NOM : **Robin Agnès**

DEPARTEMENT : Persyst

LIEU D'AFFECTATION : UMR Eco&Sols (Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et des Agro-écosystèmes) INRA-IRD-SupAgro-CIRAD

COMPTE-RENDU MISSION CONGO (07 MAI AU 14 MAI 2011)

RESUME

L'objectif de la mission était d'échantillonner de la litière (feuilles), des racines (mas racinaire de surface et racines du sol) et du sol (couche 0-10 cm) dans le cadre du WP3 du projet Intens&Fix. Le WP3 du projet Intens&Fix a pour objectif d'évaluer comment l'introduction des espèces fixatrices d'azote dans les plantations forestières affecte le fonctionnement biologique du sol, la décomposition de la matière organique, la dynamique des nutriments du sol (particulièrement azote et phosphore) et la nutrition des plantes.
Les échantillons prélevés au cours de cette mission permettront d'obtenir des mesures de la nématofaune, de la disponibilité phosphore inorganique et des activités de phosphatases fongiques, de la minéralisation de l'azote (ammonification et nitrification), de la biomasse microbienne, microbiologiques par des approches de biologie moléculaire (diversité, abondance des bactéries et des champignons).
Cette mission a été réalisée avec Manon Villeneuve (agent IRD, UMR Eco&Sols). Un échantillonnage sur le terrain a été réalisé pendant 4 jours. Différents prélèvements ont été réalisés (litière, sol, racines) sur le site de Kissoko (plantation mixte eucalyptus/acacia). Les échantillons ont été conservés à 4°C et ramenés sur Montpellier où ils ont été analysés ou conditionnés en vue d'analyses ultérieures.

DEROULEMENT DE LA MISSION

Dimanche 8 mai :
Arrivée sur Pointe Noire en début de journée. Journée d'installation et d'acclimatation.

Lundi 09 mai :
Prélèvements sur la parcelle Intens&Fix eucalyptus/acacia sur le site de Kissoko. Echantillonnage Bloc 5, T6 et T2.

Mardi 10 mai :
Prélèvements sur la parcelle Intens&Fix eucalyptus/acacia sur le site de Kissoko. Echantillonnage Bloc 1, T0, T6et T2 + Bloc 5, T0.

Mercredi 11 mai :
Echantillonnage Bloc 2, T0, T6 et T2.

Jeudi 12 mai :
Echantillonnage sols de savane. Désinfection des nodules échantillonnés.

Vendredi 13 mai :
Préparation des échantillons pour le voyage et retour sur Montpellier.

Samedi 14 mai :
Arrivée sur Montpellier en début de matinée. Tri et stockage des échantillons dans le réfrigérateur du laboratoire sol L2 de l'UMR Eco&sols.

OBJECTIF DE LA MISSION

L'objectif de la mission était d'échantillonner du sol, des racines et de la litière dans le cadre du WP3 du projet Intens&Fix. Différents paramètres seront analysés à partir de ces échantillons :

Paramètres mesurés
Nématofaune (C Villenave)
Communautés bactériennes/ communautés nitrifiantes (ADN/ARN) (A Brauman)
Communautés fongiques / saprophytes (ADN/ARN) (A Robin)
Disponibilité du Pi / activités phosphatases fongiques (C Plassard, A Robin)
Minéralisation N (JM Harmand, A Brauman)
Biomasse microbienne C, N, P (C Plassard)
Mycorhizes (C Plassard, A Robin)
Isolement de bactéries solubilisatrices de phosphate ? (C Plassard, A Brauman)
Diversité des bactéries fixatrices d'azotes (nodules acacia) (JJ Drevon)

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Le projet Intens&Fix, financé par l'Agence Nationale de la Recherche pour quatre ans (2011-2014) dans le cadre du Programme Systerra, traite de l'intensification écologique des plantations forestières à travers l'association d'espèces fixatrices d'azote. Le projet est basé sur une approche expérimentale développée sur des plantations forestières (PF) différentes et complémentaires, en France (association de *Juglans regia* + divers NFS dans le Languedoc, *Populus sp* et *Robinia pseudoacacia* dans le Nord-Est de la France), et sous les tropiques (plantations mixtes *Eucalyptus grandis* (Brésil) / *E. urophylla * grandis* (Congo) + *Acacia mangium*).

