



**HAL**  
open science

# Diversité et processus de colonisation microbienne sur des substrats minéraux

Marie Ragon

► **To cite this version:**

Marie Ragon. Diversité et processus de colonisation microbienne sur des substrats minéraux. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112184 . tel-00636619

**HAL Id: tel-00636619**

**<https://theses.hal.science/tel-00636619>**

Submitted on 27 Oct 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 DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD XI**

Spécialité : **Ecologie microbienne**

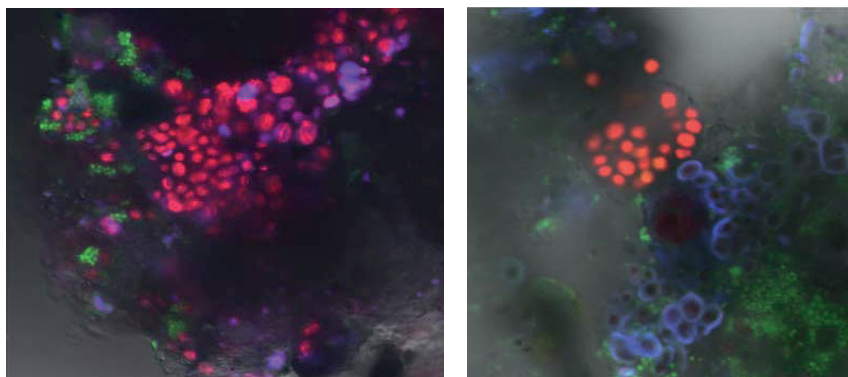
Présentée par :

**Marie RAGON**

Pour obtenir le grade de :

**DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD XI**

**DIVERSITE ET PROCESSUS DE COLONISATION MICROBIENNE DANS DES BIOFILMS  
SUR DES SUBSTRATS MINERAUX**



Thèse soutenue le 30 septembre 2011, devant le jury composé de :

Purificación LOPEZ-GARCIA

Directeur de recherche CNRS

Directeur de thèse

Jean-François HUMBERT

Directeur de recherche INRA

Rapporteur

Isabelle DOMAIZON

Chargé de recherche INRA

Rapporteur

Wafa ACHOUAK

Directeur de recherche CNRS

Examineur

Christophe SOLA

Professeur Paris-sud XI

Examineur

Jean-Marc GHIGO

Chef de laboratoire Pasteur

Examineur

## RESUME

Mes travaux de recherche ont eu pour but d'analyser la diversité des microorganismes des trois domaines du vivant présents dans des biofilms phototrophes exposés à l'air, se développant sur des substrats minéraux divers, afin d'essayer, d'une part, de répondre à des questions de diversité et de biogéographie et, d'autre part, d'étudier le processus de colonisation par le biais d'expériences d'exposition contrôlées.

J'ai ainsi caractérisé, essentiellement par des approches moléculaires basées sur l'analyse des banques des gènes d'ARNr de la petite sous-unité (SSU rDNAs) et sur des analyses d'empreintes communautaires, la diversité microbienne (procaryote et eucaryote) formant des biofilms matures (exposés depuis plusieurs années) dans plusieurs sites géographiques en Irlande du Nord, en France et en Ukraine, dans la région de Chernobyl. Dans ces biofilms soumis à forte pression sélective, nous avons mis en évidence beaucoup de microorganismes hétérotrophes et phototrophes, mais avec une diversité relativement restreinte en comparaison à d'autres milieux comme les sols ou les systèmes aquatiques. Les archées étaient absentes. Les conditions environnementales auxquelles ce type de biofilm est constamment exposé comme l'irradiation, la dessiccation et la limitation des nutriments sélectionnent des microorganismes qui développent des stratégies pour s'adapter comme, entre autres, la production de pigments. Ce sont des microorganismes fréquemment retrouvés dans des milieux désertiques extrêmes et résistants aussi aux radiations ionisantes qui ont ainsi été identifiés, notamment des Deinococcales et des Actinobacteria, ou encore des champignons ascomycètes (Ascomycota). Parmi les organismes phototrophes, nous avons dénombré des Cyanobacteria, des algues vertes (Chlorophyta) et des Streptophyta. Nous avons mis en évidence que les facteurs environnementaux influencent la composition des biofilms. Toutefois, tandis que la composition de la communauté bactérienne est fortement dépendante de la nature du substrat ou elle se développe, la composition des communautés microbiennes eucaryotes dépend de la distance géographique. Nous avons également mené des expériences de colonisation en exposant un même substrat minéral dans trois sites géographiques en Irlande du Nord et en France. L'analyse de la diversité microbienne lors du processus de colonisation a révélé des changements importants dans la composition des communautés, que ce soit pour les procaryotes ou pour les eucaryotes avec, cependant, des comportements différents de ces deux groupes de microorganismes. Dans le cas des bactéries, on observe une transition des Gammaproteobacteria, qui dominent les temps 0-6 mois et qui correspondent vraisemblablement aux cellules inactives en dispersion, vers des Betaproteobacteria, Bacteroidetes, Alphaproteobacteria et Actinobacteria dans des phases successives de formation du biofilm. Par contre, dès leur détection sur le substrat minéral, les eucaryotes sont massivement dominés par des champignons ascomycètes et basidiomycètes, des algues vertes ainsi que d'autres composantes minoritaires comme des ciliés, étant détectées dans des stades plus tardifs. Nos résultats montrent que les organismes hétérotrophes sont pionniers dans la formation de ces biofilms, ce qui permet d'émettre l'hypothèse qu'ils facilitent l'installation des cyanobactéries et surtout des algues vertes. Ils montrent aussi que le processus d'assemblage des communautés bactériennes dépend du temps de colonisation, alors que le site géographique détermine celui des microorganismes eucaryotes. Ces différences majeures de comportement pourraient être expliquées par des modes de vie différents entre les organismes de ces deux grands groupes.

## ABSTRACT

The major objective of my PhD work was the analysis of the diversity of microorganisms from the three domains of life associated with phototrophic biofilms developing on different mineral substrates exposed outdoors. These studies aimed at answering questions about microbial diversity and biogeography and also at studying the colonization process through controlled exposure experiments. I have thus characterized, essentially by molecular methods based on small subunit (SSU) rRNA gene libraries and fingerprinting analyses the diversity of prokaryote and eukaryote microorganisms forming mature biofilms (exposed for several years) in various geographic sites in Northern Ireland, France and Ukraine, in the Chernobyl area. In these biofilms, subjected to strong selective pressure, we found many heterotrophic and phototrophic microorganisms, but their diversity was limited when compared to that of other environments such as soils or aquatic systems. Archaea were absent from all biofilms. The environmental conditions to which these biofilms are constantly exposed, such as irradiation, desiccation and nutrient limitation select for organisms that develop particular adaptive strategies including, among others, pigment production. The microorganisms identified in these biofilms are also frequently found in extreme, desert environments and are known for their resistance also to ionizing radiation, such as Deinococcales and Actinobacteria or ascomycete fungi (Ascomycota). Among phototrophic lineages, we identified Cyanobacteria, Chlorophyta (green algae) and sometimes Streptophyta. We showed that environmental parameters influenced biofilm microbial communities. However, whereas the bacterial community composition depends on the nature of the substrate, the microbial eukaryotic community composition depends on the geographic distance. We also carried out colonization experiences exposing outdoors the same mineral substrate in three different sites in Northern Ireland and France. The analysis of microbial diversity along the colonization process revealed important changes in community composition both for prokaryotes and eukaryotes, although the behavior of the two groups was different. In the case of bacteria, we observed a transition from Gammaproteobacteria, which dominated the initial 0-6 months and which likely corresponded to inactive dispersive cells, towards Betaproteobacteria, Bacteroidetes, Alphaproteobacteria and Actinobacteria in successive steps of biofilm formation. By contrast, since their detection on mineral substrates, eukaryotes were massively dominated by ascomycete and basidiomycete fungi, green algae and other minor components such as ciliates were detected in later stages of biofilm formation. Our results show that heterotrophic organisms are pioneers in the formation of these biofilms, leading to the hypothesis that they facilitate the settlement of Cyanobacteria and, especially, of green algae. They also show that the process of bacteria community assembly depends on colonization time whereas the geographic site determines that of eukaryotic microorganisms. These major differences might be explained by different lifestyles between organisms of the two groups.

## REMERCIEMENTS

Tellement de personnes pourraient et doivent être remerciées que je pense en oublier et m'en excuse d'avance....

Mes plus grands remerciements vont évidemment à toi Puri, tes compétences, ton franc parler et la confiance que tu m'as accordée durant toute ma thèse m'ont permis de réaliser ce projet auquel je n'aurais jamais cru. Merci pour la liberté de recherche que tu m'as accordée. Particulièrement merci pour les dernières semaines, qui furent intenses!!!! Tu le sais aussi... Je n'aurais pu espérer mieux comme encadrement.

David, un grand merci également, tu vas de pair avec Puri et tu m'as également été d'une grande aide durant ces 4 années.

Puis, je me dois de remercier de façon globale tout le laboratoire ESE qui, il faut le dire fait toujours preuve d'un accueil des plus chaleureux pour tout nouvel arrivant.

Jacqui merci de m'avoir accepté au sein du département GEE, qui représente vraiment une unité de recherche très enrichissante.

Merci à Gwen et Mika pour nos collaborations qui j'espère vont nous permettre de produire de bons papiers...

Pour ma part, ce sont de réelles amitiés qui se sont créées tout au long de ma thèse et je ne saurais par qui commencer, il y en a tellement... tout d'abord ceux qui sont partis comme Quique, William, Achim mes trois post doc qui m'ont épaulé au début de ma thèse ; Magali et Samah deux véritables amies que j'ai pu rencontrer à l'ESE.

Puis il y a ceux qui sont encore là, qui ont ou vont finir leur thèse : Damien merci, tu es le premier à m'avoir accueilli au laboratoire il y a 4 ans, Alex merci de ton soutien, Diane avec qui j'ai cohabité 2 ans durant.

Et Mika, tu es non seulement devenu un collaborateur mais également un grand ami que j'espère garder bien longtemps....

Les jeunes microbiologistes qui m'ont également bien soutenu sur la fin quand je ne voyais plus le bout : Charles, Jonathan, Céline, Marianne et Estelle que j'ai appris à mieux connaître lors de notre virée à Seattle. Je serais là pour vous quand ce sera votre tour !!!!!

Et les « anciens » microbiologistes je ne vous oublie pas, Manue, Ludwig, Philippe et Paola....

Manue, merci pour du temps que tu m'as accordé pour l'apprentissage de la microscopie confocale.

Et puis, les indispensables au fonctionnement de notre laboratoire comme Christian, Odylle, Paola...

Evidemment je dois oublier énormément de personnes, Amandine, Claire, Ben, Hervé, Julien, JT, Alexis, Laetitia.....

A toutes ces personnes de mon laboratoire, je me dois également de rajouter toutes les personnes extérieures qui d'une manière ou d'une autre m'ont conduit sur la voie de la recherche.

Mes responsables d'autres laboratoires, Jean-Michel, Sylvain, Alban, Françoise... ces scientifiques ont aussi participé à ma carrière d'apprenti chercheur.

Puis je remercie également Jean-Marc, Catherine, Lionel pour nos intéressantes discussions. Et d'autres que je ne peux citer...

Merci à Claude et Brigitte pour la réalisation de la microscopie électronique à balayage et à transmission.

Puis, comme toute personne qui me connaît le sait, j'ai bien souvent trouvé du réconfort auprès de Donita (ma jument) qui prend une part très importante dans ma vie. J'en profite ainsi pour remercier mes ami(e)s des écuries Mélanie, Anksana, Audrey, Virginie, Karine, Franck... qui m'ont également beaucoup aidé.

Puis ma famille qui m'a soutenu énormément lors des moments difficiles et me pousse toujours à aller plus loin. Ronan, tu as été mon premier stagiaire, j'espère t'avoir transmis l'envie de te lancer dans le domaine de la recherche; Nanou... que dire tu es juste indispensable.

Et Lionel, qui je pense, a été plus que patient dans les dernières semaines et je te remercie de ton soutien et de tes encouragements, ne t'inquiètes pas je ne ferais pas de deuxième thèse comme je le dis si souvent...

Et enfin, merci à vous tous membres de mon jury (rapporteurs et examinateurs) d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit de thèse, de l'apprécier (je l'espère) et de le critiquer (il le faut bien...).

## SOMMAIRE

### LISTE DES ABREVIATIONS

### LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1. La diversité microbienne</b> .....	<b>1</b>
I.1.1. Les trois domaines du vivant .....	1
I.1.2. L'analyse de la diversité microbienne .....	5
I.1.3. L'étendue de la diversité microbienne .....	8
I.1.3.1. La diversité procaryote .....	8
I.1.3.2. La diversité de protistes .....	9
<b>I.2. Existe-t-il une biogéographie pour les microorganismes ?</b> .....	<b>10</b>
I.2.1. Biogéographie et structure des communautés .....	10
I.2.2. L'école de Baas-Becking .....	11
I.2.3. Endémismes microbiens? Le débat fait rage .....	12
I.2.4. Exemples de différenciation génétique avec la distance géographique .....	13
I.2.5. Questions ouvertes .....	14
<b>I.3. La vie en biofilm</b> .....	<b>15</b>
I.3.1. Les biofilms, communautés complexes et structurées .....	15
I.3.2. La formation d'un biofilm .....	16
I.3.3. Des biofilms très divers .....	18
I.3.4. Les biofilms subaériens comme modèle d'étude de la biogéographie microbienne .....	21

<b>II. OBJECTIFS .....</b>	<b>23</b>
II.1. Biogéographie microbienne	
II.2. Processus de colonisation	
<b>III. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>24</b>
<b>III.1. Echantillons et sites de collection .....</b>	<b>24</b>
<b>III.2. Méthodes utilisées .....</b>	<b>25</b>
III.2.1. Extraction d'ADN et amplification par PCR du SSU rDNA et ITS, construction de banques de clones, analyse préliminaire des séquences .....	25
III.2.2. Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant .....	26
<i>(Denaturing Gel Gradient Electrophoresis, DGGE)</i>	
III.2.3. Analyses phylogénétiques .....	29
III.2.4. Microscopie confocale ( <i>Confocal Scanner Laser Microscopy, CSLM</i> ) .....	29
III.2.5. Microscopie électronique (SEM et TEM) .....	30
III.2.6. Indices de diversité, comparaison des communautés et analyses statistiques multivariées	30
<b>IV. RESULTATS .....</b>	<b>32</b>
<b>IV.1. Diversité et biogéographie des communautés microbiennes formant des biofilms sur des surfaces minérales exposées</b>	
IV.1.1. Article 1: Prokaryotes and microbial eukaryotes display differential biogeography patterns in epilithic biofilms .....	34
IV.1.2. Synthèse et discussion autour de l'article 1 .....	77
IV.1.3. Résultats supplémentaires .....	80
IV.1.3.1. Analyse d'un échantillon « atypique » .....	80
IV.1.3.2. Analyse complémentaire d'échantillons en DGGE .....	81
IV.1.3.3. Banques de clones spécifiques aux cyanobactéries .....	84



<b>IV. 2. Résistance naturelle des communautés microbiennes de biofilms exposés aux différents niveaux de radioactivité dans la région de Chernobyl .....</b>	<b>85</b>
IV.2.1. Article 2: Sunlight-exposed biofilm microbial communities are naturally resistant to Chernobyl ionizing-radiation levels .....	87
IV.2.2. Synthèse et discussion autour de l'article 2 .....	106
IV.2.3. Résultats supplémentaires .....	107
<b>IV.3. Processus de colonisation microbienne et évolution des communautés de microorganismes lors de la formation du biofilm .....</b>	<b>108</b>
IV.3.1. Article 3: Distinct colonization patterns for prokaryotes and microbial eukaryotes during epilithic biofilm formation .....	110
IV.3.2. Synthèse et discussion autour de l'article 3 .....	150
IV.3.3. Résultats supplémentaires .....	152
IV.3.3.1. Analyses d'échantillons supplémentaires par fingerprint .....	152
IV.3.3.2. Observations et analyses en microscopie confocale .....	154
IV.3.3.3. Banques de clones spécifiques aux cyanobactéries .....	156
IV.3.3.4. Suivi du développement du biofilm par SEM et TEM .....	157
<b>V. DISCUSSION .....</b>	<b>160</b>
<b>VI. CONCLUSION .....</b>	<b>168</b>
<b>VII. PERSPECTIVES .....</b>	<b>171</b>
<b>VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>172</b>
<b>IX. ANNEXES .....</b>	<b>180</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

BCA: Between Class Analysis  
CCA: Canonical Correspondence Analysis  
CoA: Correspondence Analysis  
CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy  
DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis  
DNA, ADN: Desoxyribonucleic acid  
ITS: Internal Transcribed Spacer  
MLST: Multi Locus Sequence Typing  
MLSA: Multi Locus Sequence Analysis  
NMDS: Non-metric Multidimensionnal Scaling  
OTU: Operational Taxonomic Unit  
PC: Principal Component  
PCA: Principal Component Analysis  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
RNA, ARN: Ribonucleic Acid  
SAB: Sub Aerial Biofilm  
SEM: Scanning Electron Microscopy  
SSU rRNA: Small SubUnit ribosomal RNA  
SSU rDNA: Small SubUnit ribosomal RNA gene  
TEM: Transmission Electron Microscopy

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Ces figures et tableaux n'incluent pas ceux dans les manuscrits des articles et leur matériel supplémentaire.

**FigureI.1.** Arbre phylogénétique des trois domaines du vivant reconstruit sur la base des méthodes moléculaires SSU rRNA. Les triangles en vert représentent les phylums, division ou groupes où au moins un des membres est cultivé et décrit ; les triangles en rouge représentent les divisions candidates où aucune espèce n'est cultivée.

**FigureI.2.** Photographies illustrant les principales morphologies des procaryotes.

**FigureI.3.** Photographies illustrant la grande diversité morphologique au sein des protistes.

**FigureI.4.** Schéma simplifié résumant l'approche par techniques moléculaires mise en œuvre dans ce travail.

**FigureI5.a et b.** Images représentant des biofilms matures. a. Image en microscopie en confocale illustrant la fluorescence naturelle émise par les microorganismes photosynthétiques. b. Biofilm mature en milieu aquatique.

**FigureI.6.** Illustration des différentes étapes de formation d'un biofilm, jusqu'à la dispersion.

**FigureIV.1.3.1.** Abondance relative des grands groupes d'eucaryotes présents dans l'échantillon A2.2a, versus les autres échantillons de Charente-Maritime.

**FigureIV1.3.2a.** Dendrogramme représentant les profils de DGGE obtenus pour les bactéries, pour les échantillons supplémentaires analysés à Ballyclare, Cork et en Région parisienne.

**FigureIV1.3.2b.** Dendrogramme représentant les profils de DGGE obtenus pour les eucaryotes, pour les échantillons supplémentaires analysés à Ballyclare, Cork et en Région parisienne.

**FigureIV1.3.2c.** Représentation en « *multidimensionnal scaling* » des profils DGGE bactéries et eucaryotes des échantillons supplémentaires analysés de Ballyclare, Cork et Paris.

**FigureIV.1.3.3.** Abondance relative des cyanobactéries issues des banques de clones obtenues avec des amorces spécifiques.

**FigureIV2.3.** Photographies en microscopie optique de bactéries résistantes à une irradiation aux UV, provenant d'échantillons récoltés dans la région de Chernobyl.

**Figure IV3.3.1.a.** Dendrogramme des profils DGGE des bactéries obtenus pour les échantillons complémentaires analysés issus de la campagne d'exposition.

**Figure IV3.3.1.b.** Dendrogramme des profils DGGE des eucaryotes obtenus pour les échantillons complémentaires analysés issus de la campagne d'exposition.

**FigureIV3.3.1.c.** Représentation en « *multidimensional scaling* » des profils DGGE des échantillons complémentaires analysés issus de la campagne d'exposition de Ballyclare, Servas et Paris.

**FigureIV3.3.2.** Photographies en microscopie confocale sur les échantillons à 24 mois d'exposition des sites d'exposition Ballyclare, Servas et Paris. a, b et c correspondent à des cyanobactéries de type unicellulaires ; d correspond à des cyanobactéries de type filamenteuses.

**FigureIV3.3.3.** Abondance relative des cyanobactéries identifiées dans des banques de clones obtenues avec des amorces spécifiques pour les cyanobactéries pour les échantillons à 24 mois d'exposition pour Ballyclare (Bt), Servas (St), Aubervilliers (SGt).

**FigureIV3.3.4.** Photographies de microscopie à balayage et à transmission permettant le suivi visuel de l'évolution du biofilm, pour les sites de Ballyclare, Aubervilliers et Servas.

