Marschner, 2012). Respiration of plant and microorganisms in the rhizosphere produces CO_2 which can in some soils lead to acidification through dissolution of CO_2 in carbonic acid in the soil solution. Plants also release through their roots various carbon compounds including organic acids. Moreover, plants secrete acid phosphatase in the soil and are therefore able to sustain on an organic P fertilizer source in controlled conditions (Tarafdar and Claassen, 1988). Phosphatases are enzymes allowing the separation of a phosphate group from a molecule. Different types exist: acid and alkaline phosphomonoesterases, phosphodiesterase, and phosphotriesterase (Eivazi and Tabatabai, 1977).

Plant P uptake can lead to depletion the soil surrounding their roots. If the surrounding soil is completely depleted of labile P, another strategy for the plant could be to explore the soil that is further removed. Root architecture varies among plant species and genotypes but lateral root growth over primary root growth is expected when a P depletion occurs (Péret *et al.*, 2014). Having a more extended and plastic rhizosphere is an advantage to exploit soil patchy nutrients like P (Lynch, 1995). The grass *Lolium perenne* can respond to patches of elevated N concentration by growing roots toward them and the response to P patches is even stronger than that to N patches for any plant studied. However, the responsiveness differs per plant species and a species like *Poa trivialis* is less responsive to patchy nutrient availability *i.e.* it doesn't grow more roots in nutrient rich patches than in the rest of the soil (Hodge, 2004).

2.4 Association with Arbuscular Mycorrhizal Fungi

Having an extensive root system can be costly in terms of carbon (C) for the plant. Association with mycorrhizal fungi can be a solution to extent the root network for a lower C price since hyphae are smaller than roots. The hyphae of mycorrhizal fungi permit to access nearby patches of nutrients more quickly and more easily (Hodge, 2004). Several mycorrhiza symbioses exist but the main ones encountered involve Arbuscular Mycorrhiza Fungi (AMF) that colonize cortical root cells with arbuscules. Hyphae can spread several centimeters outside the root system and thereby P outside the root depletion zone can be acquired. Arbuscules have a high turnover as its lifespan is generally of one to two weeks, enabling a rather dynamic exploitation of the soil according to the P availability and to follow root growth.

Even if the better exploration of soil is thought to be the major pathway of P acquisition by AMF, they are also more efficient in mining P from soil than plants as they can absorb

P in the soil at lower concentrations. AMF P solubilization mechanisms are similar to plant mechanisms. They involve acidification of the soil, interaction with decomposer microorganisms and excretion of phosphatases (both acid and alkaline) (White and Hammond, 2008; Wang *et al.*, 2014). However, the symbiosis is mainly controlled by plants according to P availability: a rather low P fertilization leads to a higher root colonization of AMF while a (too) high fertilization tends to decrease the colonization rate of AMF (Liu *et al.*, 2016).

2.5 Earthworms

Earthworms have long been recognized to have a positive effect on plant production. Darwin (1881) was the first to point out the benefits of earthworms to soil fertility and thus plant growth. Ever since, numerous studies have been performed on the effect of earthworms on plant production. They are summarized in a meta-analysis (van Groenigen *et al.*, 2014): earthworm presence increases crop yield by 25%, and benefits both above- and belowground biomass. Earthworms are ecosystem engineers of the soil as they modify its physical properties and decompose organic matter (Jones, Lawton and Shachak, 1994; Lavelle *et al.*, 1997). They are involved in numerous ecosystem services such as water regulation and improvement of soil structure. One of the most interesting perspectives of earthworms in agriculture is their participation in nutrient cycling in soil (Blouin *et al.*, 2013; van Groenigen *et al.*, 2014) such as P (Le Bayon and Kohler-Milleret, 2009). Earthworms are known to produce alkaline phosphomonoesterase. Casts of *Eisenia fetida*, *Dendrobaena veneta*, *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* all contain alkaline phosphatases (Satchell and Martin, 1984). In a pot experiment, an increase in soil phosphatase activity has been shown to be stimulated by earthworms via microorganism activity in their burrows. That study concludes that the effect of earthworms on the P biogeochemical cycle depends on the organic P source, burrowing behavior and food preferences of earthworms (Le Bayon and Binet, 2006). Phosphorus availability is also linked to pH as ortho-P can form ions pairs with metal cations and this occurs more or less according to the pH (Hinsinger, 2001). A modification of pH can in turn change earthworm activity (Springett and Syers, 1984; Barois and Lavelle 1986). The activity of five different species in monoculture increases the P availability in the bulk soil and modifies the pH as well as the electrical conductivity after a 90 days incubation (Chaudhuri *et al.*, 2012). This illustrates that the effect of earthworms on the phosphorus cycle in soil is complex and consists of multiple pathways (Figure 2) that have been studied by Ros *et al* (2017). Earthworms influence directly ortho-P availability as they produce their own phosphatases (W1). Mineralization occurs in casts, transforming organic P into ortho-P (W3). Their calciferous glands in the gut impact the concentration of calcium ions in soil (Briones and Pearce, 2011) and thus the pH, which tend to be higher in their casts (Ros *et al.*, 2017). The pH is also impacted by microbial activity leading to denitrification in casts (W4). DOC is higher in casts than in the bulk soil and this might be explained by earthworm food preferences. Because of the competitive sorption of OM and ortho-P, this leads to a higher ortho-P availability in the soil solution (W2&5). Aromaticity is the percentage of phenolic group in DOC, thus a estimation of the degradability of DOC (Weishaar *et al.*,

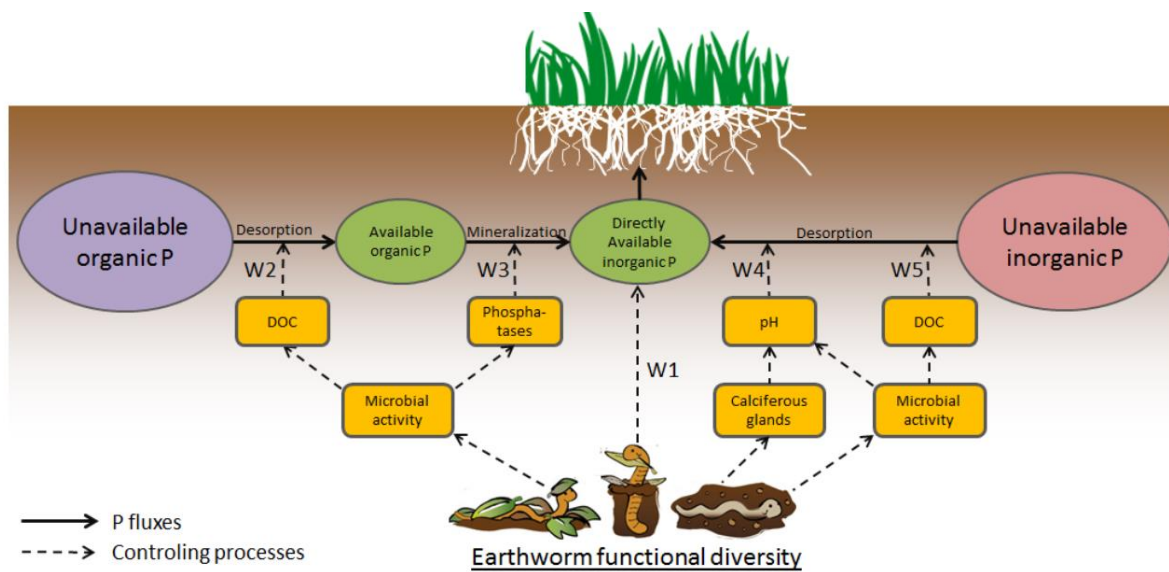


Figure 2: Hypothetical pathway through which earthworms influence the P availability to plants. The P pools have been simplified (van Groenigen, 2015).

2003). Earthworms impact aromaticity as their cast present lower values than the bulk soil, meaning that the DOC of casts is more easily degradable than the one of the bulk soil (Vos *et al.*, in preparation).

A possible key towards the way in which various earthworm species can affect P availability is their functional niche. Earthworms can be organized in 3 ecological groups according to the functional niche they inhabit: epigeic, anecic and endogeic earthworms (Bouché, 1977). Epigeic earthworms are pigmented worms living and feeding in the litter layer. They are highly predated and have therefore developed an R strategy, i.e. they reproduce in high number and grow fast. Anecic earthworms are long maximally dorso-anterior pigmented worms. They live in permanent burrows in the soil and feed on leaves at the surface. They developed a K strategy, i.e. they reproduce and grow more slowly. Endogeic earthworms are non-pigmented worms living and feeding on soil particles and associated organic matter. They are not highly predated and have thus a slow pace of reproduction. Those categories are theoretical and although some species clearly belong to one group, it is not rare to encounter species presenting characters from two ecological groups such as epi-endogeic or epi-anecic species (Bouché, 1977). Those groups are of importance when ecosystem services provided by earthworms are considered. For instance, anecic and epigeic earthworms influenced the mineralization of surface crop residues in a mesocosm experiment but endogeic earthworms did not. On the other hand, in the same study, mineralization of soil organic matter was increased by endogeic and epigeic earthworms but not by anecic worms (Postma-Blaauw *et al.*, 2006). Casts of epigeic and anecic earthworms both contain more dissolved inorganic P than the bulk soil where that was not true for endogeic earthworms (Vos *et al.*, 2014). Furthermore, the behavior of single species is changed when earthworms are cultivated in a multi-specific mixture, e.g. the length and depth of their burrows can be modified by the presence of another species (Jégou, Capowiez and Cluzeau, 2001). Most of the time, the interactions are negative. This would mainly be explained by competition, with the higher competition applying to the species having the closest ecological niches (Uvarov, 2009). Interactions can be positive as for *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus rubellus* interaction which interaction leads to a better reproduction rate for *A. caliginosa* (Räty and Huhta, 2003).

Earthworm interaction with AMF has been studied several times under different conditions but results are unclear. Milleret, Le Bayon and Gobat (2009) have shown a significant interaction between AMF and earthworms. In an experiment of buried pots in the field, Li *et al* (2012) have found that earthworms (*Aporrectodea trapezoids*) and AMF (*Glomus intraradices*) in interaction stimulate plant growth (shoot and root) and nutrient content (N and P). They used wheat straw as a food source for earthworms and hypothesized that earthworms feed on hyphae and spores when no other food source was available. The same results were found with a similar study involving another earthworm species (*Eisenia fetida*) (Li *et al.*, 2012). Reddell and Spain (1991) have found that the concentration of AMF spores in earthworm cast was always higher than its concentration in the surrounding soil. They explain this by a preference of earthworms for feeding in the rhizosphere or rich organic matter spots, where AMF are active.

Table 1: Characteristics of the soil used in the experiment.

Parameters	Methods	Values	Units
Physics			
Texture	pipet method	1.6 silt, 7.6 clay, 87.7 sand	%
Chemistry			
* pH	extr. CaCl ₂ , pH-meter	5.99	-
* Organic matter	weight loss on ignition	4.2%	%
* Nitrogen NH ₄	extr. CaCl ₂ , SFA	2.8	mg.kg ⁻¹
* Nitrogen NO ₃ +NO ₂	extr. CaCl ₂ , SFA	9.8	mg.kg ⁻¹
* Aluminium	extr. acid ammonium oxalate, ICP-AES	1636	mg.kg ⁻¹
* Iron	extr. acid ammonium oxalate, ICP-AES	630	mg.kg ⁻¹
* Manganese	extr. acid ammonium oxalate, ICP-AES	47	mg.kg ⁻¹
* Phosphorus			
	extr. acid ammonium oxalate, ICP-AES	272	mg.kg ⁻¹
	ammonium lactate, SFA Nt/Pt	105	mg.kg ⁻¹
- PO ₄	extr. CaCl ₂ , SFA CaCl ₂	under detection limit	mg.L ⁻¹
- PO ₄	extr. water, SFA CaCl ₂	9	mg.L ⁻¹
- Inorganic	Kuo, ICP-AES	244	mg.kg ⁻¹
- Organic	Kuo, ICP-AES	99	mg.kg ⁻¹
- Total	Kuo, ICP-AES	343	mg.kg ⁻¹

extr. CaCl₂: extraction 0.01 M CaCl₂; SFA: Segmental Flow Analysis; ICP-AES: Inductively Coupled Plasma–Atomic Emission Spectrometry

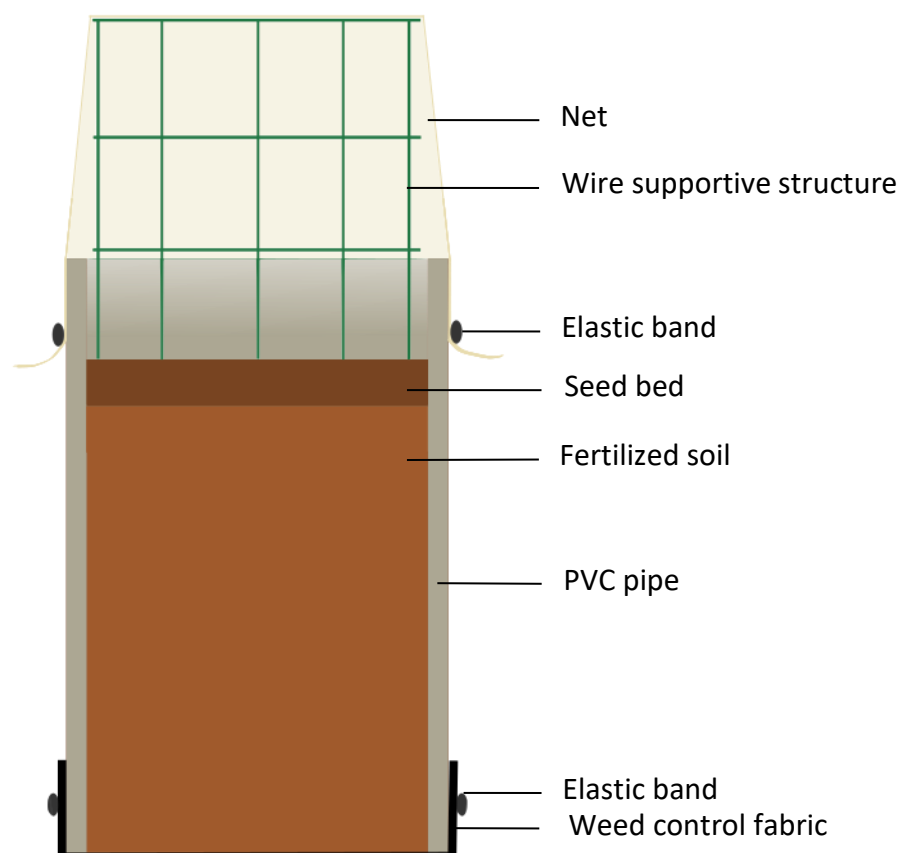


Figure 3: Setup of the columns placed in the field

Earthworms presence has also been linked to a higher AMF colonization in controlled experiments (Zarea *et al.*, 2009).

3 Material and methods

3.1 Experimental design

The experiment consisted of 95 PVC columns buried in the field. Columns contained a low P status soil and were cultivated with perennial ryegrass (*L. perenne*). A more detailed description of the columns will be given in paragraph 3.3. Five different species of earthworms were used: *L. rubellus* (Lr), *L. terrestris* (Lt), *A. longa* (Al), *A. caliginosa* (Aca) and *A. chlorotica* (Ach). All species were cultivated in monocultures as well as in all possible combinations of 3 species and a mixture of all five species. Two controls were earthworm-free with one being fertilized with inorganic P whereas all the other treatments were not. Those 18 treatments were repeated 5 times in a randomized complete block design. The study started in April 2018 and will last two growing seasons.

3.2 Soil description

The soil used for this experiment was a sandy soil with a low P status (Table 1), excavated from an extensively managed pasture in Achterberg, the Netherlands (51°59'32"N, 5°35'2"E). To prevent any earthworms or cocoons *ab initio*, the soil was γ -irradiated at 8kGy (Synergy Health B.V., Ede, the Netherlands). Since the aim of this procedure was to obtain an earthworm and cocoon-free soil that was not sterile, an inoculation soil was made by sieving the original soil at 1mm. Earthworms cocoons of the smallest species found in the Netherlands are on average 3mm, thus sieving over 1mm was fine enough to prevent any cocoons going through the mesh (Sims and Gerard, 1985).

3.3 Column description and management

The columns (Figure 3) were 40 cm high and 18.5 cm wide. The bottom was covered with weed control fabric to allow natural-like water and nutrient flows but prevent earthworms to move in or out. The top of the columns was covered with a 1.5 mm polyethylene mesh insect net in which was supported by a wire structure of 25 cm high, allowing enough space for grass to grow. The structure allowed the net to be flat on top and did therefore not hamper the rain when falling through it.

