



Réponse des communautés microbiennes du sol à l'apport de résidus de culture : influence des pratiques agricoles et lien avec le fonctionnement biologique du sol

Noémie Pascault

► To cite this version:

Noémie Pascault. Réponse des communautés microbiennes du sol à l'apport de résidus de culture : influence des pratiques agricoles et lien avec le fonctionnement biologique du sol. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS020 . tel-00582567

HAL Id: tel-00582567

<https://theses.hal.science/tel-00582567>

Submitted on 1 Apr 2011

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.

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

pour obtenir le grade de **Docteur de l'Université de Bourgogne**

en Sciences de la Vie

Spécialité : Ecologie Microbienne – Agroenvironnement

par **Noémie PASCAULT**

Réponse des communautés microbiennes du sol à l'apport de résidus de culture : influence des pratiques agricoles et lien avec le fonctionnement biologique du sol.

Le 13 Juillet 2010

Jury

CLEYET-MAREL Jean-Claude – Directeur de Recherche, INRA, Montpellier	Rapporteur
LATA Jean-Christophe – Maître de Conférence, UPMC – Paris VI, Paris	Rapporteur
BISPO Antonio – Ingénieur, ADEME, Angers	Examineur
CUNY Philippe – Maître de Conférence, Université de la Méditerranée, Marseille	Examineur
NICOLARDOT Bernard – Professeur d'Agronomie, AgroSup, Dijon	Examineur
REDECKER Dirk – Professeur de Microbiologie Environnementale, Université de Bourgogne, Dijon	Président du jury
RANJARD Lionel - Directeur de Recherche, INRA, Dijon	Directeur de thèse
MARON Pierre-Alain – Chargé de Recherche, INRA, Dijon	Co-directeur de thèse

Laboratoire d'accueil : UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement (MSE), INRA / UFR des Sciences de la Terre et de l'Environnement, Université de Bourgogne. 17 rue de Sully – BP 86510 – 21065 Dijon Cedex

Je tiens tout d'abord à remercier vivement les rapporteurs, Jean-Claude Cleyet-Marel et Jean-Christophe Lata, ainsi que les examinateurs, Antonio Bispo, Philippe Cuny, Bernard Nicolardot et Dirk Redecker, qui ont accepté d'évaluer ce travail et qui me permettent de soutenir à cette période de « trêve estivale ».

Je remercie également l'ADEME et la région Bourgogne pour avoir cofinancées ce travail. Et j'en profite pour remercier l'INRA, et particulièrement Philippe Lemanceau, directeur de l'UMR MSE, pour m'avoir accueilli dans leurs locaux.

Mais finalement, que serait une thèse sans directeurs de thèse ? Je tiens donc à remercier plus que vivement Lionel et Pierre-Alain, tout d'abord de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse, mais aussi de m'avoir laissée une grande liberté pendant ces 3 ans et demi, de m'avoir fait confiance, de m'avoir soutenu dans les bons et mauvais moments, de m'avoir donné un environnement optimum pour la réalisation de cette thèse et mon épanouissement scientifique (environnement optimum : à croire que je m'assimile à un résidu de culture au bout de ces 3 ans et demi... !). Mais aussi merci 1000 fois d'avoir fait tout votre possible pour que je puisse m'envoler vers de nouveaux horizons. Nouveaux horizons qui me permettront d'être la première sur les pistes de ski cette année !

Je tiens à présent à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer pendant cette thèse.

Tout d'abord, je remercie Bernard Nicolardot qui, finalement, aura suivi ma thèse de A à Z, de la mise en place de l'expérimentation à Mons, en passant par mon comité de pilotage, jusqu'à membre du jury. Ce fut un plaisir de travailler avec vous, autant pour votre réactivité à tout instant que vos connaissances en la matière ... organique !

Je n'oublie pas ceux qui sont de l'autre côté de la rue, au 3^{ème} étage en plus ; merci à Jean Lévêque, Olivier Mathieu et Marie-Jeanne Milloux, de m'avoir fait découvrir le monde de la boulette, mais aussi celui de l'isotopie. Merci aussi pour les conseils et lumières sur le monde de la géochimie.

Merci aussi à Catherine Hénault pour les analyses effectuées sur les gaz qui m'ont permis d'élargir ma vision de microbiologiste.

Je remercie Christophe Mougel de m'avoir appris un nouveau mode de langage : le ATGC ! Toutes ces discussions en 4 lettres m'ont été très bénéfiques et m'ont permis de communiquer avec Richard Christen, que je remercie tout autant pour m'avoir évité de blaster à la main 1 million de séquences.

Je voulais aussi remercier Pascal Farcy, qui s'est occupé de la parcelle mise en place sur Epoisses, pour son implication et sa gentillesse. Au niveau terrain, je tiens à remercier aussi Céline Faivre pour sa participation aux prélèvements, bien que les moustiques aient été de la partie.

Mes remerciements vont aussi du côté de Montpellier pour Laetitia Bernard, qui a bien voulu me transmettre son savoir faire du DNA-SIP, ce fut un vrai plaisir d'interagir avec toi, un enrichissement scientifique de tout instant qui j'espère continuera.

Je profite de passer par Clermont-Ferrand pour remercier Sébastien Fontaine d'avoir participé tous les ans à mon comité de pilotage et de m'avoir apporté ses lumières sur le priming effect.

Mes remerciements remontent ensuite du côté de Paris pour aller voir Lauric Cécillon, qui m'a offert la possibilité de faire de la NIRS lorsqu'il était au CEMAGREF de Grenoble. Mais quelle énergie et quel investissement ! Très contente de cette collaboration, j'ai appréciée de travailler avec une personne si dynamique qui m'a fait découvrir un autre monde. Merci aussi à Jean Jacques Brun de m'avoir accueilli au laboratoire du CEMAGREF de Grenoble.

Tant qu'à monter vers le Nord, j'irais jusqu'à Cork pour remercier David, ben oui c'est bien grâce, ou à cause de toi si j'en suis là, à toi de choisir ! Quel modèle pendant ce stage de maîtrise, la recherche en était devenue une évidence pour moi. En tout cas, merci pour tout ce que tu m'as appris, surtout d'un point de vue technique, c'est sûr je n'en serais pas là sinon.

Je tenais aussi à remercier Jean-Paul Lemaître de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner. Ce fut une vraie découverte et une très bonne expérience. Merci pour ta confiance. J'en profite pour remercier Evelyne et Babeth pour la préparation des TPs, quel gain de temps énorme !

De retour au labo, je n'oublie pas d'adresser mes remerciements particuliers à mes deux stagiaires : Chloé et Aurore, ainsi qu'à Aziza pour avoir participer à mes travaux de thèse. Merci pour cette aide précieuse. Je suis fière de voir que vous avez décidé toutes les 3 de continuer dans la recherche.

Je ne peux oublier de citer les personnes qui nous facilitent la vie au quotidien afin que nous puissions nous abandonner à la recherche, merci Christine, merci Virginie, merci BLB, merci LES secrétaires : Catherine, Fabienne, Sylvie et Stéphanie, sans oublier Martine pour les premières années.

Je tiens à adresser un clin d'œil tout particulier aux gens de mon équipe : Ams, Nikos, Virginie, Milled, Sam, Mélanche, Fafa, Tiffanie, Lionel et PAM et tous les gens de passage comme Vincent, Pascal ou le pti Guillou qui nous amènent un peu de fraîcheur à chaque venue. Un merci particulier à Fafa, tu es tellement loin de notre domaine d'écologiste microbien que tu me permettais d'avoir des discussions diverses et variées, des moments de détente dans ces « grandes » journées de thésard (!) qui, il faut le dire, étaient sublimées par un humour exceptionnel !

En parlant de personnes de passage, je ne t'oublie pas JEF, une sacrée bouffée d'oxygène quand tu venais, mais surtout une bonne tranche de poilade ! J'en profite pour faire un clin d'œil à notre Mamito qui savait si bien nous accueillir.

C'est pareil pour toi Steph, voir des scientifiques hors contexte, ça change la vision des choses ! Merci en tout cas à toi d'avoir initié dans ma tête la possibilité de faire un post-doc.

Je voulais aussi remercier celles qui sont dans la même barque que moi depuis le début de la thèse : Didine et Marie, on se sent toujours moins seule dans les innombrables incompréhensions du thésard ! De même, j'ai une pensée particulière pour mes copines de « barque » qui sont dispersées en France, voir expatriée au Québec : Caro, Momo et Clo.

Ai-je terminé mes remerciements ? Bien sûr que non, comment oublier ce mémorable bureau 107 !! Finalement, ce ne sont pas les plus faciles à écrire, tellement je pourrais en dire. Certains diront que nous étions trop fusionnels, mais je pense que travailler dans une telle ambiance nous a permis d'accomplir de grandes choses. Comment oublier ces échanges enflammés sur R avec des courses de recherche de commande ?! Ces discussions interminables sur la qPCR, vous savez ce que j'en pense ! Regarde petite Mélanoche ce que nous avons fait de toi : un joli petit Stitch ! Aussi bien adorable qu'argneuse, sache qu'on est très fiers de toi avec Sam ! Et toi Sam, comment as-tu pu tenir avec nous deux dans le bureau finalement ?! Nous avons accueilli beaucoup de VIP dans ce bureau qui ont engendré une vraie cohésion (enfin pas toujours !) ainsi que des débats intenses très riches culturellement, entre autre je voudrais citer : Bob, Roger, Hervé, Bruno, Mélodie, le père Noël, la chanson du dimanche, Ghinzu... Je ne suis pas fière de partir et de vous abandonner à votre triste sort, sans compter cette ouverture musicale que je vous apportais et qui sera à jamais perdue... ! Merci de tout cœur à vous deux d'avoir été mes collègues et amis de tous les instants.

Pour terminer, je veux adresser ma reconnaissance toute particulière à ma grande famille, ce n'est pas depuis 3 ans que vous me soutenez mais bien depuis que j'ai commencé mes études il y a 23 ans ! Toujours le petit mot qu'il faut quand il faut, vous êtes ma bouffée d'oxygène. Plus particulièrement, merci à mes parents qui m'ont permis de faire des études, vous m'avez toujours fait confiance et donné les moyens de réaliser mes projets, je ne serais comment vous en remercier. Merci très sincère à mon Cha, à Rom1 et Cindy pour être ma source d'énergie inépuisable. Sans oublier Chloé et Pauline, comment aurais-je tenu sans toutes ces rigolades cette année ? Vous restez mon meilleur public.

Et bien sûr toi Nico, toujours là pour me soutenir et m'encourager. Cette thèse n'aurait pas été la même sans toi. Je ne vois qu'une chose, à ton tour de rentrer dans le monde merveilleux de la thèse pour que je puisse espérer te rendre la pareille !

Résumé

A l'échelle de l'agro-écosystème, la productivité primaire est sous la dépendance du recyclage des matières organiques du sol (MOS) par l'action des organismes indigènes décomposeurs, qui minéralisent les composés organiques libérant ainsi les nutriments nécessaires à la croissance végétale. A une échelle plus globale, le recyclage des MOS détermine les flux de carbone entre le sol et l'atmosphère, avec des conséquences majeures sur la qualité de l'environnement et les changements globaux. Malgré le rôle central des microorganismes indigènes dans ces processus, la composante microbienne est encore mal connue et souvent considérée comme une boîte noire en termes de diversité et de fonctionnalité. Par conséquent, pour mieux comprendre et prédire l'évolution des MOS et donc les flux de carbone (C) dans les agro-écosystèmes, il est nécessaire de mieux connaître les populations et les mécanismes microbiens impliqués dans leur dégradation et transformation. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était de progresser dans la connaissance de la réponse des communautés microbiennes telluriques à l'apport de résidus de culture. Cette réponse des communautés microbiennes a été abordée en termes de (i) succession des populations impliquées dans les processus de dégradation de ces MOS (matières organiques fraîches), (ii) lien avec leur fonction de dégradation et répercussion sur la dynamique des matières organiques, et (iii) rôle dans les processus de stockage/déstockage du carbone *via* les processus de « priming effect ». Différents paramètres pouvant moduler la dégradation des résidus et la dynamique des communautés ont été pris en compte : modalité d'apport des résidus (pratiques culturales), qualité biochimique des résidus (différentes espèces végétales), et température. La stratégie globale de recherche développée repose sur des expérimentations de terrain et au laboratoire impliquant différentes échelles spatiales (du microcosme de sol à la parcelle agronomique) et temporelles (du temps de génération microbien aux cycles culturaux). La réponse des communautés microbiennes à l'apport de résidus a été évaluée par l'utilisation de méthodes moléculaires permettant de caractériser sans *a priori* la diversité des microorganismes du sol (empreintes moléculaires, clonage/séquençage, séquençage haut débit). En parallèle, un suivi quantitatif et qualitatif de la matière organique du sol, par des méthodes de biochimie ou de spectroscopie, a été réalisé afin d'établir le lien entre la dynamique des communautés microbiennes et le devenir de la matière organique dans le sol.

Les deux premiers chapitres du manuscrit portent sur des expérimentations réalisées au terrain (conditions naturelles) afin d'évaluer l'influence de la localisation des résidus (résidus de blé incorporés vs. laissés en surface ; site expérimentale INRA Mons) d'une part et d'autre part de la qualité biochimique des résidus (résidus de blé, colza et luzerne incorporés, site expérimentale INRA Epoisses) sur la dynamique des communautés microbiennes du sol. Les résultats obtenus mettent en évidence une forte influence de la localisation comme de la qualité biochimique des résidus sur les successions de populations microbiennes induites suite à l'apport. Des populations/groupes microbiens stimulés spécifiquement dans chaque modalité ont été identifiés. Les résultats de diversité ont été mis en regard des dynamiques de décomposition des résidus, afin de faire le lien entre les successions de populations et l'évolution des ressources trophiques.

La troisième partie du travail correspond à une expérimentation en conditions contrôlées (microcosmes de sol) nous permettant de coupler des outils moléculaires et isotopiques (ADN-SIP) pour cibler spécifiquement les populations microbiennes activement impliquées dans la dégradation des résidus de culture et les mettre en relation avec les flux de carbone gazeux précisément qualifiés, et plus particulièrement avec la mesure du « priming effect » (fonction de stockage/déstockage des MOS). Le facteur de variation pris en compte a été à nouveau la qualité biochimique des résidus apportés (blé, luzerne). Les taux de minéralisation des résidus observés (luzerne > blé) ont été reliés à des dynamiques de populations spécifiques du résidu apporté. D'autre part, le déstockage du carbone du sol engendré par l'apport de résidus était aussi modulé par la qualité de l'apport et relié à des dynamiques de populations spécifiques du résidu apporté. La diversité de ces populations bactériennes a été caractérisée par pyroséquençage afin de mieux identifier les populations impliquées et leurs attributs écologiques.

L'ensemble des travaux a permis d'identifier les successions populationnelles des microorganismes qui sont impliquées dans la dégradation des résidus de culture apportés dans les sols. La diversité de ces populations mais aussi la dynamique de leurs successions ont été démontrées comme étant fortement influencées par les pratiques agricoles mais aussi par la qualité biochimique des résidus. En parallèle, les mesures de flux de CO₂ couplées à des techniques d'isotopie ont permis de relier ces modifications de diversité microbienne avec le turn-over des MOS mais aussi avec les potentialités de stockage/déstockage de C dans le sol.

LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	15
CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	21
I - DESCRIPTION DES ACTEURS PRINCIPAUX	22
1. <i>Le sol</i>	22
1.1. L'objet sol : une matrice physique et chimique complexe, hétérogène mais structurée	22
1.2. Le sol : une niche écologique	23
1.3. Le sol : un réservoir de diversité	24
1.4. Le sol : une source de fonctions environnementales.....	24
2. <i>La matière organique du sol (MOS)</i>	25
3. <i>Les microorganismes du sol</i>	27
3.1. Fantastique diversité	27
3.2. Implications de la composante microbienne dans la dégradation de la matière organique.....	28
3.3. Attributs écologiques de la composante microbienne impliquée dans la dégradation de la matière organique.....	29
3.4. Stratégies méthodologiques pour étudier la composante microbienne du sol	30
3.4.1. Densité microbienne	30
3.4.2. Activités enzymatiques, métaboliques et cataboliques	31
3.4.3. Analyse des phospholipides à acides gras (PLFA).....	32
3.4.4. Approches moléculaires basées sur l'ADN de sol	33
II - IMPACT DES APPORTS DE RESIDUS DE CULTURE DANS LES AGROSYSTEMES SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES TELLURIQUES	36
1. <i>Minéralisation des résidus de culture dans le sol</i>	36
2. <i>Influence de l'apport de résidu de culture sur les communautés microbiennes du sol</i>	37
3. <i>Paramètres influençant les processus de dégradation de la MOF dans le sol</i>	37
3.1. Influence de la qualité biochimique des résidus de culture	37
3.2. Influence des pratiques agricoles	39
3.2.1. Influence du travail du sol	39
3.2.2. Influence de l'azote disponible	41
3.2.3. Influence des éléments traces métalliques (ETM)	42
3.3. Influence des facteurs environnementaux	43
3.3.1. Influence de la température.....	43
3.3.2. Influence du pH et de l'humidité des sols.....	45
4. <i>Influence de l'apport de résidus sur les niches écologiques du sol : la détritusphère</i>	46
III - ROLE FONCTIONNEL DE LA DIVERSITE MICROBIENNE DANS LE TURN-OVER DES MATIERES ORGANIQUES DU SOL.....	48
1. <i>Stratégie 1 : développement de méthodologies innovantes pour aborder le rôle fonctionnelle de la diversité microbienne</i>	48

1.1. La caractérisation <i>in situ</i> du métaprotéome microbien du sol	48
1.2. La caractérisation <i>in situ</i> des communautés activement impliquées dans la dégradation de la MO par DNA/RNA-SIP.....	50
2. Stratégie 2 : Développement d'approches expérimentales spécifiques pour aborder le lien entre la diversité des communautés microbiennes et leurs capacités fonctionnelles	53
2.1. Manipulation de diversité	53
2.2. Influence de l'érosion de diversité sur les capacités fonctionnelles des communautés	54
IV - CONCLUSION.....	56

CHAPITRE 2 : INFLUENCE *IN SITU* DE LA LOCALISATION DE RESIDU DE CULTURE DE BLE AU COURS DE LEUR DECOMPOSITION SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DU SOL

ABSTRACT.....	62
I - INTRODUCTION	63
II - MATERIALS AND METHODS	66
1. Site description and sampling	66
2. Soil and plant residue chemical and biochemical determinations	67
3. Extraction and purification of total DNA from bulk soil, detritusphere and plant residues	68
4. Automated-RISA fingerprinting communities	68
5. Statistical analysis	69
6. Clone library construction and sequencing.....	70
7. Sequence analyses and diversity indices calculation	71
8. Nucleotide sequence accession numbers	71
III - RESULTS AND DISCUSSION.....	72
1. Dynamics of residue degradation.....	72
2. Inorganic N dynamics in soil	73
3. Spatial distribution of microbial biomass.....	74
4. Spatial distribution of the structure of bacterial communities	74
5. Dynamics of the structure of bacterial communities colonizing the residue	75
6. Taxonomic composition of the bacterial communities colonizing the residues.....	76
ACKNOWLEDGEMENTS	79

CHAPITRE 3 : INFLUENCE *IN SITU* DE LA QUALITE BIOCHIMIQUE DE RESIDUS DE CULTURE DE BLE, DE COLZA ET DE LUZERNE AU COURS DE LEURS DECOMPOSITIONS SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DU SOL

ABSTRACT.....	89
I - INTRODUCTION	90
II - MATERIALS AND METHODS	93
1. Site description and sampling	93
2. Plant residues determinations	94
3. Soil respiration measurement	94
4. Extraction and purification of total DNA from crop residues	95
5. Automated-RISA fingerprinting communities	95
6. Statistical analysis	96

7. Clone library construction and sequencing.....	97
8. Sequence analyses and diversity indices calculation	97
9. Nucleotide sequence accession numbers	98
III - RESULTS.....	99
1. Dynamics of CO ₂ emission	99
2. Decomposition of plant materials	99
3. Genetic structure of the bacterial communities colonizing the residues	100
4. Taxonomic composition of the bacterial communities colonizing the residues	101
IV - DISCUSSION	103
1. Dynamics of residues decomposition	103
2. Influence of crop residue quality on the genetic structure of the colonizing bacterial communities.....	104
3. Influence of crop residue quality on the taxonomic composition of the colonizing bacterial communities.....	106
V - CONCLUSION	108
ACKNOWLEDGEMENT.....	108

CHAPITRE 4 : STIMULATION DE DIFFERENTS GROUPES FONCTIONNELS MICROBIENS PAR L'APPORT DE RESIDUS DE BLE ET DE LUZERNE DANS LE SOL, CONSEQUENCES SUR LE PRIMING EFFECT..... 118

ABSTRACT.....	121
I - INTRODUCTION	122
II - EXPERIMENTAL PROCEDURES	125
1. Plant culture and ¹³ C-labelling	125
2. Soil, microcosms set up and sampling strategy	125
3. Total and ¹³ C-CO ₂ measurements	126
4. Extraction and purification of PLFA from soil.....	126
5. DNA extraction from soil	127
6. Isopycnic centrifugation and fractionation	127
7. Bacterial-Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis fingerprinting communities.....	128
8. Pyrosequencing.....	129
9. Phylogenetic assignment, alignment and clustering of 16S rRNA gene fragments	129
10. Statistical analysis	130
III - RESULTS.....	131
1. Soil- and residues-C mineralization.....	131
2. Microbial biomass	131
3. Genetic Structure of bacterial communities	132
4. Taxonomic composition of bacterial communities.....	133
IV - DISCUSSION	136
1. Decomposition of plant residues	136
2. Dynamics of the genetic structure of bacterial communities assimilating C derived from indigenous SOM or labeled crop residues	137
3. Diversity and taxonomic composition of the bacterial communities assimilating C derived from native SOM or labeled crop residues	139
4. Relationship between the dynamics of the microbial communities and the priming effect.....	142
V - CONCLUSION	145
ACKNOWLEDGMENTS	145

CONCLUSION.....	147
PERSPECTIVES.....	151
I - PERSPECTIVES GENERALES : COMMENT PROGRESSER DANS LA CONNAISSANCE DE LA REPONSE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DU SOL A UN APPORT DE RESIDUS DE CULTURE.	152
II - PERSPECTIVE PRIORITAIRE : IMPACT DES CHANGEMENTS GLOBAUX SUR L'IMPLICATION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS LA DEGRADATION DES RESIDUS DE CULTURE DE BLE.	154
<i>1. Influence de l'élévation de température sur la minéralisation des résidus.</i>	155
<i>2. Dynamique de la structure génétique des communautés bactériennes au cours de la décomposition des résidus de blé.</i>	157
<i>3. Caractérisation de la diversité des communautés bactériennes</i>	161
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	164
ANNEXES	180

LISTE DES FIGURES

Introduction Générale :

Figure IG.1 : Liens entre Services d'origine écosystémique et Bien-être de l'Homme. Cette figure donne une liste non exhaustive des services fournis par les écosystèmes et les différentes composantes du bien-être qui en résultent.

Figure IG.2 : Cycle du carbone au niveau des agrosystèmes.

Chapitre 1 :

Figure I.1 : Schéma conceptuel représentant l'approche utilisée dans la synthèse bibliographique pour étudier la réponse des microorganismes à l'apport de matière organique fraîche au sol.

Figure I.2 : Le positionnement et la complexité externe et interne du sol.

Figure I.3 : Vue du sol en termes de niches écologiques.

Figure I.4 : Les fonctions environnementales du sol.

Figure I.5 : Composition de quelques résidus végétaux.

Figure I.6 : Modèle schématique de minéralisation de la matière organique fraîche.

Figure I.7 : Schéma conceptuel de la détritosphère.

Figure I.8 : Stratégie expérimentale et résultats attendus de la caractérisation du métaprotéome du sol.

Figure I.9 : Diagramme schématique illustrant les étapes du DNA-SIP (Stable Isotope Probing).

Figure I.10 : Schéma conceptuel de l'implication des populations bactériennes en fonction de leurs attributs écologiques dans les mécanismes du « priming-effect ».

Chapitre 2 :

Figure II.1: Amount of C in remaining wheat residues during decomposition depending on their localization: incorporated (IW) or left at the soil surface (SW).

Figure II.2: Evolution of the soluble compounds, hemicellulose, cellulose and lignin of remaining wheat residues during their decomposition depending on their localization in the soil: incorporated (IW) or left at the soil surface (SW).

Figure II.3: Dynamics of inorganic N in the different soil zones after addition of wheat residues depending on their localisation: incorporated (IW) or left at the soil surface (SW).

Figure II.4: Dynamics of the C microbial biomass in the different soil zones after addition of wheat residues depending on their localization: incorporated (IW) or left at the soil surface (SW).

Figure II.5: Principal component (PC1 x PC2) plots generated from B-ARISA profiles obtained from the residues, the detritosphere, and bulk soil depending on their localization: incorporated (IW) or left at the soil surface (SW).

Figure II.6: Principal component (PC1 x PC2) plots generated from B-ARISA profiles obtained from the residues incorporated (A) or left at the soil surface (B) for each sampling date.

Figure II.7: Principal component (PC1 x PC2) plots generated from B-ARISA profiles obtained from the incorporated residues (IW) and the residues left at the soil surface (SW) for each sampling date.

Figure II.8: Relative distribution of bacterial phyla determined by the affiliation of 16S rRNA sequences from the clones library generated on samples of wheat incorporated to soil (IW) and wheat residues left at the surface (SW) at an early (September 2005), middle (November 2005) and late (March 2006) stage of decomposition.

Figure II.S1 supplemental data. Temperature (°C) at 2.5 and 12.5 cm depth under control soil and rainfall (mm) during the experiment.

Chapitre 3 :

Figure III.1: Soil respiration of C-CO₂ (µg C g⁻¹ soil h⁻¹) following the incorporation of wheat (circle), rape (square), or alfalfa (triangle) residues in soil and in control soil (cross).

Figure III.2: Principal Component Analysis (PCA) of the biochemical quality of crop residues calculated from preprocessed NIR fingerprints

Figure III.3: Principal Component Analysis (PC1xPC2) plots generated from B-ARISA profiles obtained from wheat, rape and alfalfa residues.

Figure III.4: Distribution of 16S rDNA sequences affiliated to different bacterial phyla in the clones library generated from wheat, rape and alfalfa residues at the early (July) and the late (March) degradation stages.

Figure III.S1, supplemental data. Loading matrices of PC1 and PC2 for Principal Component Analysis of NIR fingerprints of all residues (a, b); wheat (c, d); rape (e, f) and alfalfa (g, h) residues. Grey gradation represents loading values from -1 (black) to +1 (white). Threshold values of -0.8 and +0.8 were used for the identification of wavebands explanatory for each principal component represented in Table III.1. Wavenumbers are expressed in cm⁻¹.

Figure III.S2, supplemental data. Rarefaction curves for wheat, rape and alfalfa residues at T22 and T254 days after incorporation to soil, respectively.

Figure III.S3, supplemental data. Microbial C-biomass determined by analysis of the total soil fatty acid (PLFA) content in the soil after incorporation of wheat, rape and alfalfa residue.

Figure III.S4, supplemental data. Rainfall (mm) and atmospheric temperature (°C) during the experiment.

Chapitre 4 :

Figure IV.1: C-CO₂ accumulated during the 120 days of incubation (a) corresponding to total C-CO₂ accumulated in microcosms amended with alfalfa residues, wheat residues and in control microcosms; (b) corresponding to the cumulative mineralization of alfalfa and wheat residues (¹³C-CO₂); (c) corresponding to the cumulative Priming effect calculated in microcosms amended with alfalfa and wheat. Errors bars symbolize standard deviation calculated on triplicates.

Figure IV.2: Principal Component Analysis (PC1xPC2) plots generated from B-ARISA profiles obtained from (a) DNA extract of microcosms amended with wheat residues, and (b) DNA extract of microcosms amended with alfalfa residues. The black labels represent heavy fraction, the grey labels represent light fraction. Numbers represent days of incubation.

Figure IV.3: Principal Component Analysis (PC1xPC2) plots generated from B-ARISA profiles obtained from the heavy fraction of wheat and alfalfa amended microcosms. The black labels represent the wheat treatment and the grey labels represent the alfalfa treatment. Numbers represent days of incubation.

Figure IV.4: Principal Component Analysis (PC1xPC2) plots generated from (a) sequences obtained from light DNA fraction of control at T3, and for both light (grey labels) and heavy (black labels) fractions extracted from wheat and alfalfa amended microcosms at T3, T14 and T60 days, respectively; (b) from phylum illustrative of the repartition of taxonomic diversity observed in (a). In (a) the black labels represent the ¹³C fraction and the grey labels represent the ¹²C fraction.

Figure IV.S1, supplemental data: rarefaction curves of taxonomic diversity determined for sequences obtained for light DNA fraction of control at T3, and for both light and heavy fractions extracted from wheat and alfalfa amended microcosms at T3, T14 and T60 days, respectively.

Perspectives :

Figure P.1 : C-CO₂ cumulé mesuré pendant la période d'incubation (a) dans les microcosmes contrôles ; (b) dans les microcosmes avec résidus de blé ; (c) correspondant à la

minéralisation du résidu ; (d) correspondant au priming effect. Les barres d'erreurs symbolisent les écarts types déterminés sur des triplicats.

Figure P.2 : Analyses en composante principale des profils B-ARISA obtenus pour les communautés bactériennes à (a) 10°C ; (b) 20°C ; (c) 30°C au cours de l'incubation. En vert sont représentées les structures génétiques des communautés bactériennes issues de la fraction ^{13}C , en orange celles de la fraction ^{12}C . T3, T7, T14, T28, T60 et T120 représentent le temps d'incubation en jours.

Figure P.3 : Analyse en composante principale des profils B-ARISA obtenus pour les communautés bactériennes à partir de l'ADN marqué au ^{13}C . Les communautés bactériennes observées à 10°C sont représentées en rose, celles à 20°C en bleu, et celles à 30°C en violet. T3, T7, T14, T28, T60 et T120 représentent le temps d'incubation en jours.

Figure P.4 : Analyse en composante principale des compositions taxonomiques des communautés bactériennes issues de la fraction ^{13}C en vert et de la fraction ^{12}C en orange. Le témoin est représenté en noir. Les 3 températures d'incubation sont notés 10, 20 et 30 pour 10°C, 20°C et 30°C et sont associées à la date d'incubation correspondante représentées par T3 et T60 pour 3 jours et 60 jours.

Figure P.5 : Analyse en composante principale des séquences obtenues par pyroséquençage des communautés bactériennes issues des fractions ^{13}C représentées en vert. En noir, sont représentés les phylums explicatifs des modifications de composition observées entre les différentes températures et dates. Les 3 températures d'incubation sont notées 10, 20 et 30 pour 10°C, 20°C et 30°C et sont associées à la date d'incubation correspondante représentées par T3 et T60 pour 3 jours et 60 jours.

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1 :

Tableau I.1 : Biocénose du sol : ordres de grandeur par famille.

Tableau I.2 : Proportions moyennes des grandes catégories de matières organiques dans la plante et dans le sol.

Tableau I.3 : Principaux rôles des matières organiques dans la qualité des sols.

Tableau I.4 : Liste des techniques permettant l'étude des structures génétiques des communautés microbiennes, leurs principes, avantages et inconvénients.

Chapitre 2 :

Table II.S1 supplemental data. Closest affiliations of 16S rRNA sequences cloned from the DNA extracted from wheat residue incorporated and left at the soil surface for September,

November 2005 and March 2006. The accession numbers for the 16S rRNA sequences were deposited in the GeneBank database (from FJ432290 to FJ432586).

Chapitre 3 :

Tableau III.1: NIR wavebands explanatory for PC1 and PC2 of Principal Component Analysis of NIR fingerprints for all samples and for each residue and their corresponding chemical bonds and biochemical components.

Table III.S1, supplemental data. Closest affiliations of 16S rDNA sequences cloned from DNA extracted from wheat, rape and alfalfa residue for July 2006 and March 2007 (22 and 254 days after incorporation, respectively). The accession numbers for the 16S rDNA gene sequences were deposited in the GeneBank database (from GQ379348 to GQ379673).

Chapitre 4 :

Table IV.1: Microbial C-biomass and contribution of fungal PLFA determined by analysis of the soil fatty acid (PLFA) content in control microcosms and microcosms amended with wheat and alfalfa residues at T3, T14, T28 and T120 days. n.d. for non determined.

Table IV.2: Shannon diversity (H) indices calculated for bacterial communities of control, and for bacterial communities in the heavy and the light fractions of wheat and alfalfa treatments at T3, T14 and T60 days. n.m. for no measure.

Table IV.3: Taxonomic affiliation at the phylum level of the bacterial sequences determined for the control at T3, and for both light and heavy fractions extracted from wheat and alfalfa amended microcosms at T3, T14 and T60 days, respectively. Only the nine major bacterial phyla are represented.

Introduction Générale

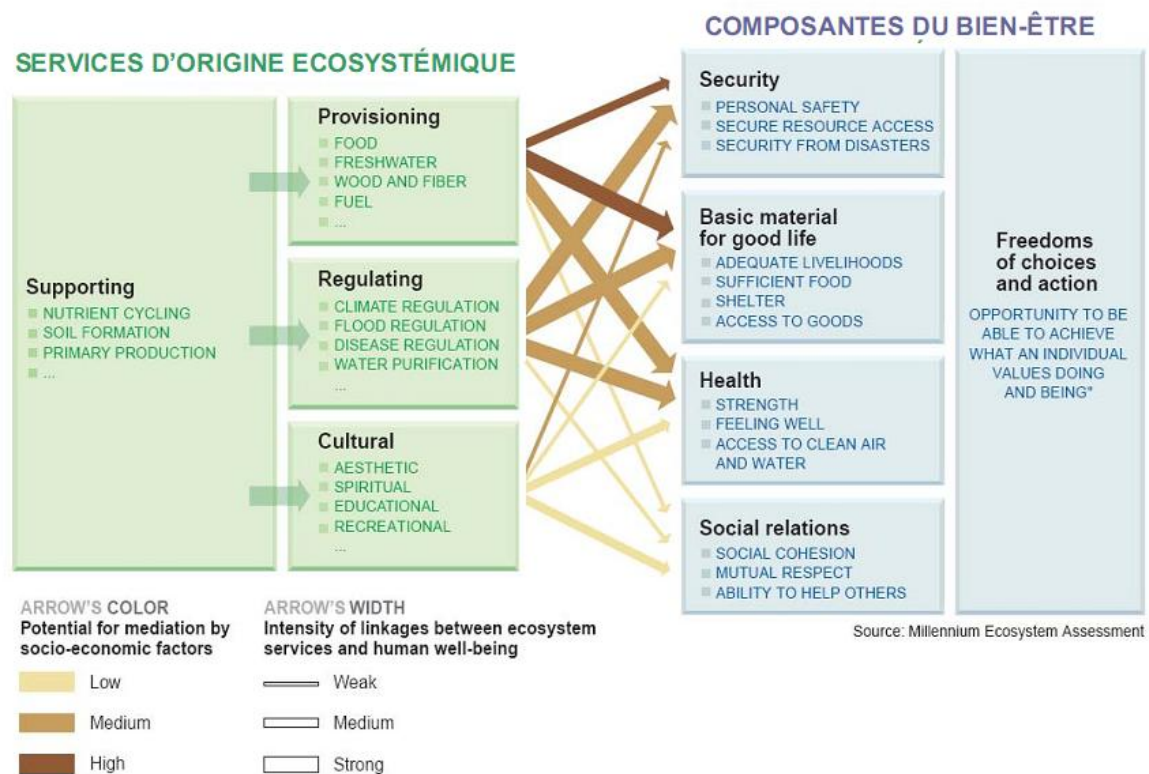


Figure IG.1 : Liens entre Services d'origine écosystémique et Bien-être de l'Homme. Cette figure donne une liste non exhaustive des services fournis par les écosystèmes et les différentes composantes du bien-être qui en résultent.
Source : *Millennium Ecosystem Assessment*

<http://www.millenniumassessment.org/fr/Index.aspx>.

Au cours du XXème siècle, les activités humaines se sont intensifiées et ceci est, en partie, dû à l'augmentation de la population mondiale et au besoin croissant en alimentation associée, mais aussi à cause de la forte demande d'une partie de cette population à développer son bien être [Figure IG.1]. Cette intensification des activités humaines a provoqué une altération de notre environnement et est la cause d'une érosion significative de biodiversité à l'échelle planétaire. L'évaluation des écosystèmes a ainsi montré que le taux d'extinction des espèces a augmenté d'un facteur 10, 100 voire 1000 dans certains cas depuis le début de l'ère industrielle (Lawton et May, 1995; MA, 2005). Une telle perte de biodiversité entraîne une modification des processus biologiques et de la stabilité des écosystèmes (Balvanera et al., 2006). D'un point de vue écologique, le sol représente l'un des plus importants réservoirs de diversité biologique de notre planète et surtout l'un des derniers remparts pour cette biodiversité (Swift, 1998). Il est aussi le lieu de nombreux processus biologiques et écologiques et fournit donc un nombre important de services écosystémiques [Figure IG.1] résultant de la complexité des assemblages taxonomiques et fonctionnels des communautés indigènes et des interactions entre les organismes (Coleman and Whitman, 2005). De façon non exhaustive ces services sont (i) la fertilité des sols via la dégradation de la matière organique et le recyclage des éléments minéraux, (ii) la qualité de l'environnement en terme de réduction de pollutions, (iii) les changements globaux à travers la régulation des émissions de gaz à effets de serre, (iv) l'alimentation humaine à travers la production végétale... Pourtant, le nombre d'études sur la quantification de la biodiversité du sol et sa traduction en fonctionnement biologique est beaucoup plus faible au regard des travaux portant sur la diversité des organismes vivants à sa surface (notamment les plantes) et par conséquent, notre niveau de connaissance reste limité. Ceci est d'autant plus vrai pour les communautés microbiennes indigènes qui sont encore considérées, sur la base d'un postulat proposé par Beijerinck (1913) : « tout est partout » (« everything is everywhere »), comme des organismes ubiquistes présentant une forte redondance fonctionnelle. A ce titre, les communautés microbiennes telluriques apparaissent encore de façon récurrente comme une "boîte noire" fonctionnelle génératrice de flux dont l'intensité ne dépend que de facteurs abiotiques comme la température, l'humidité, le pH..., excluant l'hypothèse que la diversité et la composition des communautés microbiennes ainsi que les interactions trophiques (compétition, commensalisme,...) entre les populations puissent jouer un rôle fonctionnel (McGill, 1996 ; Gignoux et al., 2001).

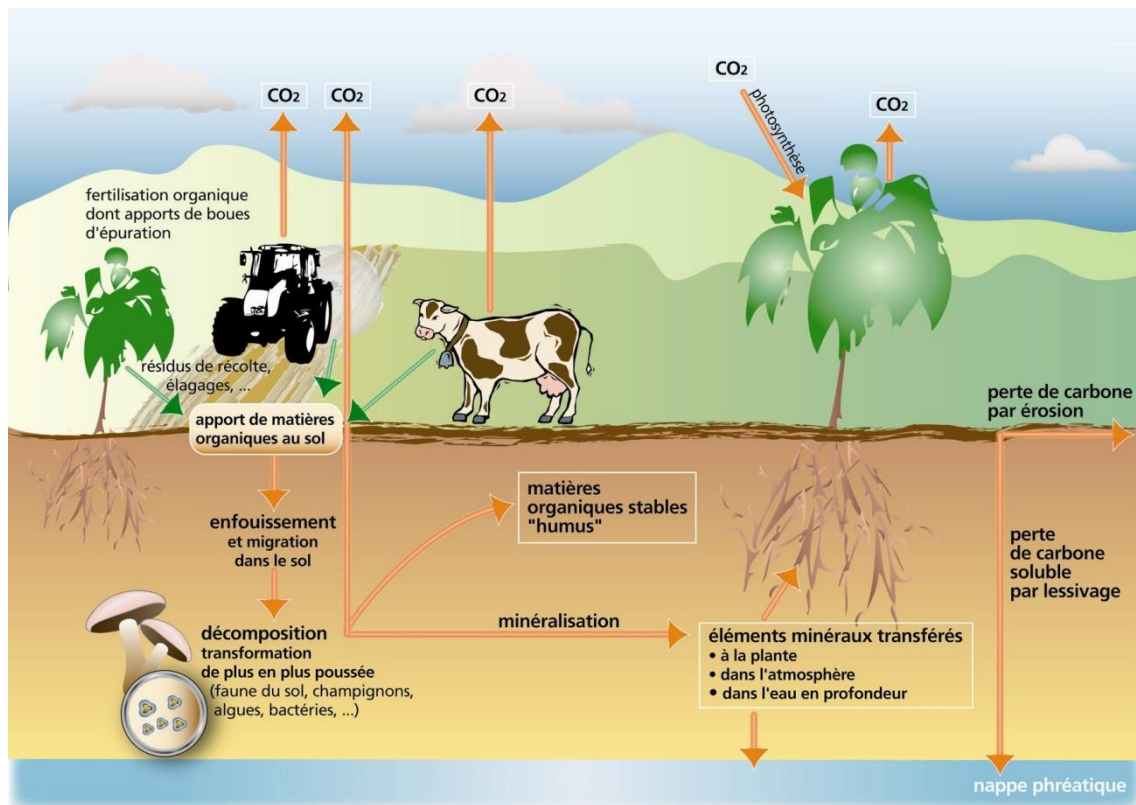


Figure IG.2 : Cycle du carbone au niveau des agrosystèmes. Sur cette figure sont représentées les deux grandes voies du cycle du C : (i) fixation du carbone dans composé organique (photosynthèse), (ii) production de CO₂ ; et plus en détail, le devenir d'apport de matières organiques au sol. *Source : ©INRA - Pascale Inzerillo.*

Il en résulte :

- un manque de connaissances sur la diversité des microorganismes du sol, sa distribution spatiale à petite comme à grande échelle, et son implication dans le fonctionnement du sol (Ranjard et al., 2010).
- une prise en compte insuffisante, voire absente, de la diversité microbienne dans les modèles actuels permettant de quantifier les flux de matière et d'énergie (Ingwersen et al., 2008).

Parmi les activités microbiennes qui conditionnent le fonctionnement biologique du sol et plus largement des écosystèmes, celles liées au cycle du carbone nous ont particulièrement interpellées car elles ont un rôle central dans les flux de matière et d'énergie au niveau de la biosphère. En effet, avec des stocks atteignant à l'échelle planétaire 750Gt dans l'atmosphère, 650Gt dans la végétation et 1500Gt dans les sols et des échanges moyens annuels entre biosphère continentale et atmosphère s'élevant à 120GtC/an, les flux de carbone engendrés prennent une part importante dans le fonctionnement des écosystèmes (IPCC, 2001). Parmi les différentes sources carbonées métabolisées contribuant à ces flux de carbone, une part non négligeable est représentée par les résidus végétaux qui retournent au sol. Au niveau des agro-écosystèmes, une pratique régulière, qui a tendance à se développer, est l'incorporation des résidus de culture au sol qui a déjà démontré son efficacité pour augmenter les stocks de carbone dans le sol, réduire le lessivage des nitrates et par conséquent améliorer la fertilité des sols [Figure IG.2].

Si on regarde plus précisément le cycle biogéochimique du carbone, le dioxyde de carbone (CO_2) est emmagasiné dans les plantes grâce à la photosynthèse. Les résidus de plante se retrouvent ensuite dans le sol où très souvent ils sont consommés par des petits invertébrés, des bactéries et/ou des champignons qui les décomposent et les convertissent soit (i) en substance humique à travers des processus biochimiques et abiotiques permettant de stocker le carbone dans le sol, soit (ii) en dioxyde de carbone et en eau [Figure IG.2]. Le flux majeur de carbone dans l'atmosphère est libéré par ces processus de décomposition appelée respiration hétérotrophe. Même si en volume, le CO_2 ne représente qu'une très faible proportion de l'atmosphère (0,036%), il est cependant important car, avec la vapeur d'eau, le méthane et d'autres gaz à « effets de serre », il absorbe les rayons infrarouges. Il laisse passer la lumière solaire jusqu'à la surface de la terre, mais il empêche le retour du rayonnement

ENCADRE 1 : Historique de l'Ecologie Microbienne.

Le premier symposium en écologie microbienne a eu lieu en 1957, le premier ouvrage sur cette discipline fut publié par Brock en 1966 et les premiers journaux scientifiques destinés à l'écologie microbienne (*Applied and Environmental Microbiology* et *Microbial Ecology*) sont apparus en 1974 et 1976. Comment expliquer cet intérêt tardif ?

Parmi les disciplines étudiant les différentes formes de vie sur notre planète, l'écologie microbienne a été la dernière à s'établir, dû essentiellement à la découverte tardive des microorganismes. En effet, même si plusieurs chercheurs suspectaient l'existence et le rôle des microorganismes dans les maladies, il faudra attendre les premières observations au microscope par Antonie van Leeuwenhoek pour pouvoir réellement les observer (1676). La microbiologie fait alors son apparition permettant l'isolement, l'étude et l'identification des microorganismes.

Le concept d'écologie microbienne apparaît alors fin du XIX^{ème} - début du XX^{ème} siècle, lorsque quelques microbiologistes se penchent sur le rôle écologique des microorganismes en étudiant le rôle de ces derniers dans les cycles du carbone, de l'azote et du soufre qui se déroulent dans le sol et dans les eaux. Entre autre, Sergei Winogradsky découvrit que de nombreuses bactéries pouvaient incorporer du CO₂ dans la matière organique comme les organismes photosynthétiques et étudia la décomposition de la cellulose. Beijerinck et Winogradsky développèrent la technique d'enrichissement des cultures et l'utilisation de milieux sélectifs, qui sont tellement importants en microbiologie. Jusque dans les années 1960, les études portaient donc essentiellement sur des cultures microbiennes monoxéniques et visaient en particulier à définir des milieux et des procédures permettant l'isolement de souches microbiennes issues de l'environnement, dont la physiologie et les conditions de développement étaient ensuite étudiées *in vitro*.

Dans les années 1980-90, les indications de la vaste diversité microbienne dans les sols qui est non cultivable (moins d'1% des microorganismes observés sous microscope sont cultivables) (Bakken et al., 1985 ; Torsvik et al., 1990 ; Amann et al., 1995), ainsi que l'abstraction des interactions avec d'autres organismes et celles avec leur habitat (initié par Brock en 1987) ont stimulé le développement de progrès méthodologiques pour s'affranchir des méthodes de culture et avoir un meilleur accès à cette microflore et passer le niveau d'intégration de l'individu aux populations voir à la communauté.

En 1985, Pace et al. introduisent une approche basée sur l'extraction, l'amplification, le clonage et la caractérisation de gènes d'ADNr directement des environnements naturels et ouvrent la voie à des innovations techniques majeures en biologie moléculaire et en biochimie (électrophorèse, amplification *in vitro* de l'ADN, bio-informatique) permettant l'étude du génome de ces populations (génomique). Beaucoup d'études ont été dédiées à ce type d'approche et ont fourni les bases pour comprendre le monde microbien et son rôle dans le fonctionnement des écosystèmes.

Cependant l'ADN de la microflore ne correspond qu'au potentiel génétique de la communauté et non à son activité. Or un des enjeux des études d'écologie microbienne est de mettre en relation la diversité génétique et les activités de la microflore afin d'étudier et de prédire le fonctionnement des communautés microbiennes et ses conséquences sur l'environnement. C'est pourquoi depuis la fin des années 1990, des progrès continuent d'être réalisés dans le domaine du transcriptome (étude des ARN) et du protéome (étude des protéines) grâce au développement de méthodologies pour extraire, amplifier et caractériser les ARN et les protéines.

Au jour d'aujourd'hui, l'écologie microbienne est connue pour être une science intégrative avec des interconnexions fortes avec la systématique, la génétique, la biochimie, la biologie moléculaire, la physiologie, la modélisation, la paléobiologie, les sciences du sol, la parasitologie, l'épidémiologie... avec des implications importantes dans l'alimentation, la santé publique et l'environnement qui nécessitent encore des avancées technologiques pour améliorer notre compréhension des processus gérés par les microorganismes.

thermique de la terre vers l'espace permettant l'échauffement de l'atmosphère et le maintien de la température terrestre.

Afin de mieux comprendre et gérer le cycle du carbone et prédire les flux associés, des études descriptives et de nombreux modèles mathématiques centrés sur la matière organique du sol et sa dégradation ont été développés (Schlessinger et al., 2000). Malgré l'utilité de ces études ou modèles, leur intérêt écologique est encore limité à cause d'une prise en compte insignifiante de la composante microbienne. Cette dernière est souvent considérée dans les modèles comme un seul pool quantitatif sous forme de biomasse microbienne (Hadas, 2004 ; Shibu et al., 2006) alors qu'elle représente un des acteurs principaux des processus biologiques du sol (McGill et al., 1996). Les études réalisées jusqu'à présent, pour évaluer l'impact de l'apport de matière organique sur la communauté microbienne du sol, se sont essentiellement basées sur des mesures de paramètres quantitatifs globaux comme la biomasse microbienne, le taux de respiration, des mesures d'activités enzymatiques ou de turn-over de carbone et d'azote. Le manque de prise en compte des communautés microbiennes en terme de diversité, de successions populationnelles et de fonctionnalité s'explique par le fait que, parmi les disciplines étudiant les différentes formes de vie sur notre planète, l'écologie microbienne et la microbiologie environnementale ont été les dernières à s'établir, essentiellement à cause de la découverte tardive des microorganismes [Encadré 1 : Historique de l'écologie microbienne]. Il en résulte un retard méthodologique sur la caractérisation des microorganismes du sol *in situ* qui s'explique aussi par les caractéristiques propres du modèle microbien (i) petite taille des organismes, (ii) accessibilité plus ou moins importante des populations au sein d'une matrice hétérogène et structurée comme le sol, (iii) difficulté à résoudre une information constituée de 100 000 à 1 000 000 d'espèces différentes par gramme de sol (Curtis and Sloan, 2005 ; Maron et al., 2007). Toutefois, depuis une vingtaine d'années, les importantes avancées en biologie moléculaire ont permis de mettre au point des techniques qui permettent d'appréhender et de résoudre la diversité des communautés microbiennes du sol *in situ* et sans *a priori* (pour revue voir Ranjard et al., 2000).

Dans ce contexte, afin de pouvoir prédire l'impact des résidus végétaux sur les microorganismes du sol en termes de diversité, de dynamique de communauté et de fonctionnalité et de pouvoir gérer durablement le C dans les sols, il est apparu nécessaire d'identifier les acteurs microbiens impliqués dans la dégradation de cette matière organique fraîche (MOF) mais aussi ceux impliqués dans le turn-over de la MOS. Plus précisément, l'enjeu de cette thèse était de pouvoir relier le devenir des résidus végétaux apportés au sol à

la diversité des populations microbiennes impliquées, tout en intégrant des facteurs agronomiques (pratiques agricoles), biochimiques (types de résidus), et environnementaux (température). Nous nous sommes basés sur une stratégie complémentaire mêlant (i) des expérimentations au champ (conditions naturelles) où nous avons évalué la réponse des communautés microbiennes à un apport de résidus au sol, et (ii) des expérimentations en microcosmes (conditions contrôlées) nous permettant d'utiliser des outils de pointe (ADN-SIP) capables de cibler spécifiquement les populations microbiennes activement impliquées dans la dégradation des résidus de culture et de les mettre en relation avec les flux de carbone gazeux précisément qualifiés, et plus particulièrement avec la mesure du « priming effect » (fonction : processus de stockage/déstockage des MOS).

Le présent manuscrit est composé de 4 chapitres :

- Le **chapitre 1** correspond à une synthèse bibliographique décrivant le contexte scientifique dans lequel s'inscrit cette thèse, tout en pointant les problématiques ayant conduit au travail expérimental présenté dans les chapitres suivant.

- Le **chapitre 2** correspond, grâce à la mise en place d'une expérimentation au champ, à l'étude de l'influence du travail du sol (enfouissement des résidus vs résidus laissés en surface) sur la dégradation de résidus de blé et la dynamique des communautés microbiennes associées. Ce chapitre sera présenté sous la forme d'un article scientifique qui a été accepté pour publication dans le journal *Microbial Ecology*.

- Le **chapitre 3** est consacré à l'étude de la réponse des communautés microbiennes telluriques à l'apport de résidus de culture de différentes qualités biochimiques (blé, colza, luzerne), étude basée à nouveau sur une expérimentation au champ. De même, ce chapitre sera présenté sous la forme d'un article scientifique qui a été accepté pour publication dans le journal *Microbial Ecology*.

- Le **chapitre 4** décrit une étude menée en conditions contrôlées sur des microcosmes de sols et visant à caractériser les communautés bactériennes activement impliquées dans la dégradation de différents résidus de culture (blé, luzerne) et les processus de minéralisation associés. Ce chapitre sera présenté sous la forme d'un article scientifique en cours de préparation.

La dernière partie de ce manuscrit représentera la **conclusion générale** en termes de synthèse des principaux résultats acquis. La partie **perspectives** présentera les premiers résultats d'une étude qui est en cours de réalisation. Elle avait pour questionnement d'évaluer l'effet de la température sur la dynamique et la diversité des populations microbiennes impliquées dans la dégradation des résidus végétaux ainsi que sur leur fonctionnalité.

Chapitre 1 :

Synthèse Bibliographique

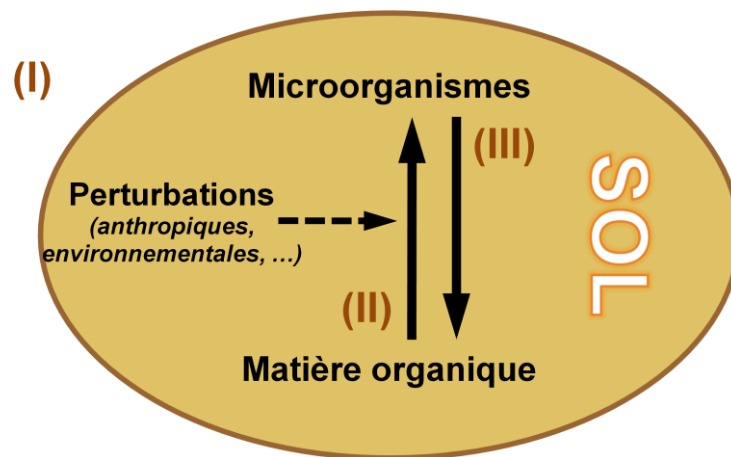


Figure I.1 : Schéma conceptuel représentant l'approche utilisée dans la synthèse bibliographique pour étudier la réponse des microorganismes à l'apport de matière organique fraîche au sol.

La section (I) correspond à une description des acteurs principaux : le sol, la MOS et les microorganismes ; la section (II) traite de l'impact des apports des résidus de culture des agrosystèmes sur les communautés microbiennes telluriques ; la section (III) répertorie le rôle fonctionnel des microorganismes dans le turnover des matières organiques. La flèche en pointillée représente les perturbations extérieures qui peuvent intervenir dans le processus de dégradation de la matière organique par les microorganismes et qui sont prises en compte lors de cette synthèse.

L'objectif de ce chapitre bibliographique est de présenter le contexte scientifique dans lequel se sont inscrits les travaux de thèse, c'est-à-dire d'identifier les travaux déjà réalisés sur la réponse des communautés microbiennes du sol à l'apport de résidus de culture, tout en mettant en évidence les manques à ce niveau et en pointant les questions de recherche qui ont été les bases de travail durant ma thèse. Cette synthèse de la littérature internationale a été structurée en 3 parties décrites dans le schéma conceptuel en Figure I.1.

I - Description des acteurs principaux

Les trois acteurs principaux de notre schéma conceptuel [Figure I.1] sont le sol, la matière organique et les microorganismes. Ce sont les fortes interactions entre ces trois acteurs qui vont déterminer les fonctions, les processus, les cycles biogéochimiques du sol et les services écosystémiques qu'ils fournissent. La première partie de cette synthèse bibliographique est donc consacrée à les décrire d'un point de vue technique et fondamentale.

1. Le sol

1.1. L'objet sol : une matrice physique et chimique complexe, hétérogène mais structurée

D'un point de vue spatial, la pédosphère est la couche superficielle et meuble de la croûte terrestre qui se trouve à l'interface de 4 autres grands milieux naturels de la planète : la lithosphère, l'hydrosphère, l'atmosphère et la biosphère [Figure I.2]. Verticalement, elle s'étend de la roche altérée jusqu'à la surface, qui peut varier de quelques décimètres à quelques mètres sous nos climats tempérés. Horizontalement, elle couvre, de façon presque continue, la surface des continents, seulement interrompue par les affleurements rocheux, les cours d'eau et les constructions de l'homme (Gobat et al., 1998).

Au niveau de sa composition, le sol est une matrice complexe qui est formée [Figure I.2] :

- d'une phase liquide correspondant à une solution chimique complexe nécessaire à la réalisation des réactions importantes qui ont lieu dans les sols ;

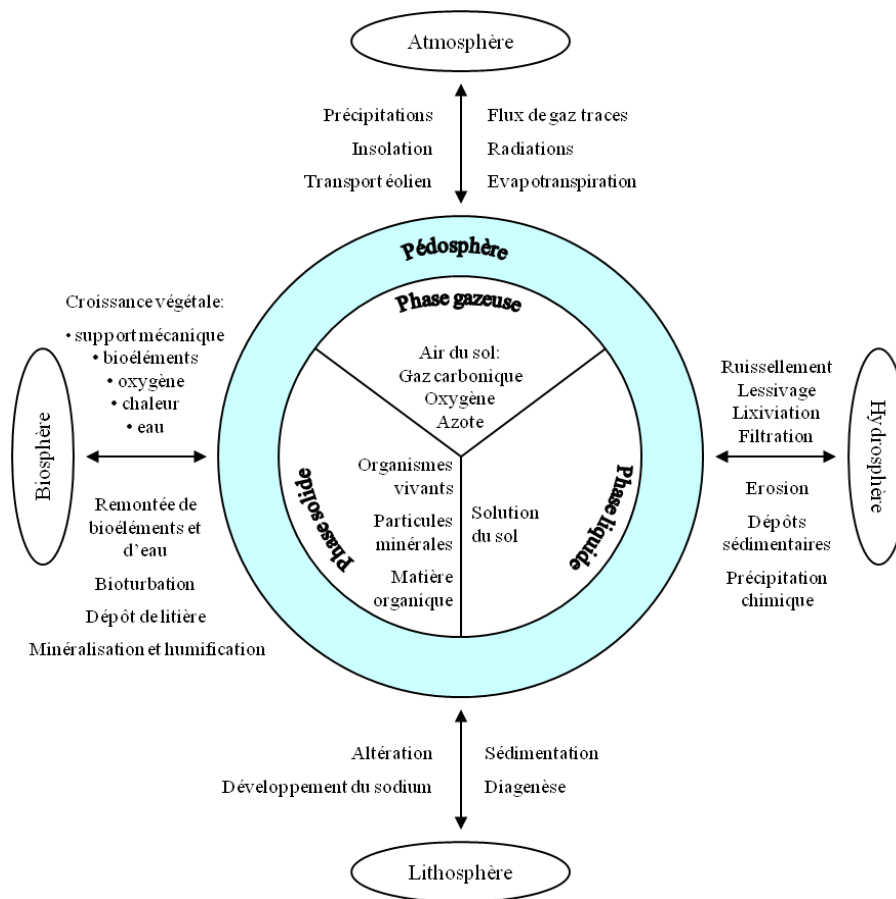


Figure I.2 : Le positionnement et la complexité externe et interne du sol.
Source : Gobat et al., 1998.

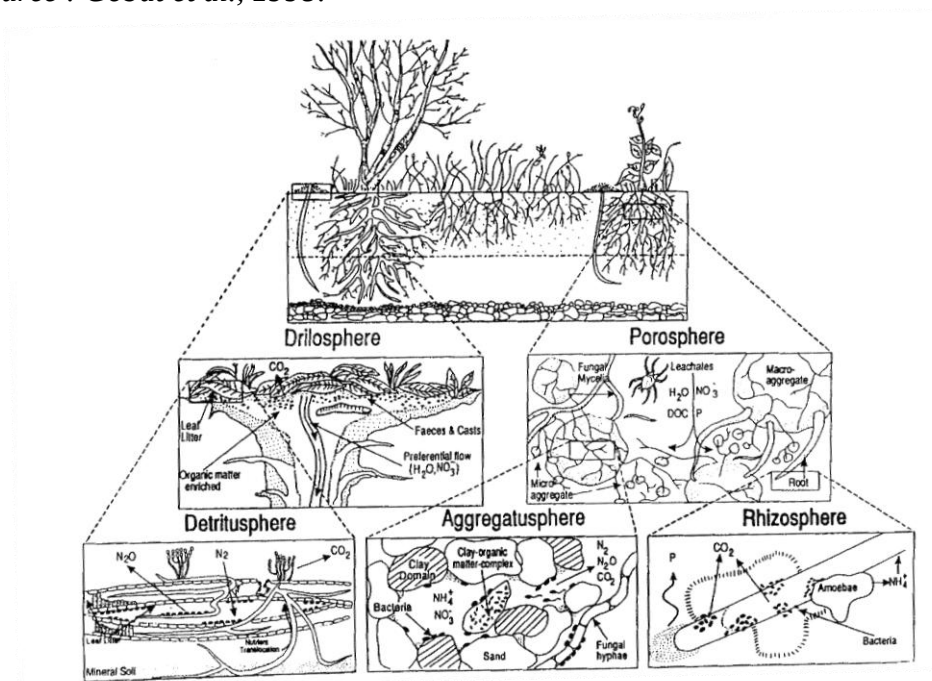


Figure I.3 : Vue du sol en termes de niches écologiques. *Source : Beare et al., 1995, dessiné par Terry Moore.*

- d'une phase gazeuse qui est contenue dans les pores ouverts des sols. Ces pores comprennent des gaz atmosphériques et des gaz libérés lors des réactions chimiques et biologiques ;
- d'une phase solide constituée en majeure partie de particules minérales de taille et de nature minéralogiques différentes. Secondairement, elle est formée de constituants organiques allant de fragments végétaux ou d'animaux à des macromolécules organiques complexes.

En plus de cette complexité multiphasique, les variabilités de texture (composition granulométrique) et de structure (mode d'assemblage des constituants minéraux et organiques) confèrent au sol une importante complexité et une forte hétérogénéité spatiale à petite et grande échelles. L'organisation, qui en ressort, permet l'existence d'une mosaïque de micro- et de macro-environnements (agrégat, motte, parcelle, champ, paysage...) différents en termes de caractéristiques physico-chimiques et structurales qui représentent une multitude d'habitats pour les organismes indigènes (Bruand, 2009 ; Girard et al., 2005). Au niveau des sols cultivés, la structure du sol évolue en permanence sous l'effet de diverses contraintes qui sont liées à l'action des engins et des outils, du climat et des êtres vivants dans le sol. Elles engendrent des processus comme le tassement, la fragmentation, la fissuration, la perforation, la prise en masse, l'effondrement et affectent aussi les caractéristiques physico-chimiques du sol (Girard et al., 2005 ; Richard & Roger-Estrade, 2009).

1.2. Le sol : une niche écologique

L'organisation du sol peut être aussi appréhendée en termes de niche écologique. Ces niches écologiques, dues en majeure partie à des apports de composés carbonés, sont des sphères d'influence où il existe une haute activité biologique. Le turn-over du carbone dans le sol se fait majoritairement au niveau de ces « hots spots » d'activité biologique (Stotsky, 1997). Actuellement, sept principales sphères d'influence (domaines fonctionnels) dans le sol ont été mises en évidence : la détritosphère, la rhizosphère, la porosphère, l'agrégatusphère, la drilosphère, la termitosphère et la myrmecosphère [Figure I.3]. Elles ont été identifiées selon leur origine et leur importance dans les processus et les fonctions régulatrices majeurs du sol comme l'agrégation, la décomposition de la matière organique, les cycles des nutriments, l'activité microbienne et la productivité des plantes (Beare et al., 1995 ; Brown et al., 2000) [Figure I.3]. Au niveau des sols agricoles, la détritosphère (zone sous l'influence des résidus

Tableau I.1 : Biocénose du sol : ordres de grandeur par famille.

Source : <http://www.ifen.fr/donnees-essentielles/sol/le-sol/la-biodiversite-des-sols.html>

		Nombre d'espèces	Taille	Abondance	Biomasse (g / m ²)	Régime alimentaire
Faune du sol						
Microfaune (Microphages consommateurs des colonies bactériennes)	Nématodes	65	0,1 à 5 mm	10 ⁶ à 10 ⁸ / m ²	1 à 30 g/m ²	Champignons, bactéries, débris organiques, algues (action de prédation stimulant le renouvellement de la microflore)
	Protozoaires	68	0,2 mm	10 ³ à 10 ¹¹ / m ²	6 à > 30 g/m ²	
Mésafaune (Broyeurs de feuilles)	Arthropodes inférieurs et enchytraéides	Arthropodes : 140 Enchytraéides : 36	de 0,2 à 4 mm	2 x 10 ⁴ à 4 x 10 ⁵ /m ²	0,2 à 400 g/m ²	Résidus de végétaux, algues, champignons, bactéries
Macrofaune (« Ingénieurs de l'écosystème » : fragmentation des matières organiques et brassage avec les matières minérales)	Taupes, hérissons, lombrics, araignées, myriapodes (mille-pattes), fourmis, ...	Lombrics : 11 Myriapodes : 6 ...	Taille > 1cm (ex : lombrics : 3 à 30 cm, jusqu'à 3m)	Lombrics : 10 à 10 ³ /m ² Myriapodes : 20 à 700 /m ² ...	Lombrics : 20 à 400 g/m ² Myriapodes : 0,5 à 12,5 g/m ² ...	Résidus de végétaux, champignons, bactéries, cadavres d'invertébrés
Microflore du sol (micro-organismes)						
Bactéries	Indispensables au fonctionnement des cycles du carbone et de l'azote	10 ⁴ génotypes microbiens différents /g de sol	de l'ordre du µm	10 ⁸ à 10 ⁹ /g de sol	2 à 200 g/m ²	Matière organique, azote atmosphérique
Champignons	Dégradent la matière organique morte		> 1 µm	10 ⁴ à 10 ⁶ /g de sol	100 à 150 g/m ²	Résidus de végétaux, parasite ou symbiote mycorhizien
Algues	Capables de créer de la matière organique à partir d'éléments minéraux sans photosynthèse		0,2 mm	10 ² à 10 ⁴ /g de sol	5 à 20 g/m ²	Arthropodes

végétaux) et la rhizosphère (zone sous l'influence des racines) constituent les principaux « hots spots » d'activités biologiques (Gaillard et al., 1999).

1.3. Le sol : un réservoir de diversité

Le sol est considéré comme l'habitat majeur de la biosphère terrestre. Il héberge de très nombreux organismes vivants, appelé biocénose, parmi lesquels on distingue [Tableau I.1] :

- les racines des plantes ;
- la faune du sol (lombrics, mollusques, arthropodes, nématodes) qui est principalement dominée par les lombriciens grâce à leur redoutable compétitivité vis-à-vis des ressources trophiques du sol (Girard et al., 2005) ;
- la microflore du sol (détaillée dans la partie I.3) : algues, champignons et bactéries, sans oublier les archées et virus qui restent largement à être explorés et qui sont donc souvent omis dans les inventaires de la biocénose (Fierer et al., 2007b).

Cette composante vivante du sol peut représenter jusqu'à 4% du carbone organique total du sol et est conditionnée par la structure du sol, en raison de son importance pour l'ensemble du fonctionnement physique du sol (circulation de l'eau, de l'air, évolution de la température...) comme décrit en section I.1.1. L'abondance relative et absolue des organismes indigènes du sol est fonction de la taille des organismes et de leur capacité à coloniser les différentes niches disponibles dans la matrice sol [Tableau I.1].

La biocénose du sol commence à être bien décrite, principalement au niveau des macro-organismes, et l'objectif des scientifiques, à l'heure actuelle, est de relier cette forte diversité au fonctionnement des écosystèmes et d'identifier les conséquences de modifications et/ou perte de diversité (Coleman et al., 2005).

1.4. Le sol : une source de fonctions environnementales

Les fonctions environnementales du sol sont multiples [Figure I.4] et participent aux services écosystémiques cités en introduction générale [Figure IG.1] ; entre autre, on retrouve des fonctions liées à la production agricole, à la régulation des flux, à la dynamique des écosystèmes, à la protection contre les pollutions et au support physique des activités

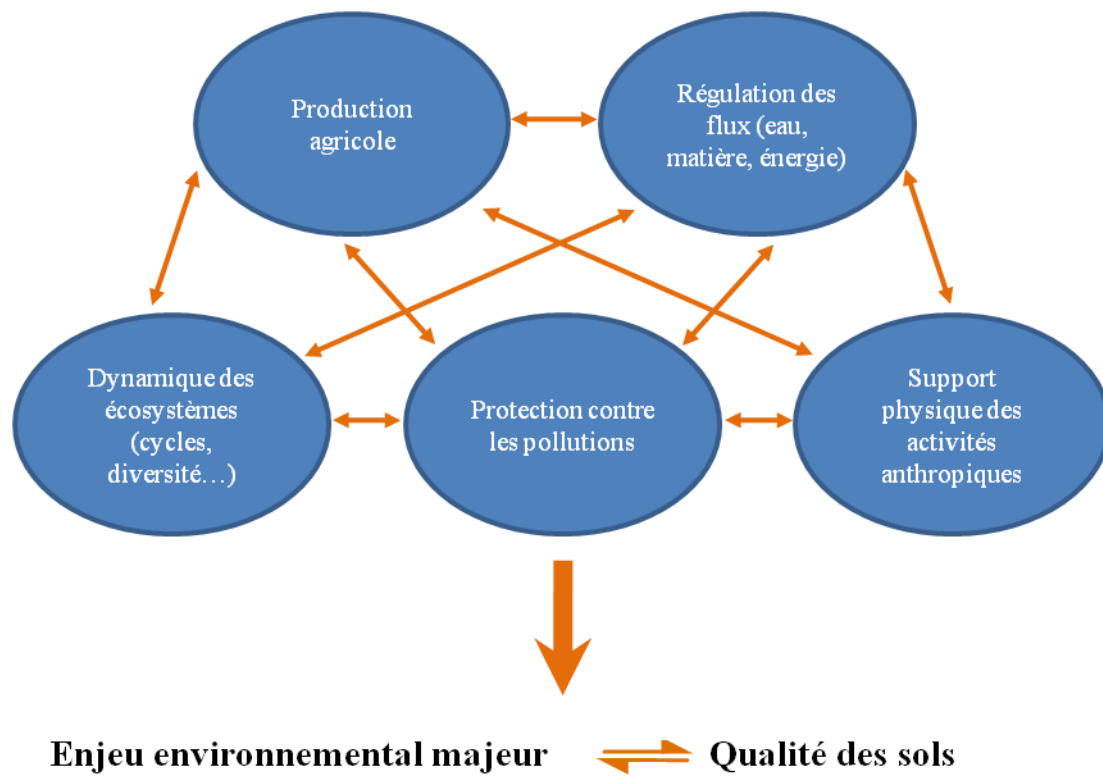


Figure I.4 : Les fonctions environnementales du sol.

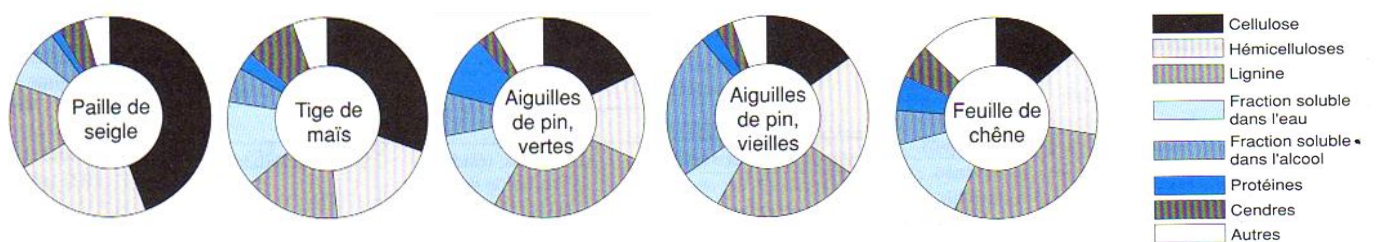


Figure I.5 : Composition de quelques résidus végétaux. *Source : d'après Ellis & Mellor, 1995 ; cité par Gobat et al., 1998.*

anthropiques. Il en résulte que le sol est une ressource essentielle pour les sociétés humaines et les écosystèmes. Sachant que cette ressource est fragile et non renouvelable à une échelle de temps humaine (dû aux vitesses de dégradation qui peuvent être très rapides contrairement aux processus de formation et de régénération qui sont extrêmement lents), il convient de protéger la qualité des sols (c'est-à-dire son aptitude à remplir ses fonctions) contre les dégradations croissantes liées notamment à la croissance démographique (besoins alimentaires, besoins de logements et d'infrastructures) ou aux pollutions (ponctuelles ou d'origine atmosphérique).

2. La matière organique du sol (MOS)

La matière organique du sol (MOS) est considérée comme un compartiment du sol qui peut représenter jusqu'à 98% du carbone organique total retrouvé dans le sol. Certains auteurs considèrent la MOS comme l'ensemble de la matière organique vivante et de la matière organique morte (Shibu et al., 2006) alors que certains limitent la MOS au produit non vivant de la décomposition de substances de plantes et d'animaux (Manlay et al., 2007). Dans ce travail de thèse, nous avons fait la distinction entre la composante vivante et la MOS comme décrit par Manlay et al (2007). Le temps moyen de résidence de la matière organique dans les sols est estimé à 15 ans, indiquant un renouvellement rapide de ses composés, mais il ne faut pas écarter que ce temps de résidence des MOS peut s'étendre de quelques jours pour des matières organiques fraîches à des milliers d'années pour des substances humiques (Gaillard et al., 2005). En effet, la matière organique du sol est un vaste ensemble d'éléments en évolution permanente qui peut être subdivisé en 2 grands pools :

- **la matière macro-organique**

La matière macro-organique (10 – 30% du carbone organique total) désigne la fraction légère de la MOS et est composée (i) de matière organique fraîche (MOF) représentée par les cadavres et excréments d'animaux mais principalement dominée par les débris végétaux ; et (ii) de matière organique transitoire ou composés organiques intermédiaires de la dégradation. D'un point de vue qualitatif, cette matière macro-organique du sol est constituée de composés organiques différenciables par leur taux de turn-over, dont les principaux sont (Gobat et al., 1998 ; Kogel-Knaber et al., 2002) [Figure I.5 ; Tableau I.2] :

Tableau I.2 : Proportions moyennes des grandes catégories de matières organiques dans la plante et dans le sol. *Source : d'après Foth, 1990 ; cité par Gobat et al. 1998.*

Catégories de matière organique	Proportion dans la plante (% des catégories)	Proportion dans le sol (% des catégories)
Cellulose	20 – 50	2 – 10
Hémicelluloses et pectines	10 – 30	0 – 2
Lignine	10 – 30	35 – 50
Protéines	1 – 15	28 – 35
Lipides, cires, autres	1 – 8	1 – 8

Tableau I.3 : Principaux rôles des matières organiques dans la qualité des sols. *Source : Girard et al., 2005.*

Propriété du sol	Rôles et propriétés correspondantes des MOS
Stabilité de la structure du sol, résistance à l'érosion et à la dégradation physique	Propriétés d'adhésion : les macromolécules, souples (en terme de viscoélasticité) et à forte activité de surface se lient aux minéraux et contribuent à la cohésion des agrégats. Le caractère hydrophobe à l'état sec ralentit l'action désagrégeante de l'eau.
Résistance au compactage du sol	Porosité et élasticité propre des débris organiques, stabilisation des agrégats par les MOS.
Aération, Réserve utile en eau	Le caractère hydrophile des MOS à l'état humide permet la rétention d'eau. Augmentation de la porosité liée à l'agrégation.
Rétention des cations basiques Ca, Mg, K	Charges de surface ; la CEC moyenne des MOS est de 1,5 équivalent par kg.
Réserve d'éléments nutritifs N, P, S	Ces éléments constitutifs sont libérés par la minéralisation des MOS.
Rétention de certains métaux toxiques	Charges de surface, groupements complexants.
Rétention, inactivation de certains xénobiotiques organiques	Groupements fonctionnels des MOS, caractère hydrophobe : Adsorption, interaction hydrophobe, réductions.

- la cellulose et l'hémicellulose, polysaccharides des parois végétales, qui se décomposent rapidement dans les sols ;

- la lignine, composée d'une structure chimique complexe avec des arrangements variés à partir d'une structure de base de phénylpropane, qui est plus récalcitrante à la décomposition en raison de ses noyaux aromatiques.

Les proportions relatives de ces composés varient suivant le type de résidus végétaux [Figure I.5] mais aussi entre la matière organique des plantes et celle du sol [Tableau I.2]. Ces différentes compositions indiquent des variabilités dans les processus de biodégradation, biotransformation et biominéralisation qu'ont subi ou vont subir ces matières organiques.

- **la matière organique humifiée**

Les matières organiques résultant de l'humification forment l'humus qui est un ensemble de composés allant des acides fulviques (les plus simples et les plus solubles), aux acides humiques (solubles uniquement en milieu alcalin) et à l'humine (les plus stables et non dispersables à tous les pH) (Girard et al., 2005).

La répartition des matières organiques ainsi que leurs décompositions ne sont pas aussi cloisonnées dans le sol et de nombreuses interactions entre les différentes catégories de MOS se produisent. En effet, les MOS résultant de la dégradation des matières macro-organiques peuvent s'associer plus ou moins étroitement aux substances humiques et aux constituants minéraux du sol (Girard et al., 2005). Ces produits résiduels plus ou moins stabilisés dans des structures organo-minérales seront soumis à de nouveaux cycles de biodégradation et minéralisation, même si ces associations favorisent en général la stabilisation et limitent la biodégradation.

Les matières organiques jouent des rôles importants dans les sols. Tout d'abord, elles constituent une source considérable de carbone, d'énergie et de nutriments pour les organismes vivants du sol. De plus, ces MOS interviennent dans la qualité des sols, dont les principales implications sont répertoriées dans le Tableau I.3, sans oublier, qu'avec la biomasse végétale, la MOS est un des principaux compartiments stockant le carbone.

3. Les microorganismes du sol

3.1. Fantastique diversité

Au même titre que la MOS, les microorganismes sont une composante essentielle du sol, principalement représentée par les champignons (eucaryotes) et les bactéries (procaryotes). Une densité de 10^9 microorganismes par gramme de sol peut être atteinte, ainsi que de formidables niveaux de diversité : quelques dizaines à centaines de milliers de taxons ou groupes microbiens par gramme [Tableau I.1] (Torsvik, 2002). Malgré cette fantastique diversité, seulement 7000 procaryotes ont été décrits à l'heure actuelle (Alain et al., 2009), notamment dû au retard méthodologique exposé en introduction générale.

L'énorme diversité taxonomique et génétique des microorganismes telluriques se traduit par une implication forte dans de nombreuses fonctions environnementales du sol. Certains microorganismes participent à la santé et à la croissance des plantes, dont les plus étudiées sont les symbioses rhizobiennes et mycorhiziennes. La composante microbienne tellurique participe aussi activement aux cycles biogéochimiques du soufre, du phosphore, du fer et de l'azote. Au niveau de ce dernier, l'implication forte dans la fixation de l'azote atmosphérique, l'ammonification, les processus de nitrification et de dénitrification n'est plus à démontrer. Sans oublier leurs rôles essentiels dans le cycle du carbone, les microorganismes du sol, hétérotrophes pour la plupart, font partis des acteurs principaux contrôlant la décomposition de la matière organique [détaillée dans la section I.3.2.]. De par leur plasticité métabolique, les microorganismes telluriques interviennent aussi dans la dégradation et l'immobilisation de polluants (ETM, pesticide...) apportés en milieu agricole ou industriel. Toutefois, la diversité microbienne peut aussi se traduire par des effets néfastes et la présence de certains microorganismes qui sont pathogènes pour les plantes (*Plasmopara viticola*, *Fusarium*...) et l'homme (*Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*...).

Au niveau du sol, la distribution des microorganismes est hétérogène et conditionnée par l'organisation du sol (texture, structure, composition, ...) (Ranjard & Richaume, 2001), détaillée dans la section I.1.1. La distribution des microorganismes dans le sol est aussi fortement dépendante des ressources nutritives et de leur distribution spatio-temporelle. Par conséquent, la présence de niche trophique particulière va structurer fortement la distribution des microorganismes dans le sol (Ranjard & Richaume, 2001). Notre étude générale se focalisant sur la niche détritusphère (qui résulte de l'apport de résidu), cette dernière représente une « oasis nutritive » pour les microorganismes dans un environnement et

engendre ainsi la formation de « hots spots » d'abondance microbienne et d'activités biologiques (Nicolardot et al., 2007).

3.2. Implications de la composante microbienne dans la dégradation de la matière organique

Les bactéries et champignons du sol font partis des acteurs principaux de la dégradation de la matière organique fraîche apportée au sol ; quant à leur contribution relative, les opinions des scientifiques divergent. Il faut en réalité mieux comprendre dans quelles conditions la matière organique est décomposée pour déterminer la part relative de chaque acteur dans les processus de dégradation. Les champignons domineraient la décomposition dans les sols non fertilisés (Bardgett et al., 1993), alors que les bactéries sont généralement considérées être les décomposeurs prédominants des résidus de plante apportés au sol par culture conventionnelle. De plus, les bactéries sont capables de répondre plus rapidement à des amendements organiques que les champignons qui interviendraient au stade tardif de la décomposition quand la matière organique est plus récalcitrante (MacMahon et al., 2005 ; Poll et al. 2008) ; sur le même principe, un résidu avec un C/N plutôt élevé favorisera sa décomposition par les champignons, alors qu'à l'inverse, la dégradation d'un résidu avec un C/N plus bas sera plutôt menée par des bactéries. D'autres auteurs ont directement rattaché des phylums de microorganismes à la dégradation de composés de plantes en particulier. De Boer et al. (2005) ont répertorié que parmi les champignons, les Ascomycètes et les Basidiomycètes étaient souvent impliqués dans la dégradation aérobie de cellulose, alors que des bactéries filamenteuses (comme *Streptomyces*) et non filamenteuses (comme *Bacillus*, *Cytophaga*) interviendraient dans la dégradation anaérobie de cellulose. La fonction de décomposition de la lignine est surtout retrouvée chez des Basidiomycètes pour les champignons et des Actinomycètes pour les bactéries. Ils ont aussi mis en évidence des interactions entre les deux domaines (champignons et bactéries) pour décomposer la lignocellulose complexe.