**Tableau III.1.** Nature et sites de prélèvement de l'ensemble des biofilms sur substrat minéral analysés.

**Tableau III.2.** Amorces utilisées pour les amplifications et le séquençage des gènes SSU rRNA

## ANNEXES

**Annexe III.1.a.** Caractéristiques des échantillons analysés par approche moléculaire de clonage et séquençage.

**Annexe III.1.b.** Caractéristiques des échantillons analysés par approche de type fingerprint.

**Annexe III.2.a.** Paramètres environnementaux recueillis dans l'article 1.

**Annexe III.2.b.** Paramètres environnementaux recueillis dans l'article 3 issus des données météorologiques locales.

**Annexe III.2.c.** Paramètres environnementaux recueillis dans l'article 3 issus de mesures « testo ».

**Annexe IV.1.1.** Table des OTUs bactériens retrouvés dans l'article 1

**Annexe IV.1.2.** Table des OTUs eucaryotes retrouvés dans l'article 1

**Annexe IV.2.1.** Table des OTUs bactériens retrouvés dans l'article 2

**Annexe IV.2.2.** Table des OTUs eucaryotes retrouvés dans l'article 2

**Annexe IV.3.1.** Table des OTUs bactériens retrouvés dans l'article 3

**Annexe IV.3.2.** Table des OTUs eucaryotes retrouvés dans l'article 3

# I. INTRODUCTION

## I.1. La diversité microbienne

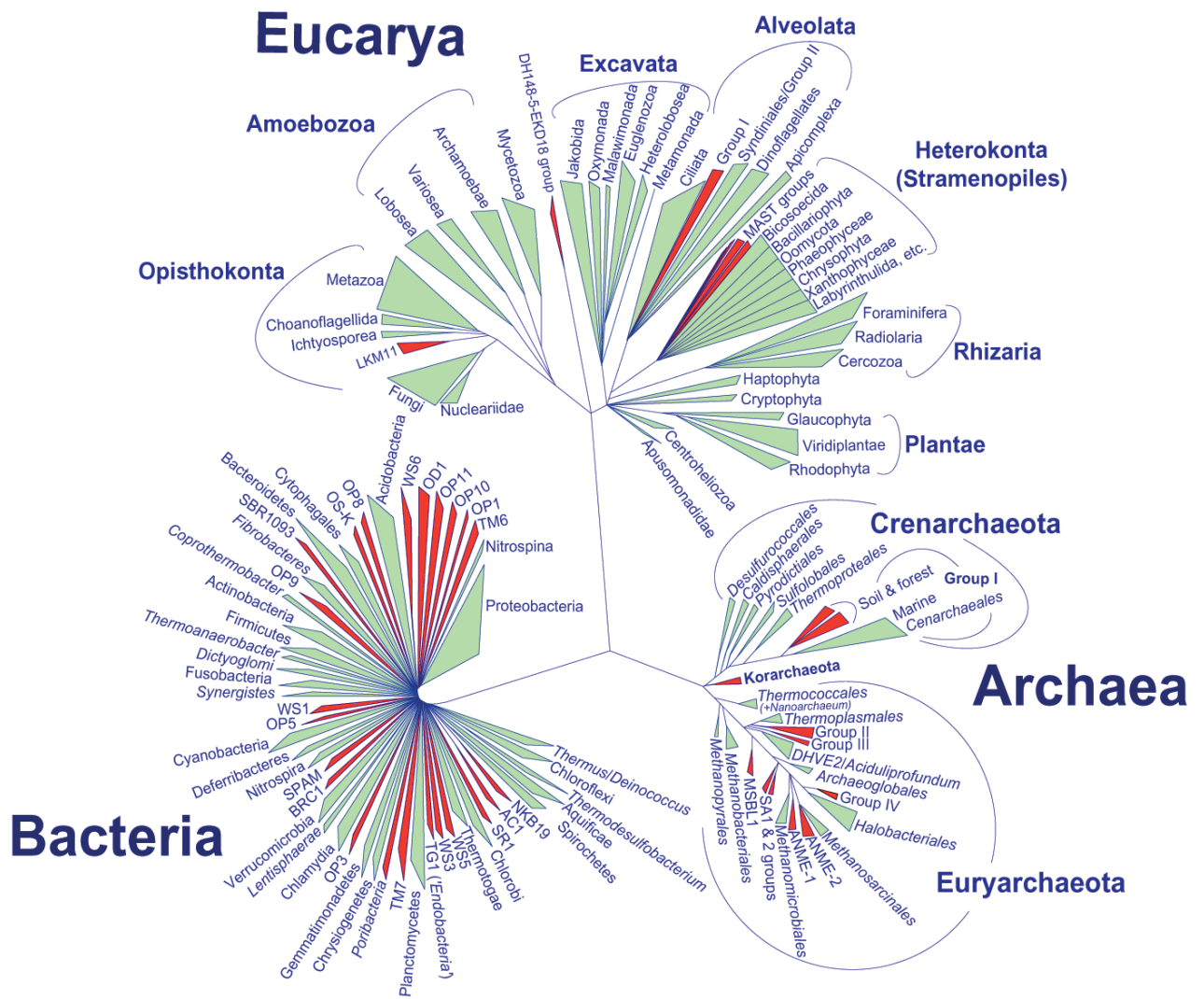
### I.1.1. Les trois domaines du vivant

Jusque dans les années 1970, deux grands groupes d'organismes étaient connus et identifiés sur la base de leur structure cellulaire, les procaryotes (bactéries) et les eucaryotes. En 1977, Carl Richard Woese définit le domaine des archées par l'analyse phylogénétique du gène codant pour l'ARN de la petite sous unité ribosomique (SSU rDNA) en démontrant que les procaryotes se divisaient en deux groupes phylogénétiques, initialement appelés eubactéries et archaeobactéries, aussi éloignés l'un de l'autre qu'ils l'étaient des eucaryotes. A partir de ce moment sont décrits les trois domaines du vivant (Figure I.1): Bacteria, Archaea et Eucarya (Woese and Fox 1977; Woese, Magrum et al. 1978; Woese and Gupta 1981; Woese 1987; Woese CR 1990). Le SSU rDNA est un gène présent et conservé chez tous les organismes, donc un marqueur moléculaire universel. Son utilisation comme marqueur moléculaire a permis notamment de faire des études de phylogénie moléculaire de tous les groupes d'organismes et de classer et définir les trois domaines du vivant de manière robuste. Cette classification de Woese basée sur des analyses phylogénétiques est actuellement privilégiée en microbiologie car elle est plus objective que les anciennes classifications basées notamment sur des caractères physiologiques. Les microorganismes se répartissent dans les trois domaines du vivant (Pace 1997). Les bactéries et les archées sont des procaryotes, organismes unicellulaires qui ne possèdent pas de noyau cellulaire et dont la transcription et la traduction sont couplées (Dove, Joung et al. 1997). Tous les procaryotes sont des organismes microscopiques, exception faite des certaines associations multicellulaires sous forme de filaments ou des colonies. Les eucaryotes eux, sont pourvus d'un noyau et d'organites cellulaires : la mitochondrie et, dans le cas d'eucaryotes photosynthétiques, le chloroplaste. Ils peuvent être microscopiques (certains champignons et la plupart des protistes) ou macroscopiques (animaux, plantes, certains protistes comme quelques algues brunes ou rouges). Les études phylogénétiques montrent que les mitochondries présentes chez tout organisme eucaryote, sont issues de l'endosymbiose d'une bactérie de type Alphaproteobacteria (Andersson, Zomorodipour et al. 1998; Kurland and Andersson 2000). Il en est de même pour les chloroplastes, qui dérivent d'une cyanobactérie endosymbionte (Zablen, Kissil et al. 1975).

La plupart des procaryotes ne dépassent pas les 3 µm en taille ; leur petite taille et la simplicité de leur structure cellulaire ne nous donnent que très peu d'éléments distinctifs au niveau de la morphologie

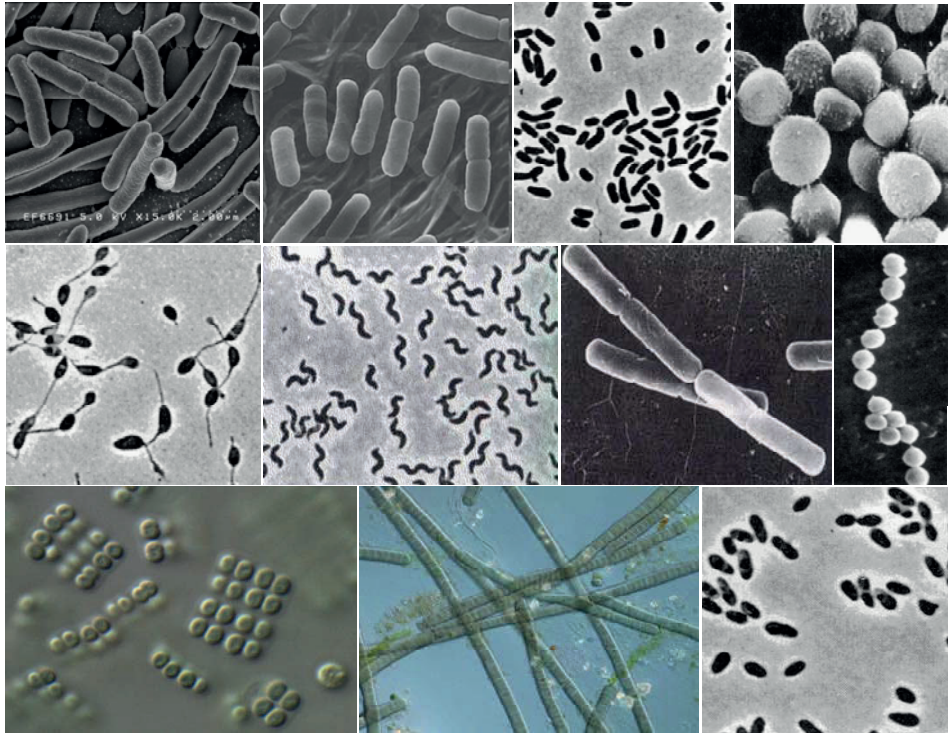
(Figure I.2). Généralement, ils sont classés en deux grands groupes morphologiques : les coques (arrondis) et les bacilles (bâtonnets), mais le phylum des spirochètes (bactéries longues de forme hélicoïdale) se distingue nettement des autres bactéries. La coloration, positive ou non, à la méthode de coloration Gram de leur paroi cellulaire les reclassent également en deux groupes : Gram+ et Gram-. Malgré le peu d'éléments distinctifs au niveau morphologique, les procaryotes sont extrêmement divers au niveau métabolique (Feldgarden, Byrd et al. 2003) (Madigan, Martinko et al. 2002). Procaryotes et eucaryotes ont besoin d'énergie et d'une source de carbone, mais la diversité des métabolismes énergétiques et du carbone est globalement bien plus importante chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Pour les chimiotrophes, l'énergie est d'origine chimique, alors que pour les phototrophes, l'origine de leur énergie est lumineuse. Les autotrophes utilisent le CO<sub>2</sub> comme source de carbone, alors que les hétérotrophes ont besoin d'une source organique de carbone. Quatre grands groupes nutritionnels de bactéries sont alors distinguables : les photoautotrophes, les photohétérotrophes, les chimioautotrophes et les chimiohétérotrophes. Parmi les chimiotrophes, on peut aussi distinguer ceux oxydant les minéraux, les lithotrophes, et ceux oxydant la matière organique, les organotrophes. Les réactions d'oxydo-réduction des chimiotrophes, c'est à dire la respiration, peut se faire avec l'oxygène, respiration aérobie (facultative ou stricte), mais aussi sans et avec d'autres molécules inorganiques ou organiques. Cette respiration dite anaérobie peut être également facultative ou stricte. Même si la diversité de formes des procaryotes est limitée, leur grande diversité métabolique leur permet d'être présents et de coloniser quasiment tous les écosystèmes de notre planète.

Concernant les eucaryotes unicellulaires, leur taille peut quelques fois dépasser le millimètre, mais dans la plupart des cas elle reste inférieure à 200 µm. Ils ont de formes beaucoup plus diverses que les procaryotes (Figure I.3). De ce fait, ils ont été et sont encore très souvent étudiés de part des critères morphologiques et ultrastructuraux, beaucoup plus caractéristiques et complexes que chez les procaryotes. Leur taille et leur morphologie permettent donc une description traditionnelle des protistes relativement bonne, contrairement aux procaryotes. Cependant, les approches moléculaires (voir-ci dessous) ont mis en évidence une diversité inattendue au sein des protistes, non seulement pour ceux de taille « normale » (>5µm), mais également au sein des pico-eucaryotes (<5µm) (Lopez-Garcia and Moreira 2008).



**Figure 1.1.** Arbre phylogénétique des trois domaines du vivant reconstruit sur la base des méthodes moléculaires SSU rRNA. Les triangles en vert représentent les phylums, division ou groupes où au moins un des membres est cultivé et décrit ; les triangles en rouge représentent les divisions candidates où aucune espèce n'est cultivée.





**FigureI.2.** Représentation des principales morphologies décrites au sein des procaryotes.



**FigureI.3.** Représentation d'une partie des eucaryotes unicellulaires, illustrant leur diversité morphologique.

### **I.1.2. L'analyse de la diversité microbienne**

Selon à quel auteur on se réfère, le nombre estimé d'espèces de bactéries sur Terre varie de 10 000 à  $10^{30}$  (Whitman, Coleman et al. 1998) et est encore le plus souvent très mal connu. Jusque dans les années 1970, l'étude des communautés microbiennes ne se faisait que par observation microscopique et culture, et la classification était donc uniquement phénotypique (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1974). En effet, après mise en culture des échantillons microbiens, on observait au microscope les différentes morphologies microbiennes présentes, ainsi que divers critères distinctifs (aspect des colonies, présence de flagelles, etc). Puis des tests d'identification métabolique étaient réalisés afin d'affiner l'affiliation taxonomique dans des classes fonctionnelles. Le problème était que, non seulement très peu d'éléments de comparaison (caractères morphologiques et physiologiques) existent pour les microorganismes, mais en plus on estime que moins de 1% des microorganismes sont cultivables au laboratoire, soit parce qu'ils entretiennent des relations symbiotiques avec d'autres organismes soit parce qu'on ne sait pas reproduire au laboratoire les milieux nutritifs dont ils ont besoin. En effet, beaucoup d'efforts ont été réalisés de la part des microbiologistes afin de reproduire au mieux les conditions de culture et de croissance des microorganismes (Janssen, Yates et al. 2002; Rappe, Cannon et al. 2002; Rappe and Giovannoni 2003), mais bien souvent ces conditions sont trop complexes pour être reproduites en laboratoire. On ignorait donc une grande partie de la diversité des microorganismes.

L'arrivée de la phylogénie moléculaire a permis d'introduire une classification naturelle des microorganismes basée sur des relations de parenté en utilisant l'information évolutive stockée dans la séquence des gènes conservés (Woese 1987; Keller and Zengler 2004). Woese, dans les années 1980 décrivait environ 11 phylums pour les bactéries (Woese, Stackebrandt et al. 1985), alors qu'à l'heure actuelle ce sont plus de 50 phylums bactériens ou divisions candidates qui sont reconnus (Figure I.1) (Rappe and Giovannoni 2003; Lopez-Garcia and Moreira 2008). Ces résultats sont pour la plus part basés sur l'analyse du gène qui code pour la petite sous unité du ribosome (SSU rDNA) (Woese 1987) et incluent un grand nombre de divisions candidates, c'est à dire des clades de séquences équivalant à des phylums pour lesquels aucune espèce n'a pas pu être isolée au laboratoire. Leur découverte a été cependant rendue possible depuis une vingtaine d'années grâce à l'utilisation d'une nouvelle approche moléculaire basée sur l'amplification par PCR du SSU rDNA à partir d'ADN extrait directement des échantillons naturels (Figure I.4). Le mélange des SSU rDNAs ainsi amplifiés, est cloné et les différents SSU rDNAs portés par les différents clones séquencés, comparés aux séquences dans les bases de données publiques et positionnés dans des arbres phylogénétiques avec des espèces de référence. Cette stratégie permet donc d'avoir accès à la diversité des organismes qui se trouvent dans un échantillon grâce à l'identification de

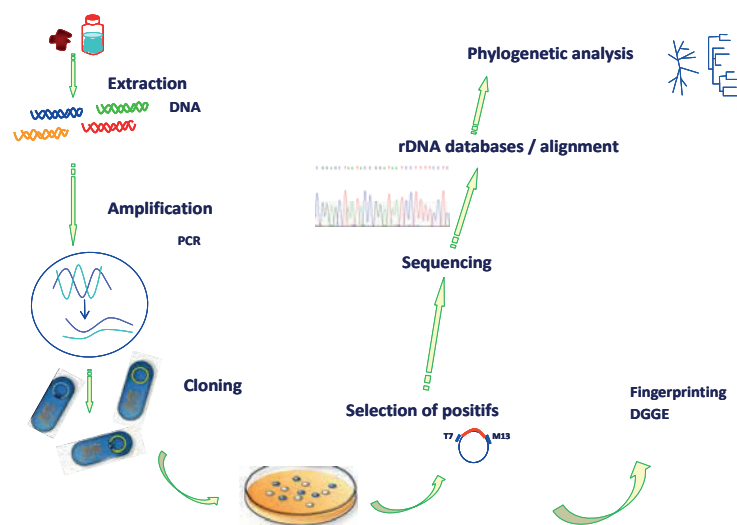
leurs séquences (Hugenholtz and Pace 1996). D'autres marqueurs phylogénétiques (autres gènes informatifs) peuvent actuellement être aussi utilisés de la même manière pour compléter l'information apportée par le SSU rDNA, et l'accès à des génomes complets séquencés est désormais possible. De nouvelles techniques d'analyse sont maintenant disponibles, avec entre autres, l'utilisation du pyroséquençage (méthode 454, Roche), qui permet d'obtenir des données massives de séquences à partir d'un fragment de plus petite taille (jusqu'à récemment de l'ordre de 400 bp) que le séquençage Sanger classique, souvent à partir des régions variables de SSU rDNA, sans la nécessité de passer par des étapes de clonage. Cette technique a l'avantage d'être très rapide dans l'obtention de grandes quantités de données, et donc souvent utilisée pour des nombres d'échantillons importants (Agogue, Lamy et al. 2011) ou pour le séquençage en profondeur des SSU rDNAs des échantillons où on s'attend à retrouver une certaine variabilité dans les séquences du SSU rDNA. En effet, pour y trouver un vrai intérêt, les échantillons doivent présenter une certaine variabilité dans leurs communautés microbiennes. Un autre inconvénient du pyroséquençage est la courte taille des fragments obtenus et les erreurs de lecture, ne permettant pas ou du moins ne facilitant pas l'identification précise des grands groupes présents et la reconstruction d'arbres phylogénétiques fiables. Ceci devrait changer de manière imminente avec l'amélioration de la chimie de la réaction et le passage à des lectures d'environ 700 bp.

Les performances de l'ensemble de ces méthodes moléculaires ont permis de mettre en avant l'importance de la diversité « micro » versus la diversité macroscopique. En effet, les procaryotes (archées et bactéries), ainsi que les eucaryotes microscopiques ont une place beaucoup plus importante que celle imaginée, non seulement en termes de diversité et d'abondance mais aussi en tant qu'acteurs dans le fonctionnement des écosystèmes. Depuis longtemps, les écologues microbiens savent combien les microorganismes et surtout les procaryotes sont importants pour les cycles biogéochimiques, mais ces techniques ont permis en plus la découverte de rôles insoupçonnés notamment dans la réalisation de réactions métaboliques nouvelles (Pace 1997).

Quand on parle de diversité, il est important de définir ou d'essayer de comprendre ce qu'est la notion d'espèce, une question très souvent abordée. La définition la plus communément admise est celle d'Ernst Mayr (Mayr 1948) basée sur le concept dit « biologique », Biological Species Concept (BSC), qui dit qu'une espèce est une population dont les individus peuvent se reproduire entre eux et engendrer une descendance viable et féconde en conditions naturelles. D'autres définitions de l'espèce basées sur la morphologie, la phylogénie ou encore l'écologie existent (Gevers, Cohan et al. 2005). Pour la majorité des espèces traditionnellement étudiées, c'est-à-dire, les eucaryotes macroscopiques, le concept biologique peut être relativement bien appliqué et est donc largement accepté par la communauté scientifique. Concernant les procaryotes, la reproduction se faisant par scissiparité, ce concept d'espèce ne peut pas être

appliqué. Simpson parle alors du concept d'espèce basé sur l'évolution des organismes et les liens de parenté qu'ils ont entre eux, Evolutionary Species Concept (ESC), qui est alors applicable à tous les organismes vivants (Ward 1998) et qui nécessite par contre l'utilisation de méthodes moléculaires quand on s'intéresse aux microorganismes; pour les macroorganismes les phylogénies peuvent être aussi basées sur la morphologie. Avec cette idée, beaucoup de microbiologistes ont essayé de définir l'espèce chez les procaryotes, sans encore de consensus à l'heure actuelle (Gevers, Cohan et al. 2005; Doolittle and Zhaxybayeva 2009). Par exemple, Staley parle du *Genomic-Phylogenetic Species Concept*, basé sur des études phylogénétiques multi-gènes (Staley 2006). Face à ces problèmes conceptuels, une solution purement pragmatique a été adoptée. Le plus communément il est admis que deux procaryotes appartiennent à la même espèce quand ils ont au moins 70% d'hybridation entre l'ADN de leurs génomes (DNA-DNA Hybridization), ce qui expérimentalement équivaut dans beaucoup de cas à au moins 97% identité sur le gène SSU rDNA.

Des méthodes moléculaires basées sur les différences phylogénétiques au niveau des séquences sont souvent appliquées aussi au niveau intra-spécifique. C'est le cas de la MLST (Multi Locus Sequence Typing) ou MLSA (Multi Locus Sequence Analysis) (Cooper and Feil 2004; Gevers, Cohan et al. 2005). Ces études contribuent aussi à remettre en question la définition purement phénotypique de l'espèce microbienne. En effet, ces nouvelles approches permettraient un meilleur clustering phylogénétique (Ivars-Martinez, D'Auria et al. 2008), et soutiennent et renforcent de manière très robuste les phylogénies existantes basées seulement sur les SSU rDNAs. Selon de nombreux auteurs (Palleroni 1997), une approche polyphasique impliquant la phylogénie moléculaire mais également en combinant des données de culture, serait l'idéal pour définir une espèce procaryote.



**Figure I.4.** Schéma simplifié résumant l'approche par techniques moléculaires mise en œuvre dans ce travail

### **I.1.3. L'étendue de la diversité microbienne**

Les analyses de diversité basées sur l'utilisation de méthodes moléculaires ont mis en évidence une énorme diversité que ce soit pour les procaryotes comme pour les eucaryotes microscopiques (Lopez-Garcia and Moreira 2008). Cette diversité, jusque là inattendue, implique non seulement la découverte de nouveaux grands groupes (par exemple des divisions candidates équivalant à des phylums), surtout pour les procaryotes, mais également d'une grande diversité des lignées au sein des groupes connus (Slapeta, Moreira et al. 2005; Brown and Wolfe 2006). On compte aujourd'hui beaucoup plus de phylums de microorganismes que de macroorganismes (Cavalier-Smith 2004). La découverte de cette diversité à grande échelle phylogénétique s'est également accompagnée de la découverte d'une grande diversité microbienne dans la plupart des écosystèmes analysés.

#### I.1.3.1. La diversité procaryote

La diversité phylogénétique au sein des procaryotes est énorme. Pour les bactéries, on compte à l'heure actuelle au moins 50 phylums (Rappe and Giovannoni 2003), dont quasiment la moitié sont des « divisions candidates », correspondant aux phylums où aucun représentant cultivé n'est connu ou du moins n'a été décrit à ce jour (Lopez-Garcia and Moreira 2008) (Figure I.1). Les archées sont, elles, représentées par 26 phylums, se répartissant entre 3 grands groupes principaux : les Crenarchaeota, les Korarchaeota et les Euryarchaeota. Récemment, il a été proposé que les Crenarchaeota mésophiles soient séparées dans un quatrième grand phylum au sein des archées, les Thaumarchaeota (Brochier-Armanet, Bosau et al, 2008). Les procaryotes peuvent être retrouvés dans quasiment tous les milieux et environnements étudiés (Whitman, Coleman et al. 1998) (DeLong and Pace 2001), allant du sol aux milieux marins aux eaux douces. De plus, les procaryotes s'associent aussi à d'autres organismes, dont les animaux, comme commensaux, symbiontes ou parasites obligés ou opportunistes. L'océan et les milieux marins ont été très étudiés. Ces milieux présentent une stratification et une organisation très spécifique des communautés microbiennes (Fuhrman, McCallum et al. 1992)(DeLong 2006), notamment à cause des différences physico-chimiques des masses d'eau et des niveaux d'eau, des courants et des barrières, contraignant les conditions de vie des microorganismes. Les sols, également très étudiés, présentent une diversité microbienne beaucoup plus importante au niveau métabolique et physiologique (Torsvik, Salte et al. 1990). Les communautés microbiennes se développant dans des sols exposés à de nombreux

contaminants comme les herbicides, les métaux lourds ou autres, ont également fait l'objet de nombres d'études (el Fantroussi, Verschuere et al. 1999; Sandaa, Torsvik et al. 1999; Stephen, Chang et al. 1999). En effet, certains microorganismes, notamment en association à travers des symbioses, pourraient avoir la capacité de détoxifier des sols contaminés par des produits chimiques. Certains microorganismes et notamment beaucoup d'archées et bactéries ont la capacité et la nécessité de se développer dans des environnements extrêmes, comme les déserts, où on les retrouve souvent colonisant et altérant les roches, les sources hydrothermales chaudes (Barns, Fundyga et al. 1994; Barns, Delwiche et al. 1996), des environnements à des très basses températures, à bas ou haut pH ou à de fortes pressions (Rothschild and Mancinelli 2001; Lopez-Garcia 2005). Ces microorganismes sont appelés les extrêmophiles. Ils vivent dans des environnements où les conditions sont proches de la limite de ce qu'une cellule peut tolérer en terme de paramètres physico-chimiques (pH, température, salinité, pression). Une catégorie particulière d'extrêmophiles correspond à celle des organismes qui résistent aux conditions éprouvantes sans pour autant en dépendre. C'est le cas des organismes radiorésistants ou radiotolérants. Ces microorganismes ont dû développer des systèmes de réparation et/ou de protection afin de s'adapter à ces conditions de vie. De par leurs adaptations aux conditions physico-chimiques extrêmes, les extrêmophiles ont été la cible d'intérêt technologique, avec par exemple la production d'enzymes thermostables ou résistant des conditions de pH élevé (Demirjian, Moris-Varas et al. 2001).

### I.1.3.2. La diversité de protistes

Les protistes ou, de manière générale les eucaryotes unicellulaires, sont également très divers et peuvent être retrouvés dans la plupart des environnements, mais ils ont cependant été moins étudiés que les procaryotes et dans moins d'environnements en utilisant des méthodes moléculaires. Les eucaryotes microscopiques se répartissent dans les groupes suivants : les opisthokontes (Opisthokonta, où on retrouve entre autre les métazoaires et les champignons), les amibes (Amoebozoa), les excavés (Excavata), les alvéolés (Alveolata, dont font partie les ciliés), les hétérokontes (Heterokonta), les rhizaires (Rhizaria) et les algues vertes et rouges et les plantes vertes (Viridiplantae) (Cavalier-Smith 2004; Lopez-Garcia and Moreira 2008) (Figure I.1). Les protistes ont longtemps et sont encore souvent étudiés par observation microscopique et classifiés selon des critères morphologiques car, contrairement aux procaryotes, ils ont une grande diversité morphologique (Figure I.3). Les études moléculaires ont cependant révélé une énorme diversité de protistes qui était passée inaperçue aux analyses classiques. C'est le cas par exemple de la diversité trouvée dans les océans et les mers, avec la découverte de nouveaux grands groupes d'alvéolés parasites (Lopez-Garcia, Rodriguez-Valera et al. 2001; Moreira and Lopez-Garcia 2002; Guillou, Eikrem

et al. 2004), dans les lacs (Lepere, Domaizon et al. 2007; Lepere, Domaizon et al. 2008) ou même encore dans les sols (Ekelund, Ronn et al. 2001). De la même façon que pour les procaryotes, les eucaryotes microscopiques ont été également retrouvés dans des environnements extrêmes comme les sources hydrothermales (Lopez-Garcia, Philippe et al. 2003; Brown and Wolfe 2006; Lopez-Garcia, Vereshchaka et al. 2007) ou des mines acides (Baker, Tyson et al. 2009) mais ils sont absents de certains milieux extrêmes, comme ceux à très haute température (>60°C) ou pH très alcalin, où les procaryotes dominent.