Le projet a pour objectif de développer un modèle intégré adapté aux PF en association avec des espèces fixatrices d'azote (EFA). Il dérivera d'un modèle conceptuel gérant le fonctionnement des PF en mélange au travers i) de l'étude des interactions biophysiques et biogéochimiques clés et ii) des règles de décision des acteurs relatives aux contraintes/avantages techniques et socio-économiques de ces plantations. Le projet s'articule autour 5 « Work Packages ».

Parmi ces 5 work packages, le WP3 a pour objectif d'évaluer comment l'introduction des EFA dans les PF affecte le fonctionnement biologique du sol, la décomposition de la matière organique, la dynamique des nutriments du sol (particulièrement N et P) et la nutrition des plantes.

ÉCHANTILLONNAGE

Commentaire : La campagne d'échantillonnage à été réalisée à la fin de la saison des pluies (absence de pluies depuis deux semaines). Les échantillons de litière et de sol étaient relativement secs. Pas de carpophores de champignons observés sur les parcelles. Pas de mycorhizes visibles à l'œil sur les racines de surfaces comme celles observées lors du prélèvement au mois de décembre 2010.

Site = Kissoko, parcelle plantations mixtes (âgées de 7 ans et demie) + savanes à proximité de la plantation.

Espèces = *Eucalyptus urophylla * grandis* et *Acacia mangium.*

PROTOCOLE D'ECHANTILLONNAGE

Prélèvement de carottes de sol « nématofaune »
Utilisation d'un cylindre diamètre 5 cm sur 10 cm de hauteur
5 carottes prélevées par arbre, selon le quart du carré de Voronoi (cf. schéma de prélèvement)

- 5 traitements
  3 peuplements étudiés dont 1 peuplement (traitement mixte) avec un sous échantillonnage (T0,
  T2, T6 (Fix), T6 (non Fix))
  + sols de savane d'origine
- 3 échantillons composites par traitement
- **1 composite = 10 prélèvements (5 carottes sur 2 arbres)**
  Soit 6 arbres échantillonnés par parcelle (12 arbres si peuplement mixte)
  3 blocs par traitement (bloc 1, 2 et 5 pour le Congo)

Pur Non Fix (T2) : 3 échantillons composites par parcelle = ((5 carottes x 2 arbres)*3) x 3 blocs

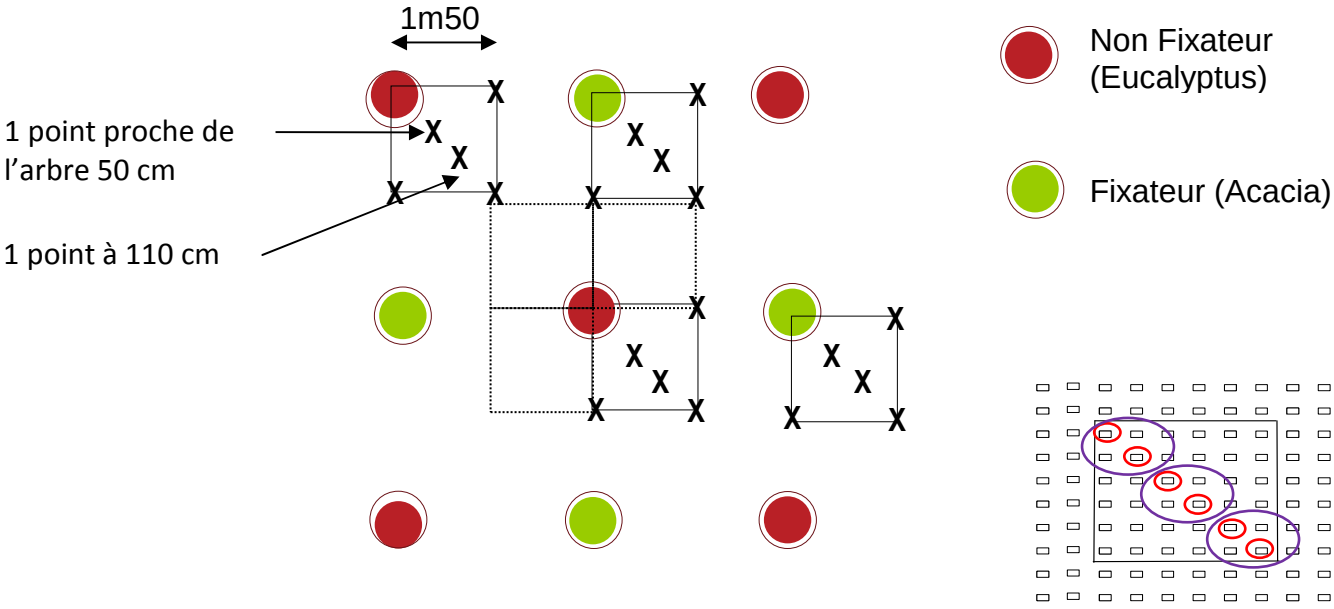
Pur Fix (T0) : 3 échantillons composites par parcelle = ((5 carottes x 2 arbres)*3) x 3 blocs