3.3. Attributs écologiques de la composante microbienne impliquée dans la dégradation de la matière organique

MacArthur and Wilson (1967) ont proposé un concept basé sur les caractéristiques écologiques des différents taxons de plantes et d'animaux, les divisant en deux pools : les stratégies-r et les stratégies-K. En général, les stratégies-r sont décrits pour s'adapter à optimiser leur taux de croissance quand les ressources sont abondantes, alors que les stratégies-K sont adaptés à se battre et survivre quand les ressources sont limitées. En microbiologie, les termes de copiotrophes (stratégies-r) et oligotrophes (stratégies-K) sont plus couramment utilisés mais il est encore peu connu si ce concept peut s'appliquer aux microorganismes (Fierer et al., 2007a).

Au niveau du sol et du turn-over du carbone organique, les microorganismes stratégies-r consommeraient préférentiellement les pools de carbone organique labile du sol, auraient des besoins nutritionnels forts et pourraient présenter des fortes capacités à augmenter leur taux de croissance quand les conditions en ressources sont abondantes ; de ce fait, ils seraient plutôt impliqués dans la dégradation de la matière organique fraîche. Par contre, les microorganismes stratégies-K présenteraient des taux de croissance plus faibles et seraient probablement en compétition avec les stratégies-r en condition de faible disponibilité en nutriments, dû à leur meilleure affinité pour les substrats, et par conséquent seraient plutôt impliqués dans la dégradation de la matière organique native du sol (Fierer et al., 2007a). Pour ces raisons, les organismes stratégies-r apparaissent préférentiellement dans le stade précoce de la décomposition de la matière organique fraîche, contrairement aux stratégies-K intervenant plutôt au stade tardif (Liebich et al., 2006 ; Bastian et al., 2009).

Certains auteurs ont essayé de relier la diversité microbienne à ces caractéristiques écologiques (stratégies-r/copiotrophes ou stratégies-K/oligotrophes). Fierer et al. (2007a), grâce à une étude où ils ajoutaient du sucrose comme source de C dans le sol, ont pu relier des phylums de bactéries aux taux de minéralisation du carbone. Ils ont montré que les β -Protéobactéries et les Bacteroidetes sont positivement corrélés avec le taux de minéralisation du carbone contrairement aux Acidobacteria négativement corrélés avec le taux de minéralisation du carbone. Par contre l'abondance des α -Protéobactéries, des Firmicutes et des Actinobacteria n'a pas pu être prédite par ce taux de minéralisation. Lors de dégradation de résidus de blé marqués au ^{13}C , Bernard et al. (2007) ont suggéré des caractéristiques de stratégies-r pour les β -Protéobactéries et les γ -Protéobactéries et de stratégies-K pour les Actinobactéries. Quant à Bastian et al. (2009), ils ont mis en évidence des microorganismes

décrits comme des stratégies-r au stade précoce de la décomposition (*Pseudomonas* spp, *Neurospora* sp) et d'autres décrits comme des stratégies-K (Actinobacteria et δ -protéobactéries pour les bactéries ; Basidiomycota et *Madurella* spp. pour les champignons) au stade tardif de la décomposition de résidus de culture de blé.

Les auteurs sont conscients que l'ensemble des espèces d'un phylum ne peut pas être rattaché à un caractère écologique, mais ces résultats peuvent fournir des bons indicateurs de la décomposition.

3.4. Stratégies méthodologiques pour étudier la composante microbienne du sol

Pour mieux comprendre le rôle et l'importance de la composante microbienne tellurique dans les fonctions délivrées par le sol, différentes approches sont possibles nous apportant des informations bien distinctes sur les communautés microbiennes indigènes. Il n'est pas question ici de faire une liste exhaustive de toutes les techniques recouvrées en écologie microbienne mais de pointer celles utilisées couramment dans notre domaine d'application, et de focaliser sur celles utilisées pour les expérimentations de ma thèse, tout en intégrant leurs limites techniques et leurs domaines d'application. Durant mes travaux de thèse, nous avons décidé d'appréhender les microorganismes en tant que communauté (i.e. groupe d'organismes à un endroit donné à un moment donné) et non comme entité isolée comme le permet l'approche par isolement et mise en culture sur milieu synthétique. Nous noterons que la décomposition de la matière organique est une « fonction » large englobant de nombreux processus ; il n'est donc pas possible de cibler des fonctions précises (gènes cibles) parmi les microorganismes avec ces techniques moléculaires. Par conséquent, nous nous sommes limités à des études sur l'abondance, la structure génétique et la diversité des communautés indigènes.

3.4.1. Densité microbienne

Si l'on veut faire une description des méthodes les plus utilisées pour étudier les microorganismes dans les agrosystèmes, il semble indispensable de commencer par la biomasse microbienne, méthode permettant de quantifier le pool microbien du sol. Le concept de biomasse microbienne a été initialement proposé par Jenkinson (1966). Il fait référence à la

fraction vivante de la matière organique, considérant l'ensemble des microorganismes du sol. Les techniques permettant de mesurer la biomasse microbienne donnent des valeurs en $\mu\text{gC} \cdot \text{g}^{-1}$ et les 4 principales méthodes sont : (i) la fumigation-incubation, (ii) la fumigation-extraction, (iii) la respiration induite par un substrat, (iv) l'extraction ATP (Martens, 1995).

Les mesures de biomasse microbienne ont été très utilisées (Chaussod, 1996 ; Kandeler et al., 1999 ; Marschner et al., 2003 ; Lejon et al., 2005 ; Ranjard et al., 2006) afin d'évaluer les impacts de différentes perturbations dans les agrosystèmes (pratiques agricoles, pollutions...) et, comme énoncé en introduction générale, sont souvent les seules à être prises en compte dans les modèles de minéralisation de la matière organique du sol pour représenter la composante microbienne (Hadas et al., 2004 ; Shibu et al., 2006). Même si elle reste un bon bioindicateur de la qualité des sols (Marschner et al., 2003), la biomasse microbienne souffre d'un manque de résolution et nécessite d'être complétée par des méthodes plus informatives sur les processus étudiés. En effet, cette mesure, qui prend en compte l'ensemble des microorganismes présents (vivants ou non), ne fait pas de différence entre les domaines des microorganismes (archaea-champignons-bactéries) et donne seulement une mesure quantitative et non qualitative.

3.4.2. Activités enzymatiques, métaboliques et cataboliques

Les activités enzymatiques impliquées dans la décomposition de MOF peuvent être mesurées et permettent d'obtenir une mesure fonctionnelle de la composante microbienne du sol. Très utilisées dans les études concernant la décomposition de matière organique, ces approches fournissent des résultats qui restent compliqués à interpréter car les enzymes restent actives quand elles sont stabilisées sur la matière organique ou la surface minérale (Nannipieri et al., 2003 ; Bünemann et al., 2006).

Les capacités métaboliques et cataboliques apportent aussi une mesure fonctionnelle des communautés microbiennes du sol. Elles sont appréhendées par des techniques utilisant les aptitudes des communautés microbiennes à utiliser certains substrats organiques comme la technologie BIOLOG ou la méthode SIR (substrate-induced respiration). Ces méthodes permettent de caractériser et classer les communautés microbiennes hétérotrophiques suivant leurs capacités métaboliques et cataboliques et de visualiser rapidement des structures de communautés comme un composite de capacités fonctionnelles (Garland et al., 1991 ; Degens et al., 1997). Le désavantage du BIOLOG est qu'il implique, sans l'intégrer, la croissance des

communautés microbiennes, biaisant ainsi la représentativité de l'ensemble des microorganismes. La méthode SIR s'affranchit de ce problème et semble plus précise même si moins utilisée (Degens et al., 1997 ; Nannipieri et al., 2003).

Les nombreuses études réalisées jusqu'à présent pour évaluer l'impact des apports de MO sur la communauté microbienne du sol, sont essentiellement fondées sur ces mesures de densité (biomasse microbienne) et d'activité (Lundquist et al., 1999 ; Griffiths et al., 2001 ; Gaillard et al., 2003 ; Zelenev et al., 2005) ; mais elles ne reflètent pas les dynamiques et diversités des communautés microbiennes influencées ou impliquées dans la dégradation de la MOF.

3.4.3. Analyse des phospholipides à acides gras (PLFA)

L'analyse des phospholipides à acide gras (PLFA pour phospholipid fatty acid) est la 1^{ère} méthode d'analyse structurale des communautés microbiennes à faire abstraction des méthodes de culture ; elle est basée sur l'extraction, le fractionnement, la méthylation et la chromatographie des composants phospholipidiques des lipides du sol. Les phospholipides sont des composants essentiels des membranes des cellules vivantes et sont donc utilisés comme indicateurs de la microflore du sol (Zelles, 1999 ; Nannipieri et al., 2003). La force de cette méthode est sa capacité à fournir différentes informations à partir d'un même échantillon. En effet, l'analyse des PLFA peut fournir (i) des mesures de biomasses bactérienne et fongique ; (ii) des informations taxonomiques sur les communautés microbiennes (champignons, bactéries, Gram +, Gram -, ...) ; (iii) des profils représentant la structure des communautés microbiennes dans l'échantillon.

Même si l'analyse des PLFA a montré une bonne sensibilité sur des changements de structure de communautés microbiennes après apport de résidus de plantes au sol (MacMahon et al., 2005 ; Duong et al., 2009), la classification taxonomique des microorganismes par cette méthode est plus délicate à cause du manque de données qualitatives et quantitatives sur la distribution des acides gras au sein des taxons microbiens, et cette méthode reste peu résolutive surtout pour les champignons.

3.4.4. Approches moléculaires basées sur l'ADN de sol

Les approches moléculaires basées sur l'ADN de sol se sont développées avec la nécessité de s'affranchir des méthodes dépendantes de l'isolement basées sur la culture des microorganismes [Encadré 1 : Historique de l'écologie microbienne] et sont encore en constante évolution. Ces méthodes sont basées sur l'analyse de l'ADN directement extrait des échantillons environnementaux (Ranjard et al., 2000). Deux principaux types de techniques moléculaires sont disponibles : (i) les approches moléculaires prenant en compte l'ensemble de l'information génétique de l'ADN extrait du sol ; (ii) les approches moléculaires se focalisant sur certaines parties de l'information génétique, c'est-à-dire certaines séquences du génome qui sont ciblées et amplifiées par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) grâce à des amorces universelles capables d'amplifier ces gènes cibles.

Après analyse de la bibliographie disponible sur notre sujet, nous avons pu observer que les approches principalement employées sont celles concernant l'analyse d'une partie de l'ADN du sol dont la plupart sont basées sur l'analyse des gènes codant pour l'ARN ribosomal (ARNr 16S pour les procaryotes et ARNr 18S ou 28S pour les eucaryotes). En effet, même si les gènes fonctionnels sont judicieux pour cibler les populations impliquées dans certains processus, dans notre cas il n'est pas possible de se concentrer sur des gènes cibles impliqués dans la décomposition de la matière organique car c'est une fonction « large » et redondante englobant de nombreux processus et avec peu de possibilité de mise au point d'outils moléculaires adaptés (Ranjard et al., communication personnelle).

Les différentes approches moléculaires basées sur l'ADN des gènes ribosomiques de sol peuvent fournir des informations précieuses sur la représentativité, les structures génétiques et la diversité taxonomique des communautés microbiennes comme détaillées ci-dessous.

3.4.4.1. Structure génétique des communautés microbiennes

Le pool de PCR obtenu à partir de l'ADN extrait du sol peut être caractérisé par des techniques de génotypages produisant des « empreintes génétiques » des communautés microbiennes. Ces « empreintes génétiques » sont en fait des profils de bandes complexes donnant une représentation globale de la structure génétique des communautés microbiennes. Ces différentes techniques sont basées sur le principe de migration électrophorétique

Tableau I.4 : Liste des techniques permettant l'étude des structures génétiques des communautés microbiennes, leurs principes, avantages et inconvénients. *D'après Amann et al. (1995) ; Nocker et al. (2007) ; Ranjard et al. (2000) ; Torsvik et al. (1998).*

	Nom de la technique	Gène ciblé	Principe méthode	Principaux avantages techniques de la méthode	Principaux inconvénients techniques de la méthode
Différentiation suivant la taille de la séquence	ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) <i>ou</i> RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	ARNr 16S	Amplifiats digérés par enzymes de restriction et séparés sur gels d'agarose ou de polyacrylamide.	- Utile pour communautés microbiennes simples.	- Nécessité de faire plusieurs restrictions multiples si pas assez sensible avec une ; - Perte d'information phylogénétique si profil génétique trop complexe.
	T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism)	ARNr 16S ou autres gènes	Amplifiats marqués sur côté 5' digérés par enzymes de restriction, puis détection des T-RFs (Terminal-Restriction Fragment) sur gel de polyacrylamide ou séquenceur capillaire.	- Peut permettre assignation phylogénétique des microorganismes ; - Bonne résolution pour comparaison de communautés complexes ; - Permet de réduire la complexité des profils retrouvés pour l'ARDRA.	- Assignation de faible résolution ; - Surestimation diversité.
	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	Différents endroits de l'ADN génomique.	Utilisation d'amorces courtes ciblant au hasard dans le génome, puis migration sur gel d'agarose ou d'acrylamide.	- Rapide et sensible pour comparaison de communautés complexes.	- Manque de reproductibilité ; - Pas d'information phylogénétique sur composition microbienne.
	ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)	ITS : intergenic transcribed spacer entre les gènes 16S et 23S pour bactérie	Amplifiats marqués par un fluorochrome, sur séquenceur migration sur gel de polyacrylamide et séquences détectées par laser.	- Plus haute hétérogénéité en longueur et en nucléotide des séquences - Hautement résolutif	- Amplification préférentielle des séquences les plus courtes ; - Un organisme peut contribuer à un ou plusieurs signaux.
Différentiation suivant la composition de la séquence	DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) <i>et</i> TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)	Pas de gène précis ou ARNr 16S avec amorce en 5' avec clamp riche en GC	Dénaturation des amplifiats et électrophorèse des produits PCR en présence d'un gradient dénaturant (agent dénaturant chimique ou physique).	- Bandes d'intérêt peuvent être excisées du gel pour séquençage ; - Abordable d'un point de vue économique.	- Sensibilité et résolution limitées ; - Comparaison inter-gels difficile ; - Faible taille des séquences ; - Faible efficacité PCR dû à l'amorce riche en GC.
	SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	Pas de gène précis	Analyse électrophorétique sur gel d'acrylamide non dénaturant ou sur séquenceur capillaire des amplifiats sous forme de fragments simple brin	- Bandes d'intérêt peuvent être excisées du gel pour séquençage.	- Fort taux de réassociation des simples brins ; - Une espèce peut être représentée par plusieurs pics.

différentielle sur gels d'agarose ou de polyacrylamide suivant leur taille (ARDRA, t-RFLP, ARISA, RAPD) ou suivant leur séquence (DGGE, TGGE, SSCP).

Ces méthodes, peu coûteuses, permettent un criblage rapide des structures génétiques des communautés microbiennes et sont souvent utilisées pour mettre en évidence des variations de structure induites par des changements environnementaux. Plusieurs auteurs (Amann et al., 1995 ; Nocker et al., 2007 ; Ranjard et al., 2000 ; Torsvik et al., 1998) ont répertorié et pointé les avantages et désavantages de ces différentes techniques de typage génétique résumées dans le Tableau I.4. D'après ces considérations, la bibliographie ayant montré le potentiel de cette technique sur des échantillons de sol (Ranjard et al., 2001) et le matériel disponible au laboratoire, nous avons eu recours à l'ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) pour déterminer les structures génétiques des communautés microbiennes dans nos études.

3.4.4.2. Diversité taxonomique

La méthode communément appelée clonage/séquençage consiste en l'amplification de séquences cibles (couramment les gènes ribosomiques) qui sont ensuite intégrées dans des clones à l'aide de vecteur. Les inserts sont alors séquencés et comparés à des séquences connues répertoriées dans des bases de données internationales tel NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cette méthode offre une haute résolution phylogénétique permettant l'identification des espèces (Nocker et al., 2007 ; Ranjard et al., 2000 ; Torsvik et al., 1998).

Cette méthode étant coûteuse en temps et en argent, généralement une centaine de clones sont séquencés par échantillon étudié. Même si la plupart des études montrent que ce nombre est trop faible pour une estimation réelle de la diversité, les résultats obtenus informent de la diversité des populations majoritaires et permettent de mettre en évidence des modifications suite à des perturbations environnementales.

Afin de contourner les biais dus au faible nombre de séquences, les dernières avancées technologiques se sont concentrées sur le séquençage à haut débit tel que le pyroséquençage. Cette technique permet de s'affranchir de l'étape de clonage et d'obtenir jusqu'à 400 000 séquences valides en un seul « run » (Christen, 2008). Cependant, les séquences obtenues sont à l'heure actuelle très courtes - maximum 400bp - laissant penser que l'affiliation

taxonomique des séquences sera peu efficace pour atteindre le niveau de l'espèce. Toutefois, Liu et al. (2007) ont montré que des séquences d'au moins 100bp suffisaient pour mettre en évidence des similarités et/ou des différences biologiques entre des échantillons microbiens. Un point sensible pour l'utilisation de cette technologie est le choix de la séquence cible et donc des amorces correspondantes. La séquence amplifiée étant courte, il est préférable qu'elle ne représente ni une partie hypervariable ni une partie trop conservée du génome (principalement l'ARNr16S) au risque de surestimer ou sous-estimer la diversité des espèces (Youssef et al, 2009). Cette nouvelle technologie semble être un outil d'avenir pour l'étude de la diversité et a déjà montré son efficacité sur l'étude de communautés microbiennes du sol affectées par les pratiques agricoles ou l'utilisation des sols (Acosta-Martinez et al., 2008 ; Roesch et al., 2007).

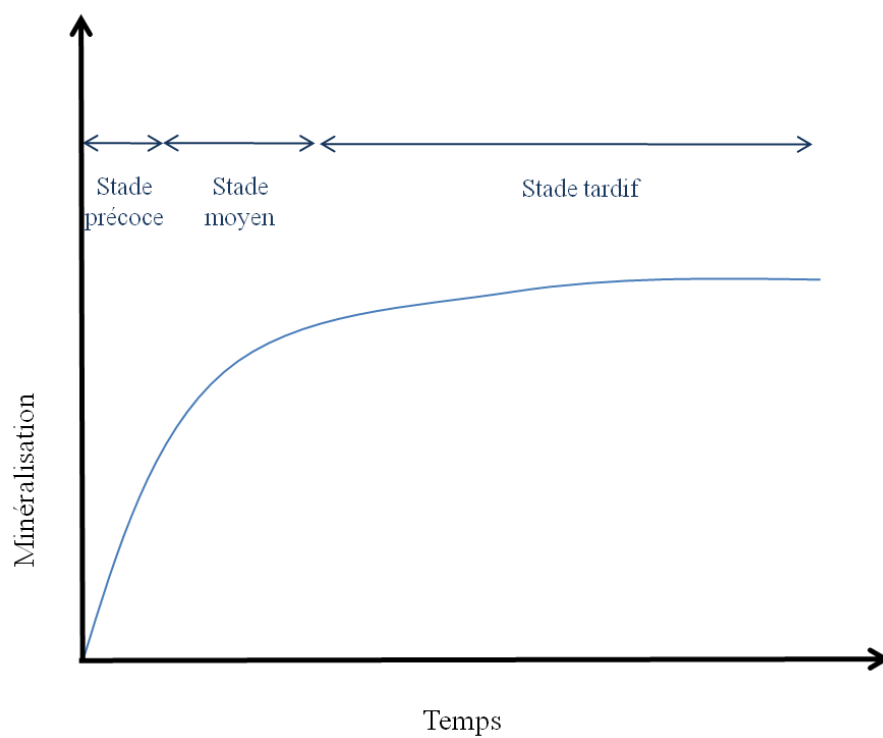


Figure I.6 : Modèle schématique de minéralisation de la matière organique fraîche.

Le stade précoce correspond à une minéralisation rapide de la matière organique fraîche, le stade moyen correspond à un ralentissement de la minéralisation de la MOF et le stade tardif correspond à une phase lente de la minéralisation.

II - Impact des apports de résidus de culture dans les agrosystèmes sur les communautés microbiennes telluriques

Au niveau des agrosystèmes, entre 0.3 et 2.0 tonnes de matière organique fraîche par hectare sont réintroduites au sol par an sous forme de résidus végétaux de culture (Gobat et al., 1998). Cette quantité de résidus dépend du type de culture initialement présente et du mode d'utilisation des sols associé. De plus, la typologie biochimique des résidus végétaux ainsi que les pratiques agricoles vont aussi fortement influencer la minéralisation de cette matière organique fraîche ou sa transformation en matière organique stabilisée du sol. Au niveau du sol, cet apport de matière organique fraîche constitue une impressionnante source de substrats organiques et d'énergie pour les micro-organismes indigènes, dont la croissance est habituellement fortement limitée par la pauvreté en ressources nutritives de la matrice sol (Wardle, 1992). Par conséquent, cet apport de MOF va augmenter l'hétérogénéité spatiale du sol en créant de nouvelles niches ou hot spot d'activité fonctionnelle comme la détritosphère. Cette partie de notre étude bibliographique a pour objectif de renseigner sur les capacités de transformation de cette MOF dans le sol ainsi que son impact sur la composante microbienne indigène.

1. Minéralisation des résidus de culture dans le sol

De nombreuses études ont suivi la minéralisation de résidus de plantes réintroduits dans les sols ou les effets de leur décomposition sur les flux de carbone et d'azote du sol (Gaillard et al., 1999 ; Trinsoutrot et al., 2000a and 2000b ; Martens et al., 2000). Il est courant de retrouver une forte minéralisation au stade précoce de la décomposition suivie par une phase plus lente correspondant à un stade tardif de la décomposition [Figure I.6]. Ces intensités de minéralisation sont principalement expliquées par des modifications dans la composition de la MO. En effet, les composés facilement dégradables (C soluble, cellulose, hémicellulose) sont très rapidement dégradés dès l'introduction des résidus dans le sol, puis les composés plus récalcitrants (tel la lignine) sont dégradés beaucoup plus lentement dans un deuxième temps. Les variabilités temporelles et d'intensité de minéralisation observées entre les différentes études peuvent être dépendantes de divers paramètres que nous allons décrire dans la section II.3.

2. Influence de l'apport de résidu de culture sur les communautés microbiennes du sol

Au niveau microbien, les nombreux travaux réalisés jusqu'à présent pour évaluer l'impact des apports de MOF se sont concentrés sur des mesures de densité et d'activité des microorganismes telluriques (Bending et al., 2002 ; Gaillard et al., 1999 ; Gaillard et al., 2003 ; Griffiths et al., 2001 ; Lundquist et al., 1999 ; Zelenev et al., 2005). Les auteurs s'accordent à dire que l'apport de résidus entraîne une augmentation de la biomasse microbienne dans les sols, du moins au début de la décomposition de la matière organique fraîche. Les capacités enzymatiques et métaboliques semblent être reliées aux modifications de composition des résidus (Cookson et al., 2008 ; Fang et al., 2007). Quelques études ont commencé à s'intéresser à la dynamique des communautés microbiennes au cours de la dégradation et ont mis en évidence des successions de populations bactériennes et fongiques (Bastian et al., 2009 ; Baumann et al., 2009 ; Bernard et al., 2007 ; Poll et al., 2010). Pour aller plus loin, certains auteurs ont déterminé la diversité des microorganismes indigènes du sol, permettant d'identifier des phylums ou genres dominants aux différents stades de la décomposition des résidus de culture, et ils ont tenté de les relier avec des caractéristiques écologiques type stratégies-r et stratégies-K décrits en section I.3.2 (Bernard et al., 2007 ; Bastian et al., 2009).

Des tendances générales au niveau des communautés microbiennes commencent à être dégagées des différents travaux en termes de successions populationnelles et de groupes taxonomiques impliqués dans les différents stades de dégradation. Toutefois, des paramètres environnementaux sont mis en évidence comme fortement influant sur les processus de dégradation des résidus végétaux dans le sol. Ces paramètres sont liés (i) à la qualité biochimique des résidus apportés, (ii) aux pratiques agricoles, mais aussi (iii) à des paramètres plus globaux comme le type pédoclimatique de la zone étudiée.

3. Paramètres influençant les processus de dégradation de la MOF dans le sol

3.1. Influence de la qualité biochimique des résidus de culture

Les études comparant la minéralisation de différents types de résidus sont nombreuses et elles ont toutes démontrées que la composition biochimique des résidus de plantes est un des plus importants facteurs influençant sa décomposition. Quant à savoir exactement les composants organiques qui déterminent la vitesse et l'amplitude de la décomposition,

plusieurs hypothèses ont été formulées. De nombreux travaux (Johnston et al., 2009 ; Xu et al., 2006) ont mis en évidence que le ratio C/N pouvait être un bon prédicteur de la vitesse de décomposition de la matière organique et de la minéralisation de l'azote dans le sol. De manière générale, les résidus avec un C/N élevé auraient un turnover moins rapide que les résidus avec un C/N plus bas, de même que les substrats riches en N ont un taux de décomposition et une libération de nutriments plus importants. Les teneurs en cellulose, hémicellulose, lignine, composés solubles, tannins, amidon, protéines, lipides et polyphénol - composés organiques classiques des plantes - sont souvent suivies lors d'études portant sur la décomposition de matière organique et leurs proportions varient avec l'espèce et la maturité des plantes. Il en ressort, entre autre, que la teneur en lignine influencerait négativement la décomposition de résidus (Fang et al., 2007 ; Luxhoi et al., 2002) alors que les résidus avec les plus hautes quantités de carbohydrates et d'aminoacides se décomposent plus vite (Martens et al., 2000).

La qualité du résidu lui-même influence sa décomposition mais aussi les paramètres biologiques du sol. Des résidus avec des forts C/N (>30) favoriseraient la colonisation par les champignons alors que ceux avec un faible C/N (<30) favoriseraient celle des bactéries (Lundquist et al., 1999 ; Moore et al., 2004). Quel que soit le résidu considéré, une augmentation de la biomasse microbienne peut être observée, corrélée positivement au taux de carbone disponible du résidu (Bremer & van Kessel, 1992 ; Cayuela et al., 2009 ; Govaerts et al., 2007).

La décomposition de différentes qualités de résidus entraîne des réponses métaboliques et enzymatiques distinctes, ce qui semble cohérent avec la composition des résidus (Bending et al., 2002 ; Cookson et al., 1998 ; Fang et al., 2007 ; Govaerts et al., 2007). Ceci n'exclut pas que les communautés microbiennes soient semblables, mais plusieurs auteurs (Baumann et al., 2009 ; Ha et al., 2008 ; Nicolardot et al., 2007) ont montré que les structures des communautés microbiennes engendrées par l'apport de MO fraîche étaient différentes suivant la qualité biochimique de la MO apportée. A l'heure actuelle, aucune étude ne compare la réponse de la diversité des microorganismes à l'apport de différents résidus de plante dans les sols cultivés, comme Aneja et al. (2006) ont pu le faire sur des litières de forêt.

La qualité du résidu lui-même influence les communautés microbiennes indigènes du sol, mais à l'heure actuelle peu d'études ont essayé de relier les composants biochimiques des résidus à des compositions particulières des communautés microbiennes. Seul Baumann et al.

(2009) ont tenté d'établir des relations entre la chimie du carbone et les structures de communautés microbiennes. Ils ont pu montrer que les changements dans les structures de communautés microbiennes étaient associés avec des changements dans la chimie du carbone des résidus, principalement la teneur relative en aryl-C et O-alkyl-C. D'autres scientifiques se sont focalisés directement sur des composants des résidus de plantes comme la lignine (Bahri et al., 2008) ou la cellulose (Haichar et al., 2007 ; Hu et al., 1997) pour s'affranchir de ce problème.

Même si l'on commence à décrypter le rôle de la qualité biochimique des résidus de culture sur la composition et la diversité des communautés microbiennes indigènes du sol, il est important de continuer les travaux dans ce sens pour, à terme, pouvoir généraliser les conclusions déjà formulées et les utiliser dans des modèles permettant de simuler la décomposition de la matière organique suivant sa qualité tout en prenant en compte les microorganismes indigènes du sol. Il reste tout de même à préciser que les deux tiers des travaux cités dans ce paragraphe ont été réalisés en laboratoire sous forme de microcosmes en conditions contrôlées et qu'il sera donc important de vérifier leur réalité au terrain.

3.2. Influence des pratiques agricoles

De nombreuses études ont examiné l'influence des pratiques agricoles sur la dynamique des MOS. La plupart des pratiques agricoles ont un effet sur les composantes physiques, chimiques et biologiques du sol et ont par conséquent des répercussions sur les activités biologiques associées, notamment sur la dégradation des résidus de culture. Parmi ces pratiques, le travail du sol, la fertilisation azotée et l'apport de composés exogènes toxiques de type ETM semblent engendrer le plus de modifications de ces activités biologiques, soit par des modifications de la matrice sol, soit directement par des modifications de la composante microbienne indigène (Bünemann et al., 2006 ; Schlesinger & Andrews, 2000).

3.2.1. Influence du travail du sol

La compilation des données de la littérature concernant l'influence du travail du sol sur la dégradation de résidus de culture montre deux grandes stratégies d'investigation. La première stratégie est d'utiliser des agrosystèmes avec des sols présentant des historiques

cultureaux différents en termes de travail du sol (Chen et al., 2009 ; Cookson et al., 2008 ; Fu et al., 2000 ; Lundquist et al., 1999 ; Spedding et al., 2004 ; White & Rice, 2009) ; alors que la deuxième stratégie prend en compte des sols avec le même historique mais qui seront menés sous différentes techniques de travail du sol (labour vs non labour) (Coppens et al., 2006 ; Curtin et al., 2008 ; Nicolardot et al., 2007 ; Sharma et al., 1999).

Pour les études menées sur l'influence de l'historique cultural, il apparaît qu'un apport de résidus entraîne une plus importante augmentation de biomasse microbienne dans le sol ayant subi le moins de perturbations dues au travail du sol accumulé dans le temps (Lundquist et al., 1999 ; Spedding et al., 2004 ; White & Rice, 2009). Par contre, au niveau de la minéralisation, les résultats ne sont pas homogènes, certains auteurs observent une minéralisation identique du résidu sous des sols ayant subi différents historiques de travail du sol : sols sous rotations culturales vs système de production végétale intensive (Lundquist et al., 1999) et culture conventionnelle vs non-labour (White & Rice, 2009) ; alors que d'autres mettent en évidence des variations significatives en comparant : le labour vs un travail du sol réduit vs une prairie (Chen et al., 2009).

En ce qui concerne les études menées via la deuxième stratégie décrite ci-dessus, et testant l'influence de la localisation du résidu dans le sol via son incorporation grâce au labour ou le fait qu'il soit laissé en surface (sans labour = mulch), les auteurs ont montré des effets différents sur la décomposition des résidus de culture (Coppens et al., 2006 ; Curtin et al., 2008 ; Nicolardot et al., 2007). En effet, les auteurs s'accordent à dire que la décomposition des résidus est plus importante quand ils sont incorporés au sol que lorsqu'ils sont laissés en surface. Ce phénomène s'explique par un meilleur contact entre le sol et le résidu qui améliore les conditions d'humidité et de colonisation microbienne nécessaire à une dégradation optimum du résidu végétal. Toutefois, Abiven et al. (2007) ont montré une absence de différence en fonction de la localisation du résidu, qu'ils expliquent par les conditions non limitantes en azote qu'ils ont appliquées dans leur étude en microcosme. Ils ont suggéré que la structure du sol ferralitique en micro-agrégats augmenterait le contact entre la surface du sol et le résidu et donc gommerait les causes des différences de minéralisation observées précédemment. Par ailleurs, Nicolardot et al. (2007) ont montré que la localisation du résidu (en surface ou incorporé au sol) a une influence sur la diversité des populations microbiennes colonisant le résidu, qui pourrait s'expliquer par les conditions hydriques plus limitantes au niveau du mulch qui mènent à la sélection de populations capables de dégrader le résidu dans ces conditions.

A la vue de ces études, il est difficile de pouvoir dégager des tendances générales sur l'influence du travail du sol sur la dégradation des résidus de culture et les successions populationnelles microbiennes impliquées dans cette dégradation. Par ailleurs, certains auteurs ont mis en évidence que l'impact du travail du sol est moins influant sur la dégradation des résidus que d'autres facteurs comme la qualité biochimique du résidu [cf section II.3.1] (Nicolardot et al., 2007). Fu et al. (2000), par une expérimentation double menée au terrain et au laboratoire en conditions contrôlées et comparant des sols sous culture conventionnelle ou sans labour, ont montré que les tendances obtenues *in situ* étaient comparables à celles obtenues en microcosmes mais toujours avec une amplitude plus faible. Ces résultats montrent l'importance d'intégrer les variations pédoclimatiques du terrain pour valider les études du travail du sol sur la dégradation des résidus de culture, et une telle stratégie doit aussi être appliquée aux études portant sur les dynamiques de communautés microbiennes impliquées dans cette dégradation.

3.2.2. Influence de l'azote disponible

Les amendements azotés sont courants en agriculture pour participer à la fertilisation du sol, c'est-à-dire au développement des plantes, mais en contre partie cet apport d'azote intervient sur la décomposition des résidus de plantes réintroduits dans les sols. En effet, plusieurs travaux ont testé différentes concentrations d'azote disponible dans le sol sur la décomposition de résidus de plantes (Recous et al., 1995 ; Henriksen et al., 1999). Ces auteurs ont mis en évidence que l'augmentation d'azote disponible accroît le taux de minéralisation de C de résidu de plantes jusqu'à un certain seuil, puis l'augmentation de la teneur en azote n'a plus d'impact sur la décomposition. Par ailleurs, ils ont montré que plus la teneur en azote disponible dans le sol est importante, plus la biomasse microbienne et l'activité enzymatique associée le sont aussi. En effet, lors de la décomposition de résidus de culture, les microorganismes puisent l'azote qu'ils ont besoin soit dans le résidu lui-même, soit dans le sol. Les résidus avec des C/N bas, c'est à dire des taux d'azote élevés, permettent facilement leur dégradation par les microorganismes grâce à leur disponibilité en azote, contrairement aux résidus végétaux avec des C/N plus haut où l'azote du sol est la source pour les microorganismes.

L'azote est donc un facteur important contrôlant la décomposition de MO fraîche (Mary et al., 1996) et il est nécessaire de le prendre en compte dans les études de

décomposition. En effet, les conclusions dégagées d'études prenant en compte des conditions limitantes en azote (en conditions naturelles par exemple) ou en conditions non limitantes en azote seront différentes, comme nous avons pu le voir dans la section précédente [II.3.2.2] avec l'étude d'Abiven et al. (2007). Ces auteurs ont suggéré qu'il n'y avait pas de différence de minéralisation entre des résidus de culture incorporés au sol ou laissés en surface et différents types de résidus de culture (riz, soja, sorgho, brachiaria et blé) car les conditions de leur étude étaient non limitantes en azote.

3.2.3. Influence des éléments traces métalliques (ETM)

Les contaminations aux éléments traces métalliques dans les sols agricoles sont le résultat de retombées atmosphériques locales (industrielles et urbaines) et d'apports divers (boues de stations d'épuration, composts, engrais, pesticides...) anciens ou actuels (Bünemann et al., 2006 pour revue). L'impact de ces ETM sur la densité, l'activité et la diversité des microorganismes a déjà été largement mené et s'est traduit globalement par des effets délétères sur la composante microbienne du sol mais aussi par une capacité d'adaptation de certains microorganismes à ces substances toxiques (Lejon et al., 2007 ; Lejon et al., 2010) [voir annexes 1 et 3].

L'objectif commun des principales études est de déterminer des seuils critiques auxquels l'effet de ces contaminants est irréversible, tout en prenant en compte les interactions avec les différentes composantes biotiques et abiotiques du sol comme la matière organique du sol (Lejon et al., 2007 ; Lejon et al., 2008 ; Lejon et al., 2010) [voir annexes 1,2 et 3]. Toutefois, l'impact des contaminants sur les processus du sol a été rarement mené spécifiquement sur la dégradation des résidus de culture, même si les modifications des communautés microbiennes du sol par les ETM suggèrent des modifications fonctionnelles importantes dans ces processus. Néanmoins, les études existantes ont mis en évidence une diminution de la respiration du sol après apport de résidus de plantes en présence d'ETM (Aoyama, 1998 ; Giller et al, 1998 ; Tobor-Kaplon et al., 2005) variant suivant le type d'ETM et sa concentration. A l'inverse, Bernard et al. (2009) ont montré une augmentation de la respiration après un apport de résidu de blé dans un sol contaminé au cuivre. Cette augmentation n'est pas due à une plus forte minéralisation du résidu mais à une augmentation de la respiration basale du sol, correspondant à une sur-minéralisation de la MOS via le processus appelé « priming effect » [cf section III.1.2 pour plus de précisions]. Aoyama et al.

(1997) avaient d'ailleurs montré que l'addition de métaux lourds dans un sol sans amendement organique augmentait aussi la respiration du sol. Dans l'étude de Bernard et al. (2009), l'étude de la dynamique et de la diversité des communautés bactériennes indigènes a mis en évidence des populations particulières parmi celles activement impliquées dans la dégradation des résidus dans le sol contaminé par rapport au sol non contaminé. La présence de cuivre semble avoir inhibée des populations à croissance rapide en présence de carbone facilement disponible et favorisée la présence de populations co-métabolisant la MOS et la MOF expliquant la stimulation du processus de « priming effect ».

Si l'on veut résumer l'impact des ETM sur l'interaction résidus – microorganismes indigènes, les ETM modifient l'abondance et la diversité des populations présentes mais la forte redondance fonctionnelle des microorganismes permet de maintenir les activités biologiques de dégradation de ces résidus (Girvan et al., 2005). Toutefois, une analyse plus précise montre des différences de minéralisation des MOS du sol due au processus de priming-effect et à la stimulation de populations particulières microbiennes et adaptées aux métaux.

3.3. Influence des facteurs environnementaux

L'environnement extérieur climatique (température, disponibilité en oxygène, conditions météorologiques...) et l'environnement édaphique (structure, humidité, pH...) peuvent avoir des répercussions au niveau de la minéralisation de la MOF.

3.3.1. Influence de la température

L'effet de la température a déjà été examiné sur la respiration de la MOS, de la rhizosphère mais a été peu appréhendé sur la décomposition de MO fraîche apportée au sol. Une forte corrélation positive entre la respiration du sol et la température a été mise en évidence et quantifiée dans certains travaux. Quant à la décomposition du carbone organique de résidus de plantes, elle serait aussi plus importante à des plus hautes températures (Kätterer et al., 1998 ; Knorr et al., 2005). Des observations similaires ont été obtenues pour la décomposition de résidus de blé (Coûteaux et al., 2002 ; Luxhoi et al., 2002 ; Bauer et al., 2008). Pour étudier *in situ* des variations de température, Coûteaux et al. (2002) se sont basés sur un transect d'altitude (de 65 à 3968 mètres). Leurs résultats montraient une diminution

significative de la décomposition des résidus de plantes avec l'accroissement de l'altitude (c'est-à-dire une diminution de la température). Le problème majeur de cette étude est que les différences observées ne peuvent pas forcément être attribuées aux variations de température, mais au type de sol ou aux autres conditions climatiques comme les précipitations.

Afin de lier la décomposition et la température, les scientifiques ont utilisé des fonctions pour décrire les réponses obtenues en fonction de la température. Une des plus utilisées est le coefficient de température Q_{10} (van't Hoff, 1898 ; Kätterer et al., 1998). Ce coefficient représente le facteur par lequel le taux d'une réaction (ici la décomposition) augmente pour chaque élévation de 10 degrés de température. Ce coefficient n'a pas d'unité, il est de 1.0 si la réaction est complètement indépendante de la température et supérieur à 1 si le taux de la réaction s'amplifie avec l'augmentation de température. Au niveau de la décomposition de la MOS, Kirschbaum (1995) a indiqué des valeurs de Q_{10} élevées à faible température et inversement des valeurs de Q_{10} plus basses pour des températures plus hautes. Bauer et al. (2008) ont déterminé le Q_{10} à 1.16 pour le taux de décomposition de résidus de blé, valeur assez faible qu'ils expliquent par une complexité de l'impact de la température sur la décomposition de la MOF.

A travers l'analyse de la bibliographie, on se rend compte que les études, portant sur l'effet de la température sur la décomposition de la MOF, se sont concentrées sur des modélisations de fonctions et que l'impact des changements de température sur les communautés microbiennes a été très peu pris en compte. Au niveau des résidus de plante réintroduits au sol, Rui et al. (2009) ont montré un effet important de différentes températures (15, 30 et 45°C) sur les dynamiques bactériennes lors de la décomposition de résidus de riz. Par contre Luxhoi et al. (2002) n'ont pas mis en évidence de changement d'activité enzymatique entre 3 et 9°C lors de la décomposition de plusieurs résidus de plantes. Etant donné les dernières prises de conscience sur le réchauffement climatique, l'amélioration des connaissances sur l'impact de la température sur la dégradation de MO fraîche semble primordiale.

3.3.2. Influence du pH et de l'humidité des sols

Comme décrit en section I.1.1, le sol est une matrice complexe dont les propriétés varient entre les différents types de sol. Plusieurs de ces propriétés ont montré leur influence sur la minéralisation de résidu de plantes.

Plus précisément, le pH du sol semble être positivement corrélé avec les taux de respiration observés après apport de résidus de plants de légumes ou de pailles de blé (Xu et al., 2006). De leur côté, Renella et al. (2006) ont montré que l'activité de phosphomonoestérase acide prédominait dans un sol acide, alors que dans des sols de pH neutre ou basique, c'est la phosphomonoestérase alcaline qui était la plus retrouvée après apport de résidu de plante fourragère. Le pH fait donc partie des paramètres du sol qui influencent le processus de décomposition de la MOF. Une telle influence s'explique soit par des modifications physiologiques directes des populations microbiennes, soit par des modifications de diversité des communautés et donc de leur fonctionnalité. En effet, les récents travaux menés sur la caractérisation de la biodiversité microbienne tellurique sur des grandes échelles spatiales montrent que le pH est le filtre environnemental majeur de cette biodiversité (Fierer & Jackson, 2006 ; Dequiedt et al., 2009)

L'humidité est aussi une propriété du sol qui influence la minéralisation de résidus végétaux dans le sol (Degens et al., 1998). Entre autre, Poll et al. (2006) ont mis en évidence de meilleurs taux d'activité enzymatique et de PLFA avec des teneurs en humidité des sols importantes. Bending et al. (2002) ont, quant à eux, testé la qualité de la matière organique native du sol sur la décomposition de différentes MOF apportées au sol. La MOS native du sol influencerait la minéralisation des résidus, ainsi que les activités enzymatiques. Pour Bending et al. (2002), la qualité de la MOS affecterait la diversité fonctionnelle microbienne du sol au même titre que la qualité de la MOF retournée au sol. La structure du sol en micro-agrégat est un autre paramètre contrôlant la minéralisation de résidus apportés au sol (Balesdent et al., 2000 ; Denef et al., 2001). Par exemple, Oorts et al. (2006) montrent que la minéralisation du carbone est inférieure au sein de zones compactées par rapport à des zones non compactées dans le profil de sol.

En conditions naturelles, ces paramètres de l'environnement sont très variables. En conditions contrôlées, (c'est-à-dire en expérience en microcosmes de sol), ces paramètres sont stables et gérés au cours de l'expérimentation et ne reflètent donc pas forcément les conditions que l'on peut retrouver au champ. En effet, les saisons, le climat et autres

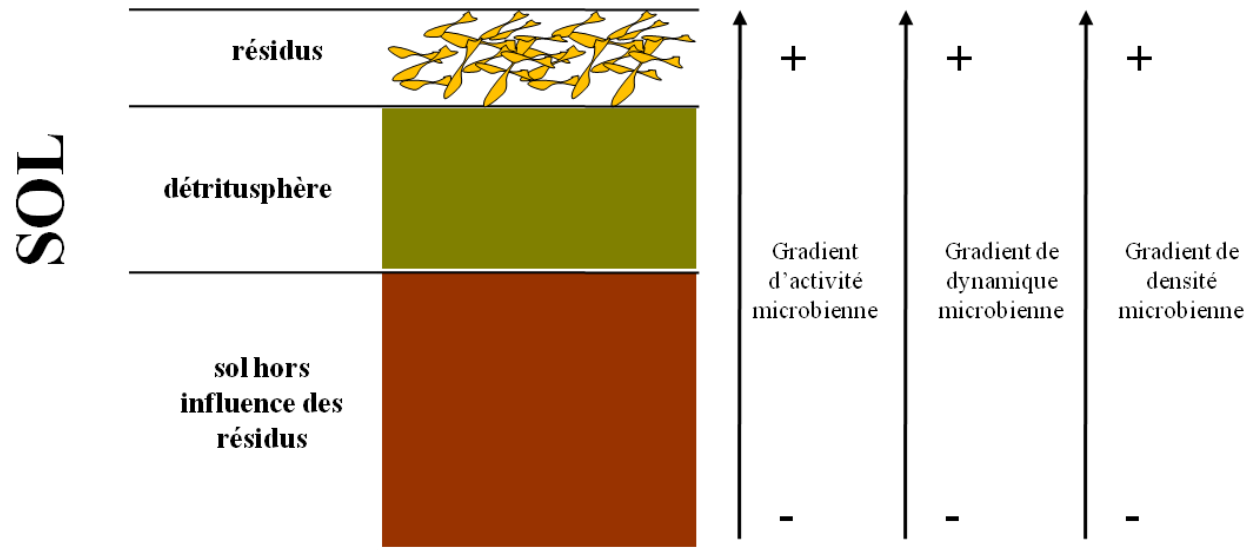


Figure I.7 : Schéma conceptuel de la détritusphère.

perturbations extérieures (pratiques agricoles...) influent les conditions retrouvées dans le sol et donc la dégradation de la MOF. Il est important de vérifier que les expérimentations en laboratoire reflètent alors la réalité au champ, tout comme il est primordial de continuer les travaux intégrant des systèmes pédologiques variés afin d'augmenter la généricité des résultats obtenus.

4. Influence de l'apport de résidus sur les niches écologiques du sol : la détritosphère

Comme expliqué dans la section I.1.2., la détritosphère est une niche écologique du sol créée sous l'influence des résidus de plantes, qui correspond à un « hot-spot » de biomasse microbienne et d'activité biologique associée à cette biomasse (Beare, 1995 ; Brown et al., 2000). Parfois, certains auteurs parlent de « residosphere » pour caractériser ce « hot-spot » (Magid et al., 2006 ; Sengeløv et al., 2000), mais ce terme est très peu employé et nous resterons donc sur le terme de détritosphère dans ce manuscrit.

Les premières études, qui ont porté sur la caractérisation de la détritosphère, ont permis d'évaluer la sphère d'influence de cette niche en termes de modifications des populations microbiennes telluriques et des flux de C associés à l'activité biologique dans cette niche. Par exemple, l'apport de résidu de paille de blé induit des stimulations de biomasse et d'activités enzymatiques jusqu'à 4mm de distance des résidus dans le sol (Gaillard et al., 1999). De façon similaire, Poll et al. (2006) ont démontré que des résidus de maïs peuvent induire des modifications de biomasse et d'activités biologiques jusqu'à 3mm suivant le mécanisme de transport (diffusion ou convection) des solutés engendrés par la dégradation du résidu. Nicolardot et al. (2007) ont aussi démontré un gradient de minéralisation et de dynamique des communautés microbiennes à l'échelle millimétrique qui déclinait quand on s'éloignait du résidu.

Par conséquent, que ce soit pour les flux d'éléments engendrés par la décomposition de matière organique fraîche apportée, ou pour les modifications quantitatives et qualitatives de la composante microbienne, la niche détritosphère contribue à l'hétérogénéité spatiale du sol et son influence semble se limiter à quelques millimètres dans le sol (Gaillard et al., 1999 ; Gaillard et al., 2003 ; Nicolardot et al., 2007 ; Poll et al., 2008). Cette hétérogénéité spatiale est donc aussi bien physico-chimique que biologique, en termes d'abondance, de dynamique, de diversité et d'activité microbienne [Figure I.7]. Par ailleurs, certaines études démontrent

que la structuration de cette niche dans l'espace et le temps varie aussi avec la qualité biochimique de la matière organique fraîche apportée et les caractéristiques physico-chimiques initiales du sol (Gaillard et al., 1999 ; Poll et al., 2006).

D'un point de vue dynamique et diversité des communautés microbiennes indigènes du sol, la détritusphère est un véritable réacteur biologique qui se matérialise par d'importantes successions populationnelles. Ces successions ont été démontrées au niveau des populations de champignons telluriques (Bastian et al., 2009 ; Poll et al., 2010) ou au niveau bactérien (Bastian et al., 2009 ; MacMahon et al., 2005) et des transferts de gènes bactériens y ont été mis en évidence (Sengeløv et al., 2000). Malgré le dynamisme de cette zone, il est important de noter que c'est le résidu lui même qui est la principale source de CO₂ (Gaillard et al., 1999) et qui est le plus dynamique au niveau microbien (Bastian et al., 2009 ; Nicolardot et al., 2007).

En conclusion, parmi la bibliographie portant sur la dégradation de la matière organique fraîche apportée au sol, la notion de détritusphère est très peu mentionnée et se retrouve souvent amalgamée avec le sol non influencé par les résidus de plantes. Il en résulte une certaine méconnaissance écologique de cette niche et donc la nécessité de mieux appréhender ce « hot-spot » biologique qui peut avoir une importance fondamentale dans le fonctionnement biologique du sol et plus largement des services écosystémiques.

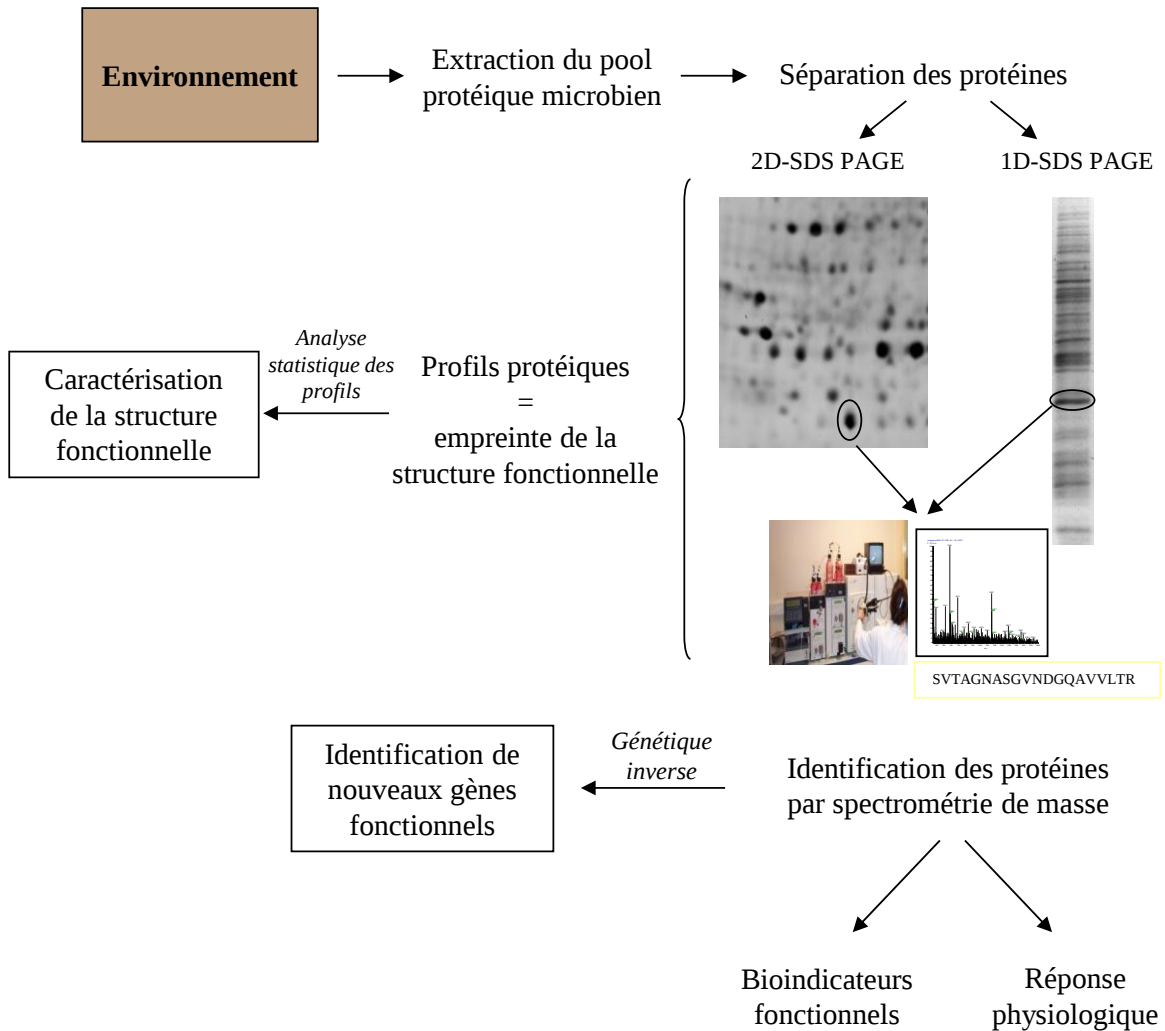


Figure 1.8 : Stratégie expérimentale et résultats attendus de la caractérisation du métaprotéome du sol.

III - Rôle fonctionnel de la diversité microbienne dans le turn-over des matières organiques du sol

Même si l'implication des microorganismes dans le turn-over des matières organiques du sol est bien établie [cf section I.3.2], la relation entre le niveau et la composition de la biodiversité microbienne et la dégradation des MOS reste encore peu décrite et démontrée. L'intérêt final de comprendre le rôle fonctionnel de la composante microbienne dans le cycle du carbone est de pouvoir mieux gérer les microorganismes afin d'améliorer la productivité des agrosystèmes (Welbaum, 2004). Toutefois, ces questionnements scientifiques d'écologie fonctionnelle supposent de disposer d'outils performants pour caractériser les communautés *in situ* d'un point de vue fonctionnel (structure fonctionnelle, fonctionnalité). Dans ce contexte, un effort important a été consenti au niveau de la communauté scientifique internationale pour développer des approches innovantes permettant une telle caractérisation. Deux grandes approches peuvent être décrites :

- d'une part des technologies innovantes qui permettent de caractériser *in situ* les populations actives et la structure fonctionnelle / fonctionnalité des communautés et de les relier à leurs capacités métaboliques [Stratégie 1],
- d'autre part, une stratégie qui met en œuvre des expérimentations spécifiques impliquant des manipulations de la diversité afin de faire un lien empirique entre la diversité/composition des communautés et leurs capacités fonctionnelles [Stratégie 2].

1. Stratégie 1 : développement de méthodologies innovantes pour aborder le rôle fonctionnelle de la diversité microbienne

1.1. La caractérisation *in situ* du métaprotéome microbien du sol

Le métaprotéome microbien représente l'ensemble des protéines synthétisées à l'échelle de la communauté microbienne à un temps donné. Les protéines représentant les biomolécules réellement responsables des biotransformations, l'analyse du métaprotéome permet de caractériser la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes et d'identifier sans *a priori* les fonctions impliquées dans leurs réponses à l'apport de MOF [Figure I.8]. Couplée à des approches de caractérisation de la diversité taxonomique, une telle approche peut donc renseigner sur le lien entre la diversité génétique et fonctionnelle des communautés microbiennes.

L'étude du métaprotéome est très récente et également peu développée, et nécessite donc encore de forts développements méthodologiques. A l'heure actuelle, les principales études se sont concentrées sur l'amélioration de l'extraction des protéines d'environnements complexes comme l'eau et le sol (Bastida et al., 2009 ; Benndorf et al., 2007 ; Maron et al., 2007b). Au niveau de la matrice sol, les trois principales limites rencontrées actuellement sont : (i) la faible ressource en protéines qui empêche parfois leur détection, sans compter qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de techniques qui permettent d'amplifier les protéines, comme la PCR pour l'ADN et l'ARN ; (ii) l'association des protéines à des composés organiques ou minéraux qui interfèrent avec leur extraction mais aussi leur identification ; (iii) les bases de données qui sont encore trop incomplètes pour pouvoir identifier les protéines des environnements naturels (Bastida et al., 2009 ; Maron et al. 2007a). L'analyse du fingerprint du métaprotéome peut être une alternative à l'identification des protéines [Figure I.8]. Maron et al. (2008) ont pu mettre en évidence différentes structures fonctionnelles correspondant à une même structure génétique dans trois sols différents, revisitant ainsi le concept du lien structure-fonction.

Au niveau des agrosystèmes, l'étude du métaprotéome pourrait offrir la possibilité d'identifier les fonctions microbiennes impliquées dans la dégradation de la matière organique et donc du cycle du carbone. Toutefois, cette approche a été très peu utilisée à ce jour. Parmi les quelques travaux réalisés, Schulze et al. (2005) ont identifié le type (cellulase, glucosidase, collagénase, phenoloxidase ligniolytique) et l'origine biologique (archaea, bactéries, champignons, plantes, nématodes...) de protéines par spectrométrie de masse dans des échantillons de matière organique dissoute (MOD) et de particules de sol d'écosystèmes de lac et de forêt.

Comme pour les techniques basées sur l'ADN et l'ARN combinées à celles de SIP (Stable Isotope Probing, voir section III.1.2), une perspective pour étudier le métaprotéome est le SIP-protéines qui permettra d'identifier les microorganismes et les enzymes intervenant activement dans la dégradation de la matière organique du sol. L'étude du métaprotéome mérite l'intérêt qu'on commence à lui porter pour participer à l'éclaircissement du rôle fonctionnel des microorganismes dans le turn-over de la matière organique du sol.

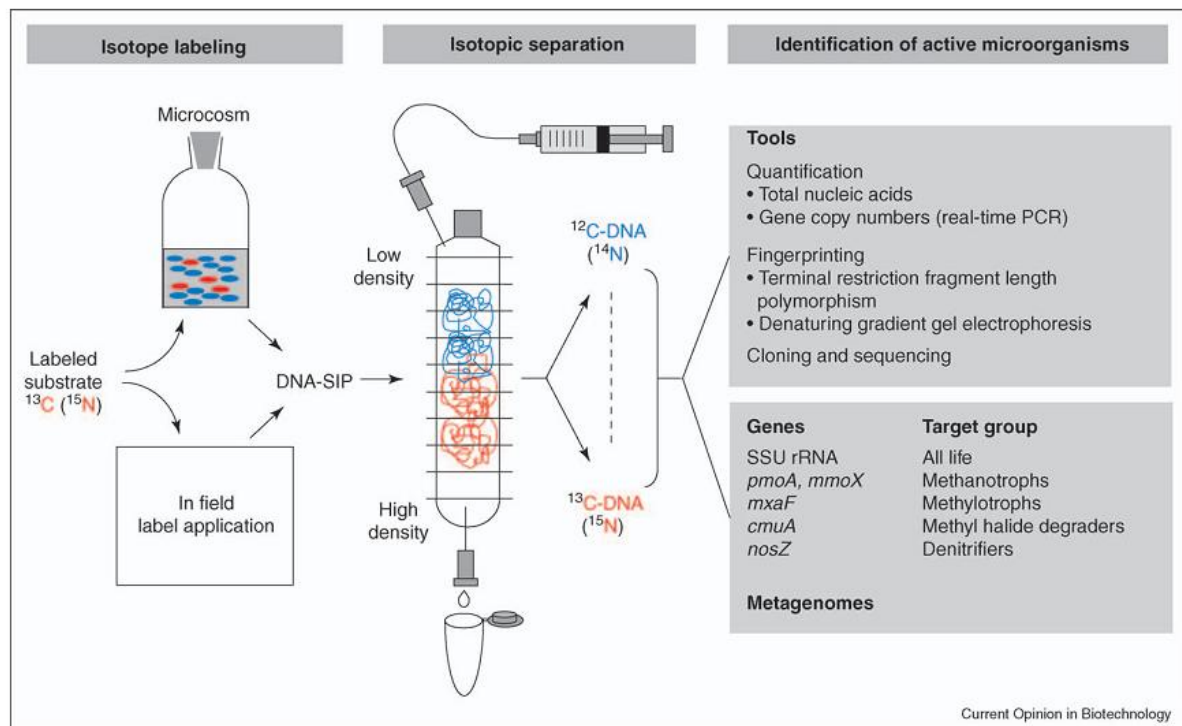


Figure I.9 : Diagramme schématique illustrant les étapes du DNA-SIP (Stable Isotope Probing). Source : Friedrich, 2006.

1.2. La caractérisation *in situ* des communautés activement impliquées dans la dégradation de la MO par DNA/RNA-SIP

- méthodologie

L'utilisation de substrats marqués isotopiquement est couramment employée pour suivre spécifiquement les produits de la décomposition de la matière organique fraîche dans les sols, en suivant (i) la distribution du carbone et de l'azote marqués dans le sol et/ou (ii) les dégagements de CO₂ marqué dans l'atmosphère. Cette pratique permet aussi de différencier les flux de carbone et d'azote provenant de la MOF et ceux provenant de la MOS native du sol. Certains travaux (Bell et al., 2003 ; Fu et al., 2000 ; Hu et al., 1997 ; Liebich et al., 2006) utilisent plutôt le carbone 14, isotope radioactif du carbone, comme marqueur ; mais l'utilisation d'isotopes stables comme le carbone 13 et l'azote 15, plus facile à manipuler, devient de plus en plus courante (Coppens et al., 2006 ; Gaillard et al., 1999 ; Trinsoutrot et al., 2000).

Récemment, des techniques de biologie moléculaire utilisant ces isotopes stables ont été mises au point pour tenter de lier les capacités métaboliques des microorganismes avec leurs identités taxonomiques (Bernard et al., 2007 ; McMahon et al., 2005 ; Padmanabhan et al., 2003). En consommant les molécules ou substrats d'intérêt (glucose, acétate, méthane, cellulose, plantes, xénobiotiques...) fortement marqués par des isotopes stables (¹³C et/ou ¹⁵N), l'ADN des populations microbiennes se retrouve significativement marquée au ¹³C et/ou au ¹⁵N. L'ADN ainsi marqué ¹³C et/ou ¹⁵N est séparé de l'ADN ¹²C et/ou ¹⁴N (qui correspond aux populations qui n'utilisent pas le substrat organique marqué), sur un gradient de densité [Figure I.9]. A partir de cette matrice d'ADN ¹³C et/ou ¹⁵N, des outils moléculaires (comme décrit en section I.3.2) sont appliqués afin de résoudre la diversité/structure génétique des populations considérées comme activement impliquées dans les processus de dégradation. Cette technique, appelée SIP (pour Stable Isotope Probing), couplée à des techniques de biologie moléculaire (PLFA-SIP, DNA-SIP, RNA-SIP), a l'avantage considérable de pouvoir cibler au sein de l'immense diversité des microorganismes indigènes du sol les populations microbiennes activement impliquées dans des processus de dégradation et/ou d'incorporation de substrats marqués (Friedrich, 2006 ; Neufeld et al., 2006 ; Radajewski et al., 2000). Ces outils isotopiques ont été éprouvés dans différentes études portant sur les interactions plantes-microorganismes (Haichar et al., 2008 ; Prosser et al., 2006 ; Rangel-Castro et al., 2005) afin

de déterminer les communautés microbiennes incorporant activement les exsudats racinaires dans la rhizosphère.

- communautés microbiennes activement impliquées dans la décomposition de résidus de culture

Au niveau des résidus de MOF, seuls Bernard et al. (2007) ont utilisé à ce jour cette approche SIP pour identifier la composante microbienne activement impliquée dans la dégradation de résidus de culture de blé, tout en suivant les flux de CO₂ associés. Ils ont pu mettre en évidence des modifications de structure génétique de la communauté bactérienne au cours de la dégradation du résidu soulignant la stimulation de successions de populations. En termes de diversité bactérienne tellurique, caractérisée par clonage/séquençage des gènes codant pour l'ARN 16S, ces auteurs ont démontré que celle impliquée dans la dégradation des résidus était moins importante que celle non impliquée dans ce processus. Plus précisément, ils ont montré que les β -protéobactéries et les γ -protéobactéries (principalement les genres *Massilia*, *Variovorax* et *Pseudomonas*), étaient activement impliquées dans la dégradation précoce des résidus de blé. Une telle approche permet donc de confirmer les attributs écologiques copiotrophes (stratégies-r) de ces populations car elles interviennent dans le stade précoce de la décomposition et utilisent de la matière organique fraîche et facilement dégradable.

- une résultante fonctionnelle : le « priming-effect »

En parallèle de ces résultats sur la biodiversité « active » du sol, Bernard et al. (2007) ont observé une augmentation significative du relargage de ¹²CO₂ résultant de la sur-minéralisation de la MOS suite à l'apport de MOF. Ce processus est communément appelé « priming effect » et a été défini par Bingemann (1953) comme l'extra-décomposition de la matière organique native du sol recevant un amendement organique. Certains auteurs ont montré que l'amplitude de l'extra-décomposition pouvait être dépendante du type de résidu apporté (Sall et al., 2007) ou de la contribution relative des champignons et des bactéries impliqués dans la décomposition du résidu apporté (Bell et al., 2003). Malgré la mise en évidence de l'influence de l'apport de MOF sur la dégradation de la matière organique native du sol dans certaines études, les mécanismes qui régissent ce processus sont très controversés (Fontaine et al., 2003 ; Kuzyakov et al., 2000).

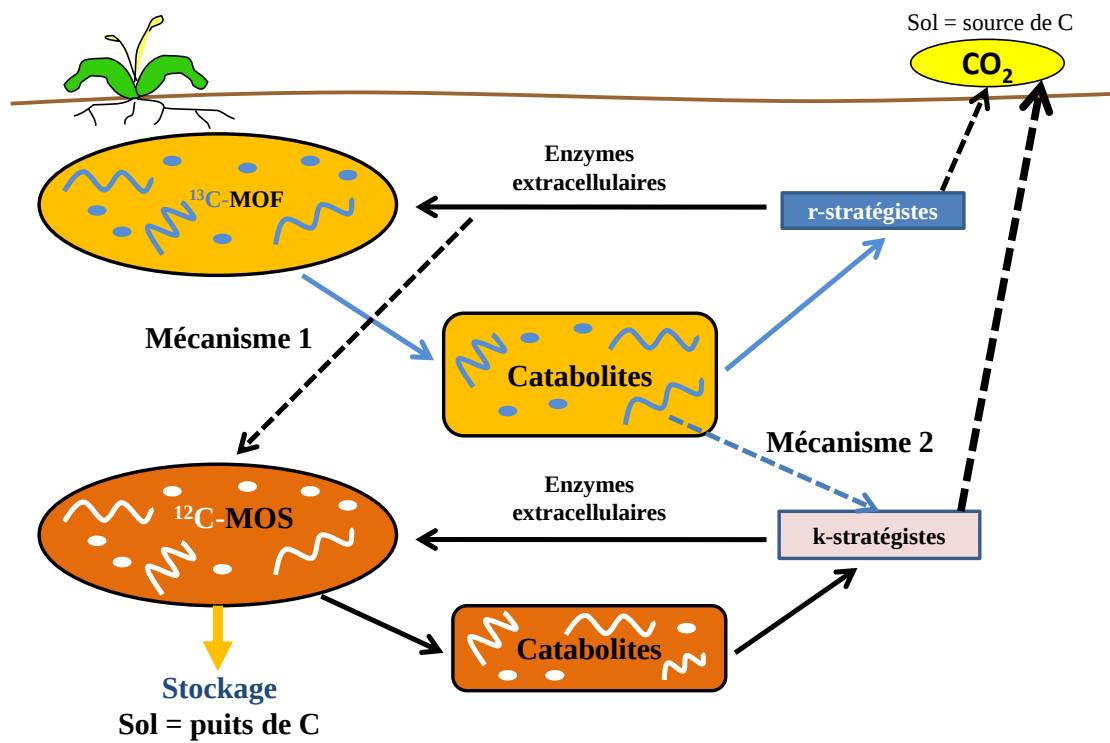


Figure I.10 : Schéma conceptuel de l'implication des populations bactériennes en fonction de leurs attributs écologiques dans les mécanismes du « priming-effect ». *Source : communications personnelles de Bernard L.*

A partir de l'ADN ^{12}C , Bernard et al. (2007) ont mis en évidence des modifications spécifiques de la structure génétique des communautés bactériennes associées à cette sur-minéralisation de MOS native. Les populations identifiées comme étant impliquées dans ce processus étaient affiliées taxonomiquement aux Actinobacteria, Cyanobacteria, Candidate, Gemmatimonadetes, Verrumicrobia et Planctomycetes, populations généralement décrites comme des stratégies-K. Haichar et al. (2008), dans une étude sur les exsudats racinaires, ont aussi mis en évidence ce phénomène de « priming-effect » et l'ont associé à des structures génétiques particulières de communautés bactériennes actives, qui sont donc impliquées dans cette sur-minéralisation de la MOS.

Afin d'expliquer cette sur-minéralisation lors d'apport de résidu de blé, Bernard et al. (2007) ont suggéré que les communautés bactériennes considérées comme des stratégies-K aient profité des exo-enzymes, produites par les stratégies-r impliqués dans la dégradation du résidu, pour induire une hydrolyse de la MOS native comme décrit dans le mécanisme 1 du priming-effect proposé par Fontaine et al. (2003). Par ailleurs, comme certaines populations activement impliquées dans la dégradation du résidu de blé étaient affiliées à des stratégies-K, ils ont aussi suggéré que le mécanisme 2 du priming effect pouvait être impliqué dans les processus observés. L'implication des populations bactériennes en fonction de leurs attributs écologiques (stratégies-r / stratégies-K) dans ces deux mécanismes du « priming-effect » est conceptualisée dans la Figure I.10.

Ces quelques études utilisant ces techniques innovantes de DNA/RNA-SIP ont mis en évidence la capacité de ces techniques à identifier les populations microbiennes activement impliquées dans la dégradation de la MOF mais aussi de la MOS native. Ces études montrent aussi les fortes potentialités de ces approches d'écologie fonctionnelle pour mieux décrire le rôle de la diversité microbienne dans le cycle biogéochimique du carbone. A travers nos études, nous avons choisi cette approche technique pour contribuer à l'identification des acteurs microbiens impliqués dans la décomposition de résidus de blé et de luzerne, et de la matière organique native du sol associée [Chapitre 4 et Perspectives].

2. Stratégie 2 : Développement d'approches expérimentales spécifiques pour aborder le lien entre la diversité des communautés microbiennes et leurs capacités fonctionnelles

2.1. Manipulation de diversité

Les quelques études abordant le lien entre la diversité des communautés microbiennes et leurs capacités fonctionnelles ont montré que la simplification de la diversité peut permettre la démonstration expérimentale du lien entre diversité et fonction. Deux types d'approches expérimentales peuvent être dégagés de la littérature pour manipuler les communautés microbiennes : (i) l'approche par dilution de diversité, et (ii) l'approche par reconstitution de communautés microbiennes.

En 1981, Salenius a ouvert la voie de l'approche par dilution en inoculant des suspensions de sol de différents niveaux de biodiversité (mais contenant approximativement la même biomasse) à des échantillons de sol stérilisés. Cette méthode permet la simplification de la diversité microbienne en créant des taux réalistes de diversité ; toutefois, le désavantage est que ce sont les organismes les plus nombreux qui sont sélectionnés (Dimitriu et al., 2010 ; Franklin et al., 2001 ; Garland et al., 1999). Girvan et al. (2005) quant à eux ont utilisé directement deux sols différents en composition de matière organique, considérant que la biomasse et la diversité microbienne étaient meilleures dans le sol le plus organique. D'autres auteurs ont utilisé des méthodes plus destructives, comme des fumigations répétées sur le sol diminuant la diversité (Degens, 1998 ; Dickens et al., 1999 ; Griffiths et al., 2000) ou l'application de stress (bactéricide...) tuant spécifiquement des microorganismes. Dans ce cas, des microorganismes avec des capacités adaptatives et des caractéristiques physiologiques particulières sont sélectionnés.

La deuxième approche par reconstitution consiste à créer des consortiums de communautés microbiennes en sélectionnant des microorganismes cultivables (Bell et al., 2005 ; Griffiths et al., 2008 ; Liebich et al., 2007 ; Naeem and Li, 1997 ; Setälä et al., 2004). Dans ce cas, l'inconvénient est que la diversité sélectionnée n'est pas du tout représentative de la communauté indigène du sol que ce soit (i) en terme de richesse spécifique : les communautés reconstituées sont composées de 10 (Liebich et al., 2007) à 72 espèces (Bell et al., 2005), alors que la composante microbienne des sols est caractérisée par une énorme diversité génétique [cf section I.3.1] ; ou (ii) en terme de caractéristiques physiologiques :

seules les espèces microbiennes ayant les capacités de croître en milieu de culture sont utilisées.

Même si les différentes approches entraînent des biais dans la sélection de diversité et de composition, elles permettent d'avoir une vision de la réponse des processus des écosystèmes à une érosion de diversité. Ces travaux ont d'ailleurs mis en évidence qu'une baisse de diversité n'est pas forcément synonyme de perte de fonction. En effet, la forte redondance fonctionnelle des communautés microbiennes permettrait la stabilité et la résilience des activités des communautés microbiennes telluriques après perturbation (Girvan et al., 2005 ; Griffiths et al., 2000).

2.2. Influence de l'érosion de diversité sur les capacités fonctionnelles des communautés

Au niveau des fonctions dans les processus biogéochimiques, Horz et al. (2004) ont montré qu'une modification de la diversité de la communauté nitrifiante du sol en réponse aux changements globaux peut entraîner une augmentation de la nitrification, illustrant un lien fonctionnement-diversité. Au niveau de la dégradation de la matière organique, les différents travaux mettent en évidence qu'une diminution de la diversité microbienne n'entraîne pas forcément un déclin ou une perte de fonction de dégradation mais peut modifier sa réponse.

En effet, différents travaux ont mis en évidence une minéralisation des résidus de plantes plus importante avec des taux de diversité réduite (Degens, 1998 ; Griffiths et al., 2000 ; Liebich et al., 2007). Sachant que ces résultats peuvent s'expliquer (i) dans le cas de diminution de diversité par fumigation, par l'augmentation des concentrations en nutriments dans le sol due à la méthode qui permettrait une meilleure minéralisation du résidu (Degens, 1998) ; (ii) dans le cas d'inoculation par microorganismes cultivables, par la capacité de ces microorganismes à croître rapidement et donc considérés comme des stratèges-r connus pour intervenir au début de la minéralisation de matière organique fraîche (Liebich et al., 2007). Wohl (2004), quant à lui, a observé une diminution du taux de dégradation de la cellulose si seulement une ou deux espèces différentes de décomposeurs de cellulose étaient présentes dans une culture liquide, comparées à 4 ou 8 espèces différentes ; concluant qu'une bonne diversité est quand même indispensable en termes d'intensité du processus.

Les auteurs considèrent que la fonction de décomposition est alors redondante dans les communautés microbiennes, étant donné une minéralisation des résidus toujours présente après manipulation de la diversité. Même si les auteurs observent cette redondance de la fonction de décomposition après baisse de diversité, Griffiths et al. (2000) préviennent qu'après une très importante perturbation, cette fonction peut être perdue. Ce constat résulte du concept d'« assurance écologique » (Loreau et al., 2000) qui fait le postulat qu'une baisse de diversité entraîne une baisse de stabilité donc de résistance de la communauté face aux perturbations et aux stress environnementaux. Liebich et al. (2007) ont montré que tous les mécanismes importants pour l'humification des résidus ne peuvent être réalisés par une communauté microbienne avec une diversité réduite. Il y aurait donc perte de cette fonction avec diminution de la diversité. La dégradation de la matière organique est un processus complexe où de nombreuses fonctions, et donc populations, interviennent. Un changement de diversité ne semble pas affecter la fonction de minéralisation mais celle d'humification. Il paraît donc inquiétant que des fonctions soient perdues et d'autres non, les conséquences de la décomposition de résidus de plantes seraient totalement changées. Toutefois, les études portant sur l'érosion de la diversité et la démonstration empirique du lien diversité-fonction sont peu nombreuses et quelquefois contradictoires. Un des challenges majeurs en écologie microbienne est de continuer ce genre d'investigation afin d'améliorer nos connaissances sur ce sujet et de réellement démontrer la valeur patrimoniale, mais aussi fonctionnelle de la diversité microbienne tellurique dans un contexte d'utilisation durable des sols.

IV - Conclusion

Cette synthèse bibliographique présentait un état des lieux de la réponse des communautés microbiennes du sol à l'apport de résidus de culture. D'un point de vue général, nous pouvons dire que, malgré de nombreuses études s'intéressant à la décomposition des résidus de culture apportés au sol dans les systèmes cultivés et les flux de carbone et d'azote associés, la prise en compte de l'implication des microorganismes du sol en termes de diversité, de dynamique de communauté et de fonctionnalité reste faible et incomplète.

Plus précisément, il en résulte une méconnaissance des facteurs édaphiques et environnementaux qui peuvent influencer la composante microbienne du sol associée à la décomposition de résidus de culture. Dans ce contexte, il nous est paru important de réaliser des études sur la dynamique et la diversité de la composante microbienne du sol, au cours de la décomposition de résidu, tout en tenant compte de ces différents facteurs, comme le travail du sol [**chapitre 2**] ou la qualité biochimique des résidus de culture [**chapitres 3 et 4**], voire la température [**perspectives**]. L'objectif d'augmenter ce type d'étude est de dégager des tendances microbiennes et à terme de pouvoir déduire le déterminisme et des indicateurs microbiens de la décomposition de résidus de culture.

L'analyse de la littérature a aussi révélé un nombre conséquent d'études réalisées en microcosmes de sol, c'est-à-dire en conditions contrôlées, qui simulent les systèmes cultivés par quelques dizaines de grammes de sol. Bien que ces études permettent d'utiliser des techniques de pointe non applicables au champ, comme l'approche prometteuse de DNA/RNA-SIP décrite dans cette synthèse et utilisée dans le **chapitre 4** et les **perspectives**, l'importance de prendre en compte l'approche au terrain (i.e. en conditions naturelles intégrant la variabilité pédo-climatique) permet de valider les résultats obtenus en laboratoire avec des microcosmes [**chapitres 2 et 3**].

De plus, cette partie bibliographique soulignait le peu d'intérêt porté à la détritusphère et donc la nécessité d'améliorer nos connaissances sur cette niche écologique, ce que nous avons essayé de prendre en compte au mieux dans la suite de nos travaux [**chapitres 2 et 4** et **perspectives**].

Un dernier point mis en évidence dans cette synthèse bibliographique est la très faible connaissance du lien diversité – fonction de la composante microbienne du sol impliquée dans la décomposition des résidus de culture dans le sol. Par des outils isotopiques couplés à des

techniques de biologie moléculaire, nous avons essayé d'appréhender ce lien diversité – fonction dans le **chapitre 4** et les **perspectives** en identifiant les populations activement impliquées dans la dégradation de résidus de culture.

Chapitre 2 :

Influence *in situ* de la localisation de résidu de culture de blé au cours de leur décomposition sur les communautés microbiennes du sol

Parmi les facteurs influençant la décomposition de résidus de culture dans le sol présentés dans la synthèse bibliographique [Chapitre 1], la localisation du résidu, qui est déterminée par le travail du sol (labour vs mulch), nous a particulièrement interpellés [Chapitre 1, section II.3.2.1]. En effet, bien que l'influence de la localisation du résidu sur sa décomposition ait été bien appréhendée (Coppens et al., 2006 ; Curtin et al., 2008), les études caractérisant la dynamique et la diversité microbienne associées sont peu nombreuses. Nicolardot et al. (2007), dans une étude en microcosmes, ont étudié la minéralisation de résidus de blé et de seigle soit incorporés au sol, soit laissés à la surface du sol. Ils ont mis en évidence des structures génétiques de communautés bactériennes et de champignons spécifiques de la localisation du résidu ainsi qu'un gradient de dynamique microbienne allant du résidu, à la détritosphère puis au sol nu.

Dans ce contexte, il nous a semblé important d'étudier l'influence de la localisation des résidus de culture sur leur minéralisation et sur la réponse des communautés microbiennes telluriques *in situ*. Pour cela une expérimentation au champ a été mise en place à l'unité expérimentale de Mons (projet géré par B. Nicolardot, INRA Reims) qui a consisté à apporter au sol des résidus de blé selon deux modalités de travail du sol : incorporé (par le labour) ou laissé en surface (= mulch), ainsi qu'un contrôle sans résidu. Un échantillonnage mensuel d'août 2005 à mars 2006 a permis de suivre les produits de la décomposition ainsi que la réponse des communautés microbiennes tout au long du processus de décomposition, tout en tenant compte de différents compartiments du sol : le résidu, la détritosphère et le sol « nu ». L'azote inorganique du sol, la teneur en carbone du résidu, et les fractions « Van Soest » (C soluble, hémicellulose, cellulose et lignine) ont été mesurés au cours de l'expérimentation. En parallèle, la biomasse microbienne, les structures génétiques des communautés bactériennes et la diversité taxonomique bactérienne ont été déterminées dans les différents compartiments de sol prélevés.

Cette étude *in situ* avait pour objectifs :

- d'étudier l'influence de la localisation (incorporés vs surface) de résidu de culture sur la réponse des communautés microbiennes indigènes ;
- d'observer l'influence de l'incorporation ou non de résidu de culture au sol sur l'hétérogénéité spatiale du sol (résidu, détritosphère, sol nu) ;

- de relier la décomposition du résidu à la composante microbienne du sol en fonction de la localisation du résidu ;

- de comparer les résultats obtenus sur les études en microcosmes (conditions contrôlées) à ceux obtenus *in situ* lorsque les variations pédoclimatiques sont intégrées.

Cette étude sera présentée ci-dessous sous la forme d'un article accepté pour publication dans la revue *Microbial Ecology* : [DOI: 10.1007/s00248-010-9648-z](https://doi.org/10.1007/s00248-010-9648-z).