Every action done on the columns is referenced in the Figure 4. Each column contained 13.12 kg of dry soil. The main part was filled with 12.25 kg of soil of which 3.32% of inoculum soil, mixed with fertilizer (Table 2) and 0.800 L of de-ionised water. During the filling of the columns the soil was compacted each time after a third of the total volume was added. Subsequently the seed bed was applied, consisting of 0.500 kg irradiated soil and 0.08 L of de-ionised water but was not fertilized. The columns were kept in the greenhouse (Unifarm, Wageningen University and Research, the Netherlands) during 7 weeks after the filling and completely randomized every two weeks. Four grams of seeds of *Lolium perenne* (L. cultivar Barnhem) were used per column and the columns were covered with a plastic sheet to provide optimum conditions for germination. The sheet was removed after one week. After complete germination, the columns were watered every other day with 0.5L of de-ionised water while being in the greenhouse. They were

Table 2: Fertilizer application. P Fertilization apply to the P fertilized treatment only. Concentrations in kg.ha⁻¹ if not specified.

Time	N	K	Ca	S	Trace elements	P
<i>Ab initio</i>	133.0	108.0	50.0	12.0	0.5 mg B.L ⁻¹ , 0.5 mg Mn.L ⁻¹ , 0.02 mg Cu.L ⁻¹ , 0.05 mg Zn.L ⁻¹ and 0.01 mg Mo.L ⁻¹ Mo	87.0
Day 1	277.4	-	-	-	-	27.8
Day 29	78.2	254.0	-	-	-	7.8

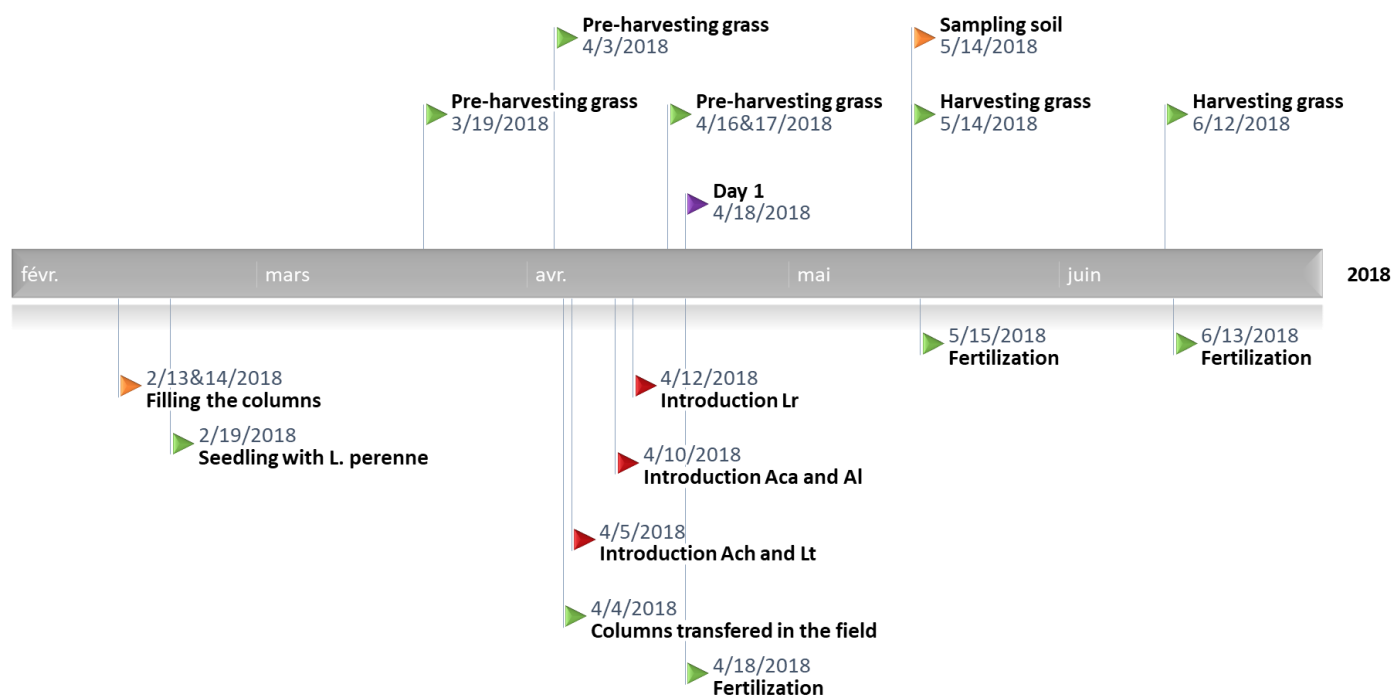


Figure 4: Timeline of the setting and the start of the experiment. Results of the 12th June 2018 are not presented in this report.

Table 3: Location of Earthworm collection

Earthworm species	Location
<i>L. rubellus</i>	Wageningen, the Netherlands
<i>L. terrestris</i>	Ordered from Star Food, Barneveld, the Netherlands
<i>A. longa</i>	Den Hoorn Texel & Wageningen, the Netherlands
<i>A. caliginosa</i>	Wageningen, the Netherlands
<i>A. chlorotica</i>	Wageningen, the Netherlands

buried in the field the day following the second pre-harvesting of grass. The field was equipped with an irrigation system pumping deep groundwater with a very low P content. After the start of the experiment (Day 1 on Figure 4), each harvest was followed by a fertilizer application. All columns were fertilized with N and the positive controls also received additional P fertilization K was also applied every second harvest (table 2). The fertilizer concentration was calculated according to the estimated loss of nutrients in the exported biomass as well as the nutrient use efficiency. We considered that *L. perenne* had a concentration of 35 g N.kg⁻¹, 3.5 g P.kg⁻¹ and 25 g K.kg⁻¹ of dry shoot biomass (Reuter and Robinson, 1997). We assumed that all nutrient use efficiencies were 50%.

3.4 Earthworms

Five species of earthworms were applied in this experiment: one epigeic worm (*L. rubellus*), two anecic worms (*L. terrestris* and *A. longa*) as well as two endogeic worms (*A. caliginosa* and *A. chlorotica*, green morphotype). 15 earthworms were applied in each column; therefore one species is represented with either 15 (monoculture), 5 (three species interaction) or 3 (all species interaction) individuals. Adult earthworms were used as much as possible and the other worms were chosen carefully to be sub-adults. They were collected at various locations in the Netherlands (Table 3) and kept in buckets of soil with grassland litter at 15°C in the dark before the start of their introduction. They were introduced over the first two weeks after moving the columns from the greenhouse to the field (Figure 4). The earthworms were added in upside-down plastic cups with wet filter paper, which remained in the field overnight, and thereby gave them time to dig themselves in the soil without drying out. If a worm failed to dig itself in completely within three days, it was replaced by another one.

3.5 Grass analysis

The grass was pre-harvested three times before the start of the experiments and harvested approximately every 3 to 4 weeks after (depending on weather conditions and regrowth). It was cut at 5 cm above the soil surface. The dry biomass of pre-harvests was used to calculate the concentration of the first fertilizer and helped detect a block effect, supporting the frequent complete randomization of the columns in the greenhouse. The biomass was weighted fresh and dry (48h at 70°C) each time. Additional measurements were conducted at the beginning and the end of each growing season. These included analysis of the N and P content of the shoots and colonisation of grass roots by AMF. To determine the N and P content of grass shoots, the dry material was grinded and then digested with a mixture of hydrogen peroxide, sulfuric and salicylic acid with selenium as a catalyst (Houba *et al.*, 1997). Subsequently, nutrient concentrations in the digestate were measured with a Segmented Flow Analysis (SFA). To assess the percentage of AMF colonisation of roots, two soil cores with a diameter of 1.5 cm and a depth of 10 cm were sampled from each column and roots were carefully separated from the soil. They were cleaned with tap water and subsequently stained with the ink and vinegar method (Vierheilig *et al.*, 1998). The standard magnified intersections method (McGonigle *et al.*, 1990) was used to determine the percentage of AMF colonisation. Because this measurement was time consuming, only three repetitions of monoculture and all-species.

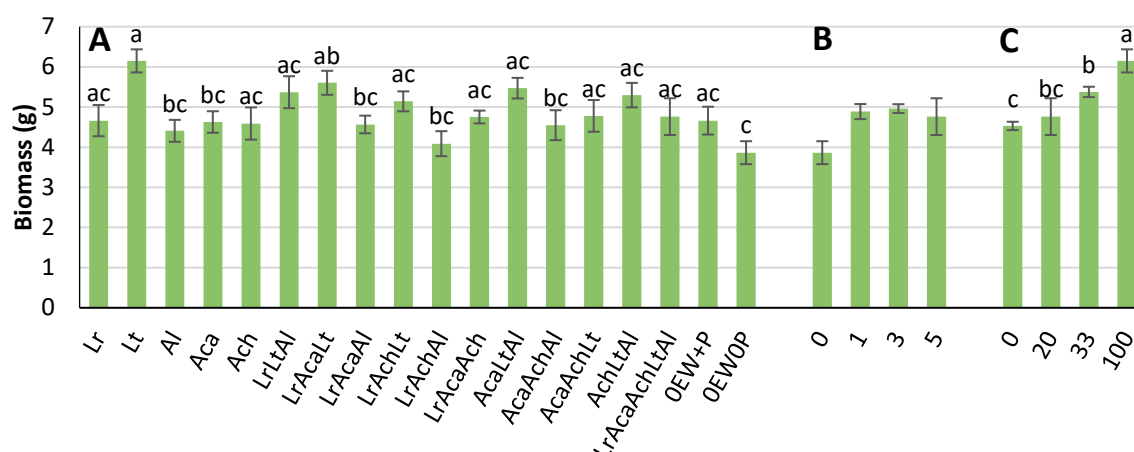


Figure 5: Average biomass of dry grass per column. A: according to the different treatments (ANOVA, $p = 0.0000208$); B: according to earthworm diversity (ANOVA, $p = 0.142619$); C: according to Lt density (%) (ANOVA, $p = 0.0000000153$). If applicable, results of Tukey test are given in letters. Error bars represent standard error. Lr: *L. rubellus*, Lt: *L. terrestris*, Al: *A. longa*, Aca: *A. caliginosa* and Ach: *A. chlorotica*.

Table 4: Average shoot nutrient content and root colonization. Standard error is given in brackets. If applicable, results of Tukey test are given in letters. Lr: *L. rubellus*, Lt: *L. terrestris*, Al: *A. longa*, Aca: *A. caliginosa* and Ach: *A. chlorotica*.

Treatments	N content (g P.kg ⁻¹)	P content (g P.kg ⁻¹)	AMF colonization (%)
Lr	42.66 (0.59) bc	2.28 (0.06) b	49.7 (6.1)
Lt	48.30 (1.08) a	2.14 (0.06) b	47.7 (11.8)
Al	41.14 (1.04) bc	2.34 (0.05) b	28.0 (4.7)
Aca	43.15 (2.06) ac	2.31 (0.07) b	45.0 (4.7)
Ach	43.28 (1.33) ac	2.30 (0.03) b	43.7 (3.6)
LrLtAl	43.15 (0.96) ac	2.19 (0.06) b	- -
LrAcaLt	45.12 (0.60) ac	2.25 (0.06) b	- -
LrAcaAl	42.69 (1.17) bc	2.30 (0.09) b	- -
LrAchLt	46.39 (1.18) ab	2.35 (0.09) b	- -
LrAchAl	44.92 (0.67) ac	2.30 (0.07) b	- -
LrAcaAch	41.37 (1.81) bc	2.33 (0.06) b	- -
AcaLtAl	47.32 (0.57) ab	2.36 (0.09) b	- -
AcaAchAl	42.36 (0.91) bc	2.12 (0.06) b	- -
AcaAchLt	48.44 (1.33) a	2.21 (0.10) b	- -
AchLtAl	45.63 (1.00) ac	2.22 (0.07) b	- -
LrAcaAchLtAl	43.04 (0.88) ac	2.23 (0.08) b	41.7 (2.2)
OEW0P	41.66 (0.49) bc	2.35 (0.11) b	- -
OEW+P	40.18 (1.14) c	3.51 (0.21) a	- -
<i>p</i> of ANOVA	0.000000598	5.41e-15	0.527

treatments were assessed in a first instance. The holes that were created by taken the soil cores were refilled with moist irradiated soil

After the last growing season, the root analysis will also include digestion of the roots to determine their N and P content. A subsample of the roots will be scanned and the resulting picture will be processed with the software WinRhizo (Regent Instruments Inc.) for root morphology. The dry root biomass from the main sample and the “morphology” subsample will be weighted (48h at 70°C).

3.6 Soil analysis

The soil was analysed at the first and last harvest of each growing season, using the two same cores as for the AMF colonization measurement. Phosphorus pools and DOC should be measured on fresh soil to avoid any over-estimation related to drying and rewetting of the soil (Koopmans *et al.*, 2006; Koopmans and Groenenberg, 2011). Subsamples were dried at 40°C for 24h just after the sampling, while the rest of the soil samples were kept in airtight bags at 4°C. Drying a subsample allowed us to determine the water content at 40°C of each column. The extraction was done using ultra-pure water (UPW), as a proxy of the soil solution (Torrent and Delgado, 2001; Koopmans *et al.* 2006), with a ratio of 1:10 (w:v). The solutions were shaken horizontally for 24h at 75 strokes/min. Subsequently, the extracts were centrifugated at 3750 rpm for 10 min and the supernatants were filtered through a 0.45 µm filter (NC45, Whatman). Subsamples were prepared for analyses by pooling equal amounts of all the same treatments of the five different blocks together. DOC was measured by persulphate and tetraborate oxidation under ultraviolet (UV) light and infrared detection with an SFA. Total Dissolved Phosphorus (TDP) was measured using a High Resolution - Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (HR-ICP-MS). Ortho-P was transformed in a phosphomolybdenum blue complex and measured using an SFA. Electrical Conductivity (EC), pH and the absorbance at 254 nm were measured in this order in the rest of the 90 samples. Ionic Strength (IS) was deduced from EC as:

$$IS = 0.0127 \times EC$$

with IS in mol.L⁻¹ and EC in dS.m⁻² (Griffin and Jurinak, 1973). Aromaticity was deduced from DOC and the absorbance at 254 nm as:

$$Aromaticity = 6.25 \times (100 \times \frac{Abs_{254}}{DOC}) + 3.63$$

With aromaticity being expressed as a % and DOC in mg.L⁻¹ (Weishaar *et al.*, 2003).

Phosphatase activity was assessed later on moist soil that had been stored in sealed bags at 4 °C. Those results are not reported here.

3.7 Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the software R (version 3.4.2) and the packages stats (version 3.4.2), multcomp (version 1.4-8) and FactoMineR (version 1.41).

Normality and homoscedasticity of a variable were assessed with Shapiro tests and Bartlett tests respectively. ANOVA was performed followed by a test to check the normality of the residuals. If the ANOVA was significant, Tukey post-hoc test was performed. If residuals from the ANOVA were not following normality, then a non-

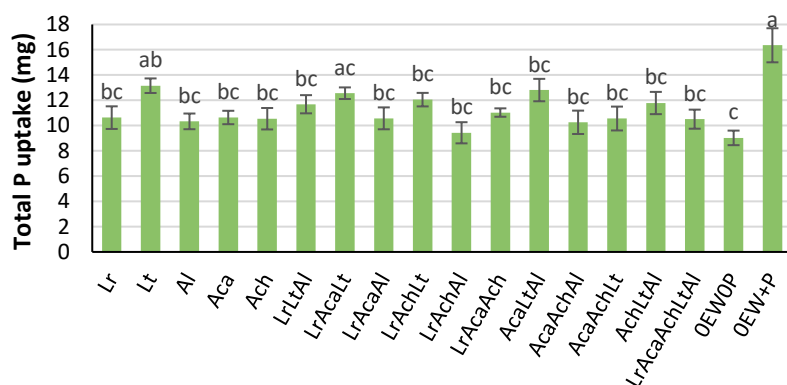


Figure 6: Average total P uptake per column according to the different treatments. ANOVA, $p = 0.00000232$; results of Tukey test are given in letters. Error bars represent standard error. Lr: *L. rubellus*, Lt: *L. terrestris*, Al: *A. longa*, Aca: *A. caliginosa* and Ach: *A. chlorotica*.