## **I.2. Existe-t-il une biogéographie pour les microorganismes ?**

Depuis le début du vingtième siècle, grâce à l'utilisation massive des méthodes moléculaires pour décrire la diversité microbienne dans l'environnement, les scientifiques ont commencé à comparer la structure des communautés microbiennes. Ceci a mené à des observations de différences de composition importantes et à la question de savoir quels facteurs déterminent la structure des communautés microbiennes, c'est à dire, des questions sur la biogéographie microbienne.

### **I.2.1. Biogéographie et structure des communautés**

Au début, la biogéographie se définissait uniquement par l'étude de la répartition des êtres vivants sur la Terre. Mais depuis les années 70, l'impact des interventions humaines et des changements climatiques sur cette répartition fut primordial. La biogéographie va ainsi s'intéresser à la distribution globale des espèces et à l'influence de l'environnement et de la géographie sur cette distribution. Depuis déjà longtemps on sait que les plantes et les animaux connaissent une biogéographie en fonction du lieu où ils sont situés et en fonction des événements historiques passés à l'endroit où ils se trouvent actuellement. Concernant les microorganismes aucune théorie n'a encore été validée comme universelle, même si beaucoup pensent que ce serait plus les conditions environnementales qui structureraient ces communautés microbiennes (Martiny, Bohannan et al. 2006). Mais, comme dit dans un paragraphe précédent, la notion d'espèce notamment dans le monde procaryote est très vague, ce qui pose des problèmes à l'heure d'aborder la biogéographie pour ces organismes.

### I.2.2. L'école de Baas-Becking

La question de la biogéographie microbienne a ses origines dans celle qu'on appelle l'école de microbiologie de Delft (Pays Bas). C'est Beijering qui, dans les années 1900, décrit que les microorganismes sont retrouvés partout, « *everything is everywhere* », impliquant que les espèces microbiennes ne trouvent pas des barrières à la dispersion et sont donc cosmopolites. En 1934, Baas-Becking reprend les travaux de Beijering et s'accorde à dire que les microorganismes sont retrouvés partout, mais rajoute « *but the environment selects* », impliquant que sur cette dispersion cosmopolite l'effet de la sélection environnementale locale fera le tri des espèces qui se développent dans un écosystème donné. Il est tout d'abord important de bien recadrer et re-citer l'idée de Baas-Becking : dans bien des citations et interprétations, les scientifiques ont souvent oublié le « but », transformant sa citation en « *everything is everywhere AND the environment selects* », ce qui n'a plus le même sens (de Wit and Bouvier 2006). Le respect strict de sa phrase est important avant de pouvoir épiloguer sur celle-ci, car cela signifie que les microorganismes sont partout et ubiquitaires, mais l'environnement et les conditions environnementales vont faire que certaines espèces vont « s'éteindre » ou se mettre en latence le temps que les conditions extérieures redeviennent plus favorables. Son affirmation sur le fait que les microorganismes peuvent être retrouvés partout est liée à son idée qu'ils peuvent être véhiculés par l'atmosphère et par les vents, en partie du fait de leur petite taille. En effet, cette contrainte de dispersion est beaucoup moins importante pour les communautés de microorganismes que pour les animaux et les plantes (Redford, Bowers et al. 2010).

La question reste ouverte et plusieurs hypothèses s'ouvrent aux microbiologistes : la principale étant de savoir si il y a une biogéographie pour les microorganismes. En effet, comme le dit l'hypothèse de Baas-Becking, les microorganismes pourraient être dispersés et répandus de manière complètement aléatoire partout dans la nature et, dans ce cas, il n'y aurait même pas une "vraie" biogéographie (dans le sens d'une différenciation spécifique ou génétique avec la distance géographique). Ceci peut grossièrement être assimilé à ce qui se produit dans les environnements marins, où de par la présence de courants à l'échelle globale des océans, la biogéographie est quasiment impossible à définir (Bowman and McCuaig 2003). Dans ce genre d'environnement très mélangé, les microorganismes semblent se répartir en fonction de la profondeur de l'eau, plus qu'en fonction de la géographie (Ivars-Martinez, D'Auria et al. 2008). L'existence des différences de composition d'espèces ou génétiques en fonction de la distance géographique serait peut être plus détectable dans des milieux dits structurés comme le sol, les roches, voir même les lacs. Dans tous les cas, des exemples contradictoires sur les facteurs qui déterminent la diversité des communautés microbiennes existent et la question de la biogéographie microbienne reste très



controversée. Le problème affecte les organismes de vie libre et pas à ceux qui, comme beaucoup de microorganismes, sont en association avec d'autres organismes, notamment des macroorganismes. Dans ce cas, ils suivent le même mode de biogéographie que leurs hôtes. Des études de coévolution et donc co-dispersion ont d'ailleurs été menées et montraient bien que la géographie de l'hôte et du symbionte était identique (Held and Whitaker 2009) (Colwell and Huq 1998), malgré l'influence inévitable des paramètres environnementaux (Taylor, Schupp et al. 2005).

### **I.2.3. Endémismes microbiens? Le débat fait rage**

Pour les procaryotes l'hypothèse de Baas-Becking a été admise jusqu'au début des années 2000. Depuis, un certain nombre d'analyses suggèrent qu'une différenciation génétique peut exister avec la distance. C'est le cas des souches de *Sulfolobus* isolées des sources chaudes continentales à des distances croissantes (Whitaker 2003). Certaines études suggérant une différenciation génétique pour les bactéries avec la distance, vont même jusqu'à parler d'endémismes, idée très controversée (Martiny, Bohannan et al. 2006). Certains s'accordent sur le fait que les procaryotes marins sont dispersés un peu partout (Furhman, 2007), notamment les plus abondants de la communauté, et que ensuite ce sont les facteurs environnementaux qui vont structurer la communauté (Nemergut, Costello et al. 2011) alors que d'autres ont mis en évidence non seulement une biogéographie pour les bactéries rares mais également pour les dominantes de la communauté par exemple en Atlantique Nord (Agogue, Lamy et al. 2011). Il est désormais plus ou moins admis, qu'au niveau du domaine ou du phylum, la distribution des procaryotes est ubiquitaire et qu'on peut les retrouver partout (DeLong and Pace 2001). Au niveau du genre, les microbiologistes pencheraient plus ou moins pour un consensus semblable et donc une distribution des procaryotes ubiquitaire (Hedlund, Staley, 2003).

Ce débat a touché de manière encore plus forte les eucaryotes et d'autant plus les protistes, menant à une confrontation forte entre deux écoles de pensée, représentées par Finlay et Fenchel s'opposant à Foissner. En effet, Finlay et Fenchel ont proposé que les eucaryotes microscopiques de très petite taille (<2mm) se comportaient comme les procaryotes et pouvaient être retrouvés un peu partout, sans de réelle barrière géographique (Finlay 2002). Ainsi, des études menées sur certains protistes comme les cercozoaires (Bass, Richards et al. 2007) ont mis en évidence une certaine ubiquité dans la distribution de ces eucaryotes. De manière antagoniste, Foissner a mis en avant dans ses travaux une certaine distribution géographique des protistes (Foissner 1999). La problématique dans ce genre d'approche est en partie

dépendante de la façon dont sont étudiés les microorganismes. En particulier, la biogéographie ne sera pas la même en fonction de la façon dont on détermine l'espèce ; en effet, une approche morphologique/phénotypique de l'espèce est très limitée pour les microorganismes, la diversité génétique étant souvent beaucoup plus large. A l'opposé, l'approche moléculaire est beaucoup plus fine et peut permettre la séparation des espèces différentes ayant les mêmes morphologies (espèces cryptiques). La présence d'une même morphologie à deux endroits géographiques distincts peut donc ne pas impliquer la même espèce. Ceci peut être illustré par un exemple lors d'études menées chez des champignons microscopiques (Taylor, Turner et al. 2006), où si on les définit par la morphologie on observe une distribution ubiquitaire de ces champignons, alors que si on les classe suivant des critères phylogénétiques ils sont en partie décrits comme endémiques. Cette question de la définition de l'espèce reste encore très ouverte. Fenchel et Finlay reviennent également sur la définition de l'espèce pour les protistes car les informations obtenues par méthodes moléculaires via les séquences d'ADN sont complémentaires des caractères phénotypiques, mais ne décrivent du coup pas l'appartenance à une espèce de la même façon, ainsi que donc l'existence ou pas de biogéographie (Fenchel and Finlay 2006).

#### **I.2.4. Exemples de différenciation génétique avec la distance géographique**

Depuis l'étude pionnière de Whitaker sur la différenciation génétique des archées hyperthermophiles du genre *Sulfolobus* dans des sources chaudes, les études sur la biogéographie microbienne se sont multipliées (Cho and Tiedje 2000; Whitaker, Grogan et al. 2003). Certains voient une différenciation des communautés avec la distance géographique et donc influencée par l'histoire de dispersion, d'autres, la plupart, suggèrent que, au contraire, les espèces procaryotes sont partout et c'est l'environnement qui les sélectionne. Cette question d'isolement par la distance a et est souvent abordée. En 2006, Whitaker explique que pour beaucoup de microorganismes, on peut observer une spéciation allopatrique (donc par la distance géographique) conduisant ainsi à de nouvelles espèces (Whitaker 2006). Cette idée est aussi soutenue pour d'autres procaryotes, comme des cyanobactéries *Synechococcus* ou *Prochlorococcus* retrouvées dans des sources chaudes continentales (Papke, Ramsing et al. 2003) (Follows, Dutkiewicz et al. 2007) (Castenholz, 1996 ; Bahl et al. 2010). Nombres d'études portant sur la diversité des bactéries retrouvées dans le sol ont montré une certaine biogéographie (Cho and Tiedje 2000; Oda, Star et al. 2003) (Wawrik, Kutliev et al. 2007) (Angel, Soares et al. 2010) alors que d'autres à l'inverse expliquaient cette sélection par l'influence de facteurs physicochimiques. En effet, Fierer et Jackson ont montré que la distribution spécifique des bactéries du sol est indépendante de la distance géographique à proprement parler, mais est plus liée à des paramètres physicochimiques comme le pH (Fierer and Jackson 2006), idée

confirmée par Griffiths, Thomson et al. (2011). D'autres types de différenciation, comme par exemple des phénomènes d'adaptation locale liés à la prédation par des phages, pourraient également créer une certaine biogéographie (Kunin, He et al. 2008).

De la même manière, plusieurs études se sont focalisées sur la biogéographie des protistes pour essayer de résoudre le débat activé par Finlay et Fenchel. Comme dit précédemment en introduction à ce paragraphe, les protistes des environnements marins, de par la présence de courants et le manque de structuration du milieu (sauf verticalement), ne présentent que très rarement une biogéographie (Bowman and McCuaig 2003) (de Vargas, Norris et al. 1999). Cependant, certaines études menées sur des diatomées en Atlantique du Nord ont montré une certaine différenciation génétique corrélée avec la distance géographique (Casteleyn, Leliaert et al.)(2010), résultats en accord avec ceux obtenus également sur des diatomées à une échelle géographique plus large (Vyverman, Verleyen et al. 2007). Il en est de même pour des cas démontrés d'endémisme sur des ciliés isolés de lacs alpins (Stoeck, Bruemmer et al. 2007).

### **I.2.5. Questions ouvertes**

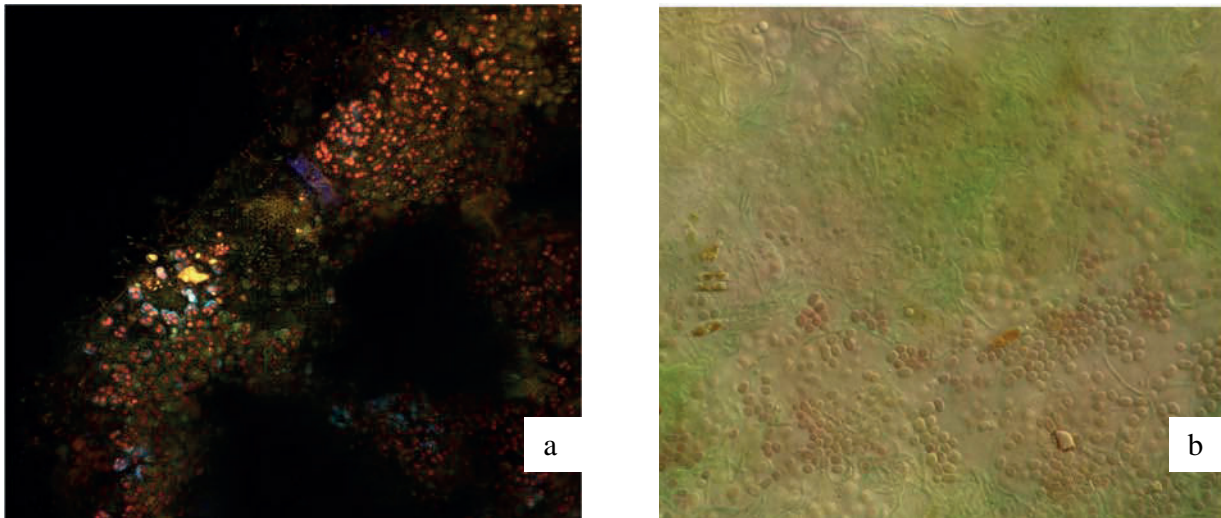
Ce qui ressort de toutes ces études est que la définition de l'espèce est très complexe et ne fait pas l'objet d'un consensus admis par toute la communauté scientifique, et que par ce fait la notion de biogéographie est encore plus difficile à déterminer. De plus, la difficulté de ce genre d'approche est que pour déterminer si un microorganisme est endémique ou pas, il faudrait pouvoir décrire les communautés microbiennes dans leur intégralité, c'est à dire en saturation, ce qui est rarement le cas surtout dans des environnements à très forte diversité comme les sols. Il est par conséquent plus juste de dire de façon sûre qu'une espèce de microorganisme est cosmopolite car on le retrouve partout, que de dire qu'un microorganisme est endémique car on n'a réussi à le mettre en évidence que dans un endroit spécifique. Cependant, la notion d'isolement génétique par la distance a complètement lieu d'être. Ces études pourraient d'ailleurs être plus facilement réalisées dans des environnements plus structurés (où l'on s'attend à plus de variabilité dans l'espace et à des communautés plus stables), comme par exemple sur certains biofilms.

### **I.3. La vie en biofilm**

#### **I.3.1. Les biofilms, communautés complexes et structurées**

Les microorganismes peuvent vivre seuls (par exemple en mode planctonique), mais le plus souvent sont retrouvés en communautés pluricellulaires, plus ou moins complexes, à un ou plusieurs types d'organismes. De telles communautés microbiennes peuvent éventuellement adhérer à une surface quelle qu'elle soit. La coexistence de ces microorganismes et leurs comportements coopératifs (Moons, Michiels et al. 2009) entre eux, ont pour effet l'apparition de nouvelles fonctions au sein de la communauté microbienne. On appelle ces organisations des biofilms; selon John William Costerton (1978), ce serait le mode de vie naturel de la plupart des microorganismes. Ces organisations sont caractérisées par la production d'une matrice extracellulaire autour du biofilm (Figure I.5a et b), qui entre autre peut lui conférer une protection. En effet, l'organisation des microorganismes en biofilm va permettre une protection contre des agressions comme les UV, les métaux lourds, la dessiccation et tout autre forme de stress (Hall-Stoodley, Costerton et al. 2004). Les biofilms peuvent se développer sur n'importe quel type de substrat artificiel ou naturel (sur du matériel médical, de construction, sur des roches, dans l'eau, etc.) (Hall-Stoodley, Costerton et al. 2004). D'ailleurs, les biofilms ont très probablement constitué les premières colonies d'organismes vivants sur Terre, avec les stromatolithes déjà présents il y a 3.5 milliards d'années (Rothschild and Mancinelli 1990).

De par leur complexité, l'étude des biofilms reste à l'heure actuelle encore très limitée. La structuration en épaisseur des biofilms nécessite pour leur étude de pouvoir déterminer leur topologie. Pour cela, l'utilisation de méthodes de microscopies, comme le CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*) (Hall-Stoodley, Costerton et al. 2004; Peltola, Neu et al. 2008) et les SEM (*Scanning Electron Microscopy*) et/ou TEM (*Transmission Electron Microscopy*), sont des approches relativement bien adaptées. L'utilisation de sondes moléculaires via le marquage fluorescent *in situ* (FISH) peut également permettre de visualiser l'absence ou présence et l'abondance de certains microorganismes particuliers. L'apparition des méthodes moléculaires de caractérisation de la diversité a également permis d'avoir une connaissance sur les différents composants microbiens du biofilm (Fernandes 2006; Roeselers, van Loosdrecht et al. 2007), mais dans ce cas pas de son organisation spatiale. D'autres, essayant plus de comprendre le fonctionnement des biofilms, ont mis en œuvre des approches protéomiques (Stoodley, Sauer et al. 2002). D'autres encore, s'initient à reproduire en laboratoire des biofilms artificiels à plusieurs espèces, sous conditions contrôlées (Heydorn, Nielsen et al. 2000; Yang, Beyenal et al. 2000).



**Figure I.5.a et b.** Images représentant des biofilms matures. On peut y distinguer différentes morphologies microbiennes, ainsi que la présence de la matrice extracellulaire englobant le biofilm. a. Image en microscopie confocale illustrant la fluorescence naturelle émise par les microorganismes photosynthétiques. b. Biofilm mature en milieu aquatique.

### **I.3.2. La formation d'un biofilm**

La formation d'un biofilm a surtout été étudiée dans le domaine médical en utilisant des espèces modèles, notamment des genres *Pseudomonas* (Sauer, Camper et al. 2002) ou *Vibrio* (Watnick and Kolter 1999), deux pathogènes humains connus. Bridier et collaborateurs (Bridier, Le Coq et al. 2011) se sont eux intéressés à l'architecture d'un biofilm par inoculation en laboratoire, sur une surface, d'une espèce du genre *Bacillus*.

La formation classique d'un biofilm suit généralement cinq étapes principales (Figure I.6). Tout d'abord, la phase d'adhésion ou adhérence des microorganismes sur la surface (Moons, Michiels et al. 2009). Les liaisons cellules/surface sont de type faible et l'adhésion à ce stade est donc réversible. Puis les « ligands », molécules protéiques, vont renforcer l'adhésion la rendant permanente. Ensuite les cellules vont proliférer et le biofilm va grandir et se développer (Chandra, Kuhn et al. 2001; Kolter and Greenberg 2006). Une fois à maturation, les microorganismes du biofilm vont produire la matrice extracellulaire (EPS) qui va lui conférer une protection contre les attaques phagocytaires, mais également un maintien de l'intégrité du biofilm (Flemming and Wingender 2010). Cette matrice extracellulaire, essentielle au

biofilm, est d'une composition complexe ; on y trouve des carbohydrates, des protéines, du phosphore, du glucose, mais une grande partie reste encore inconnue (Baillie and Douglas 2000; Latasa, Solano et al. 2006). A ce stade de maturation, on peut voir apparaître des structures « mushroom-like ». Ces formations ressemblant à des champignons, sont en partie formées sous la dépendance de quorum-sensing (QS) (Kolter and Greenberg 2006). Ce phénomène consiste en l'expression contrôlée et la régulation de certains gènes par des facteurs signaux en fonction de la densité de la population microbienne concernée (Greenberg 2003; Keller and Surette 2006). Certains gènes sont alors exprimés à partir d'une concentration suffisante de bactéries dans le milieu, avec en plus un système de rétrocontrôle positif. Dans les systèmes modèles où le QS a été étudié, celui-ci peut être de 3 types selon les molécules de communication impliquées. Les systèmes de QS 1 et 2 impliquent des autoinducteurs (N-homosérines lactones pour le QS1 ; histidines kinases pour le QS2) comme molécule signal. Le QS3 est un système de communication des bactéries à Gram+, impliquant des peptides. Le quorum-sensing a été très étudié dans des biofilms de type médical, notamment par son implication dans la régulation des facteurs de virulence (comme chez *Pseudomonas*), dans la synthèse de molécules antibiotiques et antifongiques, mais aussi pour les interactions avec l'hôte (Lam, Chan et al. 1980). Les molécules de communication permettent non seulement une communication intra-espèce, mais également une communication inter-espèces (exemple entre des beta- et des gamma-protéobactéries).

La dernière étape dans la formation d'un biofilm, est la phase de dispersion, ou retour à l'état planctonique. Certains microorganismes du biofilm pourvus d'un flagelle vont avoir la capacité à se détacher du biofilm et à aller se redéposer ailleurs pour éventuellement déclencher la formation d'une autre structure similaire. Enfin, ce qui est essentiel pour l'entretien du biofilm, certaines cellules du biofilm vont à un moment mourir dans le but que le biofilm continue à se développer. Ce phénomène de « mort programmée » ou autolyse est très contrôlé (Bayles 2007).

Plus rares sont les études sur la formation des biofilms complexes en milieu naturel, tels les biofilms épilithiques qui se développent sur des substrats minéraux ou sur des systèmes de canalisation ou des structures métalliques en milieu océanique. En ce qui concerne les biofilms se développant sur des substrats minéraux, des tests de reproduction de formation de biofilms en laboratoire ont été initiés en pulvérisant un mélange de microorganismes de composition connue sur une surface vierge, dans le but d'essayer de reproduire les biofilms se développant sur des monuments (Miller, Laiz et al. 2008). Roeselers et al. ont réalisé également des tests de développement de biofilm en laboratoire (Roeselers, Zippel et al. 2006), mais ces tests, bien qu'intéressants, ne reflètent pas réellement ce qui se passe en conditions « naturelles » à l'extérieur.

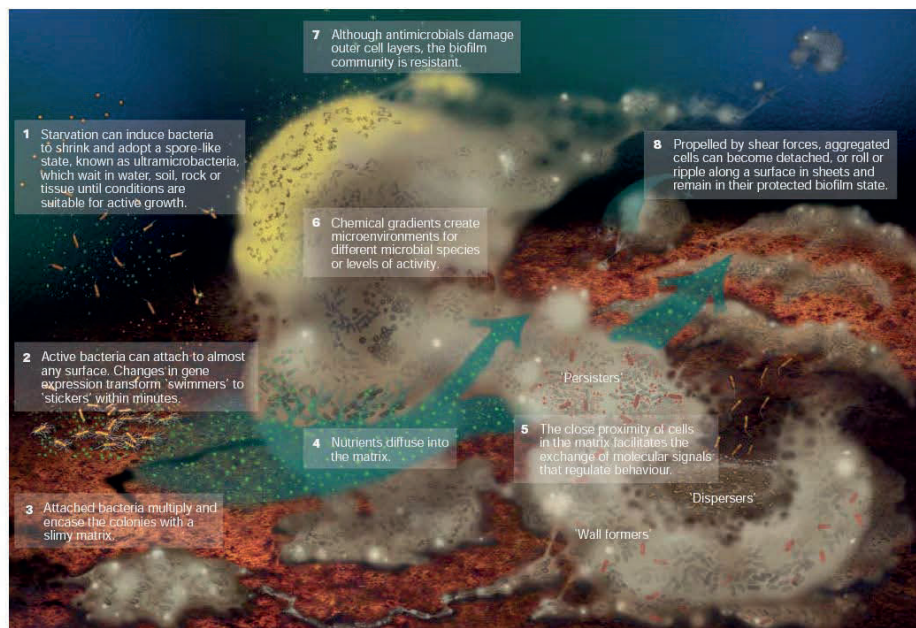


Figure 1 | **Conceptualization of biofilm development and dynamic behaviours.** The figure was compiled from laboratory and natural observations of pure culture (both Gram-positive and Gram-negative organisms), and mixed-culture biofilms. (For an interactive web-based version of Figure 1 and biofilm movies showing dynamic processes of growth and detachment, rolling and rippling, see the Online links). Image courtesy of P. Dirckx, Center for Biofilm Engineering, USA.