***In situ* dynamics and spatial heterogeneity of soil bacterial communities
under different crop residue management**

Noémie Pascault¹, Bernard Nicolardot^{2*}, Fabiola Bastian¹, Pascal Thiébeau³, Lionel Ranjard¹,
Pierre-Alain Maron^{1#}

¹UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement, INRA/Université de Bourgogne, CMSE, BP 86510, 17 rue
de Sully, 21065 Dijon cedex France

² INRA-Unité d'agronomie de Laon-Reims-Mons, 2 Esplanade Roland Garros, BP 224, 51686 Reims Cedex 2,
France

³ INRA, UMR-614 Fractionnement des Agro-Ressources et Environnement, 2 Esplanade Roland Garros, BP
224, 51686 Reims Cedex 2, France

Running title: Interaction between crop residues & soil bacterial diversity

Abstract

The effect of the location of wheat residues (soil surface vs. incorporated in soil) on their decomposition and on soil bacterial communities was investigated by the means of a field experiment. Bacterial-Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (B-ARISA) of DNA extracts from residues, detritusphere (soil adjacent to residues), and bulk soil evidenced that residues constitute the zone of maximal changes in bacterial composition. However, the location of the residues influenced greatly their decomposition and the dynamics of the colonizing bacterial communities. Sequencing of 16S rRNA gene in DNA extracts from the residues at the early, middle, and late stages of degradation confirmed the difference of composition of the bacterial community according to the location. Bacteria belonging to the γ -subgroup of proteobacteria were stimulated when residues were incorporated whereas the α -subgroup was stimulated when residues were left at the soil surface. Moreover, Actinobacteria were more represented when residues were left at the soil surface. According to the ecological attributes of the populations identified, our results suggested that climatic fluctuations at the soil surface select populations harboring enhanced catabolic and/or survival capacities whereas residues characteristics likely constitute the main determinant of the composition of the bacterial community colonizing incorporated residues.

Key words: crop residues, soil bacterial community, bacterial diversity, decomposition process

I - Introduction

Soil Organic Matter (SOM) represents the largest pool of organic carbon in the biosphere and plays a central role in the regulation of many of the soil functions and consequently for numerous ecosystem goods and services that humanity depends upon (De Groot et al., 2002). In agrosystems, considerable changes have occurred in SOM content as a result of cultivation, with a decrease in carbon stock generally observed in intensive cultivation or continuous cropping systems compared to prairies, grasslands or forests (Lal & Kimble, 1997). Such a decrease can have dramatic consequences for the ability of soils to support sustainable crop growth. To maintain soil carbon stocks and consequently agrosystem productivity and economic returns, organic amendments such as crop residues are commonly applied (Campbell et al., 2000).

Accumulation of SOM is highly dependent on the activity of soil heterotrophic microorganisms responsible for the transformation of residues into complex and stabilized organic compounds. The biochemical nature (depending on plant species) and organic amendment practices greatly influence the C mineralization *versus* sequestration ratio and therefore the repercussion on global climatic and atmospheric changes (Gaillard et al., 1999a; Takeuchi et al., 1995; Wang et al., 2002). In this context, the challenge is to improve management of organic inputs in order to maximize the benefits while minimizing negative agronomic and environmental effects. To this end, progress in the knowledge of the factors affecting decomposition must be achieved and a better understanding of the interaction between microorganisms, organic matter and agricultural practices would constitute a decisive step forward for this problematic (Bernard et al., 2007). Many attempts have been made to elucidate the influence of different factors on microbial processes involved in the carbon cycle (Gaillard et al., 2003; Giller et al., 1998; Kwabiah et al., 2003; Lundquist et al., 1999; Nicolardot et al., 1994; Pankhurst et al., 2002; Rangel-Castro et al., 2005). These studies were all based on measurements of global quantitative parameters such as microbial biomass, respiration rate, enzymatic activities or C and N turnover, thus considering microbial communities as a functional “black box”. These works provided estimations of organic carbon turn-over in soil based on evaluations of the mineralization/immobilization ratio which was demonstrated to vary depending on soil type, biochemical characteristics of the residues, agricultural practices, climate, etc (Balesdent et al., 2000). However, prediction of the residence time of the residues is still not satisfactory, mainly because of a lack of knowledge

concerning the parameters controlling degradation, and in particular the functional involvement of microbial actors (Gleixner et al., 2002).

In this context, to improve our ability to predict and manage the fate of organic matter in soil, microbial communities must no longer be considered as a “functional black box” and a major challenge for microbial ecology is to identify of the microbial populations involved in SOM degradation and to understand the influence of carbon sources and agricultural practices on the diversity of soil microbial communities. Recently, Bernard et al. (2007) performed a microcosm experiment using the molecular DNA/RNA-SIP approach to elucidate the dynamics and the diversity of bacterial populations actively assimilating C derived from ^{13}C labelled wheat residues incorporated in soil. They showed that residue incorporation induced a rapid succession of bacterial populations, with the stimulation of specific labelled bacterial populations belonging to the β - and γ - subgroups of *proteobacteria* (Bernard et al., 2007). They linked the dynamics of diversity they observed with the degradation of both residues and soil organic matters on the basis of hypothesis of Fontaine et al. (2003) dealing with the microbial involvement for priming-effect in soil. Similarly, Nicolardot et al. (2007) performed a microcosm experiment to evaluate the influence of location (soil surface vs. incorporated into soil) and quality of plant residues (young rye vs. wheat straw) on both residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. The results obtained showed that depending on both the quality and the location of the residues, different genetic structures of microbial communities were stimulated, with a gradient observed from residue to bulk soil particularly for young rye. These results suggest that the quality of organic inputs and the way they are added to soil may represent a suitable way to manage the microbial component in soil and consequently the soil processes they are responsible for. However, all these studies were conducted in soil microcosm laboratory incubations and extrapolating to the field decomposition data derived from laboratory experiments must be undertaken with caution (Coppens et al., 2006; Parr & Papendick, 1978) since variations in soil characteristics, climatic events as well as seasonal variations occurring *in natura* can greatly influence residues degradation and microbial community dynamics.

In the present work, our purpose was to evaluate under field conditions the influence of the location of wheat residues on residue degradation and the dynamics of bacterial communities colonizing the residue. To this end, we performed a field experiment in which mature wheat residues were added to soil either as mulch or incorporated into the soil by tillage. The dynamics of residue degradation and of soil bacterial communities were then

assessed each month, from August 2005 to March 2006 in three soil zones, i.e. the residue, the detritusphere (soil adjacent to the residues), and the bulk soil. Evolutions in soil inorganic N content, as well as the quantitative and qualitative evolution of residues in each treatment were monitored. Furthermore, the bacterial community structure was assessed using the DNA fingerprinting technique B-ARISA (for Bacterial-Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) to characterize the succession of bacterial populations during the residue decomposition. Based on the dynamics of residue degradation and community structure, three sampling dates were selected for both amended treatments (residues left at the soil surface vs. incorporated) to build up 16S rRNA gene clone libraries from DNA extracts from residues and characterize the evolution of the composition of the bacterial community between an early (September 9th, 2005), middle (November 8th, 2005), and late (March 20th, 2006) stage of decomposition.

II - Materials and methods

1. Site description and sampling

A field experiment was set up on the Estrées-Mons INRA experimental station located at Mons (49.53°N, 3.01°E). Three samples were collected from the 0-20 soil layer and sent to the Arras Laboratory of Soil Analysis (INRA) for determination of soil properties following standardized methods (http://www.lille.inra.fr/las/methodes_d_analyse/sols). The main characteristics of the soil were as follows: clay (<2µm) $163 \pm 4.1 \text{ g kg}^{-1}$; silt (2-20 µm) $299 \pm 2.3 \text{ g kg}^{-1}$; silt (20-50 µm) $462 \pm 3.6 \text{ g kg}^{-1}$; sand (50-200 µm) $61 \pm 2 \text{ g kg}^{-1}$; sand (200-2000µm) $13.6 \pm 1.3 \text{ g kg}^{-1}$, pH_{H2O} 7.05 ± 0.13 ; CaCO₃ $1.1 \pm 0.15 \text{ g kg}^{-1}$, organic carbon $10 \pm 0.3 \text{ g kg}^{-1}$; organic matter $17.4 \pm 0.5 \text{ g kg}^{-1}$, total nitrogen $0.99 \pm 0.01 \text{ g kg}^{-1}$, and C:N ratio 8.4 ± 0.16 . It is classified as a silt loam soil (Luvisol Orthic, FAO classification).

Prior to the establishment of the field experiment, the 0-20 cm soil layer was homogenous because of yearly soil tillage of the entire experimental site (Alvarez et al., 1995; Oorts et al., 2007). As a consequence, the heterogeneity observed in our study will be essentially the consequence of crop residue amendment and not of a vertical gradient due to differences in soil characteristics over the soil profile.

The field experiment consisted of three treatments according to the way organic inputs were applied to the soil. Each treatment was laid out in a 50 x 4 m block subdivided into three independent 10 x 3 m plots. Before the experiment, all previous crop residues (winter wheat) were removed from soil surface either by harvesting or burning. At the beginning of the experiment (August 2005), plots were amended with the same quantity ($6 \text{ t dry matter ha}^{-1}$) of wheat residues (*Triticum aestivum*). Residues were either left at the soil surface (SW), or incorporated into the first 10 cm of soil by tillage using a rotavator (IW). This allowed distributing the residues as homogeneously as possible in the 0-10 cm soil layer. To avoid migration of surface applied residues via runoff, high density polyethylene safety nets with a 20mm x 20mm diamond mesh have been placed on SW plots. Considering the methodology used to incorporate the residues as well as the quantity of residues added insuring a high density of residues in the 0-10cm soil layer, we assumed that almost all the soil was under the influence of the residues and consequently that this layer corresponded to a detritosphere. Plots without any organic matter input (NA) were used as a control.

For the three treatments, sampling was carried out each month from August 2005 to March 2006. For SW and IW treatments, three zones were considered at each sampling date: (i) the crop residue which was carefully separated from the soil using sieving (5-6 mm) and hand picking and subsequently washed with sterile water on a sieve of 200µm to remove soil particles, (ii) the detritosphere (0-1 cm soil layer for SW; and 0-10 cm soil layer for IW), and (iii) the bulk soil (1-20 cm soil layer for SW; 10-20 cm soil layer for IW). For control plots, only bulk soil (0-20 cm soil layer) was collected. For each plot, four soil subsamples per soil zone were collected over a 50 x 50 cm area and afterwards pooled and mixed. The number of replicates was therefore $n=3$ for each treatment. This allowed obtaining samples representative of each plot. Each soil zone was sieved at 2 mm and stored at either 4°C or -20°C, depending on determinations. The crop residues were either dried at 80°C or cut into pieces and stored at -20°C. Bulk density of the different soil layers (2 replicates per plot) was measured with a rubber balloon density meter (Nardeaux-Humisol, Saint Avertin, France) at the end of the experiment, dry weight of sampled soil being measured after oven-drying at 105°C.

2. Soil and plant residue chemical and biochemical determinations

The soil inorganic N in the detritosphere and bulk soil was obtained by extraction of 100 g fresh soil by 200 mL 1 M KCl (3 replicates per soil layer and date) and determined by continuous flow colorimetry with an auto-analyser (TRAACS 200, Bran & Luebbe, Norderstedt, Germany) using adaptations of the methods proposed by Kamphake et al. (1967) and Krom (1980). The C content of dried wheat residues crushed to 80 µm (3 replicates per date and treatment) was determined with an NA 1500 element analyzer (Fisons, Milan, Italy). To characterize the biochemical composition of decomposing residues, the soluble compounds of the 1 mm dried wheat residues were determined using the method described by Linères & Djakovitch (1993). The resulting non-extracted material was then successively subjected to selective extraction for hemicellulose and cellulose as described by Van Soest (1963). The mass of residue was weighed after each step in the serial extraction: the difference between the mass of material subjected to specific extraction and the mass of residue accounted for a specific component. The mass of the final residual non-extractable fraction of the plant material was considered as lignin (lignin-like) mass. C content of each fraction was determined with an NA 1500 element analyser (Fisons, Milan, Italy) after crushing residues to 80 µm. Microbial biomass C in the detritosphere and bulk soil were

determined after measuring soluble organic C in of CHCl_3 fumigated and non fumigated soil extracts (30 g fresh soil, 100 mL 0.05 M K_2SO_4 , agitation 30 min at 20°C, 3 replicates per date and soil layer) using a 1010 TOC analyser (OI Analytical, College Station, TX) (Trinsoutrot et al., 2000). All results (i.e. residue C, C present in the different biochemical fractions, soil inorganic N and microbial biomass C) were then expressed per unit of surface (ha^{-1}) taking into account the size and the bulk density of each soil layer.

3. Extraction and purification of total DNA from bulk soil, detritusphere and plant residues

Microbial DNA was extracted from three replicates of the wheat residues, detritusphere and bulk soil samples which had been stored to -20°C according to the method described by Ranjard et al. (2003). Briefly, 1 g of each soil and residue sample was mixed with 4 mL for soil and 5 mL for residue of a solution containing 100 mM Tris (pH 8.0), 100 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM NaCl, and 2% (w/v) sodium dodecyl sulphate. Two grams of 106 μm diameter glass beads and eight glass beads of 2 mm diameter were added in a bead-beater tube. The samples were then homogenized for 30 s at 1600 rpm in a mini bead-beater cell disruptor (Mikrodismembrator; S.B. Braun Biotech International) and centrifuged at 7000 x g for 5 min at 4°C after a 30 min incubation at 70°C. The collected supernatants were incubated for 10 min on ice with 1/10 volume of 3 M potassium acetate (pH 5.5) and centrifuged at 14000 x g for 5 min. After precipitation with one volume of ice-cold isopropanol, the nucleic acids were washed with 70% ethanol. For purification, aliquots (100 μL) of crude DNA extracts were loaded onto polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) minicolumns (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) and centrifuged at 1000 x g for 2 min at 10°C. The elute was collected and purified from residual impurities by using a Geneclean Turbo kit as recommended by the manufacturer (Q Biogene®, Illkirch, France).

4. Automated-RISA fingerprinting communities

The bacterial ribosomal IGS were amplified by PCR using the primers S-D-Bact-1522-b-S-20 (small eubacterial ribosomic subunit; 5'-TGCGGCTGGATCCCCCTCCTT-3'), which was labelled at its 5' end with the IRD800 fluorochrome, and L-D-Bact-132-a-A-18 (large eubacterial ribosomic subunit; 5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3'), as described by Ranjard et al. (2003). Fifty nanograms of DNA were used as template in PCR. B-ARISA involved the

use of a fluorescent-labeled primer for PCR which is the IRD 800 dye fluorochrome (MWG SA Biotech, Ebersberg, Deutschland) for the LiCor® DNA sequencer (ScienceTec, Les Ulis, France). For RISA fingerprinting, PCR products were loaded on a 3.7% polyacrylamide gel (acrylamide-N, N-methylenebisacrylamide, 29: 1, Bio-Rad, Ivry sur Seine, France) and run under denaturing conditions for 14 h at 1500V / 80W on a LiCor® DNA sequencer (ScienceTec). The software converted fluorescence data into electrophoregrams where peaks represented PCR fragments. The height of the peaks was calculated in conjunction with the median filter option and the Gaussian integration in 1D-scan, and represented the relative proportion of the fragments in the total products. Lengths (in base pairs) were calculated by using a size standard with bands ranging from 200 to 1659 bp. The standard was made by PCR amplifications of different fragment sizes of phage M13 mp18 (Promega, Charbonnières, France).

5. Statistical analysis

The effect of location of wheat residues and of the sampling date on the soil inorganic N content, C content of dried wheat residues and van Soest fractions and microbial biomass data were tested by means of two-ways ANOVA and differences between means were tested with the Student-Newman-Keuls test ($P \leq 0.05$). All these statistical calculations were carried out using XLSTAT software (Addinsoft, Paris, France).

The kinetics of C evolution in the different biochemical fractions (hemicellulose, cellulose, lignin) was fitted using a 1-compartment model by using the NLIN procedure (SAS Institute, 2001):

$$C(t) = A(1 - e^{-k_1 t})$$

where $C(t)$ represents the carbon of residue present in the biochemical fraction by day t (kg C ha^{-1}), A is the amount of residue C present in the biochemical fraction by day $t = 0$ (kg C ha^{-1}), and k_1 is the rate constant of decomposition of the biochemical fraction (days^{-1}). Rate constants of decomposition of the biochemical fractions obtained for the different treatments were then compared using variance analysis and mean classification were based respectively on the ANOVA procedure and the Student-Newman-Keuls test of the SAS software (SAS Institute, 2001), with a significance at level of $P = 0.05$.

Data obtained from the 1D-Scan software were converted into a table summarizing the band presence (i.e. peak) and intensity (i.e. height or area of peak) using the PrepRISA program (Ranjard et al., 2001). This software allowed us to choose the number of peaks (i.e. all detected populations versus the most dominant populations), the profile resolution (between 1 and 10 bp) and the method of evaluating peak intensity (height or area).

Covariance matrix (bacterial communities as rows and bands as columns) were subjected to Principal Component Analysis (PCA), which provided an ordination of bacterial communities in a factorial map based on the scores of the first two principal components. The Monte Carlo test was performed with 1000 permutations to confirm the significance of the discrimination of the structures of the bacterial communities revealed by the PCA. PCA and Monte Carlo test were performed using the ADE-4 software (Thioulouse et al., 1997).

6. Clone library construction and sequencing

In order to precisely describe bacterial populations during crop residues degradation, clone libraries were constructed. Three dates were chosen for SW and IW treatments, respectively: September 2005, November 2005 and March 2006. For each date and each treatment, same amount of DNA extracted from each of the three repetitions was pooled to perform the PCR. The bacterial 16S rRNA gene subunit was amplified by PCR with universal primers: 1492R and 27F (Amann et al., 1995). PCR products were ligated to the vector pGEMT (Promega, Charbonnières, France). Ligation and transformation into *Escherichia coli* JM109 competent cells were carried out according to the manufacturer's protocol. A total of 50 white clones were sampled to constitute the library. The DNA of each clone was extracted by "heat/cold" shocks. The plasmid inserts from each clone were amplified using Sp6 and T7 primers. The amplicons were visualized through a 2% agarose gel electrophoresis by ethidium bromide staining to determine the insert size. Sequencing of amplicons with the expected size was performed by Beckman Coulter Genomics (<http://www.beckmangenomics.com>) using the 1492R primer with a Sangers sequencing protocol using the Big Dye 3.1 kit (Applied Biosystems) and the ABI 3730XL DNA sequencer. For each sequence, quality of the read has been determined based on the phred scores of each base (based on a basecall performed with the basecaller phred). Portion of the read composed by bases harboring phred scores ≥ 20 have been considered as high quality portion suitable for diversity analysis.

7. Sequence analyses and diversity indices calculation

The 16S rRNA gene sequences were used as queries in blast searches for standard nucleotide-nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1990) using GeneBank database. Sequences from clones and the most closely relative sequences were aligned using Clustal W (Trinsoutrot et al., 2000). Phylogenies were determined by Neighbour-Joining method (Saitou & Nei, 1987) using Kimura “2-parameters” model of nucleotide substitution (Kimura, 1980). Tree nodes validity was determined from the results for 1000 bootstrapped data sets using the phylwin software in the PHYLIP program (Felsenstein, 1985). The combination of similarity data and phylogenetic analysis was used to define operational taxonomic units (OTUs). An OTU was defined when the percentage of similarity was superior to 90 % and the bootstrap value was superior to 80 %.

Calculation of diversity indices was applied to 16S rRNA gene sequences defined as OTUs. Shannon diversity index richness (H) and evenness (E) values were calculated as previously described (Begon et al., 1986).

8. Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences determined in this study, corresponding to an average of 750 bp of length, have been deposited in the GeneBank database. The accession numbers for the 16S rRNA gene sequences obtained in our study were from FJ432290 to FJ432586 and are provided as supplemental data.

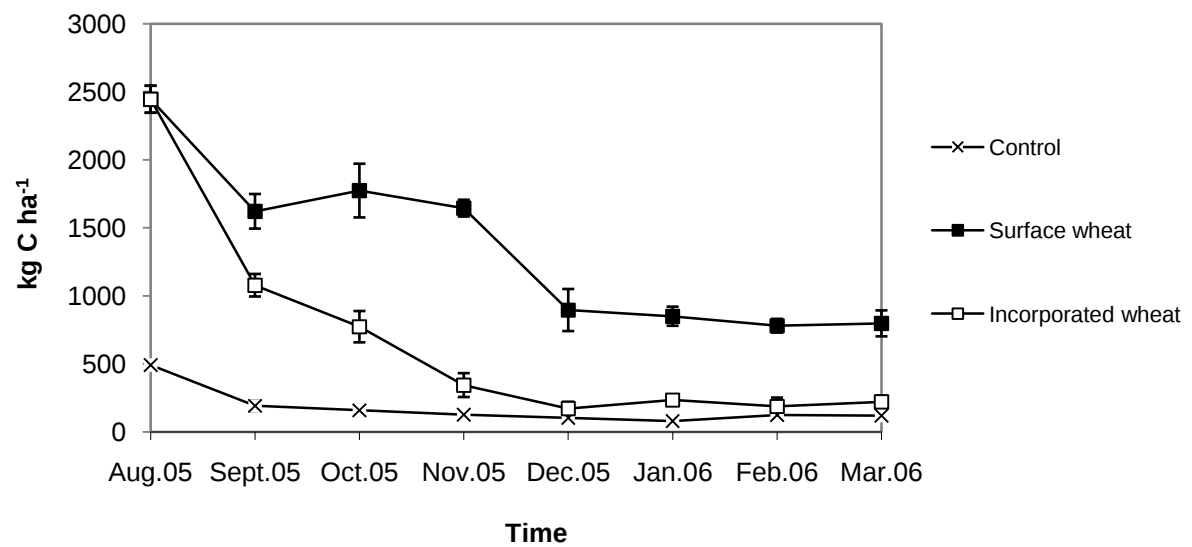


Figure II.1: Amount of C in remaining wheat residues during decomposition depending on their localization: incorporated (IW) or left at the soil surface (SW). In the control, dynamics represents the residual wheat residues remaining in the whole soil after aerial parts have been exported and burned. Bars indicate standard deviations.

III - Results and Discussion

1. Dynamics of residue degradation

The dynamics of the degradation of wheat residues in IW and SW treatments were investigated by measuring the C of the residues remaining in soil at each sampling date [Figure II.1]. Wheat residues decomposed significantly more quickly in the IW, compared to the SW treatment ($P < 0.05$). Almost all the residue was decomposed four months after incorporation whereas C content of the residues left at the surface decreased only from 2500 to 800 kg C ha⁻¹ during the same period before stabilizing until the end of the experiment [Figure II.1]. This finding was in agreement with those from other field experiments demonstrating a slower decomposition rate for mulched than for incorporated residues (Curtin et al., 2008; Curtin et al., 1998; Douglas et al., 1980). This difference in degradation rate between IW and SW ($p \leq 0.05$) may be explained by (i) an increase of the soil/residue surface contact for soil-incorporated residues, hence favouring the colonization of residues by the soil degrading microbial community (Cookson et al., 2008), and (ii) more favourable moisture conditions for microbial activity when residues are mixed with soil (Coppens et al., 2006; Curtin et al., 2008).

Qualitative changes of the residues in terms of the dynamics of the different C pools (soluble compounds, hemicellulose, cellulose and lignin) as measured by the Van Soest procedure indicated that regardless of the location of the residues, cellulose and hemicellulose decomposed more quickly than lignin ($P < 0.05$) [Figure II.2]. However, qualitative evolution of the residues depended greatly on location ($P < 0.05$). More precisely, when residues were incorporated, the decrease in the C content of the residues over the first three months was mainly due to a fast cellulose and hemicellulose degradation whereas lignin content decreased much slowly ($P < 0.05$). Degradation of the lignin pool really began only after almost all of the easily degradable C pools were consumed. This was in agreement with the weak degradability of lignin which represents the recalcitrant C pool of plant tissues (Hadas et al., 2004; Henriksen & Breland, 1999). In other respects, the delay observed for lignin degradation suggested a modification in the microbial degradation strategy during the decomposition of the residues. This finding confirms recent results highlighting successions of microbial populations responsible for the degradation of wheat residues in soil and relating those successions to differences in growth strategies between fast growing microbes decomposing mainly easily degradable C compounds, and slow growing microbes

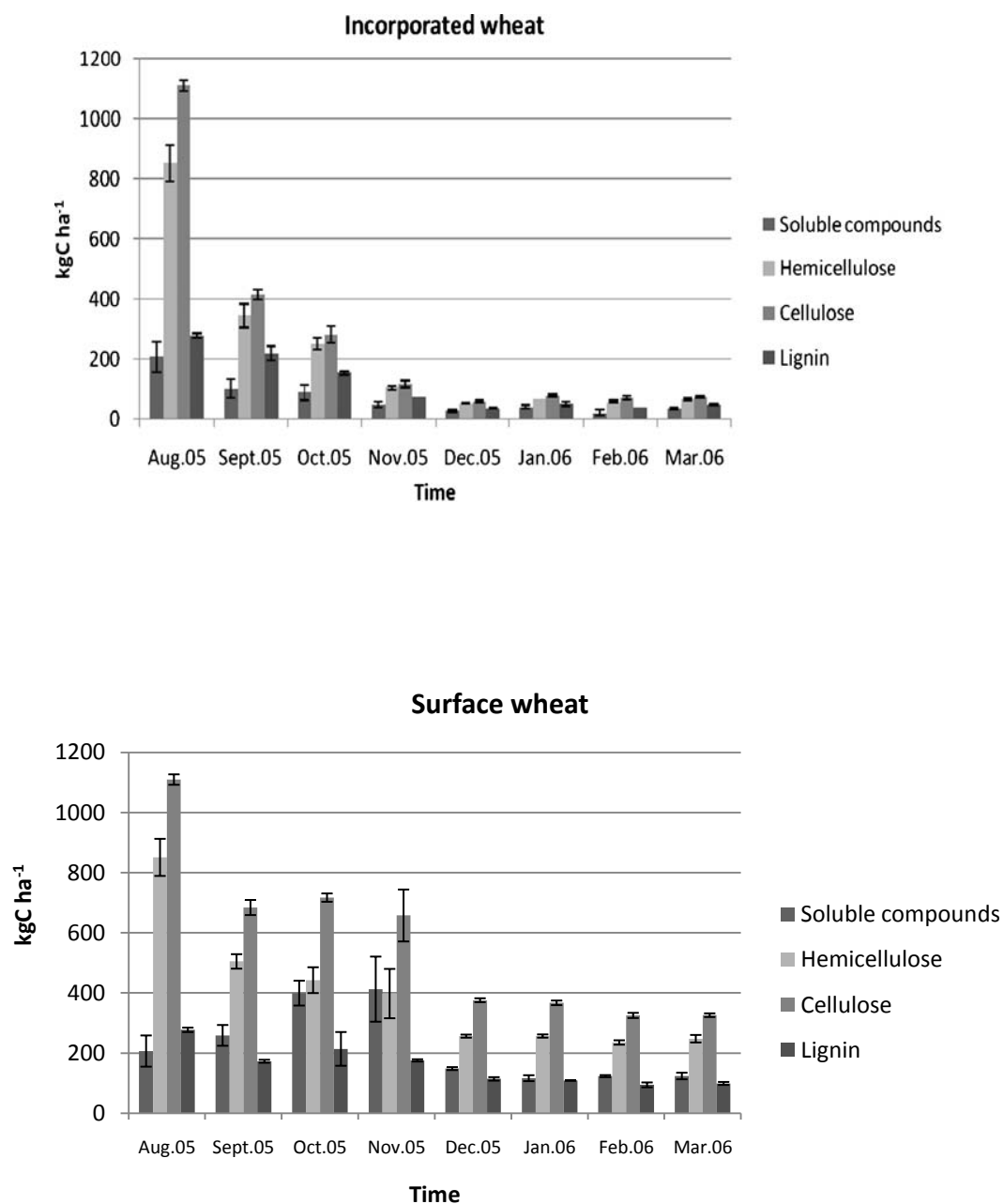


Figure II.2: Evolution of the soluble compounds, hemicellulose, cellulose and lignin of remaining wheat residues during their decomposition depending on their localization in the soil: incorporated (IW) or left at the soil surface (SW). Bars indicate standard deviations.

decomposing mainly recalcitrant C compounds (Bernard et al., 2007). In contrast, in the SW treatment, the relative proportion of lignin increased in the remaining C measured in the residues as it decomposed much slowly than the other fractions ($P < 0.05$) during the sampling period, perhaps because of the characteristics of the mulch in terms of moisture which did not allow lignin degrading microbes to develop and/or to express their catabolic capacities on the residues.

2. Inorganic N dynamics in soil

Significantly lower amounts of inorganic N were recorded in the bulk soil of the SW and IW treatments compared to the control for the period from September 2005 to December 2006 ($P < 0.05$), suggesting N immobilization in microbial biomass in this soil zone [Figure II.3]. This result suggested that under field conditions the stimulation of the microbial activity by the presence of the crop residues is not limited to the first millimeters close to the residues, as previously demonstrated under laboratory conditions (Gaillard et al., 1999), but extended to several centimeters around the residues. Such an immobilization of N in the bulk soil could be due to the decomposition of carbon compounds derived from the residues and leached through the soil profile because of rain (Coppens et al., 2006). More precisely, the bulk soil of the SW treatment showed important variations in N content, characterized by an increase from 18 to 25 kg N ha⁻¹ due to N mineralization during the autumn, followed by a decrease to < 5 kg N ha⁻¹ between October and March due to drainage [Figure II.3]. These results were in accordance with those of other authors reporting dynamics of soil mineral N consecutive to residue addition in field experiments (Fuentes et al., 2003; Oorts et al., 2007a). Contrastingly, weak variations in N content were observed in the bulk soil of the IW treatment, mainly due to an important N immobilization recorded for the period from September to November. This agrees with Corbeels et al. (2003), and Coppens et al. (2006) who found that more N was immobilized when residues were ground and mixed with the soil than when they were cut and left on the surface. This increase in N immobilization in IW compared to SW could be attributed to an increase in the microbial activity in the bulk soil due to a major release of soluble C compounds from the residues, hence increasing their need of N to meet their metabolic requirements (Mary et al., 1996). This hypothesis is in agreement with the greater decomposition of residues observed in the IW treatment.

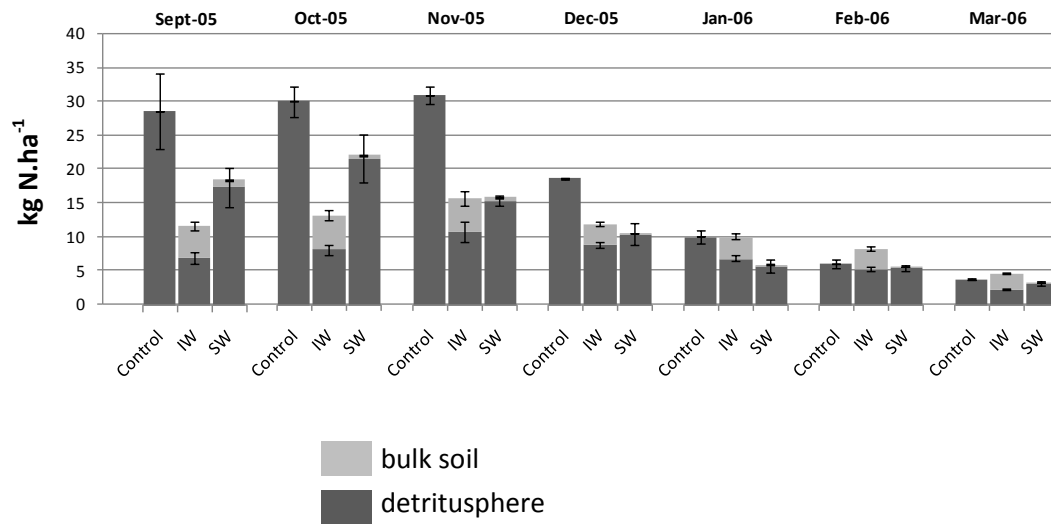


Figure II.3: Dynamics of inorganic N in the different soil zones after addition of wheat residues depending on their localisation: incorporated (IW) or left at the soil surface (SW). In the control, dynamics represents the evolution of inorganic N in the whole soil. Bars indicate standard deviation values.

Whatever the location of the residues, the amount of inorganic N observed was always significantly lower in the detritusphere compared to the bulk soil ($P < 0.05$), indicating an increase in N immobilization in this particular soil zone. This result was in agreement with Nicolardot et al. (2007) and highlighted the fact that residue decomposition induced a gradient of microbial activity, as stated before by Gaillard et al. (2003).

3. Spatial distribution of microbial biomass

Addition of wheat residues did not induce significant modifications ($P < 0.05$) in microbial biomass in the bulk soil of IW or SW treatments compared to the NA control soil [Figure II.4]. However, a significant increase ($P < 0.05$) was recorded in the detritusphere compared to the bulk soil in both IW and SW treatments, indicating a quantitative stimulation of microbial communities in this particular soil zone. This shift in microbial biomass recorded in the detritusphere may be explained by the transfer from the residues to the detritusphere and bulk soil of water soluble C during wheat decomposition (Coppens et al., 2006; Gaillard et al., 2003; Nicolardot et al., 2007; Poll et al., 2006). Together with the dynamics of residue decomposition and inorganic N discussed above, our results suggested that the increase of activity in both detritusphere and bulk soil could be explained by different mechanisms depending on the C flux gradient between the soil zones, with the detritusphere being characterized by an increase in the metabolic activity and in the number of microbes and the bulk soil being just characterized by an increase in metabolic activity. This hypothesis is in agreement with the highest microbial activity in regards to N immobilization recorded in the detritusphere compared to the bulk soil whatever the way residues were added to soil.

4. Spatial distribution of the structure of bacterial communities

For both IW and SW treatments, bacterial ARISA fingerprinting was performed on each of the three soil zones: the residue, the detritusphere and the bulk soil for September, November and March sampling dates to evaluate the spatial distribution of the structure of the bacterial communities according to residues degradation stage. B-ARISA profiles obtained were complex, with bands ranging from 200 to 1659 bp, highlighting that the bacterial communities were highly diverse whatever the soil zone (data not shown).

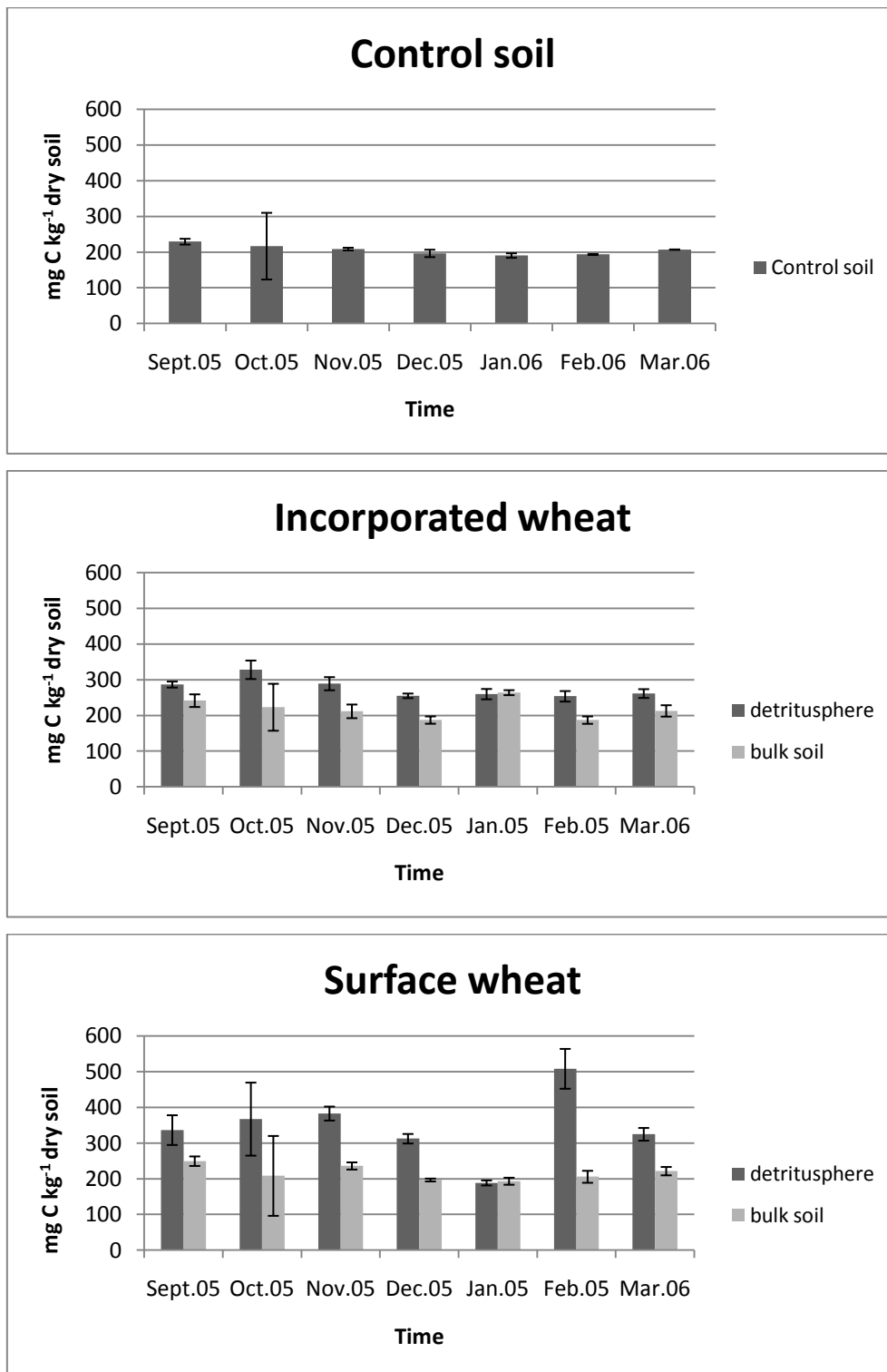


Figure II.4: Dynamics of the C microbial biomass in the different soil zones after addition of wheat residues depending on their localization: incorporated (IW) or left at the soil surface (SW). In the control, dynamics represents the evolution of C microbial biomass in the whole soil. Bars indicate standard deviation values.

Principal Component Analysis (PCA) of the profiles revealed a significant discrimination (Monte-Carlo, 1000 permutations) of the residues from the bulk soil and the detritosphere on the first PCA axis whatever the sampling date [Figure II.5]. These results highlighted an enduring impact of crop residues inputs on the spatial distribution of bacterial diversity since no return of the residues colonizing communities to the original bacterial community (i.e. bulk soil) was observed whatever the localization and the degradation stage of the residues. Our results confirmed that decomposing residues result in soil heterogeneity (Gaillard et al., 2003), but highlighted that their sphere of influence is spatially limited when considering the structure of bacterial communities. More precisely, it appears from our results that residues themselves constitute the zone of greatest changes in microbial community composition over time. This may be explained by the wide range of metabolic capacities necessary to degrade complex plant materials, hence requiring the selection of particular microbial populations (De Boer et al., 2005; Hu & van Bruggen, 1997). Contrastingly, in the detritosphere and bulk soil, C compounds transferred from the residues may be mainly represented by more simple soluble compounds, the degradation of which does not require specialized metabolic capacities nor consequently the stimulation of specific microbial populations.

5. Dynamics of the structure of bacterial communities colonizing the residue

Regarding the structure of the bacterial communities colonizing the residues, PCA of B-ARISA profiles obtained for IW and SW treatments revealed significant important dynamics over the sampling time (Monte Carlo, 1000 permutations) [Figure II.6]. Such a community dynamics suggested a succession of populations consecutive to wheat addition, as described in recent studies focusing on the decomposition process of plant residues in soils (Aneja et al., 2004; Bernard et al., 2007; De Boer et al., 2005; Lundquist et al., 1999; Zelenev et al., 2005). Analysis of the metabolic capacities necessary for residue degradation reveals that they are not uniformly distributed over the soil microflora, and in particular that those involved in the last steps of the degradation are only carried out by a relatively limited number of populations (De Boer et al., 2005; Hu & van Bruggen, 1997), which could explain the successions of populations observed. The important variability observed for the samples collected in February for the two treatments may be explained by the negative temperatures that occurred during this period (see temperature and rainfall data provided as supplemental data).

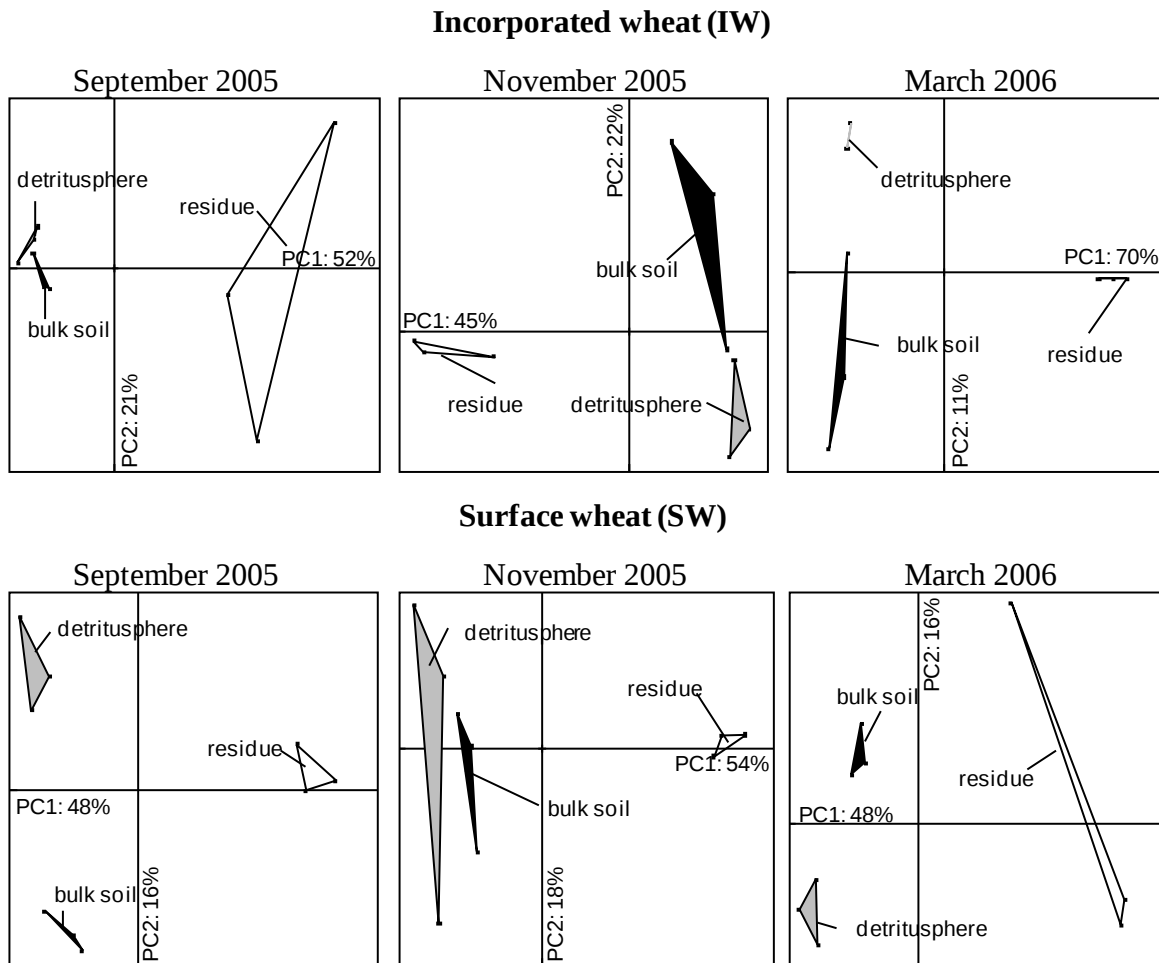


Figure II.5: Principal component (PC1 x PC2) plots generated from B-ARISA profiles obtained from the residues, the detritusphere, and bulk soil depending on their localization: incorporated (IW) or left at the soil surface (SW). Convex hulls represent 90 % confidence limits.

Depending on the location of the residues, we observed different dynamics in the structure of the residue colonizing bacterial communities (Monte Carlo, 1000 permutations). The IW treatment showed a continuous dynamics, with the different sampling dates being gradually discriminated on the first axis accounting for 36% of the variability [Figure II.6A]. Contrastingly, dynamics appeared less progressive in the SW treatment, with two clusters being discriminated on the first axis (62% of the variability) between an early (September/October/November) and a late (December/January/February/March) step in the degradation process [Figure II.6B]. Such a difference between the two treatments could be related to the biochemical changes of the residues during the degradation process as highlighted above. More precisely, in the SW treatment, modifications observed between the early and the late stages of the degradation process might be explained by an increase in the recalcitrance of the residues due to the increase in the relative lignin content [cf Figure II.2]. Contrastingly, the progressive modifications observed in the SW treatment could be attributed to the succession of populations harbouring the different metabolic capacities required for the complete degradation of residues.

Comparison of the dynamics of the structure of bacterial communities between IW and SW treatment evidenced two different dynamics depending on the way residues were added to soil [Figure II.7]. Communities in SW and IW were similar just after addition of straw, maybe because of the release of easily accessible carbohydrates in both treatments. However, the dynamics observed for the two treatments diverged over the experiment, the late sampling dates being more discriminated than the initial sampling dates on the first axis of the factorial map. This clearly suggested a strong influence of the location of the residues on the diversity of the bacterial populations stimulated, which could be explained by (i) the differences in the ecological niches between the mulch and the incorporated residues, and (ii) the differences in the quantitative and the qualitative changes of the residues observed between SW and IW.

6. Taxonomic composition of the bacterial communities colonizing the residues

In regards to the results discussed above, we investigated the taxonomic composition of the bacterial populations colonizing the residues at an early (September 2005), middle (November 2005), and late (March 2006) stage of degradation in each treatment. To do so, 16S rRNA gene clone libraries were constructed for SW and IW. Whatever the treatment and the sampling date, a wide diversity of bacterial species was observed [Figure II.8; table II.1,

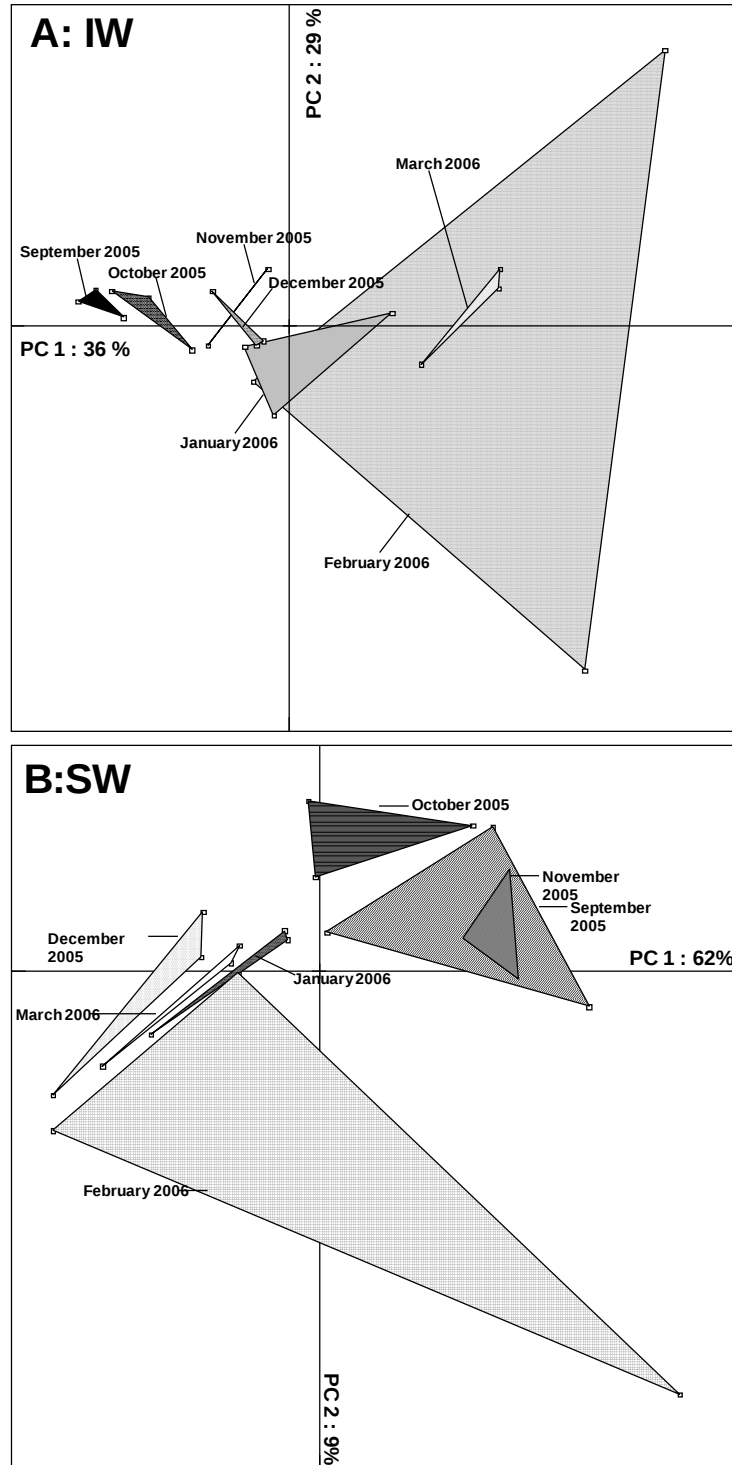


Figure II.6: Principal component (PC1 x PC2) plots generated from B-ARISA profiles obtained from the residues incorporated (A) or left at the soil surface (B) for each sampling date. Convex hulls represent 90 % confidence limits.

supplemental data]. These results were in agreement with the complexity of the B-ARISA profiles obtained from these samples. The Shannon diversity indices were calculated using the determined sequences of each clone library. The values obtained were $H = 3, 3.2, 3.2$, and $H = 2.8, 2.5, 2.8$ for September, November, and March samples of IW and SW treatments, respectively. The diversity recorded for the residues left at the surface seems always lower than diversity observed in incorporated residues. This could be attributed to the increase in the soil/residue surface when residues are incorporated, which may favour the accessibility of residues for a wide diversity of degrading microbial populations (Cookson et al., 2008). On the other hand, wheat residues left at the soil surface are more exposed to fluctuations of temperature and moisture than residues incorporated to soil (Coppens et al., 2006), which may limit microbial colonization (Curtin et al., 2008) and select particular populations able to survive in fluctuating environments. Evenness indices calculated using the sequences of each clone library supported this hypothesis since the values obtained were lower for SW than for IW ($E = 0.91/0.85/0.87$ vs. $E = 0.93/0.94/0.94$ for September, November and March libraries, respectively), indicating that the distribution of bacterial populations was less equitable when residues were left at the soil surface.

Whatever the date and the treatment considered, bacteria belonging to the *proteobacteria* group may be the most represented since they represented an average of 70% of all the sequences recovered in our molecular inventories. This was in agreement with (Fierer et al., 2007a) who observed an increase in the relative abundance of bacteria belonging to this group in rhizospheric soils compared to C-poor bulk soils, demonstrating that this group is stimulated in C-rich environments. However, the distribution of the different subgroups of *proteobacteria* may be different depending on the location of the residues. More precisely, bacteria belonging to the α -subgroup may be stimulated on residues left at the soil surface compared to the incorporated residues (44%, 51%, 55% for SW vs. 38%, 44%, 32% for IW of all the sequences obtained from September, November and March samples, respectively), maybe due to the stimulation of the *Sphingomonas* phylum which represented 8%, 26% and 18% of all the sequences obtained from September, November, and March SW samples, respectively [Table II.1, supplemental data]. *Sphingomonas* is a Gram-negative, non spore forming, chemoheterotrophic, strictly aerobic bacterium. It has been found in various environments, including aqueous and terrestrial habitats, plant root systems or clinical samples (Fredrickson et al., 1995; Hsueh et al., 1998; Rickard et al., 2002). Its widespread distribution in the environment is a result of its ability to use a wide range of organic

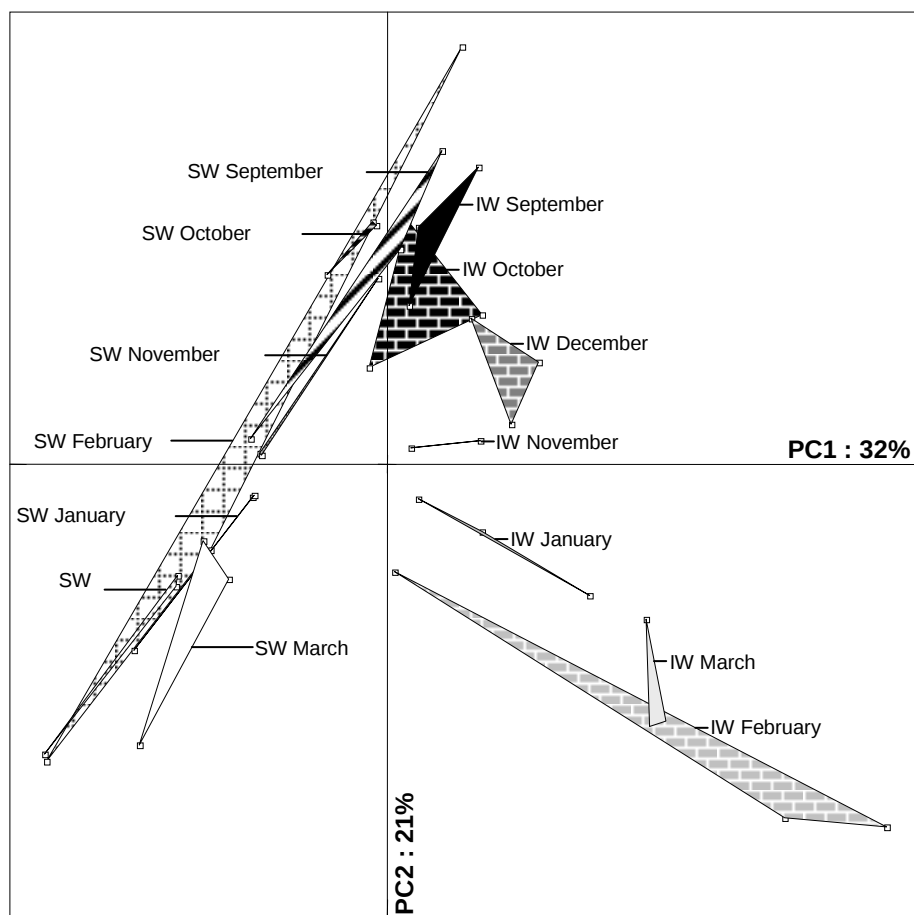


Figure II.7: Principal component (PC1 x PC2) plots generated from B-ARISA profiles obtained from the incorporated residues (IW) and the residues left at the soil surface (SW) for each sampling date. Convex hulls represent 90 % confidence limits.

compounds (Fredrickson et al., 1995). Interestingly, it has also been described as an *r*-strategist (i.e: fast growing copiotroph microbe) (Wittmann et al., 1998) widespread on plant aerial parts (Kim et al., 1998; Takeuchi et al., 1995), which may explain its better fitness on the residues left at the soil surface.

Contrastingly, incorporation of the residues may induce a stimulation of γ -*proteobacteria* since the proportion sequences affiliated with this group was higher when residues were incorporated, and particularly in the early degradation phase (31%, 10%, 14% vs. 6%, 2%, 2% of all the sequences obtained from September, November, and March samples of IW and SW treatments, respectively). Stimulation of γ -*proteobacteria* consecutive to wheat residue incorporation had previously been reported by Bernard et al. (2007). In other respects Fierer et al. (2007a) observed an increase in γ -*proteobacteria* after addition of sucrose to soil, highlighting the copiotrophic ecological attributes of these organisms. Consequently, in our study the stimulation of populations affiliated with γ -*proteobacteria* when residues were incorporated could be attributed to the increase in soluble-C release from the residues in this treatment, hence conferring a better fitness to those copiotrophic populations.

Differences between the two treatments may also be due to an increase in sequences affiliated to the *Actinobacteria* when residues were left at the soil surface (14%, 21%, 14% vs. 6%, 6%, 10% of all the sequences obtained from September, November, and March samples of SW and IW treatments, respectively). *Actinobacteria* are a group of Gram-positive bacteria with high G+C ratio. They play an important role in decomposition of organic materials, such as cellulose and lignin and thereby play a vital part in organic matter turnover and carbon cycle (De Boer et al., 2005). Furthermore, some Actinomycetes species produce external spores adapted for survival for periods of time in unfavourable conditions. Consequently, in our study, stimulation of this bacterial group when residues were left at the soil surface is in agreement with the fluctuating temperature and moisture conditions occurring in the mulch. Together with the stimulation of the *Sphingomonas* phylum described above, our result suggest that when residues are left at the soil surface, moisture and temperature fluctuations occurring in the mulch may lead to the selection of particular well adapted populations harbouring enhanced catabolic and/or survival capacities. The Bacteroidetes group was also well represented in all the libraries, whatever the location and the sampling date, suggesting a stimulation of this group in C-rich environments because of its copiotrophic attributes. This

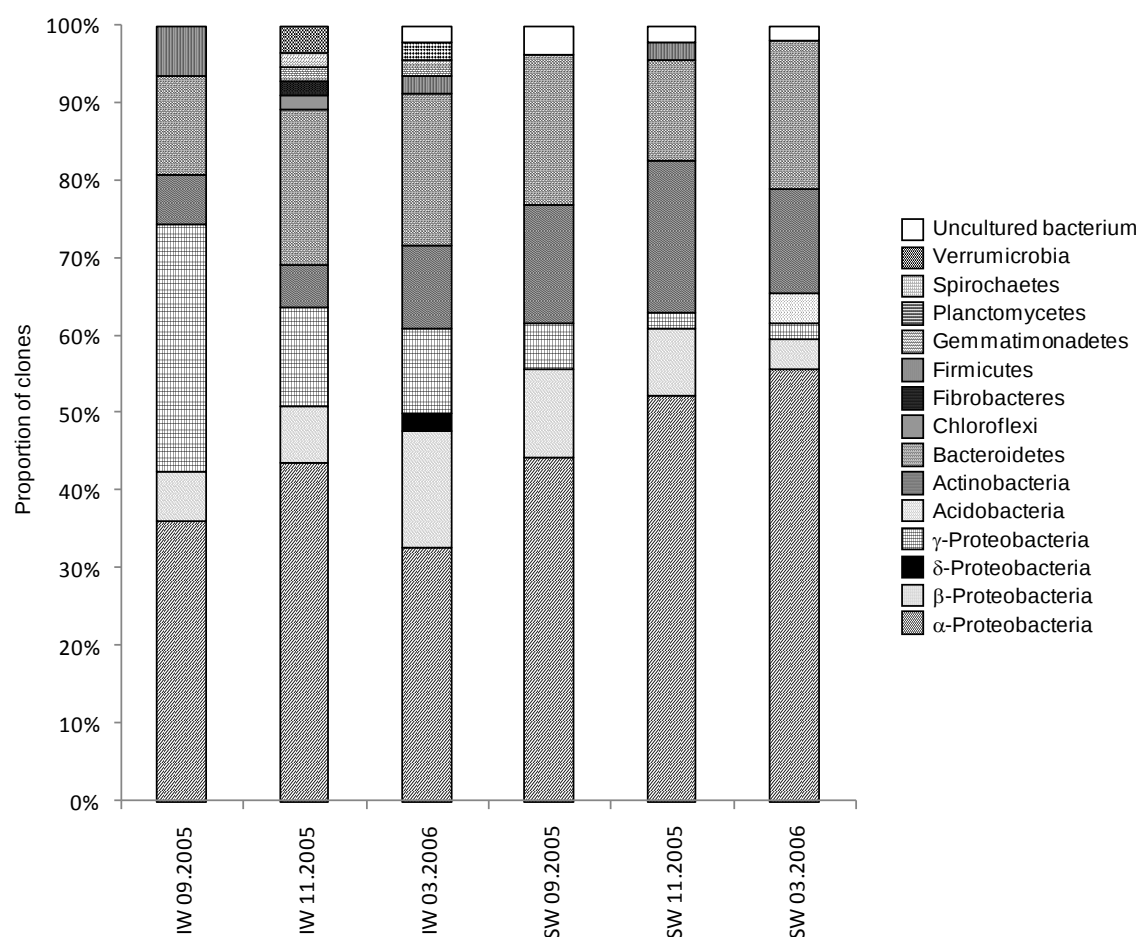


Figure II.8: Relative distribution of bacterial phyla determined by the affiliation of 16S rRNA sequences from the clones library generated on samples of wheat incorporated to soil (IW) and wheat residues left at the surface (SW) at an early (September 2005), middle (November 2005) and late (March 2006) stage of decomposition.

finding was in agreement with Fierer et al. (2007a) who demonstrated a positive correlation between the abundance of Bacteroidetes and the C mineralization rates.

Altogether, our results demonstrated that the location of the residues greatly influenced the decomposition rate as well as the ecological successions observed in the population structure and taxonomic diversity of the bacterial communities colonizing these residues. Consequently, crop residues management practices may represent a suitable way to manage the bacterial component in soil and consequently the soil processes they are responsible for. However, it needs to be noticed that the present study focused on bacterial communities and did not take into account fungi that constitute another important soil microbial component involved in organic matter degradation. Consequently, this may give an incomplete picture of microbial dynamics at the site, especially on the soil surface where fungi will be important colonizers because of their ability to translocate nutrients. Our choice was justified by the lack of knowledge of the populations and the ecology of the bacterial communities involved in organic matter degradation in soil compared to fungal communities. However, further research will need to take into account both fungal and bacterial communities to better understand the complementarities of those two microbial components involved in soil organic matter turn-over.

Acknowledgements

This study was financially supported by the Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) and the Burgundy region. We would like to thank G. Alavoine, F. Millon, S. Millon, C Herre, M.J. Herre for their technical assistance, and M. Leleu, responsible for the Estrées-Mons INRA experimental station. Thanks also to Mary Bouley for critical reading of the manuscript.

Table II.S1 supplemental data. Closest affiliations of 16S rRNA sequences cloned from the DNA extracted from wheat residue incorporated and left at the soil surface for September, November 2005 and March 2006. The accession numbers for the 16S rRNA sequences were deposited in the GeneBank database (from FJ432290 to FJ432586).

Genus of bacteria	Accession number	Accession number of reference	% d'homologie	Incorporated wheat			Surface wheat		
				09.2005	11.2005	03.2006	09.2005	11.2005	03.2006
Alphaproteobacteria									
Brevundimonas (4)	FJ432380	DQ372984.1	89%			1		2	1
	FJ432324	AY571824.1	94%						
	FJ432402	DQ108394.1	87%						
	FJ432415	EF423374.1	94%						
Caulobacter (7)	FJ432550, FJ432437, FJ432438 and FJ432375	DQ337549.1	94 à 96%	1	2	2		2	
	FJ432388	AJ227774.1	92%						
	FJ432431	AJ227788.1	92%						
	FJ432432	AJ227772.1	95%						
	FJ432456	AJ717391.1	93%		1				
Aurantimonas (3)	FJ432376, FJ432297 and FJ432518	EF423363.1	94 à 96%			1	1		1
Afipia (2)	FJ432374	U87785.1	95%			2			
Bradyrhizobium (2)	FJ432541	Z94805.1	98%	1	1				
	FJ432470	EF601955.1	95%						
Rhodopseudomonas (5)	FJ432465	AB087719.1	94%		1	3			1
	FJ432346, FJ432348 and FJ432307	AJ968691.1	89 à 93%						
	FJ432347	CP000463.1	94%						
Ochrobactrum (2)	FJ432554	AF452128.1	95%		1	1			
	FJ432352	AM490617.1	94%						
Devosia (10)	FJ432412	AB271045.1	94%	2	2		1	2	3
	FJ432328 and FJ432329	DQ227786.1	94 à 95%						
	FJ432562	EF433462.1	92%						
	FJ432460 and FJ432515	EF540476.1	93 à 97%						
	FJ432547 and FJ432413	EF540486.1	95 à 96%						
	FJ432486	EF554909.1	87%						
	FJ432301	EF012357.1	93%						
	FJ432416	EF648045.1	86%					1	
	FJ432292	AB220076.1	86%		1		2	1	8
	FJ432309 and FJ432517	AB220078.1	97 à 98%						
Rhodomicrobium (1) Methylobacterium (12)	FJ432319	AM237344.1	94%						
	FJ432290, FJ432291, FJ432293 and FJ432294	AY369236.2	92 à 96%						
	FJ432306 and FJ432391	AY616142.1	94%						
	FJ432484	DQ322592.1	94%						
	FJ432522	Z23156.1	95%						
	FJ432490 and FJ432491	AM489616.1	96 à 97%				3	1	
	FJ432530	AM231587.1	89%						
	FJ432425	AF533356.1	93%						
	FJ432436	DQ337585.1	94%		1				
	FJ432580	AB306891.1	94%	1					
	FJ432561	AJ271902.1	97%	5	3	1	9	3	2
	FJ432430	AJ810381.1	92%						
	FJ432560	AM084044.1	95%						
	FJ432499, FJ432500, FJ432501, FJ432502 and FJ432503	AM237359.1	94 à 99%						
	FJ432521	AM489652.1	96%						
	FJ432563, FJ432442 and FJ432320	AY509211.1	92 à 96%						
FJ432475	AY509213.1	95%							
FJ432463	DQ337581.1	92%							
FJ432372	DQ855276.1	96%							
FJ432424 and FJ432295	EF363715.1	93%							
FJ432414, FJ432544, FJ432545, FJ432494, FJ432495 and FJ432496	EF540493.1	92 à 98%							
Sinorhizobium (3)	FJ432305	AF285965.1	94%				1		2
	FJ432335	EF100529.1	85%						
	FJ432533	AM084000.1	87%						
unclassified rhizobiales (1)	FJ432338	AJ810382.1	92%						1
Rhodobacter (1)	FJ432553	DQ413163.1	95%	1					

unclassified Rhodobacteraceae (1)	FJ432525	DQ659412.1	94%						1
Paracoccus (1)	FJ432528	AY573045.1	87%						1
Caenimicrobium (2)	FJ432477 and FJ432478	EF100695.1	87 à 89%		2				
Kaistobacter (1)	FJ432471	AB245347.1	92%		1				
Sphingobium (4)	FJ432577, FJ432578, FJ432584 and FJ432296	DQ376584.1	90 à 95%	3					1
Sphingomonas (37)	FJ432510, FJ432511 and FJ432396	AB055863.1	91 à 93%	2	7	3	4	12	9
	FJ432321, FJ432322, FJ432323, FJ432394 and FJ432395	AF131295.2	94 à 97%						
	FJ432397	AF385529.1	91%						
	FJ432448, FJ432449 and FJ432450	AF503278.1	92 à 93%						
	FJ432345 and FJ432429	AJ009706.2	92 à 94%						
	FJ432302	AJ251638.2	90%						
	FJ432417	AY512601.1	92%						
	FJ432398 and FJ432401	AY571827.1	95 à 96%						
	FJ432569	AY599670.1	94%						
	FJ432428	CP000699.1	94%						
	FJ432469	DQ151830.2	93%						
	FJ432403 and FJ432400	DQ339616.1	90 à 95%						
	FJ432570 and FJ432479	DQ898300.1	94%						
	FJ432378	DQ917253.1	96%						
	FJ432311, FJ432316 and FJ432526	EF103200.1	91 à 96%						
	FJ432440	EF103215.1	95%						
	FJ432439	EF462462.1	93%						
	FJ432310, FJ432312, FJ432313, FJ432537 and FJ432399	EF540484.1	94 à 97%						
	FJ432379	Y09639.1	94%						
unclassified Alphaproteobacteria (1)	FJ432386	EF612766.1	83%					1	
unclassified Alphaproteobacteria (1)	FJ432542	AF498713.1	94%	1					
uncultured alpha proteobacterium (1)	FJ432474	EF032742.1	89%		1				
Betaproteobacteria									
Polaromonas (1)	FJ432462 and FJ432371	AM492164.1	95 à 96%		1	1			
Variovorax (9)	FJ432420	AB245358.1	96%		2	4	1	1	1
	FJ432534	AB300597.1	98%						
	FJ432387	AF538929.1	96%						
	FJ432385	AY571831.1	95%						
	FJ432349 and FJ432350	AY689053.1	97%						
	FJ432331	DQ279350.1	96%						
	FJ432481 and FJ432482	EF419341.1	96%						
unclassified Burkholderiales (1)	FJ432446	AB245356.1	96%		1				
unclassified Comamonadaceae (1)	FJ432555	AF468446.1	96%	1					
unclassified Comamonadaceae (1)	FJ432367	EF540485.1	86%			1			
Janthinobacterium (1)	FJ432373	EF455530.1	96%			1			
Massilia (6)	FJ432514 and FJ432390	AJ871463.1	93 à 94%	1			4	1	
	FJ432489	AM237371.1	94%						
	FJ432509	AM489661.1	99%						
	FJ432551	AY966001.1	94%						
	FJ432497	DQ177478.1	94%						
unclassified Oxalobacteraceae (1)	FJ432581	AY429714.1	95%	1					
unclassified Oxalobacteraceae (1)	FJ432519 and FJ432389	DQ113445.1	92 à 96%				1	1	
unclassified Oxalobacteraceae (1)	FJ432308 and FJ432411	DQ337591.1	89 à 90%					1	1
Deltaproteobacteria									
Chondromyces (1)	FJ432360	AJ233940.1	91%			1			
Gammaproteobacteria									
Pantoea (3)	FJ432552	AF130946.1	95%	1	2				
	FJ432467 and FJ432468	DQ307453.1	93 à 94%						
Legionella (1)	FJ432418	AF424887.1	91%					1	
Acinetobacter (6)	FJ432559	DQ857754.1	93%	6					
	FJ432549 and FJ432571	DQ988168.1	96 à 97%						
	FJ432539	EF540501.1	96%						
	FJ432548 and FJ432582	X81659.1	96%						
Cellvibrio (2)	FJ432369	EF540502.1	92%		2				
	FJ432370	AJ289162.1	95%						
Pseudomonas (7)	FJ432558	AY308048.1	97%	4	1	1	1		
	FJ432583 and FJ432498	AY456700.1	95 à 96%						
	FJ432556	DQ178233.1	97%						
	FJ432364	DQ898298.1	88%						
	FJ432573	EF491958.1	93%						
	FJ432447	EF601815.1	97%						
Rhizobacter (1)	FJ432461	AB297965.1	93%		1				
Aquimonas (1)	FJ432359	DQ499974.1	97%				1		
Dokdonella (1)	FJ432445	AJ969432.1	94%		1				
Hydrocarboniphaga (1)	FJ432564	AY363245.1	92%	1					
Luteimonas (1)	FJ432382	DQ337599.1	90%				1		

Stenotrophomonas (3)	FJ432557	AM745261.1	97%	2	1		
	FJ432568 and FJ432358	EF540516.1	96%				
Xanthomonas (4)	FJ432546	DQ279336.1	92%	1		2	1
	FJ432506 and FJ432507	DQ279337.1	93 à 98%				
	FJ432300	DQ213024	94%				
uncultured gamma proteobacterium (1)	FJ432351	EF520572.1	95%		1		
Acidobacteria							
uncultured Acidobacteria (1)	FJ432303	DQ514191.1	94%				1
unclassified Acidobacteriaceae (1)	FJ432318	AY234727.1	91%				1
Actinobacteria							
Mycobacterium (1)	FJ432332	AF408955.1	95%				1
Frankia (2)	FJ432317	AY502034.1	81%			1	1
	FJ432422	U60285.1	79%				
Blastococcus (1)	FJ432339	AJ316573.1	96%				1
Agrococcus (2)	FJ432326 and FJ432426	DQ232611.1	93 à 94%			1	1
Clavibacter (1)	FJ432523	DQ339609.1	96%			1	
Curtobacterium (6)	FJ432527	AM042692.1	85%			1	4
	FJ432327	AM410688.1	94 à 97%				1
Frigoribacterium (2)	FJ432441 and FJ432365	AY571813.1	95 à 97%		1	1	
Labeledella (1)	FJ432434	DQ533552.1	96%				1
Leifsonia (1)	FJ432343	EF466129.1	95%			1	
Microbacterium (1)	FJ432585	AB042085.1	98%	1			
Plantibacter (2)	FJ432392 and FJ432393	AM396918.1	96%				2
Rathayibacter (1)	FJ432505	AM410683.1	96%			1	
unclassified Microbacteriaceae (1)	FJ432512	EF540491.1	95%			1	
Arthrobacter (1)	FJ432574	AY572475.1	96%	1			
Sanguibacter (1)	FJ432529	DQ339590.1	96%			1	
unclassified Micrococcineae (1)	FJ432575	DQ010160.1	91%	1			
Actinoplanes (1)	FJ432421	AB037004.1	92%			1	
Aeromicrobium (1)	FJ432368	AB245387.1	95%			1	
Friedmaniella (1)	FJ432315	Z78206.1	94%				1
Saccharothrix (1)	FJ432357	AB020031.1	95%			1	
Lentzea (1)	FJ432383	AB327257.1	91%			1	
Streptomyces (2)	FJ432451	EF063500.1	95%		2		
	FJ432457	DQ448729.1	91%				
Conexibacter (2)	FJ432314 and FJ432508	AJ440237.1	89 à 93%			1	1
Solirubrobacter (1)	FJ432524	AB245334.1	88%			1	
Bacteroidetes							
Chryseobacterium (2)	FJ432567	EF442766.1	95%	2			
	FJ432576	AY883415.1	95%				
Flavobacterium (3)	FJ432452	AM230488.1	93%		1	1	1
	FJ432488	DQ168834.1	91%				
	FJ432423	AJ786788.1	91%				
Terrimonas (4)	FJ432476	AB192292.2	91%		2	1	1
	FJ432473, FJ432363 and FJ432304	AM230484.1	91 à 94%				
unclassified Flavobacteriaceae (1)	FJ432325	AY468453.1	92%				1
Niastella (3)	FJ432472, FJ432384 and FJ432340	DQ244077.1	88 à 93%		1	1	1
Cytophaga (1)	FJ432466	AF414444.1	89%		1		
Dyadobacter (8)	FJ432493	AF137029.1	94%		3	2	2
	FJ432535 and FJ432435	AJ619978.1	93 à 94%				
	FJ432453, FJ432454, FJ432455, FJ432298 and FJ432299	EF017660.1	93 à 94%				
Flexibacter (1)	FJ432458	EF535334.1	89%		1		
Hymenobacter (8)	FJ432538	AB251884.1	92%		1	3	3
	FJ432516	AJ276901.1	95%				1
	FJ432492	AJ549285.1	95%				
	FJ432487	AY647897.1	84%				
	FJ432366	DQ177475.3	94%				
	FJ432361 and FJ432336	EF423328.1	95%				
	FJ432356	Y18837.1	90 à 95%				
Larkinella (1)	FJ432586	AM000022.1	90%	1			
Sporocytophaga (1)	FJ432354	DQ186971.1	88%			1	
uncultured Flexibacteraceae (1)	FJ432520	AM489683.1	96%			1	
Pedobacter (7)	FJ432531	AJ438170.1	86%			3	3
	FJ432337	AM114396.1	96%				1
	FJ432513 and FJ432409	AM491372.1	92 à 97%				
	FJ432536 and FJ432419	EF660752	96%				
	FJ432433	EU169155.1	96%				
Sphingoterrabacterium (2)	FJ432333	AB267718.1	94%				2
	FJ432341	AB267717.1	92%				
unclassified Sphingobacteriaceae (1)	FJ432334	X89912.1	95%				1
Chitinophaga (8)	FJ432572	AB078049.1	89%	3	1	3	1
	FJ432381	AB078067.1	91%				
	FJ432579	AB078068.1	96%				
	FJ432543, FJ432485 and FJ432353	AB245374.1	91 à 97%				

	FJ432344	AB267723.1	97%				
	FJ432408	AB267724.1	92%				
Chloroflexi							
uncultured Chloroflexi (1)	FJ432443	DQ811880.1	88%	1			
Fibrobacteres							
uncultured Fibrobacteres (1)	FJ432459	EF520549.1	82%	1			
Firmicutes							
Bacillus (1)	FJ432540	AJ316316.1	98%	1			
Exiguobacterium (2)	FJ432565 and FJ432566	DQ019168.1	96%	2			
Paenibacillus (2)	FJ432355	AF290916.1	92%		1		1
	FJ432410	AF468220.1	91%				
Gemmatimonadetes							
Gemmatimonas (1)	FJ432480	AB072735.1	89%	1			
uncultured Gemmatimonadetes (1)	FJ432342	EF612389.1	94%		1		
Planctomycetes							
unclassified Planctomycetaceae (1)	FJ432362	AY162119.1	85%		1		
Spirochaetes							
Leptospira (1)	FJ432483	AB251602.1	94%	1			
Verrumicrobia							
uncultured Spartobacteria (1)	FJ432444	AY395435.1	87%	1			
Rubritalea (1)	FJ432464	AB277853.1	87%	1			
uncultured							
uncultured bacterium (5)	FJ432427	AF268998.1	94%		1	2	1
	FJ432504	AF269013.1	93%				1
	FJ432330 and FJ432377	AF418963.1	93 à 94%				
	FJ432532	DQ378246.1	94%				

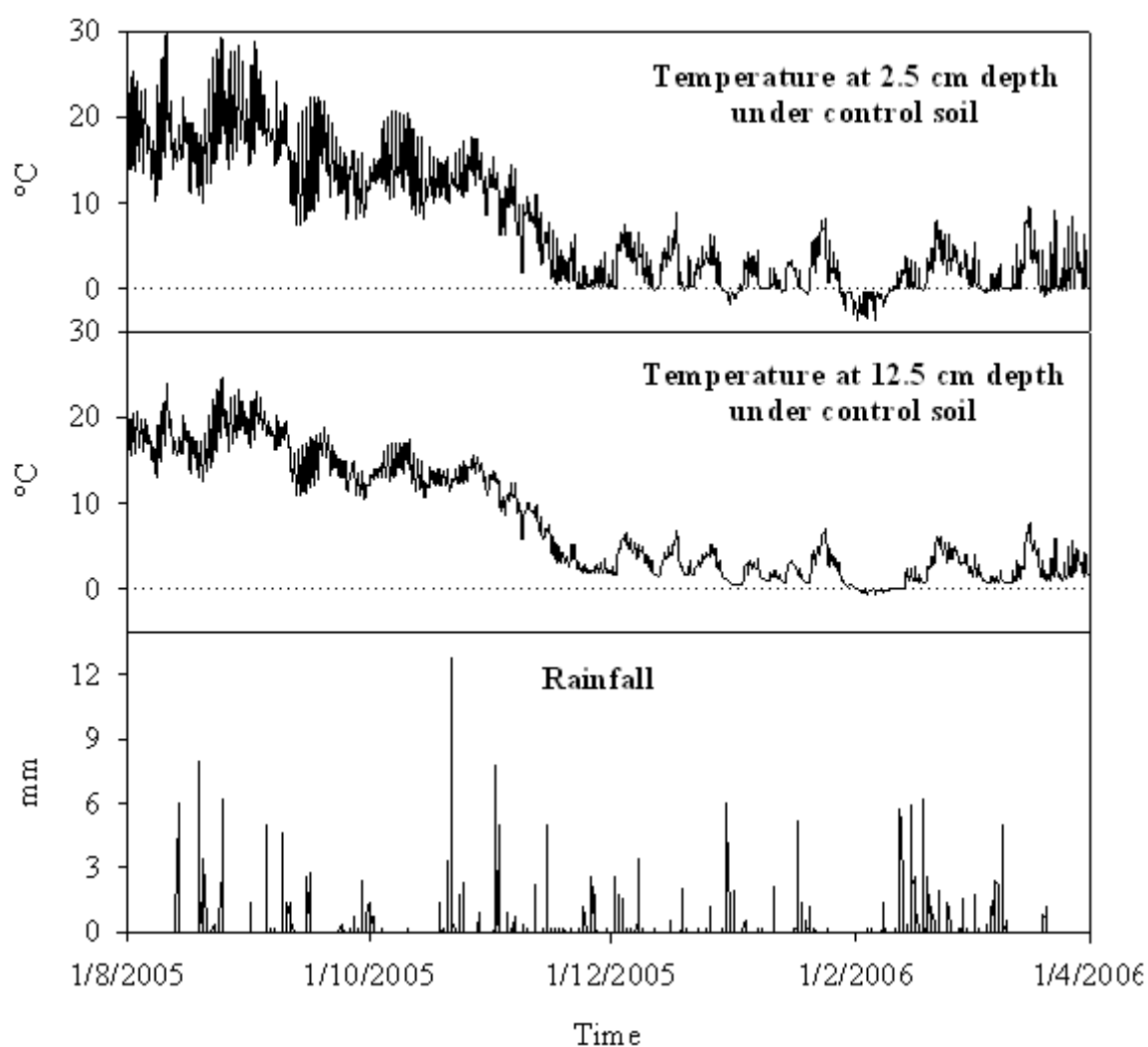


Figure II.S1 supplemental data. Temperature (°C) at 2.5 and 12.5 cm depth under control soil and rainfall (mm) during the experiment.

Chapitre 3 :

Influence *in situ* de la qualité biochimique de
résidus de culture de blé, de colza et de
luzerne au cours de leurs décompositions sur
les communautés microbiennes du sol

Dans le Chapitre 2, nous nous sommes intéressés à l'influence de la localisation de résidus de blé dans le sol sur la dynamique et la diversité microbienne du sol au cours de la décomposition du résidu. Dans cette expérimentation, un seul type de résidu a été considéré. Toutefois, parmi les autres facteurs énumérés dans la synthèse bibliographique [Chapitre 1], qui semblent contrôler la vitesse et le taux de décomposition des résidus de culture, la qualité biochimique du résidu lui-même fait partie des plus importants [Chapitre 1, section II.3.1]. Bien que quelques auteurs aient observé que les structures des communautés microbiennes telluriques engendrées par l'apport de MO fraîche étaient conditionnées par la qualité biochimique de la MO apportée (Baumann et al., 2009 ; Ha et al., 2008 ; Lejon et al., 2005 ; Lejon et al., 2007 ; Nicolardot et al., 2007), peu de données sont encore disponibles pour faire le lien entre la composition biochimique des résidus et la diversité et la dynamique de la communauté microbienne impliquée dans le turn-over de la matière organique du sol.