Mixte (T6, 50/50) :
Non Fix 3 échantillons composites par parcelle = ((5 carottes x 2 arbres)*3) x 3 blocs
Fix 3 échantillons composites par parcelle = ((5 carottes x 2 arbres)*3) x 3 blocs

Savane 3 échantillons composite x 3 parcelles de savane
Composite = 10 prélèvements (idem parcelles)

Total = 9 rep/traitement (5 traitements = pur non fix, pur fix, mixte non fix, mixte fix, savane)
Total = 45 échantillons composites (36 échantillons pour la litière et les racines de surface et 45 échantillons pour les racines contenues dans le sol et le sol)

Schéma de prélèvement des carottes



Prélèvement sur la parcelle selon la diagonale (éliminer les 2 premiers rangs ; effet bordure)

Commentaire : Le prélèvement en suivant la diagonale n'a pas pu être respecté dans certains cas (arbre manquant, retard significatif de croissance, difficultés d'accès autour de l'arbre...).

4 compartiments échantillonnés par traitement :

- Litière (uniquement les feuilles)
- Mas racinaire de surface (spécifique au site du Congo)
- Sol (0-10 cm)
- Racines contenues dans le cylindre de sol (0-10 cm)

<u>Sur place</u> :

- Prélever les feuilles de litière dans un cadre de 10*10 cm et découper en petits fragments aux ciseaux pour faire un échantillon composite (environ 50 g)
  (Sur place, faire une pesée d'un aliquot de litière fraiche pour mesure %H)

- Prélever des racines de surface dans le cadre 10*10 cm, et découper en fragments aux ciseaux pour faire un échantillon composite (environ 70 g)
  (Sur place, faire une pesée d'un aliquot de racines de surface fraiches pour mesure %H)

- Séparation sol et (débris + racines) par tamisage maille 0.5 cm puis tamisage du sol à 2 mm
  (Sur place, faire une pesée d'un aliquot de sol frais pour mesure %H)

200 g, maille 0.5 cm pour les nématodes (conserver au frais sur Montpellier)
150 g, maille 2 mm pour le dosage du phosphore + biomasse microbienne + bactériologie (conserver sec, pédothèque sur Montpellier)
60 g, maille 2 mm Minéralisation N (50 g frais + 10 g pour pédothèque)
30 g, maille 2 mm pour les analyses de biologie moléculaire des bactéries et champignons (-80°C)

- Prélever les racines contenues dans le sol (entre 10-20 g)

- Prélèvement des nodules sur racines d'acacia (traitement T0 et T6)
  3-5 nodules par arbre à mettre dans un tube de 2 ml (quelque soit la distance à l'arbre)

  Si possible, ne pas mélanger les deux arbres qui servent à faire le composite pour les analyses de sol (il faut pouvoir identifier à partir de quel arbre le prélèvement de nodules à été fait) soit 6 arbres prélevés par traitement

  Prélever des nodules dans le compartiment racines de surface et racines du sol (si nodules présents)

  Si la désinfection ne peut pas être faite sur place pour tous les échantillons, privilégier les nodules présents dans les racines de surfaces et ramener les autres nodules à 4°C pour une désinfection sur Montpellier

  Diamètre nodule environ 3 mm (attention avec les nodules trop gros qui peuvent être plus âgés et nécrosés)

PROTOCOLE DE DESINFECTION DES NODULES
Bien laver les nodules à l'eau
Les conserver à 4°C si la stérilisation ne peut pas être faite tout de suite
Stérilisation des nodules pendant 3 min avec CaClO 3% (préparer la solution au dernier moment avec de l'eau stérile, filtration seringue 0.2µ avant utilisation)
Rinçage *3 avec de l'eau stérile
Stockage en tubes de 2 ml dans du glycérol 50% (stérile)
Conserver à 4°C pendant le transport
Conserver ensuite à -80°C

Transport à Montpellier (sol + racines) dans des sachets plastiques
Conservation au frais des échantillons