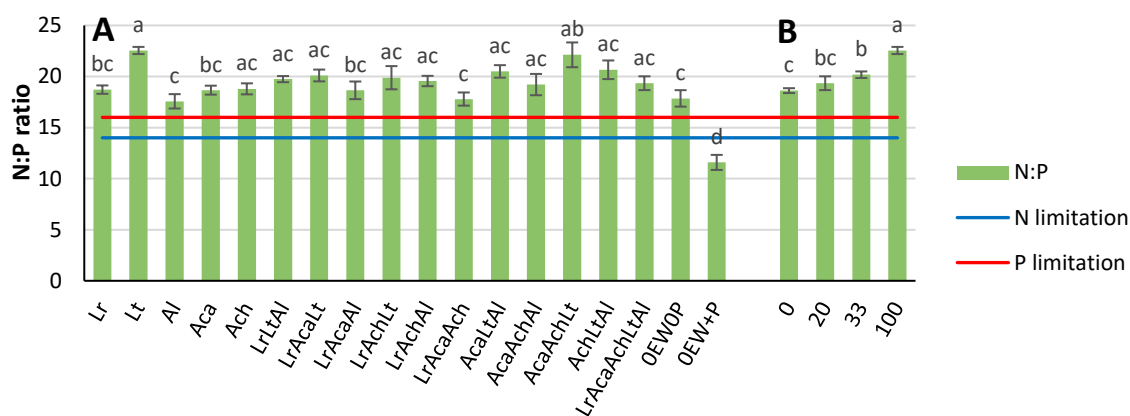


Figure 7: Average N:P ratio and range of P and N limitation according to (Koerselman and Meuleman, 1996). A: according to the different treatments (ANOVA, $p = 1.2e-12$); B: according to Lt density (%) (ANOVA, $p = 0.0000000218$). Results of Tukey test are given in letters. Error bars represent standard error. Lr: *L. rubellus*, Lt: *L. terrestris*, Al: *A. longa*, Aca: *A. caliginosa* and Ach: *A. chlorotica*.

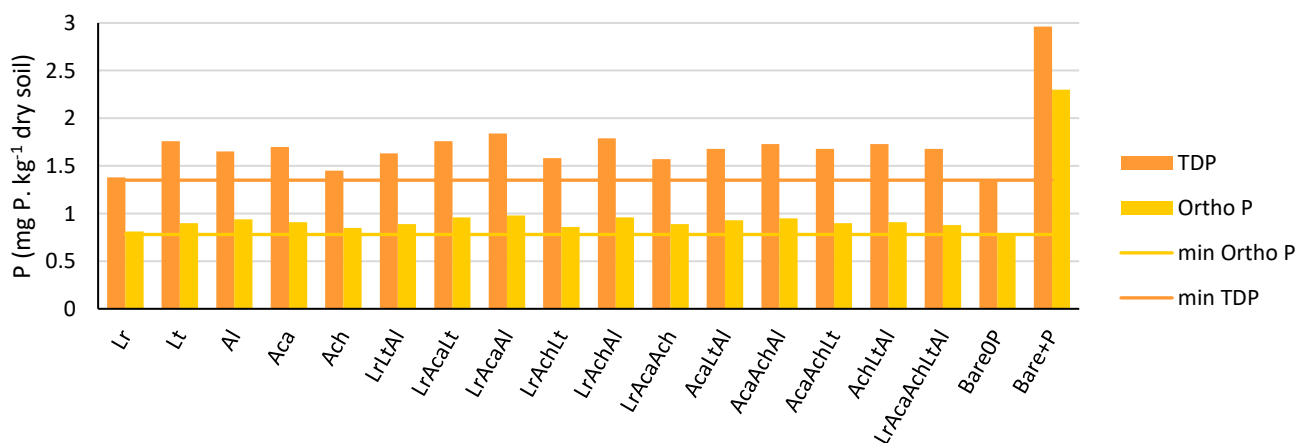


Figure 8: Total Dissolved P (TDP) and Ortho-P. The measurement was conducted in a pooled sample of the extracts of all five replicates of one treatment. Lr: *L. rubellus*, Lt: *L. terrestris*, Al: *A. longa*, Aca: *A. caliginosa* and Ach: *A. chlorotica*.

parametric test was performed (Kruskal-Wallis). If not specified in the text, p-values are given for ANOVA.

4 Results

4.1 Plant analyses

Figure 5a summarizes biomass for the first harvest. In the absence of P fertilization, Lt presence as well as the combination Lr, Aca and Lt showed a significantly ($p = 0.0000208$) higher biomass production than columns without earthworms. The maximum production occurred in the Lt columns with an average of 6.15 g of dry grass per column. The minimum production occurred in the earthworm-free columns with an average 3.86 g of dry grass per column. There was no significant earthworm richness effect ($p = 0.142619$) (Fig. 5b) but the earthworm-free columns had a lower biomass production than the average of all the monocultures, all three species combinations and the all-species combination respectively. One species stood out: a high Lt density was associated with a high biomass production. The effect decreased with decreasing density of Lt but stable density of earthworms (fig 5c).

Table 4 show the P and N concentration in shoot. The P concentration of the shoots was the same for all columns housing earthworms as well as the earthworm-free columns. The grass contained on average 2.27 g P.kg⁻¹ of dry grass for these treatments. Only the P fertilized columns were significantly ($p = 5.41e-15$) different from the others with on average 3.51 g P.kg⁻¹ of dry grass. This is the P concentration value Dutch farmers aim for (Schie-Rameijer *et al.*, 2017). However, shoot biomass production was different between treatments, including within earthworm treatments. This resulted in different total P uptake by *L. perenne* for different treatments (Figure 6). The P fertilized columns had absorbed 16.35 mg of P on average and even though this was the highest P uptake of all the treatments, columns housing only Lt and Lr, Aca and Lt in combination were significantly ($p = 0.00000232$) not in different ranges of total P uptake. Earthworm-free columns had on average the lowest P uptake with 9.03 mg of P taken up per column.

The concentration of N in the shoot (Table 4) was significantly ($p = 0.000000598$) higher compared to the P fertilized treatment for columns housing only Lt, a combination of Lr, Ach and Lt, the combination of Aca, Lt and Al as well as Aca, Ach and Lt in combination. P fertilized treatment showed the smallest average shoot N content with 40.18 g N.kg⁻¹ of dry grass.

The N:P ratio is presented in Figure 7. It shows a P limitation for all earthworm treatments as well as the earthworm-free treatment. The P fertilized treatment was N-limited. Here again, an effect of Lt density was observed: the higher the Lt density under constant earthworm density, the higher the N:P ratio.

AMF colonization is showed on Table 4. It was significantly ($p = 0.527$) not different for all assessed treatments. Roots of *L. perenne* were colonized by AMF with a variable rate in the columns housing single species of earthworm. Even if it was not significant, Al showed a relatively low colonization in comparison to other treatments with an average of 28%.

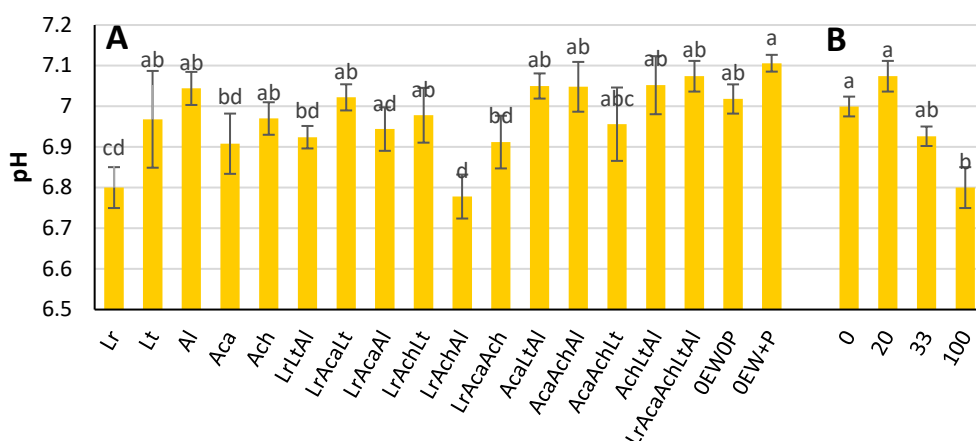


Figure 9: Average of pH. A: according to the different treatments (ANOVA, $p = 0.0087$); B: according to Lr density (%) (ANOVA, $p = 0.00385$). If applicable, results of Tukey test are given in letters. Error bars represent standard error. Lr: *L. rubellus*, Lt: *L. terrestris*, Al: *A. longa*, Aca: *A. caliginosa* and Ach: *A. chlorotica*.

Table 5: Dissolved Organic C and average aromaticity and ionic strength. If applicable, standard error is given between brackets. For DOC, the measurement was conducted in a pooled sample of the extracts of all five replicates of one treatment Lr: *L. rubellus*, Lt: *L. terrestris*, Al: *A. longa*, Aca: *A. caliginosa* and Ach: *A. chlorotica*.

Treatments	DOC (mg C. kg ⁻¹ dry soil)	Aromaticity (% root length)	Ionic strength (mol.L ⁻¹)
Lr	103	35.58 (1.94)	0.26 (0.03)
Lt	120	37.88 (1.34)	0.39 (0.06)
Al	112	37.61 (1.63)	0.25 (0.01)
Aca	116	38.59 (2.77)	0.26 (0.02)
Ach	110	37.41 (1.22)	0.25 (0.01)
LrLtAl	115	38.23 (1.75)	0.29 (0.02)
LrAcaLt	120	38.50 (2.51)	0.25 (0.01)
LrAcaAl	127	37.95 (1.08)	0.23 (0.01)
LrAchLt	111	37.99 (1.22)	0.27 (0.02)
LrAchAl	117	39.11 (3.49)	0.24 (0.01)
LrAcaAch	116	37.04 (1.30)	0.23 (0.01)
AcaLtAl	119	37.60 (0.93)	0.29 (0.04)
AcaAchAl	121	37.80 (1.11)	0.27 (0.01)
AcaAchLt	118	38.14 (2.21)	0.28 (0.03)
AchLtAl	117	38.43 (0.56)	0.27 (0.02)
LrAcaAchLtAl	122	37.92 (1.54)	0.25 (0.01)
OEWOP	106	37.19 (0.92)	0.28 (0.02)
OEW+P	114	38.38 (1.10)	0.26 (0.02)
<i>p</i> of ANOVA	-	1	(Kruskal) 0.1956

The whole species combination showed the least variability with an average of 42% of colonization and a standard error of 2%.

4.2 Soil Analyses

Figure 8 shows TDP and orto-P for the different treatments. P fertilized columns had both the highest concentrations of TDP with 2.96 mg.kg^{-1} of dry soil and of ortho-P with 2.3 mg.kg^{-1} of dry soil. The lowest concentrations were observed in earthworm-free columns with values of 1.35 mg.kg^{-1} of soil (TDP) and 0.78 mg.kg^{-1} (ortho-P). All earthworm-housing columns were in the same range of TDP and ortho-P values with an average of 1.66 mg.kg^{-1} and 0.91 mg.kg^{-1} respectively.

pH for the different treatments is presented in Figure 9A. Soil pH of P fertilized columns was significantly ($p = 0.0087$) more basic than the pH of columns housing only Lr, only Aca, Lr, Lt and Al in combination, Lr, Aca and Al in combination as well as the combination of Lr, Aca and Ach. The density of Lr in earthworm-housing columns was of importance for the pH: the higher the density, the significantly ($p = 0.00385$) lower the soil pH was (Figure 9B).

DOC and aromaticity are presented in Table 5. All treatments lead to DOC concentrations ranging within 100 and 130 mg C.kg^{-1} of dry soil. The lowest concentration of DOC occurred in the columns housing only Lr with 103 mg C.kg^{-1} and the earthworm-free columns with 106 mg C.kg^{-1} . Aromaticity was significantly ($p = 1$) not different for all the different treatments of the experiments. It ranged from 37 to 40%, with exception of the monoculture of Lr (35.58%) (not significantly different).

Ionic strength (Table 5) of the water extracts of the soil was significantly (Kruskal, $p = 0.1956$) not different for all treatments. It ranged from 0.20 to 0.30 mol.L^{-1} and columns housing only Lt showed a higher (not significant) value of 0.39 mol.L^{-1} on average.

5 Discussion

5.1 Plant analyses

5.1.1 Shoot biomass

Shoot biomass was affected by earthworms. This effect was significant for two treatments but not for the others. The effect of earthworm is in accordance with previous studies but it was then mainly attributed to N supply (van Groenigen *et al.*, 2014). Here the N supply is not limiting, meaning that it should be explained by another parameter. It could be because of earthworm presence only (disturbing or feeding on roots) and because of earthworm effect on P availability. Those results were already found in greenhouse experiments under controlled conditions (Vos *et al.*, 2014; Ros *et al.*, 2017) but are unprecedented in the field as far as we know.

There was no diversity effect and that is an unexpected result. A high earthworm diversity effect would mean that traits of all five species were potentially complementary to each other (Dewi and Senge, 2015). This wasn't shown by our results, either because it is too early to notice such an effect, either because the interaction between species did not

allow it, meaning that the competition within species would result in one or several species not expressing their usual behaviour.

A remarkable result is the large effect that *Lt* exerts on biomass. The large effect of *Lt* could have two meanings: 1) *Lt* would be more effective at this density than mineral fertilization to increase shoot biomass or 2) some of the introduced earthworms died in the columns, resulting in fertilization of these columns with decomposing earthworm tissue. Option 1 seems possible as *Lt* has proven to be very active, both in the buckets before introduction to the field and in the columns after introduction (personal observation). *Lt* has also been proven to modify soil ortho-P through soil ingestion as ortho-P is higher in its casts than in bulk soil (Vos *et al.*, 2014). On the other hand, we are not certain that all earthworms introduced were still alive in the columns at the time of sampling, potentially leading to the second explanation. If we estimate the biomass of a *Lt* at 5 g, knowing that in this species the P content is 1590 mg P. kg⁻¹ of dry earthworm, that the N content is 105 g N/kg of dry earthworm and that *Lt* are composed of 83.6% of water (Finke, 2002); we can estimate that one *Lt* is composed of 1.3 mg of P and 86.1 mg of N. If all the earthworms had died in the columns housing 15 *Lt*, this would mean that 19.6 mg of P and 1.29 g of N would be available in the column for plant growth. This is the equivalent of the P fertilization applied on day 29 in our experiment as well as 6 times the N fertilization applied on day 29. Considering all the total P uptake, it is unlikely that all earthworms of the *Lt* monoculture treatment had died because the total P uptake would be higher, even though it is significantly not in different ranges as the P fertilized columns. The only way to know if the effect comes from the *Lt* activity or their death without disturbing the column, is to wait for the results of the next harvest. If the observed increased biomass is due to their activity, then the effect should be maintained. If it is due to their decomposition, then this effect should be absent as earthworm decomposition rate is very quick. An experiment by Whalen *et al.* (1999) showed that 71% of the N of a decomposing earthworm tissue was incorporated in plant biomass after 16 days. Yet, we can't exclude that both justifications are correct. It is likely that some *Lt* died because several had to be replaced during their introduction due to their incapacity to burrow themselves.

5.1.2 Shoot nutrients

Koerselman and Meuleman (1996) have shown that grass growth was limited by N availability when the N:P ratio was under 14 and that it was P limited when the N:P ratio was above 16. The P fertilized treatment showed no P limitation, showing that the setup of our experiment was successful. This result is also supported by the fact that treatments receiving P fertilization showed highest total P uptake and the highest P content of the shoots in the experiment. This would support the idea of a luxury consumption of P by plants because aboveground biomass was not elevated in this treatment. However, the P fertilized columns were N limited and showed the smallest shoot N content of the experiment. That explains why the shoot biomass was significantly lower than from some earthworm treatments

All the other treatments were P limited. The global P limitation for earthworm treatments is in line with the global trend for all the earthworm treatments: all of them had on average a higher N:P ratio than the earthworm-free treatment, even though it was not always significant. Columns housing only Lt as well as Aca, Ach and Lt in combination had an especially important P limitation as independently of soil supply, plants tend to stay in the range around 15:1 (Shaver and Melillo, 1984). This mean that these treatments were especially efficient in providing N for plant growth but less efficient for P.

The Lt density effect was also observable on the N:P ratio. All unfertilized treatments had higher N contents than the P fertilized treatment, even though it was not always significant. This could be linked with their P limitation: plant strategies to acquire P as extension of root network and improved symbiosis with AMF lead to a higher N acquisition as well. This was developed as an optimized fertilization strategy by Shen *et al* (2013).

5.1.3 AMF colonization

The absence of significant differences needs to be interpreted carefully because of two facts. First, the measurement was not complete: only three replicates of the monoculture treatments and the all-species treatment were assessed. Furthermore, the measurement was done not so long after the start of the experiment (on day 28), so it could have been too early for an AMF effect to develop. Still, al monoculture showed the lower average colonization. Al has been proven to have a lower cast production, a lower total burrow length and a lower burrow continuity than Aca in the same condition (Schrader, 1993). This could mean that Al is spreading less spore of AMF in the column than Aca, leading to a lower colonization. Similar results were found in studies looking at AMF colonization in *L. perenne* roots but without any N fertilization (Atkinson *et al.*, 2005; Allsopp, 1998; Grimoldi *et al.*, 2005), while N fertilization is known to reduce the colonization (Gryndler *et al.*, 2006). Considering this, earthworms might have an effect on AMF colonization but a more complete measurement is needed, including the earthworm-free treatment.