Dans ce contexte, notre objectif était d'évaluer l'influence de la composition biochimique de résidus de culture sur leur décomposition et la réponse des communautés microbiennes indigènes. Pour cela nous avons choisi de suivre la décomposition de 3 résidus de culture différents et la réponse des communautés microbiennes du sol associée. Notre choix des résidus a été motivé par leur composition biochimique contrastée et leur importance agronomique :

- une céréale : le blé,
- une crucifère : le colza,
- une légumineuse : la luzerne.

Pour réaliser notre étude, nous avons utilisé les parcelles du projet MICAGRO (projet ayant pour objectif d'étudier l'impact des rotations culturales) mises en place sur le domaine expérimental INRA d'Epoisses (Bretenières, 21). Après culture et récolte, les résidus ont été incorporés au sol, puis un échantillonnage mensuel a été effectué de juillet 2006 à juin 2007. De même que dans le Chapitre 2, différents compartiments de sol ont été prélevés : les résidus d'une part, et le sol sous l'influence des résidus (détritosphère) d'autre part. Au cours de l'expérimentation, la respiration du sol ainsi que les caractéristiques biochimiques des résidus, grâce à la spectroscopie en proche infrarouge, ont été suivis. En parallèle, la biomasse microbienne (par mesure des PLFA), les structures génétiques des communautés bactériennes (par génotypage ARISA) et la diversité taxonomique bactérienne (par clonage du gène ARNr 16S) ayant colonisée les résidus, ont été identifiées.

Les résultats obtenus ont indiqué, comme dans le Chapitre 2, que le compartiment résidu lui-même était plus réactif en termes de dynamique bactérienne. Par conséquent, nous nous sommes focalisés dans ce chapitre sur l'interprétation des résultats obtenus sur le compartiment résidu.

Les différents objectifs de ce chapitre étaient :

- d'étudier la réponse des communautés microbiennes du sol à l'apport de résidus de culture de différentes qualités biochimiques *in situ*
- de relier la composition biochimique des résidus de culture au cours de leur décomposition à des communautés microbiennes spécifiques.

Cette étude sera présentée ci-dessous sous la forme d'un article accepté avec révision pour publication dans la revue *Microbial Ecology*.

***In situ* dynamics of microbial communities during decomposition
of wheat, rape and alfalfa residues**

Noémie Pascault¹, Lauric Cécillon², Olivier Mathieu³, Catherine Hénault¹, Amadou Sarr¹,
Jean Lévêque³, Pascal Farcy⁴, Lionel Ranjard¹, Pierre-Alain Maron^{1#}

¹UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement, INRA/Université de Bourgogne, CMSE, BP 86510, 17 rue
de Sully, 21065 Dijon cedex France ;

² UMT GES-N₂O, CETIOM Paris-Grignon, Avenue Lucien Brétignières, 78850 Thiverval-Grignon France ;

³UMR 5561 Biogéosciences, CNRS/Université de Bourgogne, Université de Bourgogne, 6 bd Gabriel, 21000
Dijon France ;

⁴Unité Expérimentale, Domaine d'Epoisses, INRA Dijon, 21110 Bretenière France

Abstract

Microbial communities are of major importance in the decomposition of soil organic matter. However, the identities and dynamics of the populations involved are still poorly documented. We investigated, in a eleven-month field experiment, how the initial biochemical quality of crop residues could lead to specific decomposition patterns, linking biochemical changes undergone by the crop residues to the respiration, biomass and genetic structure of the soil microbial communities. Wheat, alfalfa and rape residues were incorporated into the 0-15 cm layer of the soil of field plots by tilling. Biochemical changes in the residues occurring during degradation were assessed by near infrared spectroscopy (NIRS). Qualitative modifications in the genetic structure of the bacterial communities were determined by Bacterial-Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (B-ARISA). Bacterial diversity in the three crop residues at early and late stages of decomposition process was further analyzed from a molecular inventory of the 16S rDNA. The decomposition of plant residues in croplands was shown to involve specific biochemical characteristics and microbial communities dynamics which were clearly related to the quality of the organic inputs. Decay stage and seasonal shifts occurred by replacement of copiotrophic populations/bacterial groups such as proteobacteria successful on younger residues with those successful on more extensively decayed material such as Actinobacteria. However, relative abundance of proteobacteria depended greatly on the composition of the residues, with a gradient observed from alfalfa to wheat, suggesting that this bacterial group may represent a good indicator of crop residues degradability and modifications during the decomposition process.

Key words: crop residues, soil microbial community, microbial diversity, decomposition process, near infrared spectroscopy

I - Introduction

Soil organic matter (SOM) constitutes the main organic C reservoir in terrestrial ecosystems. The accumulation of SOM is greatly dependent on soil microbial activity which determines the decomposition and transformation of fresh organic matter entering the soil, mainly originating from plants (root exudates and dead plant tissues), into complex and stabilized organic compounds. SOM influences many soil functions and is a key component of global carbon cycle dynamics (Lal, 2004; Piccolo, 1996). A decrease in SOM content is currently being reported in most cultivated lands due to agricultural practices, with important consequences on soil fertility and environmental quality. The preservation and the improvement of SOM content are thus of central importance in the maintenance of agrosystem productivity. A possible solution to compensate the mineralization of SOM resulting from arable farming is to amend the soil with plant residues (Campbell et al., 2000; Cayuela et al., 2009). However, negative effects on environment quality can be induced if these organic inputs are mismanaged (Kuan, 2004). In this context, a thorough understanding of the underlying processes and mechanisms controlling the fate of crop residues added to soil is required so that organic amendments can be managed in a suitable way. In view of the importance of soil microorganisms in the mineralization of plant residues and, more widely, in the turnover of soil organic matter, better knowledge of the microbial processes involved in SOM evolution should provide a decisive step forward.

Many attempts have been made to elucidate the influence of different factors on microbial processes involved in the carbon cycle. Such factors include organic matter quality (Cayuela et al., 2009; Jensen et al., 2005; Trinsoutrot et al., 2000), soil type (Lundquist et al., 1999), crop management practice (Pankhurst et al., 2002; Rangel-Castro et al., 2005), temperature (Nicolardot et al., 1994) and contamination by stressing agents (Giller et al., 1998). The above studies provided evidence that most of the biological changes induced by organic amendments in soil result from changes in the availability of carbon sources which lead to alterations in the dynamics, functioning and structure of the soil communities (Holland & Coleman, 1987). However, these investigations were based on measurements of global quantitative parameters such as microbial biomass, respiration rate, enzymatic activities or C and N turnover in which the microbial communities were considered as a functional “black box”. As a result, there is still a great gap in our knowledge of the ecology and diversity of the soil microbial communities responsible for organic matter degradation.

Recent studies were performed under controlled laboratory conditions to characterize the diversity of soil microbial communities after crop residues inputs (Bastian et al., 2009; Bernard et al., 2007; Nicolardot et al., 2007). These studies showed that the addition of plant material to soil induces important modifications of the genetic structure and diversity of the soil microbial communities. For example, Bernard et al. (2007) demonstrated that the incorporation of wheat residues into soil induced a rapid succession of bacterial populations, mainly explained by the ecological attributes of the successive populations identified in terms of differences in growth strategies between r- and K-strategists (Fontaine et al., 2003). In other respects, Nicolardot et al. (2007), and Bastian et al. (2009) showed that the addition of crop residues to soil led to considerable heterogeneity in soil microbial community diversity, and discriminated three different soil zones *i.e.* (i) the actual residues, (ii) the detritosphere (soil zone in close contact with the residues), and (iii) the bulk soil. Furthermore, they reported the greatest dynamics of microbial diversity on the residues, thereby demonstrating that this particular ecological niche represents a hot spot for microbial communities. Both the localization and chemical composition of the residues were shown to be important factors influencing the diversity of soil microbial communities (Nicolardot et al., 2007). However, these authors did not monitor the dynamics of biodiversity occurring during organic matter decomposition, and the influence of the chemical composition of crop residues on the patterns of microbial diversity evolution during decomposition remains unclear. Furthermore, these studies were conducted under laboratory conditions and are difficult to extrapolate to the field since residues degradation and microbial community dynamics can be greatly influenced by variations in soil characteristics, climatic events, as well as seasonal variations occurring *in natura* (Coppens et al., 2006; Parr & Papendick, 1978).

In this study, our objective was to evaluate the influence of the biochemical quality of crop residues on the dynamics of bacterial communities colonizing the residue under field conditions. To do this, we performed a field experiment in which crop residues of different chemical quality were added to soil. Biochemical changes in residues of wheat, alfalfa and rape were monitored during the decomposition process using near infrared spectroscopy (NIRS). NIRS is a reliable, fast-track tool for investigating detritus dynamics in soils (Cécillon et al., 2010), as the near infrared (NIR) region contains meaningful information regarding the chemical structure of organic matter (Stenberg et al., 2004; Workman & Weyer, 2008). In parallel, the dynamics of the soil bacterial communities were monitored monthly, from July 2006 to June 2007 by molecular analysis. The genetic structure of the bacterial

community was determined by DNA fingerprinting technique B-ARISA (for Bacterial-Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) to characterize the succession of bacterial populations occurring during residue decomposition. The bacterial populations colonizing each crop residue and their succession during the degradation process were identified on two sampling dates, corresponding to an early and a late degradation phase, by compiling 16S rDNA clone libraries.

II - Materials and methods

1. Site description and sampling

A field experiment was set up on the INRA experimental site at Epouisse (47.14°N, 5.06°E, Burgundy, France). The main characteristics of the soil were as follows: clay (<2µm) 37.9%; silt (2-20 µm) 32.5%; silt (20-50 µm) 23.7%; sand (50-200 µm) 3.8 %; sand (200-2000 µm) 2.1%; pH_{H2O} 6.73; CaCO₃ <1 g.kg⁻¹; organic carbon 14.7 g.kg⁻¹; total nitrogen 1.33 g.kg⁻¹; and C/N ratio 11.1. The soil was a loamy clay soil (top soil characteristics according to FAO classification). Soil characteristics over the entire experimental site were analysed before setting up the different treatments. The field was shown to be homogeneous for the different soil parameters measured: soil texture, pH, CaCO₃ and organic matter contents (Mathieu and Lévêque, personal communication), which was a prerequisite to avoid plot-to-plot variations that might have masked the impact of crop residue quality. Rainfall and atmospheric temperature and were measured during the time course of the experiment.

The field experiment consisted of three treatments, depending on the type of residue incorporated into the soil *i.e.* wheat (13 t/ha dry matter), rape (17 t/ha dry matter), and alfalfa (4 t/ha dry matter), respectively. Amounts of residues incorporated to the soil corresponded to the entire biomass of each crop at the moment of the harvest (excepted to the grain that has been exported in the case of wheat) that was different between wheat, rape and alfalfa. We used this procedure since it was a common agricultural practice to amend the soil with crop residues. Each treatment was laid out in three replicates represented by three independent 3 x 8m plots. At the beginning of the experiment (T0 corresponding to 4 July 2006), the plots were either amended with fresh residues of wheat (*Triticum aestivum*), rape (*Brassica napus*), or alfalfa (*Medicago sativa*) which were ground before being incorporated into the first 15 cm of soil by tilling using a rotavator. Plots without any organic matter input were used as controls. For each treatment, herbicide (glyphosate) was applied to keep the soil bare during the experiment.

Soil was sampled from the three treatments at least monthly from T0 to T335 (4 June 2007), but more frequently at the beginning of the experiment. Correspondence between the sampling dates and their corresponding calendar is T0 (4 July 2006), T7 (11 July 2006), T22 (26 July 2006), T51 (24 August 2006), T98 (10 October 2006), T126 (7 November 2006), T169 (20 December 2006), T231 (20 February 2007), T254 (15 March 2007), T304 (4 May 2007), T335 (4 June 2007). Two zones in each residue amended treatment were considered at

each sampling date: (i) the crop residue, which was separated from the soil, (ii) the soil layer between 0 and 15 cm. Only bulk soil (between 0 and 15 cm) was collected from the control plots. Three soil subsamples per zone were collected over a 20 x 20 cm area in each plot, pooled and mixed. The number of replicates was therefore $n=3$ for each treatment which allowed representative samples to be obtained from each plot. Each soil sample was sieved at 2mm and stored at -20°C . The crop residues were cut (0.5 cm) and stored at -20°C .

2. Plant residues determinations

Residue samples were ground to obtain homogeneous powders for NIR and elementary analysis. Total carbon and nitrogen contents were determined for each residue sample by total combustion in a 1500 CN elemental analyser (Carlo Erba).

The biochemical characteristics of the crop residues during decomposition were roughly assessed by NIR analysis. Diffuse reflectance measurements ($10000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, equivalent to $1000\text{--}2500\text{ nm}$) were obtained for each sample using a Fourier-transform NIR spectrophotometer Antaris II (Thermo electron). Each spectrum comprised 32 averaged scans of the sample. Data were collected at 16 cm^{-1} resolution resulting in 1556 absorbance values per spectrum. All NIR spectra were preprocessed using multiplicative scatter correction and the computing of second derivatives. An infrared fingerprint of each residue sample was computed using a data fusion technique called “outer product analysis” (Veselá et al., 2007). Infrared fingerprints were obtained from the outer product of two NIR spectral domains: $4220\text{--}4835\text{ cm}^{-1}$ (160 wavenumbers) and $5685\text{--}6100\text{ cm}^{-1}$ (109 wavenumbers), which resulted in a single data matrix (160 rows by 109 columns = 17440 outer product variables) per sample. The two NIR regions were chosen because of their numerous absorbance peaks related to carbohydrates, lipids, proteins or aromatic structures such as lignin, usually found in natural organic matter (Fourty et al., 1996; Gleixner et al., 2001; Workman & Weyer, 2008).

3. Soil respiration measurement

Soil CO_2 production was determined on the fresh soil samples on the day of sampling. Five g of each of the 12 manually homogenized soil samples (3 treatments + control ; 3 plots of each) were placed in a 37 ml flask which was then airtightly closed for 24 h at 20°C . The

flask atmosphere was sampled using Terumo venoject tubes and analysed for CO₂ concentration on a microGC (MTI200) fitted with a TCD detector.

4. Extraction and purification of total DNA from crop residues

Microbial DNA was extracted from three replicates of residues from the wheat, rape and alfalfa samples according to the method described by (Ranjard et al., 2003). Briefly, 1 g of each residue sample was mixed with 5 ml of a solution which contained 100 mM Tris (pH 8.0), 100 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM NaCl, and 2% (w/v) sodium dodecyl sulphate. Two grams of 106 µm diameter glass beads and eight glass beads of 2 mm diameter were added in a bead-beater tube. The samples were then homogenized for 30 s at 1600 rpm in a mini bead-beater cell disruptor (Mikrodismembrator; S.B. Braun Biotech International) and centrifuged at 7000 x g for 5 min at 4°C after incubation for 30 min at 70°C. The collected supernatants were incubated for 10 min on ice with 1/10 volume of 3 M potassium acetate (pH 5.5) and centrifuged at 14000 x g for 5 min. After precipitation with one volume of ice-cold isopropanol, the nucleic acids were washed with 70% ethanol. For purification, aliquots (100 µL) of crude DNA extracts were loaded onto polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) minicolumns (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) and centrifuged at 1000 x g for 2 min at 10°C. The eluate was collected and purified from residual impurities by using a Geneclean Turbo kit as recommended by the manufacturer (Q Biogene®, Illkirch, France).

5. Automated-RISA fingerprinting communities

The bacterial ribosomal IGS were amplified by PCR using the primers S-D-Bact-1522-b-S-20 (small eubacterial ribosomic subunit; 5'-TGCGGCTGGATCCCCCTCCTT-3'), which was labelled at its 5' end with the IRD800 fluorochrome, and the primer L-D-Bact-132-a-A-18 (large eubacterial ribosomic subunit; 5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3'), as described by (Ranjard et al., 2003). Twenty-five nanograms of DNA were used as template in PCR. B-ARISA involved the use of a fluorescent-labeled primer for PCR *i.e.* the IRD 800 dye fluorochrome (MWG SA Biotech, Ebersberg, Deutschland) for the LiCor® DNA sequencer (ScienceTec, Les Ulis, France).

For ARISA fingerprinting, the PCR products were loaded on a 3.7% polyacrylamide gel (acrylamide-N, N-methylenebisacrylamide, 29: 1, Bio-Rad, Ivry sur Seine, France) and run

under denaturing conditions for 14 h at 1500V / 80W on a LiCor[®] DNA sequencer (ScienceTec). The software converted the fluorescence data into electrophoregrams where the peaks represented PCR fragments. The height of the peaks was calculated in conjunction with the median filter option and the Gaussian integration in 1D-scan, and represented the relative proportion of the fragments in the total products. Lengths (in base pairs) were calculated by using a size standard with bands ranging from 200 to 1659 bp. The standard consisted of PCR amplifications of different fragment sizes of phage M13 mp18 (Promega, Charbonnières, France).

6. Statistical analysis

The effects of the quality of the crop residues and of the sampling date on CO₂ release data were tested by two-way ANOVA and differences between means were tested with the Student-Newman-Keuls test ($P \leq 0.05$). All these statistical calculations were carried out using XLSTAT software (Addinsoft, Paris, France).

The biochemical quality of the plant residues was assessed by using principal component analysis (PCA) of the infrared fingerprints. The unconstrained ordination of samples obtained with PCA allows a blind discrimination of samples based on their biochemical quality, without any a priori assumption on residue type or sampling time (Cécillon et al., 2009). Biochemical changes in plant residues during decomposition were assessed by examining the loadings matrices of the PCA (weights for each outer product variable when calculating the principal components). For NIR analysis, statistical treatments were conducted using R software version 2.8.0 with ADE-4 package for PCA (Chessel et al., 2004).

The B-ARISA data obtained from the 1D-Scan software were converted into a table summarizing the band presence (i.e. peak) and intensity (i.e. height or area of peak) using the PrepRISA program (Ranjard et al., 2001) under R software version 2.8.0. This program allowed us to choose the number of peaks (i.e. all detected populations versus the most dominant populations), the profile resolution (between 1 and 10bp) and the method of evaluating peak intensity (height or area). As described in a previous study, we used 100 peaks, 2bp resolution and Gaussian peak area for a robust analysis of the bacterial communities (Ranjard et al., 2003).

The covariance matrices (bacterial communities as rows and bands as columns) were subjected to Principal Component Analysis (PCA), which provided an ordination of the bacterial communities in a factorial map based on the scores of the first two principal components. The Monte Carlo test was performed with 1000 permutations to confirm the significance of the discrimination of the genetic structures of the bacterial communities revealed by PCA. The PCA and Monte Carlo test were performed using the ADE-4 package (Chessel et al., 2004; Thioulouse et al., 1997) under R software version 2.8.0.

7. Clone library construction and sequencing

A description of the most abundant bacterial populations in relation to crop residue degradation time was obtained by constructing clone libraries. Two dates corresponding to an early (July 26th 2006, T22) and a late (March 15th 2007 T254) stage of decomposition were chosen for wheat residues, rape residues and alfalfa residues. For each date and each treatment, DNA extracted from the three replicates was pooled to perform the PCR. The bacterial 16S rDNA subunit was amplified by PCR with universal primers: 1492R and 27F (Amann et al., 1995). PCR products were ligated to the vector pGEMT (Promega, Charbonnières, France). Ligation and transformation into *Escherichia coli* JM109 competent cells were carried out according to the manufacturer's protocol. A total of 50 white clones were then sampled to constitute the library. The DNA of each clone was extracted by "heat/cold" shocks. The plasmid inserts from each clone were amplified using Sp6 and T7 primers. The insert size was determined by visualizing the amplicons by a 2% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. Amplicons with the expected size were sequenced by GENOME express (<http://www.genome-express.com>) with a Sangers sequencing protocol using the 1392R primer.

8. Sequence analyses and diversity indices calculation

The 16S rDNA sequences were used as queries in blast (Basic Local Alignment Search Tool) searches for standard nucleotide-nucleotide sequences (Altschul et al., 1990) using the GeneBank database. Sequences from clones and the most closely relative sequences were aligned using Clustal W (Thompson et al., 1994). Phylogenies were determined by Neighbour-Joining method (Saitou & Nei, 1987) using the Kimura "2-parameters" model of nucleotide substitution (Kimura, 1980). Tree nodes validity was determined from the results

for 1000 bootstrapped data sets using the phylwin software in the PHYLIP program (Felsenstein, 1985). The similarity data and phylogenetic analysis were combined to define Operational Taxonomic Units (OTUs). An OTU was defined when the percentage of similarity exceeded 90 % and the bootstrap value exceeded 80 %. Diversity indices were calculated from the defined 16S rDNA sequences. Shannon diversity index richness (H) values were calculated as previously described (Begon et al., 1986).

9. Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences determined in this study, corresponding to an average length of 900 bp were deposited in the GeneBank database. The accession numbers for the 16S rDNA gene sequences obtained in our study (GQ379348 to GQ379673) are provided as supplemental data.

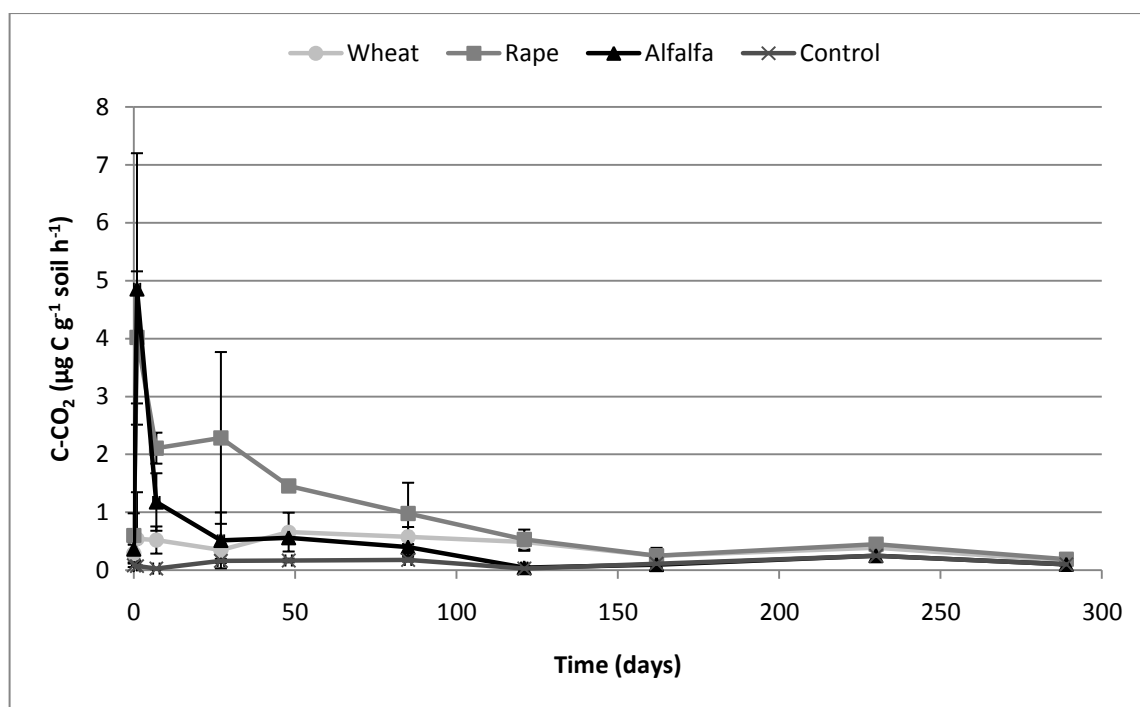


Figure III.1: Soil respiration of C-CO₂ (μg C g⁻¹ soil h⁻¹) following the incorporation of wheat (circle), rape (square), or alfalfa (triangle) residues in soil and in control soil (cross).

III - Results

1. Dynamics of CO₂ emission

The soil respiration dynamics consecutive to residues incorporation were determined from the mean CO₂ emission measurement. Before introduction of the residues, the C-CO₂ emission rate was less than 1 µg C-CO₂ g⁻¹ soil h⁻¹ and did not differ significantly between treatments. After incorporation, different respiration patterns were observed depending on the residue [Figure III.1] and significant differences ($p < 0.05$) between the treatments were observed for 126 days. More precisely, the addition of alfalfa and rape residues rapidly induced a peak of C-CO₂ production, with 4.02 ± 1.14 and 4.85 ± 2.34 µg CO₂-C g⁻¹ soil h⁻¹ respectively, observed 1 days after incorporation (T1). The C-CO₂ peak was followed by a rapid decline for alfalfa whereas respiration remained high for rape and decreased slowly to the level of control soil 126 days after incorporation. In comparison, wheat residue incorporation induced only a small increase of soil respiration (from 0.083 ± 0.03 in the control to 0.29 ± 0.15 µg CO₂-C g⁻¹ soil h⁻¹ in the wheat treatment at T1), which remained stable up to 126 days before decreasing at the level of the control.

2. Decomposition of plant materials

The results of the C and N determinations showed that the wheat, rape and alfalfa residues used in our study presented different C/N ratios ($p \leq 0.05$), with 94, 51, and 27 respectively.

Likewise, PCA analysis of infrared fingerprints of the wheat, rape and alfalfa residues revealed different biochemical characteristics [Figure III.2a]. The main differences between residue types were observed along the first axis of the PCA (PC1 = 34% of total variance), with negative PC1 values for wheat, values close to zero for rape and positive values for alfalfa residues. These differences were mostly due to contrasting protein and lignin content from wheat to alfalfa, as shown by examination of the PC1 loading matrix and subsequent identification of the chemical structures corresponding to the highest and lowest loading scores [Figure III.S1 supplemental data; Table III.1; Workman & Weyer, 2008]. Changes in the biochemical characteristics of rape and alfalfa residues during decomposition were also observed along the second axis of the PCA (PC2 = 31% of total variance), with negative and positive PC2 values for early and late stages of degradation, respectively [Figure III.2 a]. Wheat residues, in comparison, showed a different pattern of decomposition which was

mostly observed along PC1 [Figure III.2 a]. The degree of modification of the biochemical characteristics of the residues during the decomposition process depended on the residue, with rape = alfalfa > wheat [Figure III.2 a].

PCA of the NIR fingerprints were also performed separately for each residue type [Figure III.2 b, c, d]. Each PCA showed that significant changes in the infrared fingerprints occurred during the experiment, highlighting modifications of the residue chemistry, with discrimination of the different sampling dates on the factorial map (Monte-Carlo test, p-value < 0.001). During the early stages of the experiment (from T0 to T51 corresponding to 4 July and 24 August 2006, respectively), similar decomposition trajectories were observed for rape and alfalfa residues along the first axis of PCA, with a rapid evolution of residue chemistry (PC1 = 58% and 51% of total variance, respectively), followed by a sudden break in autumn 2006 [Figure III.2 c, d]. Interestingly, the same NIR wavebands mainly assigned to lipid and carbohydrate contents were associated with PC1 of both PCAs, suggesting that changes in the relative content of both compounds characterized the early stages of decomposition of rape and alfalfa residues [Table III.1; Workman & Weyer, 2008]. The main NIR wavebands for the late stages of decomposition (from T98 to T335, corresponding to 10 October 2006 and 4 June 2007, respectively) were assigned to protein and alcohol for the rape residues, while the late changes in the alfalfa residues in spring 2007 were mainly assigned to variations in carbohydrate concentration (PC2 of both PCAs, Table III.1). Wheat residues exhibited a much more continuous decomposition trajectory during the entire course of the experiment [Figure III.2 b] with rapid changes only occurring during the first week of the experiment, followed by a slow and continuous evolution with no break during fall or winter (from T98 to T254), compared to rape and alfalfa [Figure III.2 b]. The main changes in wheat residue chemistry were observed along the first axis of PCA (PC1 = 44% of total variance), which was associated with most of the chemical components of wheat residues (protein, lipid, carbohydrate and aromatic structures such as lignin, Table III.1).

3. Genetic structure of the bacterial communities colonizing the residues

The dynamics of the genetic structure of bacterial communities colonizing the residues during the degradation process were characterized by performing B-ARISA fingerprinting on the DNA extracts obtained from wheat, alfalfa and rape residues. The structure of the bacterial community colonizing wheat, rape and alfalfa residues were significantly different (Monte-

Tableau III.1: NIR wavebands explanatory for PC1 and PC2 of Principal Component Analysis of NIR fingerprints for all samples and for each residue and their corresponding chemical bonds and biochemical components. Explanatory wavebands correspond to wavebands with absolute loading above 0.8 (see Figure III.S1).

		All residues	Wheat	Rapeseed	Alfalfa
PC1	Wavebands (cm ⁻¹)	** 4800-4825 ** 4710-4725 ** 4620-4640 ** 4485-4505	** 4790-4835 ** 4515-4550 * 5785-5820 * 4620-4635 * 4485-4505 * 4355-4370	** 4320-4350 ** 4280-4305 ** 4245-4270 * 5825-5865 * 5770-5795 * 5730-5750 * 4575-4605 * 4365-4380	** 4425-4475 ** 4315-4355 ** 4275-4295 ** 4230-4265 * 5765-5790 * 4705-4765 * 4560-4610
	Chemical bonds ¹	** NH; OH; CO; CN; Aromatic CH	** NH; OH; Aromatic CH; CHO * Aliphatic CH; Aromatic CH; NH; CONH ₂	** Aliphatic CH; Aromatic CH; CH * Aliphatic CH; CH; Aromatic CH; NH; CONH ₂	** CH; Aliphatic CH; Aromatic CH * CH; CO; NH
	Biochemical components ¹	** Protein; Alcohol; Water; Aryl	** Protein; Water; Alcohol; Aryl; Carbohydrate * Lipid	** Lipid; Carbohydrate * Aryl; Protein; Carbohydrate	** Lipid; Carbohydrate * Aryl; Protein; Carbohydrate
PC2	Wavebands (cm ⁻¹)	** 4430-4470 ** 4325-4350 ** 4285-4350 ** 4250-4265 * 5775-5785 * 4595-4610	** 4245-4265 * 4335-4345 * 4280-4300	* 4775-4820	** 4515-4550 * 4390-4400
	Chemical bonds ¹	** CH; Aliphatic CH; CHO * CONH ₂	** CH; Aliphatic CH; Aromatic CH * CH	* OH; NH	** CHO; Aromatic CH; NH; CONH ₂ * OH; CO
	Biochemical components ¹	** Carbohydrate; Lipid; Aryl * Protein	** Aryl; Lipid; Carbohydrate * Carbohydrate; Protein	* Protein; Alcohol; Water	** Protein; Aryl; Carbohydrate * Carbohydrate

¹ according to Workman & Weyer, 2008

******; ***** relative importance of the explanatory waveband for the construction of each principal component of the PCA of NIR fingerprints (****** = very important waveband; ***** = important waveband), as determined by the examination of Figure III.S1.

Carlo, $p < 0.05$) when analyzed by PCA when the three datasets were pooled [Figure III.3], indicating that each residue was characterized by a specific bacterial community. This concurred with visual comparison of the B-ARISA profiles which revealed specific patterns depending on the residue considered (data not shown). The genetic structures of the bacterial communities of all three crop residues exhibited strong dynamics implying that successions of populations occurred during the degradation process. However, the nature of these dynamics was dependent on the quality of residue. For alfalfa and wheat residues, a discrimination of the sampling dates was observed mainly on the first axis of the factorial map. However alfalfa was characterized by rapid and major changes in microbial community structure from T0 to T126 whereas the shifts in community structure for wheat residues occurred later, from T126, and were smaller than for alfalfa. In contrast, the pattern of community dynamics observed for rape residues differed considerably from those of alfalfa and wheat, with strong and continuous discrimination of the different sampling dates on both the first and second axis of the factorial map. This suggested the establishment of a singular bacterial community on rape residues. Interestingly, the amplitude of the modifications in genetic structure observed during the decomposition process depended from the residues, with rape>alfalfa>wheat.

4. Taxonomic composition of the bacterial communities colonizing the residues

The evolution in taxonomic diversity of the bacterial communities colonizing each residue was assessed by constructing 16S rDNA clone libraries from crop residues collected on 26 July 2006 (T22 days after incorporation, corresponding to the early degradation stage) and on 15 March 2007 (T254 days after incorporation, corresponding to the late degradation stage). It should be noted that at T22 the three residues were certainly not at the same stage of decomposition. However, this date corresponded to an initial dynamic phase in terms of both community structure and residues modification. The sequencing of 50 to 60 clones per library allowed the phylogenetic affiliation of bacterial sequences. Shannon diversity (H) indices were calculated for each clone library. It should be noted that although the number of clones sampled does not reflect the entire diversity it provides a view of the most dominant populations [rarefaction curves calculated from each dataset did not raise the plateau, Figure III.S2, supplemental data] and their succession during the degradation of each crop residue. The diversity indices for the rape, wheat, and alfalfa libraries from samples collected on 26 July and 15 March were $H = 3.10/2.92/2.80$, and $H = 3.53/3.29/3.07$ respectively. These results suggest that the bacterial communities colonizing rape residues were more diversified than

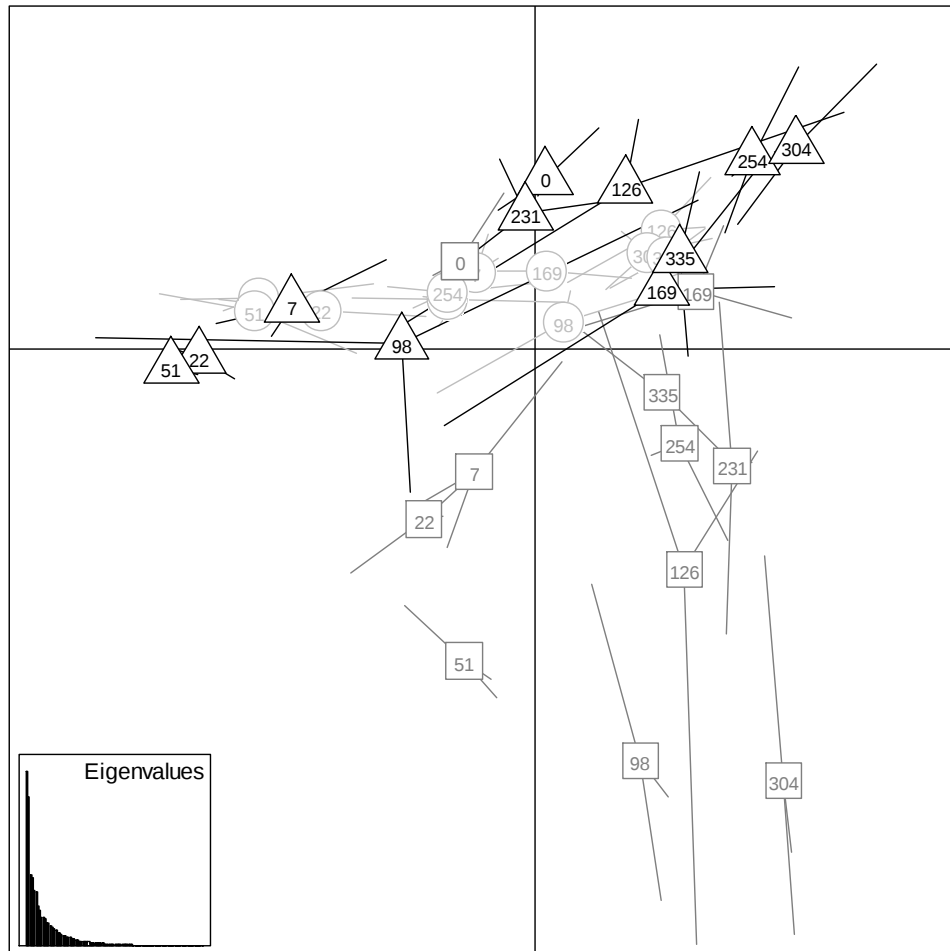


Figure III.3: Principal Component Analysis (PC1xPC2) plots generated from B-ARISA profiles obtained from wheat (circle), rape (square) and alfalfa (triangle) residues. Numbers represent days after incorporation of crop residues.

those of wheat and alfalfa residues. Furthermore an increase in diversity between the early and the late degradation stages was observed for all three residue types.

Examination of the taxonomic affiliation of the bacterial sequences in the six clone libraries revealed a broad diversity of bacterial species [Table III.S1, supplemental data]. Proteobacteria were the most dominant group whatever the date or residue considered. However, the relative abundance of sequences related to proteobacteria recorded in July and March respectively was significantly lower for wheat residues (63% and 57%) than for rape (83% and 74%) and alfalfa residues (90% and 83%) [Figure III.4]. The β -proteobacteria was the most represented subgroup of proteobacteria in each library, with 35% of the total sequences on average. *Massilia* was the main genus at the early stage of degradation, (17%, 10% and 18% for wheat, rape and alfalfa residues respectively) whereas the number of sequences affiliated to *Variovorax* increased at the late stage of degradation (7%, 5% and 8% for wheat, rape and alfalfa residues respectively). The proportion of α -proteobacteria increased between the early and late stages of residue decomposition for all three crop residues, mainly due to appearance of the genus *Sphingomonas* (5%, 7% and 11% of all sequences obtained from wheat, rape and alfalfa residues respectively) which was not detected at the early stage of degradation. Contrastingly, sequences affiliated to the γ -proteobacteria subgroup were mainly recorded at the early stage of degradation in all three crop residues, with *Pantoea* and *Stenotrophomonas* being the dominant genera (7%, 2%, 12% and 10%, 16%, 12% for wheat, rape and alfalfa respectively). The largest decrease of this particular group was recorded for rape residues, with a decline of all the identified sequences from 29 to 5%. Like α -proteobacteria, the Bacteroidetes group was represented in all the libraries and increased between the early and late stages of degradation, mainly due to the stimulation of *Cytophaga* and *Mucilaginibacter* genera. Furthermore, the relative proportions of sequences related to this group were always higher for wheat residues (12% in July, 25% in March) than for rape (3% in July, 16% in March) and alfalfa (2% on July, 13% on March) residues. Firmicutes were mainly detected at the early stage of degradation in all three crop residues, with the highest relative abundance observed for wheat residues (21%) mainly represented by the *Bacillus* genus (16%). Sequences affiliated to Actinobacteria were mainly detected during the late stage of wheat residue degradation.

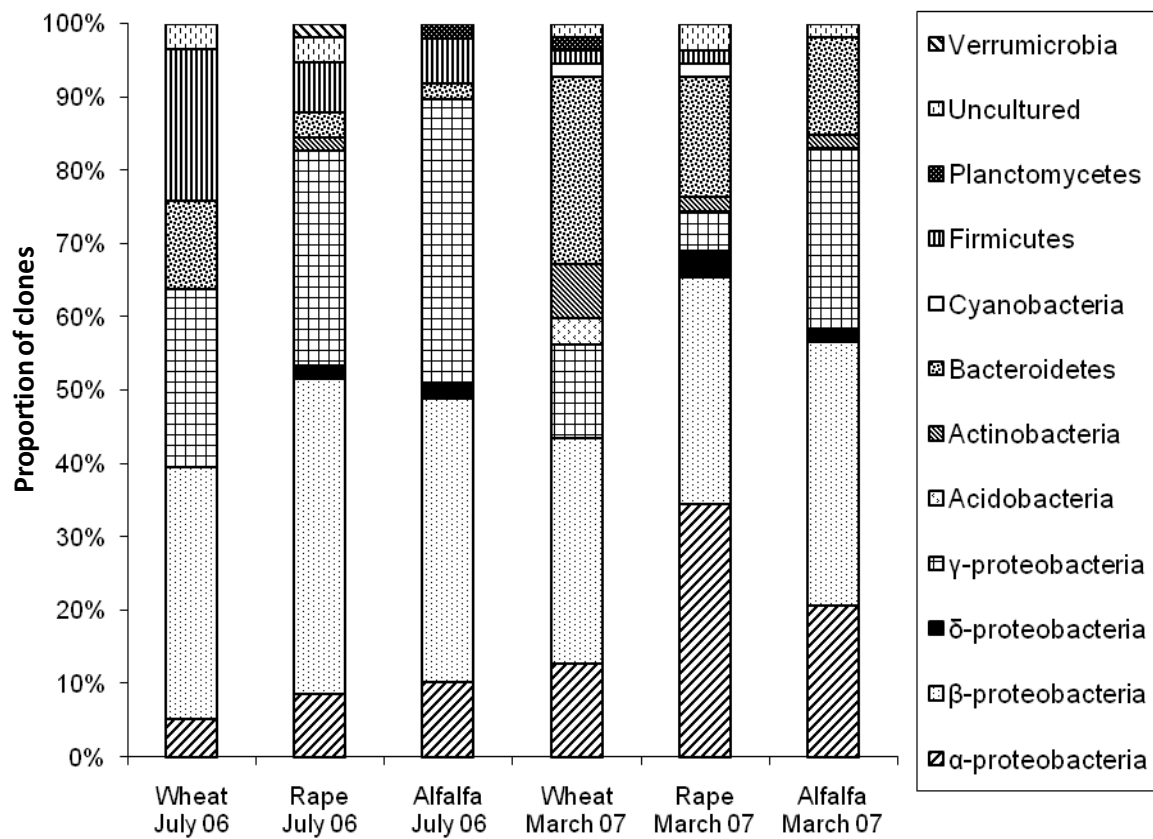


Figure III.4: Distribution of 16S rDNA sequences affiliated to different bacterial phyla in the clones library generated from wheat, rape and alfalfa residues at the early (July) and the late (March) degradation stages.

IV - Discussion

A better knowledge of the underlying microbial processes and mechanisms controlling the fate of fresh crop residue inputs in agrosystems is necessary to maximize the benefits while minimizing the associated negative agronomic and environmental effects. Here, an experimental field was specifically carried out to evaluate the influence of the biochemical characteristics of crop residues on the structure and diversity of soil bacterial communities.

1. Dynamics of residues decomposition

Three crop residues with contrasting C/N ratios were used because different dynamics of residue decomposition were expected. Indeed the C/N ratio of plant material is a quality parameter widely used to predict mass loss or N mineralization during crop residues decomposition (Nicolardot et al., 2001; Vanlauwe et al., 1996). Alfalfa residues, with the lowest C/N ratio were expected to mineralize faster than mature wheat straw, with highest C/N ratio (Trinsoutrot et al., 2000). The results of C mineralization confirmed this general degradation law since a large and transient peak in C-CO₂ release was observed for alfalfa and rape residues during the first weeks after residues incorporation whereas only a small increase in mineralization rate was observed in wheat. Considering rape, a more lasting effect was observed compared to alfalfa, characterized by highest respiration values recorded during the first 155 days. This might be explained by the important amount of rape residues added to the soil (17 t/ha dry matter) compared to alfalfa (4 t/ha dry matter). These mineralization patterns were in agreement with Cayuela et al. (2009) who observed similar dynamics after the incorporation of wheat straw and cotton carding residues in soil.

Changes occurring in the biochemical components of the crop residues during decomposition were characterized from the means obtained by near infrared spectroscopy. The suitability of this method for monitoring plant material decomposition has already been demonstrated (Albrecht et al., 2008; Cécillon et al., 2010; Chodak, 2008; Joffre et al., 1992; Shepherd et al., 2005). In our study, the factorial map produced by PCA of the NIR fingerprints obtained from wheat, rape and alfalfa residues showed significant differences between residues, highlighting specific biochemical composition for each residue type. A biochemical gradient was observed from wheat to alfalfa [Figure III.2 a], which could be assigned to protein and lignin content. Such differences could indicate an increase in aromatic structures and decrease in protein contents from alfalfa to wheat, with intermediate values for rape residues. Biochemical

changes in each crop residue during decomposition were also observed, in agreement with other reports (Baumann et al., 2009; Buchan et al., 2003). The extent of the modifications depended on the chemical composition of the residues, with rape and alfalfa showing greater changes than wheat. Our results thus illustrated that the initial differences in crop residue quality leads to specific decomposition patterns (with different decomposition kinetics and variations in the concentration of specific biochemical components) (Baumann et al., 2009; Moore et al., 2004; Xu et al., 2006), and that NIR is a suitable method for assessing such dynamics in soil experiments. Results also suggested that the important chemical changes observed in rape and alfalfa residues at the beginning of decomposition might be due to the rapid degradation of easily degradable compounds such as sugars, starch, and low-molecular-weight extractives, in agreement with other reports (Aneja et al., 2006). In contrast, wheat residues might evolve slowly because of their lower content of readily degradable compounds and higher lignin content. This was also supported by soil respiration and PLFA measurement [Figure III.S3, supplemental data] that revealed transient stimulation of microbial activity and biomass for alfalfa and rape residues at the beginning of the decomposition process, which was not observed for wheat. Alternatively to chemical composition, wheat residues decomposition may also have been limited by a sub-optimal N availability since no N have been added to soil in our study, or a non optimum physical contact to the soil compared to the other residues. The grouping of the dates collected in autumn and winter for rape and alfalfa residues suggested a slowdown of the chemical evolution of the residues during this period, probably because of climatic conditions, and particularly low temperatures [see temperature and rainfall data provided as supplemental data, Figure III.S4], unfavourable to decomposition and/or nutrient depletion (Cayuela et al., 2009; Demetz & Insam, 1999). However, this pattern was not observed for wheat residues which showed continuous changes during the experiment [Figure III.2 b].

2. Influence of crop residue quality on the genetic structure of the colonizing bacterial communities

The above changes in crop residue quality during decomposition were also reflected in the structure of the colonizing bacterial communities. Successions of bacterial populations during decomposition were evidenced by ARISA. The important modifications of genetic diversity observed for all three crop residues could be due to responses of the colonizing microbial community to the changing composition of the plant material during decomposition, as shown

by NIR analysis. However, they could also be related to variations in environmental conditions since the study was performed under field conditions. Nevertheless, the genetic structures of the bacterial communities colonizing the alfalfa, wheat and rape residues were different, highlighting that in our study the biochemical composition of the residues was a key factor in determining the dynamics of the structure of the bacterial communities developing on the residues. This is in agreement with other authors who evidenced different microbial dynamics during beech and spruce litter degradation (Aneja et al., 2006), and between eucalypt, wheat and vetch residues degradation (Baumann et al., 2009).

Surprisingly, the patterns of community dynamics observed for wheat and alfalfa residues were relatively similar and very different from those of rape. This was in discrepancy with the respiration measurements and NIR analysis that indicated strong similarities between rape and alfalfa compared to wheat. It could indicate that the relationship between the biochemical quality of the crop residues and the dynamics of the genetic structure of the colonizing microbial community is weak. Likewise, Baumann et al (2009) observed kinetic differences between the microbial community structure and residue C-chemistry changes during the decomposition of eucalypt, wheat and vetch residues in soil, particularly in the later stages of decomposition. However rape tissues, like those of most other cruciferous plants, are known to contain glucosinolates. In intact rape cells, these glucosinolates are located in vacuoles. Disruption of the tissues during degradation leads to release of the glucosinolates that are hydrolyzed by the enzyme myrosinase, leading to the liberation of thiocyanates, isothiocyanates and nitriles (Sarwar et al., 1998). These compounds are known to have inhibitory or lethal effects on soil bacteria and fungi (Charron & Sams, 1999; Sarwar et al., 1998). Consequently, their progressive liberation during the degradation process, in addition to the residue chemistry, might exert a selection pressure of variable strength depending on the rate of decomposition. This could explain the particular pattern of community dynamics observed for rape in our study compared to wheat and alfalfa. On the other hand, the relative similarity of community dynamics between wheat and alfalfa might result from the fact that in the case of wheat carbon was difficult to be mineralized even if it is a decomposable carbon (cellulose + hemicellulose), and in the case of alfalfa all the readily decomposable carbon was mineralized during the first 25 days, as suggested by the peak of respiration observed during the first two weeks after the incorporation of alfalfa residues.

The amplitude of modifications of the biochemical quality of crop residues, the respiration rate and the genetic structure of the colonizing microbial community appeared to be more

closely related than the dynamics, since the observed reactivities of those three parameters were always lower for wheat than for rape and alfalfa residues. This suggests a trend in the relationship between residue composition, decomposition, and bacterial community structure modifications, with rapidly decomposing residues (*i.e.* those with low C/N ratio, readily degradable compounds content and low recalcitrant compounds content) inducing the greatest changes in bacterial communities in terms of structure and function.

3. Influence of crop residue quality on the taxonomic composition of the colonizing bacterial communities

Examination of the dominant taxa with significantly different relative contributions to the early vs. the late decomposition stages of each residue was performed for evidence that (i) residue composition can select for specific bacterial diversity, and (ii) the changing substrate composition is responsible for microbial community changes. The Shannon index values calculated for each clone library suggested an increase of bacterial diversity between the early and late degradation stages for all three residues, in agreement with Bastian et al (2009). It should be noted that regard the size of the clone libraries, the Shannon index calculated give indications of the diversity of the dominant populations and not of the entire communities. However, they constitute useful indicators to understand the response of bacterial communities to residues inputs (Bastian et al., 2009; Bernard et al., 2007). In this context, the higher H values observed at the late degradation stage could be due to the increased relative content of recalcitrant compounds (lignin) of the residues during the decomposition process resulting from the more rapid degradation of less recalcitrant components *i.e.* carbohydrates such as sugars and starch, as supported by the NIR results and other reports (Aneja et al., 2006). The increase in residue recalcitrance could explain the stimulation of a more diverse bacterial consortium able to degrade such residues, *i.e.* communities harbouring the wide range of metabolic capacities necessary to degrade complex recalcitrant plant materials (De Boer et al., 2005; Hu & van Bruggen, 1997). Alternatively, the increase in bacterial diversity observed during the decomposition for all three residues might also be attributed to physical changes in the residues, resulting in an increase in the number of ecological niches available for bacterial colonization (Cookson et al., 2008).

Regarding the taxonomic composition of the bacterial community at the early and late stage of degradation, the most common phylum in all three plant residues was represented by

proteobacteria which are known to be stimulated in C-rich environments (Fierer et al., 2007a). However, the relative abundance of this group at the two degradation stages varied significantly between the residues, with a gradient observed from alfalfa (90% in July vs. 83% in March) to rape (83% vs. 74%) and wheat (63% vs. 57%). The NIR results revealed a similar gradient, mostly attributed to increasing protein content and decreasing content of aromatic structures (such as lignin) from wheat to alfalfa. Consequently, it can be hypothesized that the high levels of readily degradable compounds in rape and alfalfa residues could explain the high dominance of typical “r-strategists” such as proteobacteria, as previously shown by Aneja et al (2006) during spruce and beech litter degradation.

As proposed above for the Shannon index, the increasing recalcitrance of the residues during the decomposition could explain the observed decrease in the relative abundance of proteobacteria between the early and late degradation stages in all three residues. This hypothesis is supported by the high relative abundance of sequences affiliated to *Stenotrophomonas* (γ -proteobacteria) and *Massilia* (β -proteobacteria) genera observed at the early stage of decomposition of the three residues. Enrichment in *Massilia* has been previously reported during the initial stage of green wheat decomposition in soil (Bernard et al., 2007), and both genera were shown to be stimulated after glucose addition (Padmanabhan et al., 2003), thereby highlighting their copiotrophic attributes and explaining their better fitness at the beginning of the decomposition process. On the other hand, the increased sequences related to *Sphingomonas* (α -proteobacteria) during decomposition may be explained by its ability to use a wide range of organic compounds (Fredrickson et al., 1995) conferring a better fitness to this genera with the increase in residue complexity. In other respects, our results suggest that the relative size of the Proteobacteria group could be a good indicator of crop residue degradability and dynamics during degradation.

The Bacteroidetes group was stimulated in the late stage of degradation of all three residues but was mainly detected on wheat residues, irrespective of the date. This finding was in discrepancy with Fierer et al (2007a) who demonstrated a positive correlation between the abundance of Bacteroidetes and C mineralization rates, and with Bastian et al (2009) who showed a stimulation of this bacterial group in the early stage of wheat residues degradation. However, the detection of this group in all the clone libraries confirmed its stimulation in C-rich environments. Sequences related to Actinobacteria were mainly recorded at the late stage of degradation, with a particular stimulation observed for wheat residues. Similar results were previously reported for wheat residues decomposition (Bastian et al., 2009; Bernard et al.,

2007). Actinobacteria are Gram-positive bacteria with a high G+C ratio. They play an important role in the decomposition of complex organic materials, such as cellulose and lignin (De Boer et al., 2005), which may explain their better fitness in the late stage of residues degradation and the higher stimulation observed for wheat residues.

V - Conclusion

This study provides evidence that the biochemical composition of crop residues is a key factor determining the dynamics of the structure and diversity of bacterial communities. Readily degradable residues such as alfalfa may induce greater modifications of the bacterial diversity and activity than more recalcitrant residues such as wheat. Copiotrophic populations/bacterial groups dominate the early stages of degradation and are progressively replaced by more specialized groups. However, our study indicates that the relative abundance of copiotrophs such as proteobacteria is greatly dependent on residue composition, with a gradient observed from alfalfa to wheat. Consequently, the quality of organic inputs added to soil might represent a suitable way to manage the microbial component in soil and potentially the soil processes for which they are responsible. Our study highlights a link between residue composition and bacterial diversity. The next step is to evaluate the reciprocity of this link, *i.e.* do modifications of bacterial diversity induce different patterns of residue decomposition? This phase will involve targeted experiments based on manipulations of microbial diversity and the assessment of residue modifications during decomposition.

Acknowledgement

This study was financially supported by the Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) and the Burgundy region.

The authors are grateful to the CEMAGREF of Grenoble and S. De Danieli and J.J. Brun for the NIR analysis.

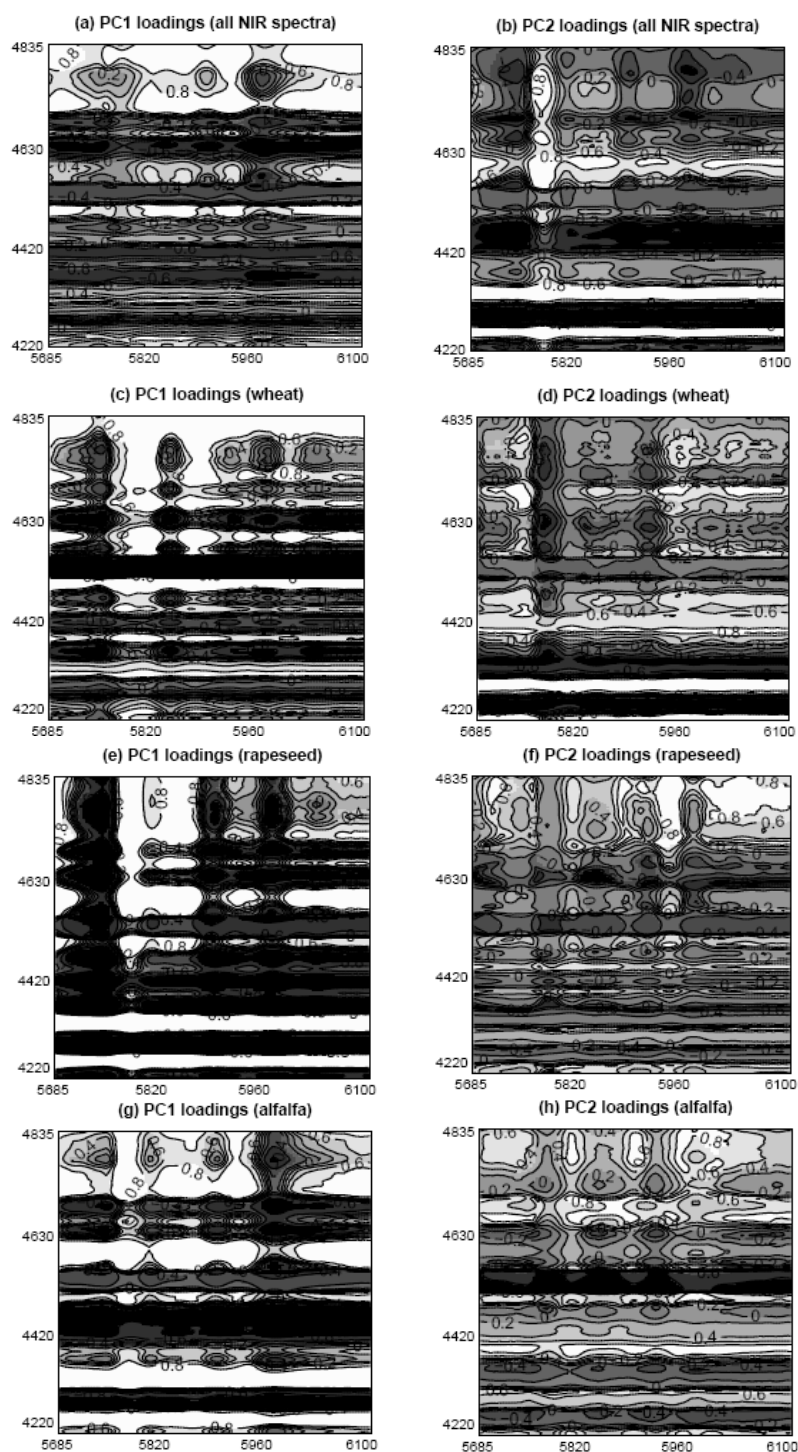


Figure III.S1, supplemental data. Loading matrices of PC1 and PC2 for Principal Component Analysis of NIR fingerprints of all residues (a, b); wheat (c, d); rape (e, f) and alfalfa (g, h) residues. Grey gradation represents loading values from -1 (black) to +1 (white). Threshold values of -0.8 and +0.8 were used for the identification of wavebands explanatory for each principal component represented in Table III.1. Wavenumbers are expressed in cm^{-1} .

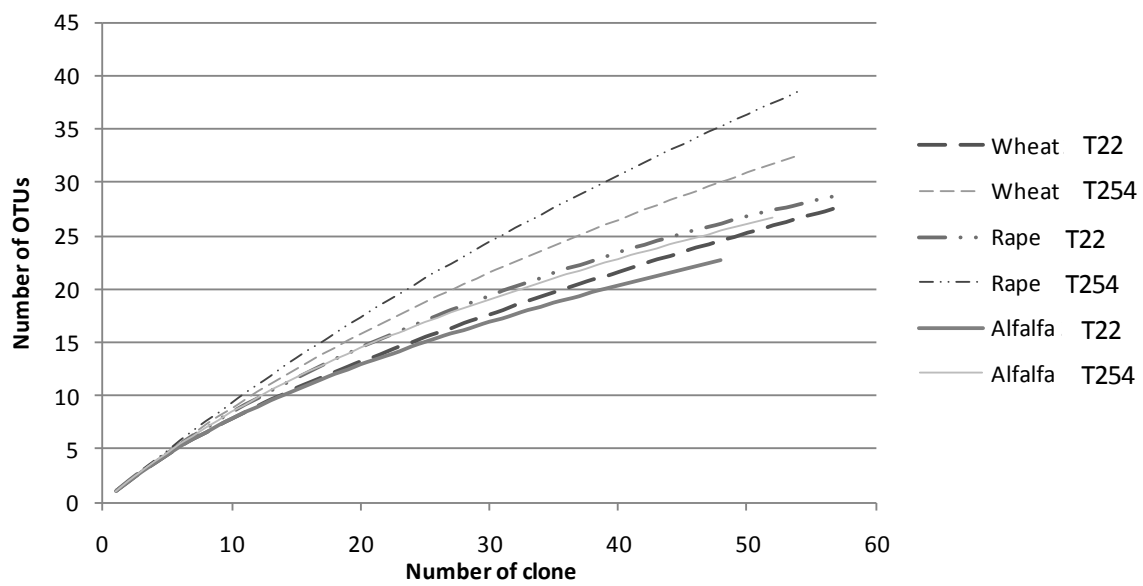


Figure III.S2, supplemental data. Rarefaction curves for wheat, rape and alfalfa residues at T22 and T254 days after incorporation to soil, respectively.

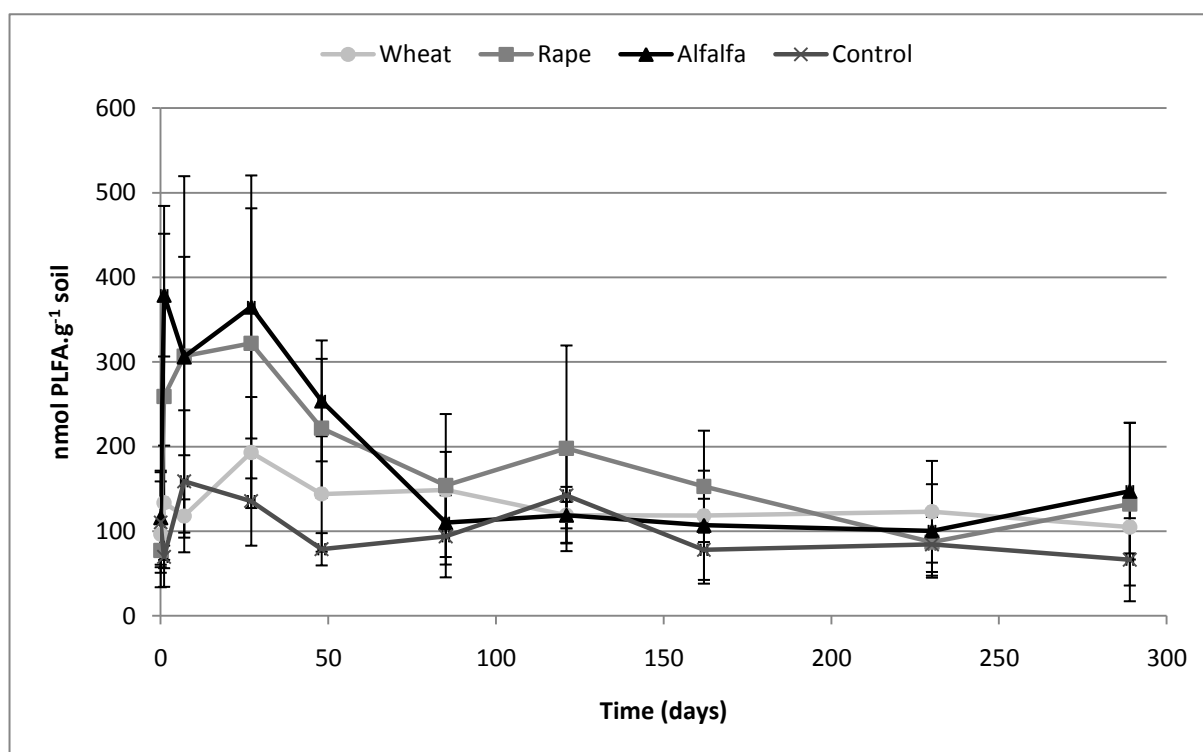


Figure III.S3, supplemental data. Microbial C-biomass determined by analysis of the total soil fatty acid (PLFA) content in the soil after incorporation of wheat, rape and alfalfa residue.

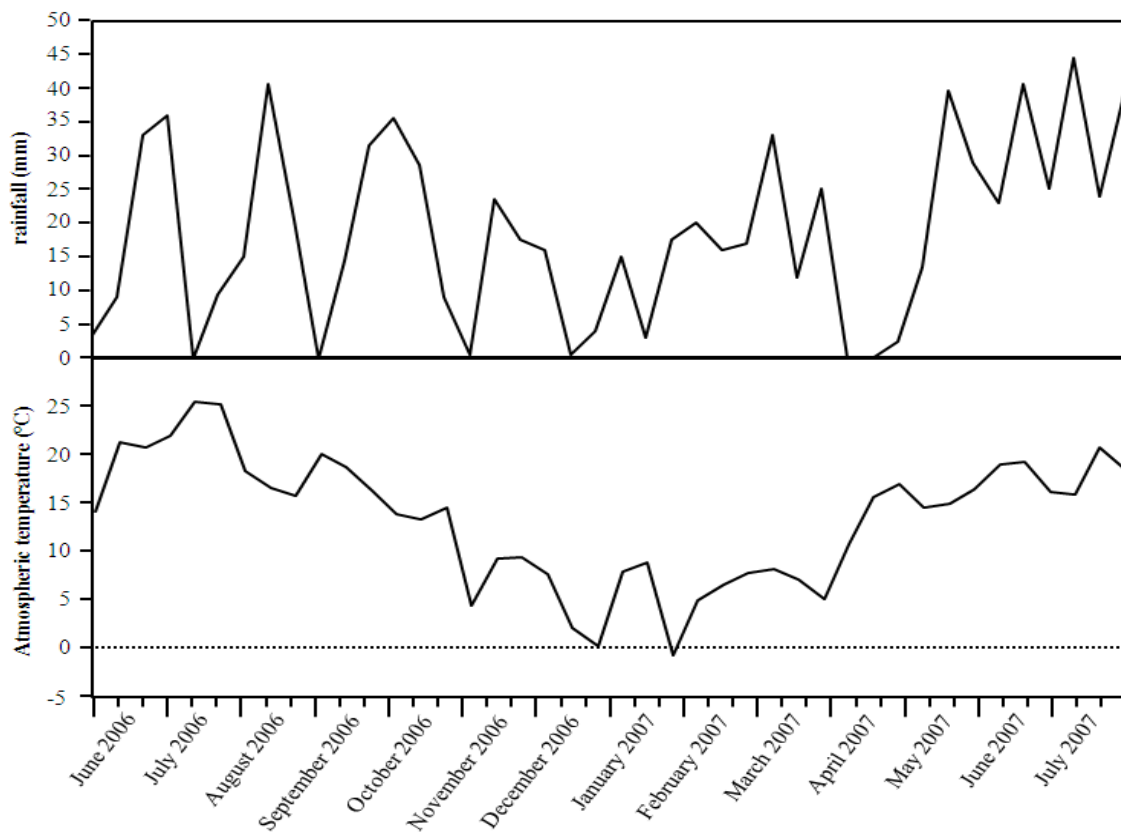


Figure III.S4, supplemental data. Rainfall (mm) and atmospheric temperature (°C) during the experiment.

Table III.S1, supplemental data. Closest affiliations of 16S rDNA sequences cloned from DNA extracted from wheat, rape and alfalfa residue for July 2006 and March 2007 (22 and 254 days after incorporation, respectively). The accession numbers for the 16S rDNA gene sequences were deposited in the GeneBank database (from GQ379348 to GQ379673).

Genus of bacteria	Accession number	Accession number of reference	% similarity	Wheat		Rape		Alfalfa	
				07/2006	03/2007	07/2006	03/2007	07/2006	03/2007
Alphaproteobacteria									
Bradyrhizobium (1)	GQ379456	EU256463.1	97%		1				
Brevundimonas (1)	GQ379526	AJ244709	97%				1		
Caulobacter (1)	GQ379614	EU730905	97%					1	
Devosia (4)	GQ379534	AB361068	98%				1		
	GQ379630	AB271045	97%						1
	GQ379547	EF012357	95%				1		
	GQ379493	EF540476.1	94%			1			
Kaistobacter (6)	GQ379385	AB258386.1	95%	1					
	GQ379502 and	AM411905.1	89% to			1	1		
	GQ379553		96%						
	GQ379530	EU193092.1	97%				1		
	GQ379564	EU193111.1	97%				1		
	GQ379570	FJ436424.1	94%				1		
Methylobacterium (5)	GQ379549 and	AM910530.1	94% to				1		1
	GQ379665		97%						
	GQ379541	AY364020.2	96%				1		
	GQ379670	AY569283.1	98%						1
	GQ379438	FJ006916.1	96%		1				
Methylocapsa (1)	GQ379421	AJ278726.1	91%		1				
Novosphingobium (1)	GQ379601	EU984513.1	95%					1	
Phenylobacterium (1)	GQ379565	EU202833.1	94%				1		
Phyllobacterium (3)	GQ379481	AJ968699.1	93%			1			
	GQ379497	EU697963.1	91%			1			
	GQ379395	FJ154092.1	94%	1					
Rhizobium (7)	GQ379406	AM084044.1	95%		1				
	GQ379600 and	DQ855276	96% to					1	1
	GQ379658		99%						
	GQ379671	EF364391.1	97%						1
	GQ379583	EF540493.1	96%					1	
	GQ379550	EU872221.1	97%				1		
	GQ379540	FJ267567.1	95%				1		
Roseomonas (1)	GQ379519	AM231587	93%				1		
Sinorhizobium (3)	GQ379484	AJ879127.1	92%			1			
	GQ379377	AY505132.1	93%	1					
	GQ379525	EU399913.1	97%				1		
Sphingomonas (13)	GQ379621	AF177917.1	95%						1
	GQ379651 and	AF385529.1	89% to						2
	GQ379661		95%						
	GQ379559	AM691108.1	96%				1		
	GQ379444	AM900776.1	97%		1				
	GQ379455	AY563441.1	95%		1				
	GQ379451	DQ314734.1	93%		1				
	GQ379672	DQ917253.1	97%						1
	GQ379655	EF103200.1	91%						1
	GQ379529 and	EF103215.1	97% to				2		
	GQ379531		98%						
	GQ379568	EU723128.1	96%				1		
	GQ379667	X89909.1	98%						1
uncultured alpha proteobacterium (1)	GQ379618	AY922052.1	96%					1	
uncultured Caulobacteriales bacterium (1)	GQ379558	EU202836.1	92%				1		
Betaproteobacteria									
Achromobacter (9)	GQ379638	AF531768	97%						1
	GQ379517	AF439314	93%			1			
	GQ379503	AF511516	93%			1			
	GQ379507	DQ530072.1	89%			1			
	GQ379469 and	EF550171.1	93% to			1	1		

	GQ379522		97%				
	GQ379510,	EU239469	96% to		1	1	2
	GQ379546,		98%				
	GQ379623 and						
	GQ379647						
Acidovorax (6)	GQ379476	AM084011.1	94%		1		
	GQ379509	AY177768.1	88%		1		
	GQ379576	EF596912.1	88%				1
	GQ379669	EU037287.1	96%				1
	GQ379365	EU375646.1	96%	1			
	GQ379593	EU730927	96%				1
Acteobacter (1)	GQ379473	FM178869.1	91%		1		
Alcaligenes (1)	GQ379351	AJ509012.1	98%	1			
Burkholderia (6)	GQ379581	AF408980.1	99%				1
	GQ379440,	AM922178.1	94% to		1	1	2
	GQ379487,		96%				
	GQ379624 and						
	GQ379642						
	GQ379417	EU723145.1	92%		1		
Collimonas (2)	GQ379467 and	AY281151.1	95% to		2		
	GQ379485		96%				
Comamonadaceae bacterium TBEA3 (1)	GQ379563	EU825700.1	96%			1	
Duganella (6)	GQ379589 and	AM412134.1	91% to				2
	GQ379590		96%				
	GQ379520	D14256.1	96%			1	
	GQ379367	EF575562.1	96%	1			
	GQ379625	EF584756	93%				1
	GQ379433	EU921644.1	94%		1		
Herbaspirillum (1)	GQ379475	AJ238361	95%			1	
Hydrogenophaga (1)	GQ379384	AF523010.1	96%	1			
Janthinobacterium (8)	GQ379566,	AY167838	94% to		3		1
	GQ379447,		95%				
	GQ379448 and						
	GQ379439						
	GQ379454 and	EU057879.1	92 to 94%		1	1	
	GQ379488						
	GQ379607	EU073069.1	90%				1
	GQ379434 and	EU341231.1	94% to		1		1
	GQ379639		97%				
Leptothrix (1)	GQ379358	DQ463735.2	99%	1			
Massilia (31)	GQ379626	AM237371	95%				1
	GQ379606	AY966001	92%				1
	GQ379597	AJ871463	97%				1
	GQ379657,	AM231588	92% to	2			1
	GQ379355 and		98%				
	GQ379366						
	GQ379453	AM237367.1	95%		1		
	GQ379582,	AY965999	93% to	2		1	1
	GQ379648,		97%				
	GQ379392,						
	GQ379396 and						
	GQ379496						
	GQ379506,	AY966000	90% to		1		2
	GQ379577 and		96%				
	GQ379608						
	GQ379483,	AY966001	95% to		1		2
	GQ379579,		96%				1
	GQ379604 and						
	GQ379636						
	GQ379462,	EU274637	92% to	2	2		2
	GQ379465,		97%				1
	GQ379585,						
	GQ379615,						
	GQ379632,						
	GQ379354 and						
	GQ379398						
	GQ379390 and	EU420063.1	95%	2			
	GQ379394						
	GQ379404 and	FJ192602.1	93% to	1	1		
	GQ379501		95%				
	GQ379373	FJ267580.1	93%	1			
Methylibium (2)	GQ379521	EU193047.1	97%			1	
	GQ379539	CP000555.1	95%			1	
Methylobacillus (1)	GQ379569	DQ287787	94%			1	
Methylophilus (6)	GQ379486	AB193725	92%		1		
	GQ379374,	AY436789.1	94% to	1	1	2	

	GQ379490,		97%			
	GQ379548 and					
	GQ379551					
	GQ379545	EU375653.1	96%		1	
Mitsuria (1)	GQ379557	EF110621.1	94%		1	
Oxalobacter (3)	GQ379425	AJ496038.1	96%	1		
	GQ379611	AY367029.1	96%			1
	GQ379397	DQ196473.1	96%	1		
Pigmentiphaga (2)	GQ379586 and	EU583723.1	93% to			2
	GQ379616		94%			
Polaromonas (3)	GQ379430 and	AM492164.1	96% to	2		
	GQ379460		98%			
	GQ379556	EU130998.1	96%		1	
Ralstonia (3)	GQ379628 and	AY238507.1	98%			2
	GQ379673					
	GQ379437	EU727457.1	91%	1		
Ramlibacter (1)	GQ379463	EU423304.1	96%		1	
uncultured Comamonadaceae bacterium (1)	GQ379561	AF523038.1	95%		1	
uncultured Nitrosomonadaceae bacterium (1)	GQ379498	EF019754.1	95%		1	
uncultured oxalobacteraceae (1)	GQ379415	DQ520826.1	90%	1		
Variovorax (16)	GQ379584	EU979529	98%			1
	GQ379629	AY599725.1	97%			1
	GQ379542	AY621157.2	96%		1	
	GQ379645,	DQ256487	96% to			3
	GQ379646 and		98%			
	GQ379654					
	GQ379371	DQ530075.1	96%	1		
	GQ379412	EF471221.1	95%	1		
	GQ379360 and	EU341214.1	97% to	1		1
	GQ379535		98%			
	GQ379508	EU979529	92%		1	
	GQ379435,	FJ006917.1	96% to	3		1
	GQ379436,		97%			
	GQ379445 and					
	GQ379562					
Zoogloea (1)	GQ379518	FJ348026.1	93%		1	
	GQ379368	AF001645.1	98%	1		
Deltaproteobacteria						
Cystobacter (1)	GQ379516	EU263004	90%		1	
Polyangiaceae (1)	GQ379555	EU193070.1	91%			1
uncultured delta proteobacterium (1)	GQ379664	DQ269039.1	86%			1
Gammaproteobacteria						
Acinetobacter (1)	GQ379620	EU427316	93%			1
Aquicella (1)	GQ379359	AY359283.1	94%	1		
Dokdonella (1)	GQ379644	EU685334.2	91%			1
Enterobacter (4)	GQ379591	EF175731.1	98%			1
	GQ379474	EU196755.1	94%		1	
	GQ379609	EU693565.1	91%			1
	GQ379574	EU733519	95%			1
Escherichia (1)	GQ379594	DQ013851.1	97%			1
Frateriella (1)	GQ379663	EU682683.1	93%			1
Lysobacter (1)	GQ379622	EF488749.1	98%			1
Pantoea (11)	GQ379356	AB004757.2	93%	1		
	GQ379357	AJ583835.1	93%	1		
	GQ379596	EF428997	97%			1
	GQ379613	EU302842.1	97%			1
	GQ379369 and	EU828365.1	96% to	1	1	
	GQ379494		98%			
	GQ379376	EU849108.1	97%	1		
	GQ379587	EU849111	95%			1
	GQ379610 and	FJ357815	97%			2
	GQ379617					
	GQ379605	FJ357816	98%			1
Pseudomonas (3)	GQ379505	AY574908	95%		1	
	GQ379533	EF601815.1	95%			1
	GQ379491	EU391388.2	95%		1	
Pseudoxanthomonas (1)	GQ379652	EF540482.1	98%			1
Rhizobacter (1)	GQ379575	AB297965	97%			1
Rickettsiella (1)	GQ379353	EF516173.1	85%	1		
Solimonas (1)	GQ379512	EU370953.1	92%		1	
Stenotrophomonas (28)	GQ379515	AB294554	92%		1	
	GQ379480	AM403587.1	92%		1	
	GQ379431	AY131216.1	97%	1		
	GQ379578 and	AY689032.1	90% to			1

	GQ379637		93%					
	GQ379461,	DQ109991.2	92% to		2		2	1
	GQ379479,		98%					
	GQ379595,							
	GQ379598 and							
	GQ379649							
	GQ379588,	DQ424872.1	95% to	4				1
	GQ379375,		97%					
	GQ379382,							
	GQ379399 adn							
	GQ379401							
	GQ379405	DQ993329.1	97%	1				
	GQ379472,	EU022689	91% to		2			2
	GQ379478,		97%					
	GQ379631 and							
	GQ379641							
	GQ379633	EU048274.1	95%					1
	GQ379592 and	EU239138	96% to				2	
	GQ379612		97%					
	GQ379511	EU693549.1	94%		1			
	GQ379470 and	EU834266	95% to		2			
	GQ379471		97%					
	GQ379362	EU834266.1	97%	1				
	GQ379409	EU834266.1	93%		1			
Thermomonas (5)	GQ379528	AB355702	94%				1	
	GQ379653,	EF100698	94% to					3
	GQ379660 and		95%					
	GQ379666							
	GQ379403	EU202906.1	96%	1				
uncultured gamma proteobacterium (2)	GQ379424 and	AB252888.1	93% to		2			
	GQ379427		95%					
Xanthomonas (9)	GQ379466,	AM920689	95% to	1	1	1		
	GQ379349 and		97%					
	GQ379422							
	GQ379627	AY994101	95%					1
	GQ379419,	DQ213024.1	92% to		1	1	1	
	GQ379499 and		97%					
	GQ379552							
	GQ379504 and	FJ405365.1	91% to			1	1	
	GQ379619		94%					
Acidobacteria								
Acidobacterium (1)	GQ379420	EU403966.1	98%		1			
uncultured Acidobacteria (1)	GQ379446	DQ648914.1	94%		1			
Actinobacteria								
Curtobacterium (1)	GQ379432	AM410692.1	98%		1			
Frigobacterium (1)	GQ379524	AY571813.1	98%				1	
Marmoricola (1)	GQ379449	AM295338.1	95%		1			
Microbacterium (2)	GQ379459	EF540477.1	94%		1			
	GQ379492	AB004718	93%			1		
Promicromonospora	GQ379426	EU863844.1	98%		1			
uncultured Rubrobacteridae bacterium	GQ379643	AY395375	93%					1
Bacteroidetes								
Chitinophaga (4)	GQ379477 and	AB245374	96% to	1		1		
	GQ379378		97%					
	GQ379573	AB264798	96%					1
	GQ379391	AB267723.1	95%	1				
Cytophaga (4)	GQ379634,	CP000383	89% to		3			1
	GQ379407,		92%					
	GQ379442 and							
	GQ379458							
Flavisolibacter (2)	GQ379416	AB267476.1	94%		1			
	GQ379523	AB267477	93%				1	
Flexibacter (1)	GQ379429	AB078049.1	91%		1			
Hymenobacter (1)	GQ379656	EU379243.1	92%					1
Mucilaginibacter (1)	GQ379527	AM933506.1	95%				1	
Mucilaginibacter (9)	GQ379418,	EU423302.1	93% to		4		1	1
	GQ379423,		98%					
	GQ379443,							
	GQ379452,							
	GQ379544 and							
	GQ379640							
	GQ379662	EU729366.1	93%					1
	GQ379441 and	EU747841.1	94% to		1			1
	GQ379659		96%					
Niastella (5)	GQ379402	DQ244076.1	93%	1				
	GQ379532 and	DQ244077	92% and				1	1

	GQ379650		93%			
	GQ379536	EU362141.1	86%			1
	GQ379450	EU917053.1	93%	1		
Pedobacter (2)	GQ379370	EU194881.1	94%	1		
	GQ379495	EU109722.1	92%		1	
Sphingobacterium (1)	GQ379572	AM411963.1	94%			1
Sphingoterrabacterium (2)	GQ379380	AB267719.1	96%	1		
	GQ379388	AY571816	86%	1		
unclassified Chitinophagaceae (3)	GQ379571	AJ252615	95%			1
	GQ379413 and	FJ263934.1	88% 94%	1		1
	GQ379635					
uncultured Crenotrichaceae bacterium (1)	GQ379538	EF019302.1	94%			1
uncultured Bacteroidetes bacterium (1)	GQ379543	EF522294.1	92%			1
uncultured Saprospiraceae bacterium (1)	GQ379410	EU177692.1	93%		1	
uncultured bacteroidetes (1)	GQ379393	EU753655.1	90%	1		
unclassified Sphingobacteriales (1)	GQ379414	FJ177532.1	90%		1	
Cyanobacteria						
Microcoleus (1)	GQ379567	EF654074	97%			1
uncultured cyanobacterium (1)	GQ379408	AY222299.1	92%		1	
Firmicutes						
Bacillus (14)	GQ379352	DQ093581.1	97%	1		
	GQ379389	DQ993305.1	98%	1		
	GQ379500	EU159488	96%		1	
	GQ379383	EU169603.1	94%	1		
	GQ379468,	EU333886	89% to	1	1	1
	GQ379580 and		98%			
	GQ379364					
	GQ379348 and	EU596422.1	97% to	2		
	GQ379361		98%			
	GQ379387	EU876652.1	95%	1		
	GQ379602 and	EU979528	96%			2
	GQ379603					
	GQ379372 and	FJ176468.1	95% to	2		
	GQ379386		96%			
Carnobacterium (2)	GQ379428 and	EU344940.1	93% to		1	1
	GQ379560		98%			
Paenibacillus (4)	GQ379482	AB271057	94%		1	
	GQ379350	AM745263.1	94%	1		
	GQ379464	AM921628	94%		1	
	GQ379381	EU558287.1	95%	1		
Staphylococcus (1)	GQ379363	EU807753.1	94%	1		
Planctomycetes						
Gemmata (1)	GQ379599	X81957	93%			1
uncultured planctomycete (1)	GQ379457	AY921761.1	92%		1	
Verrucomicrobia						
uncultured Verrucomicrobia bacterium (1)	GQ379489	EU979055.1	94%		1	
uncultured bacterium						
uncultured candidate division OP10 bacterium (1)	GQ379554	AY192276	96%			1
uncultured bacterium (7)	GQ379411	AY549545.1	95%		1	
	GQ379668	DQ017948.1	87%			1
	GQ379537	DQ856525.1	97%			1
	GQ379379	EU134604.1	93%	1		
	GQ379513	EU790024.1	94%		1	
	GQ379514	EU790057.1	95%		1	
	GQ379400	EU881323.1	91%	1		

Chapitre 4 :

Stimulation de différents groupes fonctionnels microbiens par l'apport de résidus de blé et de luzerne dans le sol, conséquences sur le priming effect

Comme indiqué dans l'introduction, l'apport de Matière Organique Fraîche (MOF) dans le sol, comme les résidus de culture dans les systèmes cultivés, pourrait représenter une pratique efficace pour maintenir le stock de C du sol et donc préserver les services écosystémiques associés. Toutefois, l'apport de MOF peut également induire une sur-minéralisation des MOS par un phénomène appelé Priming-Effect (Fontaine et al., 2003 ; Kuzyakov, 2010), dont l'importance peut dans certain cas se traduire par un bilan de C négatif. Il apparaît par conséquent important de progresser dans notre connaissance des processus impliqués dans la dégradation des MOF d'une part, et dans le PE d'autre part afin de parvenir à une gestion optimisée des apports de matière organique dans les agrosystèmes. Des études ont montré que le PE dépend de la composition et de la concentration du substrat frais apporté (Nottingham et al., 2009) ainsi que des propriétés du sol (Rasmussen et al., 2007). En revanche, bien que la diversité microbienne pourrait être un paramètre important dans le contrôle du PE, de part l'implication de différents groupes fonctionnels microbiens dans la décomposition respectivement des MOF et des MOS (Fontaine et Barot, 2005 ; Waldrop et al., 2004), très peu de données sont disponibles sur l'identité des microorganismes impliqués et leur dynamique au cours du PE.