Traitement dans L2 sol biotrop :

Partie nématodes *(36 éch racines surface + 45 éch de sol= 81 éch)*

Elutriation sur 200 g de sol frais
Elutriation sur 20g racines de surface

Partie biologie moléculaire

Pour le sol : (45 éch)
1g de sol frais dans epp (* 4 aliquots), puis stockage -80°C
10 g pour faire une mesure du pourcentage d'humidité
Reste sol à lyophiliser pour PLFA, autre…

Pour les racines (de surface et du sol) et la litière : (36+45+36=117 éch)
Pour les racines du sol
Mesure du pourcentage d'humidité des racines du sol

Broyage à l'azote liquide des racines récupérées dans le sol
Attention = conserver un aliquot de racines du sol pour colorations endoM

Protocole conservation des racines pour la coloration d'endoM : 42 ml d'éthanol + 8 ml d'acide acétique pendant 1h à température ambiante Rincer à l'eau Conserver dans éthanol 70°C, 4°C

Pour les racines de surface et la litière
Broyage environ 30 g de racines de surface ou de litière à l'azote liquide
Attention = conserver un aliquot frais de racines de surface pour les colorations d'endoM

1 g de racines de surface ou de litière dans tubes de 2 ml (* 8 aliquots), puis stockage –80°C (pour laisser possibilité d'étudier les ARN)
Reste des échantillons (racines surface, litière) à lyophiliser pour PLFA, autre…
Mesure du pourcentage d'humidité des racines de surface et de la litière

Minéralisation N *(45 éch)*

60 g de sol frais
Conserver frais pendant le transport. Stockage 10g en sec à la pédothèque à l'arrivée (50 g frais pour les analyses)

Partie dosages *(45 éch)*

100 g de sol frais
Le reste du sol est séché à l'air puis stocké à la pédothèque confinée en attendant les analyses (disponibilité Pi, minéralisation Po, biomasse microbienne, C, N, P microbiens)

Description de l’échantillonnage en photos

Délimitation des 5 points d’échantillonnage autour d’un arbre à l’aide d’un mètre pliable et de pics

Débroussaillage des zones de prélèvements

Identification des zones d’échantillonnage par un cadre 10*10 cm

Prélèvement de la litière (feuilles) dans la zone définie par le cadre

Prélèvement du mas racinaire dans la zone définie par le cadre

Prélèvement d'un cylindre de sol 0-10 cm dans la zone définie par le cadre

L'échantillon composite de sol (10 prélèvements sur 2 arbres) est tamisé à 0.5 cm pour les nématodes et à 2 mm pour les autres analyses

Echantillonnage des racines présentes dans le cylindre de sol

Le mas racinaire de l'échantillon composite est découpé en morceaux avec des ciseaux puis homogénéisé avant de faire la répartition dans les sachets

Les feuilles de l'échantillon composite sont fractionnées à la main puis homogénéisées avant de faire la répartition dans les sachets

Répartition dans les sachets de prélèvements des différentes masses d'échantillons nécessaires pour la réalisation des analyses

SAVANE

Photos savane 1 (noté SB1)

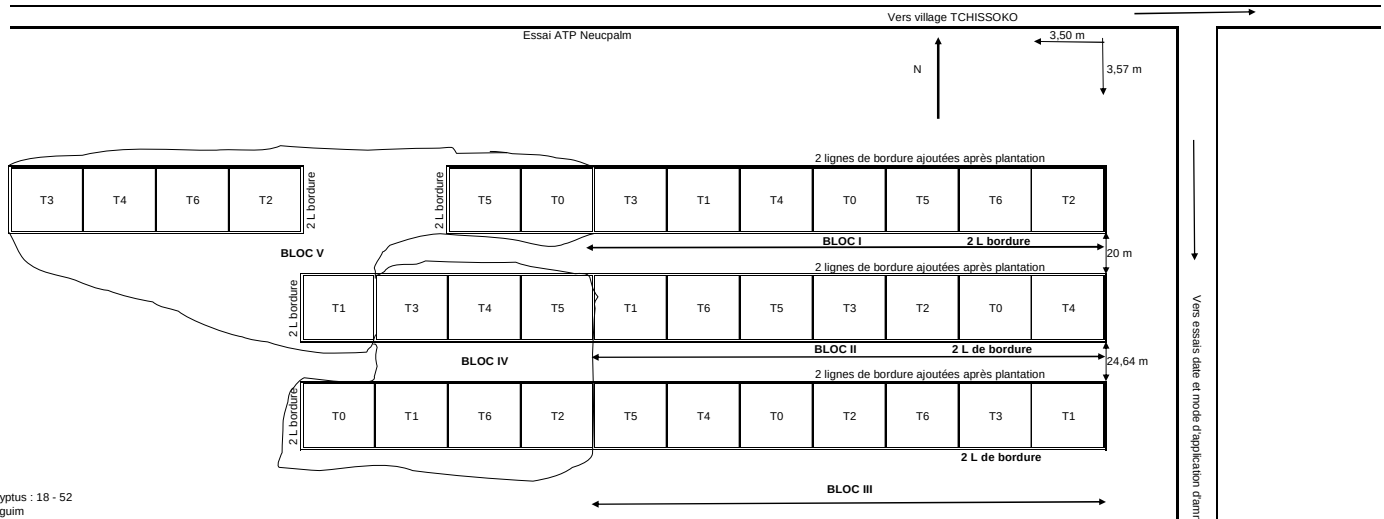
Photos savane 2 (noté SB2)