5.2 Soil analyses

5.2.1 P in soil

The P fertilized treatment had the highest TDP and ortho-P concentrations. This is in agreement with the results observed for plant biomass and nutrient analyses. It supports even more that the P fertilization was appropriate in this experiment. The minimum TDP and ortho-P were measured for the earthworm-free treatment, which supports a potential earthworm effect in the future as earthworm treatments had higher values. Monocultures of Lr and Ach both have low TDP and ortho-P concentrations, comparable to the earthworm-free treatment. Those two species are living in the first centimeters of the soil while the other species exploit the soil depth more (Sims and Gerard, 1985; personal observations). Because the sampling method used a core of 10 cm depth, any potential effect of these two species on soil might be diluted by the unexplored bulk soil.

5.2.2 PH

Significant differences in pH between treatments are difficult to interpret at this stage because the pH of all treatments ranged very close to the one of bulk soil. The idea of the percentage of soil truly affected by earthworms in the soil core analyzed also applies here

but the differences observed might as well be due to an artefact of the procedure of measurement.

5.2.3 Carbon

In this study, all earthworm treatments had elevated DOC concentrations compared to the earthworm-free treatment except for the monoculture of Lr. The elevated DOC for most of the earthworm treatment is in line with the results of the other measurements in the soil: we could expect an earthworm effect in the future. Earthworm activity has already been shown to increase DOC concentrations (Wen *et al.*, 2004). Results for monoculture of Lr are probably diluted in the bulk soil.

Aromaticity of DOC in columns housing only Lr was on average the lowest though the differences were not significant. Lr monoculture had a slightly more easily degradable OM.

5.2.4 Ionic strength

Considering the ionic strength of the water extracts of the soil, there was no significant difference between treatments. However, columns housing Lt only had a higher ionic strength than all the other treatments. Ionic strength in casts of this species is of 2.5 mol.L⁻¹ and other species range between 1.5 and 5.5 mol.L⁻¹ (Vos *et al.*, in preparation). The 15 Lt have probably influenced more than the other earthworms the soil of their columns because of their size and their activity. In future, measurements the ionic strength of all earthworm treatments might be higher for soil of the earthworm treatments considering that earthworms will probably have affected a more important volume of soil.

6 Conclusion

6.1 Summary

The setup of this experiment was successful: most of the earthworms survived, the soil TDP and ortho-P were consistent with our expectations and all earthworm treatments as well as the earthworm-free treatment had a P-limited plant growth. After only 26 days of experiment, two of the 16 earthworm treatments (monoculture of Lt and Lr, Aca, Lt in combination) significantly increase the shoot biomass of *L. perenne* (H1) as well as its total P uptake (H2). The presence of Lt resulted in an especially high biomass production but the future results still need to confirm this species effect. No earthworm diversity effect was found and no difference of AMF colonization was found between the evaluated earthworm treatments (H6).

6.2 Outlook

With more time, earthworms will explore a larger volume of soil, leading to a potential increase of their effect on soil properties as TDP, ortho-P (H3), DOC (H5) and ionic strength. A more comprehensible pH effect might occur as well (H4). The earthworm effect on shoot biomass is expected to become more significant with time and if this occurs, we might be able to detect a diversity or an earthworm species effect. Because of the N fertilization, the columns housing earthworms as well as the earthworm-free columns should always have a P-limited plant growth. If there was an effect that was not detected on AMF colonization in this study, it might be detected in the future as P

limitation might increase in the P unfertilized treatments, leading to potentially sharper differences. Those results could imply that an alternative to the mineral fertilizer is possible in the form of a better inclusion of earthworms in agrosystems.

6.3 Recommendations

Future results will need to be analyzed carefully keeping in mind the possibility that some earthworms, especially *Lt*, might have died at the beginning of the experiment. If the results follow the same trends as they do here, it would mean that no major loss of earthworms occurred. Following the same idea, an assessment of earthworm survival in the columns could be made, using a non-invasive method to ensure that the results observed are really resulting from earthworm activity. Some species might also be more active than other, especially in exploring the soil of the column. Volumes of soil ingested and impacted by earthworm will have to be measured (or at least estimated). This would allow the soil analyses to be interpreted according to the amount of soil truly (or theoretically) influenced by earthworms and by the amount of real bulk soil.

The P fertilized treatment might require a higher N fertilization. At the moment, *L. perenne* is storing a large amount of P. A higher N fertilization would allow a better use of this P and thus express more the potential of this fertilization.

AMF colonization measurements need to be performed again at the end of the experiment, in a more complete way: that is with 5 replicates per treatments and including more treatments than analyzed in this study. Earthworm-free treatments would especially need to be included.

7 References

ADHIKARI, K. and HARTEMINK, A. E., 2016. Linking soils to ecosystem services — A global review. *Geoderma*. Vol. 262, pp. 101-111. DOI 10.1016/j.geoderma.2015.08.009.

ALLSOPP, N., 1998. Effect of defoliation on the arbuscular mycorrhizas of three perennial pasture and rangeland grasses. *Plant and Soil (Netherlands)* [online]. [Consulted the 7th June 2018]. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=NL1998006476>

ATKINSON, P. W., FULLER, R. J., VICKERY, J. A., CONWAY, G. J., TALLOWIN, J. R. B., SMITH, R. E. N., HAYSOM, K. A., INGS, T. C., ASTERAKI, E. J. and BROWN, V. K., 2005. Influence of agricultural management, sward structure and food resources on grassland field use by birds in lowland England. *Journal of Applied Ecology*. Vol. 42, n° 5, pp. 932-942. DOI 10.1111/j.1365-2664.2005.01070.x.

BAROIS, I. and LAVELLE, P., 1986. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (glossoscolecidae, oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 18, n° 5, pp. 539-541. DOI 10.1016/0038-0717(86)90012-X.

BLOUIN, M., HODSON, M. E., DELGADO, E. A., BAKER, G., BRUSSAARD, L., BUTT, K. R., DAI, J., DENDOOVEN, L., PERES, G., TONDOH, J. E., CLUZEAU, D. and BRUN, J.-J., 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*. Vol. 64, n° 2, pp. 161-182. DOI 10.1111/ejss.12025.

BOUCHÉ, M. B., 1977. Strategies lombriciennes. *Ecological Bulletins*. 1977. N° 25, pp. 122-132.

BRIONES, M. J. I. and PIEARCE, T. G., 2011. Comparative Anatomy of the Calciferous Gland of Lumbricid Earthworms. In : *Biology of Earthworms* [online]. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 51-67. Soil Biology. [Consulted the 13th June 2018]. ISBN 978-3-642-14635-0. Available at: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-14636-7_4

BÜNEMANN, E. K., BONGIORNO, G., BAI, Z., CREAMER, R. E., DE DEYN, G., DE GOEDE, Ron, FLESKENS, L., GEISSEN, V., KUYPER, T. W., MÄDER, P., PULLEMAN, M., SUKKE, W., VAN GROENIGEN, J.W. and BRUSSAARD, L., 2018. Soil quality – A critical review. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 120, pp. 105-125. DOI 10.1016/j.soilbio.2018.01.030.

BUTUSOV, M. et JERNELÖV, A., 2013. The Politics of P. In : *Phosphorus* [online]. Springer, New York, NY. pp. 69-80. SpringerBriefs in Environmental Science. [Consulted the 18th janvier 2018]. ISBN 978-1-4614-6802-8. Available at: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-6803-5_8

CAMBARDELLA, C. A., 2005. CARBON CYCLE IN SOILS | Formation and Decomposition. In : *Encyclopedia of Soils in the Environment* [online]. Oxford : Elsevier. pp. 170-175. [Consulted the 21st February 2018]. ISBN 978-0-12-348530-4. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123485304009322>

CHAUDHURI, P. S., PAL, T. K., NATH, S. and DEY, S. K., 2012. Effects of five earthworm species on some physico-chemical properties of soil. *Journal of Environmental Biology*. Vol. 33, n° 4, pp. 713-716.

CORDELL, D., DRANGERT, J.-O. and WHITE, S., 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*. Vol. 19, n° 2, pp. 292-305. DOI 10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009.

DARWIN, C., 1881. *The Formation of Vegetable Mould Through the Action of Worms*. London : John Murray. ISBN 978-1-5350-3204-9.

DAWSON, C.J. and HILTON, J., 2011. *Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus*.

DEWI, W. S. and SENGE, M., 2015. Earthworm diversity and ecosystem services under threat. *Reviews in Agricultural Science*. Vol. 3, n° 0, pp. 25-35. DOI 10.7831/ras.3.25-35.

DORAN, J. W. and PARKIN, T. B., 1994. Defining and Assessing Soil Quality. *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Special publication, pp. 1-21. DOI 10.2136/sssaspecpub35.c1.

EIVAZI, F. and TABATABAI, M. A., 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 9, n° 3, pp. 167-172. DOI 10.1016/0038-0717(77)90070-0.

FAGERIA, N. K., HE, Z. and BALIGAR, V. C., 2017. *Phosphorus management in crop production* [online]. Boca Raton, FL, flu: CRC Press. [Consulted the 8th January 2018]. ISBN 978-1-4987-0587-5. Available at: [http://library.wur.nl/WebQuery/primo/directlink/2220047Collection: Library Catalogue](http://library.wur.nl/WebQuery/primo/directlink/2220047Collection:LibraryCatalogue)

FAO, 2015. *Soils are the Foundation for Vegetation which is cultivated or managed for feed, fibre, fuel and medicinal products* [online]. Rome : FAO. [Consulted the 5th February 2018]. Available at: www.fao.org/3/a-i4666e.pdf

FILIPPELLI, G., 2002. *The Global Phosphorus Cycle*.

FINKE, M. D., 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology*. Vol. 21, n° 3, pp. 269-285. DOI 10.1002/zoo.10031.

GRIFFIN, B. A. and JURINAK, J. J., 1973. Estimation of activity coefficients from the electrical conductivity of natural aquatic systems and soil extracts. *Soil Science*. Vol. 116, n° 1, pp. 26.

GRIMOLDI, A. A., KAVANOVÁ, M., LATTANZI, F. A. and SCHNYDER, H., 2005. Phosphorus nutrition-mediated effects of arbuscular mycorrhiza on leaf morphology and carbon allocation in perennial ryegrass. *New Phytologist*. Vol. 168, n° 2, pp. 435-444. DOI 10.1111/j.1469-8137.2005.01500.x.

- GRYNDLER, M., LARSEN, J., HRŠELOVÁ, H., ŘEZÁČOVÁ, V., GRYNDLEROVÁ, H. and KUBÁT, J., 2006. Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza*. Vol. 16, n° 3, pp. 159-166. DOI 10.1007/s00572-005-0027-4.
- GUPPY, C. N., MENZIES, N. W., MOODY, P. W. and BLAMEY, F. P. C., 2005. Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: a review. *Soil Research*. Vol. 43, n° 2, pp. 189-202. DOI 10.1071/SR04049.
- HART, M. R., QUIN, B. F. and NGUYEN, M. L., 2004. Phosphorus Runoff from Agricultural Land and Direct Fertilizer Effects. *Journal of Environmental Quality*. Vol. 33, n° 6, pp. 1954-1972. DOI 10.2134/jeq2004.1954.
- HAYNES, R. J., 2005. Labile Organic Matter Fractions as Central Components of the Quality of Agricultural Soils: An Overview. In : *Advances in Agronomy* [online]. Academic Press. pp. 221-268. [Consulted the 21th february 2018]. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211304850053>
- HEFFER, P., 2006. *Phosphorus Fertilisation: Issues and Outlook: Paper Presented to the International Fertiliser Society at a Conference in Cambridge, on 14th Dec. 2006*. International Fertiliser Society. ISBN 978-0-85310-223-6. Google-Books-ID: pr3gAgAACAAJ
- HINSINGER, P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*. Vol. 237, n° 2, pp. 173-195. DOI 10.1023/A:1013351617532.
- HODGE, A., 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist*. Vol. 162, n° 1, pp. 9-24. DOI 10.1111/j.1469-8137.2004.01015.x.
- JÉGOU, D., CAPOWIEZ, Y. and CLUZEAU, D., 2001. Interactions between earthworm species in artificial soil cores assessed through the 3D reconstruction of the burrow systems. *Geoderma*. Vol. 102, n° 1, pp. 123-137. DOI 10.1016/S0016-7061(00)00107-5.
- JONES, C. G., LAWTON, J. H. and SHACHAK, M., 1994. Organisms as Ecosystem Engineers. In : SAMSON, Fred B. et KNOFF, Fritz L., *Ecosystem Management* [online]. New York, NY : Springer New York. pp. 130-147. [Consulted the 3rd July 2016]. ISBN 978-0-387-94667-2. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4612-4018-1_14
- KARATHANASIS, A. D., 2006. Soil mineralogy. *Land Use and Land Cover, from Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK*, [<http://www.eolss.net>].
- KOERSELMAN, W. and MEULEMAN, A. F. M., 1996. The Vegetation N:P Ratio: a New Tool to Detect the Nature of Nutrient Limitation. *Journal of Applied Ecology*. Vol. 33, n° 6, pp. 1441-1450. DOI 10.2307/2404783.

KOOPMANS, G. F., CHARDON, W. J., DEKKER, P. H. M., RÖMKENS, P. F. a. M. and SCHOUMANS, O. F., 2006. Comparing different extraction methods for estimating phosphorus solubility in various soil types. *Soil Science*. Vol. 171, n° 2, pp. 103. DOI 10.1097/01.ss.0000187361.00600.d6.

LAVELLE, P., BIGNELL, D., LEPAGE, M., WOLTERS, V., ROGER, P., INESON, P., HEAL, O. W. and DHILLION, S., 1997. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal of Soil Biology (France)* [online]. [Consulted the 8th July 2016]. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR1999003405>

LE BAYON, R. C. and BINET, F., 2006. Earthworms change the distribution and availability of phosphorous in organic substrates. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 38, n° 2, pp. 235-246. DOI 10.1016/j.soilbio.2005.05.013.

LE BAYON, R.C. and KOHLER-MILLERET, R., 2009. Effects of Earthworms on Phosphorus Dynamics – A Review. *Dyn Soil Dyn Plant*. Vol. 3.

LI, H., XIANG, D., WANG, C., LI, X. and LOU, Y., 2012. Effects of epigeic earthworm *Eisenia fetida* and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on enzyme activities of a sterilized soil–sand mixture and nutrient uptake by maize. *Biology and Fertility of Soils*. Vol. 48, n° 8, pp. 879-887. DOI 10.1007/s00374-012-0679-0.

LIU, W., ZHANG, Y., JIANG, S., DENG, Y., CHRISTIE, P., MURRAY, P. J., LI, X. and ZHANG, J., 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi in soil and roots respond differently to phosphorus inputs in an intensively managed calcareous agricultural soil. *Scientific Reports*. Vol. 6, pp. 24902. DOI 10.1038/srep24902.

LYNCH, J., 1995. Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology*. Vol. 109, n° 1, pp. 7-13.

MARSCHNER, H. and MARSCHNER, P. (éd.), 2012. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. London ; Waltham, MA : Elsevier/Academic Press. ISBN 978-0-12-384905-2. SB91 .M37 2012

MCGONIGLE, T. P., MILLER, M. H., EVANS, D. G., FAIRCHILD, G. L. and SWAN, J. A., 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. Vol. 115, n° 3, pp. 495-501. DOI 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x.

MILLERET, R., LE BAYON, R.-C. and GOBAT, J.-M., 2009. Root, mycorrhiza and earthworm interactions: their effects on soil structuring processes, plant and soil nutrient concentration and plant biomass. *Plant and Soil*. Vol. 316, n° 1-2, pp. 1-12. DOI 10.1007/s11104-008-9753-7.

NIXON, S. W., 1995. Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia*. Vol. 41, n° 1, pp. 199-219. DOI 10.1080/00785236.1995.10422044.