Les travaux présentés dans ce chapitre avaient pour objectifs de contribuer à l'identification des acteurs microbiens impliqués dans la décomposition des MOF et dans le PE en fonction de l'apport de résidus de culture présentant des caractéristiques biochimiques contrastées. Dans ce contexte, nous avons réalisé une expérimentation en microcosmes de sol dans lesquels nous avons incorporé des résidus de blé ou de luzerne marqués à plus de 90% avec un isotope stable (^{13}C). Ce marquage fort des résidus de culture nous a permis de mettre en œuvre la méthode d'ADN-SIP (Stable Isotope Probing) qui permet de caractériser spécifiquement, par des outils moléculaires, les communautés microbiennes impliquées dans la dégradation des résidus (ADN ^{13}C), et les communautés impliquées dans la dégradation de la MOS native (ADN ^{12}C) (Bernard et al., 2007). Au cours de l'expérimentation (120 jours d'incubation à 20 °C), la respiration totale (C-CO₂) ainsi que la minéralisation des résidus (^{13}C -CO₂) ont été suivis. En parallèle, la biomasse microbienne a été mesurée par la quantification des PLFA. Les structures génétiques des communautés bactériennes impliquées dans la dégradation des résidus (fraction lourde) ou de la MOS native (fraction légère) ont été caractérisées par la méthode de génotypage ARISA et la diversité taxonomique a été déterminée par pyroséquençage du gène ARNr 16S.

Les différents objectifs de ce chapitre étaient :

- de déterminer la dynamique de la structure et de la composition taxonomique des communautés bactériennes activement impliquées dans la décomposition des résidus de blé et de luzerne d'une part, et dans la dégradation de la MOS native d'autre part ;
- de relier les flux de carbone engendrés par l'apport des différents résidus de culture (minéralisation du résidu et PE) aux dynamiques des communautés microbiennes.

Cette étude sera présentée sous la forme d'un article en préparation en vue d'une publication dans un journal scientifique de rang A dont le titre est :

“Stimulation of different functional bacterial groups consecutively to inputs of wheat and alfalfa residues in soil: consequences on the priming effect process”

Abstract

The turn-over of organic matter in soil is dependent on the activity of soil microbial decomposers. However, little is known about how the structure and diversity of microbial communities are impacted by Fresh Organic Matter (FOM) inputs and how the response of soil microbial communities may determine carbon cycling in soil. In a microcosms experiment, we investigated the decomposition of two ^{13}C labeled crop residues (wheat and alfalfa) and the dynamics of the genetic structure and taxonomic composition of the bacterial communities decomposing respectively ^{13}C labeled FOM and native unlabeled soil organic matter (SOM). For this, we combined the Stable Isotope Probing method (SIP) with molecular tools, *i.e.* Bacterial-Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (B-ARISA) to assess the structure, and pyrosequencing of 16S rDNA genes to characterize the taxonomic composition of these two bacterial functional groups. Alfalfa residues decomposed faster than wheat residues and the mineralization of SOM was enhanced by residues addition. However, the intensity of this Priming Effect (PE) depended on the biochemical quality of the residue since the increase in soil carbon decomposition after 120 days of incubation corresponded to 220% and 343 % following the addition of wheat and alfalfa residues, respectively. In parallel, different dynamics of the genetic structure and taxonomic composition of the FOM- and the SOM-degrading communities have been evidenced during the decomposition process. They suggest that different microbial mechanisms of PE induction may be implemented depending on the degradability of the crop residues added into the soil, with important consequences in terms of C-storage in soil.

Key words: bacterial community, SIP, crop residue, pyrosequencing, priming effect

I - Introduction

Soil Organic Matter (SOM) is a major component controlling the ability of soil to deliver agroecosystemic services. At a local scale, SOM plays a key role in soil fertility, aggregate stability and erosion control. At a global scale, the increase of C storage in the form of SOM may play an important role in fighting against the increase of greenhouse gas emission in the atmosphere. The total emission of CO₂ from soils is recognized as one of the largest fluxes in the global carbon cycle. As a consequence, small changes in the magnitude of soil respiration could have a large effect on the concentration of CO₂ in the atmosphere (Schlesinger and Andrews, 2000). The return of crop residue to soil is a usual agricultural practice and could contribute to the sequestration of C in soil. However, when Fresh Organic Matter (FOM), as crop residue, is supplied to the soil, only one part is humified and stored in soil. The other part is mineralized leading to the release of CO₂ in atmosphere. Even if the increase of C storage in SOM can contribute to reduce the global warming, the soil shouldn't be considered as an unlimited sink to C storage (Johnston et al., 2009). Moreover, adverse effect of carbon storage may sometimes be benefic for other soil parameters. For example, a small decrease in SOM due to rotational cropping has been shown benefic to the control of soil pathogens (Johnston et al., 2009). Altogether, these considerations highlight that it is necessary to better understand the processes involved in the decomposition of FOM as crop residue.

Microorganisms are major actors controlling the decomposition of organic matter in soil. However, microbial diversity involved is still poorly understood. Indeed, most of the works that aimed at studying the response of soil microbial communities to crop residue inputs have mainly considered the bacterial and/or fungal biomass, or the microbial enzymatic and metabolic activities (Bending et al., 2002; Gaillard et al., 1999; Gaillard et al., 2003; Griffiths et al., 2001; Lundquist et al., 1999; Zelenev et al., 2005). It appears from those studies that the inputs of crop residues in soil generally enhance the microbial biomass, mainly at the beginning of decomposition of this FOM. Furthermore, stimulated enzymatic and metabolic activities may be linked with the biochemical composition of crop residues. Recently, a few studies focused on the dynamics of the structure and diversity of soil microbial communities consecutively to crop residues addition and showed that successions of bacterial and fungal communities occur during the degradation process (Bastian et al., 2009; Poll et al., 2010). However, the taxonomic diversity of these microbial communities remains poorly known. Recently, Baumann et al. (2009) and Nottingham et al. (2009) evidenced that different dynamics of the structure of microbial communities occur during the decomposition of

different C-compounds and related those differences of communities' dynamics to the rate of C-compounds mineralization. However, these studies take into account either inoculums of microorganisms or the whole soil microbial diversity.

Considering that only a small part of the whole soil microbial diversity is active at a given point in time and takes part in the decomposition of the crop residues added into the soil, it may be suitable to target specifically the diversity of the microbial communities specifically involved in the decomposition of crop residues. To target specifically this active subset of the soil microbial communities, a recent technology has been developed, the DNA-SIP (Stable Isotope Probing), that allows characterizing specifically the communities actively involved in the decomposition of C-substrates labeled with stable isotopes (e.g., ^{13}C) (Radajewski et al., 2000; Neufeld et al., 2006). This method has been used to identify soil microorganisms actively involved in the degradation of labeled lignin, acetate, glucose or cellulose (Padmanabhan et al., 2003), or labeled plants (Bernard et al., 2007). Another advantage to use labeled molecules is the possibility to follow the mineralization of the labeled C substrate, but also the mineralization of the native SOM and consequently to evaluate the importance of processes such as the Priming Effect (PE, *i.e.* the increase of mineralization of the native SOM following the addition of FOM into the soil) that may play an important role in the carbon balance of soil (Bernard et al., 2007; Nottingham et al., 2009; Kuzyakov, 2010). PE is a complex and bad known process. A few theories have been proposed to explain it (Kuzyakov et al., 2000; Fontaine et al., 2003), but processes and particularly microbial processes involved still need to be investigated. In this context, a better knowledge of the dynamics of the FOM and SOM-degrading microbial communities during the PE may be a decisive step since it is likely that PE is controlled by the activity and the dynamics of these two microbial functional groups (Fontaine and Barot, 2005).

The aim of the present study was to characterize the dynamics of FOM- and SOM-degrading communities as well as the kinetics of FOM and SOM mineralization following the addition of two ^{13}C labeled crop residues harboring contrasted biochemical compositions (wheat and alfalfa residues). Wheat and alfalfa residues have been incorporated into soil microcosms and incubated for 120 days. The mineralization of crop residues and native SOM during the incubation has been evaluated through the measurement of $^{13}\text{C}\text{-CO}_2$ and $^{12}\text{C}\text{-CO}_2$ respectively. The dynamics of the structure of the FOM- and the SOM-degrading communities during the degradation process have been characterized by applying the B-ARISA fingerprinting method respectively on the heavy (enriched $^{13}\text{C}\text{-DNA}$) and light ($^{12}\text{C}\text{-DNA}$)

DNA) fractions of DNA directly extracted from amended microcosms. The taxonomic composition of each functional group has been characterized by pyrosequencing of 16SrDNA genes of the heavy and light DNA isolated from the amended microcosms to identify the succession of bacterial populations/groups occurring during the degradation process and more precisely the bacterial populations/groups possibly involved in the PE.

II - Experimental Procedures

1. Plant culture and ^{13}C -labelling

Residues of two different plant cultures were used: wheat (*Triticum aestivum* cv Caphorn) and alfalfa (*Medicago truncatula* ec. J5). Seeds of wheat were germinated at 4°C in darkness and seeds of alfalfa were germinated in 0.7% (w/v) water agar plates at 25°C in darkness. After germination, each plant was sown and grown on mix of sand (1/4) and perlite (3/4) in an air-tight chamber which allows accurate regulation of atmospheric gas composition and environmental parameters (chambers developed and managed by the Groupe de Recherches Appliquées en Phytotechnologie, CEA Cadarache, France). The day-night period was set at 8/16 and 14/10 for wheat and alfalfa plants respectively, photon flux rate were to 350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ for wheat and 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ for alfalfa, relative humidity were to 65% day/80% night and 70% day/80% night for wheat and alfalfa respectively. The both plants were watering with half diluted Hoagland's nutrient solution and CO_2 concentration was maintained at 380 $\mu\text{l.l}^{-1}$. The isotope excess of CO_2 as well as the partial pressure in the chamber were both continuously monitored by Near Infrared Spectroscopy. Regulation was achieved by automatic injection of pure (>99% atom ^{13}C) $^{13}\text{CO}_2$ (Purchased from CortecNet, Paris, France). The isotope excess in the chamber was fixed: >80% atom ^{13}C during the first 10 days and > 90% atom ^{13}C thereafter. After sowing, wheat and alfalfa were harvested for 196 days and 80 days respectively to obtain mature plants. Roots were separated from leaves (air part) and then dried to use this last. Wheat was labeled with ^{13}C at 96% and characterized by a C/N ratio of 78.2, and alfalfa was labeled with ^{13}C at 89% and characterized by a C/N ratio of 7.5.

2. Soil, microcosms set up and sampling strategy

The soil used was a calcareous silty-clay soil from the experimental farm of INRA Epouisse (47.14°N, 5.06°E, Burgundy, France). Soil $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ was 6.7 and it contained 37.9 % clay (<2 μm), 32.5% silt (2-20 μm); 23.7% silt (20-50 μm); 3.8% sand (50-200 μm); 2.1% sand (200-2000 μm); CaCO_3 < 1 g.kg^{-1} ; 1.47% organic C and 0.15% total N, and C/N ratio was 11.1. It was collected from the surface layer (0-5cm) and sieved at 4 mm.

Microcosms were set up by placing 30 g of dry soil into 150-ml plasmas flasks hermetically sealed. Soil microcosms were supplemented with sterile water to reach 80% of the maximum water holding capacity. After a pre-incubation of one week at 20°C,

microcosms were either amended with ^{13}C -residues of wheat or alfalfa crop (5mg.g^{-1} of dry weight soil) which were grind finely, or not amended (control). Soil microcosms were incubated at 20°C in the dark for 120 days, with weekly aeration and verification of soil water content to ensure optimal biological conditions. At T0 (just after application of the treatments), T3, T7, T14, T28, T60 and T120 days of incubation, triplicate microcosms from each treatment (wheat, alfalfa and control microcosms) were sacrificed and soil was stored at -80°C in 50 ml Falcon tubes for biological analyses.

3. Total and ^{13}C -CO₂ measurements

The gaseous phases of microcosms were sampled at T3, T7, T10, T14, T21, T28, T44, T60, T75, T90, T105 and T120 days of incubation in 3ml Terumo evacuated blood collection tubes for measurement of the CO₂ concentration and in 37 ml airtight flasks for determination of carbon isotopic abundances. Samples were stored at room temperature before analysis. CO₂ concentration was determined on a MT1 Analytical Instrument micro GC equipped with a pora-PLOT Q capillary column and a Solid State Detector. Carbon isotopic enrichment was determined by gas chromatography isotope ratio mass spectrometry (GC-IRMS) using a Trace Gas interface coupled in continuous flow with a mass spectrometer VG Isochrom (Micromass, Manchester, England). For CO₂ isotopic, a pure bottle (CO₂ > 99.999%, N48, Air Liquide, France) was selected as an internal standard USGS-24 ($\delta^{13}\text{C} = -16.0 \pm 0.1\text{‰}$ vs. PDB). Gas samples were manually injected into the Trace Gas with an air gas syringe. Amounts of excess ^{13}C percentage in the samples of gas were calculated using the equation:

$$\text{Excess } ^{13}\text{C}\% = \text{atoms } ^{13}\text{C} \% \text{ sample} - \text{atoms } ^{13}\text{C} \% \text{ reference}$$

4. Extraction and purification of PLFA from soil

PLFA were obtained from fresh soil samples and prepared as described in Malosso et al. (2004), then dissolved in 50 μl of hexane added with nonadecanoate (19:0) as internal standard and analyzed by gas chromatography (SPBTM capillary column and a flame ionization detector (FID)). Chromatograms were analyzed by reference to the SupelcoTM 26 Components FAMES mixture (concentration) to obtain assignments of the straight-chain saturated fatty acids (FAs) 11:0, 12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 19:0, 20:0; the

straight-chain mono-unsaturated FAs, 16:1 ω 7c, 18:1 ω 9c, 18:1 ω 9t; the straight-chain double-unsaturated FA, 18:2 ω 6c, the cyclopropyl FAs, cy17:0 and cy19:0; the branched FAs, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0; and the hydroxyl FAs 10:0 2OH, 12:0 2OH, 12:0 3OH ; 14:0 2OH, 14:0 3OH, 16:0 2OH. The FID response was related to the molecular mass to obtain a quantitative estimation of FA expressed in nmol PLFA g⁻¹ of soil (Steer and Harris, 2000). FAs were considered as structural groups, with the strain-chain mono-unsaturated FAs indicative of Gram-negative bacteria, the branched-chained FAs indicative of Gram-negative bacteria and the straight-chained polyunsaturated FAs indicative of eukaryotes, including fungi (Zelles, 1999).

5. DNA extraction from soil

DNA was extracted from 3 x 1g of dry soil per microcosm following the DNA extraction procedure of Bernard et al. (2007). Briefly, each gram of soil was mixed with 4ml of extraction buffer (114 mM Tris pH 8, 114 mM EDTA pH 8, 400 mM NaCl and 2.28% SDS) in a 10-ml bead-beating tube. Samples were then shaken for 1 min at 1600 r.p.m in the presence of 2 g of 106 μ m diameter glass beads and eight beads of 2 mm diameter, further incubated for 15 min at 70°C and vortex every 5 min, then centrifuged at 7000g for 5 min at 4°C. Supernatants collected were incubated 10 min on ice with 1/10 volume of 3 M potassium acetate (pH 5.5) and centrifuged at 14000g for 5 min. After precipitation with one volume of ice-cold isopropanol, the nucleic acids were washed with 70% ethanol, dissolved in 100 μ l of RNase-free water and separated from humic substances by centrifugation through polyvinyl polypyrrolidone minicolumns (BIORAD, Marne la Coquette, France). The three filtrates resulting from the 3 x 1g nucleic acids extraction for each microcosm were pooled together. Total DNA concentrations in each sample were fluorometrically quantified with Quant-iT PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) following the manufacturer's instructions.

6. Isopycnic centrifugation and fractionation

An isotopic separation of extract DNA was carried out to obtain a heavy DNA fraction contained ¹³C-DNA and a light DNA fraction contained ¹²C-DNA (Bernard et al., 2007). Density gradient centrifugation was performed in 6ml polyallomer UltraCrimp tubes

(ThermoSCIENTIFIC, Courtaboeuf, France) in a TFT 70.38 fixed-angle rotor (Kontron, Zurich, Switzerland). DNA was spun in CsCl gradients with an average density of 1.7 g ml^{-1} (5.7g CsCl dissolved in 10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) and centrifuged at 40000 r.p.m for 72h at 20°C. Centrifuged gradients were fractionated from the top of the tubes and carefully pipetting. DNA concentrations of each fraction of gradient were fluorometrically quantified with Quant-iT PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) following the manufacturer's instructions. Heavy and light DNA fractions were purified using the GeneClean kit (QBiogene, Montreal, Quebec) following the manufacturer's protocol.

7. Bacterial-Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis fingerprinting communities

The bacterial ribosomal IGS of heavy and light DNA fractions were amplified by PCR using the primers S-D-Bact-1522-b-S-20 (small eubacterial ribosomic subunit; 5'-TGCGGCTGGATCCCCCTCCTT-3'), which was labelled at its 5' end with the IRD800 fluorochrome, and L-D-Bact-132-a-A-18 (large eubacterial ribosomic subunit; 5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3'), as described by Ranjard et al. (2003). Fifty nanograms of DNA were used as template in PCR. B-ARISA involved the use of a fluorescent-labeled primer for PCR which is the IRD 800 dye fluorochrome (MWG SA Biotech, Ebersberg, Deutschland) for the LiCor® DNA sequencer (ScienceTec, Les Ulis, France). For ARISA fingerprinting, PCR products were loaded on a 3.7% polyacrylamide gel (acrylamide-N, N-methylenebisacrylamide, 29: 1, BIORAD, Ivry sur Seine, France) and run under denaturing conditions for 14 h at 1500V / 80W on a LiCor® DNA sequencer (ScienceTec, Les Ulis, France). The software converted fluorescence data into electrophoregrams where peaks represented PCR fragments. The height of the peaks was calculated in conjunction with the median filter option and the Gaussian integration in 1D-scan, and represented the relative proportion of the fragments in the total products. Lengths (in base pairs) were calculated by using a size standard with bands ranging from 200 to 1659 bp. The standard was made by PCR amplifications of different fragment sizes of phage M13 mp18 (Promega, Charbonnières, France).

8. Pyrosequencing

To amplify a 16S rRNA gene fragment of the appropriate size and sequence variability for 454 pyrosequencing, the primers 495F (xxxxGTGCCAGCMGCNGCGG) and 773R (xxxxCTACCNGGGTATCTAAT) were used and xxxx was designed for the sample identification barcoding key recommended by the manufacturer (Beckman Coulter Genomics). 2 ng of DNA aliquots of each sample were used for a 50 µl PCR reaction under these conditions: 95°C for 3min, 30 cycles of 1 min at 95°C (denaturation), 55°C for 30 s (annealing) and 72°C for 30 s (extension), followed by 5 min at 72°C. For each sample, amplicons of five replicated PCRs were purified using a MinElute gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's protocol. On 300 ng per sample, adapter sequences were added by the manufacturer and pyrosequencing was realized on a Genome Sequencer Flx 454 (Beckman Coulter Genomics). The 16S rRNA fragments provided were mainly between 250 and 300bp.

9. Phylogenetic assignment, alignment and clustering of 16S rRNA gene fragments

On the about 70.000 sequences provided for each sample, only theses 5' were conserved for the phylogenetic assignment. Two automated analysis pipelines to investigate quality-checked 454 reads were used and were described in Stoeck et al. (2009). Briefly, the first pipeline was for taxonomic assignment of 16S rRNA gene fragment. The 16S rRNA gene fragments were phylogenetically assigned according to their best matches to sequences available in GeneBank. Various threshold of percentage of similarity were tested and after an examination of the relationships between threshold and qualities of taxonomic assignment, the 97% similarity threshold was chosen for assigning a given tag to a taxon. The second pipeline was dedicated to the clustering of tags at a given level of similarity and dereplication. According to Stoeck et al. (2009) and Christen (personal communication), the sequences were cluster when they have less three differences (k3) and the sequences remain only once (single singleton) after this clustering were remove of the results, because they were considered as a PCR or sequencing error.

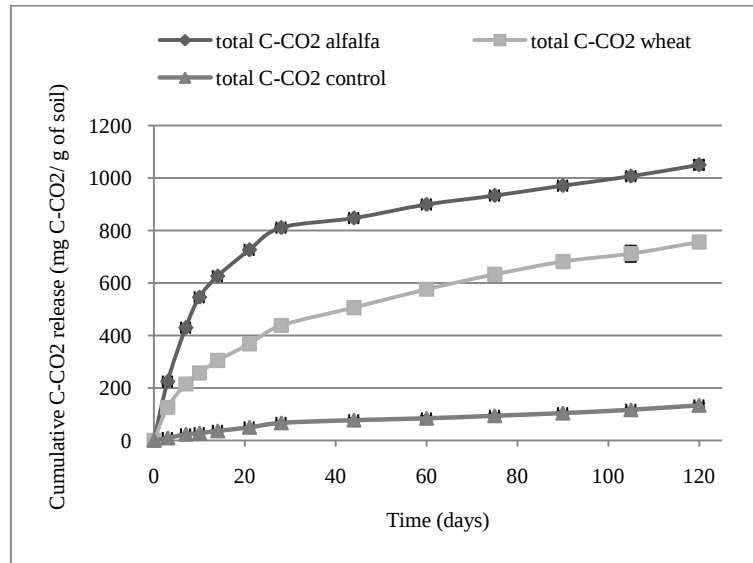
10. Statistical analysis

For gaseous and PLFA data, statistical treatments were conducted using two-ways ANOVA and differences between with the Fischer test ($P \leq 0.05$). Theses statistical calculations were carried out using *XLSTAT* software (Addinsoft, Paris, France).

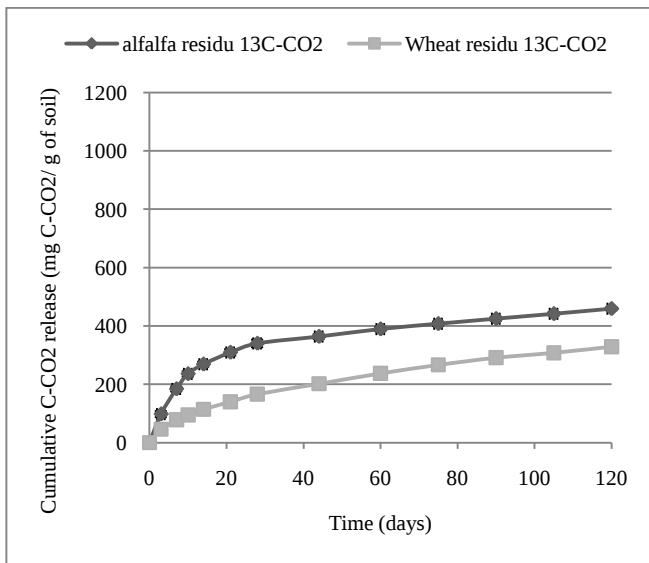
For B-ARISA results, data obtained from the 1D-Scan software were converted into a table summarizing the band presence (i.e peak) and intensity (i.e. height or area of peak) using the PrepRISA program (Ranjard et al., 2001) under R software. This program allowed us to choose the number of peaks (i.e. all detected populations versus the most dominant populations), the profile resolution (between 1 and 10bp) and the method of evaluating peak intensity (height or area). As described in a previous study, we used 100 peaks, 2bp resolution and Gaussian peak area for a robust analysis of bacterial communities (Ranjard et al., 2003).

Covariance matrix (bacterial communities as rows and bands as columns) were subjected to Principal Component Analysis (PCA), which provided an ordination of bacterial communities in a factorial map based on the scores of the first two principal components. The Monte Carlo test was performed with 1000 permutations to confirm the significance of the discrimination of the genetic structures of the bacterial communities revealed by the PCA. PCA and Monte Carlo test were performed using the ADE-4 package (Thioulouse et al., 1997; Chessel et al., 2004) under R software.

(a)



(b)



(c)

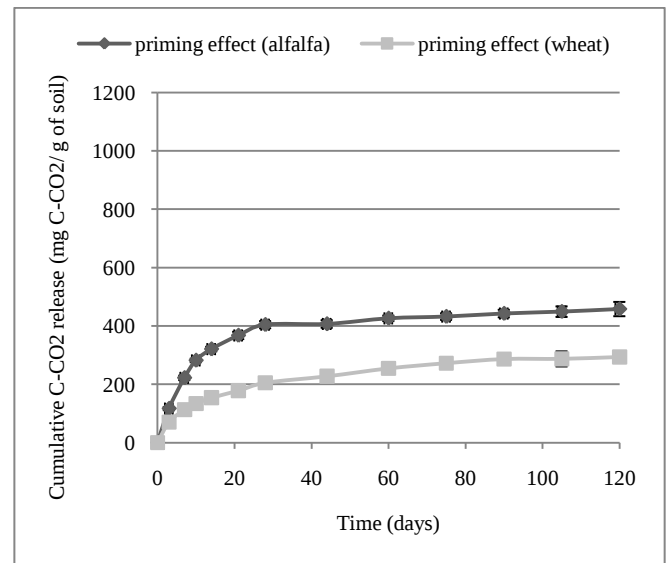


Figure IV.1: C-CO₂ accumulated during the 120 days of incubation (a) corresponding to total C-CO₂ accumulated in microcosms amended with alfalfa residues, wheat residues and in control microcosms; (b) corresponding to the cumulative mineralization of alfalfa and wheat residues (¹³C-CO₂); (c) corresponding to the cumulative Priming effect calculated in microcosms amended with alfalfa and wheat. Errors bars symbolize standard deviation calculated on triplicates.

III - Results

1. Soil- and residues-C mineralization

Soil respiration rate was rapidly increased by the addition of alfalfa and wheat residues compared to non amended control [Figure IV.1.a]. Patterns of respiration were similar in both amended treatments, characterized by an initial exponential increase during the first two weeks of incubation, followed by a slowdown of the mineralization rate [Figure IV.1.a]. Alfalfa induced the largest stimulation of total C-CO₂ release compared to wheat ($p < 0.01$). At the end of the incubation, 1.050 and 760 $\mu\text{g.g}^{-1}$ soil C-CO₂ were emitted for alfalfa and wheat respectively. Analysis of the carbon isotopic enrichment of total CO₂ fluxes allowed discriminating between CO₂ originating from the mineralization of the residues (labelled ¹³C-CO₂) and of native SOM (non labelled ¹²C-CO₂). Mineralization of alfalfa and wheat residues followed the same dynamics, consisting in an initial exponential phase during the first two weeks of incubation, followed by a slowdown of ¹³C-CO₂ release between T14 days and T28 days, and finally a weak mineralization until the end of the incubation [Figure IV.1.b]. Alfalfa residues decomposed significantly faster than wheat residues ($p < 0.01$) since we estimated from the amounts of ¹³C-CO₂ accumulated that about 21% and 9% of alfalfa and wheat residues respectively were mineralized at T28 days, and about 28% and 17% at T120 days. As observed for labelled ¹³C-CO₂, a significant stimulation of the release of non labelled ¹²C-CO₂ (data not shown) also occurred in both alfalfa and wheat treatments during the incubation compared to control. This pointed to a Priming Effect (PE) of native SOM, the degree of which appeared to be significantly related to the quality of the fresh organic matter supplied ($p < 0.01$) [Figure IV.1.c]. More precisely, comparison of the ¹²C-CO₂ (C-CO₂tot - ¹³C-CO₂) released from the amended treatments to the C-CO₂ evolved from control evidenced that a priming effect [Figure IV.1.c] occurred mainly during the first month of incubation. The increase in soil mineralization represented 139 $\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil and 338 $\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil 28 days after wheat and alfalfa addition, and 160 $\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil and 325 $\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil after 120 days of incubation, corresponding 220% and 343 %.

2. Microbial biomass

The influence of crop residue incorporation on soil microbial biomass was determined by analysing the changes in soil fatty acid (PLFA) content [Table IV.1]. Compared to the non

Table IV.1: Microbial C-biomass and contribution of fungal PLFA determined by analysis of the soil fatty acid (PLFA) content in control microcosms and microcosms amended with wheat and alfalfa residues at T3, T14, T28 and T120 days. n.d. for non determined.

Time of incubation	Control		Wheat		Alfalfa	
	Microbial biomass (nmol PLFA g ⁻¹ soil)	Contribution of fungal PLFA (%)	Microbial biomass (nmol PLFA g ⁻¹ soil)	Contribution of fungal PLFA (%)	Microbial biomass (nmol PLFA g ⁻¹ soil)	Contribution of fungal PLFA (%)
T3	5,4 ± 1,9	n.d.	5,03 ± 1,06	0,32	25,24 ± 7,9	6,7
T14	4,5 ± 3,7	n.d.	9,44 ± 4,07	n.d.	21,59 ± 1,5	2,3
T28	12,2 ± 1,9	n.d.	30,18 ± 4,89	0,43	31,38 ± 10,7	3,1
T120	6,6 ± 0,5	n.d.	4,77 ± 2,25	n.d.	4,3 ± 2,1	n.d.

amended control microcosms, the addition of crop residues led to a significant increase in microbial biomass regardless of the type of residue. However, the stimulation of microbial biomass occurred earlier and was higher for alfalfa compared to wheat. In the case of alfalfa, microbial biomass reached high values that remained stable from T3 to T120 whereas the addition of wheat residues induced a slow and progressive stimulation of microbial biomass that reached a maximum of 31 nmol PLFA.g⁻¹ soil only at T28 days. For alfalfa and wheat treatments, the stimulation of microbial biomass was transient since it was followed by a decrease to the level of the control at T120 days.

Analysis of the contribution of fungal PLFA to total PLFA measurements indicated that the microbial biomass was highly dominated by bacteria during the incubation in all the 3 treatments, with the 18:2ω6,9 FA indicative of fungi, representing less than 6.7 % of the identified PLFA all the incubation long [Table IV.1]. However, results showed that the contribution of the fungal biomass was significantly increased during the first steps of decomposition in the alfalfa amended microcosms compared to the control and wheat amended treatments, with a maximum of 6.7 % observed at T3.

3. Genetic Structure of bacterial communities

Bacterial-ARISA fingerprinting was performed on heavy and light DNA fractions to characterize the dynamics of the populations respectively involved and not involved in the decomposition of ¹³C-labelled residues. Principal Component Analysis (PCA) of B-ARISA profiles showed that both wheat and alfalfa residues input induced the stimulation of particular active bacterial communities since for each sampling date, the corresponding heavy and light fractions were significantly discriminated on the factorial maps (confirmed by Monte Carlo test, 1000 permutations) [Figure IV.2.a and b]. Regarding more precisely the genetic structure of the bacterial communities considered not involved in the degradation of residues (light fraction), no dynamics was observed in the wheat treatment with all the sampling dates grouping on the factorial map [Figure IV.2.a]. Contrastingly, a significant dynamics was observed in the alfalfa treatment, mainly represented by the discrimination between an early (T3, T7, T14) and a late (T28, T60, T120) phase which occurred both on axis 1 and 2 which explained 25% and 19% of variability respectively (confirmed by Monte Carlo test) [Figure IV.2.b].

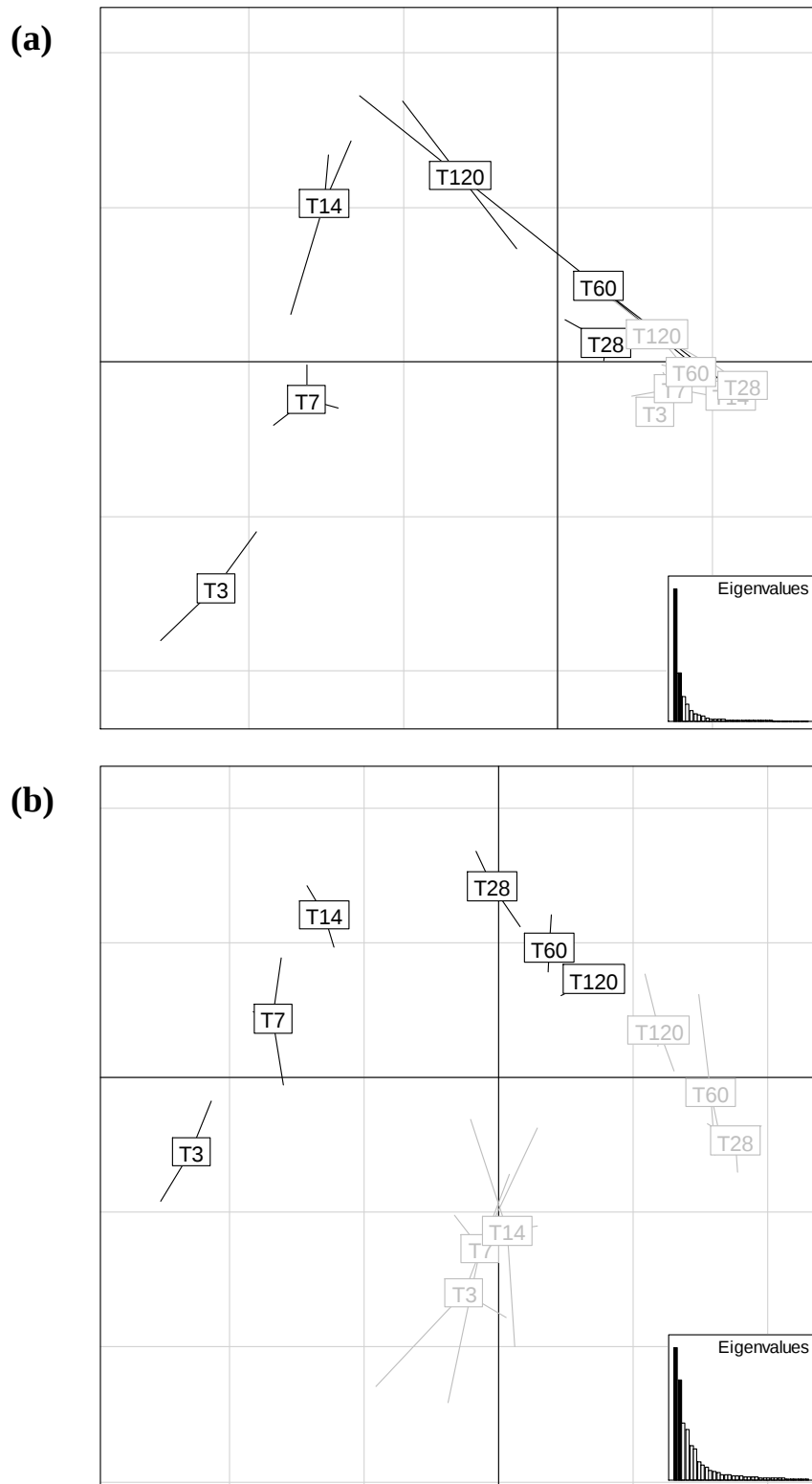


Figure IV.2: Principal Component Analysis (PC1xPC2) plots generated from B-ARISA profiles obtained from (a) DNA extract of microcosms amended with wheat residues, and (b) DNA extract of microcosms amended with alfalfa residues. The black labels represent heavy fraction, the grey labels represent light fraction. Numbers represent days of incubation.

Considering the genetic structure of the bacterial communities actively involved in the degradation of the crop residues (FOM degrading communities) (heavy fraction), a similar pattern of community dynamics was observed for both residues [Figure IV.3], characterized by a highly dynamic phase between T3, T7 and T14 followed by a slowdown of communities modifications from T28 to T120. Comparison of active bacterial communities between wheat and alfalfa treatments evidenced that different communities were stimulated depending on the biochemical quality of the residue added since wheat and alfalfa were always discriminated on the factorial map whatever the date considered. In addition the quality of the residue also influenced greatly the amplitude of the modifications of the genetic structure of the FOM degrading bacterial communities during decomposition, with wheat > alfalfa.

4. Taxonomic composition of bacterial communities

The influence of the biochemical composition of the crop residues on the dynamics of the bacterial populations during decomposition was assessed by elaborating thirteen 16S rRNA gene soil tag libraries using pyrosequencing technology from light DNA light DNA fraction of control at T3, and from both light and heavy fractions extracted from wheat and alfalfa amended microcosms at T3, T14 and T60 days, respectively. A total of 587.348 sequences have been obtained (average length 250bp), representing an average size of 50 000 sequences for each tag library.

Shannon diversity (H) indices were calculated for each tag library [Table IV.2]. Results suggested that the bacterial communities were more diversified in the wheat treatment compared to the alfalfa treatment since H values observed at each date were always higher for wheat than for alfalfa whatever the fraction considered. Furthermore, whatever the date, bacterial diversity recorded from the heavy fraction was always lower compared to the corresponding light fraction, indicating that the FOM degrading bacterial communities were less diversified than the corresponding SOM degrading communities. This discrepancy between the heavy and light fractions was particularly important at T3 for both Wheat ($H=5$ vs $H=6.01$) and Alfalfa ($H=4.55$ vs $H=5.64$), indicating a strong decrease of the diversity of bacterial communities degrading the crop residues during the first steps of decomposition. This decrease was mainly due to a strong decrease of the richness in the heavy fraction (2012 vs. 1179 OTU detected in the light and heavy fractions of the wheat treatment; and 1840 vs. 909 OTU detected in the light and heavy fractions of the alfalfa treatment at T3 days of

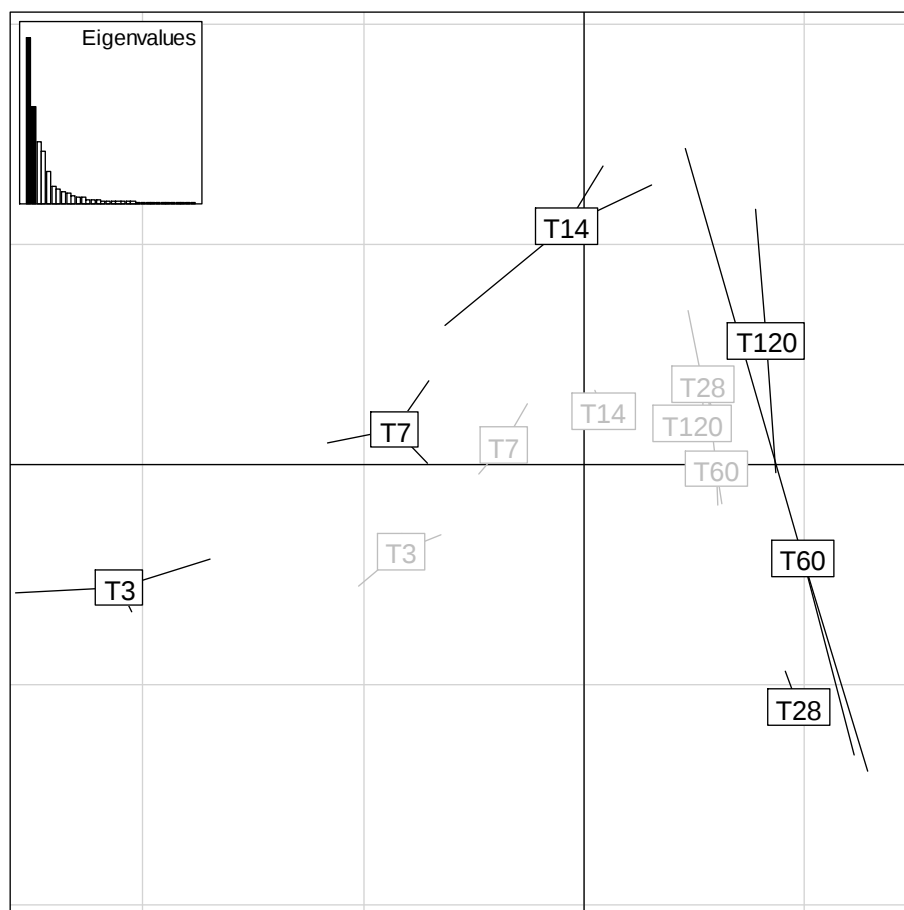


Figure IV.3: Principal Component Analysis (PC1xPC2) plots generated from B-ARISA profiles obtained from the heavy fraction of wheat and alfalfa amended microcosms. The black labels represent the wheat treatment and the grey labels represent the alfalfa treatment. Numbers represent days of incubation.

incubation), suggesting that the FOM-degrading communities were dominated by a few OTU during the first steps of the decomposition of the crop residues. For both residues, an increase in diversity occurred during the degradation in the two fractions, with a major increase observed for the heavy fraction. The increase of diversity during the decomposition of the residues was also supported by rarefaction analysis [Figure IV.S1, supplemental data]. Interestingly, the rarefaction curves were close to raise the plateau, indicating that the size of the 16SrRNA libraries was sufficient to ensure a good coverage rate of the diversity for all the samples analyzed.

Examination of the taxonomic affiliation of the bacterial sequences in the 13 clone libraries revealed a broad diversity, with 266 different genera detected. Most of those genera (87% of all the identified sequences) were distributed in nine major bacterial phyla: *Acidobacteria* (22.9% of all sequences), *Actinobacteria* (2.8% of all sequences), *Bacteroidetes* (8.2% of all sequences), *Chloroflexi* (1.4% of all sequences), *Firmicutes* (8.7% of all sequences), *Gemmatimonadetes* (6% of all sequences), *Planctomycetes* (3.5% of all sequences), *Proteobacteria* (27.5% of all sequences), *Verrucomicrobia* (5.9% of all sequences) [Table IV.3].

At each date and for each residue, the phylogenetic fingerprints of the communities in the light fractions were close to the control and were distinct from the communities in the corresponding heavy fractions [Figure IV.4.a]. This confirmed B-ARISA data and evidenced particular genetic characteristics of the bacterial communities actively decomposing crop residues. Difference between the heavy and the light fractions was the main parameter discriminating all the libraries on the first axis of the factorial map. Such discrimination on the first axis was mainly attributed to an increase of the relative proportion of *Proteobacteria* in the heavy fractions and a more important proportion of *Acidobacteria*, and to a lesser extends of *Verrumicrobia*, in the light fractions as well as in the control [Figure IV.4.b]. Interestingly, the discrimination between dates, residues and fractions observed at the phylum level was the same at finer phylogenetic levels (class, order, family, genus, data not shown), indicating that the phylogenetic fingerprint of the communities was impressed at this coarse taxonomic level (Youssef and Elshahed, 2009).

Considering the heavy fractions, the T3 libraries were highly discriminated between the two residues, mainly explained by a high abundance of *Firmicutes* for wheat (46% of all sequences retrieved in the heavy fraction of the wheat treatment at T3 days of incubation) and

Table IV.2: Shannon diversity (H) indices calculated for bacterial communities of control, and for bacterial communities in the heavy and the light fractions of wheat and alfalfa treatments at T3, T14 and T60 days. n.m. for no measure.

	Control	Wheat		Alfalfa	
		Light fraction	Heavy fraction	Light fraction	Heavy fraction
T3	5,62	6,01	5	5,64	4,55
T14	n.m	6,53	6,17	6,19	5,93
T60	n.m	6,6	6,29	6,54	6,38

of *Proteobacteria* for alfalfa (65% of all the sequences retrieved in the heavy fraction of the wheat treatment at T3 days of incubation). This highlighted that the addition of fresh crop residues strongly stimulated particular bacterial groups actively involved in their degradation and that the identity of these groups was highly dependent on the biochemical quality of the residues during the first steps of the degradation process. At T14 and T60, the composition of the active communities was closer between wheat and alfalfa, dominated by bacteria belonging to the *Proteobacteria* phylum (mainly the α -, β -, and γ -subgroups).

Phylogenetic fingerprints obtained from the light fractions of the wheat treatment were close to the control and did not show a strong dynamics between the three sampling dates [Figure IV.4.a], suggesting that no major population dynamics occurred in this fraction during the incubation, in agreement with B-ARISA data. Contrastingly, we observed an important dynamics of the light fraction of the alfalfa treatment suggesting important modifications of the native SOM-degrading communities during the incubation. At T3 days of incubation, most of the discrimination was explained by a more important proportion of sequences affiliated to the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* groups compared to the other sampling dates [Figure IV.4.b; Table IV.3].

The *Bacteroidetes* phylum was stimulated by the addition of crop residues, as evidenced by comparing the amended microcosms with the non amended control microcosms. However, they were always more represented in the light fractions compared to the heavy fractions [Table IV.3]. A stimulation of the *Firmicutes* phylum following the addition of crop residues was also observed in the light and in the heavy fractions for both amended treatments. Excepted for the heavy fraction of the wheat treatment at T3, this stimulation was globally more important for the alfalfa treatment at T3 and T14, with an average of 15% of all the sequences detected. At T60, the proportion of the *Firmicutes* group decreased strongly in the alfalfa treatment (2% of all sequences in the light and heavy fractions, respectively) whereas it remained stable in the wheat treatment (6% of all sequences in the light and heavy fractions, respectively).

Table IV.3: Taxonomic affiliation at the phylum level of the bacterial sequences determined for the control at T3, and for both light and heavy fractions extracted from wheat and alfalfa amended microcosms at T3, T14 and T60 days, respectively. Only the nine major bacterial phyla are represented.

			Acidobacteria	Actinobacteria	Bacteroidetes	Chloroflexi	Firmicutes	Gemmatimonadetes	Planctomycetes	Proteobacteria	Verrucomicrobia
Control	T3	light fraction	37,8%	1,2%	4,2%	0,6%	0,0%	4,9%	4,4%	14,8%	14,7%
Wheat	T3	heavy fraction	15,2%	2,8%	1,1%	0,2%	44,3%	3,1%	1,7%	23,3%	3,0%
		light fraction	38,5%	2,9%	1,6%	0,4%	10,2%	5,7%	5,9%	15,6%	7,0%
	T14	heavy fraction	13,4%	3,1%	3,3%	2,2%	9,8%	6,9%	1,6%	48,2%	2,8%
		light fraction	28,6%	2,9%	6,2%	0,9%	4,4%	7,7%	4,0%	21,5%	8,1%
	T60	heavy fraction	15,6%	2,6%	6,2%	2,1%	5,0%	10,1%	1,5%	41,7%	4,5%
		light fraction	21,6%	3,4%	12,2%	1,1%	4,9%	9,4%	3,4%	23,7%	6,4%
Alfalfa	T3	heavy fraction	1,3%	8,2%	5,4%	0,0%	17,3%	1,2%	0,5%	63,6%	0,7%
		light fraction	13,8%	2,3%	19,0%	0,3%	18,1%	7,4%	3,2%	24,6%	3,5%
	T14	heavy fraction	18,5%	1,4%	3,2%	4,8%	10,4%	3,3%	5,3%	34,0%	5,3%
		light fraction	37,5%	1,3%	7,2%	0,7%	12,1%	2,5%	5,0%	7,8%	6,7%
	T60	heavy fraction	15,1%	2,6%	7,7%	2,9%	1,7%	6,2%	3,1%	44,7%	3,0%
		light fraction	21,2%	3,0%	17,4%	1,4%	2,1%	5,5%	3,4%	23,8%	6,5%

IV - Discussion

Addition of FOM in soil may represent a suitable practice to maintain the stocks of soil organic carbon and consequently to preserve the associated ecosystem services. However, improved knowledge about the processes involved in the degradation of FOM and in the impact of FOM addition on SOM degradation (PE) is required to better manage organic inputs. Here, we performed a microcosm experiment involving the use of ^{13}C labelled wheat and alfalfa residues to identify the microbial populations/groups involved respectively in the decomposition of FOM and SOM. We hypothesized that the dynamics of the structure and composition of these two functional groups may be dependent on the quality of the FOM added (wheat and alfalfa residues) and that the differences of communities stimulated between wheat and alfalfa may explain for the differences of crop residues and SOM mineralization observed between the two amended treatments.

1. Decomposition of plant residues

The decomposition of crop residues occurred during the 120 days of incubation. However, most of the degradation was observed during the first two weeks of the incubation. The patterns of mineralization observed in our study were in agreement with other authors (Cayuela et al., 2009, Xu et al., 2006) who showed similar dynamics after the incorporation of different plant residues into the soil. High and transient mineralization rates observed during the first weeks after the incorporation of the crop residues into the soil may be explained by the release and decomposition of easily degradable compounds during the first steps of the decomposition process, followed by the establishment of limiting conditions due to nutrient depletion (Cayuela et al., 2009, Nicolardot et al., 2007).

As estimated from the amounts of $^{13}\text{C}\text{-CO}_2$ released, the quantity of residue decomposed was different between wheat and alfalfa, with alfalfa decomposing faster than wheat (28% of incorporated alfalfa vs. 17% of incorporated wheat decomposed at T120). This may be explained by difference in the C/N ratio between alfalfa (C/N: 7.5) and wheat (C/N: 78.2), as well as in the content of easily degradable carbon compounds between the two residues, hence conferring wheat residues a lower degradability compared to alfalfa residues (Xu et al., 2006; Nicolardot et al., 2001; Henriksen and Breland, 1999). This is supported by PLFA data indicating a significant increase of microbial biomass in the alfalfa treatment

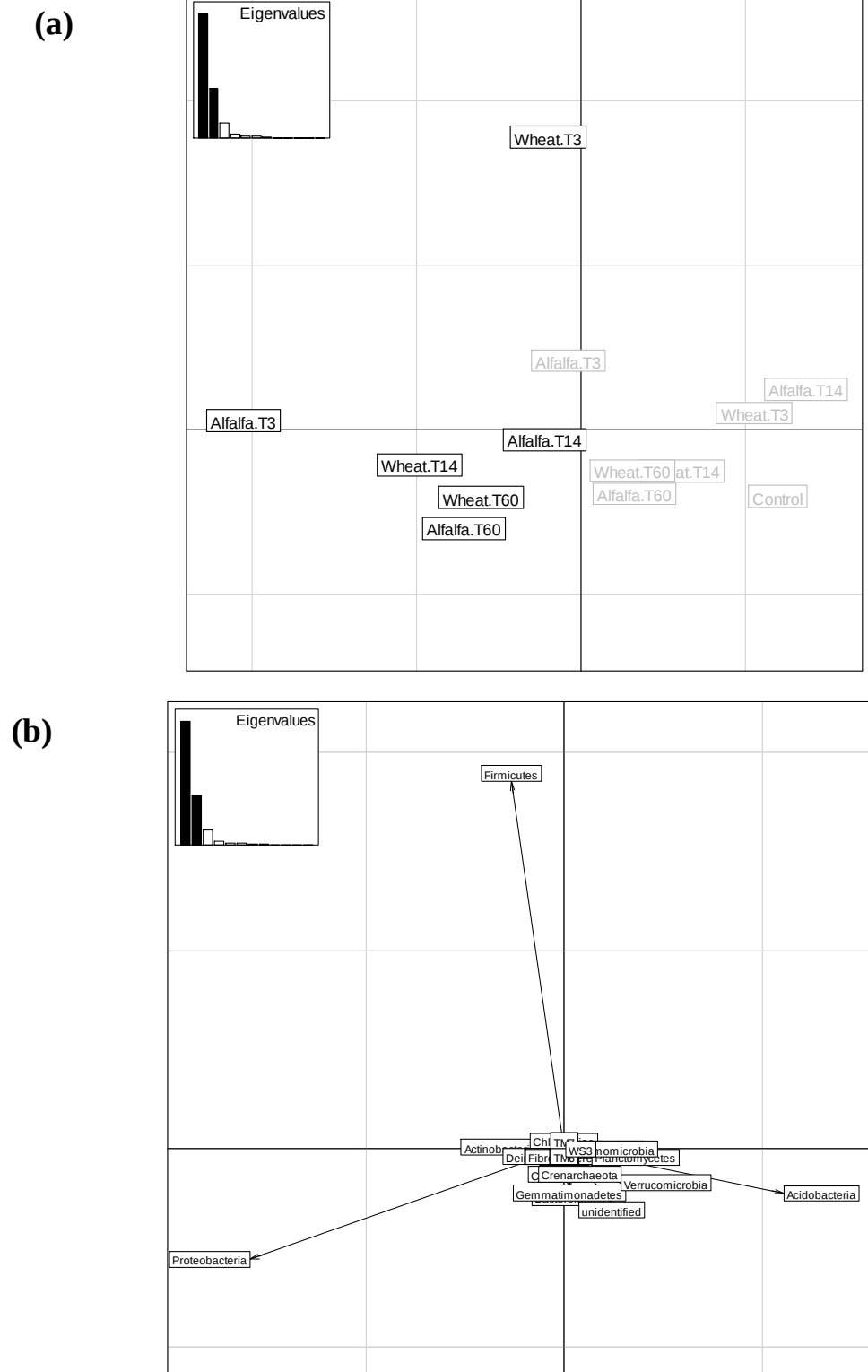


Figure IV.4: Principal Component Analysis (PC1xPC2) plots generated from (a) sequences obtained from light DNA fraction of control at T3, and for both light (grey labels) and heavy (black labels) fractions extracted from wheat and alfalfa amended microcosms at T3, T14 and T60 days, respectively; (b) from phylum illustrative of the repartition of taxonomic diversity observed in (a). In (a) the black labels represent the ^{13}C fraction and the grey labels represent the ^{12}C fraction.

compared to wheat and control treatments. Alternatively to chemical composition, wheat residues decomposition may also have been limited by a sub-optimal N availability since no N has been added to the soil in our study (Henriksen and Breland, 1999b).

An increase of the decomposition of the native SOM was observed in the wheat and alfalfa amended microcosms compared to the control, indicating that a PE occurred consecutively to crop residues addition into the soil (Fontaine et al., 2003). This finding was in agreement with a growing number of studies that evidenced an increase of the rate of soil C mineralization and the total amount of C mineralized following the addition of plant residues into the soil (Bernard et al., 2007; Kuzyakov, 2010; Waldrop and Firestone, 2004; Bell et al., 2003; Nottingham et al., 2009). PE was particularly important during the first two weeks of the incubation. It persisted over 28 days in the alfalfa treatment and 120 days in the wheat treatment. This discrepancy may be explained by the higher decomposition kinetics of alfalfa residues compared to wheat residues. We measured a 220% and 343 % increase in soil C lost from SOM compared to the control following respectively wheat and alfalfa incorporation into the soil. These results indicated that SOM mineralization can be greatly stimulated by plant residues addition and that intensity and duration of PE depend from the composition of the substrate (Kuzyakov, 2010, Nottingham et al., 2009). As evidenced by PLFA measurements, microbial biomass was highly dominated by bacteria in all the 3 treatments, maybe because the soil originated from a cropped field that was regularly submitted to tillage. However, a significant increase of the relative contribution of fungal PLFA to total PLFA occurred during the first week following alfalfa addition. Such increase may explain in part the higher PE observed in the alfalfa microcosm during the first weeks of incubation compared to the wheat treatment, in agreement with Bell et al. (Bell et al., 2003) that observed a positive correlation between the intensity of the PE and the increase of the fungal/bacterial ratio following the addition of crop residues into the soil.

2. Dynamics of the genetic structure of bacterial communities assimilating C derived from indigenous SOM or labeled crop residues

The input of crop residues induced different dynamics between the communities involved in the decomposition of the SOM and the FOM, as shown by the different patterns of communities' dynamics observed between the light and the heavy DNA fractions for the wheat and the alfalfa treatment, respectively. This confirmed the specificity and sensitivity of

the DNA-SIP approach used to target the microbial populations actively involved in the degradation of labeled C-compounds in soil (Chen and Murrell, 2010; Bernard et al., 2007; Neufeld et al., 2006).

Addition of wheat and alfalfa residues into the soil induced a strong dynamics of the FOM-degrading communities (heavy fraction). Such dynamics suggested that successions of bacterial populations occurred during the degradation of both residues in soil, in agreement with other authors that evidenced similar successions during the decomposition of various plant residues in soil (Bastian et al., 2009, Bernard et al., 2007). These successions may be explained by the increase of the recalcitrance of the crop residues during decomposition (due to the fast degradation of soluble easy degradable C compounds during the initial stages of residues decomposition) together with the lower species richness of microorganisms with the enzymatic capacities for macromolecular C (*e.g.* lignin) degradation compared to microorganisms with the enzymatic capacities for simple C (*e.g.* sugars and amino acids) degradation (Schimel and Gulledge, 1998). This is supported by greater amplitude of the modifications of the genetic structure of the bacterial communities observed during wheat decomposition compared to alfalfa which may result from the higher recalcitrance of wheat compared to alfalfa, hence requiring succession of more specialized populations for their degradation. However, most of the communities dynamics occurred during the first month of the incubation (T0 to T28 days) whatever the residue, suggesting that the dynamics of the FOM-degrading communities may be mainly attributed to copiotrophic fast growing populations (*i.e.* r-strategists) that take advantage of the easy degradable C-compounds that are decomposed at the beginning of the degradation process (Nottingham et al., 2009; Rasmussen et al., 2007; Bernard et al., 2007; Fierer et al., 2006). This is supported by the peaks of decomposition observed for the two residues during the first weeks of the incubation.

Wheat residues did not induce any significant dynamics of the structure of the communities not involved in residues decomposition (light fraction). This suggested no significant influence of wheat addition on native SOM-assimilating communities, which was not in agreement with Bernard et al. (Bernard et al., 2007) who observed a dynamics of the light DNA fraction extracted from microcosms amended with wheat residues 7 days after incorporation. However, this discrepancy may be explained by a difference of maturity between the wheat residues used by Bernard et al. (Bernard et al., 2007), which were green residues originating from young wheat plants with low C/N ratio and high easy degradable C-compounds content, and the wheat residues used in our study that were mature residues

harboring a high C/N ratio and a low easy degradable C-compounds content. This is consistent with the stimulation of SOM-degrading communities observed in the alfalfa amended microcosms, characterized by a two steps pattern represented by an early (T0 to T28) and a late (T60 to T120) phase following residues decomposition. As a consequence, we propose that the discrepancy observed between wheat and alfalfa treatments may be explained by the difference of degradability between the two residues. From the one hand, the weak degradability of wheat residues may have limited the growth of the FOM-degrading communities, due particularly to N-limiting conditions and small content of soluble C (Knapp et al., 1983), and may have consequently lowered the production of extracellular enzymes by those communities (Schimel and Weintraub, 2003). As a consequence, extracellular enzymatic pool produced by FOM-decomposers may have not been enough to induce also a decomposition of SOM sufficient to stimulate a significant dynamics of SOM-decomposers. On the other hand, the good degradability of alfalfa residues may have offered the FOM-degrading communities optimal conditions to grow. This is supported by the high degradation rate as well as the increase of microbial biomass measured after alfalfa residues addition into the soil compared to the wheat treatment. Highly stimulated FOM-decomposers may have synthesized an abundant pool of extracellular enzymes to decompose FOM, which may have significantly attacked also the SOM pool with consequences in terms of dynamics of the structure of SOM-degrading communities (Fontaine et al., 2003).

3. Diversity and taxonomic composition of the bacterial communities assimilating C derived from native SOM or labeled crop residues

Evaluation of the soil bacterial diversity through the calculation of diversity index is often problematic because of the small size of the 16S rRNA libraries generally performed in most of the current studies in microbial ecology. This is due in part to technical limitations since the PCR-cloning-sequencing strategy currently used is expensive and time-consuming. To overcome this limitation, we used the newly developed massif pyrosequencing technology that allows obtaining large size 16S rRNA libraries suitable for microbial diversity analyses (Youssef and Elshahed, 2009). By this way, we explored the taxonomic composition of FOM- and native SOM-decomposing bacterial communities during the degradation of wheat and alfalfa residues in soil. Results obtained evidenced significant changes in OTU abundance during the decomposition of crop residues (particularly in the heavy fractions of wheat and

alfalfa amended microcosms), which was consistent with a progressive and orderly pattern of community development referring to the concept of species succession that is commonly employed to explain community dynamics in aboveground terrestrial plant communities (McIntosh and Odum, 1969).

The phylogenetic fingerprint of the communities in the control was close to the light fractions of the amended microcosms compared to the heavy fractions that were strongly different, in agreement with B-ARISA data exposed above. Discrimination of the heavy fractions from the control and the light fractions were mainly attributed to an increase of the relative proportion of *Proteobacteria* (α -, β -, γ - subgroups) in the heavy fractions and a more important proportion of *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia*, in the control and the light fractions. Bacteria belonging to the *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia* groups are common soil bacterial communities (Youssef and Elshahed, 2009; Barns et al., 1999). However, they are difficult to isolate using traditional culturing techniques (Jones *et al.*, 2009). This suggests that these organisms may be oligotrophs (k-strategists) that utilize complex carbon substrates that are more likely to be present in the native SOM, which may explain the important relative contribution of these groups in the control and the light fractions. This is in agreement with Nemergut et al. (2007) who detected more *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia* in older soils by analyzing microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil. In other respect, this is in agreement with Fierer et al. (2007a) who observed a negative correlation between *Acidobacteria* abundance and C mineralization rate in soil; and also with Cleveland et al. (2007) who observed a decrease of the relative abundance of *Acidobacteria* following the addition of dissolved organic matter into the soil. On the other hand, the important contribution of sequences affiliated to the *Proteobacteria* retrieved in the heavy fractions suggested that these organisms may be copiotrophs (r-strategists) that utilize simple carbon substrates that are more likely to be present in the added FOM. This is in agreement with other authors reporting an increase of this group in rhizospheric soils (Fierer et al., 2007a) as well as following addition of plant residues into the soil (Pascault et al., in press; Bernard et al., 2007; Aneja et al., 2006).

The Shannon index values calculated for each clone library indicated that the FOM-degrading communities (heavy fractions) were less diversified than the native SOM-degrading communities (light fractions) and that the difference between the two fractions was particularly important during the first week of the incubation. This result was in agreement with Bernard et al. (2007) who observed a similar lower diversity in the heavy fraction of

microcosms amended with labeled ^{13}C wheat residues compared to the light fraction. In our study, such decrease of diversity was explained by a significant decrease of the richness together with an increase of the dominance of a few bacterial phyla in the heavy fractions compared to the light fractions of the amended microcosms. This was in agreement with the higher proportion of *Proteobacteria* retrieved in the heavy fractions, suggesting that the FOM-degrading communities are dominated by an opportunistic subset of the soil microbial community developing quickly on the easy degradable C-compounds of the FOM. In other respect, this was in agreement with B-ARISA data that suggested fast successions of FOM-degrading bacterial populations during the first steps of the decomposition of wheat and alfalfa residues.

The dominant groups of FOM-degrading bacteria stimulated at the beginning of the degradation process depended on the crop residue added, suggesting a strong influence of the quality of the residues on the FOM-degrading communities during the first steps of the degradation process, in agreement with B-ARISA results. More precisely, at T3 days of incubation, sequences affiliated to the *Firmicutes* phylum represented almost 50% of all the sequences detected in the wheat treatment whereas the *Proteobacteria* phylum was highly dominant in the alfalfa treatment with 65% of all the sequences detected. The stimulation of *Firmicutes* in the heavy fraction of the wheat treatment was transient since the proportion of this group decreased greatly at T14 and T60, replaced by the *Proteobacteria* that became highly dominant. *Firmicutes* and *Proteobacteria* are both described as fast growing copiotrophs that are stimulated in C-rich environments (Cleveland et al., 2007; Fierer et al., 2006), which is consistent with their stimulation in the active fraction of the microbial community following C-substrate addition. However, the difference observed between wheat and alfalfa treatments at T3 days of incubation suggested a difference of ecological optimum between these two groups depending on the nature of the C-substrate available. Based on the difference of biochemical composition between wheat and alfalfa, it can be hypothesized that the high stimulation of *Firmicutes* may reflect a stronger competitiveness of this bacterial group for the decomposition of more recalcitrant FOM like wheat residues compared to *Proteobacteria*. Activity of *Firmicutes* during the first steps of the decomposition process may have modified wheat residues both physically (increase of the surface contact between the soil and the residues) and biochemically (simplification of complex C-compounds), creating conditions favorable to the growth of *Proteobacteria* which may be more competitive for the decomposition of more easy degradable C-compounds. This hypothesis is consistent

with the stimulation of the *Firmicutes* also observed in the SOM-degrading communities, as well as the highest stimulation of *Proteobacteria* measured in the heavy fractions for the alfalfa treatment compared to the wheat treatment. In other respect, it is consistent with the lack of response of the *Firmicute* phylum to the addition of sucrose into the soil (Fierer et al., 2007a), and also with the stimulation of the β - and γ - subgroups of *Proteobacteria* observed following inputs of low molecular weight carbon to soil (Eilers et al., 2010).

4. Relationship between the dynamics of the microbial communities and the priming effect

The priming effect has been described 60 years ago by Bingemann et al. (1953). However, even if hypothesized (Fontaine et al., 2003), the involvement of the microbial diversity in this process is still poorly understood. Here, we observed a strong difference of the intensity of the PE between the wheat and the alfalfa treatments, in agreement with other authors that highlighted the influence of the composition of the FOM on the induced PE (Nottingham et al., 2009, Waldrop and Firestone, 2004). In the same way, we observed important differences of the dynamics of the FOM- and SOM-degrading bacterial communities between the wheat and alfalfa treatments, which may explain the higher PE observed in the alfalfa treatment compared to the wheat treatment.

B-ARISA results highlighted that the influence of crop residues inputs on the structure of the FOM- and the SOM-degrading bacterial communities depended on the biochemical characteristics of the residues. From the one hand, both wheat and alfalfa residues induced a rapid dynamics of the structure of the FOM-degrading communities, suggesting the stimulation and rapid successional of copiotrophic populations at the beginning of the degradation process. This was in agreement with the pyrosequencing data that evidenced a strong dominance of copiotrophic bacterial groups in the heavy fractions of the two amended treatments at T3days of incubation, with the *Firmicutes* phylum dominating the wheat degrading communities and the *Proteobacteria* phylum dominating the alfalfa degrading communities. From the other hand, a stimulation of the structure of the native SOM-degrading communities was observed only in the alfalfa treatment. This discrepancy in the response of the light fraction between the alfalfa and the wheat treatments may be explained by a higher stimulation of copiotrophic populations by the easy degradable alfalfa residues compared to the more recalcitrant wheat residues (*cf.* PLFA results), together with the difference of

diversity of the FOM-degrading communities stimulated between the two residues (cf. pyrosequencing data at T3 days of incubation). Consequently, the pool of extracellular enzymes synthesized by the FOM-degrading communities to decompose crop residues may have been major in the alfalfa treatment compared to the wheat treatment (Schimel and Weintraub, 2003). As a consequence, it may have also significantly helped the decomposition of the native-SOM, which may explain the dynamics of the light fraction and the higher PE observed in the alfalfa treatment (Bernard et al., 2007; Fontaine et al., 2003, Fontaine and Barot, 2005). In our study, the implementation of this mechanism of PE induction in the alfalfa treatment, previously described by Fontaine et al. (2003) as “mechanism 1”, is consistent with the stimulation of the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla observed in the light fraction of the alfalfa treatment during the first steps of the degradation process. These copiotrophic phyla may have been stimulated by the simplification of native-SOM by the extracellular enzymatic pool of the FOM-degrading communities and may consequently be directly involved in the PE. Bernard et al. (2007) also observed this mechanism following green wheat residues input in soil, suggesting that it may be particularly important following the inputs of easy degradable plant residues. Interestingly, our results suggest that not only oligotrophic populations/groups may be responsible for the PE (Fontaine et al., 2003; Bernard et al., 2007), but that “specialized” copiotrophic populations may also be significantly involved (*i.e.* fast-growing bacterial populations able to decompose complex C-compounds).

Pyrosequencing data showed that copiotrophic groups dominated the FOM-degrading communities in the two amended treatments. However, they also evidenced that a significant number of sequences affiliated to oligotrophic bacterial groups such as the *Acidobacteria*, the *Verrucomicrobia*, and the *Gemmatimonadetes* phyla (Nemergut et al., 2007) were retrieved in the heavy fractions [Table IV.3]. This labeling of oligotrophic populations suggested that they may be competitive and consequently stimulated by the polymerized FOM compounds. A direct consequence may be the increase of the decomposition of the native-SOM by a co-metabolism process (Fontaine et al., 2003; Fontaine and Barrot, 2005). This mechanism of PE induction, described by Fontaine et al. (2003) as “mechanism 2”, may have been activated during all the incubation in the wheat treatment since the three oligotrophic groups mentioned above represented together 22%, 24%, and 33% of all the sequences detected in the heavy fraction at T3, T14, and T60 days of incubation [Table IV.3]. This may be explained by the recalcitrance of the wheat residues. Contrastingly, this mechanism may have occurred later in the alfalfa treatment since the three groups represented together only 3% of all the sequences

at T3 before increasing to 31% and 27% of all the sequences at T14 and T60 days. This may be explained by the fact that alfalfa residues were still easy degradable at T3, and subsequently more recalcitrant at T14 and T60 because of the decomposition of the most easy degradable compounds during the first two weeks of the incubation.

V - Conclusion

Our results demonstrate that the dynamics of the structure and the composition of the FOM- and the SOM-degrading communities depends on the quality of the FOM added (wheat vs. alfalfa residues). They also suggest that the difference of reactivity of the diversity of these communities between the wheat and the alfalfa treatment may explain the differences of crop residues degradation and of PE observed between the two amended treatments. More precisely, they suggest that the amount of extracellular enzymes produced by the FOM-degrading communities, which depends on the degradability of the residues that determine the diversity, density and activity of copiotrophic populations, may have been the major determinant of the intensity of the PE following the addition of the easy degradable alfalfa residues. Contrastingly, co-metabolism of polymerized FOM compounds and native-SOM by oligotrophic bacterial groups (mechanism 2) may occur mainly following the addition of recalcitrant plant residues such as wheat.

Acknowledgments

This study was financially supported by the Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) and the Burgundy region.

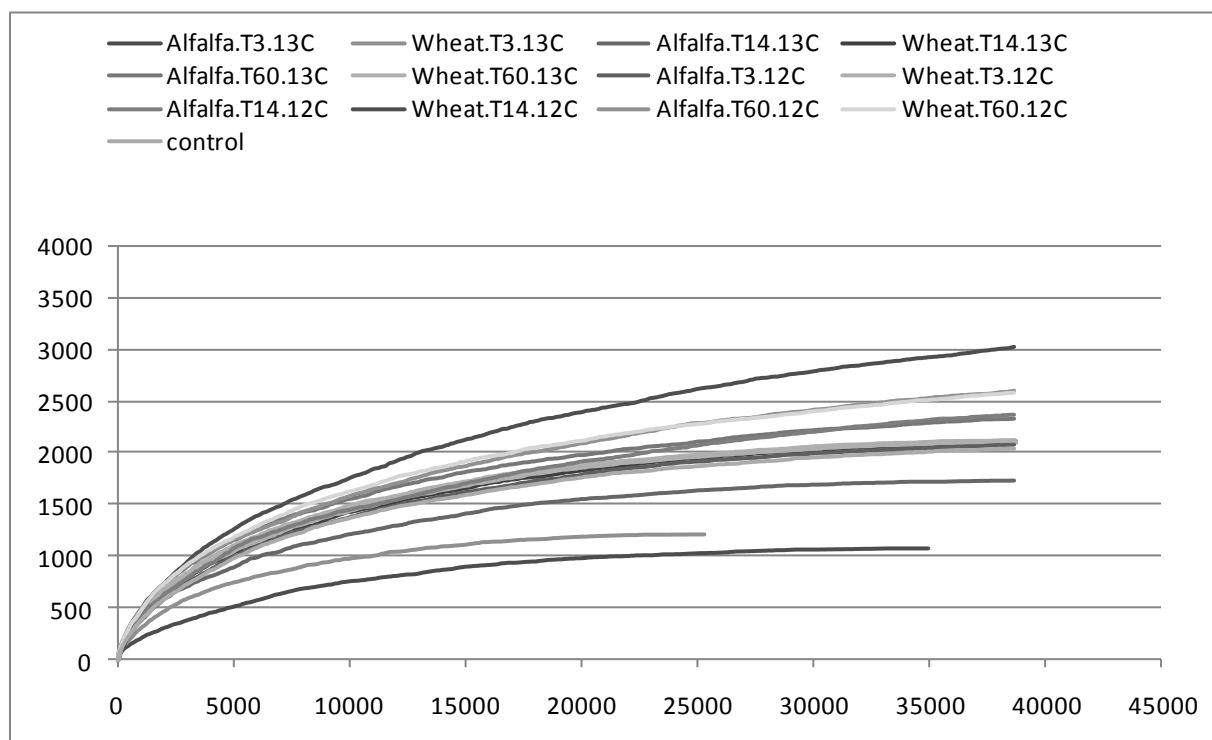


Figure IV.S1, supplemental data: rarefaction curves of taxonomic diversity determined for sequences obtained for light DNA fraction of control at T3, and for both light and heavy fractions extracted from wheat and alfalfa amended microcosms at T3, T14 and T60 days, respectively.

Conclusion

Le retour des résidus de culture au sol est une pratique courante en agriculture car elle permet d'augmenter les stocks de C (carbone) dans le sol, de réduire le lessivage des nitrates et par conséquent d'améliorer la fertilité des sols. Toutefois, l'apport de résidus de culture au sol et sa minéralisation peuvent également induire une sur-minéralisation des matières organiques natives du sol (MOS) par un phénomène appelé Priming-Effect (PE) dont l'importance peut dans certains cas se traduire par un bilan de C négatif. Bien que les microorganismes indigènes du sol fassent parti des acteurs principaux de la décomposition de ces résidus, leur prise en compte en termes de diversité, de successions populationnelles et de fonctionnalité dans les modèles d'évolution des matières organiques du sol reste faible et incomplète, et les facteurs environnementaux qui peuvent influencer la composante microbienne du sol restent peu connus. Dans ce contexte, afin de pouvoir prédire l'impact des résidus de culture sur les microorganismes du sol et de pouvoir gérer durablement les stocks de C dans le sol, il apparaît nécessaire d'identifier les acteurs microbiens et les processus écologiques impliqués dans la dégradation de cette matière organique fraîche, mais aussi ceux impliqués dans le turn-over de la MOS. Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse étaient d'une part de relier le devenir des résidus de culture apportés au sol à la diversité des populations microbiennes impliquées, tout en intégrant des facteurs agronomiques (travail du sol) ou biochimiques (type de résidu) ; et d'autre part d'améliorer notre connaissance des processus microbiens qui interviennent dans la mobilisation de la MOS native du sol en réponse à l'apport de différents résidus de culture (PE).

La première étape de mon travail de thèse a été de tester *in situ* l'influence d'une pratique agricole (le travail du sol) *via* le labour (= incorporation des résidus de culture au sol) ou le mulch (= résidus laissés à la surface) sur la minéralisation de résidus de blé et la dynamique de la diversité des microorganismes impliqués au cours de la décomposition. Ce travail a mis en évidence une décomposition accélérée des résidus lorsqu'ils sont incorporés au sol qui peut s'expliquer par des différences de conditions environnementales au niveau des résidus (humidité, température, surface de contact avec le sol) qui vont conditionner la colonisation des résidus par les communautés bactériennes indigènes. L'étude de la dynamique des communautés bactériennes tout au long de la dégradation des résidus a permis de mettre en évidence un stade précoce et un stade tardif de dégradation qui semblent être structurés par l'évolution biochimique du résidu au cours de sa décomposition, elle-même dépendante de la localisation des résidus et donc de la pratique agricole. Nous avons donc mis en évidence une dynamique des communautés bactériennes moins marquée pour le résidu

laissé en mulch. L'identification des populations/groupes microbiens majoritaires à trois stades de la décomposition des résidus (précoce, intermédiaire, tardif) dans chaque traitement a confirmé la différence de composition des communautés bactériennes en fonction de la localisation des résidus. Nos résultats ont montré une stimulation des γ -protéobactéries lorsque les résidus étaient incorporés et une stimulation des α -protéobactéries et des Actinobactéries lorsque les résidus étaient laissés en surface. Ces résultats suggèrent qu'en surface la composition des communautés bactériennes colonisant les résidus est dominée par des populations présentant des capacités métaboliques poussées ou des capacités de survie dans des conditions environnementales fluctuantes. En revanche, l'environnement favorable qu'offrent les résidus incorporés entraîne une stimulation de microorganismes connus pour être réactifs à l'apport de composés rapidement assimilables et pour leurs attributs écologiques de copiotrophes.

La deuxième partie de mon travail de thèse avait pour objectif d'étudier la réponse des communautés microbiennes du sol à l'apport de résidus de culture de différente qualité biochimique (blé, colza, luzerne) par la mise en place d'un site expérimental spécifique. Nos résultats ont mis en évidence des successions populationnelles au cours de la dégradation de chaque type de résidu qui classiquement sont calées sur l'évolution biochimique des résidus en décomposition. Par ailleurs, l'intérêt de notre étude a été de démontrer que les structures génétiques des communautés bactériennes colonisant le résidu étaient spécifiques de chaque type de résidu. De plus, l'amplitude des successions populationnelles observées au cours de la cinétique de dégradation était différente en fonction du type de résidu et en adéquation avec les différences observées en termes de minéralisation des résidus : colza = luzerne > blé. Plus précisément, l'analyse de la diversité des populations impliquées a permis de mettre en évidence des abondances relatives différentes de phylums bactériens (notamment les protéobactéries) impliqués dans la dégradation de ces différents types de résidus. Par conséquent, la qualité biochimique initiale du résidu et son évolution au cours de sa dégradation détermine sa cinétique et son efficacité de décomposition par la sélection de populations bactériennes différentes et dont les capacités trophiques correspondent à la typologie (en termes de dégradabilité) du substrat apporté.

Dans une troisième et dernière partie de mon travail de thèse, nous avons mené une étude en conditions contrôlées afin de pouvoir coupler des outils isotopiques à nos outils d'écologie moléculaire pour aborder plus finement l'identification des populations activement impliquées dans la dégradation des résidus mais aussi pouvoir quantifier les processus de

dégradation des résidus et de la sur-minéralisation de la MOS *via* le processus de priming effect. Cette étude a été menée sur deux types de résidus marqués isotopiquement au ^{13}C : la luzerne et le blé. Après apport des résidus au sol, nous avons observé une décomposition plus rapide des résidus de luzerne par rapport aux résidus de blé. De plus, chaque dynamique de minéralisation était reliée à des successions de populations bactériennes spécifiques du résidu. L'amplitude de ces successions était plus importante pour la minéralisation des résidus de blé, indiquant qu'un consortium bactérien plus important était nécessaire à sa décomposition que pour la luzerne. L'apport de chaque résidu a entraîné un PE dont l'intensité était dépendante du résidu apporté avec : PE luzerne > PE blé. En parallèle, une dynamique des communautés bactériennes responsables de cette sur-minéralisation était observable pour la luzerne, contrairement au blé où les communautés bactériennes responsable de ce PE étaient similaires. Ces résultats ont suggéré des mécanismes microbiens induisant le PE différents et dépendants du résidu apporté. Les bactéries activement impliquées dans la dégradation des résidus étaient principalement caractérisées par des protéobactéries ayant des attributs écologiques de type stratégies-r (copiotrophes), alors que celles impliquées dans le PE étaient identifiées majoritairement comme des Acidobacteria et en moindre quantité comme des Verrumicrobia caractérisés par des attributs écologiques de type stratégies-K (oligotrophes). L'importante minéralisation des résidus de luzerne associée à une forte sur-minéralisation de la MOS native du sol entrainerait donc un déstockage de carbone plus important que dans le cas du blé où les minéralisations détectées étaient plus faibles.

Ces travaux de thèse montrent donc que la diversité des communautés bactériennes colonisant les résidus de culture est modulée spécifiquement par la localisation de résidus et par leur composition biochimique. De plus, ils mettent en évidence que la diversité microbienne peut être impliquée dans des processus intervenant dans le stockage/déstockage des MOS (PE). Ils illustrent donc l'importance de ne plus considérer la diversité microbienne comme une boîte noire mais comme un réservoir de diversité assez plastique et dont il faut maintenir l'intégrité pour assurer le fonctionnement biologique du sol.

Perspectives

I - Perspectives générales : comment progresser dans la connaissance de la réponse des communautés microbiennes du sol à un apport de résidus de culture.

Ces travaux de thèse ont permis de progresser dans la connaissance de la réponse des communautés microbiennes indigènes du sol à un apport de résidus de culture. Toutefois, l'ensemble des résultats obtenus dans cette thèse n'améliore encore qu'une faible part de notre compréhension des processus microbiens impliqués dans la dégradation des résidus de culture dans les systèmes cultivés et plus largement dans la dynamique des MOS.

Une première perspective de ces travaux de thèse consiste donc à augmenter la généralité de ce type d'études, afin d'identifier et de comprendre comment l'ensemble des facteurs environnementaux ou anthropiques (variations pédoclimatiques, variations du type de résidu, variations des pratiques agricoles...) peuvent réguler l'écologie et donc l'implication de la composante microbienne tellurique dans la dégradation des résidus de culture. En effet, au cours des expérimentations, nous nous sommes seulement intéressés aux paramètres « travail du sol » et « qualité du résidu », alors que de nombreux autres facteurs semblent influencer la dégradation des résidus de culture par les microorganismes [cf synthèse bibliographique]. Par ailleurs, nos études et résultats obtenus sont limités au type de sol étudié. Il est maintenant fortement reconnu que les caractéristiques physico-chimiques des sols ainsi que l'accumulation des perturbations subies sont significativement structurantes sur la biodiversité indigène mais aussi sur sa fonctionnalité (Ranjard et al., 2010). Il convient donc, toujours dans un objectif d'augmenter la généralité de nos études, de tester d'autres types de sols. Une des solutions serait d'utiliser des réseaux de surveillance des sols (type RMQS) afin de dégager les types de sols et pratiques agricoles les plus représentatifs pour effectuer de telles études.