Photos savane 3 (noté SB5)

Commentaire : cette savane avait été échantillonnée lors de la mission en décembre 2010.

PLANTATION KISSOKO

PLAN DE L'ESSAI



Clone eucalyptus : 18 - 52
Acacia manguim
Placeau élémentaire : 10 X 10 plants
Densité : 800 plant/ha
Ecartemnt : 3,75 m x 3,33 m
7 traitements
5 blocs
Traitements
T0 : Acacia mangium pur (densité 800/ha)
T1 : Eucalyptus 18-52 pur (densité 800/ha, fertilisation starter avec 200 g d'ammonitrate dilué dans 150 ml d'eau par plant, plus une fertilisation complémentaire à l'engrais marqué 15 N prévu à 1 an)
T2 : Eucalyptus 18-52 pur (densité 800/ha, fertilisation à l'engrais marqué 15N pour les eucalyptus des placeaux internes 6 X 6, et à l'ammonitrate 27%N pour les eucalyptus de bordures)
T3 : Melange eucalyptus 18-52 (densité 800/ha fertilisation à l'engrais marqué 15N pour les eucalyptus des placeaux internes 6 X 6, et à l'ammonitrate 27%N pour les eucalyptus de bordures) et Acacia mangium (densité 400/ha)
T4 : Melange eucalyptus 18-52 (densité 800/ha fertilisation à l'engrais marqué 15N pour les eucalyptus des placeaux internes 6 X 6, et à l'ammonitrate 27%N pour les eucalyptus de bordures) et Acacia mangium (densité 400/ha) avec recepage des acacias à 9 m Mel
T5 : Melange eucalyptus 18-52 (densité 800/ha fertilisation à l'engrais marqué 15N pour les eucalyptus des placeaux internes 6 X 6, et à l'ammonitrate 27%N pour les eucalyptus de bordures) et Acacia mangium (densité 200/ha)
T6 : Melange eucalyptus 18-52 pur (densité 400/ha fertilisation à l'engrais marqué 15N pour les eucalyptus des placeaux internes 3 X 3, et à l'ammonitrate 27%N pour les eucalyptus de bordures) et Acacia mangium (densité 400/ha)

Date de plantation : 11 mai 2004
Fertilisation : 16 au 18 juin 2004

NODULES

Des nodules ont été échantillonnés uniquement sur le bloc 5. Sur les autres blocs, aucun nodule n'a été observé sur les racines échantillonnées.

Commentaire : difficultés pour observer des nodules sur les racines de surface (il aurait fallu « nettoyer » les racines pour voir s'il y avait ou non des nodules)

4 échantillons avec nodules (racines du sol) = uniquement sur le bloc 2, principalement traitement T6 (mixte)

- 314 (1 seul nodule) T0B2R2
- 319 T6AB2R1
- 320 T6AB2R2
- 321 T6AB2R3

pour les autres échantillons, 2 tubes avec environ 6 nodules par tube dans glycérol 50%. Stockage à -80°C (congélateur IRD).

NEMATOLOGIE : CECILE VILLENAVE ET ERNEST KOUAKOUA

Extraction de nématodes et comptage sur les compartiments mas racinaire de surface et sol.

MINERALISATION N : JM HARMAND, ALAIN BRAUMAN, JOËLLE TOUCET ET AGNES MARTIN

Commentaire : Le pourcentage d'humidité du sol à été mesuré par Joëlle et Agnès pour la manipulation minéralisation N. Les données sont dans le fichier Excel reprenant la liste des échantillons prélevés pour chaque type d'analyse.