- PÉRET, B., DESNOS, T., JOST, R., KANNO, S., BERKOWITZ, O. and NUSSAUME, L., 2014. Root Architecture Responses: In Search of Phosphate. *Plant Physiology*. Vol. 166, n° 4, pp. 1713-1723. DOI 10.1104/pp.114.244541.
- POSTMA-BLAAUW, M. B., BLOEM, J., FABER, J. H., VAN GROENIGEN, J. W., DE GOEDE, R. G. M. and BRUSSAARD, L., 2006. Earthworm species composition affects the soil bacterial community and net nitrogen mineralization. *Pedobiologia*. Vol. 50, n° 3, pp. 243-256. DOI 10.1016/j.pedobi.2006.02.001.
- RÄTY, M. and HUHTA, V., 2003. Earthworms and pH affect communities of nematodes and enchytraeids in forest soil. *Biology and Fertility of Soils*. Vol. 38, n° 1, pp. 52-58. DOI 10.1007/s00374-003-0614-5.
- REDDELL, P. and SPAIN, A. V., 1991. Earthworms as vectors of viable propagules of mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 23, n° 8, pp. 767-774. DOI 10.1016/0038-0717(91)90147-C.
- REIJNEVELD, J. A., EHLERT, P. A. L., TERMORSHUIZEN, A. J. and OENEMA, O., 2010. Changes in the soil phosphorus status of agricultural land in the Netherlands during the 20th century. *Soil Use and Management*. Vol. 26, n° 4, pp. 399-411. DOI 10.1111/j.1475-2743.2010.00290.x.
- REUTER, D. J. and ROBINSON, J. B. (éd.), 1997. *Plant analysis: an interpretation manual*. 2nd ed. Collingwood, Australia : CSIRO Publ. ISBN 978-0-643-05938-2.
- ROS, M. B. H., HIEMSTRA, T., VAN GROENIGEN, J. W., CHAREESRI, A. and KOOPMANS, G. F., 2017. Exploring the pathways of earthworm-induced phosphorus availability. *Geoderma*. Vol. 303, pp. 99-109. DOI 10.1016/j.geoderma.2017.05.012.
- SATCHELL, J. E. and MARTIN, K., 1984. Phosphatase activity in earthworm faeces. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 16, n° 2, pp. 191-194. DOI 10.1016/0038-0717(84)90111-1.
- SCHOUMANS, O. F., 2015. *Phosphorus leaching from soils: process description, risk assessment and mitigation*. Alterra Wageningen UR. 46.
- SCHRADER, S., 1993. Semi-automatic image analysis of earthworm activity in 2D soil sections. *Geoderma*. Vol. 56, n° 1, pp. 257-264. DOI 10.1016/0016-7061(93)90115-2.
- SHAVER, Gaius R. and MELILLO, Jerry M., 1984. Nutrient Budgets of Marsh Plants: Efficiency Concepts and Relation to Availability. *Ecology*. Vol. 65, n° 5, pp. 1491-1510. DOI 10.2307/1939129.
- SHEN, Jianbo, LI, Chunjian, MI, Guohua, LI, Long, YUAN, Lixing, JIANG, Rongfeng and ZHANG, Fusuo, 2013. Maximizing root/rhizosphere efficiency to improve crop productivity and nutrient use efficiency in intensive agriculture of China. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 64, n° 5, pp. 1181-1192. DOI 10.1093/jxb/ers342.

SHEN, J., YUAN, L., ZHANG, J., LI, H., BAI, Z., CHEN, X., ZHANG, W. and ZHANG, F., 2011. Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology*. Vol. 156, n° 3, pp. 997-1005. DOI 10.1104/pp.111.175232.

SIMS, R. W. and GERARD, B. M., 1985. *Earthworms: Keys and Notes for the Identification and Study of the Species*. Brill Archive. ISBN 978-90-04-07582-5. Google-Books-ID: rwsVAAAAIAAJ

SMIT, A L, BINDRABAN, P S, SCHRÖDER, J J and CONIJN, J G, 2009. Phosphorus in agriculture: global resources, trends and developments. pp. 41.

SPRINGETT, J. A. and SYERS, J. K., 1984. Effect of pH and calcium content of soil on earthworm cast production in the laboratory. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 16, n° 2, pp. 185-189. DOI 10.1016/0038-0717(84)90110-X.

TARAFDAR, J. C. and CLAASSEN, N., 1988. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*. Vol. 5, n° 4, pp. 308–312.

TORRENT, J. and DELGADO, A., 2001. Using Phosphorus Concentration in the Soil Solution to Predict Phosphorus Desorption to Water. *Journal of Environmental Quality*. Vol. 30, n° 5, pp. 1829-1835. DOI 10.2134/jeq2001.3051829x.

UVAROV, A. V., 2009. Inter- and intraspecific interactions in lumbricid earthworms: Their role for earthworm performance and ecosystem functioning. *Pedobiologia*. Vol. 53, n° 1, pp. 1-27. DOI 10.1016/j.pedobi.2009.05.001.

VAN GROENIGEN, J. W., 2015. *SUPPER: Stimulating Uptake of Phosphorus in Pastures through Earthworms*. ALW Open Programme Proposal form. Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek.

VAN GROENIGEN, J. W., LUBBERS, I. M., VOS, H. M. J., BROWN, G. G., DEYN, G. B. De and VAN GROENIGEN, K. J., 2014. Earthworms increase plant production: a meta-analysis. *Scientific Reports*. Vol. 4, pp. 6365. DOI 10.1038/srep06365.

VAN SCHIE-RAMEIJER, I., VAN MIDDELKOOP, J.C., PHILIPSEN, A.P., VAN DONGEN, C., BUSSINK, D.W., BOS, A.J., VELTHOF, G.L., DE HAAN, J., SCHRÖDER, J.J., REIJNEVELD, J.A. and VAN EEKEREN, N., 2017. *Bemestingsadvies* [online]. Commissie Bemesting Grasland en Voedergewassen. [Consulted the 13th June 2018]. Available at: <http://edepot.wur.nl/413891>

VIERHEILIG, H., COUGHLAN, A. P., WYSS, U. and PICHÉ, Y., 1998. Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 64, n° 12, pp. 5004-5007.

VON LIEBIG, J. F. and PLAYFAIR, L. P. B., 1843. *Chemistry in Its Application to Agriculture and Physiology*. J.M. Campbell. Google-Books-ID: ccE1AQAAIAAJ

VOS, H. M. J., ROS, M. B. H., KOOPMANS, G. F. and VAN GROENIGEN, J. W., 2014. Do earthworms affect phosphorus availability to grass? A pot experiment. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 79, pp. 34-42. DOI 10.1016/j.soilbio.2014.08.018.

VOS, H. M.J., KOOPMANS, G. F., BEEZEMER, L., DE GOEDE, R. G.M., HIEMSTRA, T. and VAN GROENIGEN, J. W., in preparation. *Large variation in readily available phosphorus in casts of eight earthworm species: a link to cast properties*.

WANG, Q., BAO, Y., LIU, X. and DU, G., 2014. Spatio-temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi associated with glomalin-related soil protein and soil enzymes in different managed semiarid steppes. *Mycorrhiza*. Vol. 24, n° 7, pp. 525-538. DOI 10.1007/s00572-014-0572-9.

WEISHAAR, J. L., AIKEN, G. R., BERGAMASCHI, B. A., FRAM, M. S., FUJII, R. and MOPPER, K., 2003. Evaluation of Specific Ultraviolet Absorbance as an Indicator of the Chemical Composition and Reactivity of Dissolved Organic Carbon. *Environmental Science & Technology*. Vol. 37, n° 20, pp. 4702-4708. DOI 10.1021/es030360x.

WEN, B., HU, X.-y., LIU, Y., WANG, W.-s., FENG, M.-h. and SHAN, X.-q., 2004. The role of earthworms *Eisenia fetida* in influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biology and Fertility of Soils*. Vol. 40, n° 3, pp. 181-187. DOI 10.1007/s00374-004-0761-3.

WHALEN, J. K., PARMELEE, R. W., MCCARTNEY, D. A. and VANARSDALE, J. L., 1999. Movement of N from decomposing earthworm tissue to soil, microbial and plant N pools. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 31, n° 4, pp. 487-492. DOI 10.1016/S0038-0717(97)00252-6.

WHITE, P. J. and HAMMOND, J. (éd.), 2008. *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions*. Dordrecht ; London : Springer. Plant ecophysiology, 7. ISBN 978-1-4020-8434-8. QK717 .E232 2008

ZAREA, M. J., GHALAVAND, A., GOLTAPPEH, E. M., REJALI, F. and ZAMANIYAN, M., 2009. Effects of mixed cropping, earthworms (*Pheretima sp.*), and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus mosseae*) on plant yield, mycorrhizal colonization rate, soil microbial biomass, and nitrogenase activity of free-living rhizosphere bacteria. *Pedobiologia*. Vol. 52, n° 4, pp. 223-235. DOI 10.1016/j.pedobi.2008.10.004.

8 Annexe I: French translation

Effets des Lombriciens sur l'assimilation en phosphore de *Lolium perenne* : une expérimentation au champ

1 Introduction

La qualité du sol est un concept qui a été défini à maintes reprises et qui est toujours en discussion (Bünemann *et al.*, 2018). La définition la plus reconnue est probablement celle de Doran et Pham (1994) : « la capacité d'un sol à fonctionner dans les limites des écosystèmes pour maintenir la productivité biologique, la qualité de l'environnement et promouvoir la santé des plantes et des animaux ». La production alimentaire est l'un des services écosystémiques les plus importants des sols (Adhikari et Heye, 2016). À la lumière de la croissance de la population mondiale, les demandes alimentaires vont augmenter et donc une gestion durable du sol est nécessaire. En outre, une fertilité durable du sol dépend d'une bonne gestion des nutriments du sol (FAO, 2015).

L'un des plus importants de ces nutriments est le phosphore (P). Le P est un constituant majeur des plantes et peut être un nutriment limitant pour leur croissance (Liebig et Playfair, 1843). Le P est incorporé dans les acides nucléiques, les phospholipides membranaires et les intermédiaires de la phosphorylation du métabolisme énergétique (ATP) (Shen *et al.*, 2011). La principale façon pour une plante d'obtenir du P est de l'obtenir de la solution de sol sous forme d'ortho-phosphates (ortho-P). Cependant la disponibilité de l'ortho-P est généralement très faible à tout moment, même si d'autres pools P peuvent être assez importants (Fageriall et Basset, 2017). Ceci est provoqué par la liaison très forte du P aux particules de sol par précipitation dans les minerais de P secondaires ou adsorption sur des argiles par exemple. Ces dynamiques du P dans le sol seront détaillées au paragraphe 2.1.

Les plantes ont développé plusieurs stratégies pour compenser la rareté des ions ortho-P dans la solution du sol. Celles-ci peuvent être divisées en deux catégories : (i) changer la disponibilité du P dans la zone racinaire ; (ii) augmenter le réseau racinaire (Shen *et al.*, 2011). Ces stratégies seront expliquées en détail au paragraphe 2.3. L'association avec les champignons mycorhiziens peut aussi être une solution à l'étendue du réseau racinaire (Hodge, 2004). Cette étude sera examinée plus en profondeur au paragraphe 2.4.

Dans les agrosystèmes les engrais phosphatés de source minérale ou organiques sont utilisés pour remédier au déficit en P. Toutefois, les engrais minéraux ne sont produits qu'à partir de roches phosphatées et leurs stocks sont ainsi limités (Cordell, Drangert et White, 2009). Cette question sera davantage détaillée au paragraphe 2.2. Le fumier est le plus utilisé des engrais organiques mais il conduit à des problèmes environnementaux lorsqu'il est appliqué à trop hautes concentrations dans les régions où la production de bétail est élevée (Reijneveld *et al.*, 2010). Compte tenu de ces inconvénients, de nouvelles sources de P doivent être trouvées pour la croissance des plantes dans les agrosystèmes.

La faune du sol, en particulier les vers de terre, pourrait peut-être aider les plantes à obtenir l'accès aux P relativement indisponibles du sol. Les vers de terre sont des

organismes clés dans le sol car ils participent au cycle des nutriments, en particulier de l'azote (N) (Blouin *et al.*, 2013) et le P (Le Bayon et Kohler-Milleret, 2009). Les vers de terre peuvent affecter la disponibilité du P pour les plantes, mais les résultats dépendent des espèces de vers de terre (Vos *et al.*, 2014). De très différentes disponibilités en ortho-P dans les turricules de sept espèces différentes ont été trouvées dans une expérience en serre (Vos *et al.*, en préparation). Ces résultats doivent encore être validées dans des conditions de terrain. En outre, les interactions possibles au sein de communautés multi-espèces de vers de terre devraient être étudiées. D'autres informations sur les vers de terre seront données au paragraphe 2.5.

L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets de différentes espèces de vers de terre sur l'absorption de P de plantes dans un sol avec un faible statut en P au champ. Nos hypothèses étaient que la présence de vers de terre permettrait une disponibilité supérieure en P pour les plantes et donc entraîner une plus grande production de biomasse (H1) ainsi qu'une plus grande concentration en P dans la plante (H2). Ceci serait expliqué par une modification des pools de P dans le sol (H3), un changement du pH du sol (H4), un changement du carbone organique dissous (DOC) (H5), une modification de la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens (H6) et un changement dans la morphologie des racines permettant une meilleure exploration du sol (H7). Les résultats refléteraient un effet d'espèce, de groupe écologique et seraient différents dans diverses communautés de vers de terre et plus globalement, une production de biomasse plus élevée et une meilleure disponibilité de P sont attendues avec une plus grande richesse en vers de terre.

Afin de tester ces hypothèses, une expérience sur le terrain avec des colonnes de sol contenant un sol à faible statut en P et cultivées avec du rye-gras (*L. Perenne* L.) a été mise en place. Cinq espèces différentes de vers de terre ont été utilisées : *Lumbricus rubellus* Hoffmeister, *L. Terrestris* L., *Aporrectodea Longa* Ude, *A. caliginosa* Savigny et *Allobophora chlorotica* Savigny. Les traitements de vers de terre incluaient des monocultures de toutes les espèces ainsi que toutes les combinaisons de 3 espèces et un mélange de toutes les espèces. Deux traitements contrôles étaient sans vers de terre et un était fertilisé avec du P inorganique pour un contrôle positif. L'étude durera deux saisons de croissance et se terminera à l'automne 2019. Pendant ce temps, les effets des vers de terre dans le champ sur la production de biomasse et la teneur en P de la plante seront évalués. Pour comprendre les voies potentielles qui pourraient conduire à un effet des vers de terre, d'autres paramètres pédologiques et biologiques seront également évalués. Ce stage de 6 mois se concentre sur la mise en place de cette expérience ainsi que sur la réalisation des premières mesures et l'analyse de la première saison de production. Ainsi, seulement une première évaluation des hypothèses est donnée ici quand cela a été possible et les résultats vont probablement évoluer au fil des saisons.

Le prochain chapitre de ce rapport résume les connaissances pertinentes pour cette étude. Le troisième chapitre décrit la méthodologie appliquée et les résultats sont ensuite présentés et discutés dans les deux chapitres suivants. Le rapport se termine par une conclusion résumant les principales conclusions, donnant une perspective sur les résultats

qui peuvent être attendus à la fin de l'expérience ainsi que quelques recommandations pour la gestion et les analyses futures.

2 État de l'art

2.1 Dynamique du phosphore dans le sol

Le P est présent dans une grande variété de formes dans le sol, mais la plupart d'entre elles ne sont pas disponibles pour l'absorption des plantes. Il y a deux principaux pools de P dans le sol : organique et inorganique (figure 1). Seul le P inorganique présent dans la solution du sol est disponible pour l'absorption par les plantes. Les plantes prennent le P sous forme de phosphate de dihydrogène (H_2PO_4^-) dans les sols acides et le phosphate d'hydrogène (HPO_4^{2-}) dans les sols alcalins. Le P labile est maintenu sur des surfaces solides (oxydes métalliques, bords d'argile, contenus dans matière organique du sol) mais facilement libéré à la solution de sol. Tous les autres pools sont considérés comme non-labiles, insolubles ou fixes. Le P inorganique dans la solution du sol représente un pool mineur par rapport aux pools de P labiles et fixes (Fageria, He et Bligar, 2017) qui représentent ensemble 98% du P total du sol (Filippelli, 2002).