Dans les 3 chapitres expérimentaux de cette thèse, nous nous sommes focalisés principalement sur la dynamique et la diversité des communautés bactériennes. Or les champignons microscopiques du sol sont connus pour être des acteurs aussi importants que les bactéries dans la dynamique des MOS (de Boer et al., 2005). Par conséquent, une des perspectives fondamentales serait aussi d'étendre nos études aux communautés de champignons et de déduire leurs implications relative et fonctionnelle dans les processus étudiés.

D'autre part, bien que des stratégies aient été mises au point pour déterminer le rôle fonctionnel des microorganismes dans le turnover des matières organiques, l'effort de

développer et d'appliquer des outils et concepts en écologie fonctionnelle doit être maintenu et même augmenté. En déterminant les communautés bactériennes activement impliquées dans la dégradation de résidu de blé et de luzerne grâce au DNA-SIP [Chapitre 4] et en couplant nos outils d'écologie moléculaire aux outils de mesures de flux, nous avons commencé à établir le lien diversité – fonction de ces communautés bactériennes. Dans la continuité de cette stratégie, l'extraction et la caractérisation du métaprotéome microbien du sol tout au long de la cinétique de décomposition des résidus de blé permettrait de déterminer les protéines et donc les fonctions impliquées dans la dégradation de ces résidus. L'intérêt croissant pour ce type d'étude permettra d'aborder réellement l'écologie fonctionnelle des communautés microbiennes impliquées dans la dégradation des résidus de culture, tout en pouvant définir la part relative des activités microbiennes dans les processus de dégradation des MOS (minéralisation, priming effect, humification, incorporation dans la biomasse).

D'un point de vue plus finalisé, les différentes perspectives listées ci-dessus peuvent avoir pour résultantes :

- d'intégrer, en termes de dynamique, de diversité et de fonctionnalité, la composante microbienne dans les modèles de prédiction de la minéralisation de la MOS et permettre à terme de mieux prédire et gérer les flux de carbone entre les différents compartiments de l'écosystème ;
- d'établir des indicateurs microbiens de la décomposition de résidus de culture en fonction des différents paramètres environnementaux, des taux de minéralisation... et plus largement dans le cycle du carbone ;
- d'améliorer la connaissance de l'impact de l'apport de résidus de culture sur la mobilisation de la MOS native du sol et ainsi définir des outils d'aide à la décision sur les pratiques agricoles les plus à même de participer au stockage du carbone dans le sol.

II - Perspective prioritaire : Impact des changements globaux sur l'implication des communautés microbiennes dans la dégradation des résidus de culture de blé.

De notre avis, une des perspectives principales de ces travaux de thèse est de positionner les études sur le rôle fonctionnel de la diversité microbienne tellurique dans la décomposition de la matière organique du sol dans un contexte de changement global. Après avoir caractérisé les dynamiques et la diversité des communautés microbiennes activement impliquées dans la dégradation de différentes qualités biochimiques de résidus [Chapitre 4], nous avons voulu étudier l'influence d'un facteur environnemental important en termes de changement climatique : la température. En effet, une des conséquences de l'augmentation des gaz à effets de serre dans l'atmosphère est l'augmentation de la température globale terrestre ce dernier siècle. D'après le rapport de l'IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) en 2007, ce réchauffement climatique est sans équivoque. L'augmentation établie entre 1906 et 2005 est de 0,74°C (0,56-0,92) et doit se maintenir dans les décennies à venir. Certains scénarios prédisent jusqu'à 6°C d'augmentation de température pour le siècle prochain. Dans ce contexte, il paraît important d'évaluer son effet sur les processus écologiques et notamment ceux impliqués dans le cycle du carbone et donc les flux de CO₂ associés, afin de vérifier si les activités biologiques peuvent être accentuées ou amorties par les changements globaux. Nous avons alors initié des travaux concernant l'effet de la température sur la dégradation de résidus de culture de blé ainsi que sur la dynamique et la diversité des populations bactériennes activement impliquées dans la dégradation de ces résidus végétaux en utilisant la technique de DNA-SIP. Ces travaux n'ont pas été présentés sous forme de chapitre car ils sont encore préliminaires, mais, de notre point de vue, ils ouvrent de nouvelles pistes d'investigations techniques et conceptuelles.

En parallèle de l'étude menée dans le chapitre 4, où nous avons suivi la décomposition à 20°C de résidus de blé et de luzerne marqués au ¹³C, nous avons aussi mis en place des microcosmes de blé incubés à 10 et 30°C. Brièvement, les résidus de plantes utilisés dans cette étude sont uniquement des résidus de blé (*Triticum aestivum* cv Caphorn) marqués au ¹³C à 96%, qui ont poussé dans les conditions de croissance décrites dans le chapitre 4. De même, le sol utilisé et la mise en place des microcosmes sont identiques à ceux détaillés dans le chapitre 4. Grâce à l'utilisation de résidus marqués par un isotope stable (¹³C), les flux de CO₂ total et de ¹³CO₂ ont été suivis au cours de l'incubation. Grâce à une centrifugation et un fractionnement isopycnique de l'ADN extrait des microcosmes à différents temps de l'incubation (T3j, T7j, T14j, T28j, T60j, T120j), nous avons étudié la structure génétique des

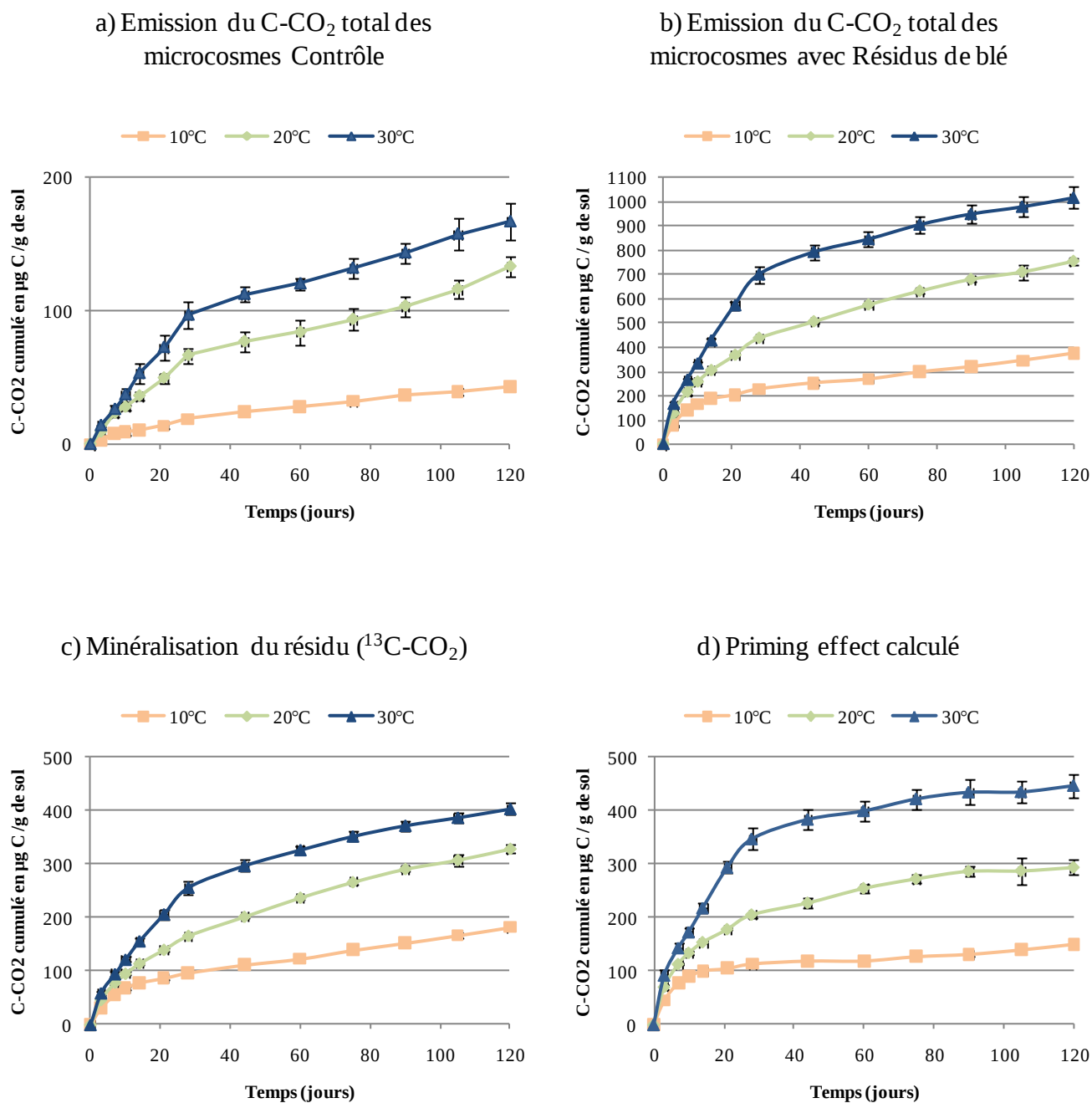


Figure P.1 : C-CO₂ cumulé mesuré pendant la période d'incubation (a) dans les microcosmes contrôles ; (b) dans les microcosmes avec résidus de blé ; (c) correspondant à la minéralisation du résidu ; (d) correspondant au priming effect. Les barres d'erreurs symbolisent les écarts types déterminés sur des triplicats.

communautés bactériennes marquées au ^{13}C (considérées comme ayant activement incorporées le résidu) et celles non marquées au ^{13}C (considérées comme non impliquées dans la dégradation du résidu) par la technique de fingerprint B-ARISA (Bacterial-Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis). La diversité taxonomique des communautés bactériennes, activement impliquées ou non dans la dégradation des résidus de blé, a été identifiée à des temps choisis de l'incubation (T3j et T60j) par amplification PCR de l'ARNr 16S et pyroséquençage sur pyroséquenceur Flx 454 (Beckman Coulter Genomics). Plus de 600 000 séquences valides de taille entre 250 et 300bp ont été obtenues, soit environ 46 000 séquences en moyenne par échantillon. L'analyse bioinformatique des séquences obtenues a été menée en collaboration avec Richard Christen (Faculté des Sciences de Nice) qui a mis en place différents pipelines d'outils bioinformatiques pour analyser des jeux de données d'une telle envergure, dont les caractéristiques sont détaillées dans le chapitre 4.

1. Influence de l'élévation de température sur la minéralisation des résidus.

Au cours de l'incubation, l'émission totale de C-CO_2 dans les microcosmes contrôlés a été mesurée afin de suivre la respiration basale du sol pour chaque température d'incubation (10, 20 et 30°C). Les respirations basales observées sont significativement et positivement corrélées avec la température d'incubation au cours de la cinétique de dégradation du résidu ($p < 0.05$) [Figure P.1.a]. Plusieurs auteurs ont déjà décrit une forte corrélation entre la respiration du sol et la température (Kätterer et al., 1998 ; Knorr et al., 2005). Toutefois, d'autres travaux montrent des résultats divergents (Giardina et Ryan, 2000). Ces contradictions peuvent s'expliquer par le fait que l'influence de la température sur la minéralisation de la MOS peut être dépendante de la stabilité et du degré de protection physique de la MOS, de la disponibilité des substrats (N, P...), de la diversité et des capacités fonctionnelles des communautés microbiennes indigènes, et d'autres paramètres physico-chimiques tel le pH, l'eau... (Fierer et al., 2005 ; Von Lützow & Kögel-Knabner, 2009). Dans notre étude, les conditions édaphiques et biologiques semblent optimums pour montrer une influence significative de la température sur le processus de minéralisation de la MOS.

Au niveau des microcosmes amendés avec des résidus de blé, l'émission totale de C-CO_2 est aussi positivement corrélée avec la température (30°C > 20°C > 10°C). Les dynamiques de C-CO_2 total émis pour les 3 températures suivent la même cinétique avec une augmentation exponentielle au début de l'incubation, correspondant à la phase précoce de la

décomposition, suivi par un ralentissement de la minéralisation, correspondant à la phase tardive de la décomposition. A T120 jours, le C-CO₂ total cumulé émis est de 370, 760 et 1020 µg C-CO₂/g de sol pour 10, 20 et 30°C, respectivement [Figure P.1.b].

Les mesures de ¹³C-CO₂ ont permis de suivre la minéralisation des résidus de blé au cours de l'incubation [Figure P.1.c]. Dès T3 jours, les résultats mettent en évidence une différence significative ($p < 0.05$) des taux de minéralisation des résidus entre les températures (30°C > 20°C > 10°C). Plus précisément, les dynamiques de minéralisation sont caractérisées par une forte minéralisation exponentielle jusqu'à T14 jours (80 et 170 µg C-CO₂/g de sol) pour 10°C et 20°C respectivement et T28 jours (260 µg C-CO₂/g de sol) pour 30°C. Puis, un ralentissement de la minéralisation est observée pour atteindre, à la fin de l'incubation, 180, 330 et 400 µg C-CO₂ cumulé/g de sol correspondant à 10%, 17% et 21% de résidu minéralisé à 10, 20 et 30°C, respectivement. Ces dynamiques de minéralisation s'expliquent par l'évolution de la composition biochimique du résidu au cours de sa dégradation. En effet les composés facilement dégradables sont minéralisés rapidement et expliquent l'important dégagement de C-CO₂ au stade précoce de la décomposition, contrairement aux composés plus récalcitrants qui se dégradent beaucoup plus lentement. Toutefois, la température d'incubation semble influencer significativement le taux de minéralisation des résidus de blé durant cette phase précoce de décomposition. Des résultats similaires avaient déjà été obtenus pour la décomposition de résidus de blé (Bauer et al., 2008 ; Coûteaux et al., 2002 ; Luxhoi et al., 2002). L'élévation de température semble donc stimuler la phase précoce de dégradation des résidus qui peut s'expliquer soit par une stimulation fonctionnelle des populations copiotrophes impliquées, soit par l'établissement de nouvelles populations, plus aptes à se développer à ces températures et plus efficaces dans leur capacité de minéralisation.

Les minéralisations des résidus de blé observées associées à la respiration basale du sol n'expliquent pas entièrement les teneurs en C-CO₂ totales émises à la fin de l'incubation. Ceci suggère donc une sur-minéralisation de la matière organique native du sol consécutive à l'apport des résidus de blé. Ce phénomène est appelé priming effect et a aussi été mis en évidence dans le chapitre 4 avec des résidus de luzerne et de blé apportés au sol, incubés à 20°C. Les cinétiques de priming effect mesurées dans cette étude [Figure P.1.c] sont aussi caractérisées par un important dégagement de C-CO₂ au début de l'incubation jusqu'à T14 jours (100 et 150 µg C-CO₂/g de sol) pour 10°C et 20°C et jusqu'à T28 jours (350 µg C-CO₂/g de sol) pour 30°C. Dans cette phase exponentielle de sur-minéralisation, les teneurs de C-CO₂ observées sont significativement dépendantes de la température ($p < 0.05$). Au stade

tardif de la décomposition des résidus, le priming effect induit se stabilise et les concentrations de C-CO₂ émises sont du même ordre de grandeur entre les 3 températures à partir de T90 jours ($p < 0.05$).

La respiration du sol, la minéralisation du résidu de blé ainsi que le priming effect engendré par cet apport de résidu sont significativement influencés par la température d'incubation. Notre étude semble montrer qu'une élévation de température ne « sature pas » les potentialités de minéralisation du résidu par la microflore du sol, ni les potentialités de priming effect. Plus précisément, une élévation de température permet surtout une augmentation du stade précoce de minéralisation du résidu et donc une dégradation accentuée des composés facilement assimilables par les microorganismes. D'un point de vue bilan, les résidus sont plus rapidement décomposés, ce qui entraîne une plus forte minéralisation, donc une plus faible assimilation/humification et donc stabilisation de la matière organique avec l'élévation de la température. Couplée aux résultats obtenus pour le priming effect, notre étude suggère que l'élévation de température prévue pour les décennies à venir peut provoquer un « emballement » du système qui se mettra d'autant plus à déstocker le carbone et donc à participer à l'effet de serre.

Toutefois, ces résultats sont limités à notre expérimentation en conditions contrôlées et leur extrapolation *in situ* mérite d'être vérifiée expérimentalement à plus long terme pour faire des bilans avant de tirer des conclusions ou même des modèles sur ce sujet.

2. Dynamique de la structure génétique des communautés bactériennes au cours de la décomposition des résidus de blé.

Pour mieux comprendre les processus écologiques qui sont modifiés par l'augmentation de la température et qui provoquent une augmentation de la minéralisation du résidu et de la MOS, nous avons étudié la dynamique et la diversité bactérienne au cours de l'incubation.

L'ADN a été extrait de chaque microcosme et la séparation isopycnique de cet ADN a permis de récupérer une fraction d'ADN lourd (¹³C) et une fraction d'ADN léger (¹²C) correspondant respectivement aux communautés bactériennes activement impliquées et celles non impliquées dans la dégradation des résidus de blé (marqués au ¹³C). Les modifications de structure génétique des communautés bactériennes de ces deux fractions ont été identifiées

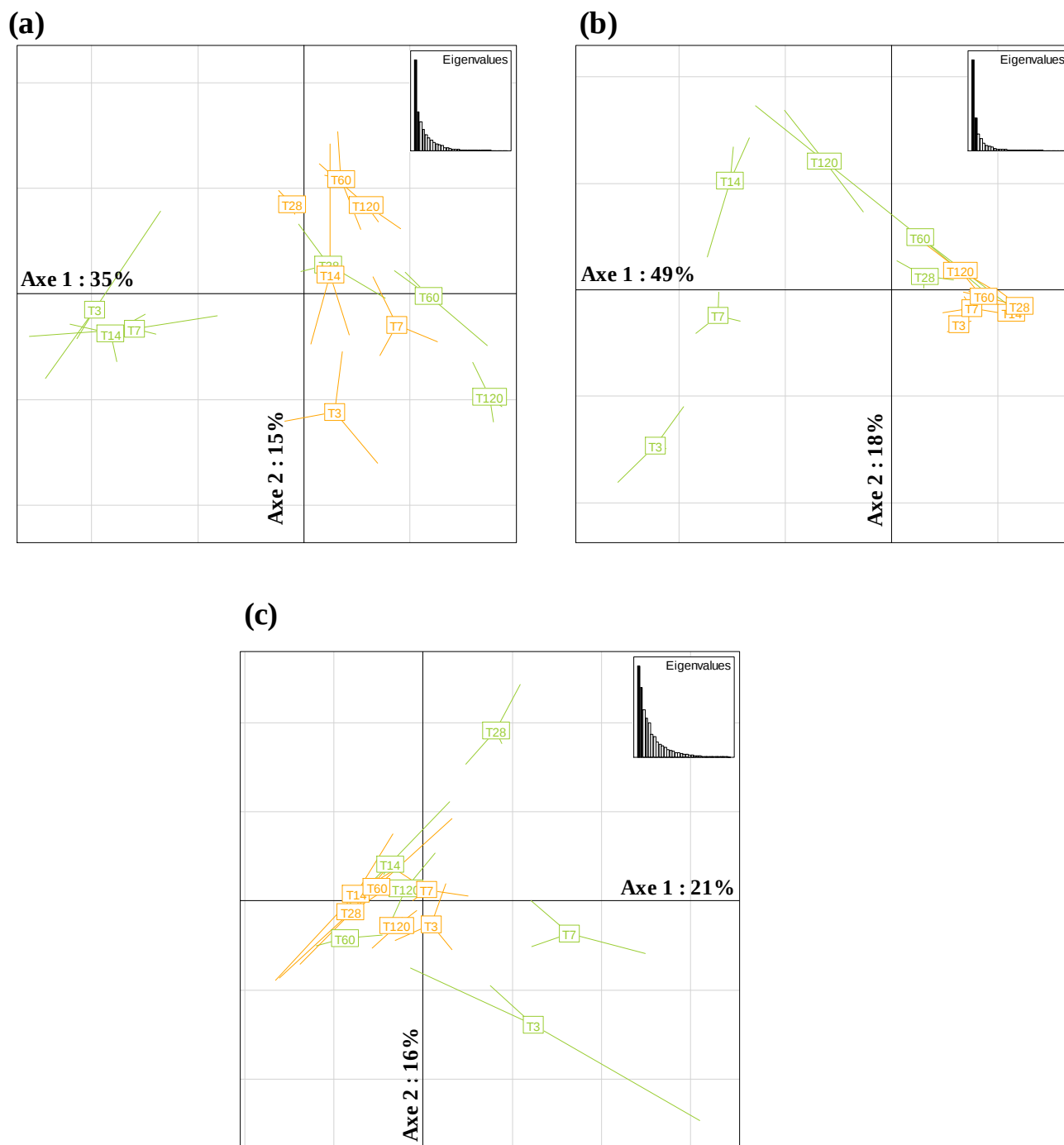


Figure P.2 : Analyses en composante principale des profils B-ARISA obtenus pour les communautés bactériennes à (a) 10°C ; (b) 20°C ; (c) 30°C au cours de l'incubation. En vert sont représentées les structures génétiques des communautés bactériennes issues de la fraction ^{13}C , en orange celles de la fraction ^{12}C . T3, T7, T14, T28, T60 et T120 représentent le temps d'incubation en jours.

par une technique de fingerprint d'ADN : la B-ARISA (Bacterial-Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis). Cette méthode permet l'analyse du polymorphisme de taille de l'intergène (IGS) séparant les gènes 16S et 23S de l'opéron ribosomique bactérien. Les profils complexes obtenus par B-ARISA montrent des bandes allant de 250bp à plus de 1000bp. Visuellement, des bandes spécifiques des fractions lourdes et des fractions légères sont observables ainsi que des modifications de profils entre dates et entre températures d'incubation [données non montrées].

Des analyses en composante principale (PCA) des profils de B-ARISA confirment les différences observées visuellement entre les fractions lourdes et légères pour chaque température d'incubation et mettent en évidence des dynamiques de structure génétique des communautés bactériennes spécifiques de la fraction étudiée (^{13}C et ^{12}C) (Monte Carlo, 1000 permutations) [Figure P.2]. Dans la phase tardive de la décomposition, les communautés bactériennes activement impliquées dans la dégradation des résidus de blé présentent des structures génétiques qui coïncident avec celles observées dans la fraction ^{12}C pour les trois températures d'incubation [Figure P.2]. Ce phénomène peut s'expliquer par une dilution du carbone ^{13}C au sein des populations, mais aussi par le fait que les bactéries semblent moins impliquées dans la dégradation de la MOF au stade tardif de la décomposition et laissent place aux champignons (MacMahon et al., 2005 ; Poll et al., 2008).

Au niveau de la fraction ^{12}C , les structures génétiques des communautés bactériennes à chaque temps d'incubation sont similaires entre elles pour les microcosmes incubés à 20 et à 30°C [Figure P.2.b et c]. Il n'y aurait pas, à ces deux températures, de dynamique particulière des communautés du sol non impliquées dans la dégradation, par rapport aux communautés bactériennes marquées au ^{13}C . A 10°C, une faible mais significative dynamique des structures génétiques des communautés bactériennes ^{12}C a pu être observée sur l'axe 2 de l'ACP (représentant 15% de la variance expliquée) de T3 à T28 jours [Figure P.2.a]. Toutefois, cette exacerbation de la dynamique ^{12}C pour 10°C peut s'expliquer par une diminution de la dynamique ^{13}C pour cette même température, qui par défaut peut mettre en évidence une dynamique mineure.

Les fractions ^{13}C sont beaucoup plus réactives que la fraction ^{12}C pour les 3 températures testées. En effet, que ce soit pour 10, 20 ou 30°C, une discrimination significative des structures génétiques des communautés bactériennes actives est observée sur l'axe 1 et 2 de l'analyse ACP au cours de l'incubation. A 10°C, les communautés activement

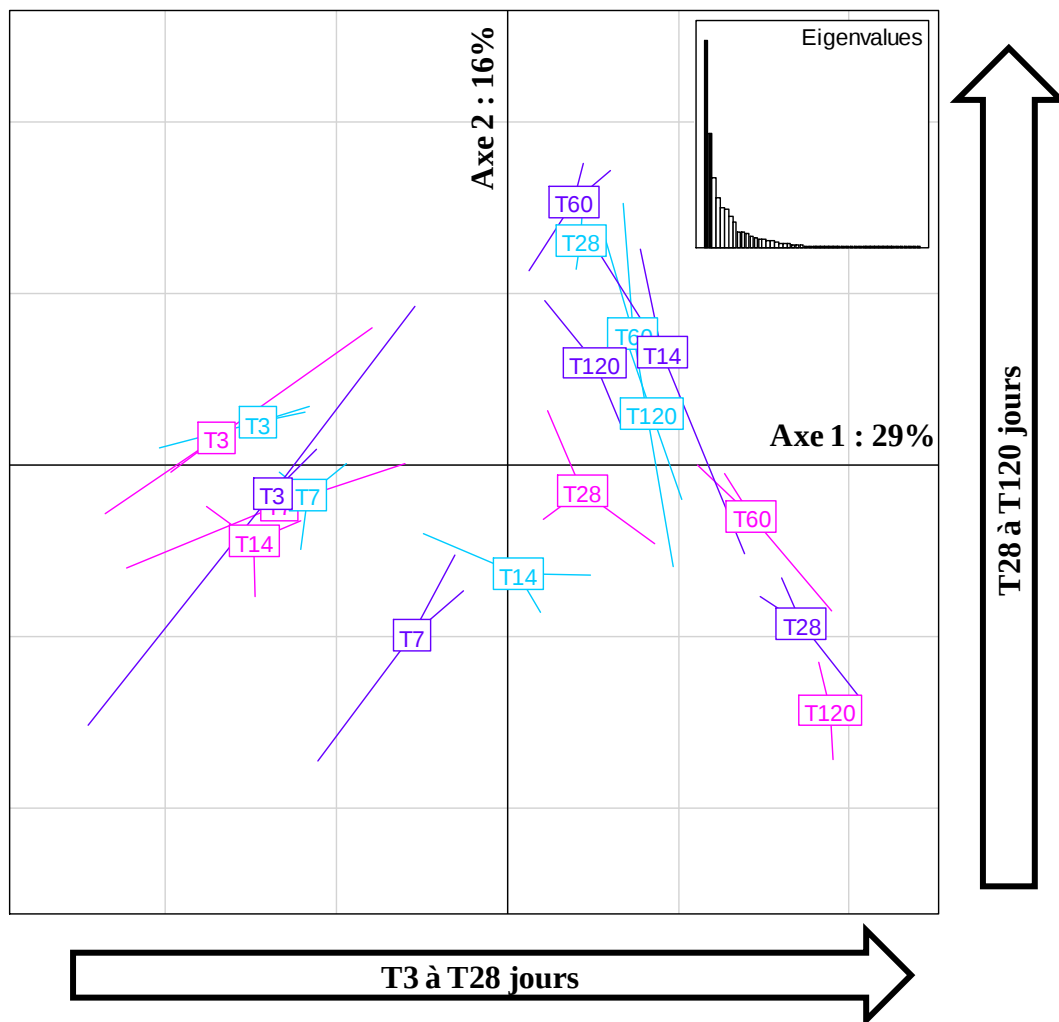


Figure P.3 : Analyse en composante principale des profils B-ARISA obtenus pour les communautés bactériennes à partir de l'ADN marqué au ^{13}C . Les communautés bactériennes observées à 10°C sont représentées en rose, celles à 20°C en bleu, et celles à 30°C en violet. T3, T7, T14, T28, T60 et T120 représentent le temps d'incubation en jours.

impliquées dans la dégradation des résidus de blé sont similaires jusqu'à T14 jours puis significativement discriminées jusqu'à la fin de l'incubation sur l'axe 1 (représentant 34% de la variance expliquée) [Figure P.2.a]. A 20°C, les structures génétiques des communautés bactériennes sont fortement réactives pendant les 28 premiers jours, (déterminées sur les axes 1 et 2 représentant 49% et 18% respectivement, de la variance expliquée) [Figure P.2.b]. A 30°C, les structures génétiques des communautés bactériennes de T3, T7 et T28 jours sont discriminées de celles observées à T14, T60 et T120 jours qui présentaient des signatures de structure génétique de communautés bactériennes similaires [Figure P.2.c]. L'observation de ces dynamiques de structure génétique des communautés bactériennes suggèrent donc des successions de populations qui sont fortement influencées par la température avec des cinétiques plus marquées pour les fortes températures. Bien que ce type de successions de populations microbiennes ait déjà été décrites suite à l'incorporation de résidu de blé, de seigle ou de riz dans le sol (Bastian et al., 2009 ; Baumann et al., 2009 ; Nicolardot et al., 2007 ; Poll et al., 2010 ; Rui et al., 2009), nos travaux démontrent en plus que la dynamique des communautés impliquées est fortement influencée par la température d'incubation.

Quelle que soit la température, la forte réactivité des communautés bactériennes observées au stade précoce de la décomposition est systématiquement associée à la phase exponentielle de minéralisation décrite précédemment, de même la phase tardive de la minéralisation correspond aux communautés bactériennes moins réactives et similaires à celles retrouvées dans la fraction ^{12}C . Comme Bernard et al. (2007) le suggéraient, ainsi que les résultats obtenus dans le chapitre 4, les communautés bactériennes réactives au stade précoce de la décomposition correspondent à des organismes stratèges-r (copiotrophes) connus pour leur capacité à dégrader les composés facilement dégradables (cellulose, composés solubles...), alors qu'au stade tardif de la décomposition, les communautés sont moins réactives et similaires à celles observées dans la fraction ^{12}C suggérant des communautés plutôt stratèges-K (oligotrophes), c'est-à-dire utilisant le carbone de composés plus récalcitrant (lignine).

Afin de comparer les successions de populations observées dans la fraction ^{13}C des 3 températures d'incubation, nous avons représentés les structures génétiques des communautés bactériennes activement impliquées dans la dégradation des résidus de blé sur un même plan factoriel [Figure P.3]. Les dynamiques de structures génétiques des communautés bactériennes des 3 températures semblent suivre la même cinétique. En effet, de T3 à T28 jours, les structures génétiques des communautés bactériennes de chaque température se

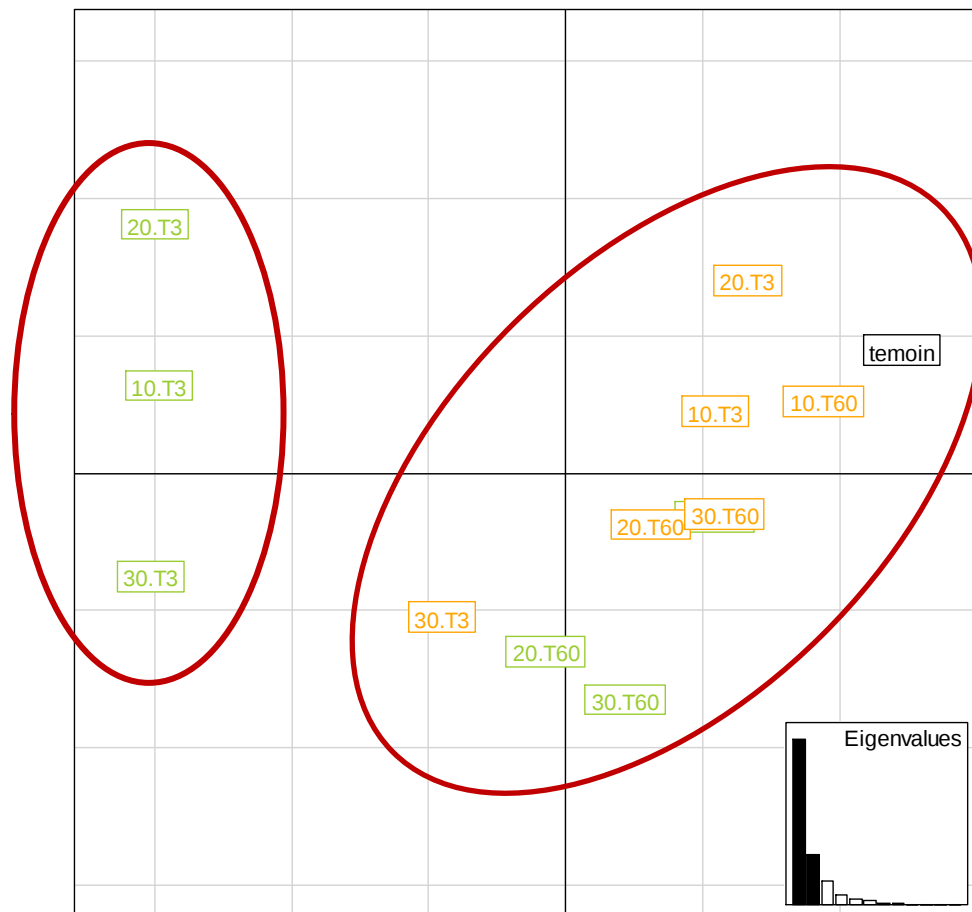


Figure P.4 : Analyse en composante principale des compositions taxonomiques des communautés bactériennes issues de la fraction ^{13}C en vert et de la fraction ^{12}C en orange. Le témoin est représenté en noir. Les 3 températures d'incubation sont notés 10, 20 et 30 pour 10°C, 20°C et 30°C et sont associées à la date d'incubation correspondante représentées par T3 et T60 pour 3 jours et 60 jours.

succèdent sur l'axe 1, représentant 29% de la variance expliquée, alors que les structures génétiques de T28 à T120 jours se répartissent sur l'axe 2, représentant 16% de la variance expliquée. A T7 et T14 jours les communautés bactériennes observées à 10°C sont fortement discriminées sur l'axe 1 de celles présentes à 20 et 30°C. Elles sont plus similaires à celles correspondant à T7 jours pour 20°C et T3 jours pour 30°C. Ces résultats suggèrent donc que les successions de populations, en termes d'évolution de la composition dans le temps, sont similaires entre les températures. Toutefois, la cinétique de ces successions est fortement influencée par la température avec un effet retard à 10°C (par rapport à 20°C) et un effet accélérateur à 30°C. La température, dans la gamme de variation étudiée, ne stimule donc pas de nouvelles populations actives mais influence la cinétique d'apparition de ces populations. Les processus écologiques impliqués résultent donc plus d'un retard métabolique quand la température est faible que d'un changement de la biodiversité microbienne indigène. Toutefois, quel que soit la température appliquée, la cinétique des communautés microbiennes impliquées dans la dégradation des résidus reste fortement sous la dépendance de l'évolution biochimique du résidu en décomposition (stade tardif et précoce) [cf axe 1, Figure P.3] qui gère la disponibilité et la qualité des substrats disponibles et donc la succession de populations aptes à dégrader ces substrats (selon leurs attributs écologiques).

Dans une étude sur un sol amendé avec de la chaux ou non, Pettersson et Bååth (2003) ont mis en évidence des changements de structures de communautés à travers le suivi des PLFA dont l'amplitude était corrélée avec la température (30°C > 20°C > 5°C). Quant à Rui et al. (2009), qui ont étudié la décomposition de résidu de riz en anaérobie à 15, 30 et 45°C, ils ont observé des communautés bactériennes similaires à 15 et 30°C mais différentes à 45°C. Cette réactivité plus importante des communautés microbiennes à haute température pourrait s'expliquer par un optimum de croissance et de fonctionnalité de ces populations copiotrophes. En effet, il est commun que la température optimum de croissance des microorganismes telluriques soit supérieure à celle retrouvée généralement dans les sols (Barcenas-Moreno et al., 2009). Les microorganismes étant dans des conditions plus favorables à leur croissance, ils se développent plus rapidement avec une stimulation des processus de minéralisation de la matière organique.

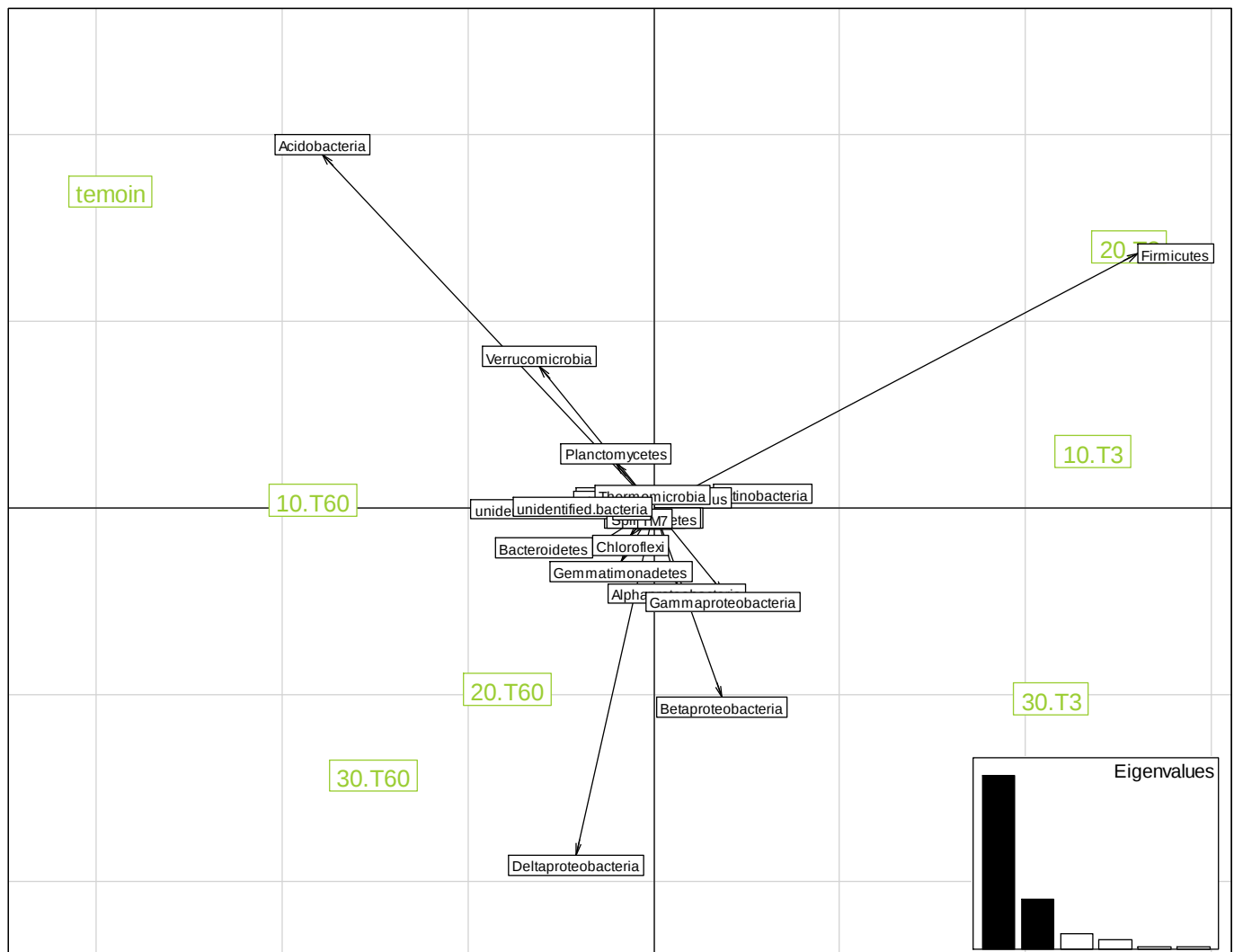


Figure P.5 : Analyse en composante principale des séquences obtenues par pyroséquençage des communautés bactériennes issues des fractions ^{13}C représentées en vert. En noir, sont représentés les phylums explicatifs des modifications de composition observées entre les différentes températures et dates. Les 3 températures d'incubation sont notées 10, 20 et 30 pour 10°C, 20°C et 30°C et sont associées à la date d'incubation correspondante représentées par T3 et T60 pour 3 jours et 60 jours.

3. Caractérisation de la diversité des communautés bactériennes

Afin d'affiner ces résultats, la diversité taxonomique des communautés bactériennes (par pyroséquençage du gène ARNr 16S) des deux fractions (^{13}C et ^{12}C) a été déterminée sur deux dates (T3 et T60 jours) de l'incubation correspondant respectivement au stade précoce et au stade tardif de la décomposition. Tout d'abord, les dynamiques des communautés bactériennes observées par l'étude de la diversité sont similaires à celles observées par fingerprint (B-ARISA) [Figure P.4]. En effet, les communautés bactériennes activement impliquées dans la dégradation des résidus de blé (marqué au ^{13}C) au stade précoce de la décomposition (T3 jours) sont discriminées sur l'axe 1 de l'ACP de celles inféodées au stade tardif de la décomposition (T60 jours) et celles non marquées au ^{13}C . De plus, les modifications de communautés entre les températures sont, quant à elles, différenciées seulement sur l'axe 2. Comme supposé précédemment, les communautés bactériennes sont plus sous l'influence du stade de décomposition, i.e. des substrats présents, que sous l'influence de la température.

Plus précisément, nous avons déterminé les phylums et les genres bactériens spécifiques de ces différences de diversité de communautés bactériennes au niveau de la fraction ^{13}C . En premier lieu, les modifications de diversité bactérienne marquée au ^{13}C entre T3 et T60 jours sont principalement expliquées par leurs compositions en Firmicutes, plus importantes à T3 jours, et en Acidobacteria, plus importantes à T60 jours, sur l'axe 1 du plan factoriel quelle que soit la température [Figure P.5]. Ce sont les genres *Bacillus* (14 à 18% des séquences totales) et *Clostridium* (9 à 20% des séquences totales) qui sont les plus représentés parmi les Firmicutes mis en évidence à T3 jours de l'incubation. Les Firmicutes et plus précisément les bactéries du genre *Bacillus* et *Clostridium* sont déjà connues pour être des stratégies-r / copiotrophes, ce qui peut expliquer leur présence à ce stade précoce de la dégradation du résidu (Rui et al., 2009). Par ailleurs, ces deux genres bactériens sont aussi connus pour être impliqués dans la dégradation de la cellulose (de Boer et al., 2005), ce qui renforce leur implication dans la dégradation de résidu de blé, qui ne possède pas beaucoup de composés solubles mais une forte teneur en ce polymère. Quant aux Acidobacteria, ils sont connus pour être des bactéries ubiquistes des sols, à croissance lente et généralement adaptés à des environnements oligotrophiques (Fierer et al., 2007a ; Quaiser et al., 2003). A la vue de leurs attributs écologiques (stratégies-K / oligotrophes), il apparaît donc normal de les retrouver plus fortement au stade tardif de la décomposition dans la fraction ^{13}C . Dans notre étude, ils sont principalement représentés par les genres GP4 et GP6 qui sont très peu décrits

dans la littérature, GP6 serait un néotype de bactérie méthanogène qui fabrique du méthane. Rui et al. (2009) observaient aussi une prédominance des Acidobacteria dans la phase tardive de la décomposition de résidu de culture de riz, les associant à la dégradation de composés plus récalcitrants (lignine...). Par contre, ils mettaient en évidence une sélection de ces bactéries aux plus fortes températures étudiées (45°C), ce que nous n'observons pas.

Les modifications de diversité entre les 3 températures étudiées sont beaucoup moins importantes que celles entre les deux temps d'incubation étudiés (T3 et T60 jours), elles ne se différencient que sur l'axe 2 du plan factoriel et s'expliquent principalement par une abondance supérieure des Protéobactéries (α , β , γ , δ) pour les fortes températures [Figure P.5].

Plus précisément, les δ -protéobactéries semblent expliquer une part importante des différences de compositions taxonomiques entre les 3 températures avec une augmentation de la part relative de ce phylum positivement corrélée avec la température. Pour T3 jours, 0, 5 et 10% des séquences sont affiliées aux δ -protéobactéries à 10°C, 20°C et 30°C respectivement, et pour T60 jours, 12, 12 et 26% des séquences y sont rattachées à 10°C, 20°C et 30°C respectivement. Des attributs de stratégies-K ont déjà été octroyés aux δ -protéobactéries (Bastian et al., 2009), ils interviendraient donc dans la dégradation de matière organique plus récalcitrante. D'autre part, les taux de minéralisation observés, plus importants avec l'élévation de température, et l'accélération des successions de populations mise en évidence de 10°C à 30°C indiqueraient que la phase de décomposition des composés plus récalcitrants serait initiée plus tôt à 30°C qu'à 20°C et qu'à 10°C. Ces considérations expliqueraient l'intervention et le développement des δ -protéobactéries plus précocement à 30°C qu'à 20°C et 10°C et confirmeraient l'hypothèse d'« emballement » du système à plus hautes températures avec une décomposition des composés récalcitrants plus rapide suivant l'augmentation de température.

Les compositions en β -protéobactéries sont aussi conditionnées par la température que ce soit à T3 jours ou à T60 jours. Les β -protéobactéries ont déjà été corrélées avec le taux de minéralisation du carbone (Fierer et al., 2007a), et étant donné que nous avons montré des taux de minéralisation plus importants suivant l'élévation de température, il semble cohérent que leur représentation soit positivement corrélée avec la température. Toutefois, pour T3 jours, la composition des communautés bactériennes à 20°C semble beaucoup plus déterminée par les Firmicutes, contrairement à celles à 10°C et 30°C gouvernées par la part relative des β -protéobactéries. Au stade précoce de la décomposition, les Firmicutes et les β -

protéobactéries ont déjà été assimilés à des stratégies-r (Bernard et al., 2007, de Boer et al., 2005). Ayant les mêmes aptitudes métaboliques, une compétition entre les bactéries affiliées à ces deux phylums pourrait mener à une exclusion compétitive au stade précoce de la décomposition et semblerait alors, dans notre étude, être conditionnée par la température.

Ces résultats préliminaires indiquent que l'élévation de la température augmente la minéralisation des résidus de culture de blé et la sur-minéralisation du sol engendrée par cet apport de matière organique fraîche dans notre étude. Toutefois, cette élévation de température ne modifierait pas la diversité bactérienne impliquée dans le processus de dégradation des résidus de blé, mais accélérerait la réactivité de ces communautés, avec principalement une réponse des différents sous-groupes de Protéobactéries (α , β , γ , δ).

L'ensemble de ces premiers résultats n'étant que des perspectives, il mérite d'être approfondi et détaillé, afin d'établir plus finement le rôle de la variation de température dans la dégradation des résidus de culture de blé et des processus de stockage/déstockage de carbone.

Références bibliographiques

- Abiven S, Menasseri S, Angers DA, Leterme P.** (2007) Dynamics of aggregate stability and biological binding agents during decomposition of organic materials. *European Journal of Soil Science*, 58: 239-247.
- Acosta-Martinez V, Dowd S, Sun Y, Allen V.** (2008) Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 2762-2770.
- Alain K, Querellou J.** (2009) Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*, 13: 583-594.
- Albrecht R, Joffre R, Gros R, Le Petit J, Terrom G, Périssol C.** (2008) Efficiency of near-infrared reflectance spectroscopy to assess and predict the stage of transformation of organic matter in the composting process. *Bioresource Technology*, 99: 448-455.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman, DJ.** (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Alvarez R, Santanatoglia OJ, Garcia R.** (1995) Soil respiration and carbon inputs from crops in a wheat–soyabean rotation under different tillage systems. *Soil Use Manage*, 11, 45–50.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H.** (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Review*, 59: 143–169.
- Aneja MK, Sharma S, Fleischmann F, Stich S, Heller W, Bahnweg G, Munch JC, Schlöter, M.** (2006) Microbial colonization of beech and spruce litter – influence of decomposition site and plant litter species on the diversity of microbial community. *Microbial Ecology*, 52: 127-135.
- Aneja MK, Sharma S, Munch JC, Schlöter M.** (2004) RNA fingerprinting – a new method to screen for differences in plant litter degrading microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 59: 223–231.
- Aoyama M, Nagumo T.** (1997) Comparison of the effects of Cu, Pb, and As on plant residue decomposition, microbial biomass, and soil respiration. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43: 613-622.
- Aoyama M.** (1998) Effects of heavy metal accumulation in apple orchard soils on the mineralization of humified plant residues. *Soil Science and Plant Nutrition*, 44: 209-215.
- Bahri H, Rasse DP, Rumpel C, Dignac M-F, Bardoux G, Mariotti A.** (2008) Lignin degradation during a laboratory incubation followed by ¹³C isotope analysis. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1916-1922.
- Balesdent J, Chenu C, Balabane M.** (2000) Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil and Tillage Research*, 53: 215-230.
- Balvanera P, Pfisterer AB, Buchmann N, He J-S, Nakashizuka T, Raffaelli D, Schmid B.** (2006) Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecology Letters*, 9: 1146-1156.
- Bárcenas-Moreno G, Gómez-Brandón M, Rousk J, Bååth E.** (2009) Adaptation of soil microbial communities to temperature: comparison of fungi and bacteria in a laboratory experiment. *Global Change Biology*, 15: 2950-2957.
- Bardgett RD, Frankland JC, Whittaker JB.** (1993) The effects of agricultural management on the soil biota of some upland grasslands. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 45: 25-45.
- Bardgett RD, Freeman C, Ostle NJ.** (2008) Through carbon cycle feedbacks. *The ISME Journal*, 2: 805-814.

- Bastian F, Bouziri L, Nicolardot B, Ranjard L.** (2009) Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. *Soil Biology & Biochemistry*, 41: 262-275.
- Bastida F, Moreno JL, Nicolas C, Hernandez T, Garcia C.** (2009) Soil metaproteomics: a review of an emerging environmental science. Significance, methodology and perspectives. *European Journal of Soil Science*, 60: 845-859.
- Bauer J, Kirschbaum MUF, Weihermüller L, Huisman JA, Herbst M, Vereecken H.** (2008) Temperature response of wheat decomposition is more complex than the common approaches of most multi-pool models. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 2780-2786.
- Baumann K, Marschner P, Smernik RJ, Baldock JA.** (2009) Residue chemistry and microbial community structure during decomposition of eucalypt, wheat and vetch residues. *Soil Biology & Biochemistry*, 41: 1966-1975.
- Beare MH, Coleman DC, Crossley Jr DA, Hendrix PF, Odum EP.** (1995) A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil*, 170: 5-22.
- Begon M, Harper JL, Townsend CR.** (1986) The nature of the community. In: Ecology (eds) Individuals, populations and community. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp 591-628.
- Beijerinck MW.** (1913) In *Jaarboek van de Koninklijke Akademie van Wetenschappen* (Müller Amsterdam).
- Bell JM, Smith JL, Bailey VL, Bolton H.** (2003) Priming effect and C storage in semi-arid no-till spring crop rotations. *Biology and Fertility of Soils*, 37: 237-244.
- Bell T, Newman JA, Silverman BW, Turner SL, Lilley AK.** (2005) The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature*, 436: 1157-1160.
- Bending GD, Turner MK, Jones JE.** (2002) Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1073-1082.
- Benndorf D, Balcke GU, Harms H, von Bergen M.** (2007) Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *The ISME Journal*, 1: 224-234.
- Bernard L, Maron PA, Mougél C, Nowak V, Lévêque J, Marol C, Balesdent J, Gibiat F, Ranjard L.** (2009) Contamination of Soil by Copper Affects the Dynamics, Diversity, and Activity of Soil Bacterial Communities Involved in Wheat Decomposition and Carbon Storage. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 7565-7569.
- Bernard L, Mougél C, Maron P-A, Nowak V, Lévêque J, Henault C, Haichar F, Berge O, Marol C, Balesdent J, Gibiat F, Lemenceau P, Ranjard L.** (2007) Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ¹³C labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environmental Microbiology*, 9: 752-764.
- Bingemann CW, Varner JE, Martin WP.** (1953) The effect of the addition of organic materials on the decomposition of an organic soil. *Proceedings-Soil Science Society of America*, 17: 34-38.
- Bremer, van Kessel.** (1992) Seasonal microbial biomass dynamics after addition of lentil and cheat residues. *Soil Science Society of America Journal*, 56: 1141-1146.

- Brown GG, Barois I, Lavelle P.** (2000) Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology*, 36: 177-198.
- Buchan A, Newell SY, Butler M, Biers EJ, Hollibaugh JT, Moran MA.** (2003) Dynamics of bacterial and fungal communities on decaying salt marsh grass. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6676-6687.
- Bünemann EK, Schwenke GD, Van Zwieten L.** (2006) Impact of agricultural inputs on soil organisms-a review. *Australian Journal of Soil Research*, 44: 379-406.
- Campbell CA, Zentner RP, Selles F, Biederbeck VO.** (2000) Quantifying short-term effects of crop rotations on soil organic carbon in southwestern Saskatchewan. *Canadian Journal of Soil Science*, 80: 193-202.
- Cayuela ML, Sinicco T, Mondini C.** (2009) Mineralization dynamics and biochemical properties during initial decomposition of plant and animal residues in soil. *Applied Soil Ecology*, 41: 118-127.
- Cécillon L, Cassagne N, Czarnes S, Gros R, Vennetier M, Brun JJ.** (2009) Predicting soil quality indices with near infrared analysis in a wildfire chronosequence. *Science of the Total Environment*, 407: 1200-1205.
- Cécillon L, de Mello NA, De Danieli S, Brun JJ.** (2010) Soil macroaggregate dynamics in a mountain spatial climate gradient. *Biogeochemistry*, 97: 31-43.
- Charron CS, Sams CE.** (1999) Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by shredded leaves of Brassica species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124: 462-467
- Chaussod R.** (1996) La qualité biologique des sols : évaluation et implications. *Etude et Gestion des Sols*, 3 : 261-277.
- Chen H, Fan M, Billen N, Stahr K, Kuzyakov Y.** (2009) Effect of land use types on decomposition of ¹⁴C-labelled maize residue (*Zea mays* L.). *European Journal of Soil Biology*, 45: 123-130.
- Chen Y, Murrell JC.** (2010) When metagenomics meets stable-isotope probing: progress and perspectives. *Trends in Microbiology*, 18: 157-163.
- Chessel D, Dufour AB, Thioulouse J.** (2004) The ade4 package — I: one-table methods. *R News* 4:5–10.
- Chodak M.** (2008) Application of near infrared spectrometry for analysis of soils, litter and plant materials. *Polish Journal of Environmental Studies*, 17: 631-642
- Christen R.** (2008) Global Sequencing: A Review of Current Molecular Data and New Methods Available to Assess Microbial Diversity. *Microbes and Environments*, 23: 253-268.
- Cleveland CC, Nemergut DR, Schmidt SK, Townsend AR.** (2007) Increases in soil respiration following labile carbon additions linked to rapid shifts in soil microbial community composition. *Biogeochemistry*, 82: 229-240
- Coleman DC, Whitman WB.** (2005) Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. *Pedobiologia*, 49: 479-497.

- Cookson WR, Beare MH, Wilson PE.** (1998) Effects of prior crop residue management on microbial properties and crop residue decomposition. *Applied Soil Ecology*, 178-188.
- Cookson WR, Murphy DV, Roper MM.** (2008) Characterizing the relationships between soil organic matter components and microbial function and composition along a tillage disturbance gradient. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 763-777.
- Coppens F, Garnier P, De Gryze S, Merckx R, Recous S.** (2006) Soil moisture, carbon and nitrogen dynamics following incorporation and surface application of labelled crop residues in soil columns. *European Journal of Soil Science*, 57: 894-905.
- Corbeels M, O'Connell AM, Grove TS, Mendham DS.** (2003) Nitrogen release from eucalypt leaves and legume residues as influenced by their biochemical quality and degree of contact with soil. *Plant and Soil*, 250: 15-28.
- Coûteaux MM, Sarmiento L, Bottner P, Acevedo D, Thiéry JM.** (2002) Decomposition of standard plant material along an altitudinal transect (65-3968 m) in the tropical Andes. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 69-78.
- Curtin D, Francis GS, McCallum FM.** (2008) Decomposition rate of cereal straw as affected by soil placement. *Australian Journal of Soil Research*, 46: 152-160.
- Curtin D, Selles F, Wang H, Campbell CA, Biederbeck VO.** (1998) Carbon dioxide emissions and transformation of soil carbon and nitrogen during wheat straw decomposition. *Soil Science Society of America Journal*, 62: 1035-1041.
- Curtis TP, Sloan WT.** (2005) Exploring microbial diversity - a vast below. *Science*, 309: 1331-1333.
- De Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L.** (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 795-811.
- De Groot RS, Wilson MA, Boumans RMJ.** (2002) A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. *Ecological Economics*, 41: 393-408.
- Degens BP, Harris JA.** (1997) Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 29: 1309-1320.
- Degens BP.** (1998) Decreases in microbial functional diversity do not result in corresponding changes in decomposition under different moisture conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 1989-2000.
- Demetz M, Insam H.** (1999) Phosphorus availability in a forest soil determined with a respiratory assay compared to chemical methods. *Geoderma*, 89: 259-271.
- Denef K, Six J, Bossuyt H, Frey SD, Elliott ET, Merckx R, Paustian K.** (2001) Influence of dry-wet cycles on the interrelationship between aggregate, particulate organic matter, and microbial community dynamics. *Soil Biology & Biochemistry*, 33: 1599-1611.
- Dequiedt S, Thioulouse J, Jolivet C, Saby NPA, Lelievre M, Maron PA, Martin MP, Chemidlin Prévost-Bouré N, Toutain B, Arrouays D, Lemanceau P, Ranjard L.** (2009) Biogeographical patterns of soil bacterial communities. *Environmental Microbiology Reports*, 1 : 251-255.
- Dickens HE, Anderson JM.** (1999) Manipulation of soil microbial community structure in bog and forest soils using chloroform fumigation. *Soil Biology & Biochemistry*, 31: 2049-2058.

- Dimitriu PA, Lee D, Grayston SJ.** (2010) An evaluation of the functional significance of peat microorganisms using a reciprocal transplant approach. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 65-71.
- Douglas CL, Allmaras RR, Rasmussen PE, Ramig RE, Roager NC.** (1980) Wheat straw composition and placement effects on decomposition in dryland agriculture of the Pacific Northwest. *Soil Science Society of America Journal*, 44: 833-837.
- Duong TTT, Baumann K, Marschner P.** (2009) Frequent addition of wheat straw residues to soil enhances carbon mineralization rate. *Soil Biology & Biochemistry*, 41: 1475-1482.
- Eilers K, Lauber CL, Knight R, Fierer N.** 2010. Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 896-903.
- Elliott ET, Coleman DC.** (1988) Let the soil work us. *Ecological Bulletins*, 39: 23-32.
- Fang M, Motavalli PP, Kremer RJ, Nelson KA.** (2007) Assessing changes in soil microbial communities and carbon mineralization in Bt and non-Bt corn residue-amended soils. *Applied Soil Ecology*, 37: 150-160.
- Felsenstein J.** (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fierer N, Bradford MA, Jackson RB.** (2007a) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88:1354-1364.
- Fierer N, Breitbart M, Nulton J, Salamon P, Lozupone C, Jones R, Robeson M, Edwards RA, Felts B, Rayhawk S, Knight R, Rohwer F, Jackson RB.** (2007b) Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7059-7066.
- Fierer N, Jackson RB.** (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS*, 103 : 626-631.
- Fontaine S, Barot S.** (2005) Size and functional diversity of microbe populations control plant persistence and carbon accumulation. *Ecology Letters*, 8: 1075-1087.
- Fontaine S, Mariotti A, Abbadie L.** (2003) The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 837-843.
- Fourty T, Baret F, Jacquemoud S, Schmuck G, Verdebout J.** (1996) Leaf Optical Properties with Explicit Description of Its Biochemical Composition: Direct and Inverse Problems. *Remote Sensing of Environment*, 56: 104-117.
- Franklin RB, Garland JL, Bolster CH, Mills AL.** (2001) Impact of dilution on microbial community structure and functional potential: comparison of numerical simulations and batch culture experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 702-712.
- Fredrickson JK, Balkwill DL, Drake GR, Romine MF, Ringelberg DB, White DC.** (1995) Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolate from deep subsurface. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1917-1922.
- Fu S, Coleman DC, Scharz R, Potter R, Hendrix PF, Crossley DA.** (2000) 14C distribution in soil organisms and respiration after the decomposition of crop residue in conventional tillage and no-till agroecosystems at Georgia Piedmont. *Soil & Tillage Research*, 57: 31-41.

- Fuentes JP, Flury M, Huggins DR, Bezdicek DF.** (2003) Soil water and nitrogen dynamics in dryland cropping systems of Washington State, USA. *Soil and Tillage Research*, 71: 33-47.
- Gaillard V, Chenu C, Recous S, Richard G.** (1999) Carbon, nitrogen and microbial gradients induced by plant residues decomposition in soil. *European Journal of Soil Science*, 50: 567-578.
- Gaillard V, Chenu C, Recous S.** (2003) Carbon mineralization in soil adjacent to plant residues of contrasting biochemical quality. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 93-99.
- Garland JL, Lehman RM.** (1999) Dilution/extinction of community phenotypic characters to estimate relative structural diversity in mixed communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 30: 333-343.
- Garland JL, Mills AL.** (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2351-2359.
- Giardina CP, Ryan MG.** (2000) Evidence that decomposition rates of organic carbon in mineral soil do not vary with temperature. *Nature*, 404: 858-861.
- Gignoux J, House J, Hall D, Masse D, Nacro HB, Abbadie L.** (2001) Design and test of a generic cohort model of soil organic matter decomposition: the SOMKO model. *Global Ecology & Biogeography*, 10: 639-660.
- Giller KE, Witter E, McGrath SE.** (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology & Biochemistry*, 30: 1389-1414.
- Girard MC, Walter C, Rémy JC, Berthelin J, Morel JL.** (2005) Sols et environnement. « Collection Sciences de la Terre » Dunod, Imprimerie Chirat, 816p..
- Girvan MS, Campbell CD, Killham K, Prosser JI, Glover LA.** (2005) Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology*, 7: 301-313.
- Gleixner G, Czimczik CJ, Kramer C, Lühker B, Schmidt MWI.** (2001) Plant compounds and their turnover and stability as soil organic matter. In: Schulze ED, Heimann M, Harrison S, Holland E, Lloyd JL, Prentice C, Schimel D, Editors, *Global Biogeochemical Cycles in the Climate System*, Academic Press, San Diego, USA, pp 201-215.
- Gleixner G, Poirier N, Bol R, Balesdent J.** (2002) Molecular dynamics of organic matter in cultivated soil. *Organic Geochemistry*, 33: 357-366.
- Gobat JM, Aragno M, Matthey Willy.** (1998) Le sol vivant. Collection “Gérer l’environnement » 14, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 519p.
- Govaerts B, Mezzalama M, Unno Y, Sayre KD, Luna-Guido M, Vanherck K, Dendooven L, Deckers J.** (2007) Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. *Applied Soil Ecology*, 37: 18-30.
- Griffiths BS, Hallett PD, Kuan HL, Gregory AS, Watts CW, Whitmore AP.** (2008) Functional resilience of soil microbial communities depends on both structure and microbial community composition. *Biology and Fertility of Soils*, 44: 745-754.
- Griffiths BS, Ritz K, Bardgett RD, Cook R, Christensen S, Ekelund F, Sørensen SJ, Bååth E, Bloem J, de Ruiter PC, Dolfing J, Nicolardot B.** (2000) Ecosystem response of pasture

soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *OIKOS*, 90: 279-294.

Griffiths BS, Ritz K, Wheatley R, Kuan HL, Boag B, Christensen S, Ekelund F, Sorensen SJ, Muller S, Bloem J. (2001) An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 33: 1713-1722.

Ha KV, Marschner P, Bünemann EK. (2008) Dynamics of C, N, P and microbial community composition in particulate soil organic matter during residue decomposition. *Plant Soil*, 303: 253-264.

Hadas A, Kautsky L, Goek M, Kara EE. (2004) Rates of decomposition of plant residues and available nitrogen in soil, related to residue composition through simulation of carbon and nitrogen turnover. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 255-266.

Haichar FZ, Achouak W, Christen R, Heulin T, Marol C, Marais M-F, Mougél C, Ranjard L, Balesdent J, Berge O. (2007) Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, 9: 625-634.

Haichar FZ, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T, Achouak W. (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2: 1221-1230.

Henriksen TM, Breland TA. (1999a) Evaluation of criteria for describing crop residue degradability in a model of carbon and nitrogen turnover in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 31: 1135-1149.

Henriksen TM, Breland TA. (1999b) Nitrogen availability effects on carbon mineralization, fungal and bacterial growth, and enzyme activities during decomposition of wheat straw in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 31: 1121-1134.

Holland EA, Coleman DC. (1987) Litter placement effects on microbial and organic-matter dynamics in an agrosystem. *Ecology*, 68: 425-433.

Horz H-P, Barbrook A, Field CB, Bohannan BJM. (2004) Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *PNAS*, 101: 15136-15141.

Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Chen YC, Pan HJ, Ho SW, Luh KT. (1998) Nosocomial infections caused by *Sphingomonas paucimobilis*: clinical features and microbiological characteristics. *Clinical Infectious Diseases*, 26: 676-681.

Hu S, van Bruggen AHC. (1997) Microbial dynamics associated with multiphasic decomposition of ¹⁴C-labeled cellulose in soil. *Microbial Ecology*, 33: 134-143.

Ingwersen J, Poll C, Streck T, Kandeler E. (2008) Micro-scale modeling of carbon turnover driven by microbial succession at a biogeochemical interface. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 872-886.

IPCC (2001) Climate change: impacts, adaptation and vulnerability. Cambridge University Press, IPCC.

Jensen LS, Salo T, Palmason F, Breland TA, Henriksen TM, Stenberg B, Pedersen A, Lundström C, Esala M. (2005) Influence of biochemical quality on C and N mineralization from a broad variety of plant materials in soil, *Plant and Soil*, 273: 307-326.

- Joffre R, Gillon D, Dardenne P, Agneessens R, Biston R.** (1992) The use of near-infrared reflectance spectroscopy in litter decomposition studies. *Annales des Sciences Forestières*, 49: 481-488 .
- Johnston AE, Poulton PR, Coleman K.** (2009) Soil Organic Matter: Its Importance In Sustainable Agriculture And Carbon Dioxide Fluxes. *Advances in Agronomy*, 101: 1-57.
- Jones RT, Robeson MS, Lauber CL, Hamady M, Knight R.** (2009) A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *The ISME Journal*, 3: 442-453.
- Kamphake LJ, Hannah SA, Cohen JM.** (1967) Automated analysis for nitrate by hydrazine reduction. *Water Research*, 1: 205-216.
- Kandeler E, Tscherko D, Spiegel H.** (1999) Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralization and enzyme activities of a Chernozem under different tillage management. *Biology and Fertility of Soils*, 28: 343-351.
- Kätterer T, Reichstein M, Andrén O, Lomander A.** (1998) Temperature dependence of organic matter decomposition: a critical review using literature data analyzed with different models. *Biology and Fertility of Soils*, 27: 258-262.
- Kim H, Nishiyama M, Kunito T, Senoo K, Kawahara K, Murakami K, Oyaizu H.** (1998) High population of *Sphingomonas* species on plant surface. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 731-736.
- Kimura M.** (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kirschbaum MUF.** (1995) The temperature dependence of soil organic matter decomposition, and the effect of global warming on soil organic C storage. *Soil Biology & Biochemistry*, 27: 753-760.
- Knapp EB, Elliott LF, Campbell GS.** (1983) Carbon, nitrogen and microbial biomass interrelationships during the decomposition of wheat straw-a mechanistic simulation-model. *Soil Biology & Biochemistry*, 15: 455-461.
- Knorr M, Frey SD, Curtis PS.** (2005) Nitrogen additions and litter decomposition: a meta-analysis. *Ecology*, 86: 3252-3257.
- Kögel-Knaber I.** (2002) The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology & Chemistry*, 34: 139-162.
- Krom MD.** (1980) Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichlorocyanurate. *The analyst*, 105: 305-316.
- Kuan MG.** (2004) Carbon sequestration and stabilization in soils: implications for soil productivity and climate change. *Soil Science & Plant Nutrition*, 50: 467-476.
- Kuzyakov Y, Friedel JK, Stahr K.** (2000) Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 1485-1498.
- Kuzyakov Y.** (2010) Priming effects: interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*, doi: 10.1016/j.soilbio.2010.074.003

- Kwabiah AB, Palm CA, Stoskopf NC, Voroney RP.** (2003) Response of soil microbial biomass dynamics to quality of plant materials with emphasis on P availability. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 207-216.
- Lal R, Kimble JM.** (1997) Conservation tillage for carbon sequestration. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 49: 243-253.
- Lal R.** (2004) Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science*, 304: 1623-1627.
- Lawton JH, May RM.** (1995) Extinction Rates. Oxford University Press, Oxford.
- Lejon DPH, Chaussod R, Ranger J, Ranjard L.** (2005) Microbial Community Structure and Density Under Different Tree Species in an Acid Forest Soil. *Microbial Ecology*, 50: 614–625.
- Lejon DPH, Martins JMH, Lévêque J, Spadini L, Pascault N, Landry D, Milloux MJ, Nowak V, Chaussod R, Ranjard L.** (2008) Copper dynamics and impact on microbial communities in soils of variable organic status. *Environ.Sci.Technol*, 42: 2819-2825.
- Lejon DPH, Pascault N, Ranjard L.** (2010) Differential copper impact on density, diversity and resistance of adapted culturable bacterial populations according to soil organic status. *European Journal of Soil Biology*, 46: 168-174.
- Lejon DPH, Sebastia J, Lamy I, Chaussod R, Ranjard L.** (2007) Relationships between Soil Organic Status and Microbial Community Density and Genetic Structure in Two Agricultural Soils Submitted to Various Types of Organic Management. *Microbial Ecology*, 53: 650-663.
- Liebich J, Schlöter M, Schäffer A, Vereecken H, Buraue P.** (2007) Degradation and humification of maize straw in soil microcosms inoculated with simple and complex microbial communities. *European Journal of Soil Science*, 58: 141-151.
- Liebich J, Vereecken H, Buraue P.** (2006) Microbial community changes during humification of ¹⁴C-labelled maize straw in heat-treated and native Orthic Luvisol. *European Journal of Soil Science*, 57, 446–455.
- Linères M, Djakovitch JL.** (1993). Matières Organiques et Agricultures. In : Decroux J, Ignazi JC (eds) Caractérisation de la stabilité biologique des apports organiques par l'analyse biochimique. COMIFER-GEMAS, Blois. pp 159-168.
- Liu Z, Lozupone C, Hamady M, Bushman FD, Knight R.** Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 35: e120.
- Loreau M.** (2000) Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. *Oikos*, 91: 3-17.
- Lundquist E, Jackson LE, Scow K, Hsu C.** (1999) Changes in microbial biomass and community composition, and soil carbon and nitrogen pools after incorporation of rye into three California agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 31:221-236.
- Luxhøi J, Magid J, Tschérko D, Kandeler E.** (2002) Dynamics of invertase, xylanase and coupled quality indices of decomposing green and brown plant residues. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 501-508.
- MA.** (2005) Ecosystems and Human Well-being: synthesis. Island press, Washington, DC.
- Magid J, De Neergaard A, Brandt M.** (2006) Heterogeneous distribution may substantially decrease initial decomposition, long-term microbial growth and N-immobilization from high C-to-N ratio resources. *European Journal of Soil Science*, 57: 517-529.

- Manlay RJ, Feller C, Swif MJ. (2007)** Historical evolution of soil organic matter concepts and their relationships with the fertility and sustainability of cropping systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 119: 217-233.
- Maron PA, Maitre M, Mercier A, Lejon DPH, Nowak V, Ranjard L. (2008)** Protein and DNA fingerprinting of a soil bacterial community inoculated into three different sterile soils. *Research in Microbiology*, 159: 231-236.
- Maron PA, Ranjard L, Mougél C, Lemanceau P. (2007)** Metaproteomics: A New Approach for Studying Functional. *Microbial Ecology*, 53: 486-493.
- Marschner P, Kandeler E, Marschner B. (2003)** Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 453-461.
- Martens DA. (2000)** Plant residue biochemistry regulates soil carbon cycling and carbon sequestration. *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 361-369.
- Martens R. (1995)** Current methods for measuring microbial biomass C in soil: Potential and limitations. *Biology and Fertility of Soils*, 19: 87-99.
- Mary B, Recous S, Darwis D, Robin D. (1996)** Interactions between decomposition of plant residues and nitrogen cycling in soil. *Plant and Soil*, 181: 71-82.
- McGill WB. (1996)** In *Evaluation of Soil Organic Matter Models*, eds Powlson, D.S., Smith, Smith P, J.U. (Springer, Rothamsted), pp. 111-132.
- McIntosh RP, Odum EP. (1969)** Ecological succession. *Science*, 169: 403-404.
- McMahon SK, Williams MA, Bottomley PJ, Myrold DD. (2005)** Dynamics of microbial communities during decomposition of carbon-13 labeled ryegrass fractions in soil. *Science Society of America Journal*, 69: 1238-1247.
- Michael W Friedrich. (2006)** Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 59-66.
- Moore JC, Berlow EL, Coleman DC, de Ruiter PC, Dong Q, Hastings A, Collins Johnson JC, McCann KS, Melville K, Morin PJ, Nadelhoffer K, Rosemond AD, Post DM, Sabo JL, Scow KM, Vanni MJ, Wall DH. (2004)** Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology Letters*, 7: 584-600.
- Naeem S, Li S. (1997)** Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature*, 390: 507-509.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G. (2003)** Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54: 655-670.
- Nemergut DR, Anderson SP, Cleveland CC, Martin AP, Miller AE, Seimon A, Schmidt SK. (2007)** Microbial community succession in an unvegetated recently deglaciated soil. *Microbial Ecology*, 53: 110-122.
- Neufeld JD, Dumont MG, Vohra J, Murrell JC. (2006)** Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microbial Ecology*, 55: 435-442.
- Nicolardot B, Bouziri L, Bastian F, Ranjard L. (2007)** A microcosm experiment to evaluate the influence of location and quality of plant residues on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 39: 1631-1644.

- Nicolardot B, Fauvet G, Cheneby D.** (1994) Carbon and nitrogen cycling through soil microbial biomass at various temperatures. *Soil Biology & Biochemistry*, 26: 253-261.
- Nicolardot B, Recous S, Mary B.** (2001). Simulation of C and N mineralization during crop residue decomposition: a simple dynamic model based on the C:N ratio of the residues. *Plant and Soil*, 228: 83-103.
- Nocker A, Burr M, Camper AK.** (2007) Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology*, 54: 276-289.
- Nottingham AT, Griffiths H, Chamberlain PM, Stott AW, Tanner EVJ.** (2009) Soil priming by sugar and leaf-litter substrates: a link to microbial groups. *Applied Soil Ecology*, 42: 183-190.
- Oorts K, Laurent F, Mary B, Thiébeau P, Labreuche J, Nicolardot B.** (2007) Experimental and simulated soil mineral N dynamics for long-term tillage systems in northern France. *Soil and Tillage Research*, 94: 441-456.
- Oorts K, Nicolardot B, Merckx R, Richard G, Boizard H.** (2006) C and N mineralization of undisrupted and disrupted soil from different structural zones of conventional tillage and no-tillage systems in northern France. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2576-2586.
- Padmanabhan P, Padmanabhan S, DeRito C, Gray A, Gannon D, Snape JR, Tsai CS, Park, W, Jeon C, Madsen EL.** (2003) Respiration of ^{13}C -labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16 rRNA gene analysis of ^{13}C -labeled soil DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1614-1622.
- Pankhurst CE, Kirkby CA, Hawke BG, Harch BD.** (2002) Impact of a change in tillage and crop residue management practice on soil chemical and microbiological properties in a cereal-producing red duplex soil in NSW, Australia. *Biology and Fertility of Soils*, 35: 189-196.
- Parr JF, Papendick RI.** (1978) Factors affecting the decomposition of crop residues by microorganisms. In: Oschwld WR (eds) Crop residues management systems. publ. 31. ASA Spec., ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, pp 101-129.
- Pettersson M, Bååth E.** (2003) Temperature-dependent changes in the soil bacterial community in limed and unlimed soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 45: 13-21.
- Piccolo A.** (1996) Humus and soil conservation. In: Piccolo, A. (Ed.), Humic substances in terrestrial ecosystems. Elsevier, Amsterdam, pp. 225-264.
- Poll C, Brune T, Begerow D, Kandeler E.** (2010) Small-scale diversity and succession of fungi in the detritosphere of rye residues. *Microbial Ecology*, 59: 130-140.
- Poll C, Ingwersen J, Stemmer M, Gerzabek MH, Kandeler E.** (2006) Mechanisms of solute transport affect small-scale abundance and function of soil microorganisms in the detritosphere. *European Journal of Soil Science*, 57: 583-595.
- Poll C, Marhan S, Ingwersen J, Kandeler E.** (2008) Dynamics of litter carbon turnover and microbial abundance in a rye detritosphere. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1306-1321.
- Prosser JI, Rangel-Castro JI, Killham K.** (2006) Studying plant-microbe interactions using stable isotope technologies. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 98-102.
- Quaiser A, Ochsenreiter T, Lanz C, Schuster SC, Treusch AH, Eck J, Schleper C.** (2003) Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Molecular Microbiology*, 50: 563-575.

Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murell JC. (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 403: 649-646.

Rangel-Castro JI, Kilham K, Ostle N, Nicol GW, Anderson IC, Scrimgeour CM. (2005) Stable isotope probing analysis of the influence of liming on root exudates utilization by soil microorganisms. *Environmental Microbiology*, 7: 828-838.

Rangel-Castro JI, Prosser JI, Ostle N, Scrimgeour CM, Killham K, Meharg AA. (2005) Flux and turnover of fixed carbon in soil microbial biomass of limed and unlimed plots of an upland grassland ecosystem. *Environmental Microbiology*, 7: 544-552.

Ranjard L, Dequiedt S, Jolivet C, Saby NPA, Thioulouse J, Harmand J, Loisel P, Rapaport A, Fall S, Simonet P, Joffre R, Chemidlin-Prévost Bouré N, Maron P-A, Mougél C, Martin MP, Toutain B, Arrouays D, Lemanceau P. (2010) Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing French national initiative. *Agronomy for Sustainable Environment*, 30: 359-365.

Ranjard L, Echairi A, Nowak V, Lejon DPH, Nouaïm R, Chaussod R. (2006) Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural Cu treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. *FEMS Microbial Ecology*, 58: 303-315.

Ranjard L, Lejon DPH, Mougél C, Schehrer L, Merdinoglu D, Chaussod R. (2003) Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 5: 1111-1120.

Ranjard L, Poly F, Lata JC, Mougél C, Thioulouse J, Nazaret S. (2001) Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4479-4487.

Ranjard L, Poly F, Nazaret S. (2000) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, 151: 167-177.

Ranjard L, Richaume A. (2001) Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, 152: 707-716.

Rasmussen C. (2007) Soil mineralogy affects conifer forest soil carbon source utilization and microbial priming. *Soil Biology & Biochemistry*, 71: 1141-1150.

Recous S, Robin D, Darwis D, Mary B. (1995) Soil inorganic N availability: effect on maize. *Soil Biology & Biochemistry*, 27: 1529-1538.

Renella G, Landi L, Ascher J, Ceccherini MT, Pietramellara G, Nannipieri P. (2006) Phosphomonoesterase production and persistence and composition of bacterial communities during plant material decomposition in soils with different pH values. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 795-802.

Richard G, Roger-Estrade J. (2009) Le Sol. Dossier INRA. Editions Quae, 183p.

Rickard AH, Leach SA, Hall LS, Buswell CM, High NJ, Handley PS. (2002) Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3644-3650.

- Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG, Triplett EW.** (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 1: 283-290.
- Rui J, Peng J, Lu Y.** (2009) Succession of Bacterial Populations during Plant Residue Decomposition in Rice Field Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 4879-4886.
- Saitou N, Nei M.** (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sall S, Bertrand I, Chotte JL, Recous S.** (2007) Separate effects of the biochemical quality and N content of crop residues on C and N dynamics in soil. *Biology & Fertility of Soils*, 43: 797-804.
- Sarwar M, Kirkegaard JA, Wong PTW, Desmarchelier JM.** (1998) Biofumigation potential of brassicas - III. In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. *Plant and Soil*, 201: 103-112.
- Schimel JP, Gulledge J.** (1998) Microbial community structure and global trace gases. *Global Change Biology*, 4: 745-758.
- Schimel JP, Weintraub MN.** (2003) The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 549-563.
- Schlesinger WH, Andrews JA.** (2000) Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry*, 48: 7-20.
- Schulze WX, Gleixner G, Kaiser K, Guggenberger G, Mann M, Schulze E-D.** (2005) A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles. *Oecologia*, 142: 335-343.
- Sengeløv G, Kowalchuk GA, Sørensen SJ.** (2000) Influence of fungal-bacterial interactions on bacterial conjugation in the residuesphere. *Microbiology Ecology*, 31: 39-45.
- Setälä H, McLean MA.** (2004) Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. *Oecologia*, 139: 98-107.
- Sharma S, Rangger A, von Liitzow M, Insam H.** (1998) Functional diversity of soil bacterial communities increases after maize litter amendment. *European Journal of Soil Science*, 34: 53-60.
- Shepherd KD, Vanlauwe B, Gachengo CN, Palm CA.** (2005) Decomposition and mineralization of organic residues predicted using near infrared spectroscopy. *Plant and soil*, 277: 315-333.
- Shibu ME, Leffelaar PA, Van Keulen H, Aggarwal PK.** (2006) Quantitative description of soil organic matter dynamics – A review of approaches with reference to rice-based cropping systems. *Geoderma*, 137: 1-18.
- Spedding TA, Hamel C, Mehuy GR, Madramootoo CA.** (2004) Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 499-512.
- Stenberg B, Jensen LS, Nordkvist E, Breland TA, Pedersen A, Gudmundsson J, Bruun S, Salo T, Palmason F, Henriksen TM, Korsæth A.** (2004) Near infrared reflectance spectroscopy for quantification of crop residue, green manure and catch crop C and N fractions governing decomposition dynamics in soil. *Near Infrared Spectrosc.*, 12: 331-346.