ENREGISTREMENT DES ECHANTILLONS ET STOCKAGE A LA PEDOTHEQUE : MANON VILLENAVE

Un numéro LOA a été attribué aux échantillons stockés dans la pédothèque. Ce numéro est indiqué dans le fichier Excel reprenant la liste des échantillons prélevés pour chaque type d'analyse.

Commentaire : 150g + 10 g environ initialement prévu pour la mesure du pourcentage d'humidité ont été stocké dans la pédothèque L2.

Commentaire : Prévoir des analyses de granulométrie sur les sols de savane à partir des échantillons stockés à la pédothèque. Environ 15-20g pour analyses granulo

BROYAGE A L'AZOTE LIQUIDE ET CONSERVATION DES RACINES (BIOLOGIE MOLECULAIRE SUR CHAMPIGNONS ET MYCORHIZES) : AVEC ESTELLE TOURNIER

- 16/05 Broyage des racines de surface = environ 15g dans bécher de 100 ml en verre remplit
Broyage manuel avec un mortier/pilon
2 bidons d'azote

- 17/05 Broyage d'environ 10 g de litière (1/2 bécher plastique avec les « oreilles » dans L2)
3 bidons d'azote
Nettoyage des racines sol pour enlever les très grosses racines, le sol adhérant. 3 rinçages à l'eau dans les flacons en verre de stockage des racines pour les mycorhizes.

Commentaire : Il est difficile de vraiment bien nettoyer les racines…

- 18/08 Broyage des racines sol. Pour certains traitement peu d'échantillons. Quelques grammes seulement on pu être broyés. Utilisation du petit bécher L2 plastique jusqu'à 10ml quand cela était possible.
2 bidons d'azote

Commentaire : Difficultés pour broyer les échantillons, surtout les feuilles et les racines d'acacia, et donc difficultés pour avoir des échantillons bien homogène. Broyeur à mortier à azote en cours de tests et d'achats pour améliorer cette étape…

Le reste des échantillons de racines non broyées est conservé dans de l'eau à 4°C pour les tests d'observations d'endomycorhizes qui seront fait ultérieurement.

Commentaire : Pas de traitements de racines à l'acide acétique. Stockage pendant 3 semaines dans de l'eau puis dans de l'éthanol 70°C.

Les échantillons broyés ont été aliquotés (environ 1g, 4 tubes par échantillons) et conservés à -80°C (congélateur IRD) dans l'attente des prochaines analyses de biologie moléculaire.

Commentaire : Le reste des échantillons de sol à été conservé à -20°C pour analyses biochimiques (type PLFA, dosages HPLC glucosamine et acide muramique). Pour les échantillons de nature végétale (racines, feuilles), le reste des broyats ont pu être sortis du laboratoire L2 et lyophilisés.

Commentaire : Tests de lyophilisation sur place uniquement sur le bloc 1. Louis doit ramener les échantillons qui n'étaient pas fini de lyophiliser à notre départ en juillet. Les échantillons lyophilisés sur place sont indiqués dans le fichier Excel reprenant la liste des échantillons prélevés pour chaque type d'analyse.

Merci à tous les gens qui ont participé à l'échantillonnage : André, Chris, Daniel, Louis, Serge, Sylvain, et bien sûre Manon, qui manie le marteau comme personne !!!
Merci à Tiburce pour les tests de lyophilisations.

ESTIMATION DU BUDGET DE LA MISSION

	CIRAD	Eco&Sols	Total
Budget total (euros)	3000	4000	7000

	Agnès	Manon
Billets avion	1289	1289
Indemnités éloignement (?)	400	0
Sur place	254.96	111.6
Frais embarquement		20.58
Hôtel		111.86
Taxi France (?)	70	
Passeport		86

Somme dépensée (euros)	2013.96	1619.04	3633
Reste à dépenser (euros)	986.04	2380.96	3367

Un budget de 7000 euros avait été prévu dans le projet pour 2 missions au Congo. Le somme dépensée est de 3633 euros (il reste des incertitudes sur les indemnités d'éloignement et le budget pour le taxi). Il reste donc un peu plus de 3000 euros de budget de mission.

FICHIERS ANNEXES

Fichier Excel avec la liste des échantillons, les pourcentages d'humidité et les numéros de LOA.