**Figure I.6.** Illustration des différentes étapes de formation d'un biofilm, jusqu'à la phase de dispersion.

### I.3.3. Des biofilms très divers

Comme dit plus haut, les microorganismes peuvent être retrouvés de manière ubiquitaire dans tous types d'environnement plus ou moins hostiles. Ils peuvent également être très variés en fonction des conditions du milieu où ils se développent, souvent formant des biofilms. Nos propres organes internes creux abritent des biofilms de microorganismes plus ou moins diversifiés. Ces biofilms ont d'ailleurs un rôle fonctionnel très important pour l'hôte, par exemple dans la digestion. Mais cette association ne se fait pas toujours en symbiose, et parfois ce sont des pathogènes qui vont se développer pouvant causer de graves problèmes médicaux.

C'est encore dans le milieu médical que l'étude des biofilms est la plus avancée et ce pour des raisons évidentes liées aux problèmes de contamination du matériel médical ou d'infections plus ou moins graves chez l'homme. En effet, de par ses propriétés et sa structure, les biofilms peuvent développer de nouvelles fonctions, comme par exemple une résistance aux antibiotiques accrue chez *Pseudomonas aeruginosa* (De Kievit, Parkins et al. 2001; Poole and Srikumar 2001). D'autres cas d'infections plus ou moins sévères par des biofilms de *Candida albicans*, champignon opportuniste très reconnu, ont été reportées (Blankenship and Mitchell 2006). D'une moindre gravité, des nombreux auteurs se sont intéressés aux biofilms se

développant sur les dents et la plaque dentaire (Kolenbrander, Palmer et al. 2010). Les biofilms posent également des problèmes dans la contamination de matériel médical comme sur des cathéters pouvant être la cause de septicémie (O'Grady, Alexander et al. 2002) (Balestrino, Ghigo et al. 2008) (Beloin, Roux et al. 2008).

Les biofilms peuvent également être une source de contamination dans le secteur de l'agroalimentaire ou encore dans le domaine de l'industrie du papier, où des développements de biofilms de *Deinococcus geothermalis* robustes ont pu être observés (Peltola, Neu et al. 2008). De par leur structuration et l'apparition de nouvelles fonctions au sein du biofilm, les microorganismes acquièrent ainsi une résistance plus grande à de nombreux stress, et peuvent coloniser encore plus de milieux extrêmes ou sélectifs, comme par exemple des sites riches en métaux lourds ; ils sont d'ailleurs utilisés à des fins d'élimination de ces métaux lourds (Teitzel and Parsek 2003; Harrison, Ceri et al. 2007). Ces biofilms peuvent également présenter des solutions dans l'amélioration de l'assainissement des sols, ou encore dans le traitement des eaux (Roeselers, Loosdrecht et al. 2008). Quelques études portent d'ailleurs sur la possibilité que les microorganismes pourraient permettre l'élimination de composés toxiques comme certains herbicides (Vercaene-Eairmal, Lauga et al.)(2010).

Le biofouling, c'est-à-dire la colonisation par les microorganismes (souvent impliquant des diatomées qui vont venir se fixer là où la surface est déjà colonisée par un biofilm bactérien) et les végétaux des structures immergées en mer (bateaux, tuyaux, etc.), est un autre problème dû aux biofilms. Ces biofilms sont bien souvent à l'origine de dommages dans le domaine maritime et, par conséquent, le biofouling est un énorme problème du point de vue économique, mais aussi biologique et écologique. C'est en partie pour cela que des recherches ont été menées dans ce domaine et des composés phénoliques ayant un effet anti-biofouling ont été identifiés (Sendamangalam, Choi et al. 2011). Dans ce type de biofilms, à demi-eau, et ce contrairement aux biofilms en espaces fermés comme dans le domaine médical, de nombreux microorganismes photosynthétiques font partie de la communauté microbienne. Tout biofilm exposé à l'extérieur en milieu naturel, et donc ayant une source de lumière a ainsi une importante composante phototrophe. Ces biofilms, composés donc en partie de cyanobactéries et d'algues peuvent poser des problèmes de coloration (de par la pigmentation des microorganismes) et d'altération des surfaces où ils se développent (Cuzman, Ventura et al. 2010; Ortega-Morales, Guezennec et al. 2000). Dans le contexte discuté auparavant de la biogéographie microbienne, Cuzman et al. mettent en avant une certaine similarité dans la diversité phototrophique des biofilms retrouvés sur des fontaines à différents lieux géographiques, mais également des différences liées aux facteurs environnementaux de chaque fontaine.

Des biofilms peuvent également se former sur des surfaces minérales exposées à l'extérieur (roches, bâtiments, etc.), souvent appelées des 'SubAerial Biofilm' (Gorbushina 2007). Tous types de



microorganismes peuvent être retrouvés sur ces surfaces, que ce soit des biofilms à dominance bactérienne et/ou eucaryote (Gorbushina, Beck et al. 2005; Gorbushina 2007), incluant évidemment des phototrophes (cyanobactéries et algues eucaryotes) (Wierzbos, Ascaso et al. 2006). En effet, dans ce genre de biofilms subaériens, on retrouve fréquemment des associations de cyanobactéries, d'algues, de champignons microscopiques, et d'autres bactéries hétérotrophes. La présence des algues et des cyanobactéries est primordial pour le développement de la communauté, notamment grâce à leur capacité de photosynthèse et de fixation de l'azote, qui apportent matière organique et azote biodisponible à la communauté (Potts 1994). Ces biofilms ont également des EPS (Figure 5) caractéristiques liés à la composition microbienne du biofilm, et d'autant plus que ces biofilms sont directement affectés par l'atmosphère et les conditions climatiques auxquels ils sont constamment exposés. Ces biofilms ont été très étudiés sur les roches et les monuments historiques et ce pour des problèmes d'altération biologique et de conservation du patrimoine culturel (Urzi and Albertano 2001; Gorbushina, Krumbein et al. 2002; Crispim, Gaylarde et al. 2003; Gaylarde, Crispim et al. 2005; Gaylarde, Ortega-Morales et al. 2007; Scheerer, Ortega-Morales et al. 2009). Cependant, l'influence des microorganismes sur les monuments historiques et leur implication dans la bio-détérioration est encore mal connue. Certains auteurs (Fernandes 2006; Webster and May 2006) se sont même intéressés à l'utilisation de ces communautés microbiennes de manière contrôlée pour la bioremédiation des monuments altérés. De manière similaire, les microorganismes peuvent être retrouvés colonisant des bâtiments et matériaux de construction tout comme les monuments historiques (Urzi and Albertano 2001; Urzi, Brusetti et al. 2001), entraînant également une altération biologique de la surface. Ces altérations sont et posent un problème non seulement esthétique dû au fait de la coloration des façades des monuments par des microorganismes pigmentés (phototrophes et autres), mais également un souci économique par la détérioration du matériel, due notamment aux communautés endolithiques. En effet, dans ce type de biofilm subaériens ou épilithiques, les microorganismes retrouvés sont très variés. On dénombre des microorganismes de surface (qui se déposent sur la roche) mais également des microorganismes endolithiques (McNamara, Perry et al. 2006), capables de creuser la roche pour se développer à l'intérieur (Friedmann, Hua et al. 1988; Ortega-Morales, Lopez-Cortes et al. 2001; Golubic, Radtke et al. 2005; Scheerer, Ortega-Morales et al. 2009). On compte une grande variété au sein des phototrophes (cyanobactéries et algues), dont l'hypothèse est faite souvent qu'ils vont par la suite permettre l'installation des hétérotrophes (Ortega-Morales, Guezennec et al. 2000; Crispim, Gaylarde et al. 2003; Crispim and Gaylarde 2005; Gaylarde, Crispim et al. 2005). Toutefois, une étude récente faite sur des biofilms se développant sur des lames de polycarbonate en milieu aquatique montre que le processus de colonisation est plus complexe et dépend de l'intensité de lumière. A forte intensité, les organismes photosynthétiques se développent d'abord mais, à faible luminosité, on peut mettre en évidence une arrivée

précoce des hétérotrophes, aidant à l'inverse dans ce cas à l'installation des communautés phototrophes (Roeselers, van Loosdrecht et al. 2007). Parmi les hétérotrophes identifiés dans les biofilms épilithiques qui ont été étudiés, la diversité bactérienne est nombreuse ; des études ont mis en évidence notamment des bactéries appartenant aux groupes des actinobactéries et acidobactéries (Heyrman, Verbeeren et al. 2005). On peut également compter de nombreux champignons microscopiques pouvant être impliqués dans des formations comme les lichens.

L'altération des substrats minéraux est l'œuvre non pas de l'action d'un seul microorganisme, mais d'une communauté complexe et des interactions présentes au sein du biofilm entre les différents microorganismes. L'exposition à l'extérieur et à l'atmosphère affecte aussi la composition et l'activité des communautés microbiennes du biofilm. Warscheid (2003) a d'ailleurs montré l'influence du climat et des conditions environnementales sur ce type de biofilm. La composition du substrat, notamment sa porosité et sa composition chimique, affecte aussi la composition de la flore microbienne (Gaylarde, Crispim et al. 2005; Scheerer, Ortega-Morales et al. 2009). Le biofilm va s'adapter aux conditions extérieures, ainsi qu'à ses composants microbiens. Au sein d'un même biofilm, on peut détecter une grande hétérogénéité physiologique et métabolique en fonction de la zone du biofilm étudiée (Augspurger, Karwautz et al. 2010; Stewart and Franklin 2008).

#### **I.3.4. Les biofilms subaériens comme modèle d'étude de la biogéographie microbienne**

Les biofilms épilithiques ou subaériens qui se développent sur des substrats minéraux divers offrent un modèle d'étude intéressant pour explorer des questions sur la biogéographie microbienne. Il y a plusieurs raisons à cela. La première est que, même si les études de diversité sont encore limitées et, par exemple, on étudie rarement l'ensemble de microorganismes procaryotes et eucaryotes sur un même substrat ou alors en ciblant seulement des groupes particuliers comme les algues ou les champignons, les analyses disponibles suggèrent que les communautés microbiennes sont moins complexes que celles des sols ou des systèmes aquatiques à cause des conditions extrêmes que peuvent représenter la dessiccation et l'exposition à l'irradiation solaire (Gorbushina 2007). Ils constituent donc des systèmes simplifiés tant par la diversité qu'on s'attend à y trouver que pour l'hétérogénéité physico-chimique locale probablement moins importante que dans des systèmes complexes et très structurés comme les sols. Par conséquent, ce sont des systèmes où tester les effets environnementaux et des facteurs historiques de dispersion sur la structuration des communautés microbiennes est probablement plus facile. Finalement, une autre raison est l'accessibilité simple et la possibilité de faire des expériences d'exposition contrôlées sur le long terme.

C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, mes travaux de recherche ont eu pour but d'analyser la diversité des microorganismes des trois domaines du vivant présents dans des biofilms phototrophes exposés à l'air, se développant sur des substrats minéraux divers, afin d'essayer, d'une part, de répondre à des questions de diversité et de biogéographie et, d'autre part, d'étudier le processus de colonisation par le biais d'expériences d'exposition de colonisation contrôlées sur 2 ans.

## II. OBJECTIFS

Mon travail de thèse a essayé de fournir des informations nouvelles autour de deux axes de recherche principaux en utilisant comme modèle des biofilms à dominance phototrophe se développant sur des substrats minéraux:

**II.1. Biogéographie microbienne** : Déterminer l'effet de la géographie par rapport à la sélection environnementale dans la structure des communautés microbiennes des biofilms phototrophes dans différentes localités géographiques. L'approche utilisée comportait la caractérisation de la diversité des microorganismes des trois domaines du vivant à l'aide de méthodes moléculaires basées sur l'amplification et le séquençage du gène SSU rDNA des communautés de biofilms établis de longue date (plus de 4 ans en moyenne) sur des substrats minéraux de nature différente et dans des localités géographiques distantes, mais toutes en région tempérée (afin de minimiser les différences dans les conditions environnementales). La diversité microbienne retrouvée serait ensuite corrélée avec la position géographique et une série de paramètres environnementaux :

- La nature du substrat minéral (substrat minéral composite contrôle, granite, calcaire, béton)
- Les paramètres climatiques (température, humidité, précipitation)
- La localisation géographique
- Le niveau de radiation ionisante (gradient d'exposition dans la région de Chernobyl)

**II.2. Processus de colonisation** : Etudier le processus de colonisation et de formation du biofilm sur le même substrat minéral contrôle à travers des expériences d'exposition à l'air libre en différentes localisations géographiques. Cette étude comportait l'analyse de la diversité des communautés microbiennes des trois domaines du vivant le long du processus de colonisation à travers des échantillonnages réguliers (mensuels et/ou semestriels) en utilisant des méthodes d'empreinte moléculaire et de séquençage du gène SSU rDNA. Ces analyses ont été complétées par des suivis d'observation au microscope électronique à balayage et à transmission et, ponctuellement, par de la microscopie confocale afin de mieux caractériser la présence de microorganismes pigmentés entraînant une coloration des substrats. A part l'étude de la dynamique de colonisation, ces échantillons ont aussi permis de s'intéresser à des questions de biogéographie et en particulier aux facteurs de structuration des communautés qui dominent dans les premières étapes de la colonisation (dispersion versus sélection environnementale) .

### III. MATERIEL ET METHODES

#### III.1. Echantillons et sites de collection.

Les biofilms épilithiques utilisés dans cette étude ont été prélevés sur des substrats minéraux naturels ou artificiels dans des sites géographiques différents en Europe. L'ensemble des échantillons utilisés dans ce travail, leurs sites de collecte et la nature du substrat minéral sont indiqués dans le Tableau III.1 (plus en détail en Annexe III.1). La majorité de mon travail de recherche a été réalisée sur un substrat minéral composite qu'on a utilisé comme substrat support contrôle, notamment dans les expériences de colonisation sur le long terme, ce qui permet d'éliminer l'effet potentiel du substrat sur les biofilms qui s'y développent. En plus, des échantillons de biofilms matures (communautés "mûres") clairement visibles à l'œil nu et qui se sont développés après des nombreuses années d'exposition sur le substrat contrôle, mais aussi sur du béton et sur des substrats rocheux naturels (granite, calcaire) ont été prélevés pour étudier les différences liées à la nature du substrat et l'effet de la géographie. L'échantillonnage s'est fait de manière systématique par grattage des biofilms sur les grains en surface de l'échantillon à l'aide d'un scalpel stérile. Une surface d'environ 4-5 cm<sup>2</sup> a été grattée pour récolter ~1 ml à partir de chaque échantillon dans la mesure du possible (un peu moins de matériel a été obtenu sur le granite, plus dur) (3 répliquats pour les échantillons de la campagne d'exposition). Au moment de l'échantillonnage, un certain nombre de paramètres ont été enregistrés : durée d'exposition, site d'exposition, coloration de la surface, température maximale et minimale, humidité relative, précipitations, température de rosée, orientation des échantillons (Annexe III.1 et III.2).

Tous les échantillons ont été ensuite stockés à -20°C, afin d'arrêter le développement des communautés microbiennes.

**Tableau III.1.** Nature et sites de prélèvement de l'ensemble des biofilms sur substrat minéral analysés.

Pays	Lieu	Type d'analyse	Type de substrat	Nom des échantillons
France	Charente-Maritime (La Rochelle)	Biofilms matures	Minéral composite	A2.1a, A2.2a, A2.3, A2.4b
		Biofilms matures	Minéral composite	A3.1, A3.3
	Lyon (Servas)	Expérience de colonisation	Minéral composite	St12, St24
		Biofilms matures	Minéral composite	RP1.5, RP2.6
	Région parisienne (Cergy, Pontoise, Aubervilliers)	Expérience de colonisation	Minéral composite	SGt12, SGt24
		Biofilms matures	Minéral composite	B1.1 à B1.3, B1.8
Béton	B1.6			
Calcaire	B1.4			
Granite	B1.7			
Irlande	Ballyclare	Expérience de colonisation	Minéral composite	Bt0, Bt6, Bt12, Bt24
		Biofilms matures	Minéral composite	C1.1 à C1.13
	Cork	Biofilms matures	Minéral composite	C1.1 à C1.13
Ukraine	Prypiat, Chernobyl	Biofilms matures	Béton	Cher1, Cher2, Cher3, Cher4, Cher5, Cher6, Cher7
				Cher8
	Vesniane, Chernobyl	Biofilms matures	Béton	Cher8

## III.2. Méthodes utilisées

### III.2.1. Extraction d'ADN et amplification par PCR du SSU rDNA et ITS, construction de banques de clones, analyse préliminaire des séquences

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de 250 µl de la poudre prélevée, à l'aide du kit d'extraction d'ADN Power Soil DNA de chez MoBio (Carlsbad, CA, 160 USA) selon leur protocole. L'ADN a été ensuite élué dans un volume final de 80 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8 et conservé à -20°C.

Les gènes codant pour l'ARNr de la petite sous unité du ribosome (SSU rDNA) ont été amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques pour chacun des trois domaines du vivant. Pour les bactéries, j'ai également amplifié la région adjacente au SSU rDNA, à savoir l'ITS (Internal Transcribed Spacer), avec les amorces 27F et 23S-1R (Tableau III.2). Le SSU rDNA eucaryote a été amplifié avec les amorces spécifiques 82F et 1520R. Concernant les archées, et ce pour maximiser les chances d'amplifier leur gène spécifique, j'ai

utilisé les amorces directes suivantes spécifiques aux archées : Ar109F, ANMEF, W36 et 21F, en combinaison avec l'amorce reverse 1492R.

Les réactions de PCR ont été faites dans un volume final de 25µl, contenant 1µl d'ADN élué, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 nmol de chaque dNTP, 20 pmol de chaque amorce et 0.2 U de Taq Platinum DNA Polymérase (Invitrogen). Les réactions de PCR ont été réalisées sous les conditions suivantes : une dénaturation de 2 min à 94°C, puis 35 cycles (dénaturation à 94°C pendant 15 sec, hybridation à 50 ou 55 °C pendant 30 sec ; extension à 72 °C pendant 2 min), pour finir avec 7 min d'extension finale à 72°C.

Les banques de clones ont été construites à l'aide du kit de clonage TopoTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suivant leur protocole. Les inserts des clones ont été ré-amplifiés par PCR en utilisant les amorces universelles des régions flanquantes du vecteur.

Les gènes SSU rDNA ont été séquencés partiellement avec soit l'amorce 1492R pour les procaryotes, soit l'amorce 1520R pour les eucaryotes (séquençage réalisé par BC Genomics). Des courbes de saturation pour chaque banque de clones ont été construites avec ces séquences partielles à l'aide de DOTUR (Schloss and Handelsman 2005) au niveau des OTUs (Operational Taxonomic Units), qui ont été définis comme des groupes de séquences de SSU rDNA partageant plus de 97% d'identité. Des clones représentant chacun des différents OTUs présents dans nos échantillons ont été ensuite séquencés en entier avec l'amorce directe la plus adéquate pour chaque groupe taxonomique. Les séquences ont été ensuite assemblées avec Codon Code Aligner (CodonCode Corporation; [www.codoncode.com](http://www.codoncode.com)), avant de réaliser des analyses phylogénétiques.

**Tableau III.2.** Amorces utilisées pour les amplifications et le séquençage des gènes SSU rRNA.

Nom d'amorce	Spécificité	Sens	Longueur bp	Séquence	Température d'hybridation (°C)
T7	universel		20	TAATACGACTCACTATAGGG	47
M13	universel	reverse	17	CAGGAAACAGCTATGAC	45
B-27F	bactéries	Forward	20	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	56
B-63F	bactéries	Forward	21	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	59
B-1387R	bactéries	Reverse	18	GGGCGWGTGTACAAGGC	60
1492R	procaryotes	Reverse	19	GGTTACCTTGTTACGACTT	47
23S-1R	bactéries	Reverse	21	GGGTTTCCCATTTCGAAATC	64
CYA106F	cyanobactéries	Forward	22	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	70
CYA1380R	cyanobactéries	Reverse	20	TAACGACTTCGGGCGTGACC	64
23S30R	cyanobactéries	Reverse	22	CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT	63
21F	archées	Forward	20	TTCCGGTTGATCCTGCCGGA	68
Ar109f	archées	Forward	20	AC(G/T) GCT GCT CAG TAA CAC GT	59
W36	archées	Forward	16	TCC AGG CCC TAC GGG G	61
ANMEF	archées	Forward	18	GGCTCAGTAACACGTGGA	53
EK-82F	Eucaryotes	forward	17	GAA ACT GCG AAT GGC TC	53
18S-1498R	Eucaryotes	Reverse	20	CAC CTA CGG AAA CCT TGT TA	53
EK-1520R	Eucaryotes	Reverse	16	CYG CAG GTT CAC CTA C	45
341F-GC	Bactéries	Forward	57	CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGG	85
534R	Bactéries	reverse	17	GGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGCTGCTGG	57
1209F-GC	Eucaryotes	Forward	56	CGCGCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGC CGCCCCCGCCGAGGTCTGTGATGCC	84



### III.2.2. Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE*)

Les analyses de "*fingerprint*" pour estimer la diversité procaryote et eucaryote ont été faites à l'aide de la DGGE. Pour ce faire, de courts fragments du SSU rDNA sont amplifiés. Pour les bactéries, l'amorce directe, 341F-GC (Tableau III.2), contient un "*GC-clamp*" ; elle est utilisée avec l'amorce reverse 534R. Pour les eucaryotes, l'amorce directe, 1209F-GC, contient également un *GC clamp*; elle est utilisée avec l'amorce reverse 1520R. Les réactions de PCR ont été réalisées avec le même mélange de réaction qu'indiquée ci-dessus, à l'exception d'une concentration finale de MgCl<sub>2</sub> de 3 mM pour l'amplification des fragments du SSU rDNA des bactéries. Les conditions de PCR ont été les suivantes : une étape de dénaturation initiale à 94°C de 3 min, 20 cycles consistant en une étape de dénaturation à 94°C de 15 sec, une étape d'hybridation de 30 sec (avec un gradient de température décroissant de 65°C à 55°C pour les 10 premiers cycles, puis les 10 derniers cycles à 55°C), et une étape d'élongation de 1.5 min à 72°C, ces 20 cycles ont été suivis d'une étape finale d'extension à 72°C de 7 min pour les eucaryotes et 1h pour les bactéries. La migration des produits de PCR a été faite avec un système DGGE-2000 (CBS Scientific Company), avec un marqueur de taille de 50bp (Promega, Lyon, France) en parallèle. Différentes conditions ont été testées avant de définir celles qui étaient le plus adaptées pour séparer au mieux les produits d'amplification pour les bactéries et pour les eucaryotes. Le gel utilisé a été un gel à 8% de polyacrylamide, avec un gradient d'agent dénaturant fait par un mélange de solution 30% et 60% pour les bactéries et 20% et 40% pour les eucaryotes. La solution 100% d'agent dénaturant correspond à 7M d'urée et 40% de formamide. 10-15 µl de produit de PCR ont été chargés pour chaque échantillon et le gel a migré 6 heures à 150V et à 60°C, dans du tampon TAE 0.5X. Après l'électrophorèse, les gels sont colorés au SYBR GOLD (Molecular Probes, Invitrogen, USA) et visualisés et photographiés grâce à un transilluminateur UV. Les gels sont ensuite traités et analysés avec le logiciel Bionumerics®6 (AppliedMaths, Saint-Martens-Latem, Belgium), et normalisés en se basant sur la position du marqueur de taille. Les bandes ont été assignées manuellement. Les analyses de "*clustering*" des profils de DGGE ont été faites par UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean).

Des tests d'utilisation de la technique d'ARISA (*Amplified Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) ont été menés dans le but de compléter l'information apportée par la DGGE. Cependant, après plusieurs essais et comparaisons, j'ai conclu que cette méthode n'apportait pas plus d'information que la DGGE pour nos échantillons et nous avons ainsi décidé de l'abandonner pour nous concentrer sur la DGGE et les banques de clones.