Le cycle du P dans le sol est présenté à la figure 1. Les deux voies principales par lesquelles le P peut devenir labile sont la minéralisation du P organique ainsi que la désorption du P inorganique à partir des pools inorganiques. La partie active (labile) de la matière organique (MO) est facilement décomposable et a un temps de renouvellement de moins de 10 ans (Haynes, 2005). La MO stable (non labile), d'autre part, n'est pas facilement décomposable et a un temps de renouvellement plus long à l'échelle de siècles (Cambardella, 2005). La MO montre une sorption compétitive avec l'ortho-P. Lors de l'ajout de MO au sol, les acides humiques et fulviques, par exemple, seront plus adsorbés sur les bords d'argile. Plus de ponts métalliques peuvent également survenir et la charge négative de la surface du sol peut être augmentée. La minéralisation peut également être augmentée (Guppy *et al.*, 2005). Les micro-organismes sont responsables de la minéralisation, qui à son tour est affectée par des pratiques culturales ainsi que des paramètres pédoclimatiques (Fageria, He et Baligar, 2017). Les pools de P fixes inorganiques sont divisés selon le type de minéraux auxquels le P est lié et différent dans leur capacité à fournir une bonne source de P pour la croissance des plantes. Les minéraux phosphatés primaires sont très stables et n'ont pas changé substantiellement du matériel parental dont ils proviennent. Cette altération dépend du climat, de la topographie, de la nature du matériau parental, de la faune du sol et du temps (Wilson, 2004). Les minéraux phosphatés secondaires sont les produits d'altération des minéraux primaires et ils se retrouvent en association avec des argiles et des limons fins (Karathanasis, 2006). Le taux de dissolution de P dépend de son pool d'origine : la dissolution des minéraux phosphatés primaires par l'altération est généralement assez lente et ne peut pas répondre aux besoins des plantes (Shen *et al.*, 2011). Cependant, la libération du P à travers ce processus dépend de l'état de développement du sol (Filippelli, 2002) et de l'intensité des intempéries (Wilson, 2004). La dissolution des minerais secondaires de P dépend de la taille des particules impliquées et du pH. Les ions phosphates se précipiteront avec le fer et l'aluminium dans des conditions acides ou avec du calcium dans des conditions

alcalines. Les processus d'adsorption et de désorption se produisent uniquement à la surface des minéraux argileux, de l'aluminium et des oxydes de fer ou des hydroxydes (Fageria, He et Baligar, 2017). L'érosion, le ruissellement et le lessivage sont des pertes plutôt incontrôlées du cycle du P à l'échelle du champ. Ces deux derniers sont des pertes de P via la solution du sol tandis que l'érosion implique le P lié ou incorporé dans les particules de sol (Schoumans, 2015).

2.2 Engrais phosphatés minéraux

Seuls quelques pays comme le Maroc, la Chine et les Etats-Unis ont des réserves naturelles de roches phosphatées, la principale source d'engrais phosphaté minéral. Les stocks mondiaux de roches phosphatées sont estimés à se terminer d'ici 300 à 400 ans (Dawson et Hilton, 2011), bien que certains auteurs aient prédit un délai plus court (Heffer, 2006 ; Smit *et al.*, 2009). De plus, la demande en engrais phosphatés continue à augmenter : un premier signe de la prochaine crise est survenu en 2007-2008, quand les prix des roches phosphatées et des engrais ont temporairement augmenté de 700% en 14 mois (Cordell, Drangert et White, 2009).

L'utilisation des engrais phosphatés peut être une source de problèmes environnementaux. Les pertes de P des agrosystèmes vers les eaux de surface se produisent lorsque les engrais sont appliqués en excès dans certaines conditions pédoclimatiques. Cela conduit à l'eutrophisation de masses d'eau (Hart, Quin et Nguyen, 2004). Finalement, l'eau finit dans les écosystèmes marins, et il a été démontré que l'utilisation croissante des engrais depuis les années 1960, est corrélée à l'augmentation de l'eutrophisation dans ces milieux (Nixon, 1995). De plus, l'exploitation des roches phosphatées conduit à la libération de contaminants dangereux tels que les métaux lourds, le gypse et le fluorure dans l'air ou l'aquifère. Le paysage peut être fortement altéré après une activité minière (Butusov et Jernelöv, 2013).

2.3 Stratégies de plantes pour acquérir le P

Afin d'acquérir le P de la solution du sol à des concentrations très faibles, les plantes ont des transporteurs actifs de haute affinité (Shen *et al.*, 2011). En outre, les plantes peuvent modifier la disponibilité du P autour de leurs racines via un changement de pH du sol environnant. Afin de contrebalancer l'absorption de N sous forme de NH_4^+ ou NO_3^- requis pour le métabolisme des plantes, des ions H^+ ou $\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$ sont libérés. Cela conduit soit à une alcalinisation (absorption de NO_3^- et l'excrétion de $\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$) ou à une acidification (absorption de NH_4^+ et l'excrétion de H^+) de la rhizosphère (Marschner et Marschner, 2012). La respiration des plantes et des micro-organismes dans la rhizosphère produit du CO_2 qui peut dans certains sols conduire à une acidification par le biais de la dissolution du CO_2 en acide carbonique dans la solution de sol. Les plantes libèrent également via leurs racines divers composés carbonés, y compris des acides organiques. De plus, les plantes sécrètent des phosphatases dans le sol et sont donc capables de survivre à partir d'une source organique d'engrais phosphatés dans des conditions contrôlées (Tarafdar et Claassen, 1988). Les phosphatases sont des enzymes permettant la séparation d'un groupe phosphate d'une molécule. Différents types existent : les phosphomonoesterases

acides et alcalines, les phosphodiesterases, et les phosphotriesterases (Eivazi et Tabatabai, 1977).

L'absorption du P par les plantes peut entraîner l'épuisement du sol entourant leurs racines. Si le sol environnant est complètement épuisé en P labile, une autre stratégie pour la plante pourrait être d'explorer le sol qui est encore plus loin. L'architecture racinaire varie entre les espèces végétales et les génotypes, mais la croissance des racines latérales par rapport à la croissance racinaire primaire est attendue lorsqu'une déplétion de P se produit (Péret *et al.*, 2014). Avoir une rhizosphère plus étendue et plus plastique est un avantage pour exploiter les nutriments en patch dans le sol comme le P (Lynch, 1995). *Lolium Perenne* peut répondre à des patches de concentration élevée en N par la croissance des racines vers ceux-ci et la réponse aux patches de P est encore plus forte que celle pour N pour n'importe quelle plante étudiée. Cependant, la réponse diffère par espèce végétale et une espèce comme *Poa trivialis* est moins sensible à la disponibilité des nutriments c'est-à-dire qu'elle ne produit pas plus de racines dans les patches de nutriments que dans le reste du sol (Hodge, 2004).

2.4 Association avec Champignons mycorhizes

Avoir un système racinaire étendu peut coûter cher en termes de carbone (C) pour la plante. L'association avec les champignons mycorhiziens peut être une solution pour étendre le réseau racinaire pour un prix en C inférieur puisque les hyphes sont plus petits que les racines. Les hyphes des champignons mycorhiziens permettent d'accéder plus rapidement et plus facilement aux patches de nutriments avoisinants (Hodge, 2004). Plusieurs symbioses mycorhizes existent, mais les principales rencontrées impliquent des champignons mycorhiziens (AMF) qui colonisent les cellules racinaires corticales avec des arbuscules. Les hyphes peuvent se répandre à plusieurs centimètres en dehors du système racinaire et ainsi acquérir le P en dehors de la zone de déplétion racinaire. Les arbuscules ont un turnover élevé : leur durée de vie est généralement d'une à deux semaines, permettant une exploration plutôt dynamique du sol en fonction de la disponibilité en P et un suivi la croissance racinaire.

Même si une meilleure exploration du sol est considérée comme la voie principale de l'acquisition du P par les AMF, ils sont également plus efficaces que les plantes pour miner le sol en P comme ils peuvent absorber le P dans le sol à des concentrations inférieures. Les mécanismes de solubilisation du P par les AMF sont semblables aux mécanismes végétaux. Ils impliquent une acidification du sol, une interaction avec les microorganismes décomposeurs et l'excrétion de phosphatases (acides et alcalines) (White et Hammond, 2008; Wang *et al.*, 2014). Cependant, la symbiose est principalement contrôlée par les plantes selon la disponibilité en P : une fertilisation en P plutôt faible conduit à une colonisation racinaire plus élevée tandis qu'une fertilisation (trop) élevée tend à diminuer le taux de colonisation par les AMF (Liu *et al.*, 2016).

2.5 Vers de terre

Les vers de terre ont longtemps été reconnus pour avoir un effet positif sur la production végétale. Darwin (1881) a été le premier à souligner les avantages des vers de terre pour la fertilité du sol et donc la croissance des plantes. Depuis, de nombreuses études ont été

réalisées sur les effets des vers de terre sur la production végétale. Ils sont résumés dans une méta-analyse (van Groenigen *et al.*, 2014) : la présence de vers de terre augmente le rendement des cultures de 25%, et profite à la biomasse aérienne et racinaire. Les lombriciens sont des ingénieurs des écosystèmes comme ils modifient les propriétés physiques du sol et décomposent la matière organique (Jones, Lawton et Shachak, 1994; Lavelle *et al.*, 1997). Ils sont impliqués dans de nombreux services écosystémiques tels que la régulation de l'eau et l'amélioration de la structure du sol. Une des perspectives les plus intéressantes des vers de terre dans l'agriculture est leur participation au cycle des nutriments du sol (Blouin *et al.*, 2013; van Groenigen *et al.*, 2014) tels que le P (Le Bayon et Kohler-Milleret, 2009). Les vers de terre sont connus pour produire des phosphomonoestérases alcalines. Les turricules d'*Eisenia Fetida*, *Dendrobaena Veneta*, *Lumbricus rubellus* et *Aporrectodea caliginosa* contiennent toutes des phosphatases alcalines (Satchell et Martin, 1984). Dans une expérience en pot, il a été démontré que l'activité des phosphatases du sol était stimulée par les vers de terres via l'activité des micro-organismes dans leurs galeries. Cette étude conclut que l'effet des vers de terre sur le cycle de biogéochimiques du P dépend de la source organique du fertilisant, du comportement d'enfouissement et des préférences alimentaires des vers de terre (Le Bayon et Binet, 2006). La disponibilité du phosphore est également liée au pH comme l'ortho-P peut former des paires d'ions avec des cations métalliques et cela se produit plus ou moins en fonction du pH (Hinsinger, 2001). Une modification du pH peut à son tour changer l'activité des vers de terre (Springett Et Syers, 1984; Barois Et Lavelle 1986). L'activité de cinq espèces différentes en monoculture augmente la disponibilité du P dans le sol et modifie le pH ainsi que la conductivité électrique après une incubation de 90 jours (Chaudhuri *et al.*, 2012). Cela montre que l'effet des vers de terre sur le cycle du phosphore dans le sol est complexe et se compose de voies multiples (figure 2) qui ont été étudiées par Ros *et al* (2017). Les vers de terre influencent directement la disponibilité des ortho-P car ils produisent leurs propres phosphatases (W1). Une minéralisation se produit dans les turricules, transformant le P organique en ortho-P (W3). Leurs glandes calcifères intestinales affectent la concentration des ions calciques dans le sol (Briones et Pearce, 2011) et donc le pH, qui a tendance à être plus élevé dans leurs turricules (Ros *et al.*, 2017). Le pH est également affecté par l'activité microbienne menant à la dénitrification dans les turricules (W4). Le DOC est plus élevé dans les turricules que dans le sol et cela pourrait être expliqué par les préférences alimentaires des vers de terre. En raison de la sorption concurrentielle de la MO et des ortho-P, cela conduit à une plus grande disponibilité des ortho-P dans la solution du sol (W2 & 5). L'aromaticité correspond au pourcentage de groupes phénoliques, donc à l'estimation de la biodégradabilité du DOC (Weishaar *et al.*, 2003). Les vers de terre ont un impact sur l'aromaticité car leur turricules présentent des valeurs inférieures à celles du sol, ce qui signifie que le DOC des turricules est plus facilement dégradé que celui du sol (Vos *et al.*, en préparation).

Une clé possible pour expliquer la façon dont diverses espèces de vers de terre peuvent affecter la disponibilité du P est la niche fonctionnelle. Les vers de terre peuvent être organisés en 3 groupes écologiques selon la niche fonctionnelle qu'ils occupent : épigés, anéciques et endogés (Bouché, 1977). Les vers de terre épigés sont des vers pigmentés

qui vivent et s'alimentent dans la litière. Ils sont très prédatés et ont donc développés une stratégie R, c'est-à-dire qu'ils se reproduisent en nombre élevé et grandissent rapidement. Les vers de terre anéciques sont des vers longs pigmentés différemment dorso-antérieurement. Ils vivent dans des galeries permanentes dans le sol et se nourrissent de feuilles à la surface. Ils ont développé une stratégie K, c'est-à-dire qu'ils se reproduisent et se développent plus lentement. Les vers de terre endogés sont des vers non-pigmentés qui vivent et s'alimentent des particules de sol et de la matière organique associée plus en profondeur. Ils ne sont pas très prédatés et ont donc un rythme lent de reproduction. Ces catégories sont théoriques et bien que certaines espèces appartiennent clairement à un groupe, il n'est pas rare de rencontrer des espèces présentant des caractères de deux groupes écologiques tel que des espèces épi-endogés ou épi-anéciques (Bouché, 1977). Ces groupes sont importants lorsque les services écosystémiques fournis par les vers de terre sont pris en considération. Par exemple, les vers de terre anéciques et épigés ont influencé la minéralisation des résidus de cultures de surface dans une expérience en mésocosmes, mais les vers de terre endogés non. D'autre part, dans la même étude, la minéralisation de la matière organique du sol a été augmentée par les vers de terre endogés et épigés, mais pas par les anéciques (Postma-Blaauw *et al.*, 2006). Les turricules des épigés et des anéciques contiennent du P inorganiques plus dissous que le sol alors que cela n'était pas vrai pour les endogés (Vos *et al.*, 2014). En outre, le comportement d'une espèce est modifié lorsque les vers de terre sont cultivés dans un mélange multi-spécifique, par exemple la longueur et la profondeur de leurs galeries peuvent être modifiées par la présence d'une autre espèce (Jégou, Capowiez et Cluzeau, 2001). La plupart du temps, les interactions sont négatives. Ceci serait principalement expliqué par la concurrence, avec une concurrence plus élevée s'appliquant aux espèces dont les niches écologiques sont les plus proches (Ouvarov, 2009). Les interactions peuvent être positives : en ce qui concerne l'interaction entre *Aporrectodea caliginosa* et *Lumbricus rubellus*, cela conduit à un meilleur taux de reproduction pour *A. caliginosa* (Räty et Huhta, 2003).

Les interactions entre vers de terre et AMF ont été étudiée à plusieurs reprises dans des conditions différentes, mais les résultats ne sont pas clairs. Milleret, Le Bayon et Gobat (2009) ont montré une interaction significative entre les AMF et les vers de terre. Dans une expérience de pots enterrés sur le terrain, Li *et al* (2012) ont trouvé que les vers de terre (*Aporrectodea Trapèzes*) et les AMF (*Glomus intraradices*) en interaction stimulent la croissance des plantes (aérienne et racinaire) et la teneur en nutriments (N et P). Ils ont utilisé de la paille de blé comme source de nourriture pour les vers de terre et ont émis l'hypothèse que les vers de terre se nourrissent d'hyphes et de spores lorsqu'aucune autre source de nourriture n'est disponible. On a trouvé les mêmes résultats avec une étude similaire impliquant une autre espèce de vers de terre (*Eisenia Fetida*) (Li *et al.*, 2012). Reddell et Spain (1991) ont constaté que la concentration des spores des AMF dans les turricules des vers de terre était toujours plus élevée que la concentration dans le sol environnant. Ils expliquent ceci par une préférence des vers de terre pour l'alimentation dans la rhizosphère ou les patchs riches en MO, où les AMF sont actifs.

La présence de vers de terre a également été liée à une colonisation supérieure par les AMF dans des expériences contrôlées (Zarea *et al.*, 2009).

3 Matériel et méthodes

3.1 Conception expérimentale

L'expérience a consisté en 95 colonnes de PVC enterrées dans le champ. Les colonnes contenaient un sol au statut en P bas et étaient cultivées avec du rye-gras (*L. Perenne*). Une description plus détaillée des colonnes sera être donnée au paragraphe 3.3. Cinq espèces différentes de vers de terre ont été utilisées : *L. rubellus* (Lr), *L. Terrestris* (Lt), *A. Longa* (Al), *A. caliginosa* (Aca) et *A. chlorotica* (Ach). Toutes les espèces ont été cultivées en monoculture ainsi que toutes les combinaisons possibles de 3 espèces et un mélange des cinq espèces. Deux traitements contrôle étaient sans ver de terre dont un était fertilisé avec de P inorganique alors que tous les autres traitements ne l'étaient pas. Ces 18 traitements ont été répétés 5 fois en design de blocs complets randomisés. L'étude a débuté en avril 2018 et va durer deux saisons.

3.2 Description du sol

Le sol utilisé pour cette expérience était un sol sableux avec un faible statut en P (tableau 1), sourcé d'une prairie à Achterberg aux Pays-Bas (51 ° 59'32 "N, 5 ° 35'2 "E). Pour éviter la présence de vers de terre ou de cocons *ab initio*, le sol a été γ -irradié à 8kGy (Synergy Health B.V., EDE, Pays-Bas). Puisque l'objectif de cette procédure était d'obtenir un sol sans ver de terre ou cocon mais qui n'était pas stérile, un sol d'inoculation a été produit par tamisage du sol d'origine à 1mm. Les cocons des vers de terre de la plus petite espèce trouvés en Hollande sont en moyenne de 3mm (Sims et Gerard, 1985).