- Stoeck T, Behnke A, Christen R, Amaral-Zettler L, Rodriguez-Mora MJ, Chistoserdov A, Orsi W, Edgcomb VP.** (2009) Massively parallel tag sequencing reveals the complexity of anaerobic marine protistan communities. *BMC Biology*, 7:72.
- Swift MJ, Andrén O, Brussaard L, Briones M, Couteaux M-M, Ekschmitt K, Kjoller A, Loiseau P, Smith S.** (1998) Global change, soil biodiversity, and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: three case studies. *Global Change Biology*, 4: 729-743.
- Takeuchi M, Sakane T, Yanagi M, Yamasato K, Hamana K, Yokota A.** (1995) Taxonomic study of bacteria isolated from plants: proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas asaccharolytica* sp. nov., and *Sphingomonas mali* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 334-341.
- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S, Olivier JM.** (1997) ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*, 7: 75-83.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** (1994) Clustal IW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Tobor-Kaplon MA, Bloem J, Römken PFAM, de Ruiter PC.** (2005) Functional stability of microbial communities in contaminated soils. *OIKOS*, 111: 119-129.
- Torsvik V, Daae FL, Sandaa R-A, Øvreås L.** (1998) Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64: 53-62.
- Torsvik V, Goksoyr J, Daae FL.** (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied & Environmental Microbiology*, 56: 782-787.
- Torsvik V, Øvreås L.** (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 240-245.
- Trinsoutrot I, Recous S, Bentz B, Lineres M, Cheneby D, Nicolardot B.** (2000a) Biochemical quality of crop residues and carbon and nitrogen mineralization kinetics under nonlimiting nitrogen conditions. *Soil Science Society of America Journal*, 64: 918-926.
- Trinsoutrot I, Recous S, Mary B, Nicolardot B.** (2000b) C and N fluxes of decomposing ¹³C and ¹⁵N *Brassica napus* L.: effects of residue composition and N content. *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 1717-1730.
- Van Soest PJ.** (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 46: 825-835.
- Vanlauwe B, Nwoke OCN, Sangina N, Merckx R.** (1996) Impact of residues quality on the C and N mineralization of leaf and root residues of three agroforestry species. *Plant Soil*, 183: 221-231.
- Veselá A, Barros AS, Synytsya A, Delgadillo I, Copikova J, Coimbra MA.** (2007) Infrared spectroscopy and outer product analysis for quantification of fat, nitrogen, and moisture of cocoa powder. *Analytica Chimica Acta*, 601: 77-86.
- Von Lützow M, Kögel-Knabner I.** (2009) Temperature sensitivity of soil organic matter decomposition-what do we know? *Biology & Fertility of Soils*, 46: 1-15.
- Waldrop MP, Firestone MK.** (2004) Microbial community utilization of recalcitrant and simple carbon compounds: impact of oak-woodland plant communities. *Oecologia*, 138: 275-284

Wang H, Curtin D, Jame YW, McConkey BG, Zhou HF. (2002) Simulation of soil carbon dioxide flux during plant residue decomposition. *Soil Science Society of America Journal*, 66: 1304-1310.

Wardle DA. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biological Reviews*, 67: 321-358.

Welbaum GE, Sturz AV, Dong ZM, Nowak J. (2004) Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Critical reviews in plant sciences*, 23: 175-193.

White PM, Rice CW. (2009) Tillage effects on microbial and carbon dynamics during plant residue decomposition. *Science Society of America Journal*, 73: 138-145.

Wittmann C, Zeng A-P, Deckwer W-D. (1998) Physiological characterization and cultivation strategies of the pentachlorophenol-degrading bacteria *Sphingomonas chlorophenolica* RA2 and *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP-1. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 21: 315-321.

Wohl DL, Arora S, Gladstone JR. (2004) Functional redundancy supports biodiversity and ecosystem function in a closed and constant environment. *Ecology*, 85: 1534-1540.

Workman JJr, Weyer L. (2008) Practical Guide To Interpretive Near-Infrared Spectroscopy (CRC Press, Taylor & Francis Group, New York).

Xu JM, Tang C, Chen ZL. (2006) Chemical composition controls residue decomposition in soil differing in initial pH. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 544-552.

Youssef NH, Elshahed MS. (2009) Diversity ranking among bacterial lineage in soil. *The ISME Journal*, 3: 305-313.

Zelenev VV, van Bruggen AHC, Semenov AM. (2005) Short-term wavelike dynamics of bacterial populations in response to nutrient input from fresh plant residues. *Microbial Ecology*, 49: 83-93.

Zelles L. (1999) Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biology & Fertility of Soils*, 29: 111-129.

Annexes

RESEARCH ARTICLE

Fingerprinting and diversity of bacterial *copA* genes in response to soil types, soil organic status and copper contamination

David P. H. Lejon¹, Virginie Nowak¹, Sabrina Bouko¹, Noémie Pascault¹, Christophe Mougel¹, Jean M. F. Martins² & Lionel Ranjard¹

¹INRA-Université de Bourgogne, UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement, CMSE, Dijon, France; and ²Laboratoire d'études des Transferts en Hydrologie et Environnement, UMR 5564, CNRS, IRD, Grenoble Universités, Grenoble, France

Correspondence: Lionel Ranjard, INRA-Université de Bourgogne, UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement, CMSE, 17 Rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon, France. Tel.: +33 3 80 69 30 88; fax: +33 3 80 69 32 24; e-mail: lionel.ranjard@dijon.inra.fr

Received 27 February 2007; revised 29 May 2007; accepted 29 May 2007.
First published online August 2007.

DOI:10.1111/j.1574-6941.2007.00365.x

Editor: Christoph Tebbe

Keywords

genetic diversity; copper resistance genes; soil bacterial community; genetic structure; soil organic matter; copper impact.

Abstract

A molecular fingerprinting assay was developed to assess the diversity of *copA* genes, one of the genetic determinants involved in bacterial resistance to copper. Consensus primers of the *copA* genes were deduced from an alignment of sequences from proteobacterial strains. A PCR detection procedure was optimized for bacterial strains and allowed the description of a novel *copA* genetic determinant in *Pseudomonas fluorescens*. The *copA* DNA fingerprinting procedure was optimized for DNA directly extracted from soils differing in their physico-chemical characteristics and in their organic status (SOS). Particular *copA* genetic structures were obtained for each studied soil and a coinertia analysis with soil physico-chemical characteristics revealed the strong influence of pH, soil texture and the quality of soil organic matter. The molecular phylogeny of *copA* gene confirmed that specific *copA* genes clusters are specific for each SOS. Furthermore, this study demonstrates that this approach was sensitive to short-term responses of *copA* gene diversity to copper additions to soil samples, suggesting that community adaptation is preferentially controlled by the diversity of the innate *copA* genes rather than by the bioavailability of the metal.

Introduction

Copper has been described for many years as an essential micronutrient for eukaryotes and prokaryotes but also as a toxic element in high concentrations, leading to detrimental effects on the metabolism of the cell (Brown *et al.*, 1992). Copper appears to be widespread in the environment, especially in agricultural soils, as a result of the application of pesticides to control plant diseases, or because of its presence as a contaminant in organic and mineral amendments (Tom-Petersen *et al.*, 2003). The combination of the significant accumulation of copper in surface soils (Flores-Vélez, 1996) and its toxicity to living organisms can therefore lead to harmful and irreversible effects on soil biological functioning and quality (Giller *et al.*, 1998).

Numerous studies have already depicted the negative effect of copper contamination on soil microbial biomass and soil key functions like mineralization of organic carbon compounds (Giller *et al.*, 1998; Dumestre *et al.*, 1999), nitrification (Sauve *et al.*, 1999) and nitrogen fixation

(McGrath, 1994). Along these lines, modifications in the population structure and diversity of the soil microbial communities as a consequence of copper contamination have been recorded by several authors following the analysis of the total phospholipid fatty acids (PLFA; Turpeinen *et al.*, 2004) or the means of new molecular methods based on the characterization of nucleic acids directly extracted from soil (Smit *et al.*, 1997; Tom-Petersen *et al.*, 2003; Ranjard *et al.*, 2006). In all cases, the impact of copper on the microbial communities found in different experiments remains difficult to compare because most studies have been limited to one soil type, without taking into account that copper bioavailability is greatly influenced by soil characteristics (Tom-Petersen *et al.*, 2003). In other respects, several authors have put forward the hypothesis that the innate composition and diversity of the indigenous community might influence its sensitivity/resistance to copper contamination and therefore partly control copper impact (Girvan *et al.*, 2004; Ranjard *et al.*, 2006). From an ecological point of view, the resistance of a community is generally described as

the static component of its stability and can result from a greater or lesser capacity to adapt to a given perturbation (Holling, 1973). At the community level, microbial adaptation is generally expressed as an increase in adapted (i.e. metal-resistant) populations and a decrease in sensitive ones (Duxbury & Bicknell, 1983; Doelman *et al.*, 1994; Ranjard *et al.*, 1997). Such an adaptation leads to a new population and functional structure (Tom-Petersen *et al.*, 2003; Ranjard *et al.*, 2006) specific to the adapted community (Baath *et al.*, 1998) which is better suited to survive in the new surrounding conditions.

Pseudomonas syringae, *Escherichia coli* and *Xanthomonas campestris* bacteria were the first populations reported to survive in the presence of high copper concentrations (Cooksey, 1994). Such an efficient resistance to copper resulted from the presence of additional genetic determinants organized in operons, the *cop* or *pco* operons (Cooksey, 1994). These operons are genetically homologous and encode a copper resistance mechanism that may involve copper sequestration and/or enzymatic transformation. (Cooksey, 1994; Rensing & Grass, 2003). More recently, several bacterial strains such as *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Borremans *et al.*, 2001), *Ralstonia solanacearum* (Salanoubat *et al.*, 2002), *Xylella fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000), *X. campestris* (da Silva *et al.*, 2002), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 (da Silva *et al.*, 2002), *P. syringae* (Mellano & Cooksey, 1988), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.*, 2000), *Aeromonas veronii* bv. *sobria* (Francki *et al.*, 2000) and *Caulobacter crescentus* (Nierman *et al.*, 2001) have been shown to be resistant to copper and to possess all or part of these operons. A compilation of data available in the literature and in the international genetic databases highlights that the copper resistance of these strains has always implied the presence of *copA* homologous genes encoding a periplasmic inducible multi-copper oxidase (Nies, 1999; Rensing & Grass, 2003). Consequently, this genetic determinant may represent a relevant marker to resolve the genetic structure and diversity of the copper-resistant functional community.

The main objective of this study was to evaluate the heterogeneity of bacterial *copA* genes harboured by bacterial communities in different soils, in soils receiving different organic amendments, or in soils artificially contaminated by copper. We designed consensus PCR primers targeting *copA* genes in *Proteobacteria* and tested these primers for specificity and coverage before they were used for DNA fingerprinting of community DNA.

Materials and methods

Reference strains and *copA* sequences

copA gene sequences belonging to *Proteobacteria* and demonstrated as functionally involved in copper resistance were selected from the GenBank database (Table 1). *copA* nucleotide sequences were aligned using CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997) to identify conserved regions and design consensus primers (Table 2). *copA* PCR primers were tested on bacterial reference strains (Table 3). Bacteria were cultured in Luria–Bertani liquid medium at 28 °C for 24 h.

Soil sampling

Five vineyard soils were used in this study. Auvillars, Chinon and Mâcon NA represented soil types differing in their pedologic characteristics (texture, C_{org}, pH; Table 4). Mâcon NA, S and CC represented the same mineral matrix differing in their soil organic status (SOS) in terms of quantity and quality of SOM (Table 4). These latter soils were obtained from a long-term soil organic management (15 years old) resulting from repeated amendments with straw (S), conifer compost (CC) or not amended (NA) (Lejon *et al.*, 2007).

Soil incubation experiment

Soil samples (150 g dry weight, sieved at 4 mm) were incubated in 2 L glass jars hermetically sealed. Soils were contaminated with CuCl₂ to reach a final concentration of

Table 1. *copA* gene sequences used for the design of PCR primers

Organisms	Accession No.	References
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	10047060	Borremans <i>et al.</i> (2001)
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	12057211	Simpson <i>et al.</i> (2000)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913	21111566	da Silva <i>et al.</i> (2002)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	21110006	da Silva <i>et al.</i> (2002)
<i>Xanthomonas campestris</i> <i>juglandis</i>	349160	Lee <i>et al.</i> (1994)
<i>Pseudomonas syringae</i> plasmid pPaCu1	8272380	GenBank submission by Nakajima, 1999
<i>Escherichia coli</i> pRJ1004	619126	Brown <i>et al.</i> (1992)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	151187	Mellano & Cooksey (1988)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	110227054	Stover <i>et al.</i> (2000)
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	30407128	Salanoubat <i>et al.</i> (2002)
<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>Sobria</i>	6941899	Francki <i>et al.</i> (2000)
<i>Caulobacter crescentus</i>	13422236	Nierman <i>et al.</i> (2001)

Table 2. Alignment of *copA* sequences from the GenBank database and the forward and reverse deduced degenerated primers

Organisms	Sequences	Primer locations (pb)
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 (gi_10047060)	TCGAACAAACCGGCAGCTACTGGTATCACTCGCA	456
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c (gi_12057211)	TACACCAATCT GGGACCTACTGGTACCACAGCCAC	444
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913 (gi_21111566)	TGCGCCAATCC GGCACCTACTGGTA TCACAGCCAT	429
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 (gi_21110006)	TGCGCCAGTCC GGCACCTACTGGTACCACAGCCAT	438
<i>Xanthomonas campestris juglandis</i> (gi_349160)	TCCAGCAGGGT GGCACCTACTGGTATCACAGTCAT	459
<i>Pseudomonas syringae</i> plasmid pPaCu1 (gi_8272380)	TCAAGCAGAATGGCAC TTAAGTGGTACCACAGCCAT	408
<i>Escherichia coli</i> pRJ1004 (gi_619126)	TTAAGCAGAACGGGACTTACTGGTACCACAGCCAT	527
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (gi_151187)	TCCAACAGAACGGGACGTACTGGTACCACAGCCAC	408
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (gi_110227054)	TCCGGCAGAACGGCACCTACTGGTACCACAGCCAC	405
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000 (gi_30407128)	TCCGGCAGAGCGGCAGCTACTGGTATCACTCGCAC	448
<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>sobria</i> (gi_6941899)	TGGAGCAGTCT GGCACCTACTGGTA TCACTCTCAT	432
<i>Caulobacter crescentus</i> (gi_13422236)	TCCGTCAGTCG GGCACCTACTGGTGGCACAGCCAT	426
Deduced degenerated primer: Coprun F2	5'-GG(GC)A(GC)(GCT)TACTGGT(AG)(GCT)CAC-3'	
	5'-GG SA SBTACTGGTRBCAC-3'	
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 (gi_10047060)	TCTGCAC AACGACACGATGATGACTCACCC	1643
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c (gi_12057211)	CTTGGTG AATGACACCATGATGGCGCACCC	1631
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913 (gi_21111566)	GCTGGTC AACGACACCATGATGCAGCACCC	1604
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 (gi_21110006)	GCTGGTC AACGACACCATGATGCAGCACCC	1577
<i>Xanthomonas campestris juglandis</i> (gi_349160)	CCTGGTC AACGACACCATGATGTCGCACCC	1703
<i>Pseudomonas syringae</i> plasmid pPaCu1 (gi_8272380)	ACTGGTA AACGACACCATGATGACCCACCC	1673
<i>Escherichia coli</i> pRJ1004 (gi_619126)	GCTGATC AACGATACCATGATGACTCACCC	1732
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (gi_151187)	GCTGGTG AATGACACGATGATGACTCACCC	1625
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (gi_110227054)	CCTGGTC AACGACACCATGATGACCCACCC	1682
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000 megaplasmid (gi_30407128)	CCTGCAC AACGACACGATGATGACGCACCC	1617
<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>sobria</i> (gi_6941899)	CCTTCAT AATGATACCATGATGACACATCC	1724
<i>Caulobacter crescentus</i> (gi_13422236)	GCTGATC AACGACACCATGATGGCCATCC	1493
Deduced degenerated primer: Coprun R1	5'-TG(AGCT)G(ACT)CATCAT(GC)GT(AG)TC(AG)TT-3'	
	5'-TGNGHCATCATSGTRTCRTT-3'	

Bold type indicates nucleotides that are conserved in all 12 sequences. Regarding degenerated primer, the following one-letter code was used for variable sites: W = A or T; M = A or C; R = A or G; Y = C or T; K = G or T; S = G or C; H = A; T or C; D = G, A or T; B = G, T or C; V = G, A or C.

250 mg Cu kg⁻¹ of soil. Uncontaminated control microcosms were supplemented with pure water (H₂O). The solution volume added was calculated to reach 80% of the water-holding capacity of the soil. Soil microcosms were incubated in the dark at 20 °C for 15 days, with weekly aeration and verification of soil water content.

DNA extraction and PCR amplification of *copA* genes

Genomic DNA from bacterial strains was obtained using the Qiaquick extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Purified DNA samples were resolved and quantified by comparison with a standard curve of calf thymus DNA (Biorad, Marnes-La-Coquette, France) by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide (Sambrook & Russel, 2001). Fragments of the *copA* gene from bacterial DNA strains were amplified by the means of degenerated oligonucleotides CoprunF2 and CoprunR1 designed in this study (Table 2). PCR reactions were conducted in a total volume of 50 µL with 5 µL of 10 × PCR buffer,

200 µM (each) deoxyribonucleoside triphosphate, 1 U of *Taq* polymerase (Qbiogene, Illkirch, France), 50 ng of DNA, 6 µM (each) primer. DNA amplification was carried out on a DNA Thermal Cycler (Eppendorf, Le Pecq, France) using the following programme: initial denaturation for 3 min at 94 °C, 35 cycles of denaturation (1 min at 94 °C), annealing (1 min at 55 °C), extension (1 min at 72 °C), and a final extension (5 min at 72 °C). PCR products were visualized through a 1.5% agarose gel electrophoresis by ethidium bromide staining.

Soil DNA was extracted from Auvillars, Chinon and Mâcon NA soils as well as from Mâcon NA, S and CC soils in contaminated and control microcosms using the method described by Ranjard *et al.* (2003). Fragments of the *copA* gene were amplified with primers CoprunF2 and CoprunR1. Hot-start PCR amplification was performed in a total volume of 25 µL with 2.5 µL of 10 × PCR buffer, 200 µM (each) deoxyribonucleoside triphosphate, 2 U of *Taq* polymerase (Qbiogene), 25 ng of soil DNA, 6 µM (each) primer, and AmpliWax bead (Applied Biosystems, CA). DNA amplification was carried out as recommended by the

Table 3. Bacterial strains used in this study and tested for PCR amplification with *copA* gene primers set

Strains	Phylum	Copper resistance	<i>CopA</i> detection	Sources
<i>Nocardia transvalensis</i>	Actinobacteria	Nkcr	—	Philippot L., personal data, INRA Dijon, France
<i>Rhodococcus rhodocrous</i>	Actinobacteria	Nkcr	—	Hartman A., personal data, INRA Dijon, France
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 123	Alphaproteobacteria	Nkcr	—	Keyser <i>et al.</i> (1982)
<i>Ensifer melliloti</i> RCR 2011	Alphaproteobacteria	Nkcr	—	ATCC 51124
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> G49	Alphaproteobacteria	Nkcr	—	IARI, Division of Microbiology, New Delhi
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Alphaproteobacteria	Nkcr	—	ATCC 33970
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	Betaproteobacteria	+	+	Borremans <i>et al.</i> (2001)
<i>Alcaligenes faecalis</i> 8750	Betaproteobacteria	Nkcr	—	ATCC 8750
<i>Variovorax</i> sp.	Betaproteobacteria	Nkcr	—	Offre <i>et al.</i> (2007)
<i>Collimonas fungivorans</i>	Betaproteobacteria	Nkcr	—	Offre <i>et al.</i> (2007)
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	Firmicutes	Nkcr	—	ATCC BAA-679
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Firmicutes	Nkcr	—	Cheneby <i>et al.</i> (2004)
<i>Streptomyces echinatus</i>	Firmicutes	Nkcr	—	Philippot L., personal data, INRA Dijon, France
<i>Enterococcus hirae</i>	Firmicutes	+	—	ATCC9790
<i>Staphylococcus</i> sp.	Firmicutes	+	—	Lejon <i>et al.</i> , personal data, INRA Dijon, France
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Firmicutes	Nkcr	—	Hartman A., personal data
<i>Listeria innocua</i>	Firmicutes	Nkcr	—	Hartman A., personal data
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Gammaproteobacteria	+	+	Mellano & Cooksey (1988)
<i>Xanthomonas campestris</i>	Gammaproteobacteria	+	+	Mellano & Cooksey (1988)
<i>Escherichia coli</i> PRJ1004	Gammaproteobacteria	+	+	Ranjard L., personal data, INRA Dijon, France
<i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12	Gammaproteobacteria	Nkcr	+	Eparvier <i>et al.</i> (1991)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Gammaproteobacteria	+	+	ATCC 47054

Nkcr, no known copper resistance.

Table 4. Physico-chemical characteristics of the soils used in this study

	Texture			pH	WHC (mL H ₂ O 100 g soil ⁻¹)	CaCO ₃ (g kg ⁻¹)	Organic C (g kg ⁻¹)	Organic N (g kg ⁻¹)	C/N	Cu tot (mg kg ⁻¹)	Cu EDTA (mg kg ⁻¹)
	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)								
Auvillars	10	29	61	7.2	25	0	10.5	0.98	11	52	28
Chinon	9	4	87	8.0	25	112	7.3	0.60	12	52	52
Mâcon NA	32	57	11	6.8	30	0	12.9	1.10	12	62	25
Mâcon S	32	58	10	6.7	35	0	19.7	1.50	13	60	27
Mâcon CC	31	56	13	6.6	40	0	45.9	2.60	18	60	22

manufacturer for Ampliwx and by temperature cycling as described above.

copA DNA fingerprinting

The purified PCR products from soil DNA were quantified on a 1.5% agarose gel using Smart Ladder (Eurogentec, Belgium), and equal amounts of the PCR products for each sample (c. 500 ng) were digested at 37 °C with *HinfI* overnight. The digested PCR products were separated on a 6% acrylamide–bisacrylamide (29:1) gel for 20 h at 5 mA. The gel was then stained with SYBR Green II (Molecular Probes, Canada), scanned with a Storm 960 phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) and analyzed using 1D-SCAN software (ScienceTec, Courtaboeuf, France). The software converted fluorescence data into electrophoretograms where peaks represented DNA fragments. The peak height was calculated in conjunction with the median filter

option and the Gaussian integration in 1D-Scan, and represented the relative proportion of the fragments in the total PCR products. Lengths (in base pairs) were calculated using a size reference mixture consisting of DNA-fragments ranging from 100 to 2000 bp. The standard was made by PCR amplifications of different fragment sizes of phage M13 mp18 (Promega, Charbonnières, France).

copA clone libraries

Clone libraries were constructed with *copA* PCR products generated from NA, S and CC soil microcosms treated with H₂O. PCR products were ligated into pGEM-T Easy according to the manufacturer's instructions (Promega). Ligated products were transformed into competent *E. coli* DH5α cells following the heat shock protocol described in the manufacturer's technical manual. Transformed cells were incubated 1 h at 37 °C on a rotary shaker at 200 r.p.m. before

Table 5. Amounts and characteristics of humic substances from Mâcon NA, S and CC soils (from Lejon *et al.*, 2007)

	Humic substances mgC g ⁻¹ soil*	Humic acid mgC g ⁻¹ soil†	Fulvic acid mgC g ⁻¹ soil†	β-humus mgC g ⁻¹ soil†	HA/FA ratio
NA	1.70 ^a ± 0.20 (12.7%)	0.60 ^a ± 0.06 (35.3%)	0.60 ^a ± 0.03 (35.3%)	0.50 ^a ± 0.08 (29.4%)	1.00 ^a
S	3.50 ^a ± 0.49 (17.5%)	1.00 ^a ± 0.10 (29.0%)	1.85 ^b ± 0.09 (52.9%)	0.60 ^a ± 0.09 (17.1%)	0.55 ^b
CC	9.10 ^b ± 1.20 (25.1%)	5.0 ^b ± 0.50 (54.9%)	2.90 ^c ± 0.15 (31.9%)	1.20 ^b ± 0.18 (13.2%)	1.72 ^c

Values are means ± SD for three independent replicates.

Different superscript letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between the organic inputs for a given experimental site.

*Percentages in parentheses are calculated as follow: humic substances (mgC g⁻¹ soil)/soil organic C (mgC g⁻¹ soil).

†Percentages in parentheses are calculated as follow: humic acids or fulvic acid or β-humus (mgC g⁻¹ soil)/humic substances (mgC g⁻¹ soil).

plating onto LB plates containing 100 µg mL⁻¹ ampicillin, 0.5 mM IPTG and 80 µg mL⁻¹ X-Gal. White *E. coli* colonies were resuspended in 10 µL dH₂O, lysed for 10 min at 95 °C and subsequently briefly centrifuged. One microlitre of supernatant was used as template in a 10 µL PCR reaction using 1 µM of T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') and SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3') promoter primers. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and clones containing DNA fragments of expected length were selected. Fifty clones in each library were randomly chosen and sequenced by GENOME express (<http://www.genome-express.com>) with a Sangers sequencing protocol using the T7-primers.

Sequences analysis, phylogeny inference and definition of clusters

Several *copA* gene sequences (Table 1) from the GenBank database were aligned using the CLUSTALX algorithm (Thompson *et al.*, 1997) to identify conserved regions for designing consensus primers. The partial sequences amplified and cloned from soil DNA were submitted to the ORF Finder, a graphical analysis tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), to identify the adequate reading frames and to deduce amino acid sequences, which were compared with sequences found in the GenBank Database (Benson *et al.*, 2005) using the BLASTP algorithm (Altschul *et al.*, 1990). Multiple-alignments were performed using the CLUSTALX algorithm (Thompson *et al.*, 1997) on DNA and protein sequences. Distance matrices were calculated using the two-parameter model of Kimura (1980) for DNA sequences and a Poisson correction for protein sequences (Galtier *et al.*, 1996). A molecular phylogenetic tree was constructed using PHYLWIN (Galtier *et al.*, 1996) with the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987). Bootstrap percentages (1000 bootstrap replications) were used to test the robustness of phylogenetic relationships within the tree (Felsenstein, 1985).

Statistical analysis

Data obtained from the 1D-SCAN software were converted into a table summarizing the band presence (i.e. peak) and intensity (i.e. height or area of peak) using the PREPRISA

program (Ranjard *et al.*, 2001). For *copA* DNA profiles, 50 peaks, a 2-bp resolution and the Gaussian peak area were used for a robust analysis of profiles. A covariance matrix (microbial communities as rows and bands as columns) was subjected to principal component analysis (PCA), which provided an ordination of bacterial communities in a factorial map based on the scores of the first two principal components. Statistical ellipses representing 90% confidence were drawn over the replicates of soil samples. The Monte Carlo test with 1000 permutations was used to evaluate the significance of the discrimination revealed by PCA.

A coinertia analysis (Doledec *et al.*, 1999; Fromin *et al.*, 2002; Lejon *et al.*, 2007) was used to study the relationships between the *copA* genetic structure and the set of either soil characteristics (Table 4) or SOM characteristics (Table 5). The coupling of the soil characteristics correlation matrix and the *copA* covariance data matrix produced new PC1 and PC2 coinertia axes by projecting variables and sampling plots in a new factorial map. A randomization test of 1000 permutations was carried out to assess the statistical significance of the costructure (Monte Carlo test). When the costructure between *copA* and soil characteristics was significant, the corresponding correlation circle of soil characteristics was drawn and superposed on the *copA* factorial map to highlight the contribution of the soil parameters to the distinction of the *copA* genetic structure among the different soils.

A factorial correspondence analysis (FCA) was applied to study the distribution of *copA* diversity among the different soils (NA, S and CC) by building a covariance data matrix with the frequency distribution of each cluster in each soil. The corresponding correlation circle was drawn, and arrows highlighted the relative contribution of each cluster to soil discrimination.

PCA, coinertia analysis, FCA and the Monte Carlo test were performed using ADE-4 software (Thioulouse *et al.*, 1997).

Results and discussion

Optimization of *copA* PCR detection and specificity

Consensus primers for the *copA* genes were deduced from an alignment of 12 *copA* sequences from proteobacterial strains

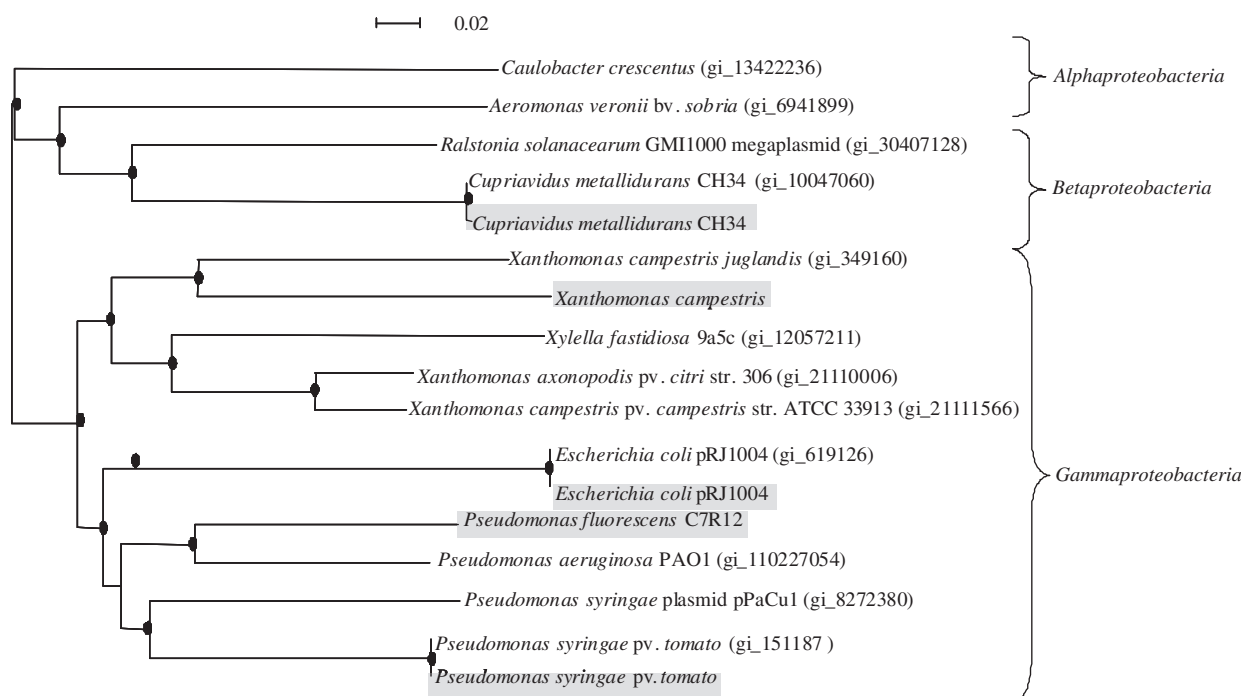


Fig. 1. Neighbour-joining phylogenetic tree representing *copA* nucleotide sequences from reference strains. Bootstrap values were estimated from 1000 replicates. Nineteen sequences were aligned. Horizontal distances are proportional to observed divergences expressed in substitutions per 100 sites. Bootstrap values above 80% are indicated with a black spot. Shading indicates sequences obtained after PCR amplification of *copA* gene from pure culture. Non-shaded text indicates sequences obtained from databases.

demonstrated as being copper resistant and available in the GenBank database (Table 1). The alignment of *copA* nucleotide sequences revealed only two conserved regions useful for designing degenerated forward and reverse primers: CoprunR1 and CoprunF2 (Table 2). Furthermore, a size polymorphism of this zone was recorded among determinants that ranged from 1067 bp for *Caul. crescentus* to 1277 bp for *P. aeruginosa* PAO1 (Table 2). This polymorphism emphasized the high diversity of this genetic determinant, probably due to its ancestral origin and long-term divergence between organisms (Cooksey, 1994; Nies, 1999). To obtain a maximal sensitivity for *copA* amplification from bacterial strains and soil DNA, PCR amplification was optimized by testing various hybridization temperatures, number of PCR cycles, types of *Taq* DNA polymerase, *Taq* enhancer and $MgCl_2$ and primers concentrations (data not shown). In a first step, *copA* detection specificity was tested through the PCR amplification of genomic DNA from known resistant and sensitive bacterial strains (Table 3). PCR products of the expected size (c. 1200 bp) were generated from genomic DNA of *Cupriavidus metallidurans* CH34, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *X. campestris*, *E. coli* PRJ1004 and *Pseudomonas putida* KT2440. Furthermore, a positive amplification was also obtained for *P. fluorescens* C7R12 leading to the description of a novel *copA* genetic determinant (deposited in the GenBank under

the number EF394595). In parallel, this strain was copper resistant as it was able to grow in YG-culture media supplemented with $CuCl_2$ (2 mM) as described by Kunito *et al.* (2001) (data not shown).

The PCR-products from these strains were sequenced and a phylogenetic tree was built up incorporating the 12 reference *copA* sequences (Table 1; Fig. 1). The phylogenetic tree confirmed the similarity between expected and amplified sequences for *Cup. metallidurans* CH34, *P. syringae* pv. *tomato*, *X. campestris* and *E. coli* PRJ1004, thus demonstrating the specificity of the designed primers. This tree also evidenced the clustering of *copA* sequences from *P. fluorescens* C7R12 with the other *copA* from the *Pseudomonas* group.

Analysis of *copA* genetic structure in soils of variable physico-chemical characteristics

A *copA* DNA fingerprinting procedure was tested directly on soil. Total DNA from three different soils (Auvillars, Chinon and Mâcon NA; Table 4) was submitted to *copA* gene PCR amplification and to DNA fingerprinting using the restriction enzyme *HinfI*. This enzyme was chosen by testing various restriction enzymes *in silico* (data not shown) to obtain the best discrimination between the different *copA* sequences (Table 1).

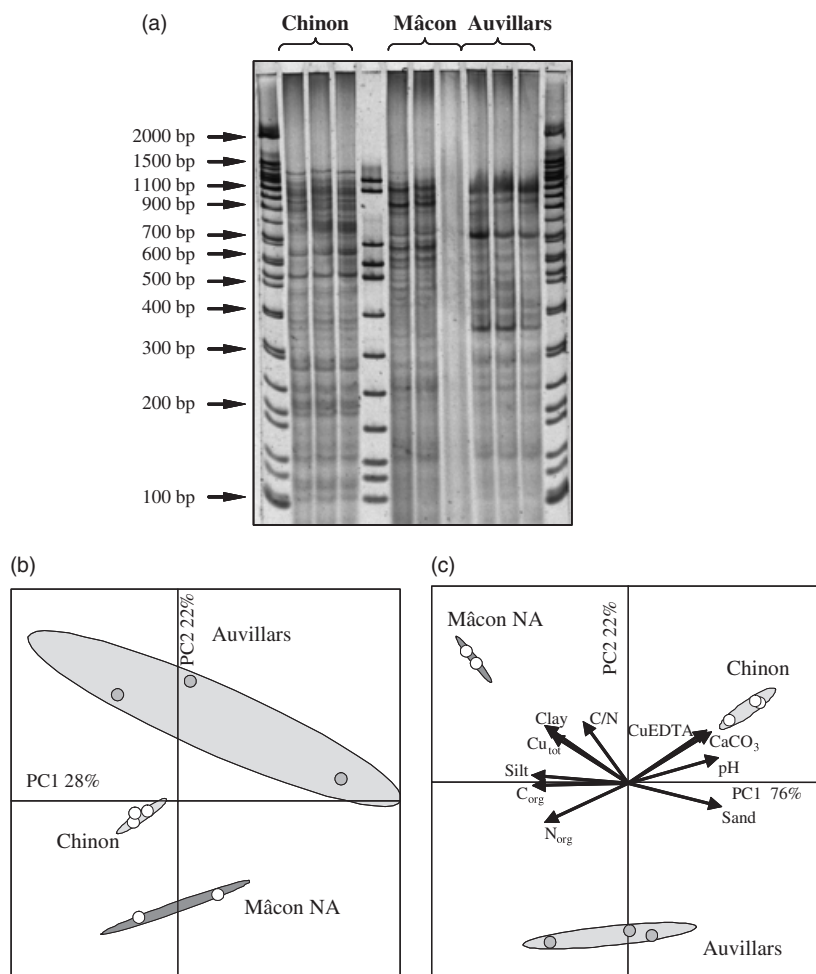


Fig. 2. *copA* DNA fingerprinting gel (a), principal component (PC1 $\times$ PC2) factorial map (b) generated from profiles obtained for the three different soils (Auvillars, Chinon, and Mâcon NA). Coinertia (PC1 $\times$ PC2) factorial map (c) generated from profiles and physico-chemical characteristics correlation matrices obtained for the three different soils (Auvillars, Chinon, and Mâcon NA). Arrows represent the contribution of each physico-chemical characteristic to the discrimination of the *copA* genetic structure indigenous to the different soils.

Fingerprinting of the *copA* determinants by electrophoretic separation provided complex profiles with bands ranging from 100 bp to about 1300 bp for Chinon, Mâcon NA and Auvillars soils (Fig. 2a). Such an observation is in agreement with the high diversity found among *copA* genetic determinants, as discussed above (Brown *et al.*, 1992; Cooksey, 1994). In another respect, our results also indicated a high diversity of genes encoding for copper adaptation in pristine or weakly contaminated soils such as Auvillars and Mâcon. However, the distribution of metals in the environmental matrix is known to be heterogeneous, with some micro-niches having high concentrations that may maintain a selection of resistant organisms (Ranjard *et al.*, 2000). On the other hand, as hypothesized by Bruce *et al.* (1995), a high diversity of genes encoding for metal adaptation in pristine soil can also result from (i) the close association of these genes with other genes involved in the metabolism and/or the fitness of bacteria in such an environment, and/or (ii) their role in cellular functions other than copper resistance (metal homeostasis etc.). PCA confirmed the significant discrimination between soils, essentially on the second axis,

explaining 22% of the variability (Fig. 2b). Our results suggest that different soil physico-chemical characteristics might induce a diversity of *copA* determinant. A coinertia analysis was performed to better evaluate the influence of soil characteristics on the *copA* genetic structure (Fig. 2c). The Monte Carlo tests revealed a weak but significant costructure between the *copA* genetic structure and the soil characteristics ($P < 0.25$). The new factorial map deduced from the coinertia analysis of the costructure, confirmed that the *copA* genetic structure of Chinon soil was significantly discriminated from Auvillars and Mâcon NA soils on the PC1 coinertia axes, which explained 76% of the variability (Fig. 2c). Superposition of the corresponding correlation circle of physico-chemical characteristics to the PCA factorial map revealed that the particular genetic structure of Chinon was mainly explained by its texture (sandy soil) as well as its higher pH. Our observation is in agreement with recent studies depicting pH as one of the soil characteristics that have the greatest influence on bacterial diversity in soil (Fierer & Jackson, 2006). Coinertia analysis also revealed that the particular genetic structure of Chinon soil could

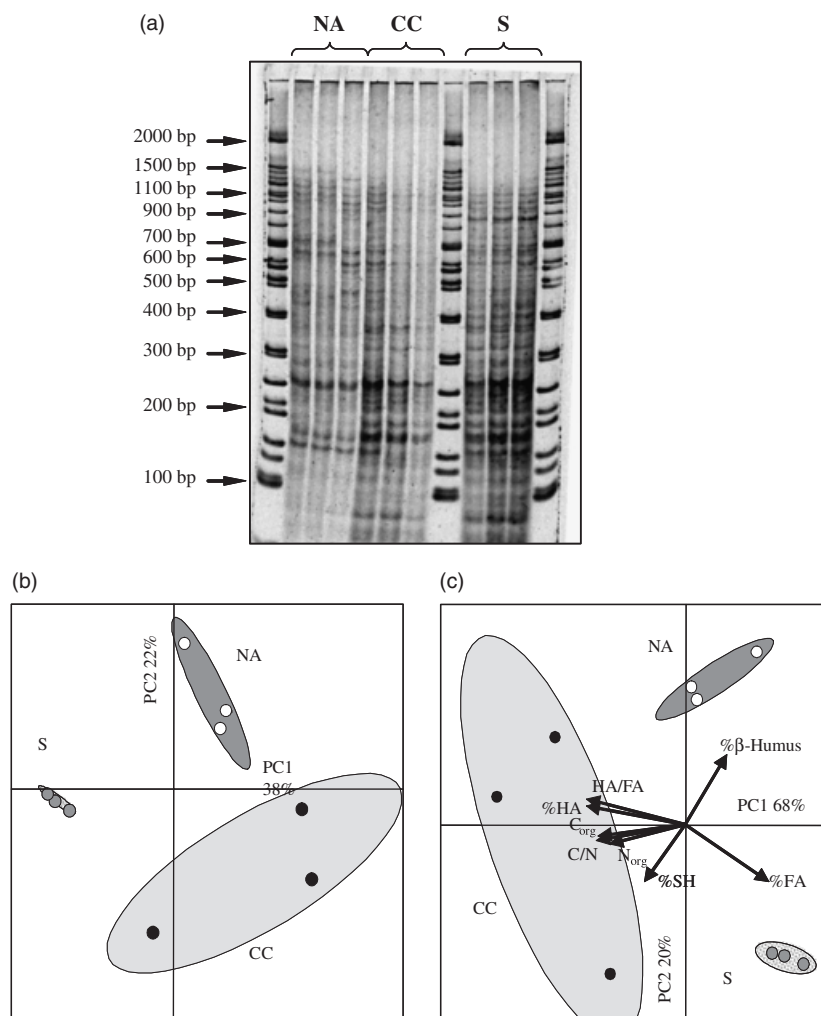


Fig. 3. *copA* DNA fingerprinting gel (a), principal component (PC1 × PC2) factorial map (b) generated from *copA* profiles of Mâcon NA, S and CC soils. Coinertia (PC1 × PC2) factorial map (c) generated from *copA* profiles covariance matrix and SOM characteristics correlation matrix obtained for Mâcon NA, S and CC soils. Arrows represent the contribution of each SOM characteristic to the discrimination of the *copA* genetic structure.

also be partly explained by a higher copper extractability, leading generally to a higher copper toxicity (Huysman *et al.*, 1994), as 52 mg Cu kg⁻¹ soil of EDTA- extractable copper were measured compared to about 25 mg Cu kg⁻¹ soil for Mâcon NA and Auvillars soils (Fig. 2c; Table 4).

Analysis of *copA* genetic structure and diversity in soils of different organic status

The soil organic status, i.e. the type and content of soil organic matter, is well known to strongly influence the density, the activity and also the diversity of indigenous bacterial communities (Marschner *et al.*, 2003; Lejon *et al.*, 2005, 2007). In view of this, we characterized the *copA* genetic structure and diversity in the three Mâcon soils (NA, S and CC) exhibiting the same mineral matrix but different SOS, as previously described [Table 5, taken from Lejon *et al.*, (2007)]. In fact, electrophoretic profiles obtained from these three soils revealed that each SOS provided a

particular *copA* pattern (Fig. 3a), as confirmed by the PCA factorial map (Fig. 3b). NA, S and CC soils were discriminated both on the first and the second axis, which explained, respectively, 38% and 22% of the total variability.

A coinertia analysis was performed using the *copA* PCA data and the SOM characteristics (Table 5). The Monte Carlo test revealed a highly significant costructure ($P < 0.007$), suggesting that the SOS had a strong influence on the *copA* genetic structure. The new factorial map deduced from the coinertia analysis of the costructure confirmed that the *copA* genetic structure of the CC soil was discriminated from the NA and S soils on the PC1 coinertia axes, which explained 68% of the variability (Fig. 3c). The superposition of the corresponding correlation circle of SOM characteristics onto the *copA* factorial map revealed that the discrimination of the CC soil was mainly explained by a higher amount of SOM (higher C_{org} and N_{org} contents) as well as by SOM quality in terms of C/N ratio and higher content of humic acids [higher C/N and HA

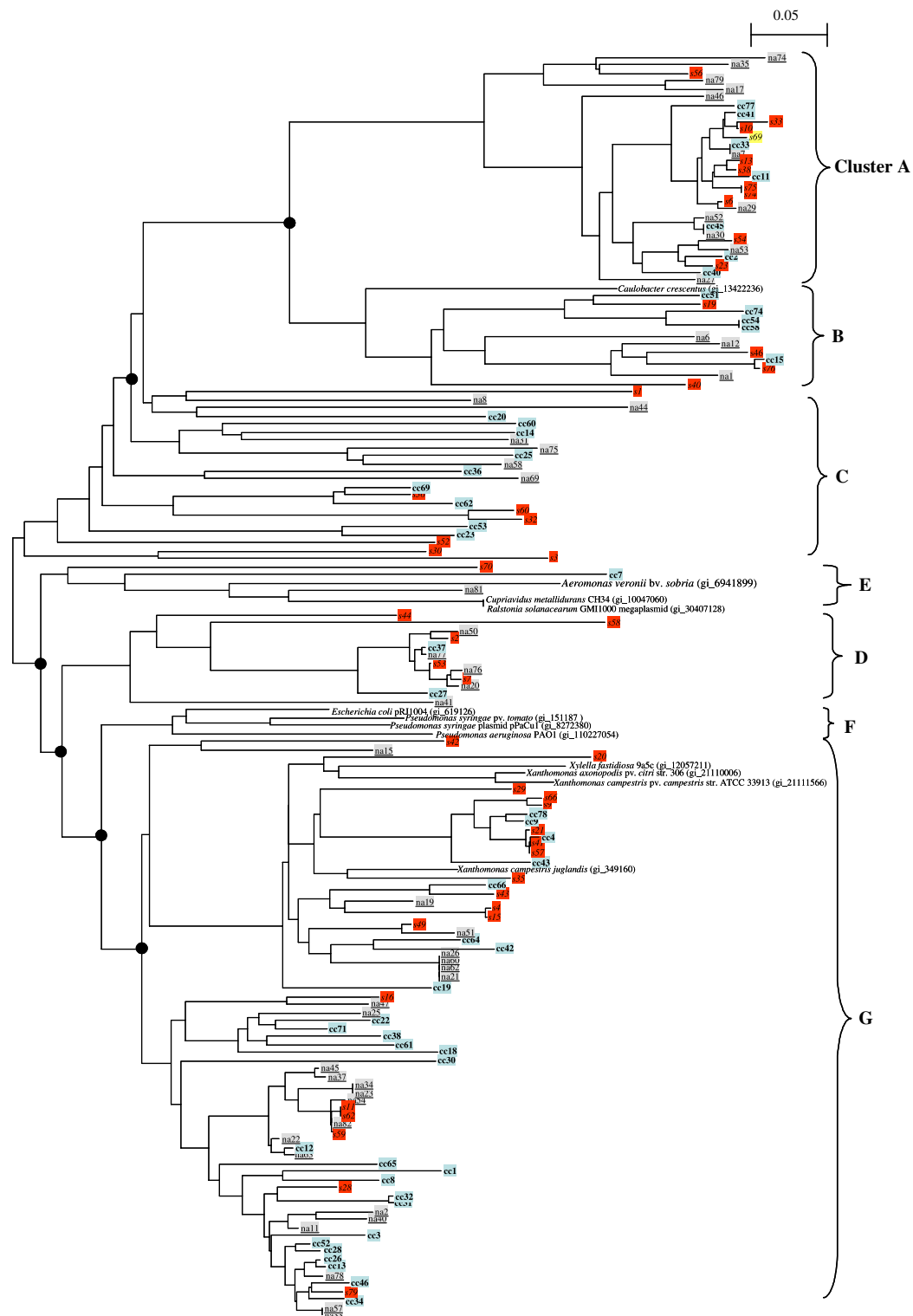


Fig. 4. NJ phylogenetic tree of CopA amino acids sequences obtained from Mâcon (NA), Mâcon (S) and Mâcon (CC) plus reference sequences listed in Table 1; 147 sequences were aligned. Clones from Mâcon NA, S and CC were emphasized in grey, red and blue, respectively. Horizontal distances are proportional to observed divergences expressed in substitutions per 100 sites. Bootstrap values were estimated from 1000 replicates. Clusters (A–G) were defined as closely related sequences grouped together in the tree with a bootstrap > 50%. Accession number ranged from EF394448 to EF394496 for NA, from EF394497 to EF394543 for S and from EF394544 to EF394594 for CC.

(humic acid)/FA (fulvic acid) ratios] (Fig. 3c). This observation was consistent with Marschner *et al.* (2003), who reported that the quality of the SOM, as reflected by the concentration and the aromaticity of the dissolved organic carbon (DOC), affected microbial community composition. Furthermore, in a previous study, we demonstrated an influence of the SOM on the genetic structure of the dominant indigenous bacterial community [using B-ARISA fingerprinting approach (Lejon *et al.*, 2007)]. By analogy, it could be hypothesized that the modifications observed for *copA* possessing bacterial communities may be due to a lower availability and quality of the carbon source supplied by a more humified SOM (due to conifer compost decomposition) and especially to the content of recalcitrant compounds compared to a less humified SOM [e.g. with straw amendment (Domeizel *et al.*, 2004)]. In other respects, the discrimination observed between the NA and S soils was mainly due to differences in relative amounts of fulvic acids and β -humus (Fig. 3c), emphasizing that the quality of less humified SOM also influenced *copA* diversity. In addition, the *copA* genetic diversity was characterized by cloning and sequencing the *copA* amplified fragments from each soil. All the sequenced clones showed high similarity to *copA* sequences of *Proteobacteria* found in the databases, confirming the specificity of the primer set designed in this study. Multiple alignments and a molecular phylogenetic tree were made with these clones and the reference sequences used above (Table 1; Fig. 1). The topology of the inferred neighbour-joining (NJ) phylogenetic tree made it possible to distinguish between seven groups (clusters A–G). This was supported by bootstrap values > 50% (Fig. 4). Our results highlighted that few indigenous *copA* sequences were related with known sequences. For example, only three clones (NA81, S70 and CC7) were affiliated to the cluster E harbouring *copA* sequences from *Ralstonia*. No *copA* sequence was isolated from the cluster F, including sequences from the different *Pseudomonas* and *E. coli* determinants, whereas 69 clones grouped in the cluster G, including all the *copA* related to *Xanthomonas* and 12 in the cluster B corresponding to *Caulobacter*. It was difficult to establish a close relationship with bacterial host for clusters A, C and D.

The influence of SOS on *copA* diversity was confirmed by the factorial correspondence analysis, which was performed to resolve the diversity of the clones in the different soils (NA, S and CC). The factorial map and the correlation circle, presented in Fig. 5, revealed that the distribution of the clones differed between clusters according to the SOS. These results highlighted the separation of the CC soil from the NA and S soils on the first axis, which explained 83% of the variability, and the significant discrimination between the NA and S soils on the second axis, which explained 20% of the variability. The correlation circle evidenced that *copA* diversity in the CC soil was mainly

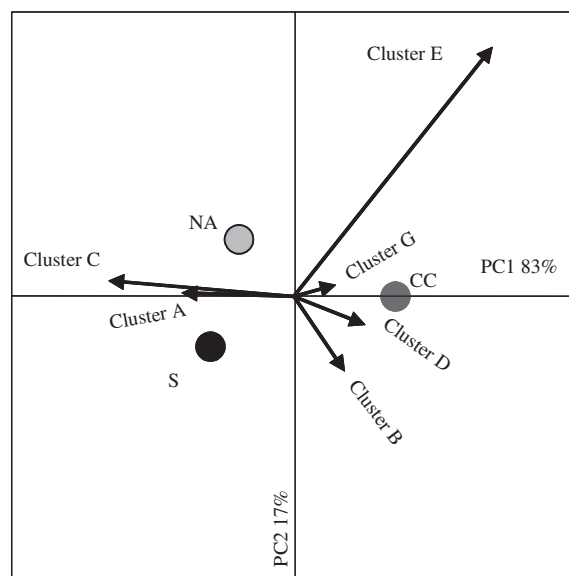


Fig. 5. Factorial correspondence analysis (FCA) generated from the distribution of the various identified clusters in NA, S and CC soils. Arrows were obtained by the superposition of the corresponding correlation circle and represent the contribution of each cluster to the discrimination of NA, S and CC soils.

represented by clusters B, D, E and G, and by clusters C and A in the NA and S soils (Fig. 5). Consequently, the specific *copA* genetic structure associated with the more humified SOM is confirmed by the occurrence of specific *copA* genes clusters in the CC soil.

Analysis of community adaptation to copper contamination in soils of different SOS

The *copA* DNA fingerprinting strategy was evaluated to detect modifications consequent to artificial copper contamination. Soil incubations were carried out over 15 days with Mâcon NA, S and CC soils contaminated with copper (+CuCl₂ at 250 mg kg⁻¹ soil) or not (+H₂O) to study short-term responses. As illustrated in Fig. 6, modifications in *copA* genetic structure were observed only in the CC soils with a significant discrimination between the control and the contaminated microcosms demonstrated by a PCA factorial map. Profiles revealed that copper spiking induced emergence of new bands and a higher intensity of pre-existing bands (shown by arrows in Fig. 6c). These results are not consistent with the hypothesis of a lower diversity of resistance genes in metal-polluted soils than in unpolluted ones (Olson *et al.*, 1989; Bruce *et al.*, 1995), possibly because of the short-term exposure described in this work. As described above, the three soils studied differed only in their SOS (quantity and type of SOM). However, our results were not consistent with the higher content of SOM in CC soil. Indeed, soil organic matter may have a major influence on

the copper impact on soil microorganisms as complexation; chelation and adsorption processes may reduce copper bioavailability and therefore toxicity (Fotovat & Naidu, 1998; Zhou & Wong, 2001; Ranjard *et al.*, 2006). In parallel, a more significant impact was recorded in the genetic structure of the dominant bacterial community of the NA compared to the S and CC soils, using B-ARISA DNA fingerprinting (unpublished data). In contrast, *copA* DNA fingerprinting results emphasized the weak relationship with total community DNA fingerprinting impact. Such a discrepancy could be explained partly by the fact that *copA* DNA fingerprinting targeted only determinants related to Proteobacteria. Consequently, this statement underlines the necessity to characterize novel *copA* determinants in Actinomycetes and Firmicutes, and to develop *copA* DNA fingerprinting specific to these taxonomic groups. On the other hand, our results might be explained partly by the fact that

bacterial copper resistance can result from other mechanisms than Cu sequestration, e.g. Cu efflux mechanisms through P-type ATPase, which are described in *E. coli* and *Enterococcus hirae* and encoded by specific genetic determinants (Magnani & Solioz, 2007).

An explanation of the higher impact observed in the CC soils might be their specific *copA* diversity as described above (see *Analysis of copA genetic structure and diversity in soils of different organic status*) (Figs 3–5). For NA and S soils, the absence of *copA* profile modifications could result from the predominance of bacterial populations harbouring highly efficient copper resistance genes that are characteristic of a highly stable genetic structure. Inversely, the significant modifications observed in the CC contaminated soil suggest the innate predominance of less efficient copper resistance genes leading to the establishment of a novel genetic structure of the community more suited to survive under

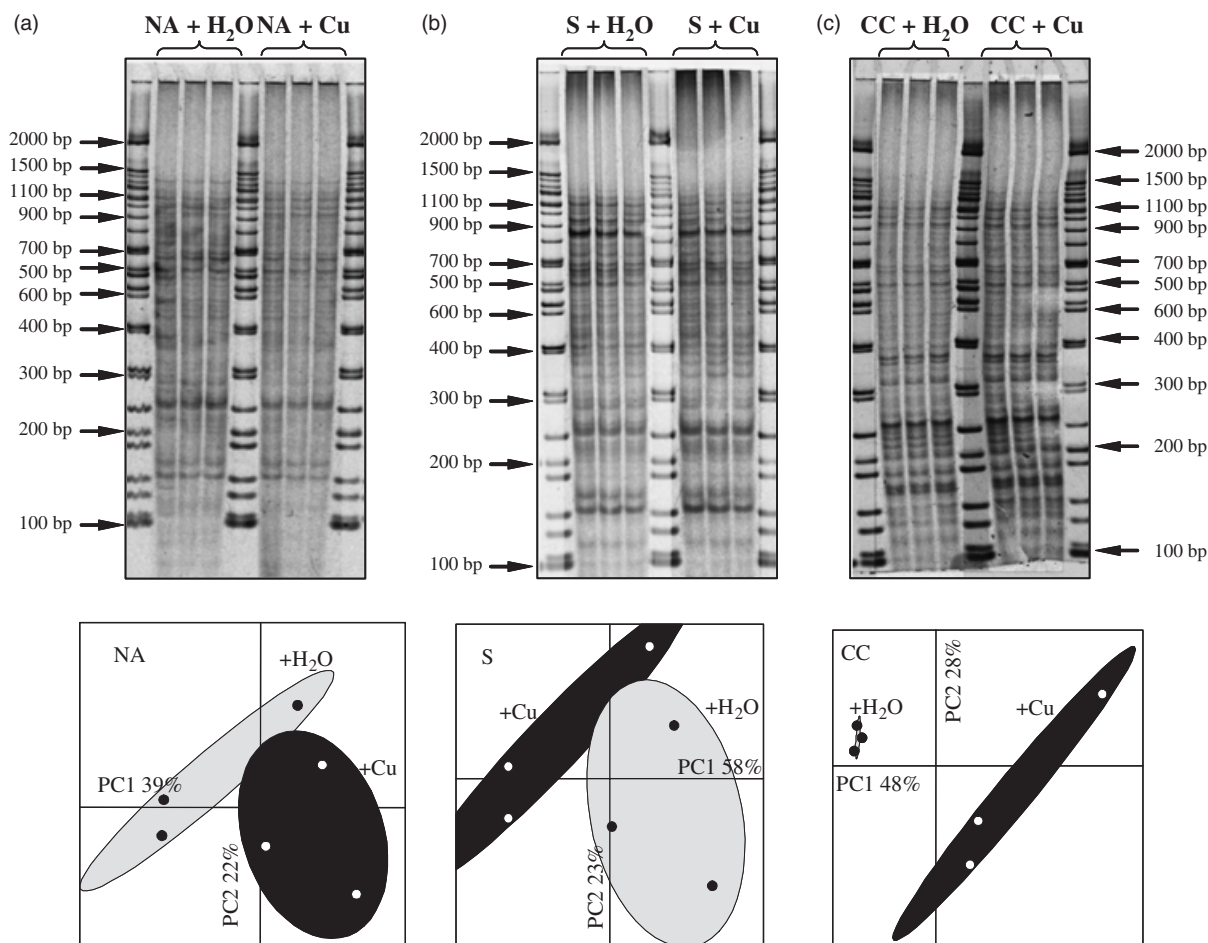


Fig. 6. *copA* DNA fingerprinting gels and principal component (PC1 x PC2) factorial maps generated from the profiles of soils differing in their soil organic status [Mâcon NA (a), S (b) and CC (c)] and incubated with CuCl₂ or with water (+H₂O, control). Arrows indicate significant modifications between control and contaminated CC soils.

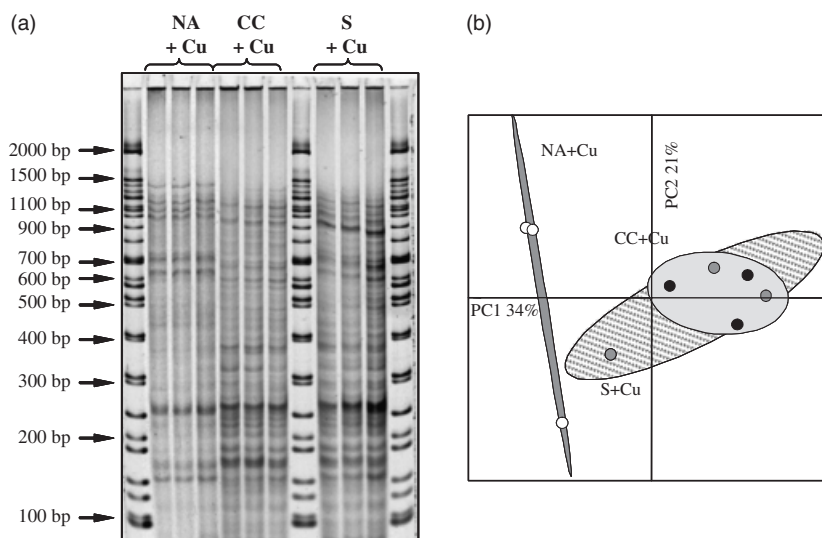


Fig. 7. *copA* DNA fingerprinting gel (a) and principal component (PC1 $\times$ PC2) factorial map (b) generated from the profiles of the Mâcon NA, S and CC soils contaminated with CuCl₂.

metal stress. This hypothesis is consistent with the results illustrated by the factorial map generated from the *copA* profiles of contaminated soils (Fig. 7). These results revealed that the new *copA* genetic structure of the CC contaminated soil is similar to that of the S soil and is discriminated from the NA soil on the first axis, which explained 34% of the variability. In this context, further investigations by cloning and sequencing *copA* genes from CC and S contaminated soils could allow confirmation of such a similarity in *copA* diversity. In addition, as it is well known that copper spiking induced an enrichment of adapted populations (Duxbury & Bicknell, 1983; Huysman *et al.*, 1994; Kunito *et al.*, 1997), complementary analysis could be performed to compare the abundance of *copA* genes before and after copper contamination and to reach a more precise conclusion about the impact of copper in the different soils. Although quantitative PCR is a relevant approach to quantify functional genes in soil (Kandeler *et al.*, 2006), our primers are not adequate for this approach as they were degenerated and provided PCR fragments of different sizes that were too large to be quantified robustly.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Program PN/ACI 'ECCO' through a ECODYN project. DPHL was funded by a grant from the Région Bourgogne and The Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne. We would like to thank Pierre-Alain Maron and Mary Bouley for critical reading of the manuscript and helpful comments, and L. Philippot (INRA Dijon, France) and A. Hartmann (INRA Dijon, France) for providing bacterial strains as indicated in Table 3. We are also grateful to Marc Solioz

(University of Berne, Switzerland) for providing the *E. hirae* strain.

References

- Altschul SE, Gish W, Miller W, Meyers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Baath E, Diaz-Ravina M, Frostegard A & Campbell CD (1998) Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl Environ Microbiol* **64**: 238–245.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J & Wheeler DL (2005) GenBank. *Nucleic Acids Res* **33**: D34–D38.
- Borremans B, Hobman JL, Provoost A, Brown NL & van der Lelie D (2001) Cloning and functional analysis of the *pbr* lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J Bacteriol* **183**: 5651–5658.
- Brown NL, Rouch DA & Lee BTO (1992) Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid* **27**: 41–51.
- Bruce KD, Osborn AM, Pearson AJ, Strike P & Ritchie DA (1995) Genetic diversity within *mer* genes directly amplified from communities of non-cultivated soil and sediment bacteria. *Mol Ecol* **4**: 605–612.
- Cheneby D, Perrez S, Devroe C, Hallet S, Couton Y, Bizouard F, Luretig G, Germon J & Philippot L (2004) Denitrifying bacteria in bulk and maize-rhizospheric soil: diversity and N₂O-reducing abilities. *Can J Microbiol* **50**: 469–474.
- Cooksey DA (1994) Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **14**: 381–386.
- da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC *et al.* (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**: 459–463.
- Doelman P, Jansen E, Michels M & Vantil M (1994) Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity–resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biol Fertil Soils* **17**: 177–184.

- Doledec S, Statzner B & Bournard M (1999) Species traits for future biomonitoring across ecoregions: patterns along a human-impacted river. *Freshwater Biol* **42**: 737–758.
- Domeizel M, Khalil A & Prudent P (2004) UV spectroscopy: a tool for monitoring humification and for proposing an index of the maturity of compost. *Biores Technol* **94**: 177–184.
- Dumestre A, Sauve S, McBride M, Baveye P & Berthelin J (1999) Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Arch Environ Contam Toxicol* **36**: 124–131.
- Duxbury T & Bicknell B (1983) Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biol Biochem* **15**: 243–250.
- Eparvier A, Lemanceau P & Alabouvette C (1991) Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiol Ecol* **86**: 177–184.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.
- Fierer N & Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 626–631.
- Flores-Vélez L (1996). Essai de spéciation des métaux dans les sols: cas du cuivre dans les vignobles. PhD thesis. University of Paris XII, Paris.
- Fotovat A & Naidu R (1998) Changes in composition of soil aqueous phase influence chemistry of indigenous heavy metals in alkaline sodic and acidic soils. *Geoderma* **84**: 213–234.
- Francki KT, Chang BJ, Mee BJ, Collignon PJ, Susai V & Keese PK (2000) Identification of genes associated with copper tolerance in an adhesion-defective mutant of *Aeromonas veronii* biovar sobria. *FEMS Immunol Med Microbiol* **29**: 115–121.
- Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvelles S, Gillet F, Aragno M & Rossi P (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol* **4**: 634–643.
- Galtier N, Gouy M & Gautier C (1996) Seaview and Phylo_win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**: 543–548.
- Giller KE, Witter E & McGrath SP (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem* **30**: 1389–1414.
- Girvan MS, Bullimore J, Ball AS, Pretty JN & Osborn AM (2004) Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2692–2701.
- Holling CS (1973) Resilience and stability of ecological systems. *Ann Rev Ecol Syst* **4**: 1–23.
- Huysman F, Verstraete W & Brookes PC (1994) Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soil microbial-populations. *Soil Biol Biochem* **26**: 103–110.
- Kandeler E, Deiglmayr K, Tscherko D, Bru D & Philippot L (2006) Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5957–5962.
- Keyser HH, van Berkum P & Weber DF (1982) A comparative study of the physiology of symbioses formed by *Rhizobium japonicum* with *Glycine max*, *Vigna unguiculata*, and *Macroptilium atropurpureum*. *Plant Physiol* **70**: 1626–1630.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**: 111–120.
- Kunito T, Nagaoka K, Tada N, Saeki K, Senoo K, Oyaizu H & Matsumoto S (1997) Characterization of Cu-resistant bacterial communities in Cu-contaminated soils. *Soil Sci Plant Nutr* **43**: 709–717.
- Kunito T, Saeki K, Nagaoka K, Oyaizu H & Matsumoto S (2001) Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *Eur J Soil Biol* **37**: 95–102.
- Lee YA, Henderson M, Panopoulos NJ & Schroth MN (1994) Molecular-cloning, chromosomal mapping, and sequence-analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *Juglandis* – homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. *J Bacteriol* **176**: 173–188.
- Lejon DPH, Chaussod R, Ranger J & Ranjard L (2005) Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). *Microb Ecol* **50**: 614–625.
- Lejon DPH, Sebastia J, Lamy I, Chaussod R & Ranjard L (2007) Relationships between soil organic status and microbial community density and genetic structure in two agricultural soils submitted to various types of organic management. *Microb Ecol* **53**: 660–663.
- Magnani D & Solioz S (2007) How bacteria handle copper. *Bacterial Transition Metal Homeostasis* (Nies DH, ed), pp. 101–127. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Marschner P, Kandeler E & Marschner B (2003) Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol Biochem* **35**: 453–461.
- McGrath S (1994) Effects of heavy metals from sewage sludge on soil microbes in agricultural ecosystems. *Toxic Metals in Soil-Plant Systems* (Ross S, ed), pp. 247–274. John Wiley & Sons, Chichester.
- Mellano MA & Cooksey DA (1988) Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J Bacteriol* **170**: 2879–2883.
- Nierman WC, Feldblyum TV, Laub MT et al. (2001) Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4136–4141.
- Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 730–750.
- Offre P, Pivato B, Siblot S, Gamalero E, Corberand T, Lemanceau P & Mougél C (2007) Identification of bacterial groups preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 913–921.
- Olson BH, Lester JN, Cayless SM & Ford S (1989) Distribution of mercury resistance determinants in bacterial communities of river sediments. *Water Res* **23**: 1209–1217.

- Ranjard L, Richaume A, Jocteur-Monrozier L & Nazaret S (1997) Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiol Ecol* **24**: 321–331.
- Ranjard L, Poly F, Combrisson J, Richaume A, Gourbière F, Thioulouse J & Nazaret S (2000) Heterogenous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb Ecol* **39**: 263–272.
- Ranjard L, Poly F, Lata J-C, Mougél C, Thioulouse J & Nazaret S (2001) Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4479–4487.
- Ranjard L, Lejon DPH, Mougél C, Schehrer L, Merdinoglu D & Chaussod R (2003) Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ Microbiol* **5**: 1111–1120.
- Ranjard L, Echairi A, Nowak V, Lejon DPH, Nouaim R & Chaussod R (2006) Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural Cu treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. *FEMS Microbiol Ecol* **58**: 303–315.
- Rensing C & Grass G (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 197–213.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406–425.
- Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F *et al.* (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**: 497–502.
- Sambrook J & Russel DW (2001) *Molecular Cloning – A laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, New York.
- Sauve S, Dumestre A, McBride M, Gillett JW, Berthelin J & Hendershot W (1999) Nitrification potential in field-collected soils contaminated with Pb or Cu. *Appl Soil Ecol* **12**: 29–39.
- Simpson AJG, Reinach FC, Arruda P *et al.* (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* **406**: 151–157.
- Smit E, Leeftang P & Wernars K (1997) Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **23**: 249–261.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959–964.
- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S & Olivier JM (1997) ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat Comput* **7**: 75–83.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**: 4876–4882.
- Tom-Petersen A, Leser TD, Marsh TL & Nybroe O (2003) Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. *FEMS Microbiol Ecol* **46**: 53–62.
- Turpeinen R, Kairesalo T & Haggblom MM (2004) Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. *FEMS Microbiol Ecol* **47**: 39–50.
- Zhou LX & Wong JWC (2001) Effect of dissolved organic matter from sludge and sludge compost on soil copper sorption. *J Environ Qual* **30**: 878–883.

Copper Dynamics and Impact on Microbial Communities in Soils of Variable Organic Status

DAVID P. H. LEJON,[†]
JEAN M. F. MARTINS,[‡] JEAN LÉVÊQUE,[†]
LORENZO SPADINI,[§]
NOÉMIE PASCAULT,[†] DAVID LANDRY,[†]
MARIE-JEANNE MILLOUX,[†]
VIRGINIE NOWAK,[†] RÉMI CHAUSSOD,[†]
AND LIONEL RANJARD^{*,†}

INRA-Université Bourgogne, UMR MSE, CMSE,
21065 Dijon, France, CNRS-Université Grenoble I, LTHE,
UMR5564, Grenoble, France, and CNRS-Université Grenoble I,
LGIT, UMR5559, Grenoble, France

Received July 05, 2007. Revised manuscript received
December 28, 2007. Accepted February 19, 2008.

The effect of soil organic status on copper impact was investigated by means of a microcosm study carried out on a vineyard soil that had been amended with varying types of organic matter during a previous long-term field experiment. Soil microcosms were contaminated at 250 mg Cu kg⁻¹ and incubated for 35 days. Copper distribution and dynamics were assessed in the solid matrix by a sequential extraction procedure and in the soil solution by measuring total and free exchangeable copper concentrations. Copper bioavailability was also measured with a whole-cell biosensor. Modifications of microbial communities were assessed by means of biomass-C measurements and characterization of genetic structure using ARISA (automated-ribosomal-intergenic-spacer-analysis). The results showed that copper distribution, speciation, and bioavailability are strongly different between organically amended and nonamended soils. Surprisingly, in solution, bioavailable copper correlated with total copper but not with free copper. Similarly the observed differential copper impact on micro-organisms suggested that organic matter controlled copper toxicity. Bacterial-ARISA modifications also correlated with the estimated metal bioavailability and corresponded to the enrichment of the *Actinobacteria*. Contrarily, biomass-C and fungal-ARISA measurements did not relate trivially to copper speciation and bioavailability, suggesting that the specific composition of the indigenous-soil communities controls its sensitivity to this metal.

1. Introduction

Copper has been widely encountered in land use practices (biosolids application, mining, pesticides use, etc.) for many years (1), leading to large increases of total Cu content at soil surfaces, i.e., up to 1000 mg kg⁻¹ of soil (2). At such high concentrations, copper has detrimental and irreversible effects on soil biocenosis and modifies the population

structure of soil microbial communities. This was shown by analysis of soil microbial biomass (3–5), analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) profiles (6, 7), or characterization of microbial community structure (8, 9). Other studies highlighted the link between pollutant perturbations and community composition, diversity, and response (in terms of resistance and resiliency (9–11)). However, most of these studies were limited to one soil and did not investigate the relation between soil properties and pollutant impact.

Recently, a differential copper impact on the microbial biomass and genetic structure has been demonstrated for two different soils (9). This study evidenced a different copper speciation existing in the two soils, which affected the bioavailability of the studied trace element and consequently its impact on microbial communities. Factors such as pH, redox potential, mineralogical, and soil organic matter contents and types are all known to affect copper speciation (12–14). Among the soil constituents, soil organic matter (SOM) is one of the more reactive toward copper, as demonstrated by several studies with soil organic matter or with organic ligands (14). Organic ligands interact with trace elements essentially through complexation reactions (15–19). Consequently, the correlation between total and bioavailable copper contents was shown to be poor in complex soil systems (12, 20, 21). A priori, this poor correlation is due to the studied system complexity, i.e., the numerous possible copper interactions with highly variable composition of soils. In addition, SOM acts to stimulate soil microbial processes and manage soil microbial diversity (22) and therefore its sensitivity to metal contamination (9). This complexity limits the ability to predict copper impact and fate from data involving only one field site, or laboratory and thermodynamical assets. Copper impact studies with soils of differing properties are needed to identify the parameters that effectively control metal fate and impact.

The aim of our study was to evaluate the impact of copper on a set of soils varying only in the organic matter status. To evaluate the effect of the soil organic status (defined as the amount and type of soil organic matter) on pollutant availability, toxicity and fate, a vineyard soil that has been subjected to three different organic matter amendments (not amended: NA, amended with wheat straw: S, or with conifer compost: CC) in the frame of a 15 years long field experiment, was used. These organic amendments conferred to the soil specific amount and quality of soil organic matter, microbial density, and microbial community structure (23). Using a microcosm approach, the aging of spiked copper was measured on the solid phase (sequential extraction experiments), and of the Ca-exchangeable total, free (copper selective electrode) and bioavailable (microbial biosensor) copper were measured. The results were compared to quantitative (soil microbial biomass) and qualitative (bacterial- and fungal-ARISA techniques applied directly to soil DNA) modifications of the indigenous microbial communities.

2. Materials and Methods

2.1. Soil Sampling and Microcosm Setup. The studied soil located in the vineyard site of Mâcon (France) (23) experienced a long-term field experiment, in which this weakly copper contaminated silt clay loam soil (about 60 mg Cu kg⁻¹) was divided in several plots, each amended with various types and amounts of organic matter since 1991. The three studied situations were as follows: not amended (NA), amended with wheat straw (S) (10 t ha⁻¹ every 2 years), and amended with conifer compost (CC) (100 m³ ha⁻¹ every 3–4 years) at the soil surface. The last amendments were

* Corresponding author phone: 33(0)380693088; fax: 33(0)380693224; e-mail: lionel.ranjard@dijon.inra.fr.

[†] INRA-Université Bourgogne.

[‡] CNRS-Université Grenoble I, LTHE.

[§] CNRS-Université Grenoble I, LGIT.

performed in 2003, and the soils were sampled in 2004. In these soils, organic carbon contents were determined: 12.9, 19.7, and 45.9 g kg⁻¹ of soil. C/N of 11.7, 13.1, and 17.5, respectively (23). The detailed soil properties are provided in the Supporting Information section. The upper layer (0–5 cm) of the soils was sampled, homogenized, sieved at 4 mm, and stored at 4 °C before microcosm setup.

Portions of 150 g soil (dry-weight) inserted in 2 L glass jars, were spiked with CuCl₂ to reach a final concentration of 250 mg Cu kg⁻¹ of soil. Copper contamination induced a decrease of soil pH of about 0.2 to 0.4 pH unit, similar for each soil studied (Figure S1). Control microcosms were supplemented with pure water (H₂O) or with 0.05 M HCl in order to reach 80% of the water holding capacity of the soil. HCl controls were performed to mimic the chloride content increase, and the acidifications caused by CuCl₂ spiking. These controls were only used for evaluating microbial modifications. Soil microcosms were incubated in triplicate for 35 days (t35d) in the dark at 20 °C, with weekly aeration and water content control.

2.2. Copper Sequential Extraction. The sequential extraction procedure was adapted from Parat et al. (24) (see Supporting Information section for more details). Extraction experiments were performed before and immediately after copper spiking (t0d) and at the end of the incubation time (t35d). Total copper concentrations in individual fractions and whole soil were determined by flame atomic absorption on triplicate samples (F-AAS, Perkin-Elmer 3300). The copper mass balance was evaluated comparing the sum of copper concentration in individual fractions (steps 1–6) with total metal concentration (TMC) in the soils

2.3. Total, Free, and Bioavailable Exchangeable Copper Measurements. Exchangeable copper concentration was obtained from copper-spiked soil microcosms by stirring at 200 rpm for 15 min 10 g of soil suspended in 20 mL of 0.1 M Ca(NO₃)₂. The measurement was done at t0d, t2d, t7d, t15d, and t35d. After centrifugation (10000g for 30 min) of the soil suspension, the supernatant was filtered at 0.45 µm and analyzed for total exchangeable copper [Cu_{tot}]_{Ex} by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES Optima 3300 DV, Perkin-Elmer, LGIT, Grenoble).

Copper speciation was determined by assessing free copper (Cu²⁺) with a Cu²⁺ selective electrode (CuSE) (Metrohm 60502140). Calibration was achieved using Cu(NO₃)₂ standards in 0.1 M Ca(NO₃)₂·4H₂O (Sigma-Aldrich, France) ranging between $-7.4 \leq \log_{10} [\text{Cu}^{2+}] \leq -4$. The lower limit of measurement is constrained by Cu impurities present in the CuNO₃ reactants, as was attested from separate calibration experiments. The electrode potential correlated linearly with Cu²⁺ concentration, [Cu²⁺]_{Ex}, with a measured Nernst parameter *k* situated at ±2 mV of the theoretical value.

At t0d, t7d, t15d, and t35d of the incubation period, bioavailable copper ([Cu_{BA}]_{Ex}) was determined on the same soil solutions with a whole-cell copper biosensor previously optimized by Tom-Petersen et al. (1), using the same bioassay procedure. This *Pseudomonas fluorescens* biosensor (DF57-Cu15) was selected as a copper sensor on the basis of its tolerance and its specific and concentration-dependent response to Cu in pure culture. Luminescence was measured using a TD20/20 luminometer (Promega, France). Bioavailable copper concentrations were calculated using a calibration curve established with Cu(NO₃)₂ standards (in 0.1 M Ca(NO₃)₂·4H₂O) of known concentrations.

2.4. Microbial Biomass-C Quantification. Microbial biomass measurements were performed using the fumigation–extraction method (25) on three independent microcosms of NA, S, and CC soils of each condition (H₂O, HCl, and Cu) at t0d, t15d, and t35d. Briefly, 40 g of soil were fumigated for 16 h at 20 °C. The C from fumigated and unfumigated soil samples was extracted in 200 mL of 0.025

M K₂SO₄ for 45 min by shaking. Soil suspensions were centrifuged at 6000g for 5 min. The measurement of soluble organic C in the supernatant was performed using the persulphate-UV oxidation procedure on a Phoenix Analyzer (Dohrmann Co., Santa Clara, CA). Microbial biomass was evaluated using a *κ_{ec}* factor of 0.38 (25)

2.5. Genetic Structure of Microbial Communities. The genetic structure of bacterial and fungal communities was performed on the soil DNA directly extracted from the different microcosms at t0d, t15d, and t35d using the method described by Lejon et al. (26). A detailed procedure description is presented in the Supporting Information section. Bacterial- and fungal-ARISA profiles were analyzed using 1D-Scan software (ScienceTec), which converted fluorescence data into electrophoregrams where peaks represented PCR fragments.

2.6. Taxonomic Identification of Responsive Populations. A statistical analysis (PCA ordination) of B-ARISA bands was performed which allowed the differences in the band profiles specifically related to the variances between bacterial communities of NA Cu-contaminated and not contaminated (control) soils (data not shown) to be highlighted at t15d. Several discriminating bands were highlighted in NA contaminated soil, all exhibiting sizes ranging between 350 and 450 bp. The corresponding DNA was reamplified by PCR in order to add a fragment of 467 bp of the 16S rRNA gene with the contiguous bacterial ribosomal IGS (27). After purification, the genetic fragment was used to construct a library of 30 clones, which were sequenced and analyzed by BLASTn algorithm (28).

2.7. Statistical Analysis. The effect of copper contamination on soil microbial biomass and differences of [Cu_{tot}]_{Ex}, [Cu²⁺]_{Ex}, and [Cu_{BA}]_{Ex} between incubation dates were tested by means of one-way ANOVA, and differences between means were tested with the Fisher PLSD test. Correlation analyses were used to investigate the effects of C_{org} content on total, free, and bioavailable exchangeable copper concentrations by means of Pearson's correlation coefficient (*r*). All these statistical calculations were carried out using XLSTAT (Addinsoft, Paris, France). ARISA data obtained from the 1D-Scan software were converted into a table summarizing the band presence (peak) and intensity (peak height or area) using the PrePRISA program (29). As described in a previous study (26), we used 100 peaks, a 2 bp resolution, and the Gaussian peak area for a robust analysis of bacterial and fungal profiles. B- and F-ARISA covariance matrices (microbial communities as rows and bands as columns) were subjected to PCA, which provided an ordination of bacterial or fungal communities in a factorial map based on the scores of the first two principal components. Statistical ellipses representing 90% of confidence were drawn over the replicates of microcosm samples. A Monte Carlo test with 1000 permutations was performed to check the significance of the observed discrimination between soil plots based on their microbial genetic structure. PCA and the Monte Carlo test were performed using the ADE-4 software (30).