### III.2.3. Analyses phylogénétiques

Nos séquences ont été comparées à celles disponibles dans la base de données GenBank par BLAST (Altschul, Madden et al. 1997). Les séquences les plus proches des nôtres ont été sélectionnées afin d'être incluses dans un alignement global, incluant aussi les espèces cultivées les plus proches ainsi que des représentants de tous les grands phylums. Les séquences ont été alignées avec MUSCLE (Edgar 2004) et l'alignement multiple généré a été vérifié manuellement à l'aide du programme ED du logiciel MUST (Philippe 1993). Les « gaps » et les positions ambiguës de l'alignement ont été exclus des analyses ultérieures. Des arbres préliminaires par neighbor-joining (NJ) ont été faits afin de faire par la suite le choix des séquences représentatives de chaque groupe taxonomique. Des arbres plus robustes ont été ensuite générés par maximum de vraisemblance avec le programme TREEFINDER (Jobb, von Haeseler et al. 2004), en appliquant un modèle d'évolution de type GTR (General Time Reversible) avec une loi gamma pour tenir compte des différences de vitesse d'évolution entre sites. La robustesse des arbres a été déterminée par 1000 tirages de bootstrap avec TREEFINDER. Les arbres ont été visualisés avec le programme FIGTREE (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### III.2.4. Microscopie confocale (Confocal Scanner Laser Microscopy, CSLM)

Sur certains des échantillons issus de la campagne d'exposition (voir IV.3.3), des observations en microscopie confocale ont été faites dans le but de visualiser les microorganismes pigmentés, notamment les espèces photosynthétiques, et de faire une première caractérisation de leur contenu pigmentaire. Ces essais ont été menés sur les échantillons susceptibles de présenter le plus de colonisation, donc ceux après 2 ans d'exposition. L'observation en microscopie confocale a été faite le plus rapidement possible après l'échantillonnage. Avant observation, les échantillons ont été réhydratés pendant 1-2 heures avec une solution physiologique afin de récupérer la morphologie des cellules dans des conditions d'hydratation optimales. On a réalisé également une coloration au Syto9, un colorant spécifique de l'ADN, afin de pouvoir visualiser aussi les microorganismes non pigmentés présents dans l'échantillon. Une portion d'échantillon (la plus fine possible) a été ensuite prélevée et placée entre lame et lamelle afin d'être observée. Ces observations ont été faites à l'Institut de Physique du Globe de Paris (collaboration avec Emmanuelle Gérard) avec un microscope confocal à balayage laser FluoView<sup>TM</sup>FV1000 et une résolution spectrale de 2 nm (Olympus). Le FluoView<sup>TM</sup>FV1000 possédait une diode laser de 405 nm laser et des

lasers "multi-line argon" (458 nm, 488 nm, and 515 nm), "helium-neon-green" (543 nm) and "helium-neon-red" (633 nm). Les images de fluorescence ont été obtenues avec des longueurs d'onde d'excitation de 405 nm, 488 nm et 543 nm en collectant la fluorescence émise entre 425–475 nm, 500-530 nm et 560-660 nm.

A part la visualisation de l'ensemble des communautés colonisant nos substrats, la microscopie confocale permet d'obtenir des spectres d'émission de fluorescence pour une cellule individuelle donnée afin de mettre en évidence la présence de différents pigments. Toutes les images obtenues ont été ensuite retravaillées avec le logiciel Image J (en particulier pour la reconstruction des images en 3D fixes ou en animation).

### **III.2.5. Microscopie électronique (SEM et TEM)**

Des observations en microscopie électronique à balayage et à transmission ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire PPF (Programme Pluri Formation) d'analyse des systèmes biologiques (équipe de Brigitte Arbeille, plateforme IBISA) de l'Université François-Rabelais (Faculté de Médecine) de Tours afin de suivre au niveau microscopique l'apparition et développement des biofilms lors des expériences de colonisation sur le long terme. Les microscopes utilisés sont le MET JEOL 1011 et le MEB GEMINI Zeiss 982. Ces observations avaient pour but de suivre l'évolution du biofilm, en terme de diversité mais également de développement en épaisseur du biofilm.

### **III.2.6. Indices de diversité, comparaison des communautés et analyses statistiques multivariés**

Différents indices (Chao1, Ace) de diversité spécifique ou, dans notre cas, des OTUs ont été calculés avec DOTUR (Schloss and Handelsman 2005) en définissant les OTUs comme des groupes de séquences partageant plus de 97% d'identité au niveau du gène SSU rDNA. Afin de pouvoir comparer la composition des communautés de bactéries et de microorganismes eucaryotes entre elles, des grandes matrices de fréquences d'OTUs ont été construites. Les données d'abondance d'OTUs ont été homogénéisées et standardisées en prenant la racine carrée de la valeur. La dissimilarité des compositions des communautés entre les échantillons a été quantifiée par l'indice de Bray et Curtis (Bray & Curtis 1957). Pour avoir une représentation graphique des différences de composition des communautés de bactéries et d'eucaryotes entre les différents échantillons, des méthodes d'ordination du type analyse multidimensionnelle non-métrique (NMDS) ont été utilisées (voir IV1.1, article 1).

Pour évaluer la contribution des variables environnementales (coordonnées géographiques, précipitation, humidité, température) dans la composition des communautés, nous avons réalisé d'abord une analyse en composantes principales (ACP) afin de réduire le nombre de variables environnementales. En effet, nous avons utilisé un jeu de 16 variables environnementales: température, humidité, précipitation et point de rosée en prenant des valeurs maximales, minimales, moyennes de la dernière année et moyennes du dernier mois avant le prélèvement (voir tableau en annexe III.2.a). Ces variables étant hautement corrélées entre elles, nous avons pu les résumer en trois composantes majeures expliquant 99% de la variation (voir IV1.1, article 1). Nous avons ensuite testé la relation entre les variables et les variations de composition des communautés microbiennes par des tests de permutation. Puis, afin de déterminer la meilleure combinaison entre les descripteurs environnementaux et la matrice d'abondance des microorganismes, nous avons appliqué des CCA (analyse canonique des correspondances), analyses contraintes. Des courbes de distance-decay ont été construites en représentant la similarité de composition entre deux échantillons calculée avec l'indice de Sorensen (Sorensen 1957) et la distance géographique. Dans le cas de la campagne d'exposition, des analyses multivariées ont été réalisées par analyses de correspondance (CoA) sur les différents échantillons au niveau des OTUs et de phylums. Pour tester si le temps de colonisation et le site géographique avaient un effet significatif sur la formation des assemblages des bactéries et des eucaryotes, nous avons réalisé des analyses inter-classe (BCA) sur les analyses des correspondances. Toutes les analyses ont été réalisées avec le langage statistique R.

## IV. RESULTATS

### IV.1. Diversité et biogéographie des communautés microbiennes formant des biofilms sur des surfaces minérales exposées

A l'heure actuelle, les questions de biogéographie et de répartition des populations microbiennes, ainsi que des facteurs influençant cette distribution, sont des sujets aux discussions intenses, avec notamment le débat construit autour de l'hypothèse de Baas-Becking « *everything is everywhere, but the environment selects* » et sur si celle-ci s'applique ou pas à toutes les espèces microbiennes. Pour résoudre ce débat, il faut connaître les facteurs environnementaux ou autres qui contrôlent la diversité microbienne (Martiny et al 2007). Deux grands types de facteurs sont souvent confrontés pour expliquer la structure des communautés des bactéries et des petits eucaryotes unicellulaires : soit une dispersion globale des espèces microbiennes sur laquelle agisse la sélection environnementale, soit des barrières physiques ou chimiques qui limitent la dispersion microbienne (cas de milieux extrêmes) entraînant des populations différenciées et, éventuellement, endémiques. Parmi les paramètres qui vont produire une sélection sur les populations des biofilms épilithiques, se trouvent les paramètres climatiques (température, humidité, précipitations, point de rosée) mais aussi, potentiellement, la nature du substrat où vont se développer les communautés. Une autre question qui est très ouverte, mais rarement posée, est si les microorganismes procaryotes et eucaryotes se comportent de la même manière vis-à-vis des facteurs qui déterminent la biogéographie.

Dans le travail reporté dans ce chapitre, je me suis intéressée à essayer de répondre à ces questions, qui constituent le premier objectif de ma thèse, à savoir l'étude de la diversité et des facteurs qui déterminent la biogéographie des microorganismes procaryotes et eucaryotes. J'ai ainsi d'abord essayé de caractériser, puis comparer, la diversité des microorganismes des trois domaines du vivant (archées, bactéries, eucaryotes) formant des biofilms sur des substrats minéraux divers, exposés à l'air depuis plusieurs années et dans différents sites géographiques. En particulier j'ai cherché à répondre à trois questions:

- Si dans un même site géographique, et sous les mêmes conditions climatiques environnementales, la nature du substrat a un effet sur la structure des communautés. Pour ce faire, j'ai comparé la diversité microbienne globale dans des substrats différents (minérale composite contrôle, béton, granite, calcaire) dans des échantillons récoltés à Ballyclare (Irlande du Nord, Tableau III.1). En effet, le transport par voie aérienne, comme mode de dispersion, étant communément admis pour les microorganismes, en particulier pour les bactéries, il est donc légitime de se poser la question de

savoir si on retrouve les mêmes microorganismes sur des surfaces avoisinantes artificielles et naturelles ou si la colonisation est substrat spécifique. Ainsi, en se plaçant sous les mêmes conditions environnementales (même site géographique), nous avons pu tester l'effet du substrat sur le développement des communautés microbiennes.

- Si dans divers sites géographiques des biofilms se développant sur le même substrat contrôle ont une diversité microbienne différente et si on pouvait séparer les effets dus à la distance géographique de ceux dus aux différences climatiques associées. Pour cela, nous avons travaillé sur un même substrat minéral composite (afin de s'affranchir de « l'effet substrat ») exposé à différents sites géographiques pour lesquels nous avons des mesures de plusieurs paramètres environnementaux (Annexe III.2.a).
- Si dans les communautés microbiennes, les procaryotes et les eucaryotes répondent de manière différente aux facteurs qui influencent la biogéographie. Il s'agit notamment de la première étude comparative portant à la fois sur la diversité bactérienne comparée à celle des eucaryotes à un même niveau de résolution (celui des OTUs) dans exactement les mêmes échantillons (biofilms).

Pour pouvoir répondre à ces questions il faut, dans un premier temps, étudier quels groupes de microorganismes forment les biofilms sur ces différentes surfaces. Pour ce faire, j'ai utilisé des méthodes moléculaires basées sur l'amplification, clonage et séquençage des gènes SSU rDNA et des méthodes de fingerprinting par DGGE. A partir de ces données comparatives, des analyses statistiques multidimensionnelles incluant toutes ces variables nous ont permis de tester l'effet de la géographie versus des facteurs environnementaux pour tenter d'expliquer la distribution observée des microorganismes.

#### **IV.1.1. Article 1: Prokaryotes and microbial eukaryotes display differential biogeography patterns in epilithic biofilms**

5

**Prokaryotes and microbial eukaryotes display differential biogeography  
patterns in epilithic biofilms**

MARIE RAGON\*, MICHAËL C. FONTAINE\*†, DAVID MOREIRA\* and

10

PURIFICACIÓN LÓPEZ-GARCÍA\*

15

*\*Unité d'Ecologie, Systématique et Evolution, CNRS UMR 8079, Université Paris-Sud,  
bâtiment 360, 91405 Orsay cedex, France; †Eco-anthropologie et Ethnobiologie, UMR 7206,  
Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Université Denis Diderot, 75005 Paris, France*

20

Correspondence: Purificación López-García, Fax: +33 1 69 15 46 97;  
E-mail: puri.lopez@u-psud.fr

25

## Abstract

Microbial biogeography studies put much effort in determining which factors are more  
30 important in shaping community composition, whether environmental selection or stochastic  
processes related to dispersal. While both types of factors are possibly influential, it is silently  
assumed that protists, or microbial eukaryotes in general, behave biogeographically as  
prokaryotes because of their small sizes. However, direct evidence for this in exactly the same  
environment and at the same phylogenetic depth is lacking. In this study, we compared the  
35 structure of both prokaryotic and eukaryotic components of microbial communities forming  
biofilms on mineral substrates in different geographic locations at the level of small-subunit  
(SSU) rRNA-based operational taxonomic units (OTUs). These microbial communities are  
subjected to strong environmental selection, since they contained important proportions of  
extremophilic microorganisms adapted to desiccation and UV-radiation. We find that the  
40 nature of the substrate as well as climatic variables and geography influence microbial  
community structure. However, constrained correspondence analyses and distance-decay  
curves showed that, whereas the substrate type was the most significant factor structuring  
bacterial communities, geographic location was the most influential factor for microbial  
eukaryote communities. Biological explanations implying a higher dispersal success for  
45 bacteria combined with more mobile lifestyles for predatory protists may underlie these  
differential prokaryote versus microbial eukaryote biogeography patterns.

Keywords: algae, desiccation, dispersal, distance-decay, fungi, microbial biogeography,  
phototrophic biofilm, protist, radioresistance

50



## Introduction

55

The massive application of molecular tools to describe prokaryotic and eukaryotic microorganisms in natural environments has revitalized in recent years the interest on microbial biogeography, i.e. the study of spatial patterns of variation in microbial community structure. This has led to multiple discussions on whether or not a true biogeography exists for free living microorganisms and whether microbial biogeography follows patterns and processes that are already known for macroorganisms in classical ecology theory. As summarized in a number of recent reviews (Green & Bohannan 2006; Lindström & Langenheder 2011; Martiny *et al.* 2006; Ramette & Tiedje 2007), non-random distributions exist both for prokaryotes (bacteria and archaea) and microbial eukaryotes (essentially protists). Furthermore, similarly to macrobial communities, taxa-area relationships have been found for bacteria (Horner-Devine *et al.* 2004) and for eukaryotes (Green *et al.* 2004). However, the factors driving those patterns, whether they are fundamentally deterministic (governed by environmental selection) or stochastic (governed by dispersal history) remain to be established.

70

The long-standing debate about which factors drive microbial diversity patterns finds its roots in the development of microbiology as a science (O'Malley 2007). The fact that particular culture media enriched the same particular microbial species strongly influenced the idea promoted by Beijerinck, one of the founders of the so-called Delf school of microbiology, that microorganisms, especially bacteria, dispersed ubiquitously but were 'selected out' by ecology (Beijerinck 1913). This idea was skillfully summarized by Baas-Becking in his assert "*everything is everywhere but the environment selects*" (Baas-Becking 1934; de Wit & Bouvier 2006). Ubiquitous distribution sorted out by ecological determinism reached soon the status of a general principle for microbiology, something that distinguished it from macrobial ecology (van Niel 1949). This view dominated microbial ecology until the onset of the twenty-first century, when claims of global dispersal of small protists and other small microbes based on classical phenotypic properties (Finlay 2002) still tried to mitigate dissenting views that began to emerge mostly from higher-resolution molecular analyses and that revealed more complex processes (Foissner 2006; Pedros-Alio 2006; Whitaker 2006; Whitaker *et al.* 2003).

85

Since then, the debate on the forces shaping microbial biogeography has been reinvigorated with the addition of many specific studies focusing on either bacteria or protists (Lindström & Langenheder 2011; Martiny *et al.* 2006). Some examples suggest that there are

barriers for microbial dispersal that isolate populations of endemic populations. This would be the case of some sea ice bacteria (Staley & Gosink 1999; Vyverman *et al.* 2007), hot spring  
90 hyperthermophilic archaea (Whitaker *et al.* 2003) or hyperhalophilic bacteria (Rossello-Mora  
*et al.* 2008). The absence of gene flow between endemic populations would favor genome  
speciation (Reno *et al.* 2009) and metabolome specialization (Rossello-Mora *et al.* 2008).  
However, demonstrating that any given microbial species is endemic is unattainable because  
of the impossibility of exhaustive sampling. Comparing community composition allows to  
95 overcome undersampling (Martiny *et al.* 2006). Nevertheless, in spite of some apparent  
similarity, especially in extreme environments, those sampled habitats are complex and  
display local physico-chemical conditions that are different from site to site, consequently  
influencing the community structure. This is shown by a number of counter-examples. For  
instance, the bacterial taxa-area relationship found in salt marsh sediments was primarily  
100 explained by environmental heterogeneity (which usually increases with distance) and not by  
geography (Horner-Devine *et al.* 2004). In accordance with this view, some studies showed  
that the diversity and biogeography of soil bacterial communities are controlled by edaphic  
variables (Fierer & Jackson 2006), including those of soils under strong environmental  
pressure, such as the Arctic soils (Chu *et al.* 2010). Similarly, a study using fossil diatoms  
105 along large temporal scales showed a lack of dispersal limitation in marine diatoms,  
suggesting that the biodiversity at the microbial level fundamentally differs from that of  
macroscopic organisms for which geographic isolation is a common component of speciation  
(Cermeno & Falkowski 2009). At the same time, another study using fossil cyanobacteria  
data along long temporal scales concluded that the global distribution of hot and cold desert  
110 cyanobacteria does not result from widespread contemporary dispersal but from ancient  
evolutionary legacy (Bahl *et al.* 2011).

These apparent contradictory examples suggest that, possibly, both alternatives are true  
(Pedros-Alio 2006; Whitaker 2006). Indeed, some examples for global dispersal and probable  
endemicity of both bacteria and protist species exist, suggesting a complex interplay between  
115 dispersal limitation and local environmental effects (Bass *et al.* 2007; Pommier *et al.* 2007;  
Schauer *et al.* 2010). Unfortunately, the controversy about the factors governing microbial  
biogeography is not only due to the difficulties of disentangling deterministic from chance  
effects, but also to a variety of difficult-to-resolve issues, including the enormous  
phylogenetic breadth of microbial taxa, the lack of a unifying species concept for prokaryotes  
120 (Achtman & Wagner 2008; Fraser *et al.* 2009; Staley 2006) but also for protists, the technical

difficulties to fully explore microbial diversity in natural ecosystems and a lack of knowledge regarding the relationship between dispersal rates and rates of evolution (Caron 2009).

Yet, disentangling deterministic from random effects may be extremely difficult since, as recently suggested, the balance between the two may depend on the spatial (Martiny *et al.* 2011) or temporal (Nolte *et al.* 2010) scale but also on the phylogenetic depth considered (Bissett *et al.* 2010). From such dependence on spatial, temporal and phylogenetic scales a similar behavior of microbial and macrobial communities could be concluded. However, microbial communities may indeed behave differently, because some of the processes underlying community structure patterns are known to be different from those operating in large organisms. This could be the case of large average population sizes and dormancy, which is seen by some authors as the most important fitness trait in microbial biogeography (Locey 2010). In prokaryotes, horizontal gene transfer across very different phylogenetic scales is an additional active process operating in adaptation and evolution (Fraser *et al.* 2009; Kloesges *et al.* 2011). Horizontal gene transfer affects more frequently adaptive, functional genes, which might justify a functional microbial biogeography based on traits (Green *et al.* 2008; Parnell *et al.* 2010), although this could be different from a phylogeny-based microbial biogeography. This would actually constitute an outstanding difference not only between macrobial and microbial communities, but between eukaryotic and prokaryotic microbial biogeographies. However, if microbial phylogeny-based biogeography studies are scarce and fragmentary, functional-trait-based studies are still very rare (Green *et al.* 2008). Furthermore, most microbial biogeography studies concentrate on only bacteria/prokaryotes or protists but, to the best of our knowledge, comparative studies analyzing simultaneously and at the same phylogenetic depth prokaryotic and eukaryotic components of microbial communities to test whether they behave similarly have never been done.

In this study, we compare the structure of both prokaryotic and eukaryotic components of microbial communities forming epilithic biofilms in different geographic locations in Northern Ireland and France. We first show that these communities are subjected to strong environmental selection, containing important proportions of extremophilic organisms adapted to desiccation and UV-radiation. We then show that the nature of the substrate as well as climatic variables and geography influence microbial community structure. However, whereas the substrate type is the factor influencing most bacterial communities, geography is the one explaining the microbial eukaryotic component.

155 **Materials and methods**

*Sampling and DNA purification*

160 Microbial biofilms growing on the same control substrate (mineral composite) exposed to the open air for a period ranging from a 2 to 8 (average 4.7) years were collected from three regions in France (Charente-Maritime, Servas and Paris area) and from Northern Ireland (Ballyclare). In addition, biofilms growing on concrete, limestone and granite on the Ballyclare site were also collected (Table 1). Biofilm samples were collected by scraping the surface of the corresponding mineral substrate (5-10 cm<sup>2</sup>) with a sterile spatula. The material  
165 collected was stored at -20°C until use. DNA extraction was done from 250 µl of scratched powder using the Power soil DNA extraction kit from Mobio (Carlsbad, CA USA) following the instructions of the manufacturer. DNA was eluted in 80 µl of Tris-HCl, pH 8, and conserved at -20°C.

170 *PCR amplification of SSU rDNA regions, library construction and sequence analysis*

SSU rDNA genes were amplified using specific primers for each domain of life. For bacteria, we also amplified the adjacent internal transcribed spacer (ITS) region, using the primers 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and 23S-1R (GGGTTTCCCCATTCGGAAATC).  
175 Eukaryotic SSU rDNA was amplified using specific primers 82F (GAAACTGCGAATGGCTC) and 1520R (CYGCAGGTTACCTAC). In order, to maximize the chances to amplify archaeal SSU rDNA genes, we used combinations of the following archaea specific primers with the reverse primer 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT): Ar109F (AC(G/T)GCTGCTCAGTAACACGT), ANMEF  
180 (GGCTCAGTAACACGTGGA), W36 (TCCAGGCCCTACGGGG) and 21F (TTCCGGTTGATCCTGCCGGA). PCR reactions were carried out in 25µl of reaction buffer, containing 1 µl of the eluted DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTPs (10 nmol each), 20pmol of each primer, and 0.2U Taq platinum DNA polymerase (Invitrogen). PCR reactions were performed under the following conditions: 35 cycles (denaturation at 94°C for 15 s, annealing at 50 to  
185 55°C for 30 s, extension at 72°C for 2 min) preceded by 2 min denaturation at 94°C, and followed by 7 min extension at 72°C. Clone libraries were constructed using the TopoTA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Clone inserts were PCR-amplified using flanking vector primers, and SSU rDNA partially

sequenced with either 1492R or 1520R. Representative SSU rDNA clones were fully  
190 sequenced by using forward primers. Complete sequences were assembled using Code  
Aligner (CodonCode Corporation; www.codoncode.com) prior to phylogenetic analyses.

### *Phylogenetic analyses*

195 Our sequences were compared to those in GenBank by BLAST (Altschul *et al.* 1997). We  
retrieved the closest sequences identified in this way to include them in an alignment  
containing also sequences from the closest cultivated members and some representative  
sequences of the major taxa found. Sequences were aligned using MUSCLE (Edgar 2004) and  
the multiple alignment was then manually edited using the program ED from the MUST  
200 package (Philippe 1993). Preliminary neighbor-joining (NJ) trees were constructed for the  
different prokaryotic taxa in order to choose representative subsets of sequences for further  
phylogenetic analyses. Final phylogenetic trees were then reconstructed using final datasets  
by maximum likelihood (ML) using TREEFINDER (Jobb *et al.* 2004) applying a general time  
reversible model of sequence evolution (GTR), and taking among-site rate variation into  
205 account by using a four-category discrete approximation of a  $\Gamma$  distribution. Gaps and  
ambiguously aligned positions were excluded from our analysis. ML bootstrap proportions  
were inferred using 1000 replicates. Phylogenetic trees were viewed using the program  
FIGTREE (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). The sequences reported in this study  
have been deposited in GenBank with accession numbers XXXXXX-XXXXXX.

210

### *Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE) analysis*

Fingerprinting analysis of bacterial and eukaryotic diversity in different samples was carried  
out by DGGE. For this short fragments of SSU rDNA were amplified, in bacteria, using the  
215 forward GC-clamp primer 341F-GC  
(CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCA  
GCAG), and the reverse primer 534R (ATTACCGCGGCTGCTGG), and in eukaryotes, the  
forward GC-clamp primer 1209F-GC  
(CGCGCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGCAGGTCTGTGATGCC  
220 C), and the reverse primer 1520R. PCR was carried out using the same reaction mix as above  
except for a final concentration of MgCl<sub>2</sub> of 3 mM for bacteria and the following conditions:  
initial denaturation step at 94°C for 3 min, 20 cycles consisting of a denaturation step at 94°C

for 15 s, an annealing step of 30 s (a touch down procedure with a decreasing annealing temperature from 65°C to 55°C for the 10 first cycles was applied followed by a hybridization temperature of 55°C for the following 10 cycles) and a polymerization step at 72°C for 1.5 min, and a final step of 7 min (eukaryotes) to 1 h (bacteria) extension at 72°C. Migration of PCR products was done in a DGGE-2000 system (CBS Scientific Company) running in parallel 50 bp ladder DNA markers (Promega, Lyon, France). An 8% polyacrylamide gel with a gradient of DNA denaturant agent was cast by mixing solutions of 30% to 60% for bacteria, and 20% to 40% for eukaryotes. 100% denaturant agent is 7M urea and 40% formamide. 10-15 µl of PCR product were loaded for each sample and gels were run at 150V for 6 hours at 60°C in 0.5X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (1X: 40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0). After electrophoresis, gels were stained in SYBR Gold (Molecular Probes, Invitrogen, USA), and then visualized and photographed on a UV transilluminator. Photographed gels were normalized using the Bionumerics® 5 software (AppliedMaths, Saint-Martens-Latem, Belgium) based on the position of ladder standards. Band positions were assigned manually. Clustering analysis of DGGE patterns was carried out using UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) clustering applying a Jaccard coefficient (Jaccard 1901).