3.3 Description de la colonne et de la gestion

Les colonnes (figure 3) étaient de 40 cm de hauteur et 18,5 cm de largeur. Le fond a été recouvert de tissu bâche anti-mauvaises herbes pour permettre un régime hydrique et les flux nutritifs normaux, mais empêcher les vers de terre de se déplacer au-delà des limites de la colonne. Le dessus des colonnes était recouvert d'un filet anti-insectes maillé à 1,5 mm en polyéthylène, lequel était soutenu par une structure métallique de 25 cm de haut, permettant un espace suffisant pour que l'herbe se développe. La structure a permis au filet d'être plat sur le dessus et n'a donc pas entravé la pluie en tombant à travers le filet.

Chaque action effectuée sur les colonnes est référencée dans la figure 4. Chaque colonne contenait 13,12 kg de sol sec. La partie principale était remplie de 12,25 kg de sol dont 3,32% de sol d'inoculum, mélangé avec de l'engrais (tableau 2) et 0,800 L d'eau déionisée. Pendant le remplissage des colonnes, le sol a été compacté chaque fois qu'un tiers du volume total a été ajouté. Par la suite, on a appliqué le lit de semence, composé de 0,500 kg de sol irradié et de 0,08 L d'eau déionisé, mais il n'a pas été fertilisé. Les colonnes ont été conservées dans la serre (Unifarm, Wageningen University and Research, Pays-Bas) pendant 7 semaines après le remplissage et complètement randomisées toutes les deux semaines. Quatre grammes de graines de *Lolium Perenne* L. Cultivar Barnhem) ont été utilisés par colonne et les colonnes ont été recouvertes d'une feuille de plastique pour fournir des conditions optimales pour la germination. La feuille a été enlevée après une

semaine. Après la germination complète, les colonnes ont été arrosées tous les deux jours avec 0,5 L d'eau déionisé pendant leur maintien dans la serre. Elles ont été enterrées dans le champ le jour suivant la deuxième pré-récolte de l'herbe. Le champ était équipé d'un système d'irrigation qui pompait les eaux souterraines profondes avec une très faible teneur en P. Après le début de l'expérience (jour 1 sur la figure 4), chaque récolte a été suivie d'une application d'engrais. Toutes les colonnes ont été fertilisées avec de l'N et les témoins positifs ont également reçu une fertilisation en P additionnelle. Du K a également été appliqué à chaque deuxième récolte (tableau 2). La concentration d'engrais a été calculée en fonction de la perte estimée des nutriments dans la biomasse exportée ainsi que de l'efficacité de l'utilisation des nutriments. Nous avons estimé que *L. Perenne* avait une concentration de 35 g N.kg⁻¹, 3,5 g P.kg⁻¹ et 25 g K.kg⁻¹ de biomasse sèche (Reuter Et Robinson, 1997). Nous avons supposé que toutes les efficacités d'utilisation des nutriments étaient de 50%.

3.4 Terre

Cinq espèces de vers de terre ont été appliquées dans cette expérience : un épigé (*L. rubellus*), deux anéciques (*L. terrestris* et *A. longa*) ainsi que deux endogés (*A. caliginosa* et *A. chlorotica* morphotype vert). 15 vers de terre ont été appliqués dans chaque colonne ; donc une espèce est représentée soit par 15 (monoculture), 5 (Interaction de trois espèces) ou 3 (toutes les espèces en interactions) individus. Les vers de terre adultes ont été utilisés autant que possible et les autres vers ont été choisis avec soin pour être au moins des sous-adultes. Ils ont été collectés à divers endroits aux Pays-Bas (tableau 3) et conservés dans des seaux de sol avec de la litière de prairie à 15 °C dans l'obscurité avant le début de leur introduction. Ils ont été introduits au cours des deux premières semaines après le déplacement des colonnes de la serre vers le champ (figure 4). Les vers de terre ont été ajoutés dans des pots en plastique à l'envers avec du papier filtre humide. Ces pots sont restés dans le champ pendant la nuit, pour leur donner le temps de s'enfouir dans le sol sans se dessécher. Si un ver n'a pas pu s'enfouir en trois jours, il a été remplacé par un autre.

3.5 Analyse de l'herbe

L'herbe a été pré-récoltée trois fois avant le début de l'expérience et récoltée approximativement toutes les 3 à 4 semaines après (selon les conditions météorologiques et la repousse). Elle a été coupée à 5 cm au-dessus de la surface du sol. La biomasse sèche des pré-récoltes a été utilisée pour calculer la concentration du premier engrais et a aidé à détecter un effet de bloc, soutenant la randomisation fréquente et complète des colonnes dans la serre. La biomasse a été pesée fraîche et sèche (48H à 70 ° c) à chaque fois. Des mesures supplémentaires ont été effectuées au début et à la fin de chaque saison de croissance. Celles-ci incluaient l'analyse de la teneur en N et P des tiges et la colonisation des racines de graminées par les AMF. Pour déterminer la teneur en N et P des feuilles d'herbe, la matière sèche a été moulue et ensuite digérée avec un mixte de peroxyde d'hydrogène, d'acide sulfurique et salicylique avec du sélénium en tant que catalyseur (Houba *et al*, 1997). Par la suite, les concentrations de nutriments dans le digestat ont été mesurées avec une analyse de débit segmenté (SFA). Pour évaluer le pourcentage de colonisation des AMF des racines, deux carottes de sol d'un diamètre de

1,5 cm et d'une profondeur de 10 cm ont été échantillonnées dans chaque colonne et les racines ont été soigneusement séparées du sol. Elles ont été nettoyées avec de l'eau du robinet et ensuite teintées avec la méthode de l'encre et du vinaigre (Vierheilig *et al.*, 1998). La méthode de l'intersection agrandie standard (McGonigle *et al.*, 1990) a été utilisée pour déterminer le pourcentage de la colonisation par les AMF. Comme cette mesure prenait beaucoup de temps, seules trois répétitions de la monoculture et du traitement d'interaction de toutes les espèces ont été évaluées en première instance. Les trous qui ont été créés par la prise des carottes de sol ont été remplis avec du sol humide irradié.

Après la dernière saison de croissance, l'analyse racinaire inclura également la digestion des racines pour déterminer leur teneur en N et en P. Un sous-échantillon des racines sera scanné et l'image résultante sera traitée avec le logiciel WinRhizo (Regent Instruments Inc.) pour la morphologie des racines. La biomasse des racines sèches de l'échantillon principal et du sous-échantillon « morphologie » seront pesée (48H à 70 ° c).

3.6 Analyse du sol

Le sol a été analysé lors de la première et dernière récolte de chaque saison de croissance, en utilisant les deux mêmes carottes que pour la mesure de colonisation des AMF. Les pools de P et le DOC devraient être mesurés sur le sol frais pour éviter toute surestimation liée au séchage et au remouillage du sol (Koopmans *et al.*, 2006; Koopmans et Groenenberg, 2011). Des sous-échantillons ont été séchés à 40 °C pendant 24h, juste après l'échantillonnage, tandis que le reste des échantillons de sol ont été conservés dans des sacs hermétiques à 4 °C. Le séchage d'un sous-échantillon nous a permis de déterminer la teneur en eau à 40 °C de chaque colonne. L'extraction a été faite en utilisant l'eau ultra-pure (UPW), comme un substitut de la solution du sol (Torrent et Delgado, 2001; Koopmans *et al.* 2006), avec un ratio de 1:10 (m:v). Les solutions ont été secouées horizontalement pendant 24h à 75 coups/min. Par la suite, les extraits ont été centrifugés à 3750 tr/min pendant 10 min et les surnageants ont été filtrés par un filtre de 0,45 µm (NC45, Whatman). Des sous-échantillons ont été préparés pour les analyses en regroupant des quantités égales des mêmes traitements des cinq blocs différents. Le DOC a été mesuré ainsi que le phosphore dissous total (TDP) et l'ortho-P. La conductivité électrique (EC), le pH et l'absorbance à 254 nm ont été mesurés dans cet ordre dans le reste des 90 échantillons. La force ionique (IS) a été déduite de EC comme :

$$IS = 0.0127 \times EC$$

avec IS en Mol. L⁻¹ et EC en DS. m⁻² (Griffin Et Jurinak, 1973). L'aromaticité a été déduite du DOC et de l'absorbance à 254 nm :

$$Aromaticité = 6.25 \times (100 \times \frac{Abs_{254}}{DOC}) + 3.63$$

L'aromaticité étant exprimée en % et DOC en Mg. L⁻¹ (Weishaar *et al.*, 2003).

L'activité phosphatase sera évaluée plus tard sur le sol humide qui avait été entreposé dans des sacs scellés à 4 °C. Ces résultats ne sont donc pas signalés ici.

3.7 Analyse statistique

Des analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R (version 3.4.2) et les packages (version 3.4.2), multcomp (version 1.4 -8) et FactoMineR (version 1,41).

La normalité et l'homoscédasticité des variables ont été évaluées avec les tests de Shapiro et de Bartlett's respectivement. L'ANOVA a été effectuée, suivie d'un test pour vérifier la normalité des résidus. Si l'ANOVA était significative, le test de Tukey a été effectué. Si les résidus de l'ANOVA ne suivaient pas la normalité, alors un test non-paramétrique a été effectué (Kruskal-Wallis). S'il n'est pas spécifié dans le texte, les p-values sont données pour l'ANOVA.

4 Résultats

4.1 Analyses de plantes

La figure 5A résume la biomasse pour la première récolte. En l'absence de fertilisation phosphatées, la présence de Lt ainsi que la combinaison Lr, Aca et Lt ont montré une production de biomasse significativement ($p = 0,0000208$) plus élevée que les colonnes sans ver de terre. La production maximale a été produite dans les colonnes Lt avec une moyenne de 6,15 g d'herbe sèche par colonne. La production minimale a été produite dans les colonnes exemptes de ver de terre avec une moyenne de 3,86 g d'herbe sèche par colonne. Il n'y avait aucun effet significatif de richesse de ver de terre ($p = 0,142619$) (Fig. 5b) mais les colonnes sans ver de terre avaient une production de biomasse plus faible que la moyenne de toutes les monocultures, les trois combinaisons d'espèces et la combinaison de toutes les espèces, respectivement. Une espèce se distingue : une forte densité de Lt est associée à une production de biomasse élevée. L'effet diminue avec une densité décroissante de Lt mais une densité stable de vers de terre (Fig 5C).

Le tableau 4 montre la concentration de P et de N dans la biomasse aérienne. La concentration en P des feuilles était la même pour toutes les colonnes ayant des vers de terre ainsi que les colonnes sans ver de terre. L'herbe contenait en moyenne 2,27 g P.kg⁻¹ d'herbe sèche pour ces traitements. Seules les colonnes fertilisées au P étaient significativement ($p = 5.41 \times 10^{-15}$) différentes des autres avec en moyenne 3,51 g P.kg⁻¹ d'herbe sèche. C'est la valeur de concentration en P que les agriculteurs néerlandais visent (Schie-Rameijer *et al.*, 2017). Cependant, la production de biomasse aérienne était différente entre les traitements, y compris dans les traitements ayant des vers de terre. Cela a donné lieu à une absorption en P totale différente par *L. Perenne* pour les différents traitements (figure 6). Les colonnes fertilisées au P avaient absorbé 16,35 mg de P en moyenne et même si c'était la plus haute absorption en P de tous les traitements, les colonnes n'ayant que Lt, et Lr, Aca et Lt en combinaison n'étaient significativement ($p = 0,00000232$) pas dans des différentes gammes d'absorption en P totale. Les colonnes sans ver de terre avaient en moyenne la plus faible absorption en P avec 9,03 mg de P absorbé par colonne.

La concentration en N dans la biomasse aérienne (tableau 4) était significativement ($p = 0,000000598$) plus élevée par rapport au traitement fertilisé au P, pour les colonnes contenant seulement Lt, une combinaison de Lr, Ach et Lt, la combinaison d'Aca, Lt et Al

ainsi qu'Aca, Ach et Lt en combinaison. Le traitement fertilisé au P a montré la plus petite teneur moyenne en N avec 40,18 g N.kg⁻¹ d'herbe sèche.

Le rapport N:P est présenté à la figure 7. Il montre une limitation en P pour tous les traitements ayant des vers de terre ainsi que le traitement sans ver de terre. Le traitement fertilisé avec du P était N-limité. Ici encore, on a observé un effet de la densité de Lt: plus la densité de Lt est élevée sous une densité constante de ver de terre, plus le rapport N:P est élevé.

La colonisation des AMF est montrée au tableau 4. Elle n'était significativement ($p = 0,527$) pas différente pour tous les traitements évalués. Les racines de *L. Perenne* ont été colonisées par les AMF avec un taux variable dans les colonnes qui abritent des espèces uniques de ver de terre. Même si ce n'était pas significatif, Al a montré une colonisation relativement faible par rapport aux autres traitements avec une moyenne de 28%. La combinaison de toutes les espèces a montré la variabilité la plus faible avec une moyenne de 42% de colonisation et une erreur-type de 2%.

4.2 Analyses du sol

La figure 8 montre le TDP et l'ortho-P pour les différents traitements. Les colonnes fertilisées au P avaient à la fois les plus fortes concentrations de TDP avec 2,96 mg.kg⁻¹ de sol sec et d'ortho-P avec 2,3 mg.kg⁻¹ de sol sec. Les concentrations les plus basses ont été observées dans des colonnes exemptes de ver de terre avec des valeurs de 1,35 mg.kg⁻¹ du sol (TDP) et 0,78 mg.kg⁻¹ (ortho-P). Toutes les colonnes ayant des vers de terre étaient dans la même gamme de valeurs de TDP et d'ortho-P avec une moyenne de 1,66 mg.kg⁻¹ et 0,91 mg.kg⁻¹ respectivement.

Le pH des différents traitements est présenté figure 9A. Le pH du sol des colonnes fertilisées au P était significativement ($p = 0,0087$) plus basique que le pH des colonnes ayant seulement Lr, seulement Aca, Lr, Lt et Al en combinaison, Lr, Aca et Al en combinaison, ainsi que la combinaison de Lr, Aca et Ach. La densité de Lr dans les colonnes était importante pour le pH : plus cette densité était élevée, plus le pH était significativement ($p = 0,00385$) abaissé (figure 9B).

Le DOC et l'aromaticité sont présentés au tableau 5. Tous les traitements conduisent à des concentrations de DOC variant entre 100 et 130 mg C.kg⁻¹ de sol sec. La plus faible concentration de DOC était dans les colonnes ayant seulement Lr avec 103 mg C.kg⁻¹ et les colonnes sans ver de terre avec 106 mg C.kg⁻¹. L'aromaticité n'était significativement ($p = 1$) pas différente pour tous les différents traitements des expériences. Elle variait de 37 à 40%, à l'exception de la monoculture de Lr (35,58%) (pas significativement différent).

Les forces ioniques (tableau 5) des extraits de sol n'étaient significativement (Kruskal, $p = 0,1956$) pas différent pour tous les traitements. Elles variaient de 0,20 à 0,30 Mol. L⁻¹ et les colonnes ayant seulement Lt ont montré une valeur plus élevée (non significative) de 0,39 mol. L⁻¹ en moyenne.

5 Discussion

5.1 Analyses de plantes

5.1.1 Biomasse aérienne

La biomasse aérienne était affectée par les vers de terre. Cet effet était significatif pour deux traitements, mais pas pour les autres. L'effet des vers de terre est conforme aux études précédentes mais il était alors principalement attribué à l'apport d'N (van Groenigen *et al.*, 2014). Ici, l'alimentation en N n'est pas limitante, ce qui signifie que l'effet doit être expliqué par un autre paramètre. L'effet pourrait être due de la présence des vers de terre seulement (dérangeant ou se nourrissant des racines) ou être due à l'effet des vers de terre sur la disponibilité en P. Ces résultats ont déjà été trouvés dans des expériences en serre sous conditions contrôlées (Vos *et al.*, 2014; Ros *et al.*, 2017) mais sont sans précédent au champ selon nos connaissances.

Il n'y avait pas d'effet de diversité et ceci est un résultat inattendu. Un effet élevé de la diversité des vers de terre signifierait que les traits des cinq espèces seraient potentiellement complémentaires les uns aux autres (Dewi et Senge, 2015). Cela n'a pas été démontré par nos résultats, soit parce qu'il est trop tôt pour remarquer un tel effet, soit parce que l'interaction entre les espèces ne l'a pas permis, ce qui signifie que la compétition au sein des espèces aurait comme conséquence qu'une ou plusieurs espèces n'exprimeraient pas leur comportement habituel.