3. Results

3.1. Copper Distribution in the Soil Matrix. Total copper concentrations were 297 ± 32, 308 ± 17, and 369 ± 62 ng Cu g⁻¹ soil for NA-, S-, and CC-soils after copper contamination (t0d). The distribution of copper in the six fractions measured with the sequential extraction procedure is presented in Figure 1. Recovery of total copper ranged from 80 to 104%. Lower ratios were considered as the cumulative losses of each extraction step (31). Note that the relation between the extracted mineral phase and the extraction step can be uncertain, especially for mineral phases. The name of mineral phases given to the extraction steps are thus indicative. In NA soils, native copper accumulated preferentially in the

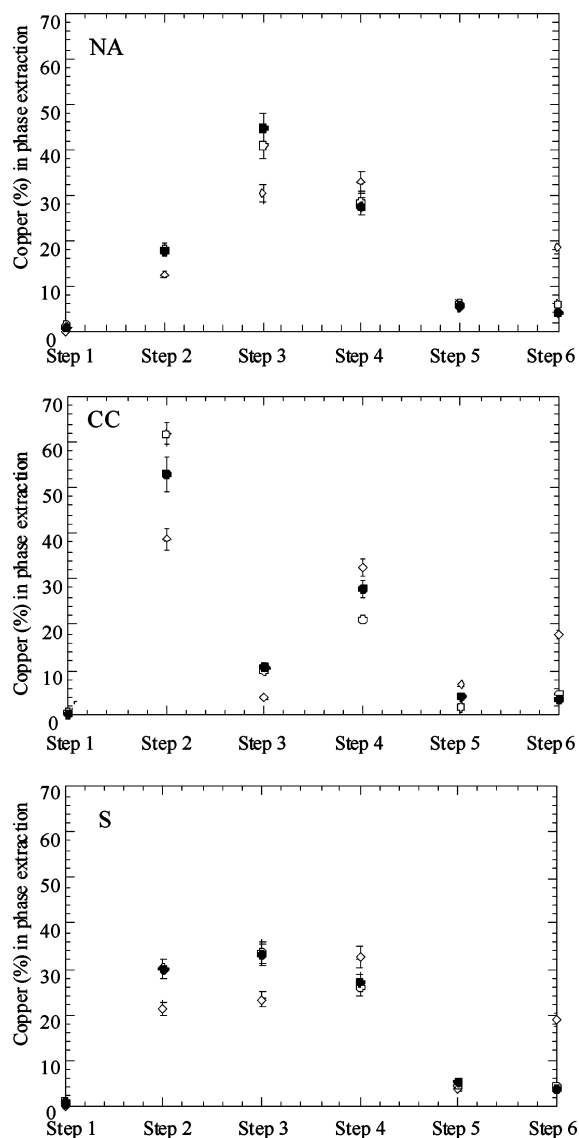


FIGURE 1. Copper distribution (%) obtained for (A) NA-, (B) S-, and (C) CC-soils before ($\blacklozenge$), immediately after (t0d) ($\circ$), and 35 days after (t35d) ($\bullet$) copper spiking. Individual step fractions are listed in the Materials and Methods section. Error bars correspond to the standard deviation calculated from triplicates. Step 1: exchangeable (Exc). Step 2: bound to organic matter (OM). Step 3: bound to Mn-oxides (Mn-Ox). Step 4: bound to amorphous Fe-oxides (Fea-Ox). Step 5: bound to crystalline Fe-oxides (Fec-Ox). Step 6: residual (Res).

fractions 3 and 4 (Mn- and amorphous Fe-oxides; 30 and 32%, respectively). In the CC-soil native copper mainly combined to fraction 2 (organic matter OM 38%). In the S-soil, the distribution of native copper was intermediate, with a well-balanced distribution between fractions 2, 3, and 4. Figure 1 shows that the Cu-distribution patterns of the soils containing only native copper generally compared to those of spiked copper, although added copper bound preferentially to the organic soil fraction. Obviously, no significant copper aging was observed in the NA and S soils. Contrarily, copper appears to migrate from the labile organic phase (fraction 2) to the more stable and potentially less available mineral phases (fraction 4) in the CC-soil within 35 days, with a pattern close to that of native copper.

As a conclusion, we can say that conifer compost and, to much lesser extent, straw amendments are able to change the distribution of Cu from fraction 2 to fraction 4.

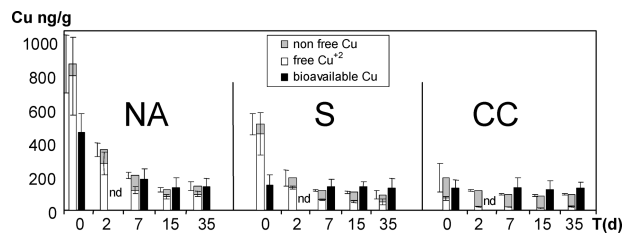


FIGURE 2. Aging of total, free, and bioavailable copper concentrations in the aqueous exchangeable fraction of soil microcosms (NA, S, CC) spiked with copper measured at t0d, t2d, t7d, t15d, and t35d. Error bars refer to standard deviations from triplicate measurements of free or total dissolved copper measurements. nd = not determined.

3.2. Speciation and Dynamics of Exchangeable Copper.

The aging of $[\text{Cu}_{\text{tot}}]_{\text{Ex}}$ and $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Ex}}$, the total and free exchangeable copper concentrations, respectively, was monitored in NA, S, and CC copper-spiked microcosms during 35 days (Figure 2). At t0d, the copper exchangeable fraction was highest in the NA-soil, with $864 \pm 171 \text{ ng Cu g}^{-1} \text{ soil}$, intermediate in the S-soil, with $508 \pm 62 \text{ ng Cu g}^{-1} \text{ soil}$, and the lowest in the CC-soil, with $191 \pm 84 \text{ ng Cu g}^{-1} \text{ soil}$. These values correspond to fraction 1 of the selective extraction procedure and represented only 0.55, 0.37, and 0.25% of Cu added to the NA-, S-, and CC-soils, respectively. In the three soils, $[\text{Cu}_{\text{tot}}]_{\text{Ex}}$ decreased rapidly within the first week of incubation and then stabilized until the end of the experiment (t35d) to represent only 17, 18, and 48% of $[\text{Cu}_{\text{tot}}]_{\text{Ex}}$ at t0d, respectively (Figure 2).

At t0d, $[\text{Cu}_{\text{tot}}]_{\text{Ex}}$ is mostly composed of Cu^{2+} since $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Ex}}$ represented 92% of $[\text{Cu}_{\text{tot}}]_{\text{Ex}}$ in the NA-soil, 89% in the S-soil, and 37% in the CC-soil. $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Ex}}$ exhibited a similar temporal evolution in the three soils: a rapid decrease during the first week and then stabilization until 35 days. At t35d $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Ex}}$ had decreased from 793, 450, and 70 to 95, 49, and 17 $\text{ng Cu g}^{-1} \text{ soil}$ (representing 12, 11, and 24% of the initial $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Ex}}$) in NA-, S-, and CC-soils, respectively. Furthermore at t35d, the $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Ex}}/[\text{Cu}_{\text{tot}}]_{\text{Ex}}$ ratios decreased to 66, 55, and 18% in NA-, S-, and CC-soils, respectively.

Bioavailable-copper concentrations, $[\text{Cu}_{\text{BA}}]_{\text{Ex}}$, presented uncertainties ranging from 24 to 45% (Figure 2). At t0d, $[\text{Cu}_{\text{BA}}]_{\text{Ex}}$ was highest in the NA-soil with $460 \pm 110 \text{ ng Cu g}^{-1} \text{ soil}$, and lower in the S- and CC-soils with 148 ± 60 and $129 \pm 51 \text{ ng Cu g}^{-1} \text{ soil}$, respectively, corresponding to 53, 29, and 68% of $[\text{Cu}_{\text{tot}}]_{\text{Ex}}$. In the NA-soil, $[\text{Cu}_{\text{BA}}]_{\text{Ex}}$ exhibited a rapid decrease during the first week and then a stabilization until t35d to reach $140 \text{ ng Cu g}^{-1} \text{ soil}$, which corresponded to about 30% of the initial $[\text{Cu}_{\text{BA}}]_{\text{Ex}}$. For the S- and CC-soils, bioavailable-copper concentration remained almost stable throughout the experiment at approximately 130 ng Cu g^{-1} of soil, revealing the aging aspect and the fact that bioavailable copper exceeds free copper ions activity.

3.3. Microbial Biomass-C. At the beginning of the incubation period, microbial biomass-C was significantly ($p < 0.05$) higher in S- (343 mg C kg^{-1} of soil) and CC-soils (557 mg C kg^{-1} of soil) than in NA-soil (205 mg C kg^{-1} of soil). At t15d, comparison of copper- and H_2O -contaminated microcosms highlighted a significant decrease ($p < 0.05$) in biomass-C only for CC-soil (Figure 3), which corresponded to a decrease of about 27%. At t35d, different but significant decreases in microbial biomass-C were recorded for the three Cu-contaminated soils (Figure 3). The S-soil was the most impacted with a decrease of about 26% of initial biomass-C (Figure 3). As a conclusion it appears that microbial biomass was negatively affected by Cu in all soil types.

3.4. B- and F-ARISA Fingerprinting. B-ARISA fingerprinting of the bacterial community provided complex profiles with peaks ranging from 200 to 1200 bp for the different soils and treatments (Figure S2, Supporting Infor-

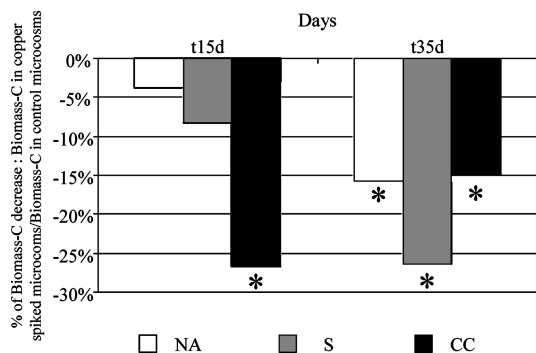


FIGURE 3. Percentage of biomass-C decrease due to copper contamination compared to H₂O control in the NA-, S-, and CC-soil microcosms after 15 (t15d) and 35 (t35d) days of incubation. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) between copper-contaminated and control microcosms for a given soil at a given time.

mation section). Immediately after contamination (t0d), the PCA of B-ARISA profiles revealed no discrimination between control and contaminated microcosms, whatever the soil (Figure 4). Throughout the experiment, a significant discrimination between controls and copper-contaminated microcosms was observed only at t15d in the NA-soil. Soils were significantly separated on the vertical axis that explained 24% of the total variability (Figure 4). At t35d, this discrimination disappeared as the three soils grouped together.

Fungal-ARISA provided complex profiles of bands ranging from approximately 350 and 1000 bp (data not shown). The similar PCA was applied to fungal-ARISA data, and the results are given in Figure S3. At t0d, as for bacteria, PCA of F-ARISA profiles of the three soils did not reveal any significant difference in fungal community structure between control and contaminated microcosms (Figure S3). At t15d, a significant discrimination between copper and control microcosms was recorded in S- and CC-soils but not in the NA-soil (Figure S3). In both soils, the discrimination occurred mainly on the second axis, which explained 20% (S) and 23% (CC) of the variability. However, in the CC-soil, PCA revealed that HCl addition induced the same effect as copper. At t35d, the modifications previously observed in the S- and CC-soils disappeared as all treatments grouped together on the factorial map (Figure S3). Instead, a significant discrimination appeared specifically for the copper-contaminated NA-soil.

3.5. Diversity of Responsive Bacterial Populations. The bands that explained most of the shifts in bacterial-ARISA profiles observed at t15d in the NA-microcosms (Figure 4) were located in a single region of the profiles ranging from 350 to 450 bp. This region was cloned and sequenced to identify the populations specifically stimulated by copper spiking (Supporting Information section). The sequencing of 30 clones allowed the phylogenetic affiliation of bacterial sequences given in Table S3 (Supporting Information). Most of the clones were identified by the BLAST algorithm as uncultured bacteria originated from environmental samples contaminated with metals and were consequently difficult to identify at a finer level than the class. A total of 57% of these clones belonged to the *Actinobacteria* class, 27% to the *Gemmatimonadetes* class, 13% to the *Proteobacteria* class, and 3% to the *Fibrobacteres* class (Table S3).

4. Discussion

4.1. Solid Copper Fractionation, Liquid Speciation, and Dynamics. The distribution of Cu was shown to differ strongly in the NA-, S-, and CC-soils. Cu-binding to the organic matter fraction is dominant in the high OM content CC-soil and to a lesser extent in the S-soil. This result confirms the strong

involvement of organic matter in the fate of copper in soils (17, 19, 32). Interestingly the distribution patterns of native and added copper were found similar in the three soils. This suggests that Cu distribution is almost time-independent and that native and added copper present close chemical behavior. Similarly, soil incubation did not affect significantly copper distribution patterns, except in the CC-soil, where about 10% of the total copper moved from fraction 2 (organic matter) to fraction 4 (am. Fe-oxide). The specific microbial status of this soil (related to the specific organic status) is probably responsible for the observed copper aging that corresponds to Cu distribution modification. This suggests interestingly that copper aging is controlled by the nature/content of OM of the soil.

Dissolved copper, $[Cu_{tot}]_{Ex}$, is assumed to be composed of free ($[Cu^{2+}]_{Ex}$) and nonfree Cu ($[Cu_{tot}]_{Ex} - [Cu^{2+}]_{Ex}$), the latter representing, a priori, Cu complexed to dissolved OM. Compared to copper in the solid phases, exchangeable copper concentrations are low: at t0d, $[Cu_{tot}]_{Ex}$ represents less than 1% of the added Cu (250 mg g⁻¹ soil), pointing out the strong and rapid chemical Cu-uptake process by the soil (Figure 1).

The $[Cu^{2+}]_{Ex}$ of the three soils were found to correlate inversely with the soil OM content whatever the time considered (e.g., at t0d, the linear correlation between soil C_{org} and $[Cu^{2+}]_{Ex}$ is -0.88 at $p < 0.05$, respectively), confirming the OM buffering effect toward Cu^{2+} . The observed data suggest that the soil OM content correlates with the number of reactive and available Cu-binding sites. This explains the lowest $[Cu^{2+}]_{Ex}$ in the OM rich CC- and S-soils, and it fits the copper impact on the bacterial community measured in the NA-soil only.

Contrarily to $[Cu^{2+}]_{Ex}$, the nonfree copper species was found to correlate positively ($r = 0.91$, $p < 0.05$) to soil C_{org} . This result appears reasonable as OM-rich soils release potentially more dissolved reactive ligands. This was confirmed by the measured dissolved organic carbon of the three soils (data not shown) and is consistent with the copper distribution measured by sequential extraction (Figure 1), confirming again the preferential Cu interaction with OM (33, 34).

After equilibration (>7 days), the sum of $[Cu^{2+}]_{Ex}$ and nonfree Cu (i.e., $[Cu_{tot}]_{Ex}$) stabilizes at the same level in the three soils. This last result is somewhat surprising considering their different soil organic status. Altogether, these data suggest that the aging of dissolved copper in soil corresponds mostly to $[Cu^{2+}]_{Ex}$ decrease. This decrease is under the control of the soil organic status through the concentration of highly reactive organic ligands (35).

Copper bioavailability ($[Cu_{BA}]_{Ex}$) measured in the exchangeable fraction showed that, even at t0d, less than 0.5% of the added Cu were available to bacteria, in agreement with other studies (1, 12). As for $[Cu^{2+}]_{Ex}$, the significantly lower $[Cu_{BA}]_{Ex}$ observed in the S- and CC-soils at the beginning of the incubation period (Figure 2) correlates with the higher dissolved OM concentration in soil (data not shown). Throughout the incubation period, the rapid decrease of $[Cu_{BA}]_{Ex}$ in the NA-soil is consistent with the copper aging described above. On the contrary, in the S- and CC-soils, $[Cu_{BA}]_{Ex}$ remained almost constant, indicating a slow aging process of bioavailable Cu in these soils in agreement with the almost instantaneous solid and liquid speciation described previously (Figures 1 and 2) (21). Furthermore, at t35d $[Cu_{tot}]_{Ex}$ and $[Cu_{BA}]_{Ex}$ concentrations stabilized at similar levels in the three soils indicating that the soluble exchangeable copper remained totally available to micro-organisms, independently of $[Cu^{2+}]_{Ex}$. These results are not in agreement with the hypothesis that Cu^{2+} is the (only) species available to micro-organisms (36) and therefore suggest that soluble organometallic complexes remain available to micro-organisms.

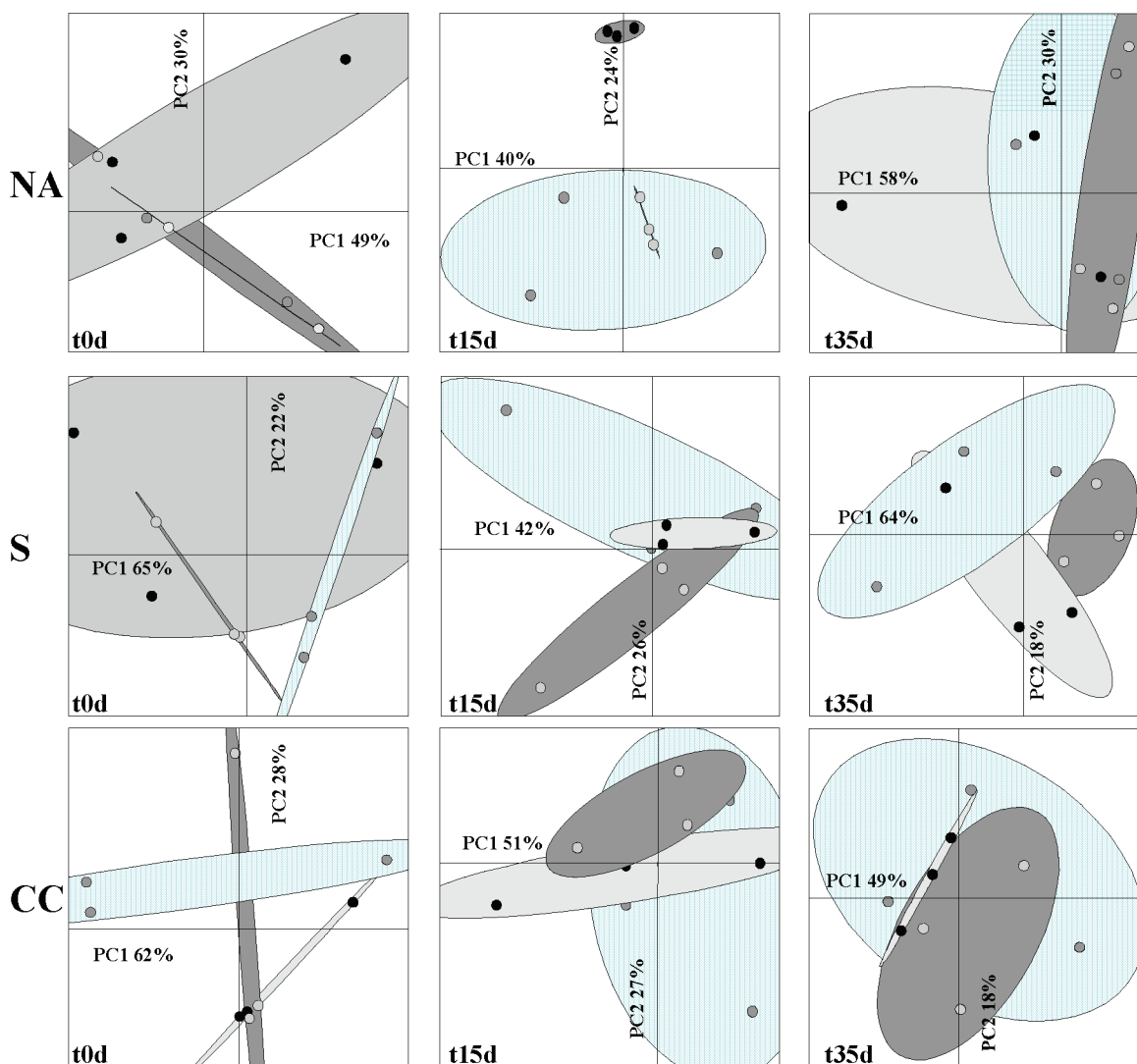


FIGURE 4. Principal component (PC1 × PC2) factorial map generated from B-ARISA profiles obtained from the NA-, S-, and CC-soils at t0d, t15d, and t35d for the three treatments. Light gray spots: control (+H₂O) microcosms. Dark gray spots: control (+HCl) microcosms. Black spots: copper-spiked microcosms. Statistical ellipses represent 90% confidence.

Altogether, our results confirm that soluble copper species are the more available and thus the more toxic to soil microorganisms as already suggested (36, 39). However, and originally, we showed that nonfree copper species can be also available to bacteria.

4.2. Relationships between Copper Dynamics and Impact on Microbial Biomass. Our results demonstrated a differential copper impact on biomass-C according to SOS (Figure 3) that are not due to the soil acidification by copper spiking, as shown by the HCl controls (40). In the present study we demonstrated that biomass-C alteration did not coincide with measured metal bioavailability. Indeed, a significant biomass-C decrease was observed early (t15d) in the CC-soil whereas it appeared delayed (t35d) in the S- and NA-soils, although the latter presented the highest Cu-bioavailability in solution. This observation probably resulted from the observed Cu-remobilization in the CC-soil evidenced from sequential extraction results (Figure 1) that may have led to a transitory increased contact of copper with SOM-degrading micro-organisms. On the other hand, all soils exhibited specific structures in bacterial and fungal communities that may explain the observed discrepancy between metal bioavailability and impact as already suggested (9, 10, 23). Indeed, the composition and diversity of the

community might modify its sensitivity and its response to metal spiking.

4.3. Relationships between Copper Dynamics and Impact on Microbial Genetic Structure. B-ARISA has already been demonstrated as powerful for discriminating the genetic structure of indigenous bacterial communities submitted to metal impact (41). Here, a differential copper impact was observed according to the SOS, since early (t15d) and significant modifications of bacterial genetic structure were only recorded in the NA-soil (Figure 2). These results were in agreement with other studies demonstrating differential impact of copper contamination on the bacterial community structure in different soil types (9, 12). Here, copper impact on the bacterial genetic structure was found to be consistent with its estimated bioavailability (Figure 2). Furthermore, these modifications were transient after 35 days and were explained by the observed bioavailable copper aging in soil solution. This result confirmed that chemical copper aging in soil had repercussions on its impact by modifying metal toxicity over time.

Phylogenetic affiliation of copper-responsive populations revealed that most of the identified clones were previously isolated from heavy-metal rich environments such as contaminated soils or volcanic deposits. In addition, it also

showed that *Actinobacteria* are the prevalent bacteria in the copper-contaminated NA-soil, in agreement with previous studies (42–44). Furthermore, *Actinobacteria* are also known to be prevalent in organic matter rich soils because of their functional involvement in SOM degradation (43, 45). The absence of copper impact in S- and CC-soils can thus be explained by the innate high proportion of *Actinobacteria* leading to a higher stability of the indigenous community to metal stress. However, based on this study alone, it can hardly be answered whether these populations were selected due to their resistance to copper or were opportunist bacteria, benefiting from copper toxicity to sensitive cells.

Similarly, copper impact on the fungal genetic structure depended also on the SOS because significant modifications occurred early in S- and CC-soil microcosms (t15d) and later in NA-soil (t35d). For CC-soil, some effects on the fungal genetic structure can be attributed to soil acidification rather than to direct metal toxicity as already observed in other studies (40). Nevertheless, the PCA factorial map (Figure S3) revealed significant differences between HCl-control and copper-spiked CC microcosms. Again, a transitory effect of copper on the fungal community structure was recorded. Furthermore, the higher impact on the fungal community structure observed in S- and CC-soils was not in agreement with the lower bioavailability of copper measured in the corresponding soil solutions compared to NA-soil (Figure 2). In addition, the impact observed in the NA-soil was not consistent with the aging of copper described above, emphasizing the difficulty to get a simple relation between copper impact on microbial diversity and its bioavailability or soil characteristics. These results emphasize the hypothesis of a control of metal toxicity and microbial response to perturbation by the specific composition and diversity of the fungal community.

Our data also showed that fungi were not affected in the same way as bacteria. A similar discrepancy between the impact of copper on bacterial and fungal community structures has been recently reported in a combined field and microcosm study (9).

It should be noted that the precise biochemical measurement of copper bioavailability did not allow a good estimation of copper impact on soil fungi. This could be improved technically with a more detailed analysis of diversity modifications in fungal groups, possible if the primers are not universal (12), or with the use of a fungal biosensor that better estimates copper bioavailability to fungi.

From an agro-environmental point of view, our results allowed us to conclude that particular soil organic management can lead to a better sustainability of soil biological quality. However, the differential response of bacterial and fungal communities to copper indicates a differential toxicity of this metal and makes the link between copper dynamics and impact very complex. This study suggests that organic amendment could represent an adequate organic soil management strategy for enhancing the stability of microbial community diversity in combination with copper agricultural treatment by (i) inducing a significant copper aging leading to a reduced copper toxicity to soil micro-organisms and (ii) stimulating a specific microbial diversity with a lower sensitivity of the community to Cu. Other parameters such as pH, soil structure, and agricultural practices (influencing abiotic and biotic processes) also need to be considered to better understand copper dynamics and impact in soil.

Acknowledgments

This work was supported by the French National Program PN-ACI/ECCO through an ECODYN project. D.P.H.L. was funded by a grant from the Région Bourgogne and The Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne. We thank the Chambre d'Agriculture de Saône-et-Loire for providing the

experimental site. Thanks also to P. A. Maron and M. Bouley for helpful discussions.

Supporting Information Available

This section details the characteristics of the analyzed soils, soil pH water during incubation, and specific experimental methods (sequential extraction method, analysis of the genetic structure of microbial communities) as well as additional data on the genetic structure (example of B-ARISA profiles and soil fungal community PCA) and on the taxonomic identification of responsive bacterial populations to copper contamination. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Literature Cited

- (1) Tom-Petersen, A.; Hosbond, C.; Nybroe, O. Identification of copper-induced genes in *Pseudomonas fluorescens* and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2001**, *38*, 59–67.
- (2) Brun, L. A.; Maillet, J.; Richarte, J.; Herrmann, P.; Remy, J. C. Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environ. Pollut.* **1998**, *102*, 151–161.
- (3) Chander, K.; Brookes, P. C. Residual effects of zinc, copper and nickel in sewage-sludge on microbial biomass in a sandy loam. *Soil Biol. Biochem.* **1993**, *25*, 1231–1239.
- (4) Knight, B. P.; McGrath, S. P.; Chaudri, A. M. Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper, or zinc. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 39–43.
- (5) Giller, K. E.; Witter, E.; McGrath, S. P. Toxicity of heavy metals to micro-organisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biol. Biochem.* **1998**, *30*, 1389–1414.
- (6) Pennanen, T.; Frostegård, A.; Fritze, H.; Bååth, E. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 420–428.
- (7) Bååth, E.; Diaz-Ravina, M.; Frostegård, A.; Campbell, C. D. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 238–245.
- (8) Lejon, D. P. H.; Nowak, V.; Bouko, S.; Pascault, N.; Mougé, C.; Martins, J. M. F.; Ranjard, L. Genetic structure and diversity of copper resistant bacterial communities according to soil types, organic status and copper contamination. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2007**, *61*, 424–437.
- (9) Ranjard, L.; Echairi, A.; Nowak, V.; Lejon, D. P. H.; Nouaim, R.; Chaussod, R. Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural Cu treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, *58*, 303–315.
- (10) Girvan, M. S.; Bullimore, J.; Ball, A. S.; Pretty, J. N.; Osborn, A. M. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2692–2701.
- (11) Martins, J. M. F.; Jocteur-Monrozier, L.; Chalamet, A.; Bardin, R. Microbial response to repeated applications of low concentrations of Pentachlorophenol in an Alfisol under pasture. *Chemosphere* **1997**, *35*, 1637–1650.
- (12) Tom-Petersen, A.; Leser, T. D.; Marsh, T. L.; Nybroe, O. Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2003**, *46*, 53–62.
- (13) Sauvé, S.; McBride, M. B.; Norvell, W. A.; Hendershot, W. H. Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: Effects of copper level, pH and organic matter. *Water Air Soil Pollut.* **1997**, *100*, 133–149.
- (14) Dumestre, A.; Sauvé, S.; McBride, M.; Baveye, P.; Berthelin, J. Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, *36*, 124–131.
- (15) Guiné, V.; Spadini, L.; Muris, M.; Sarret, G.; Delolme, C.; Gaudet, J. P.; Martins, J. M. F. Zinc Sorption to cell wall components of three gram-negative bacteria: a combined titration, modelling and EXAFS study. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 1806–1813.
- (16) Jocteur-Monrozier, L.; Guez, P.; Chalamet, A.; Bardin, R.; Martins, J. M. F.; Gaudet, J. P. Distribution of micro-organisms and fate of xenobiotic molecules in unsaturated soil environments. *Sci. Total Environ.* **1993**, *136*, 121–133.

- (17) Merritt, K. A.; Erich, M. S. Influence of organic matter decomposition on soluble carbon and its copper-binding capacity. *J. Environ. Qual.* **2003**, *32*, 2122–2131.
- (18) Spack, L.; Alvarez, C.; Martins, J. M. F.; Tarradellas, J. Comparison of Supercritical Fluid Extraction (SFE), Soxhlet and shaking methods for pendimethalin extraction from soils: effect of soil properties and water content. *J. Contam. Hydrol.* **1998**, *33*, 171–185.
- (19) Zhou, L. X.; Wong, J. W. C. Effect of dissolved organic matter from sludge and sludge compost on soil copper sorption. *J. Environ. Qual.* **2001**, *30*, 878–883.
- (20) Kunito, T.; Saeki, K.; Oyaizu, H.; Matsumoto, S. Influences of copper forms on the toxicity to microorganisms in soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1999**, *44*, 174–181.
- (21) Chaudri, A. M.; Lawlor, K.; Preston, S.; Paton, G. I.; Killham, K.; McGrath, S. P. Response of a *Rhizobium*-based luminescence biosensor to Zn and Cu in soil solutions from sewage sludge treated soils. *Soil Biol. Biochem.* **2000**, *32*, 383–388.
- (22) Øvreås, L.; Torsvik, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.* **1998**, *36*, 303–315.
- (23) Lejon, D. P. H.; Sebastia, J.; Lamy, I.; Chaussod, R.; Ranjard, L. Relationships between soil organic status and microbial community density and genetic structure in two agricultural soils submitted to various types of organic management. *Microb. Ecol.* **2007**, *53*, 650–663.
- (24) Parat, C.; Lévêque, J.; Dousset, S.; Chaussod, R.; Andreux, F. Comparison of three sequential extraction procedures used to study trace metal distribution in an acidic sandy soil. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 243–247.
- (25) Wu, J.; Joergensen, R. G.; Pommerening, B.; Chaussod, R.; Brookes, P. C. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction—an automated procedure. *Soil Biol. Biochem.* **1990**, *22*, 1167–1169.
- (26) Lejon, D. P. H.; Chaussod, R.; Ranger, J.; Ranjard, L. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). *Microb. Ecol.* **2005**, *50*, 614–625.
- (27) Schloss, P. D.; Hay, A. G.; Wilson, D. B.; Walker, L. P. Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2003**, *46*, 1–9.
- (28) Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Meyers, E. W.; Lipman, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.
- (29) Ranjard, L.; Poly, F.; Lata, J.-C.; Mougel, C.; Thioulouse, J.; Nazaret, S. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 4479–4487.
- (30) Thioulouse, J.; Chessel, D.; Dolédec, S.; Olivier, J. M. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat. Comput.* **1997**, *7*, 75–83.
- (31) Pueyo, M.; Sastre, J.; Hernández, E.; Vidal, M.; López-Sánchez, J. F.; Rauret, G. Prediction of trace element mobility in contaminated soils by sequential extraction. *J. Environ. Qual.* **2003**, *32*, 2054–2066.
- (32) Pietrzak, U.; McPhail, D. C. Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma* **2004**, *122*, 151–166.
- (33) Lores, E. M.; Pennock, J. R. Bioavailability and trophic transfer of humic-bound copper from bacteria to zooplankton. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* **1999**, *187*, 67–75.
- (34) Azenha, M.; Vasconcelos, M. T.; Cabral, J. P. S. Organic-ligands reduce copper toxicity in *Pseudomonas syringae*. *Environ. Toxicol. Chem.* **1995**, *14*, 369–373.
- (35) Stone, A. T. Reactions of extracellular organic ligands with dissolved metal ions and mineral surfaces. In *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals*; Banfield, J. F., and Nealson, K. H., Eds.; Mineralogical Society of America: Washington, DC, 1997; pp 309–344.
- (36) Sigg, L.; Xue, H. B.; Kistler, D.; Sshonenberger, R. Size fractionation (dissolved, colloidal and particulate) of trace metals in the Thur River, Switzerland. *Aquat. Geochem.* **2000**, *6*, 413–434.
- (37) Terashima, M.; Oka, N.; Sei, T.; Yoshida, H. Adsorption of cadmium ion and gallium ion to immobilized metallothionein fusion protein. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1318–1323.
- (38) Thomas, J. C.; Davies, E. C.; Malick, F. K.; Endreszl, C.; Williams, C. R.; Abbas, M.; Petrella, S.; Swisher, K.; Perron, M.; Edwards, R.; Osenkowski, P.; Urbanczyk, N.; Wiesend, W. N.; Murray, K. S. Yeast metallothionein in transgenic tobacco promotes copper uptake from contaminated soils. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 273–280.
- (39) Peijnenburg, W. J. G. M.; Postuma, L.; Eijssackers, H. J. P.; Allen, H. E. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1997**, *37*, 163–172.
- (40) Speir, T. W.; Kettles, H. A.; Percival, H. J.; Parshotam, A. Is soil acidification the cause of biochemical responses when soils are amended with heavy metal salts. *Soil Biol. Biochem.* **1999**, *31*, 1953–1961.
- (41) Ranjard, L.; Brothier, E.; Nazaret, S. Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 5334–5339.
- (42) Sandaa, R. A.; Torsvik, V.; Enger, O.; Daae, F. L.; Castberg, T.; Hahn, D. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1999**, *30*, 237–251.
- (43) Hery, M.; Nazaret, S.; Jaffre, T.; Normand, P.; Navarro, E. Adaptation to nickel spiking of bacterial communities in neocaledonian soils. *Environ. Microbiol.* **2003**, *5*, 3–12.
- (44) Gremion, F.; Chatzinotas, A.; Harms, H. Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environ. Microbiol.* **2003**, *5*, 896–907.
- (45) Goodfellow, M.; Williams, S. T. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **1983**, *37*, 189–216.

ES071652R



Original article

Differential copper impact on density, diversity and resistance of adapted culturable bacterial populations according to soil organic status

David P.H. Lejon¹, Noémie Pascault, Lionel Ranjard*

INRA-Université de Bourgogne, UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement, CMSE, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 September 2009

Received in revised form

27 November 2009

Accepted 1 December 2009

Available online 9 December 2009

Handling editor: Bryan Griffiths

Keywords:

Bacteria

Copper impact

Soil organic matter

Copper resistance

ABSTRACT

The effect of copper on the abundance, diversity and resistance of viable heterotrophic and copper resistant bacterial populations (Cu^R) was evaluated in soils differing only by their amount and type of organic matter. These soils have been obtained using a vineyard soil that had been subjected to three different organic matter managements (Not Amended (NA) or amended with Straw (S) or Conifer Compost (CC)) in a long term field experiment. Soil microcosms were artificially contaminated with copper ($250 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ of soil) and incubated for 35 days. Throughout the incubation, a differential copper impact on viable heterotrophic and Cu^R bacterial enumeration was demonstrated according to the soil organic status with a magnitude which followed the order: $\text{NA} > \text{CC} \geq \text{S}$. Diversity of Cu^R bacteria revealed no significant difference between the uncontaminated soils, as determined by 16S rRNA sequencing. However, copper spiking induced an enrichment of particular populations depending on soil, with *Methylobacterium*, *Ralstonia* and *Staphylococcus* like species becoming dominant in NA, S and CC soils, respectively. Evaluation of the *copA* gene distribution and diversity, through PCR detection and sequencing, revealed that few Cu^R bacteria (from 7 to 13%) possessed this genetic determinant before the addition of metal. Copper contamination induced an increase in the dissemination of homologous *copA* genes only in *Ralstonia* like species indigenous to S soils. From a functional point of view, copper minimum inhibitory concentration for each Cu^R strain was measured. It did not highlight variable copper resistance efficiency between strains belonging to different taxonomic groups, harboring or not the *copA* gene, and originating from different soils contaminated or not by copper.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Copper is an essential micronutrient for all living organisms since it is a constituent of many metalloenzymes and proteins involved in electron transport, redox and other important reactions [9]. On the other hand, copper present at high levels is toxic to microbial cells due to the interaction of the free ionic form (Cu^{2+}) with nucleic acids, enzyme active sites and membrane components [7]. In agricultural soils, copper has been widely used for many years as the active ingredient in bactericides and fungicides leading to its considerable accumulation in the first centimeters of these soils with frequently measured concentrations ranging from 100 to 1000 mg kg^{-1} of soil [8]. From an environmental point of view, such high copper concentration has been largely demonstrated to induce

harmful effects on indigenous microbial communities by affecting their abundance and their activity [29].

For 20 years, numerous studies, targeting the whole community [36,42] or the cultivable heterotrophic populations [11,32,37] have demonstrated that soil metal contamination induced important modifications in the community composition which resulted, for some of them, from the enrichment of adapted populations and the decrease in sensitive ones. For example, by targeting bacterial domains with the t-RFLP technique (terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism), Tom-Petersen et al. [42] revealed that copper contamination induced specific modifications in *Rhizobium-Agrobacterium* and in *Cytophaga* groups mainly due to increase in the *Bartonella* and *Psychroserpens burtonensis*, respectively. Lejon et al. [23] have identified that specific modifications of bacterial community structure in soils, which were artificially contaminated with copper, were due to the enrichment of populations belonging to *Actinobacteria*. Regarding cultivable populations, several studies have demonstrated that Gram-negative bacteria, especially populations belonging to *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, and *Methylobacterium*, are more tolerant to copper and predominant in contaminated soils than Gram-positive organisms [11,19].

* Corresponding author. Tel.: +33 3 80 69 30 88; fax: +33 3 80 69 32 24.

E-mail addresses: lionel.ranjard@dijon.inra.fr, d.lejon@ucc.ie (L. Ranjard).¹ Present addresses: Environmental Research Institute-University College Cork, Lee Road, Cork, Ireland.

A comparison of all of these studies highlights the fact that various taxonomic groups become dominant in copper contaminated soils. As it is well known that microbial species [6] and even several strains of the same species [4] can also be characterized by very different levels of sensitivity to metal toxicity, such a variety of adapted populations between soils could be explained by differences in copper bioavailability. Factors such as pH, redox potential, mineralogy and soil organic matter content and type are determinant in the sorption/desorption or complexation processes of copper and therefore strongly manage its immobilization [10,38,42]. In addition, community response to metal contamination can be mostly explained by the innate diversity and composition of the indigenous community that can also vary according to soil [14,23]. Despite these considerations, studies focusing on the influence of soil characteristics and/or of bacterial diversity on the community response to copper (link diversity–stability) by comparing different soils have remained scarce [14].

Amongst all soil components, soil organic matter is one of the most reactive towards copper immobilization into forms that are less available to the soil microbial community [1,3,10]. Soil organic matter is generally assumed to be the main characteristic influencing microbial life by shaping the density, activity and diversity of the indigenous community [16,28]. In previous studies, we evaluated to what extent Soil Organic Status (SOS, defined as the amount and type of soil organic matter) can exert an influence on the soil microbial community response to copper contamination. In a first study, we evaluated the role of amount and biochemical quality of soil organic matter in shaping the microbial community abundance (microbial biomass) and genetic structure by comparing vineyards soils which had been subjected to different organic matter managements spanning over 10 years [25]. In a second work, we demonstrated in a microcosm experiment of these soils that short term copper contamination resulted in a differential impact of copper on the entire microbial community according to the SOS and showed that this was related to metal bioavailability and to the composition of the indigenous community [23]. Using the same experimental design, we also evaluated the response of the copper resistant community by developing a DNA fingerprinting approach targeting the *copA* gene homologous to those described in *Proteobacteria* which is one of the genetic determinants of bacterial copper resistance [24]. This approach highlighted the fact that each SOS was characterized by a particular genetic structure of the resistant community and that community adaptation was preferentially controlled by the diversity of the innate *copA* genes rather than the bioavailability of the metal.

In the present study, our objective was to evaluate more comprehensively the effects of copper contamination on the abundance, diversity and adaptation of the bacterial community in relation to different soil organic status by targeting the cultivable populations. The experimental design was based on the use of soil microcosms containing vineyard soils that had been subjected to three different organic matter management, contaminated or not with copper (250 mg Cu kg⁻¹ dry soil) and incubated for 35 days. By using a cultivation based approach we aimed at performing a study complementary to those already published on the same set of experiments targeting soil DNA and molecular tools to assess soil

microbial diversity [23,24]. The relationships between the results obtained from cultivable populations in this study and those obtained from the entire community (DNA based approach) in the previous studies are discussed in terms of the overall adaptation of the community.

2. Materials and methods

2.1. Soil sampling and microcosm set-up

Mâcon NA, S and CC soils have the same mineral matrix but differ in their Soil Organic Status (SOS), in terms of the quantity (Table 1) and quality [25] of organic matter. These soils were obtained from a long term soil organic management project (15 years) without any copper treatment and resulted from repeated amendments with Straw (S), Conifer Compost (CC) or Not Amended (NA) [25]. Other soil parameters, such as soil structure and CEC, which could be affected by such practices, were not tested in our study. Triplicate soil microcosms consisted of 150 g soil (dry weight) hermetically sealed in 2 L glass jars. Soils were contaminated with CuCl₂ to reach a final concentration of 250 mg Cu kg⁻¹ of soil. Uncontaminated control microcosms were supplemented with sterile water (H₂O). The volume of the solution added was calculated in order to reach 80% of the water holding capacity of the soil. Soil microcosms were incubated in the dark at 20 °C for 35 days, with weekly aeration and adjustment of soil water content to maintain optimal biotic conditions.

2.2. Viable heterotrophic and copper resistant (Cu^R) cultivable bacteria enumeration

Enumeration of bacteria was carried out after 15 and 35 days of incubation (t15d and t35d) on NA, S and CC soil microcosms spiked with (+CuCl₂) or without (+H₂O) CuCl₂. YG-agar [19] supplemented or not with 2 mM of Cu was used as a medium to which cycloheximide (100 µg mL⁻¹) was added to inhibit fungal growth. Following the findings of Kunito et al. [19], bacteria which could grow on the YG-medium containing 2 mM Cu were considered as being copper resistant. In this way, the dynamic of copper resistant bacteria (Cu^R) was observed throughout the incubation period of the different soils. Plates with between 10 and 100 colonies per plate were counted. Data were expressed as the means of triplicate determinations.

2.3. Cu^R strain identification

About 30–51 Cu^R strains were isolated randomly from both the NA and CC soil at t15d and from S soil at t35d in control (+H₂O) and contaminated (+Cu) microcosms. Strains were isolated only at those sampling times showing a significant copper effect. Strains were subjected to single-colony isolation on 2 mM Cu YG-medium and kept at –80 °C in 25% glycerol. Genomic DNA from Cu^R bacterial strains was obtained from cell lysis using freeze/thaw cycles [43]. The bacterial 16S rRNA gene was amplified using the universal primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') [22]. PCR reactions were

Table 1
Physico-chemical characteristics of the soils.

	Texture (%)			pH	Organic C (g kg ⁻¹)	Organic N (g kg ⁻¹)	C/N	Cu tot (mg kg ⁻¹)	Cu EDTA (mg kg ⁻¹)
	Clay	Silt	Sand						
Mâcon NA	32	57	11	6.8	12.9	1.10	12	62	25
Mâcon S	32	58	10	6.7	19.7	1.50	13	60	27
Mâcon CC	31	56	13	6.6	45.9	2.60	18	60	22

conducted as described by Maron et al. [27]. Sequencing of amplicons was performed by GENOME express (<http://www.genome-express.com>) using the 1492R primer. Sequences provided were compared to sequences found in the GenBank Database using the BLASTn algorithm.

2.4. *copA* gene detection

copA genes were amplified from the Cu^R bacterial strains DNA using the degenerated primers CoprunF2 (5'-GG(GC)A(GC)(GCT)TACTGGT(AG)(GCT)CAC-3') and the CoprunR1 (5'-TG(AGCT)G(ACT)CATCAT(GC)GT(AG)TC(AG)TT-3') previously described as targeting mainly Proteobacterial sequences [24]. DNA fragments of expected size were selected for sequencing by GENOME express (<http://www.genome-express.com>) using the CoprunR1 primer. Sequences provided were compared to sequences found in the GenBank Database using the BLASTp algorithm [2].

2.5. Sequence analysis, phylogeny inference

Multiple-alignments were performed using the ClustalX algorithm on DNA sequences. These alignments were optimized with the Seaview software [12]. Distance matrices were computed using the two parameter model of Kimura [17] for DNA sequences. Molecular phylogenetic trees were constructed with the Neighbor-Joining method using Phylo_win [12]. Bootstrap percentages (1000 bootstrap replications) were used to test the robustness of phylogenetic relationships within the tree.

2.6. Minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC was considered as the lowest Cu concentration at which no bacterial growth was observed [19]. Cu^R bacteria were grown to the stationary phase in 10 mL liquid YG media and put on YG-agar plates to which Cu had been added. Copper concentrations ranged from 0 to 5 mM in increments of 0.5. The MIC value was determined after 7 days of incubation at 28 °C.

2.7. Statistical analysis

The effect of copper contamination on abundance of bacteria was tested by means of one-way ANOVA and differences between means were tested with the Fisher LSD test. χ^2 tests were performed to evaluate differences in frequency distribution of Cu^R identified bacterial isolates. Calculation of Shannon diversity index (H') was applied on the Cu^R isolates (at the genera level) [39].

3. Results and discussion

3.1. Shifts in viable heterotrophic and Cu^R bacterial density in various SOS following copper contamination

The number of viable heterotrophic bacteria ranged from 2×10^7 to 5×10^7 CFU g⁻¹ of soil in control microcosms (Table 2). Similar data have been traditionally observed in soils [37] and the higher viable heterotrophic number observed in CC soil is in agreement with the higher amount of soil organic matter recorded in this soil (Table 1). In the copper contaminated microcosms, a significant and transitory shift in viable heterotrophic bacteria was observed in the NA soil microcosm at t15d with a significant decrease ($p < 0.05$) from 2.8×10^7 to 4.0×10^6 CFU g⁻¹ of soil (Table 2). A similar alteration in bacterial density has been already recorded in metal contaminated soils [13]. However, our results revealed that the copper impact on viable heterotrophic bacteria depends on the amount and biochemical quality of soil organic matter, characterized in a previous study [25], since no modification was observed in either S or CC soil microcosms. A lower level of bioavailable copper in the latter soil microcosms compared with NA during the first week of the experiment had been demonstrated in a previous [23] study and could explain these results (460 ± 110 ng Cu g⁻¹ soil NA, and 148 ± 60 and 129 ± 51 ng Cu g⁻¹ soil, lower in the S and CC, respectively at t0d).

In the same way, the dynamic of copper resistant bacteria (Cu^R) was tracked throughout the incubation period of the different soils. In control microcosms (+H₂O), Cu^R bacteria remained stable over the incubation time and were found at the same level in all soils, with an average of 3×10^3 CFU g⁻¹ of soil, which represented 0.013%, 0.012%, and 0.01% of the viable heterotrophic bacteria in NA, S, and CC soil, respectively. These values were consistent with other studies [19] and confirmed that Cu^R bacteria occur naturally in uncontaminated or weakly contaminated environments.

The dynamics of Cu^R in contaminated microcosms showed a significant increase ($p < 0.05$) at t15d in NA and CC soils representing an enrichment factor of 3.4 and 2.7, respectively. This increase was transitory for CC soil, whereas it remained stable for NA at t35d (Table 2). At this date, a significant enrichment factor of 2.8 for Cu^R bacteria occurred in S soil. The enrichment of resistant strains is commonly observed in soils contaminated with copper [11] or with other metals [5,37]. However, in our study we demonstrated that the enrichment level was controlled by the SOS. The higher and stable Cu^R enrichment factor observed in NA soil is in accordance with the higher copper bioavailability measured in this soil [23] and confirmed that the measurement of quantitative modifications of cultivable adapted bacteria is an indicator of metal toxicity in soils [20,37].

3.2. Influence of SOS on the innate diversity of Cu^R phenotypes

Phylogenetic trees revealed that Cu^R isolates belonged to α -, β -, γ -Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes and Actinobacteria. A

Table 2
Viable heterotrophic and copper resistant (Cu^R) bacterial counts (CFU g⁻¹ soil).

	NA + H ₂ O	NA + Cu	S + H ₂ O	S + Cu	CC + H ₂ O	CC + Cu
Viable heterotrophic bacteria						
t15d	$2.8 \times 10^7 \pm 0.1^a$	$4.0 \times 10^6 \pm 0.3^b$	$2.8 \times 10^7 \pm 0.2^a$	$2.3 \times 10^7 \pm 0.1^a$	$5.2 \times 10^7 \pm 0.9^a$	$6.2 \times 10^7 \pm 1^a$
t35d	$2.3 \times 10^7 \pm 0.06^a$	$1.8 \times 10^7 \pm 0.3^a$	$2.1 \times 10^7 \pm 0.4^a$	$2.6 \times 10^7 \pm 0.2^a$	$3.8 \times 10^7 \pm 1^a$	$4.2 \times 10^7 \pm 0.3^a$
Cu ^R bacteria						
t15d	$3.0 \times 10^3 \pm 0.3^a$	$1.0 \times 10^4 \pm 0.2^b$	$3.1 \times 10^3 \pm 0.6^a$	$5.2 \times 10^3 \pm 0.6^a$	$2.6 \times 10^3 \pm 0.3^a$	$7.2 \times 10^3 \pm 1^b$
t35d	$3.1 \times 10^3 \pm 0.2^a$	$9.0 \times 10^3 \pm 0.5^b$	$2.6 \times 10^3 \pm 0.2^a$	$7.3 \times 10^3 \pm 0.2^b$	$3.8 \times 10^3 \pm 0.2^a$	$2.4 \times 10^3 \pm 0.5^a$

Data are means of triplicates from three independent repetitions of microcosms $\pm$ standard error.

Superscript letters indicated statistical differences between contaminated and control microcosms for each SOS at a given time ($p < 0.05$).

lower diversity of Cu^R bacteria in NA soil ($H' = 1.03$) compared to S and CC soils ($H' = 1.60$ and 1.35 , respectively) resulted from a larger number of minor populations as well as from a higher equitability between Cu^R populations (Fig. 1). Though our limited sampling strategy of isolates, these findings were consistent with Øvreås and Torsvik [35] who demonstrated a positive relationship between microbial diversity and soil organic matter content. Nevertheless, comparison of the distribution of the Cu^R phylogenetic affiliation among NA, S and CC control microcosms both at the class and genus levels did not reveal any significant differences (as demonstrated by χ^2 test of the global frequency distribution), suggesting a weak relationship between the soil organic status and the innate composition of adapted populations (Fig. 1). With the isolation media used, bacteria belonging mainly to the α -Proteobacteria class (53–57%) and to the Firmicutes class (38–43%) were isolated in all soils (Figs. S1–S3). More precisely, the α -Proteobacteria were mainly composed of the *Methylobacterium* genus (47–53%) and the Firmicutes of the *Staphylococcus* (17–37%) and *Bacillus* (6–17%) genera. Our results were consistent with several studies stating that the majority of the metal resistant strains in a soil were Gram-negative [11,13,37]. At a finer level, phylogenetic trees revealed a great diversity of *Methylobacterium* and *Staphylococcus* like species for a given soil, supporting that metal resistance was distributed amongst a great variety of close species, as previously revealed for Hg^R phenotypes [32].

3.3. Influence of SOS on the modifications of the diversity of Cu^R phenotypes in response to copper contamination

During soil incubation, modifications in the Cu^R bacterial diversity in response to copper contamination were different according to SOS. Comparison of Shannon diversity indices between control and contaminated microcosms revealed that copper reduced the diversity in NA soil (H' from 1.03 to 0.87, respectively) whereas in S and CC soils Cu^R diversity increased (from 1.60 to 1.82 in S and from 1.35 to 1.45 in CC soils). Comparison of Cu^R taxonomic composition between control and contaminated microcosms (by a χ^2 test of the global frequency distribution) revealed a significant shift in NA ($p = 0.007$) but not in S ($p = 0.096$) and CC ($p = 0.265$) soils. Altogether, these results emphasized that copper induced strong and differential modifications of Cu^R diversity and population structure according to the amount and quality of soil organic matter [24]. In addition to the higher bioavailability of copper discussed above (Section 3.1), the more marked impact recorded in NA soil could also be partly explained by its lower diversity compared to the other soils (as described in Section 3.2). Such a hypothesis is supported by previous studies demonstrating

that bacterial communities exhibiting lower diversity were less stable and resistant towards metallic pollutants supporting the concept of ecological insurance as described by Loreau [26].

More precisely, copper spiking stimulates particular bacterial Cu^R populations according to SOS. In NA soil, both enrichment in *Methylobacterium* like species (from 53% to 76%) and a decrease in *Staphylococcus* like species (from 37% to 10%) were observed (Fig. 1). In similar findings, Kunito et al. [19] found that most of Cu^R strains isolated from copper contaminated soils were related to the *Methylobacterium* like species. In S soil, copper induced an increase in Cu^R *Ralstonia* like species (from 8% to 29%) and a decrease in *Methylobacterium* like species (from 45% to 24%). *Ralstonia* like species are well known to be highly resistant to copper and other metals and frequently isolated from contaminated environments [5,18,30,32]. Although in CC soil the modification of the global population structure was not significant, some Cu^R populations were significantly affected by copper with enrichment in *Staphylococcus* like species (from 30% to 49%) and a decrease in *Methylobacterium* like species (from 47% to 27%, Fig. 1). In addition, a more detailed analysis of the phylogenetic tree highlighted a great inter-species diversity within each dominant Cu^R population after copper spiking, suggesting that community adaptation to metal did not result from a clonally multiplication of particular adapted phenotypes (supplemental data; Figs. S1–S3).

The enrichment of the particular culturable populations in each soil can be partly explained by a combination of differences in both copper bioavailability and in the carbon source supply. Microbial species and even several strains of the same species generally exhibit very different levels of sensitivity to metal toxicity [6]. In addition, microorganisms are mainly heterotrophic and carbon-limited in soil and their growth and population dynamics are very dependent on the availability and quality of the carbon source supplied by the soil organic matter [15]. Our hypothesis is that the combination of copper toxicity and the availability and type of carbon supply can drive the quantitative and qualitative microbial response to metal contamination. In our case, this hypothesis is supported by the fact that *Methylobacterium* like species are commonly described as being highly tolerant to copper [19] as well as indigenous to oligotrophic environments [34] which the NA soil can be considered. In the same way, *Staphylococcus* are known to be able to degrade more recalcitrant organic matter as described for CC soil by Lejon et al. [24].

3.4. *copA* distribution among Cu^R phenotypes

The distribution of *copA* genes, one of the genetic determinants involved in copper resistance [33], amongst Cu^R isolates was investigated by a PCR screening strategy on genomic DNA using a set of primers designed in a previous study [24]. Unexpectedly, only 14% of all the Cu^R bacteria (37 strains of 270 screened) possessed a sequence homologous to *copA* encoding for a periplasmic multicopper oxydase. Most of the *copA* detected were found to belong to *Ralstonia* like species (54% of all strains) followed by the *Staphylococcus* (12%), *Bacillus* (10%) and several groups of α -Proteobacteria (8%, Table 3). *cop* genes can be carried either by chromosome or on plasmids, where most of the functional genes have been found to be localized [9,30]. Kunito et al. [19] have found that only 0, 15.2 and 16.7% of the Cu^R bacteria isolated from three different contaminated soils possessed plasmids, a finding which is consistent with our observed distribution of *copA* genes among Cu^R bacteria. Such an observation is consistent with the hypothesis that few strains harbored *cop* genes as a copper resistance determinant and consequently that mechanisms other than copper sequestration could be involved in bacterial adaptation [21]. For example, mechanisms such as copper efflux through P-type ATPase have

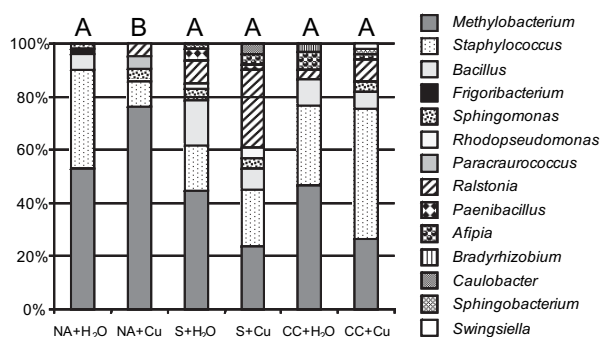


Fig. 1. Relative frequency distribution of each genus among the three different soil microcosms (NA, S and CC) contaminated with copper (+Cu) or not (+H₂O). Letters (A and B) indicate significant differences ($p < 0.05$) in the frequency distribution revealed by a χ^2 test.

Table 3
copA gene distribution among soil Cu^R bacteria, at the class and the genus level, isolated from the three different soil microcosms (NA, S and CC) contaminated (+Cu) or not (+H₂O).

Phylogenetic affiliation	% of <i>copA</i> distribution in taxonomic groups ^a (%)	% of <i>copA</i> distribution among soil treatments					
		NA + H ₂ O	NA + Cu	S + H ₂ O	S + Cu	CC + H ₂ O	CC + Cu
<i>Actinobacteria</i>	0 (0/1)	0 (0/1)					
<i>Frigoribacterium</i>	0 (0/1)	0 (0/1)					
<i>α-Proteobacteria</i>	8 (11/142)	4 (1/28)	8 (3/36)	12 (3/25)	10 (2/20)	6 (1/17)	6 (1/16)
<i>Methylobacterium</i>	6 (7/119)	4 (1/27)	6 (2/32)	10 (2/21)	8 (1/12)	7 (1/14)	0 (0/13)
<i>Sphingomonas</i>	11 (1/9)	0 (0/1)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)		50 (1/2)
<i>Rhodopseudomonas</i>	0 (0/3)			0 (0/1)	0 (0/2)		
<i>Paracraurococcus</i>	50 (1/2)		50 (1/2)				
<i>Afipia</i>	33 (2/6)			100 (1/1)	50 (1/2)	0 (0/2)	0 (0/1)
<i>Bradyrhizobium</i>	0 (0/1)					0 (0/1)	
<i>Caulobacter</i>	0 (0/2)				0 (0/2)		
<i>Firmicutes</i>	12 (12/99)	18 (4/22)	0 (0/4)	11 (2/18)	19 (3/16)	8 (1/12)	7 (2/27)
<i>Staphylococcus</i>	12 (9/75)	21 (4/19)	0 (0/4)	25 (2/8)	0 (0/11)	11 (1/9)	8 (2/24)
<i>Bacillus</i>	10 (2/21)	0 (0/3)		0 (0/8)	50 (2/4)		0 (0/3)
<i>Paenibacillus</i>	33 (1/3)			0 (0/2)	100 (1/1)	0 (0/3)	
<i>β-Proteobacteria</i>	54 (14/26)		100 (2/2)	25 (1/4)	67 (10/15)	0 (0/1)	25 (1/4)
<i>Ralstonia</i>	54 (14/26)		100 (2/2)	25 (1/4)	67 (10/15)	0 (0/1)	25 (1/4)
<i>Bacteroides</i>	0 (0/1)						0 (0/1)
<i>Sphingobacterium</i>	0 (0/1)						0 (0/1)
<i>γ-Proteobacteria</i>	0 (0/1)						0 (0/1)
<i>Swingsiella</i>	0 (0/1)						0 (0/1)
Total per soil treatment ^b		10 (5/51)	12 (5/42)	13 (6/47)	29 (15/51)	7 (2/30)	8 (4/49)

^a In brackets are indicated the ratios of *copA* possessing strains/all strains for a given taxonomic group.

^b In brackets are indicated the ratios of *copA* possessing strains/all strains for a given soil treatment.

been described in various organisms [33,41]. Even if this genetic determinant may represent a relevant marker to resolve the genetic structure and diversity of the copper resistant functional community, from a methodological point of view, the primers used did not cover the overall diversity of the *copA* determinant described among bacterial species. This statement is especially true in Gram-positive organisms since primers were designed with Proteobacterial sequences [24] and thus it will be necessary to confirm such distribution by the use of a set of consensus primers focusing a larger part of bacterial community.

Similar level of *copA* gene distribution among Cu^R strains were evidenced in NA, S and CC control soils (from 7% to 13% of all strains) suggesting that SOS did not influence *copA* occurrence in pristine environments. However, a significant increase in *copA* dissemination consecutive to copper spiking was only recorded in S soil (from 13% to 29%) and this corresponded to the enrichment of *Ralstonia* like species harboring these genetic determinants (Table 3, Fig. S2).

Of the 17 *copA* genes detected by PCR screening on *Ralstonia* like species, 10 were sequenced and a phylogenetic tree was built up by integrating 11 reference *copA* sequences (Fig. 2). As expected, molecular phylogeny of the *copA* genes revealed a clustering of *copA* sequences from *Ralstonia* like species with the reference sequences of *Cupriavidus metallidurans* and *Ralstonia solanacearum*. In addition, this phylogeny also revealed a high homology between the different sequences detected in various *Ralstonia* like species isolated from contaminated S soils. This result might result either from an enrichment of pre-adapted populations and/or from a lateral gene transfer between these *Ralstonia* populations consecutive to copper spiking. It has already been demonstrated that a metal contamination, like Hg, in soil induces a high frequency of the lateral transfer of genes encoding for metal resistance and carried by plasmids [40]. Moreover, Smit et al. [40] also demonstrated that the frequency of lateral gene transfer is more efficient in soil niches with a high amount of available carbon substrate which can correspond to the organic status of S soil [25].

3.5. Link between copper resistance efficiency, Cu^R phenotypes taxonomic affiliation and presence of *copA* genes

Copper resistance efficiency of 244 Cu^R strains was performed by measuring the MIC as described by Kunito et al. [19] and defined by Mergeay et al. [31] as the “lowest Cu concentration at which no CFU was observed”. MIC varied greatly among Cu^R strains ranging from 2.0 to 5.0 mM Cu, with most of the strains exhibiting a MIC between 2.0 and 3.0 mM (Table 4). With regard to the populations becoming dominant in each copper contaminated soil no significant difference was observed between *Methylobacterium* (in NA soil), *Ralstonia* (in S soil) and *Staphylococcus* like species (in CC soil). These findings did not support the hypothesis that the enrichment of particular populations in each contaminated soil might be due to differences in their sensitivity to metal stress combined with differences in copper bioavailability between soils. Comparison of the Cu resistance efficiency between soils and treatments for a given Cu^R taxonomic group did not highlight shifts in MIC. In S contaminated soils, the enrichment of *Ralstonia* like species harboring *copA* genes did not fit with an increase in the copper resistance of these strains. These results indicate also that efficient copper resistant strains can occur in uncontaminated soils as discussed in literature [11]. Altogether, these results add to the conclusion that the stimulation of adapted populations consecutive to Cu contamination was not the result of a more efficient copper resistance. As previously hypothesized (Section 3.3), It could be due to the ability of these populations to survive in the presence of high concentrations of metal by using a particular type of soil organic matter as carbon and energy sources.

3.6. Contribution of Cu^R phenotypes to the whole community adaptation

In a previous study, performed in the same experimental conditions but targeting the entire bacterial community, we have demonstrated i) a differential impact of copper on the genetic structure of bacterial communities according to the SOS with

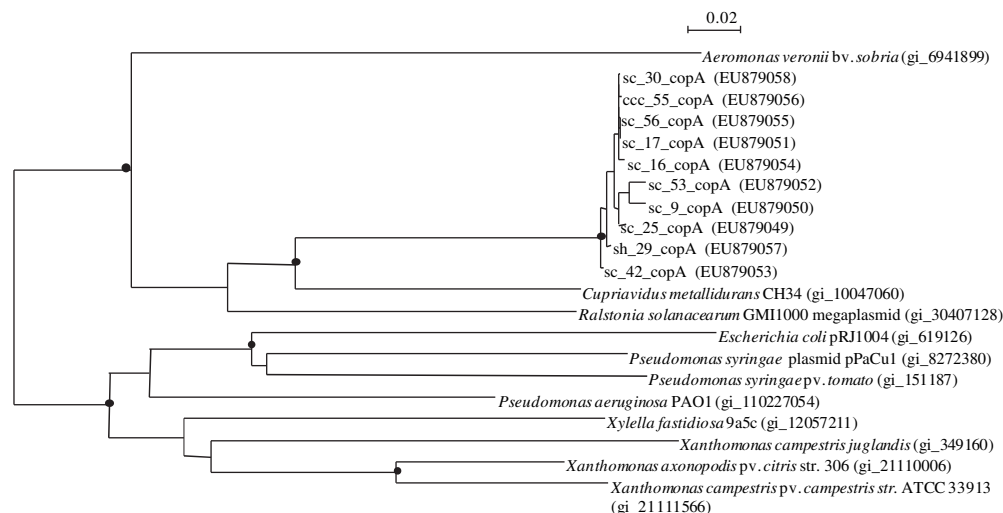


Fig. 2. NJ phylogenetic tree representing *copA* nucleotidic sequences from Cu^R *Ralstonia* like species isolated from S and CC soil microcosms contaminated with copper (sc, ccc) or not (sh, cch). Reference sequences were determined after BLAST research. Bootstrap values were estimated from 1000 replicates. Horizontal distances are proportional to observed divergences expressed in substitutions per 100 sites. Bootstrap values above 80% are indicated with a black spot. Accession numbers are indicated between brackets.

a magnitude which followed the order: NA > S = CC, and ii) that in NA soil these modifications resulted from the enrichment of populations affiliated with the *Actinobacteria* taxonomic group [23]. In the present study, the shifts in viable heterotrophic and Cu^R bacterial enumerations due to copper contamination in relation to SOS followed a similar order of magnitude (NA > CC ≥ S). However, Cu^R diversity modifications highlighted the enrichment of *Methylobacterium*, *Ralstonia* and *Staphylococcus* like species, in the NA, S and CC soils, with no evidence of the involvement of the *Actinobacteria*. Similarly, by analyzing a *copA* clone library directly from

soil DNA, we observed a particular *copA* diversity for each SOS [24] that did not coincide with the *copA* gene diversity described in Cu^R strains isolated from pristine and contaminated soils (essentially affiliated in S soil with *copA* from *Ralstonia* like species). Altogether, the compilation of these results emphasized that cultivable populations did not contribute strongly to the shifts and adaptation process observed at the level of the entire community [32] and that using distinct approaches by targeting different levels of investigation may represent a more comprehensive way of resolving microbial dynamics in response to metallic perturbation.

Table 4

Minimum Inhibitory Concentration (MIC; mM of Cu) of Cu^R bacteria isolated from the different soil microcosms (NA, S and CC) contaminated (+Cu) or not (+H₂O). Values are means ± standard deviation.

Phylogenetic affiliation	MIC of taxonomic groups ^a	MIC of taxonomic groups in each soil treatment					
		NA + H ₂ O	NA + Cu	S + H ₂ O	S + Cu	CC + H ₂ O	CC + Cu
<i>Actinobacteria</i>	5.0	5.0					
<i>Frigoribacterium</i>	5.0	5.0					
<i>α-Proteobacteria</i>	2.4 ± 0.6	3.0 ± 0.8	2.1 ± 0.3	2.2 ± 0.4	2.3 ± 0.4	2.3 ± 0.4	2.4 ± 0.5
<i>Methylobacterium</i>	2.4 ± 0.6	3.0 ± 0.8	2.1 ± 0.3	2.2 ± 0.4	2.3 ± 0.5	2.3 ± 0.4	2.4 ± 0.5
<i>Sphingomonas</i>	2.3 ± 0.5	3.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0		3.0
<i>Rhodopseudomonas</i>	2.2 ± 0.3			2.0	2.3 ± 0.4		
<i>Paracraurococcus</i>	2.3 ± 0.4						
<i>Afpia</i>				3.0	2.0	2.0 ± 0.0	2.5
<i>Bradyrhizobium</i>							
<i>Caulobacter</i>	2.5				2.5		
<i>Firmicutes</i>	2.4 ± 0.6	2.9 ± 0.8	2.3 ± 0.5	2.3 ± 0.4	2.3 ± 0.5	2.0 ± 0.2	2.4 ± 0.5
<i>Staphylococcus</i>	2.4 ± 0.6	2.8 ± 0.8	2.3 ± 0.5	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.5	2.1 ± 0.2	2.4 ± 0.3
<i>Bacillus</i>	2.4 ± 0.6	3.0 ± 1.4		2.6 ± 0.5	2.3 ± 0.3	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0
<i>Paenibacillus</i>	2.3 ± 0.6			3.0 ± 0.7	3.0		
<i>β-Proteobacteria</i>	3.0 ± 0.5		3.0 ± 0.7	2.8 ± 0.6	3.0 ± 0.5	2.5	3.4 ± 0.3
<i>Ralstonia</i>	3.0 ± 0.5		3.0 ± 0.7	2.8 ± 0.6	3.0 ± 0.5	2.5	3.4 ± 0.3
<i>Bacteroides</i>	3.0						3.0
<i>Sphingobacterium</i>	3.0						3.0
<i>γ-Proteobacteria</i>							
<i>Swingsiella</i>							
MIC per treatment ^b		3.0	2.1	2.5	2.3	2.1	2.5

^a Values are means ± standard deviation for all the strains of a given taxonomic group.

^b MIC per treatment corresponds with average MIC for each treatment balanced with proportion of the genus and was calculated as follows: $\sum (\text{MIC for each bacterial genus for a given soil}) \times (\text{proportion of this genus in this soil})$.

4. Conclusion

Our study confirmed that measuring shifts in the cultivable adapted populations might be a relevant way to evaluate the impact of copper and the influence of soil organic status on the response of soil bacterial communities. We highlighted that soil organic status strongly managed the diversity of adapted bacterial cultivable populations and their dynamics in response to metal stress. Although, the contribution of Cu^R cultivable populations to the whole community response is not clear, the combination of approaches targeting cultivable populations, on the whole community and also on the functional copper resistant genes is necessary in order to obtain an overview of the microbial modifications and strategy of adaptation.

Acknowledgement

This work was supported by the French National Program PN/ACI “ECCO” through an ECODYN project. D.P.H. Lejon was funded by a grant from the Région Bourgogne and The Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne. We would like to thank Pierre-Alain Maron, Mary Bouley and Bill Ryan for their critical reading of the manuscript and their help.

Appendix. Supplementary information

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ejsobi.2009.12.002](https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2009.12.002).

References

- [1] B. Alloway, Soil processes and the behaviour of metals. in: B. Alloways (Ed.), *Heavy Metals in Soils*. Chapman and Hall, London, 1995, pp. 9–38.
- [2] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Meyers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410.
- [3] M. Azenha, M.T. Vasconcelos, J.P.S. Cabral, Organic-ligands reduce copper toxicity in *Pseudomonas Syringae*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14 (1995) 369–373.
- [4] C. Balsalobre, J. Calonge, E. Jimenez, R. Lafuente, M. Mourino, M.T. Munoz, M. Riquelme, J. Mascarella, Using the metabolic capacity of *Rhodobacter sphaeroides* to assess heavy-metal toxicity. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8 (1993) 437–450.
- [5] T. Barkay, S. Tripp, B.H. Olson, Effect of metal-rich sewage sludge application on the bacterial communities of grasslands. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1985) 1026–1029.
- [6] I. Berdichevsky, L. Duek, D. Merzbach, S. Yannai, Susceptibility of different yeast species to environmental toxic metals. *Environ. Pollut.* 80 (1993) 41–44.
- [7] N.L. Brown, D.A. Rouch, B.T.O. Lee, Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid* 27 (1992) 41–51.
- [8] L.A. Brun, J. Maillet, J. Richarte, P. Herrmann, J.C. Remy, Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environ. Pollut.* 102 (1998) 151–161.
- [9] C. Cervantes, F. Gutierrez-Corona, Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 14 (1994) 121–137.
- [10] A. Dumestre, S. Sauve, M. McBride, P. Baveye, J. Berthelin, Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36 (1999) 124–131.
- [11] T. Duxbury, B. Bicknell, Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biol. Biochem.* 15 (1983) 243–250.
- [12] N. Galtier, M. Gouy, C. Gautier, Seaview and Phylo_win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 12 (1996) 543–548.
- [13] K.E. Giller, E. Witter, S.P. McGrath, Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* 30 (1998) 1389–1414.
- [14] M.S. Girvan, C.D. Campbell, K. Killham, J.I. Prosser, L.A. Glover, Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ. Microbiol.* 7 (2005) 301–313.
- [15] E. Kandeler, M. Stemmer, M.H. Gerzabek, Role of microorganisms in carbon cycling in soil. in: F. Buscot, A. Varmas (Eds.), *Soil Biology: Microorganisms in Soil; Roles in Genesis and Functions*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2005, pp. 139–157.
- [16] E. Kandeler, M. Stemmer, E.-M. Klimanek, Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biol. Biochem.* 31 (1999) 261–273.
- [17] M. Kimura, A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16 (1980) 111–120.
- [18] K.T. Konstantinidis, N. Isaacs, J. Flett, S. Simpson, D.T. Long, T.L. Marsh, Microbial diversity and resistance to copper in metal-contaminated lake sediment. *Microb. Ecol.* 45 (2003) 191–202.
- [19] T. Kunito, K. Nagaoka, N. Tada, K. Saeki, K. Senoo, H. Oyaizu, S. Matsumoto, Characterization of Cu-resistant bacterial communities in Cu-contaminated soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43 (1997) 709–717.
- [20] T. Kunito, H. Oyaizu, S. Matsumoto, Ecology of soil heavy metal-resistant bacteria and perspective of bioremediation of heavy metal-contaminated soils. *Recent Res. Dev. Agric. Biol. Chem.* 2 (1998) 185–206.
- [21] T. Kunito, K. Saeki, K. Nagaoka, H. Oyaizu, S. Matsumoto, Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *Eur. J. Soil Biol.* 37 (2001) 95–102.
- [22] D.J. Lane, 16S/23S rRNA sequencing. in: E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, New York, 1991, pp. 115–175.
- [23] D.P.H. Lejon, J. Lévêque, J.M.F. Martins, L. Spadini, N. Pascault, D. Landry, M. J. Milloux, V. Nowak, R. Chaussod, L. Ranjard, Copper dynamics and impact on microbial communities according to soil organic status. *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 2819–2825.
- [24] D.P.H. Lejon, V. Nowak, S. Bouko, N. Pascault, C. Mougél, J.M.F. Martins, L. Ranjard, Fingerprinting and diversity of bacterial *copA* genes according to soil types, organic status and copper contamination. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61 (2007) 424–437.
- [25] D.P.H. Lejon, J. Sebastia, I. Lamy, R. Chaussod, L. Ranjard, Relationships between soil organic status and microbial community density and genetic structure in two agricultural soils submitted to various types of organic management. *Microb. Ecol.* 53 (2007) 650–663.
- [26] M. Loreau, Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. *Oikos* 91 (2000) 3–17.
- [27] P.A. Maron, C. Mougél, D.P.H. Lejon, E. Carvalho, K. Bizet, G. Marck, N. Cubito, P. Lemanceau, L. Ranjard, Temporal variability of airborne bacterial community structure in an urban area. *Atmos. Environ.* 40 (2006) 8074–8080.
- [28] P. Marschner, E. Kandeler, B. Marschner, Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.* 35 (2003) 453–461.
- [29] S. McGrath, Effects of heavy metals from sewage sludge on soil microbes in agricultural ecosystems. in: S. Ross (Ed.), *Toxic Metals in Soil–Plant Systems*. John Wiley and Sons, Chichester, 1994, pp. 247–274.
- [30] M. Mergeay, S. Monchy, T. Vallaes, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. van der Lelie, R. Wattiez, *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2003) 385–410.
- [31] M. Mergeay, D. Nies, H.G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles, F. Van Gijsegem, *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* 162 (1985) 328–334.
- [32] S. Nazaret, E. Brothier, L. Ranjard, Shifts in diversity and microscale distribution of the adapted bacterial phenotypes due to Hg(II) spiking in soil. *Microb. Ecol.* 45 (2003) 259–269.
- [33] D.H. Nies, Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (1999) 730–750.
- [34] T. Nishio, T. Yoshikura, H. Itoh, Detection of *Methylobacterium* species by 16S rRNA gene-targeted PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 1594–1597.
- [35] L. Øvreås, V. Torsvik, Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.* 36 (1998) 303–315.
- [36] L. Ranjard, A. Echairi, V. Nowak, D.P.H. Lejon, R. Nouaim, R. Chaussod, Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural Cu treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58 (2006) 303–315.
- [37] L. Ranjard, A. Richaume, L. Jocteur-Monrozier, S. Nazaret, Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24 (1997) 321–331.
- [38] S. Sauve, A. Dumestre, M. McBride, J.W. Gillett, J. Berthelin, W. Hendershot, Nitrification potential in field-collected soils contaminated with Pb or Cu. *Appl. Soil Ecol.* 12 (1999) 29–39.
- [39] C.E. Shannon, A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27 (1948) 379–423.
- [40] E. Smit, A. Wolters, J.D. van Elsas, Self-transmissible mercury resistance plasmids with gene-mobilizing capacity in soil bacterial populations: influence of wheat roots and mercury addition. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 1210–1219.
- [41] M. Solioz, J.V. Stoyanov, Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2003) 183–195.
- [42] A. Tom-Petersen, T.D. Leser, T.L. Marsh, O. Nybroe, Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46 (2003) 53–62.
- [43] Y.L. Tsai, B.H. Olson, Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 1070–1074.

NOM Prénom : Pascault Noémie

Discipline – spécialité : Sciences de la Vie – Ecologie Microbienne / Agroenvironnement

Date de soutenance : 13 juillet 2010

Titre : Réponse des communautés microbiennes du sol à l'apport de résidus de culture : influence des pratiques agricoles et lien avec le fonctionnement biologique du sol.

Résumé : A l'échelle de l'agro-écosystème, la productivité primaire est sous la dépendance du recyclage des matières organiques du sol (MOS) par l'action des organismes indigènes décomposeurs, qui minéralisent les composés organiques libérant ainsi les nutriments nécessaires à la croissance végétale. A une échelle plus globale, le recyclage des MOS détermine les flux de carbone entre le sol et l'atmosphère, avec des conséquences majeures sur la qualité de l'environnement et les changements globaux. Malgré le rôle central des microorganismes indigènes dans ces processus, la composante microbienne est encore mal connue et souvent considérée comme une boîte noire en termes de diversité et de fonctionnalité. Par conséquent, pour mieux comprendre et prédire l'évolution des MOS et donc les flux de carbone (C) dans les agro-écosystèmes, il est nécessaire de mieux connaître les populations et les mécanismes microbiens impliqués dans leur dégradation et transformation. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était de progresser dans la connaissance de la réponse des communautés microbiennes telluriques à l'apport de résidus de culture. Cette réponse des communautés microbiennes a été abordée en termes de (i) succession des populations impliquées dans les processus de dégradation de ces MOS (matières organiques fraîches), (ii) lien avec leur fonction de dégradation et répercussion sur la dynamique des matières organiques, et (iii) rôle dans les processus de stockage/déstockage du carbone *via* les processus de « priming effect ». Différents paramètres pouvant moduler la dégradation des résidus et la dynamique des communautés ont été pris en compte : modalité d'apport des résidus (pratiques culturales), qualité biochimique des résidus (différentes espèces végétales), et température. La stratégie globale de recherche développée repose sur des expérimentations de terrain et au laboratoire impliquant différentes échelles spatiales (du microcosme de sol à la parcelle agronomique) et temporelles (du temps de génération microbien aux cycles culturaux). La réponse des communautés microbiennes à l'apport de résidus a été évaluée par l'utilisation de méthodes moléculaires permettant de caractériser sans *a priori* la diversité des microorganismes du sol (empreintes moléculaires, clonage/séquençage, séquençage haut débit). En parallèle, un suivi quantitatif et qualitatif de la matière organique du sol, par des méthodes de biochimie ou de spectroscopie, a été réalisé afin d'établir le lien entre la dynamique des communautés microbiennes et le devenir de la matière organique dans le sol.

Les deux premiers chapitres du manuscrit portent sur des expérimentations réalisées au terrain (conditions naturelles) afin d'évaluer l'influence de la localisation des résidus (résidus de blé incorporés vs. laissés en surface ; site expérimentale INRA Mons) d'une part et d'autre part de la qualité biochimique des résidus (résidus de blé, colza et luzerne incorporés, site expérimentale INRA Epioisses) sur la dynamique des communautés microbiennes du sol. Les résultats obtenus mettent en évidence une forte influence de la localisation comme de la qualité biochimique des résidus sur les successions de populations microbiennes induites suite à l'apport. Des populations/groupes microbiens stimulés spécifiquement dans chaque modalité ont été identifiés. Les résultats de diversité ont été mis en regard des dynamiques de décomposition des résidus, afin de faire le lien entre les successions de populations et l'évolution des ressources trophiques.

La troisième partie du travail correspond à une expérimentation en conditions contrôlées (microcosmes de sol) nous permettant de coupler des outils moléculaires et isotopiques (ADN-SIP) pour cibler spécifiquement les populations microbiennes activement impliquées dans la dégradation des résidus de culture et les mettre en relation avec les flux de carbone gazeux précisément qualifiés, et plus particulièrement avec la mesure du « priming effect » (fonction de stockage/déstockage des MOS). Le facteur de variation pris en compte a été à nouveau la qualité biochimique des résidus apportés (blé, luzerne). Les taux de minéralisation des résidus observés (luzerne > blé) ont été reliés à des dynamiques de populations spécifiques du résidu apporté. D'autre part, le déstockage du carbone du sol engendré par l'apport de résidus était aussi modulé par la qualité de l'apport et relié à des dynamiques de populations spécifiques du résidu apporté. La diversité de ces populations bactériennes a été caractérisée par pyroséquençage afin de mieux identifier les populations impliquées et leurs attributs écologiques.

L'ensemble des travaux a permis d'identifier les successions populationnelles des microorganismes qui sont impliquées dans la dégradation des résidus de culture apportés dans les sols. La diversité de ces populations mais aussi la dynamique de leurs successions ont été démontrées comme étant fortement influencées par les pratiques agricoles mais aussi par la qualité biochimique des résidus. En parallèle, les mesures de flux de CO₂ couplées à des techniques d'isotopie ont permis de relier ces modifications de diversité microbienne avec le turn-over des MOS mais aussi avec les potentialités de stockage/déstockage de C dans le sol.

Mots clés : communautés microbiennes ; résidus de culture ; matières organiques du sol ; processus de décomposition ; priming effect ; SIP ; pyroséquençage.

Laboratoire d'accueil : UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement (MSE), INRA / UFR des Sciences de la Terre et de l'Environnement, Université de Bourgogne. 17 rue de Sully – BP 86510 – 21065 Dijon Cedex