240

#### *Statistical methods for community analyses*

*Estimates of microbial diversity.* Distance matrices were generated from high-quality partial sequences for each clone library using ClustalX (Larkin *et al.* 2007) and used as input for DOTUR (Schloss & Handelsman 2005). Diversity indices (Table 1) and accumulation curves for operational taxonomic units (OTUs) were calculated using DOTUR at a cut-off value of 0.02, i.e. ≥98% sequence identity. Coverage values were calculated using the Good estimator (Good 1953) following the equation  $C=(1-n/N) \times 100$ , where C is the percentage of coverage of the library, n the number of singletons and N the total number of clones analyzed.

*Comparison of community composition.* OTU abundance data were squared-root transformed and pair-wise dissimilarities among samples were calculated using the Bray–Curtis index (Bray & Curtis 1957). Ordination methods were used to structure high-dimensional community composition data along simple axes expressing overall compositional similarity and dissimilarity between sites. We used a non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) as an unconstrained ordination method to depict the major compositional variations among sites. To assess to which extent community composition was related to eco-

255

environmental variation, we retained as putative significant descriptors the following variables: latitude and longitude as continuous geographic descriptors, and 16 parameters comprising different measures of temperature, precipitation, humidity and dew point levels (minimum, maximum, and averaged over the last month and the last year prior to sampling). As these variables were highly correlated, we used a principal component analysis (PCA) to summarize this eco-environmental variation into synthetic independent variables (principal components, PCs). The first 3 PCs accounted for 99.9% of the total variation and were thus retained as variables. In addition, we also considered the type of substrate and the location of each sample as categorical variables. The contribution of eco-environmental descriptors in shaping the community composition was tested first by fitting each variable with the unconstrained ordination variables and tested using  $10^5$  permutations. Then, we performed a constrained correspondence analysis (CCA) to focus on the variation that can be explained by the used environmental variables (Legendre & Legendre 1998). The significance of all descriptors together and each of them separately or in partial model was assessed using  $10^5$  permutations.

*Distance-decay similarity curves.* Pairwise community similarity between the samples was calculated based on the presence or absence of each OTU using the Sørensen's index (Sørensen 1957). Distance-decay curves were constructed separately for bacteria and eukaryotes by plotting the Sørensen's index as a function of the geographic distance between sites. Least squared regression was then fitted to the data and the slope determined. The 95% confidence interval was estimated using  $10^5$  bootstrap resampling.

All the data analyses were conducted within the R statistical environment (R Development Core Team 2011) using the package *vegan* (Oksanen *et al.* 2011).

## Results and discussion

### *Prokaryotic and eukaryotic diversity in sunlight-exposed microbial biofilms*

We first characterized by SSU rRNA gene-based approaches the diversity of prokaryotic and eukaryotic microorganisms associated with epilithic biofilms growing on control mineral composite samples and other mineral substrates (concrete, limestone and granite) in different sites (Table 1). In the case of control mineral supports, we sampled substrates that had been exposed for over 2-3 years and up to 8 years (average exposure time 4.7 years) in order to

diminish any potential biases linked to local founder-induced heterogeneity during early stages of microbial colonization. These biofilms appeared mature, exhibiting more or less mixed coloration patterns going from green or red to black.

We aimed at studying the diversity of the microorganisms from the three domains of life, Archaea, Bacteria and Eucarya, by amplifying SSU rRNA genes using specific-domain primers. However, despite the use of several archaeal-specific primer combinations and nested PCR attempts, we failed to obtain archaeal amplicons. This strongly suggests that archaea are absent in this type of biofilms or occur in too small amounts to be detected by molecular methods. This result is in agreement with recent observations in sunlight exposed biofilms on similar substrates (Ragon *et al.* 2011). We succeeded in amplifying bacterial and eukaryotic SSU rRNA genes. In total, we analyzed 1499 sequences for bacteria and 997 for eukaryotes, which were classed in different operational taxonomic units (OTUs) (Table 1). Bacterial and eukaryotic gene libraries from the different samples were explored until the accumulation curves for OTUs defined at a cut-off level of 0.02 ( $\geq 98\%$  sequence identity) reached a plateau indicating near-saturation (Figures S1 and S2). This was also reflected in coverage values for each gene library exceeding 90% in all cases (Table 1), which suggests a comprehensive sampling of the dominant microbial groups present in the different biofilms. These data were used to calculate different richness estimators (Table 1). OTU richness varied between sites for both bacteria and eukaryotes. Similarly, the relative contribution of each OTU to the total diversity identified in each sample fluctuated. In some cases, few but abundant OTUs dominated prokaryotic and eukaryotic libraries (e.g. A2.3); in others, many different OTUs in more equal proportions contributed to both prokaryotic and eukaryotic diversity (e.g. B1.4) (Figure S3).

The relative proportions of different major taxa identified in the bacterial and eukaryotic gene libraries from biofilms are shown in Figure 1. Although the phylogenetic distribution of sequences varied among samples and sites, some taxa were clearly dominant in all or most of them. Thus, Deinococcales, Actinobacteria and, in some cases, Acidobacteria dominated control mineral biofilms, with collective proportions reaching over 70-80%. The major difference observed between control mineral samples and the other substrates was the high proportion of Bacteroidetes to the expense of Deinococcales, which were absent or rare. The proportion of Alphaproteobacteria was remarkably constant in all samples (between 5 and 20%). Other taxa usually associated to phototrophic biofilms, such as Cyanobacteria, were present in almost all bacterial gene libraries but in relative low proportions. The relative high abundance of the above taxa was further confirmed by cutting and sequencing DNA



325 fragments from the most intense bands in DGGE gels (Figure 2 and Table S1). Many of the  
more intense bands in DGGE gels corresponded to cyanobacteria, suggesting that this group  
is more abundant than revealed by clone sequencing and that gene libraries constructed with  
general bacterial primers might produce a bias against this group.

In the case of eukaryotes, all the samples were dominated by green algae (Chlorophyta)  
330 or, in some samples, their close Streptophyta relatives, and ascomycete fungi (Ascomycota).  
These groups represented collectively more than 80-90% of sequences in most gene libraries.  
The only exception was the sample A3.1 from the Lyon area, where metazoan sequences  
represented a relative high proportion. Since metazoans contribute many cells and,  
consequently, more DNA per individual their relative high counts in this library should be  
335 considered with caution. The dominance of green algae and fungi in biofilms was also  
confirmed by cutting and sequencing several DNA fragments from intense bands in DGGE  
fingerprints (Figure 2 and Table S1).

To explore at finer phylogenetic scale the microbial diversity in the biofilms, we  
constructed phylogenetic trees with near full-length sequences representative of the different  
340 OTUs and including their closest relatives in GenBank and reference sequences (Figures 3-6  
and S4-S5). In general, our most abundant phylotypes were very closely related to organisms  
well known for their adaptation to extreme conditions, such as Deinococcales and  
Actinobacteria (Figure 1). We identified a series of OTUs that were very closely related  
among them and to environmental *Deinococcus* sequences retrieved from endolithic  
345 communities at high altitude or recently deglaciated soils (Nemergut *et al.* 2007) but also  
from dust particles found in buildings (Rintala *et al.* 2008), airplane cabins (Osman *et al.*  
2008) and urban aerosols (Brodie *et al.* 2007) (Figure 3). This suggests wide-dispersal  
properties, which are most likely due to the high intrinsic tolerance to of *Deinococcus* to  
desiccation, UV and ionizing radiation (Daly 2009). Deinococcales are frequently retrieved  
350 from hot and cold desert samples (e.g. (Chanal *et al.* 2006; de la Torre *et al.* 2003; Rainey *et al.*  
2005). These properties of extreme resistance to UV and ionizing radiation are also shared  
by members of the actinobacterial genus *Rubrobacter* (Suzuki *et al.* 1988), which were  
particularly abundant in our biofilm samples (Figure 4). Rubrobacterales were indeed very  
abundant in recently studied sunlight-exposed biofilms in the highly irradiated Chernobyl area  
355 (Ragon *et al.* 2011). In addition to *Rubrobacter*, a wide diversity of other Actinobacteria was  
present in our biofilms (Figure 4), from which the most abundant OTUs had as closest  
relatives sequences identified in desert endolithic communities or, as in the case of  
*Deinococcus*, dust particles (Figure 4). Similarly, the cyanobacteria identified in our biofilms

were closely related to sequences retrieved from endolithic or epilithic communities in high  
360 altitude rocks or soils and in desert areas (Figure 3), sharing similar habitats with  
Deinococcales and Actinobacteria (Chanal *et al.* 2006; de la Torre *et al.* 2003; Nagy *et al.*  
2005). Acidobacteria, which are important members of soil communities (Quaiser *et al.*  
2003), were highly represented in some of our biofilm samples as well (Figure S4). The most  
365 abundant phylotype was very closely related to sequences retrieved from a recently  
deglaciated soil (Nemergut *et al.* 2007). Acidobacteria can also colonize rock surfaces, having  
been found to dominate epilithic communities in ancient catacombs (Zimmermann *et al.*  
2006). Finally, among the Alphaproteobacteria, the most represented OTUs were related to  
the genus *Sphingomonas* (Figure S5), whose members are known by their ability to degrade  
370 recalcitrant natural and anthropogenic compounds, including cyanobacterial exudates and  
many xenobiotic compounds (Edwards & Lawton 2009; Stolz 2009). The ability to degrade  
complex compounds is also shared by many Betaproteobacteria, which were present in some  
biofilm samples to a moderate extent (Madigan *et al.* 2002) (Figure S5).

As expected, microbial eukaryotes were less diverse than bacteria also at the OTU level  
(Table 1), as was also visible in DGGE fingerprints (Figure 2). Ascomycete fungi were the  
375 most diverse group; Basidiomycete fungi were moderately represented by sequences related  
to the yeast genera *Rhodotorula*, *Bensingtonia* and *Kondoa*, of wide distribution (Figure 5).  
The most abundant ascomycete OTUs were related to the lichen-forming genera *Polycladia*  
and *Verrucaria*, often found in endolithic communities (Garvie *et al.* 2008), and *Xanthoria*,  
but also to other fungi that are potential facultative plant and animal parasites such as *Phoma*  
380 or *Phaeosphaeria*. *Verrucaria*-forming lichens have been seen to colonize very rapidly stones  
in restored habitats (Nascimbene *et al.* 2009). Together with fungi, green algae dominated  
mineral-associated biofilms, with the exception of one Lyon sample where sequences related  
to the moss *Pottia truncata* were relatively abundant (Figures 1 and 6). Mosses, like animals,  
may bias gene libraries by contributing much DNA per individual, but they are indicative of  
385 mature, well established communities. Among green algae, the most abundant sequences  
corresponded to a series of OTUs closely related among them ascribing to the genus  
*Trebouxia*, which was found to dominate endolithic Antarctic communities (Banerjee *et al.*  
2000). *Trebouxia* forms very often lichens (usually with *Xanthoria*), though not necessarily  
(Bubrick *et al.* 1984). Other highly represented OTUs affiliated to the related genera  
390 *Stichococcus*, *Chlorella* and *Printzina*. Trebouxiophyceae are well adapted to light exposure  
and, consequently, resistant to UV and ionizing radiation, being often found in building  
facades and also detected in Chernobyl concrete-associated biofilms (Ragon *et al.* 2011). This

resistance is partly due to the production of mycosporines, very efficient protective pigments (Karsten *et al.* 2005; Karsten *et al.* 2007). The rest of eukaryotic sequences identified  
395 corresponded to yellow-green algae (Xanthophyta, Stramenopiles), some ciliates (Alveolata),  
slime-mold amoeba and, within the animals, mites and tardigrades. The latter are also known  
for extreme resistance to various stresses, including desiccation, ionizing radiation, hot and  
cold temperatures (Mobjerg *et al.* 2011). The presence of typical protozoan grazers such as  
ciliates or amoeba, which have less mobility than animals, can be taken as a further indication  
400 that these biofilms are mature and sustain more or less complex trophic interactions.

In summary, the general microbial diversity found in biofilms growing on sunlight-  
exposed mineral surfaces were dominated by microorganisms, such as Deinococcales,  
Actinobacteria, green algae and melanized spore-forming Ascomycetes, that have wide  
dispersal ability and are highly resistant to desiccation and UV radiation, implying that these  
405 biofilm communities develop under strong environmental selection (Gorbushina & Broughton  
2009). Strong selective pressures limit diversity. In fact, these communities are much less  
diverse than soils or freshwater systems. This lower complexity converts them in easier  
models to explore questions related to biogeography.

#### 410 *Comparison of community composition in epilithic microbial biofilms*

In order to compare community structure in the different microbial biofilms prior to further  
exploration of the processes explaining them, we applied non-metric multidimensional scaling  
(NMDS). This unconstrained ordination method allows to structure high-dimensional  
415 community composition data along simple axes to depict the major compositional variations  
among sites (Legendre & Legendre 1998). We obtained NMDS ordination plots for bacteria  
and for eukaryotes separately. Interestingly, the distribution of biofilm samples and OTUs  
was qualitatively different for bacteria and for eukaryotes (Figure 7).

First, in the case of bacteria, the ordination of samples along the first axis (NMDS1)  
420 clearly discriminated the samples from different substrates. Samples corresponding to  
different substrates collected in the same geographic site were distributed from the extreme  
right (B1.4 and B1.7, limestone and granite) to the extreme left (B1.3, control composite  
substrate) of the axis, B1.6 (concrete) being intermediate (Figure 7). This implies that the  
variation related to the differences in substrates is larger than that related to geographic  
425 variation. By contrast, in the case of eukaryotes the communities appeared to be more similar  
among different substrates from the same locality, although with some variation in terms of

the OTUs present (Figures 3-6 and S4-S5). However, the largest variation in community composition was seen between biofilms coming from distinct geographic origins. Thus samples from Northern Ireland and the Paris area were situated towards the left of the  
430 NMDS1 axis, whereas samples from Charente Maritime located on the right of the axis and those from Lyon at an intermediate position (Figure 7). Thus, differences linked to the geographic position appeared to be more important in eukaryotes than those due to the substrate nature.

Second, not only the distribution of samples along axes is different in bacteria and  
435 eukaryotes, but also that of OTUs among samples. In the case of bacteria, OTUs appeared more disperse, whereas in eukaryotes OTUs tended to aggregate around samples (Figure 7). This implies that more bacterial OTUs are shared between samples, whereas eukaryotic OTUs appear more specific to each sample (see also Figures 3-6 and S4-S5). In other words, this suggests that bacteria effectively disperse more widely than microbial eukaryotes under  
440 exactly the same environmental constraints.

#### *Determinants of prokaryotic and eukaryotic community composition in epilithic biofilms*

To understand which ecological factors determine microbial community structure on epilithic  
445 biofilms and to test whether they affected differently prokaryotic and eukaryotic communities, we carried out a series of statistical analyses considering the following environmental descriptors: substrate type, location, latitude, longitude and a collection of environmental parameters related to temperature, precipitation, humidity and dew point levels which, being correlated among them, were summarized into 3 synthetic independent variables by a  
450 principal component analysis (PCA). The first principal component (PC) accounted for 80% of the total variation and, together, the 3 PCs selected accounted for 99.9% of it (Figure S6).

First, we tested the linear univariate relationship between the community composition summarized using the NMDS ordination and each of the putative descriptors considered (i.e., the 3 first PCs, substrate type and location) using  $10^5$  permutations (Table S2). Only the  
455 substrate revealed to be a significant descriptor of variation in bacterial community composition ( $r^2 = 0.55$ ,  $p = 0.022$ ), but not in the eukaryote community composition ( $p = 0.470$ ). By contrast, the variation in eukaryote community composition was significantly related to the geographic location ( $r^2 = 0.69$ ,  $p = 0.007$ ), with marginal significant effects of the PC1 ( $r^2 = 0.53$ ,  $p = 0.080$ ) and PC2 ( $r^2 = 0.58$ ,  $p = 0.054$ ). These results confirm previous  
460 qualitative observations in NMDS plots (Figure 7) but also in the distribution of high-level

taxa across samples (Figure 1). Thus, in the case of bacteria, Deinococcales were very abundant in the control substrate but Acidobacteria and, especially, Bacteroidetes appeared to increase their abundance in the rest of substrates. This might be related to differences in porosity, and hence desiccation potential, in the control substrate. However, qualitative differences in the presence of eukaryotic phyla were not apparent, suggesting a different behavior of prokaryotes and microbial eukaryotes with respect to substrate type.

Second, to quantify the variation explained by the selected environmental variables, we performed a constrained correspondence analysis (CCA) (Figure 8). When considering all the descriptors in the model, the variation in community composition explained collectively by such environmental factors (3 PCs, substrate and location) was 93% of the total variation for bacteria ( $p = 0.024$ ) and 92% for eukaryotes ( $p=0.023$ ) (Table 2). When considering each variable separately, we observed again significant differences between bacteria and eukaryotes. In both cases the PC1 had a significant effect in explaining community composition, 13% of the variance ( $p = 0.009$ ) for bacteria and 14% of the variance ( $p=0.033$ ) for eukaryotes. However, whereas for bacterial communities the substrate explained 38% of the total variation ( $p=0.034$ ) and location was not found as a significant descriptor ( $p = 0.470$ ), for eukaryotes location was a significant descriptor explaining 39% of the variance ( $p = 0.008$ ) but not the substrate ( $p=0.258$ ). Furthermore, we also tested the interaction between the different variables and, although the design of the present study did not allow to retrieve significant results in most cases, the only significant effect found was that of the substrate on the variation bacterial community composition, after having removed the effect of the PC1 (the geo-environmental variables) ( $p = 0.013$ ) (Table S3). This confirms that the substrate is the dominant factor shaping the variation in the bacterial community composition, with a contribution of environmental variables. On the contrary, the geographic location appears more important to shape microbial eukaryotic communities.

Finally, to further explore whether the geographic location is actually more influential for eukaryotic microbes than for bacteria, we constructed distance-decay curves for both (Figure 9). Eukaryote and bacteria curves showed a decreasing trend in community similarity as a function of the geographic distance ( $b_{Euk} = -0.04$ , 95% confidence interval (CI): $[-0.07, -0.02]$ ,  $b_{Bact} = -0.02$ , 95% CI: $[-0.04, 0.00]$ ). However, only the distance-decay curve eukaryote displayed a slope significantly different from 0. Therefore, these results confirm that geographic distance influences significantly the composition of microbial eukaryotes, but not of prokaryotes, in the same biofilm communities.

Microbial biogeography studies are on the rise and determining which factors are more important to shape community composition, whether environmental factors acting through selection or stochastic factors related to dispersal, concentrates intense research efforts. Some studies favor more selection, others chance but, likely, there is a mix of both (Green & Bohannan 2006; Lindström & Langenheder 2011; Martiny *et al.* 2006). However, it is tacitly assumed that protists, or microbial eukaryotes in general, behave as bacteria based on size criteria. This is largely based on ideas by Finlay and Fenchel, according to whom, free-living protists behave as cosmopolitan metapopulations and respond to the "*everything is everywhere, but the environment selects*" maxim (Finlay 2002; Finlay & Fenchel 2004). When counter-examples showing differences in protist communities with geographic distance are seen, they are intuitively associated to observed differences of prokaryote community composition with distance because they are microscopic as well. But in addition to size, there are other life history traits that differentiate prokaryotes and eukaryotes. Do prokaryotes and protists actually behave the same from a biogeography perspective?

To try to answer to that question, we used sunlight-exposed microbial biofilms growing on different mineral substrates in different locations as models. These microbial communities were composed of microorganisms adapted to desiccation and UV-radiation, being therefore subjected to strong environmental selection. This revealed advantageous for two reasons. First, because the microbial composition is less complex than in other ecosystems, allowing an easier description and comparison of communities. And second, because under such strong environmental selection if the "*everything is everywhere but the environment selects*" applied similarly to prokaryotes and eukaryotes, we should expect to see the same biogeography trends in prokaryote and microbial eukaryote communities. We were able to show that the nature of the substrate as well as climatic variables and geography location influence both microbial community structures. However, whereas the structure of bacterial communities was significantly explained by the substrate nature, that of eukaryotes was better explained by geography.

These significant differences in prokaryotic and eukaryotic community patterns suggest that the underlying processes are different as well, with more deterministic processes (environmental selection) prevailing for bacteria. Explanations for this might be related to dissimilar dispersal and survivability as well as lifestyle. The dominant bacterial groups detected are extremely resistant, with the concomitant increase in successful cosmopolitan

dispersal in dust particles detectable in atmospheric aerosols (Brodie *et al.* 2007; Osman *et al.*  
530 2008) where they are exposed to high irradiation and long desiccation periods. By contrast,  
although some eukaryotes have highly resistant dispersal structures, e.g. ascomycetes, others  
do not or their dispersive structures (e.g. ciliate or amoeba cysts) may be less resistant to long-  
term desiccation and irradiation. Another possible explanation resides in lifestyle. Although  
535 prokaryotes and some eukaryotes share sedentary activities (phototrophy or osmotrophy),  
many protists are predators being able to move. Therefore, it could be hypothesized that their  
presence would be more dependent on other biological variables (e.g. presence and nature of  
prey) than on abiotic environmental selection. Finally, if protist biogeography is more  
influenced by distance under strong environmental selection, it could be predicted that this  
trend would be even stronger in situations where environmental selection is less challenging.  
540 Further studies on protist versus prokaryote biogeography in other ecosystems will be needed  
to test this prediction.

### Acknowledgements

545 M.R. and this work were financed by a French *Convention Industrielle de Formation par la  
Recherche* (CIFRE). We thank Jean Marc Ghigo for helpful discussions.

### References

- 550 Achtman M, Wagner M (2008) Microbial diversity and the genetic nature of microbial  
species. *Nat Rev Microbiol* **6**, 431-440.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, *et al.* (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new  
generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- 555 Baas-Becking LGM (1934) *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde* W.P. Van Stockum &  
Zoon, The Hague, the Netherlands.
- Bahl J, Lau MC, Smith GJ, *et al.* (2011) Ancient origins determine global biogeography of  
hot and cold desert cyanobacteria. *Nat Commun* **2**, 163.
- Banerjee M, Whitton BA, Wynn-Williams DD (2000) Phosphatase activities of endolithic  
communities in rocks of the Antarctic Dry valleys. *Microb Ecol* **39**, 80-91.
- 560 Bass D, Richards TA, Matthai L, Marsh V, Cavalier-Smith T (2007) DNA evidence for global  
dispersal and probable endemism of protozoa. *BMC Evol Biol* **7**, 162.
- Beijerinck MW (1913) *De infusies en de ontdekking der bacterien* Jaarboek van de  
Koninklijke Akademie van Wetenschappen.

- 565 Bissett A, Richardson AE, Baker G, Wakelin S, Thrall PH (2010) Life history determines biogeographical patterns of soil bacterial communities over multiple spatial scales. *Molecular Ecology* **19**, 4315-4327.
- Bray JR, Curtis JT (1957) An ordination of upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs* **27**, 325-349.
- 570 Brodie EL, DeSantis TZ, Parker JP, *et al.* (2007) Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 299-304.
- Bubrick P, Galun M, Frensdorff A (1984) Observations on free-living *Trebouxia* Depuymaly and *Pseudotrebouxia* Archibald, and evidence that both symbionts from *Xanthoria parietina* (L) th fr can be found free-living in nature. *New Phytologist* **97**, 455-462.
- 575 Caron DA (2009) Past President's address: protistan biogeography: why all the fuss? *J Eukaryot Microbiol* **56**, 105-112.
- Cermeno P, Falkowski PG (2009) Controls on diatom biogeography in the ocean. *Science* **325**, 1539-1541.
- 580 Chanal A, Chapon V, Benzerara K, *et al.* (2006) The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environ Microbiol* **8**, 514-525.
- Chu H, Fierer N, Lauber CL, *et al.* (2010) Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environ Microbiol* **12**, 2998-3006.
- 585 Daly MJ (2009) A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat Rev Microbiol* **7**, 237-245.
- de la Torre JR, Goebel BM, Friedmann EI, Pace NR (2003) Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3858-3867.
- 590 de Wit R, Bouvier T (2006) 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environ Microbiol* **8**, 755-758.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**, 1792-1797.
- Edwards C, Lawton LA (2009) Bioremediation of cyanotoxins. *Adv Appl Microbiol* **67**, 109-129.
- 595 Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6266-6231.
- Finlay BJ (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* **296**, 1061-1063.
- 600 Finlay BJ, Fenchel T (2004) Cosmopolitan metapopulations of free-living microbial eukaryotes. *Protist* **155**, 237-244.
- Foissner W (2006) Biogeography and dispersal of micro-organisms: A review emphasizing protists. *Acta Protozool* **45**, 111-136.
- Fraser C, Alm EJ, Polz MF, Spratt BG, Hanage WP (2009) The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science* **323**, 741-746.