Un résultat remarquable est l'effet important que Lt exerce sur la biomasse. L'effet de Lt pourrait avoir deux significations : 1) il serait plus efficace à cette densité que la fertilisation minérale pour augmenter la biomasse aérienne ou 2) quelques-uns des vers de terre introduits sont morts dans les colonnes, entraînant la fertilisation de ces colonnes via la décomposition des tissus des vers de terre. L'option 1 semble possible car Lt s'est avéré très actif, tant dans les seaux avant l'introduction au champ que dans les colonnes après introduction (observation personnelle). Il a également été prouvé qu'il modifie l'ortho-P du sol après l'ingestion du sol comme l'ortho-P est plus élevé dans ses turricules que dans le sol (vos *et al.*, 2014). D'autre part, nous ne sommes pas certains que tous les vers de terre introduits étaient encore vivants dans les colonnes au moment de l'échantillonnage, menant potentiellement à la deuxième explication. Si nous estimons la biomasse d'un Lt à 5 g, sachant que chez cette espèce le contenu en P est de 1590 mg p. kg⁻¹ de vers de terre sec, que la teneur en N est 105 g n/kg de vers de terre sec et que Lt est composé à 83,6% de l'eau (Finke, 2002); On peut estimer qu'un Lt est composé de 1,3 mg de P et 86,1 mg de N. Si tous les vers de terre étaient morts dans les colonnes ayant 15 Lt, cela signifierait que 19,6 mg de P et 1,29 g de N seraient disponible dans la colonne pour la croissance des plantes. C'est l'équivalent de la fertilisation P appliquée au jour 29 dans notre expérience ainsi que 6 fois la fertilisation N appliquée au jour 29. Compte tenu de toute l'absorption en P totale, il est peu probable que tous les vers de terre du traitement de monoculture Lt étaient morts parce que l'absorption en P total serait plus élevée, même si elle n'est pas significativement dans des gammes différentes que les colonnes fertilisées au P. La seule façon de savoir si l'effet provient de l'activité de Lt ou de leur mort sans déranger la colonne, est d'attendre les résultats de la prochaine récolte.

Si l'augmentation de la biomasse observée est due à leur activité, alors l'effet devrait être maintenu. Si elle est dû à leur décomposition, alors cet effet devrait être absent comme le taux de décomposition d'un ver de terre est très rapide. Une expérience de Whalen *et al* (1999) a montré que 71% de l'N d'un tissu de vers de terre en décomposition était incorporé dans la biomasse végétale après 16 jours. Pourtant, nous ne pouvons pas exclure que les deux justifications soient correctes. Il est probable que certains Lt soient morts parce que plusieurs ont dû être remplacés au cours de leur introduction en raison de leur incapacité à s'enfouir.

5.1.2 Nutriments Shoot

Koerselman et Meuleman (1996) ont montré que la croissance de l'herbe était limitée par la disponibilité de l'N lorsque le rapport N:P était de moins de 14 et qu'elle était limitée par le P lorsque le rapport N:P était supérieur à 16. Le traitement fertilisé au P n'a montré aucune limitation en P, montrant que la configuration de notre expérience a été un succès. Ce résultat est également soutenu par le fait que le traitement recevant la fertilisation en P a montré la plus forte absorption de P totale et la teneur en P la plus élevée des pousses dans l'expérience. Cela soutiendrait l'idée d'une consommation de luxe en P par les plantes parce que la biomasse aérienne n'était pas élevée dans ce traitement. Cependant, les colonnes fertilisées au P étaient limitées par l'N et montraient la plus petite teneur en N de l'expérience. Cela explique pourquoi la biomasse aérienne était significativement plus faible que celle de certains traitements de vers de terre. Tous les autres traitements étaient limités par le P. La limitation en P pour les traitements contenant des vers de terre est globale : tous avaient en moyenne un rapport N:P plus élevé que le traitement sans ver de terre, même si ce n'était pas toujours significatif. Les colonnes ayant seulement Lt ainsi que Aca, Ach et Lt en combinaison ont eu une restriction en P particulièrement importante car indépendamment de l'approvisionnement du sol, les plantes ont tendance à rester dans la gamme autour de 15:1 (Shaver et Melillo, 1984). Cela signifie que ces traitements ont été particulièrement efficaces dans la fourniture d'N pour la croissance des plantes, mais moins efficace pour le P.

L'effet de densité de Lt était également observable sur le rapport N:P. Tous les traitements non fertilisés avaient des teneurs en N plus élevées que le traitement fertilisé au P, même si ce n'était pas toujours significatif. Ceci pourrait être lié à la limitation en P: les stratégies végétales pour acquérir le P comme l'extension du réseau racinaire et une meilleure symbiose avec les AMF conduisent à une acquisition plus élevée d'N. Ceci a été développé comme une stratégie de fertilisation optimisée par Shen *et al* (2013).

5.1.3 Colonisation par l'AMF

L'absence de différences significatives doit être interprétée avec soin en raison de deux faits. Tout d'abord, la mesure n'était pas complète : seules trois répliquats des traitements monocultures et du traitement contenant toutes les espèces ont été évaluées. En outre, la mesure a été faite peu de temps après le début de l'expérience (jour 29), de sorte qu'il aurait pu être trop tôt pour un effet AMF de se développer. Pourtant, la monoculture d'Al a montré une colonisation moyenne inférieure. Il a été prouvé qu'Al avait une production de turricules plus faible, une longueur totale de galeries inférieure et une continuité de

galerie inférieure par rapport à Aca dans les mêmes conditions (Schrader, 1993). Cela pourrait signifier qu'Al propage moins de spores d'AMF dans la colonne qu'Aca, conduisant à une plus faible colonisation. On a trouvé des résultats similaires dans des études portant sur la colonisation par les AMF dans les racines de *L. Perenne*, mais sans fertilisation azotée (Atkinson *et al.*, 2005; Allsopp, 1998; Grimoldi *et al.*, 2005), tandis que la fertilisation azotée est connue pour réduire la colonisation (Gryndler *et al.*, 2006). Compte tenu de cela, les vers de terre pourraient avoir un effet sur la colonisation mais une mesure plus complète est nécessaire, comprenant le traitement sans vers de terre.

5.2 Analyses du sol

5.2.1 P dans le sol

Le traitement fertilisé au P a montré les concentrations les plus élevées en TDP et en ortho-P. Ceci est en accord avec les résultats observés pour la biomasse végétale et les analyses des nutriments végétaux. Cela soutient encore plus que la fertilisation en P était correcte dans cette expérience. Le TDP et l'ortho-P minimums ont été mesurés pour le traitement sans ver de terre, ce qui supporte un effet potentiel des vers de terre à l'avenir car les traitements de ver de terre ont des valeurs plus élevées. Les monocultures de Lr et Ach ont des concentrations de TDP et d'ortho-P faibles, comparables au traitement sans ver de terre. Ces deux espèces vivent dans les premiers centimètres du sol tandis que les autres espèces exploitent plus la profondeur du sol (Sims et Gerard, 1985; observations personnelles). Étant donné que la méthode d'échantillonnage a utilisé un carottage de 10 cm de profondeur, tout effet potentiel de ces deux espèces sur le sol pourrait être dilué dans le sol inexploré par les vers de terre.

5.2.2 pH

Les différences significatives de pH entre les traitements sont difficiles à interpréter à ce stade parce que le pH de tous les traitements variait très près de celui du sol en vrac. L'idée du pourcentage de sol réellement affecté par les vers de terre dans les carottes de sol analysées s'applique également ici mais les différences observées pourraient aussi bien être dues à un artefact de la procédure de mesure.

5.2.3 Carbone

Dans cette étude, tous les traitements contenant des vers de terre avaient des concentrations élevées en DOC par rapport au traitement sans ver de terre, sauf pour la monoculture de Lr. Le DOC élevé pour la plupart des traitements contenant des vers de terre est en adéquation avec les résultats des autres mesures dans le sol : on pourrait s'attendre à un effet des vers de terre à l'avenir. L'activité des vers de terre a déjà été montré comme augmentant les concentrations de DOC (Wen *et al.*, 2004). Les résultats pour la monoculture de Lr sont probablement dilués dans le sol non-exploité.

L'aromaticité dans les colonnes ayant seulement Lr était en moyenne plus basse bien que les différences n'étaient pas significatives. La monoculture de Lr a une MO un peu plus facilement dégradable.

5.2.4 Force ionique

Compte tenu de la force ionique des extraits d'eau du sol, il n'y a pas de différence significative entre les traitements. Cependant, les colonnes contenant uniquement Lt avaient une force ionique plus élevée que tous les autres traitements. La force ionique dans les turricules de cette espèce est de 2,5 mol. L⁻¹ alors que d'autres espèces varient entre 1,5 et 5,5 mol. L⁻¹ (Vos *et al*, en préparation). Les 15 Lt ont probablement influencés plus vite que les autres vers de terre le sol de leurs colonnes en raison de leur taille et leur activité. À l'avenir, les mesures de la force ionique de tous les traitements des vers de terre pourraient être plus élevées considérant que les vers de terre auront probablement affecté un volume plus important de sol.

6 Conclusion

6.1 Résumé

La mise en place de cette expérience a été couronnée de succès : la plupart des vers de terre ont survécu, le TDP du sol et l'ortho-P étaient compatibles avec nos attentes et tous les traitements ayant des vers de terre ainsi que le traitement sans ver de terre ont montré une croissance des plantes limitée par le P. Après seulement 26 jours d'expérience, deux des 16 traitements lombriciens (monoculture de Lt et Lr, Aca, Lt en combinaison) ont augmenté significativement la biomasse aérienne de *L. Perenne* (H1) ainsi que son absorption totale en P (H2). La présence de Lt a donné lieu à une biomasse produite particulièrement élevée mais les résultats futurs doivent encore confirmer que cet effet est lié à l'activité de cette espèce. Aucun effet de la diversité des vers de terre n'a été trouvé et aucune différence de colonisation des AMF n'a été observée entre les traitements évalués (H6).

6.2 Perspectives

Avec plus de temps, les vers de terre exploreront un plus grand volume de sol, entraînant une augmentation potentielle de leur effet sur les propriétés du sol comme le TDP, l'ortho-P (H3), le DOC (H5) et la force ionique. Un effet sur le pH plus compréhensible pourra également se produire (H4). On s'attend à ce que l'effet des vers de terre sur la biomasse aérienne devienne plus significatif avec le temps et si cela se produit, nous pourrions être en mesure de détecter un effet de diversité ou d'espèce de ver de terre. En raison de la fertilisation azotée, les colonnes qui abritent les vers de terre ainsi que les colonnes sans ver de terre devraient toujours avoir une croissance de plantes limitée par le P. S'il y avait un effet qui n'a pas été détecté sur la colonisation de l'AMF dans cette étude, il pourrait être détecté à l'avenir comme la limitation en P pourrait augmenter dans les traitements non fertilisés, entraînant des différences potentiellement plus nettes. Ces résultats pourraient impliquer qu'une alternative aux engrais minéraux est possible sous la forme d'une meilleure inclusion des vers de terre dans les agrosystèmes.

6.3 Recommandations

Les résultats futurs devront être analysés soigneusement en gardant à l'esprit la possibilité que certains vers de terre, en particulier le LT, pourraient être morts au début de l'expérience. Si les résultats suivent les mêmes tendances qu'ici, cela signifierait

qu'aucune perte majeure de vers de terre n'a eu lieu. Suivant la même idée, une évaluation de la survie des vers de terre dans les colonnes pourrait être faite, en utilisant une méthode non invasive pour s'assurer que les résultats observés résultent réellement de l'activité des vers de terre. Certaines espèces pourraient aussi être plus actives que d'autres, surtout dans l'exploitation du sol de la colonne. Les volumes de sol ingérés et affectés par les vers de terre devront être mesurés (ou au moins estimés). Cela permettrait d'interpréter les analyses de sol en fonction de la quantité de sol réellement (ou théoriquement) influencée par les vers de terre et par la quantité de sol non-exploité réelle.

Le traitement fertilisé au P pourrait nécessiter une fertilisation azotée plus élevée. Pour le moment, *L. Perenne* stocke une grande quantité de P. Une fertilisation plus élevée en N permettrait une meilleure utilisation de ce P et donc d'exprimer plus le potentiel de cette fertilisation azotée.

Les mesures de colonisation des AMF doivent être exécutées à nouveau à la fin de l'expérience, de manière plus complète : c'est-à-dire avec 5 répliquats par traitement et y compris plus de traitements qu'analysés dans cette étude. Les traitements sans ver de terre devraient particulièrement être inclus.

	Diplôme et Mention : Master Biologie, Agrosciences Parcours : Amélioration, Production et Valorisation du Végétal Option : Fonctionnement et gestion des agrosystèmes Responsable d'option : Matthieu CAROF
Auteur : Laura FERRON Date de naissance : 22/06/1994	Organisme d'accueil : Department of Soil Quality, Wageningen University and Research Adresse : Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
Nb pages : 22 Annexe(s) : 17	Maîtres de stage : Jan-Willem VAN GROENIGEN & Hannah VOS
Année de soutenance : 2018	
Titre français : Effets des Lombriciens sur l'assimilation en phosphore de <i>Lolium perenne</i> : une expérimentation au champ	
English title: Earthworm species effect on <i>Lolium perenne</i> phosphorus uptake: a field experiment	
Résumé : Le Phosphore (P) est l'un des nutriments les plus importants pour la croissance des plantes. Bien que le P peut être présent en grande quantité dans le sol, il est souvent non disponible pour l'assimilation des plantes du fait d'immobilisations chimiques. En conditions contrôlées, les Vers de Terre (VdT) sont capables de rendre temporairement disponible le P pour l'assimilation via différents moyens mais cela n'est pas corroboré au champ. Nous avons mis en place une expérimentation pour trouver quels étaient les effets de différentes espèces de VdT sur l'assimilation en P de <i>L. perenne</i> dans un sol au statut faible en P au champ. Elle a consisté en des colonnes de sol enterrées au champ contenant 5 espèces de VdT (<i>L. rubellus</i>, <i>L. terrestris</i>, <i>A. longa</i>, <i>A. caliginosa</i> et <i>A. chlorotica</i>) en monoculture, en combinaison de 3 ou 5 espèces et avec 2 traitements sans VdT (dont 1 a reçu une fertilisation au P). Après 26 jours, 2 des traitements comprenant des VdT avaient une production de biomasse aérienne significativement plus importante que le traitement contrôle fertilisé au P. Pour tous les traitements comprenant des VdT, la croissance des plantes était limitée par le P mais 2 traitements ne montraient pas de différence significative avec ce même contrôle fertilisé au regard de l'assimilation totale en P. La colonisation mycorhizienne n'était pas significativement différente pour les traitements analysés. Les analyses de sol étaient cohérentes avec la configuration de l'expérimentation. L'éventuelle poursuite de ces effets sera suivie en 2018 et 2019. Nos résultats suggèrent que certaines communautés de VdT ne sont pas différentes des fertilisant en P en termes d'assimilation totale en P mais conduisent à une plus grande production de biomasse et une concentration en P plus faible (après 26 jours). Ainsi, les VdT devraient être plus pris en considération dans les agrosystèmes.	
Abstract: Phosphorus (P) is one of the most important nutrients for plant growth. Although P can be present in large amounts in soil, it is often not available for plant uptake because of chemical immobilizations. Earthworms (EW) have been shown under controlled conditions to make this P temporarily available for plant uptake through various pathways, but this has never been corroborated in the field. We set up an experiment to determine the effects of different EW species on P uptake of <i>L. perenne</i> on a soil with a low P status under field conditions. The experiment consisted of buried soil columns housing 5 EW species (<i>L. rubellus</i>, <i>L. terrestris</i>, <i>A. longa</i>, <i>A. caliginosa</i> and <i>A. chlorotica</i>) in monocultures, 3-species or 5-species combinations and 2 EW-free controls (one of which received additional P fertilizer). After 26 days, 2 EW treatments had a significantly higher aboveground biomass production than the P fertilized control. In all EW treatments plant growth was limited by P, but total P uptake of those 2 treatments was not significantly different from the P fertilized columns. AMF colonization was not significantly different between treatments. Soil analyses were consistent with the setup of the experiment. The development of these effects will be followed in 2018 and 2019. Our results suggest that some EW communities are not different from P fertilizer in terms of total P uptake but lead to a higher production and a lower P content (after 26 days). Thus, EW should be taken more in consideration in agrosystems.	
Mots-clés : Lombriciens, Phosphore, <i>Lolium perenne</i> , composition des communautés, sol Key Words: Earthworms, Phosphorus, <i>Lolium perenne</i> , community composition, soil	