- 605 Garvie LA, Knauth LP, Bungartz F, Klonowski S, Nash TH, 3rd (2008) Life in extreme environments: survival strategy of the endolithic desert lichen *Verrucaria rubrocincta*. *Naturwissenschaften* **95**, 705-712.
- Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**, 237-264.
- 610 Gorbushina AA, Broughton WJ (2009) Microbiology of the atmosphere-rock interface: how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem. *Annu Rev Microbiol* **63**, 431-450.
- Green J, Bohannan BJ (2006) Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends Ecol Evol* **21**, 501-507.
- 615 Green JL, Bohannan BJ, Whitaker RJ (2008) Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science* **320**, 1039-1043.
- Green JL, Holmes AJ, Westoby M, *et al.* (2004) Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature* **432**, 747-750.
- Horner-Devine MC, Lage M, Hughes JB, Bohannan BJ (2004) A taxa-area relationship for  
620 bacteria. *Nature* **432**, 750-753.
- Jaccard P (1901) Distribution de la flore alpine dans le bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* **37**, 241-272.
- Jobb G, von Haeseler A, Strimmer K (2004) TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol Biol* **4**, 18.
- 625 Karsten U, Friedl T, Schumann R, Hoyer K, Lembcke S (2005) Mycosporine-like amino acids and phylogenies in green algae: *Prasiola* and its relatives from the Trebouxiophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **41**, 557-566.
- Karsten U, Lembcke S, Schumann R (2007) The effects of ultraviolet radiation on photosynthetic performance, growth and sunscreen compounds in aeroterrestrial biofilm  
630 algae isolated from building facades. *Planta* **225**, 991-1000.
- Kloesges T, Popa O, Martin W, Dagan T (2011) Networks of gene sharing among 329 proteobacterial genomes reveal differences in lateral gene transfer frequency at different phylogenetic depths. *Mol Biol Evol* **28**, 1057-1074.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- 635 Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical ecology*, 2nd English edition edn. Elsevier Science BV, Amsterdam.
- Lindström ES, Langenheder S (2011) Local and regional factors influencing bacterial community assembly. *Environmental Microbiology Reports*, no-no.
- 640 Locey KJ (2010) Synthesizing traditional biogeography with microbial ecology: the importance of dormancy. *Journal of Biogeography* **37**, 1835-1841.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2002) *Brock Biology of Microorganisms*, 10th edition, 10th edn. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
- 645 Martiny JB, Bohannan BJ, Brown JH, *et al.* (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat Rev Microbiol* **4**, 102-112.

- Martiny JB, Eisen JA, Penn K, Allison SD, Horner-Devine MC (2011) Drivers of bacterial {beta}-diversity depend on spatial scale. *Proc Natl Acad Sci U S A* **Apr 25**. [Epub ahead of print].
- 650 Mobjerg N, Halberg KA, Jorgensen A, *et al.* (2011) Survival in extreme environments - on the current knowledge of adaptations in tardigrades. *Acta Physiol* **202**, 409-420.
- Nagy ML, Perez A, Garcia-Pichel F (2005) The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert (Organ Pipe Cactus National Monument, AZ). *FEMS Microbiol Ecol* **54**, 233-245.
- 655 Nascimbene J, Thus H, Marini L, Nimis PL (2009) Early colonization of stone by freshwater lichens of restored habitats: a case study in northern Italy. *Sci Total Environ* **407**, 5001-5006.
- Nemergut DR, Anderson SP, Cleveland CC, *et al.* (2007) Microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil. *Microb Ecol* **53**, 110-122.
- 660 Nolte V, Pandey RV, Jost S, *et al.* (2010) Contrasting seasonal niche separation between rare and abundant taxa conceals the extent of protist diversity. *Mol Ecol* **19**, 2908-2915.
- O'Malley MA (2007) The nineteenth century roots of 'everything is everywhere'. *Nat Rev Microbiol* **5**, 647-651.
- Oksanen J, Blanchet G, Kindt R, *et al.* (2011) Vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17-9. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- 665 Osman S, La Duc MT, Dekas A, Newcombe D, Venkateswaran K (2008) Microbial burden and diversity of commercial airline cabin air during short and long durations of travel. *Isme J* **2**, 482-497.
- Parnell JJ, Rompato G, Latta LC, *et al.* (2010) Functional biogeography as evidence of gene transfer in hypersaline microbial communities. *PLoS ONE* **5**, e12919.
- 670 Pedros-Alio C (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol* **14**, 257-263.
- Philippe H (1993) MUST, a computer package of Management Utilities for Sequences and Trees. *Nucleic Acids Res* **21**, 5264-5272.
- 675 Pommier T, CanbÄCk B, Riemann L, *et al.* (2007) Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Molecular Ecology* **16**, 867-880.
- Quaiser A, Ochsenreiter T, Lanz C, *et al.* (2003) Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Mol Microbiol* **50**, 563-575.
- 680 R Development Core Team (2011) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ragon M, Restoux G, Moreira D, Moller AP, Lopez-Garcia P (2011) Sunlight-exposed biofilm microbial communities are naturally resistant to Chernobyl ionizing-radiation levels. *PLoS ONE* **6**, e21764.
- 685 Rainey FA, Ray K, Ferreira M, *et al.* (2005) Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5225-5235.

- Ramette A, Tiedje JM (2007) Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microb Ecol* **53**, 197-207.
- 690 Reno ML, Held NL, Fields CJ, Burke PV, Whitaker RJ (2009) Biogeography of the *Sulfolobus islandicus* pan-genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8605-8610.
- Rintala H, Pitkaranta M, Toivola M, Paulin L, Nevalainen A (2008) Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment. *BMC Microbiol* **8**, 56.
- Rossello-Mora R, Lucio M, Pena A, *et al.* (2008) Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Isme J* **2**, 242-253.
- 695 Schauer R, Bienhold C, Ramette A, Harder J (2010) Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. *Isme J* **4**, 159-170.
- Schloss PD, Handelsman J (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1501-1506.
- 700 Sørensen T (1957) A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *Biologiske Skrifter / Kongelige Danske Videnskabernes Selskab* **5**, 1-34.
- Staley JT (2006) The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1899-1909.
- 705 Staley JT, Gosink JJ (1999) Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annu Rev Microbiol* **53**, 189-215.
- Stolz A (2009) Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**, 793-811.
- 710 Suzuki K, Collins MD, Iijima E, Komagata K (1988) Chemotaxonomic characterization of a radiotolerant bacterium, *Arthrobacter radiotolerans* – description of *Rubrobacter radiotolerans* gen. nov., comb. nov. *FEMS Microbiol Lett* **52**, 33-39.
- van Niel CB (1949) The ‘Delft School’ and the rise of general microbiology. *Bacteriol Rev*, 161-174.
- 715 Vyverman W, Verleyen E, Sabbe K, *et al.* (2007) Historical processes constrain patterns in global diatom diversity. *Ecology* **88**, 1924-1931.
- Whitaker RJ (2006) Allopatric origins of microbial species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1975-1984.
- Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW (2003) Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* **301**, 976-978.
- 720 Zimmermann J, Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C (2006) Epilithic biofilms in Saint Callixtus Catacombs (Rome) harbour a broad spectrum of Acidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**, 203-208.

725

## Figure legends

**Figure 1.** Taxonomic distribution of bacterial and eukaryotic SSU rDNA sequences from phototrophic biofilms growing on mineral substrates in different geographic locations in Northern Ireland and France.

**Figure 2.** Cluster analysis of DGGE fingerprints for bacteria and eukaryotes. Numbered bands were cut and the DNA sequenced (see Table S1).

**Figure 3.** Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences belonging to the *Thermus/Deinococcus* group and the Cyanobacteria. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 664 non-ambiguously aligned positions. Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilms samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.

**Figure 4.** Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences belonging to the Actinobacteria. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 759 non-ambiguously aligned positions. Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilms samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.

**Figure 5.** Phylogenetic tree of fungal SSU rDNA sequences from sunlight-exposed biofilms growing on mineral substrates. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 1403 non-ambiguously aligned positions and rooted with four chytrid sequences. Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilms samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.

**Figure 6.** Phylogenetic tree of non-fungal eukaryotic SSU rDNA sequences identified in epilithic biofilms. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 1287 non-ambiguously aligned positions. Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored

760 circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilms samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.

**Figure 7.** Unconstrained ordination analyses (NMDS) describing the major compositional variation in bacterial and microbial eukaryote communities among samples. Samples are in black and OTUs in red. When many OTU labels overlap, a “+” symbol was used, indicating an area of high OTU density.

**Figure 8.** Constrained correspondence analysis (CCA) describing the variation in bacterial and eukaryote community explained by environmental and geographic descriptors. CM, Charente Maritime; Subst., substrate

**Figure 9.** Distance-decay curves for bacteria and microbial eukaryotes in biofilm communities. The Sorensen’s index is plotted as a function of the geographic distance between samples.

**Table 1.** Samples used in this study and details about their associated bacterial and eukaryotic diversity estimates. n.d., not determined.

Sample Name	Geographic origin	Type of substrate	Coordinates	Bacteria						Eukaryotes					
				No. SSU rDNA sequences analyzed	No. of OTUs	Simpson	Shannon	Chao1	% Coverage	No. SSU rDNA sequences analyzed	No. of OTUs	Simpson	Shannon	Chao1	% Coverage
<b>A3.1</b>	Lyon, France	mineral composite	46°12'09.44"N 5°11'23.33"E	201	47	0.06	3.2	128.2	91	65	10	0.33	1.37	12	90.8
<b>A3.3</b>	Lyon, France	mineral composite	46°12'09.44"N 5°11'23.33"E	172	47	0.10	2.9	68.1	87.2	68	16	0.14	2.28	40.5	90.9
<b>A2.1a</b>	Charente-maritime, France	mineral composite	45°56'38.01"N 1°18'24.33"W	186	31	0.10	2.9	83	94.6	50	12	0.29	1.7	22.3	90
<b>A2.3</b>	Charente-maritime, France	mineral composite	46°01'57.48"N 1°22'44.50"W	58	8	0.32	1.3	6.5	100	47	5	0.54	1.04	18	95.7
<b>A2.4b</b>	Charente-maritime, France	mineral composite	46°09'28.59"N 1°09'13.94"W	254	40	0.13	3.1	135.9	94.1	46	8	0.13	2.09	12	97.8
<b>RP2.6</b>	Port Cergy, Paris region, France	mineral composite	49°2.368"N 2°3.666"E	185	29	0.27	2.1	54.6	93.5	185	30	0.32	1.97	91.75	94.05
<b>B1.3</b>	Ballyclare, Northern Ireland	mineral composite	54° 45.112'N 6° 0.156'W	84	9	0.41	1.18	14	97.6	114	19	0.13	2.5	51	94.7
<b>B1.4</b>	Ballyclare, Northern Ireland	limestone	54° 45.112'N 6° 0.156'W	121	33	0.058	3.1	89.5	93.4	128	28	0.2	2.4	48.1	94.5
<b>B1.6</b>	Ballyclare, Northern Ireland	concrete	54° 45.112'N 6° 0.156'W	112	20	0.10	2.6	33	95.5	126	15	0.4	1.34	82	92.8
<b>B1.7</b>	Ballyclare, Northern Ireland	granite	54° 45.112'N 6° 0.156'W	126	23	0.092	3.1	84.6	94.4	127	18	0.28	1.8	57	94.5

**Table 2.** Computational procedure for the partitioning model using constrained correspondence analyses.

780

Active components	Bacteria			Eukaryotes		
	$\chi^2$	%	<i>P</i>	$\chi^2$	%	<i>P</i>
Inertia	5.142			4.693		
0 PC1 & PC2 & PC3 & Substrate & Location	4.770	0.93	<b>0.024*</b>	4.320	0.92	<b>0.023*</b>
1 Substrate	1.968	0.38	<b>0.034*</b>	1.617	0.34	0.258
2 Location	1.719	0.33	0.470	1.823	0.39	<b>0.008**</b>
3 PC1	0.691	0.13	<b>0.009**</b>	0.662	0.14	<b>0.033*</b>
4 PC2	0.528	0.10	0.805	0.620	0.13	0.087
5 PC3	0.501	0.10	0.819	0.542	0.12	0.354
6 PC1 & PC2 & PC3	1.720	0.33	0.412	1.824	0.39	<b>0.007**</b>
7 PC1 & PC2 & PC3 & Substrate	3.641	0.71	<b>0.033*</b>	3.380	0.72	<b>0.003**</b>
8 PC1 & PC2 & PC3 & Location	2.848	0.55	0.505	2.764	0.59	<b>0.039*</b>
9 Substrate & Location	3.641	0.71	<b>0.034*</b>	3.380	0.72	<b>0.005**</b>

% refers to the proportion of inertia explained by the model. The significance of each step (*P*-value) was tested using  $10^5$  permutations.

785

790

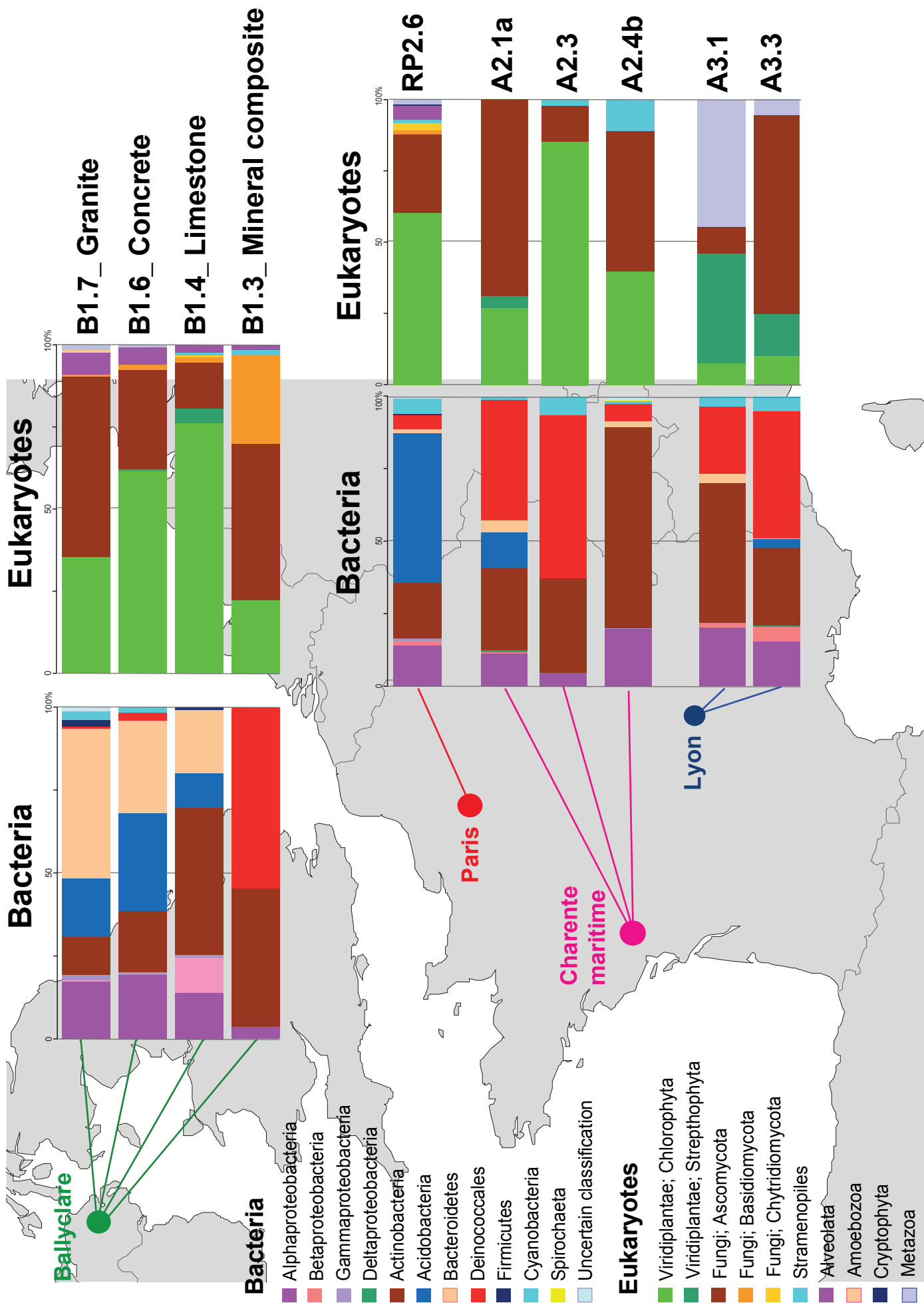
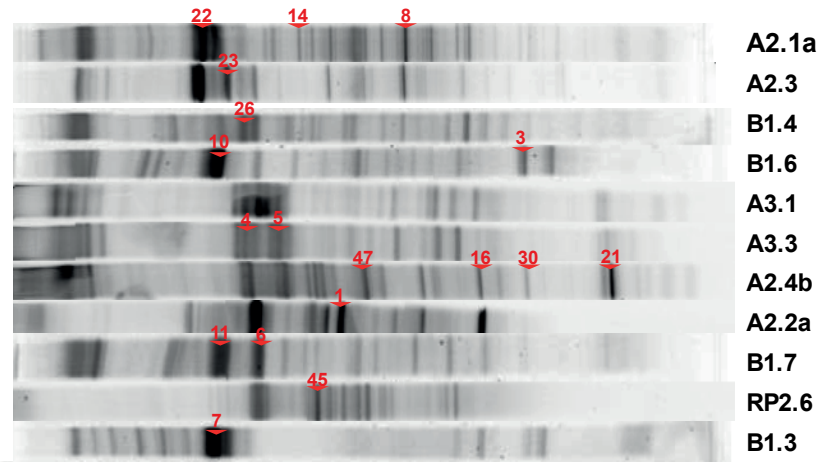
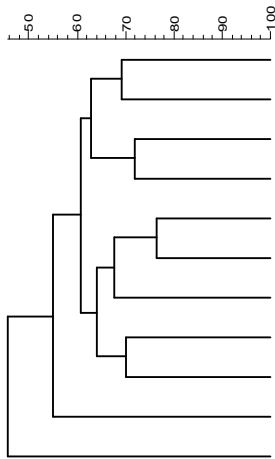


Figure 1. Ragon et al.



## Bacteria



## Eukaryotes

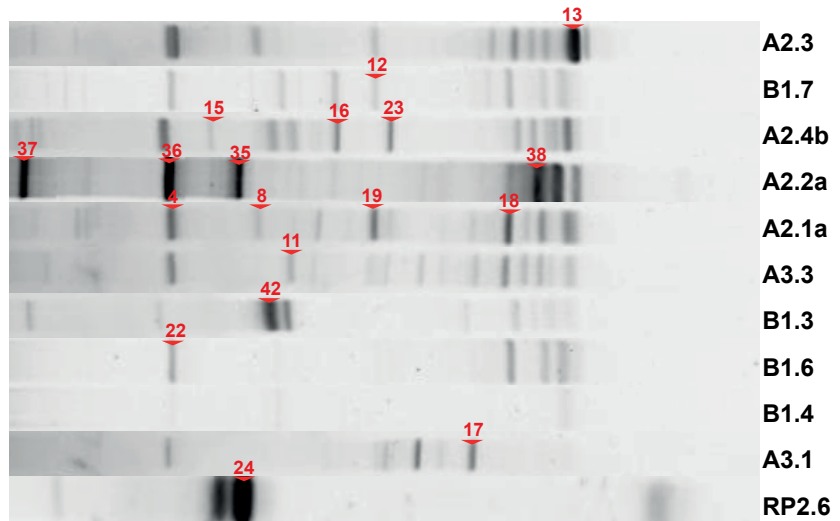
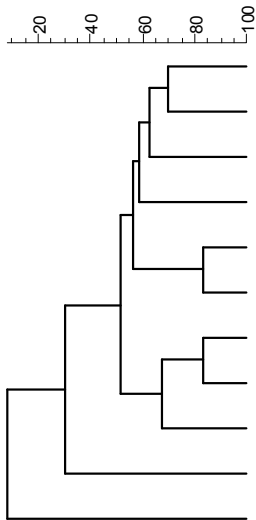


Figure 2. Ragon et al.

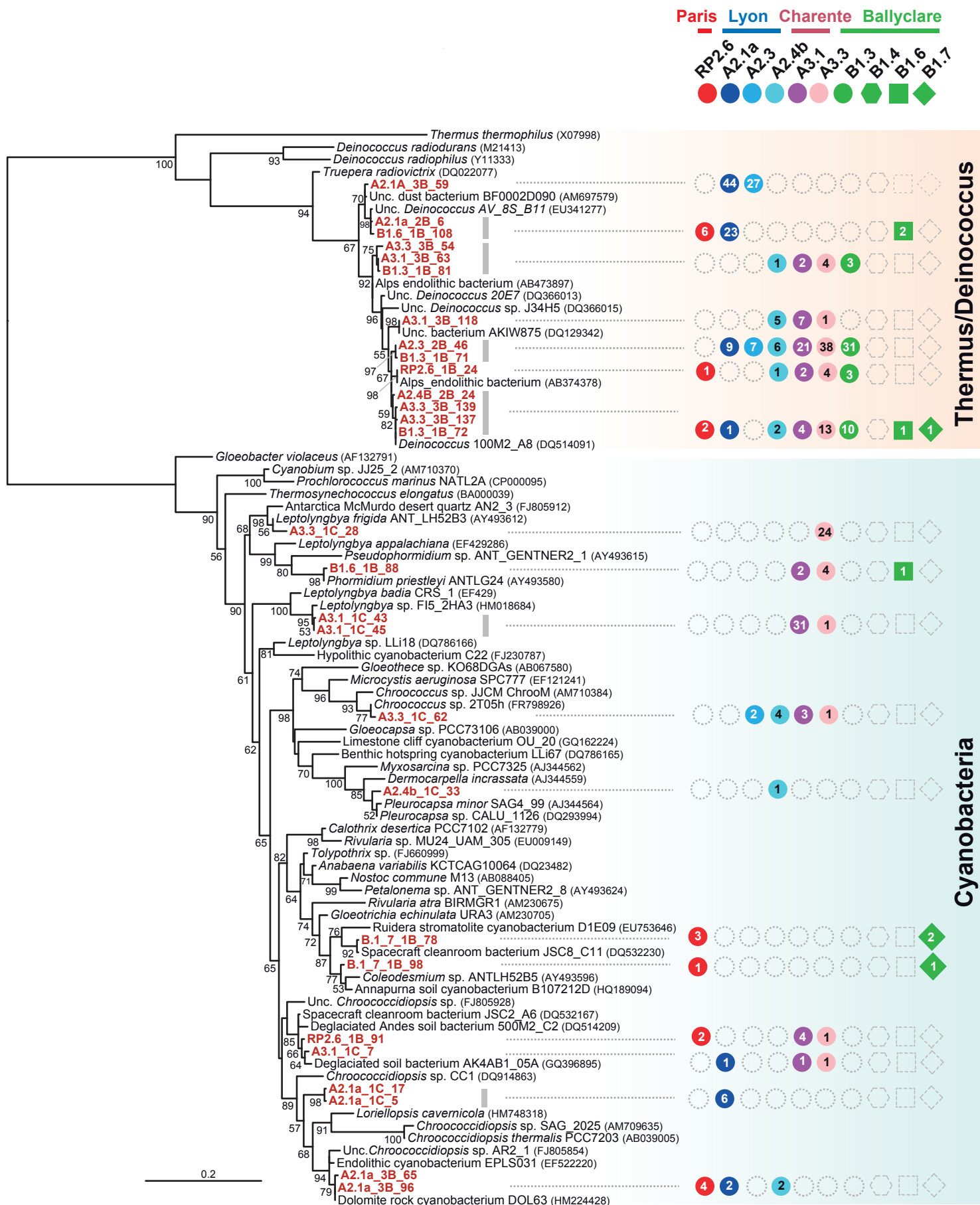


Figure 3. Ragon et al.

Paris Lyon Charente Ballyclare

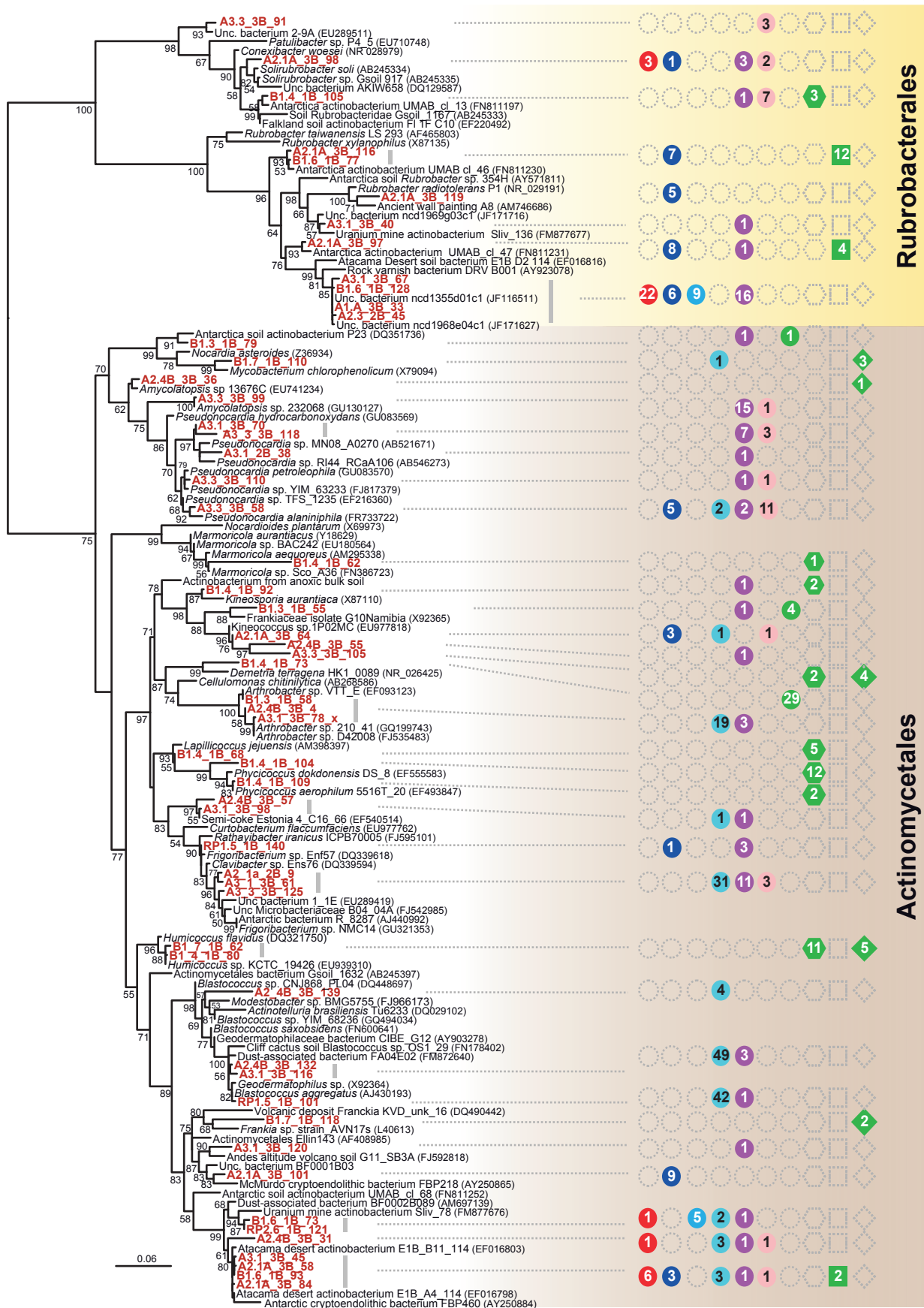


Figure 4. Ragon et al.



Figure 5. Ragon et al.

Paris Lyon Charente Ballyclare

RP2.6 A2.1a A2.3 A2.4b A3.1 A3.3 B1.3 B1.4 B1.6 B1.7

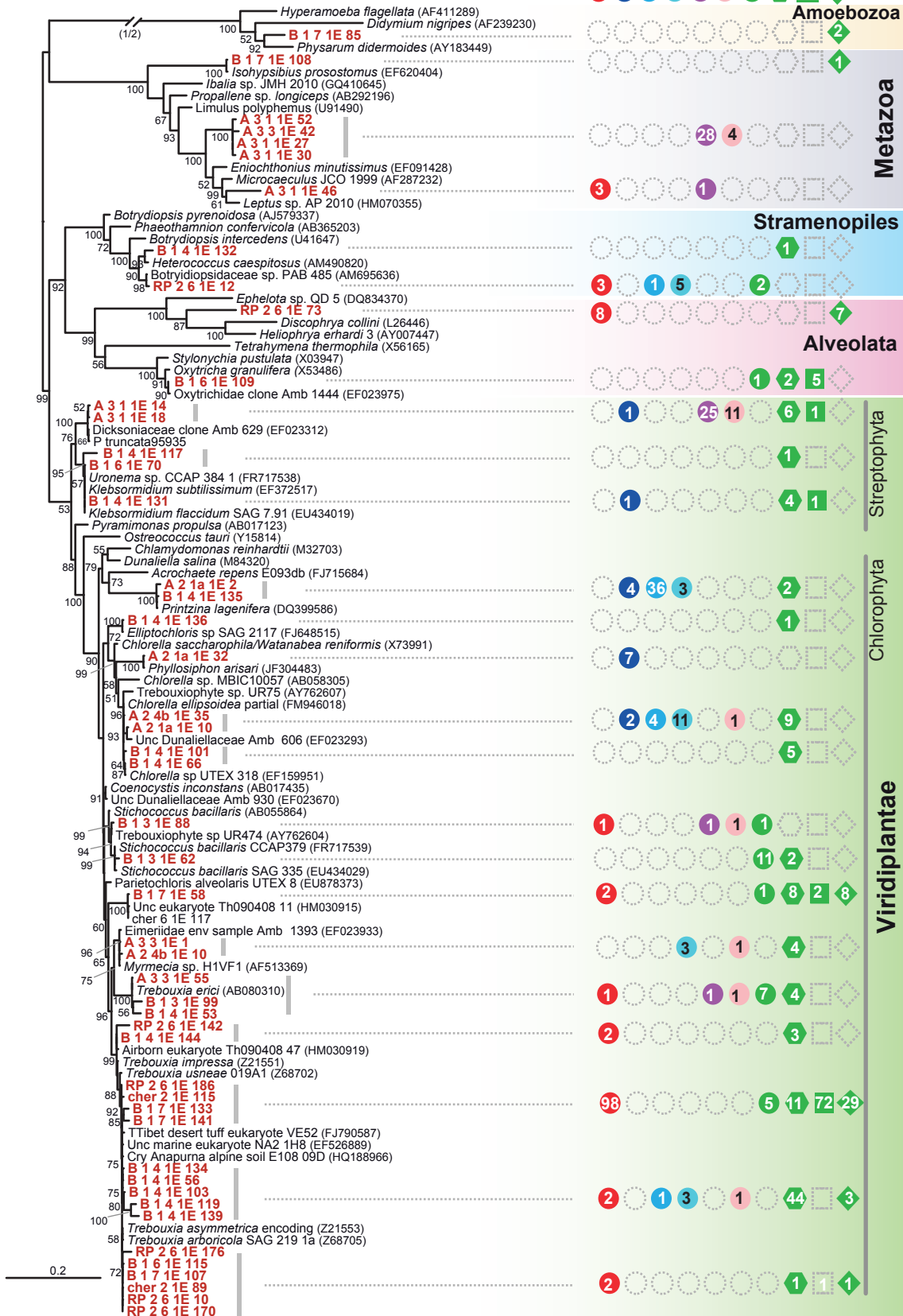
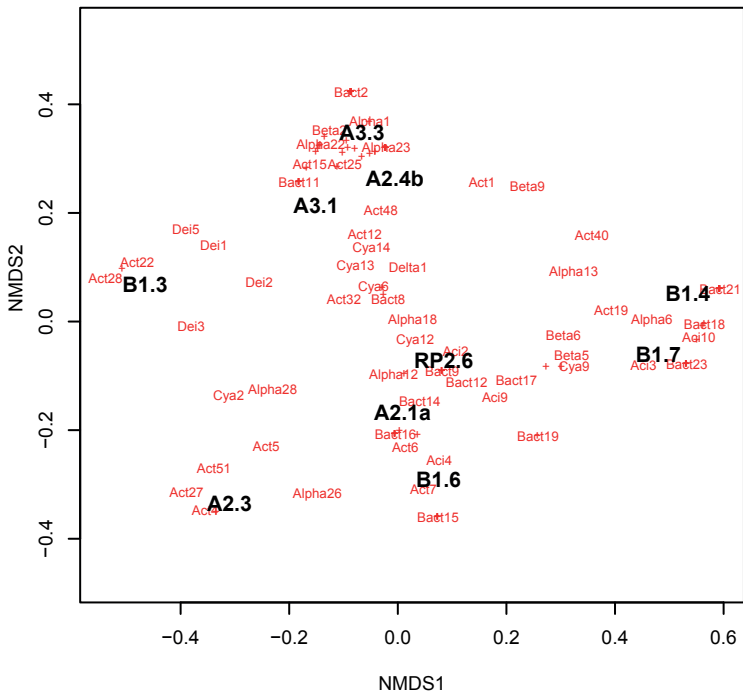


Figure 6. Ragon et al.

# Bacteria



# Eukaryotes

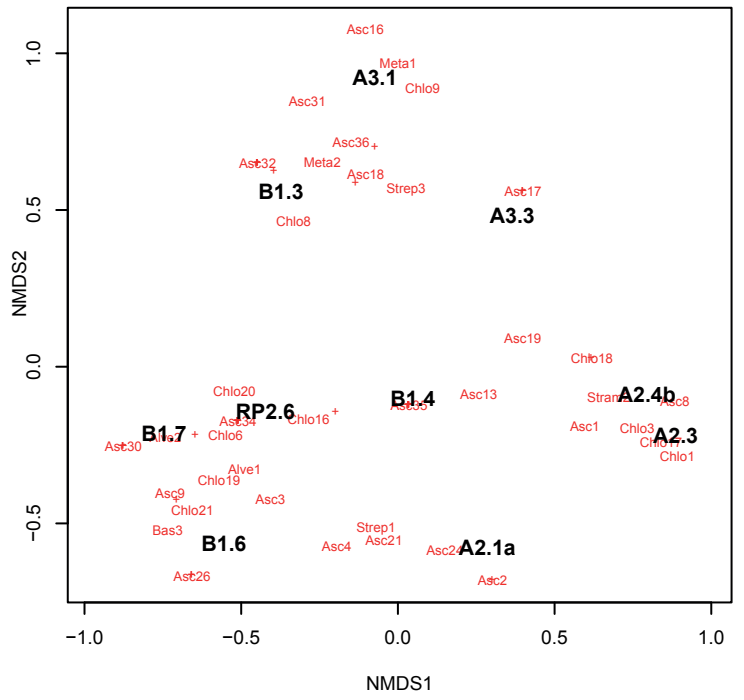
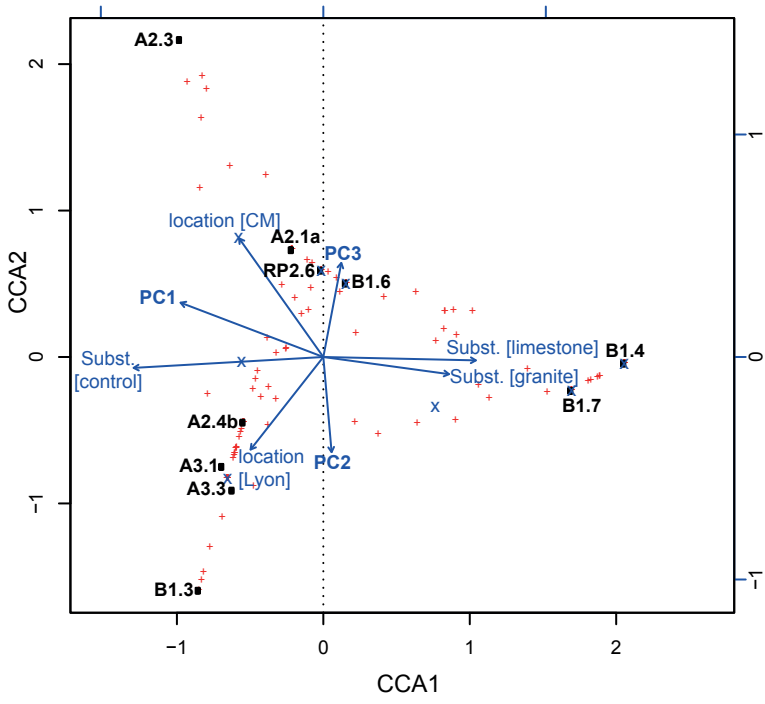


Figure 7. Ragon et al.

### Bacteria



### Eukaryotes

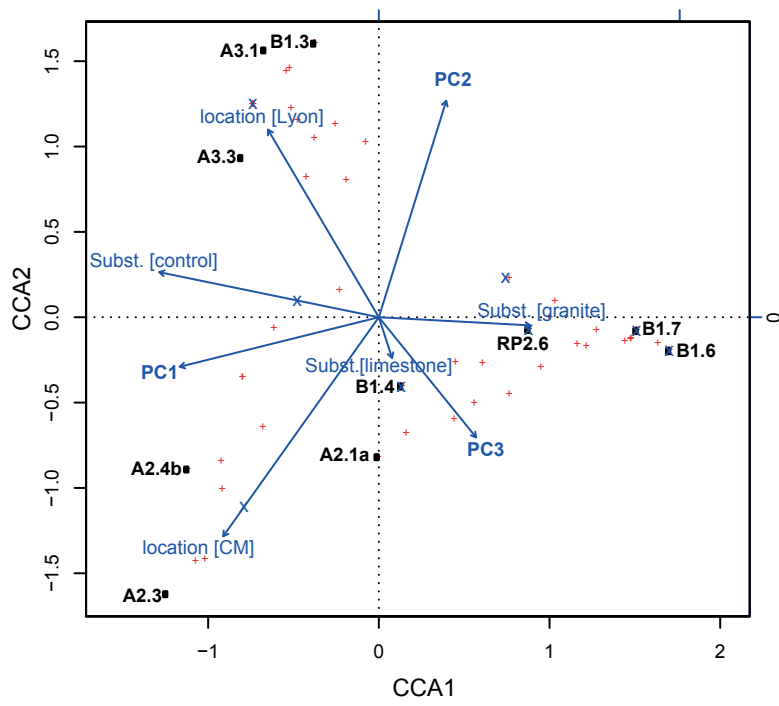


Figure 8. Ragon et al.

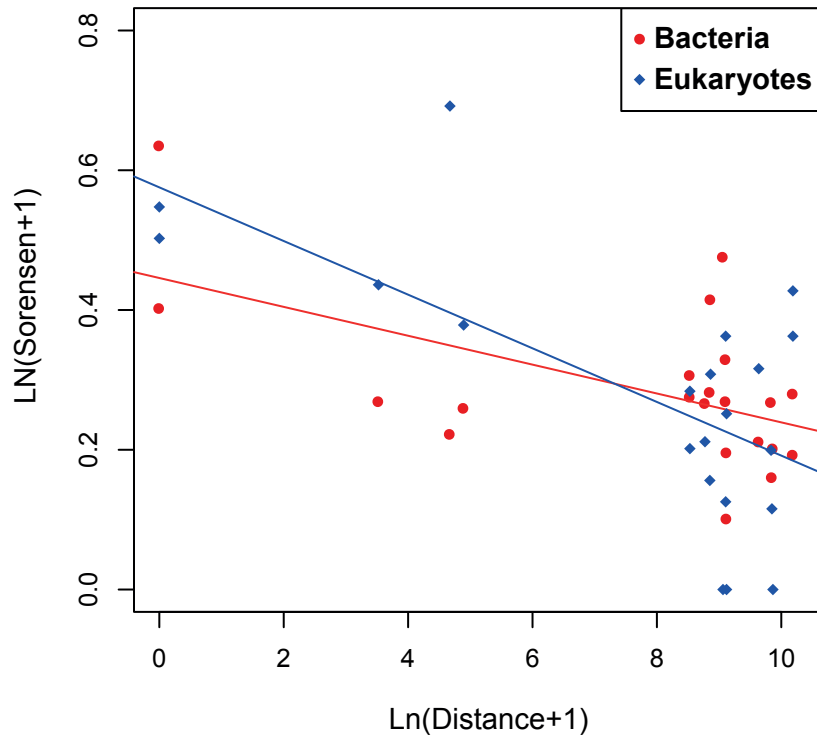


Figure 9. Ragon et al.



## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### **Prokaryotes and microbial eukaryotes display differential biogeography patterns**

*M. Ragon, M. Fontaine, D. Moreira and P. López-García*

#### **Supplementary tables**

Table S1

Table S2

Table S3

#### **Supplementary figures**

Figure S1

Figure S2

Figure S3

Figure S4

Figure S5

Figure S6

## Supplementary tables

**Table S1.** Taxonomic correspondence of intense DGGE bands cut from gels and closest hits in gene libraries. The bands are labeled in Figure S3.

<b>Bands</b>	<b>First Hit</b>	<b>% identity</b>	<b>Taxonomic affiliation</b>
<b>Bacteria</b>			
1	A3.3-3B-117	93	Alphaproteobacteria; Caulobacteriales
3	B1_4_1B 71	96	Alphaproteobacteria
4	B1_7_1B 78	87	Cyanobacteria; Nostocales
5	B1.7-1B-98	89	Cyanobacteria; Nostocales
6	B1.7-1B-98	91	Cyanobacteria; Nostocales
7	B1_7_1B 78	89	Cyanobacteria; Nostocales
8	A3.1-3B-118	98	Deinococcales
9	A2.1a-3B-96	90	Cyanobacteria; Pleurocapsales
10	B1_7_1B 78	87	Cyanobacteria; Nostocales
11	B1_7_1B 78	88	Cyanobacteria; Nostocales
13	A2_1a_2B 15	88	Bacteroidetes
14	A2_1a_2B 15	94	Bacteroidetes
16	B1.3-1B-52	94	Actinobacteria
17	A2.1a-3B-97	95	Actinobacteria
18	B1_4_1B 107	94	Alphaproteobacteria
19	B1.3-1B-50	95	Alphaproteobacteria
21	B1.3-1B-55	96	Actinobacteria
22	A3.1-2B-26	89	Cyanobacteria
23	B1.7-1B-98	88	Cyanobacteria; Nostocales
26	B1.4-1B-113	92	Bacteroidetes
28	A3.1-2B-26	90	Cyanobacteria
29	A3.1-2B-26	88	Cyanobacteria
30	B1.6-1B-126	100	Bacteroidetes; Sphingobacteria
31	B1.4-1B-103	92	Bacteroidetes
32	A2.1a-3B-100	97	Actinobacteria
33	B1.6-1B-128	97	Actinobacteria
36	B1.7-1B-74	94	Alphaproteobacteria
38	B1.7-1B-104	94	Bacteroidetes; Sphingobacteria
40	B1.4-1B-113	97	Bacteroidetes
43	B1.4-1B-126	91	Alphaproteobacteria; Rhizobiales
45	B1.7-1B-98	87	Cyanobacteria; Nostocales
47	B1.4-1B-103	100	Bacteroidetes
48	B1.7-1B-98	88	Cyanobacteria; Nostocales
49	B1.3-1B-58	94	Actinobacteria
<b>Eukaryotes</b>			
1	B1.6-1E-143	74	Fungi; Ascomycota
8	RP2_6_1E 10	97	Viridiplantae; Chlorophyta
14	RP2_6_1E 10	87	Viridiplantae; Chlorophyta
23	RP2_6_1E 10	96	Viridiplantae; Chlorophyta
35	RP2_6_1E 10	93	Viridiplantae; Chlorophyta
36	RP2_6_1E 142	97	Viridiplantae; Chlorophyta
37	RP2_6_1E 142	93	Viridiplantae; Chlorophyta
42	B1.3-1E-67	86	Fungi; Basidiomycota

**Table S2.** Relationship between the NMDS and the environmental descriptors.

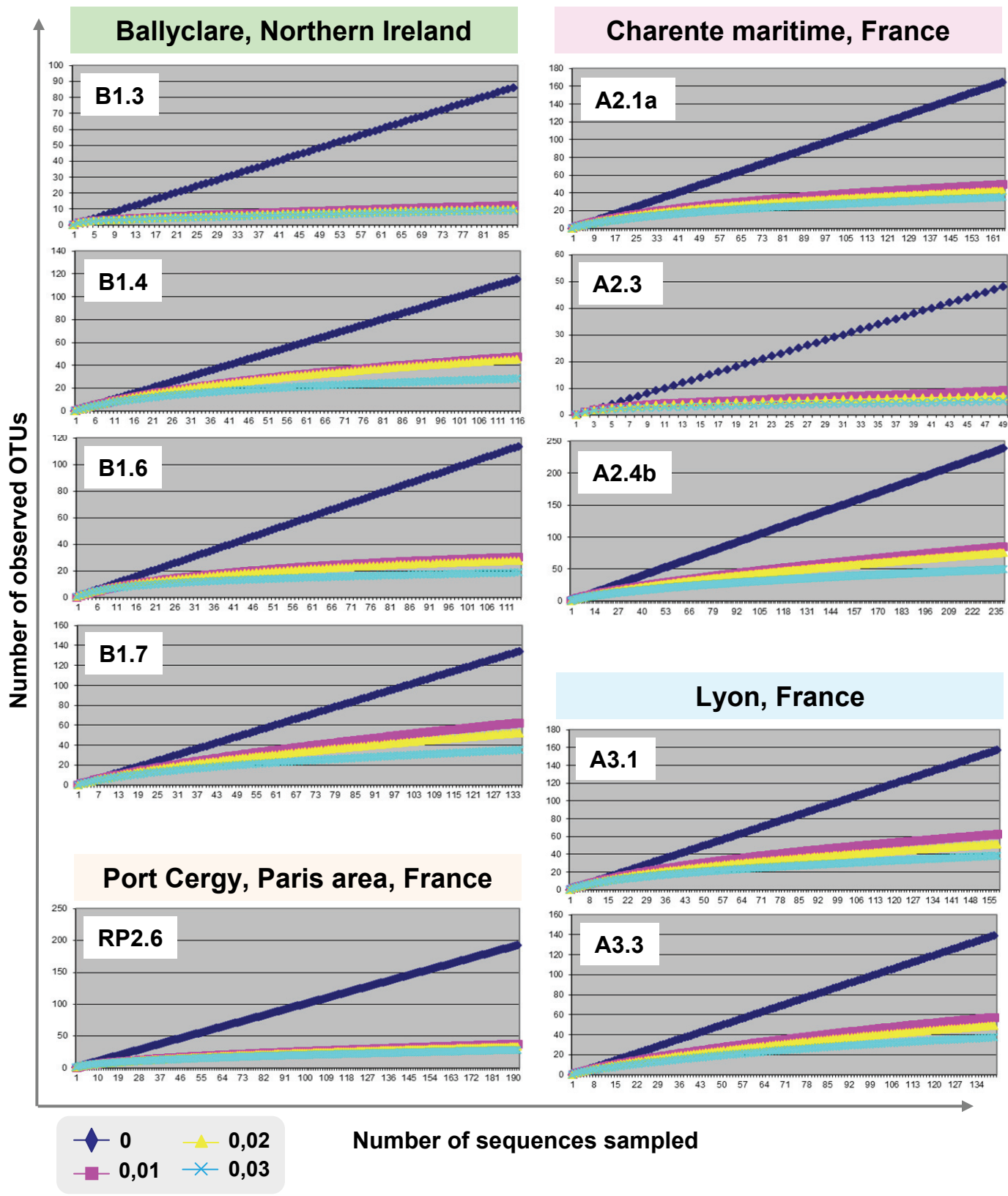
	Bacteria		Eukaryotes	
	R2	P	R2	p
PC1	0.24	0.352	0.53	0.080 <sup>¶</sup>
PC2	0.18	0.489	0.58	0.054 <sup>¶</sup>
PC3	0.18	0.547	0.24	0.372
Substrate	0.55	0.022*	0.33	0.470
Location	0.26	0.654	0.69	0.007**

<sup>¶</sup> p<0.1; \* p<0.05, \*\* p < 0.01

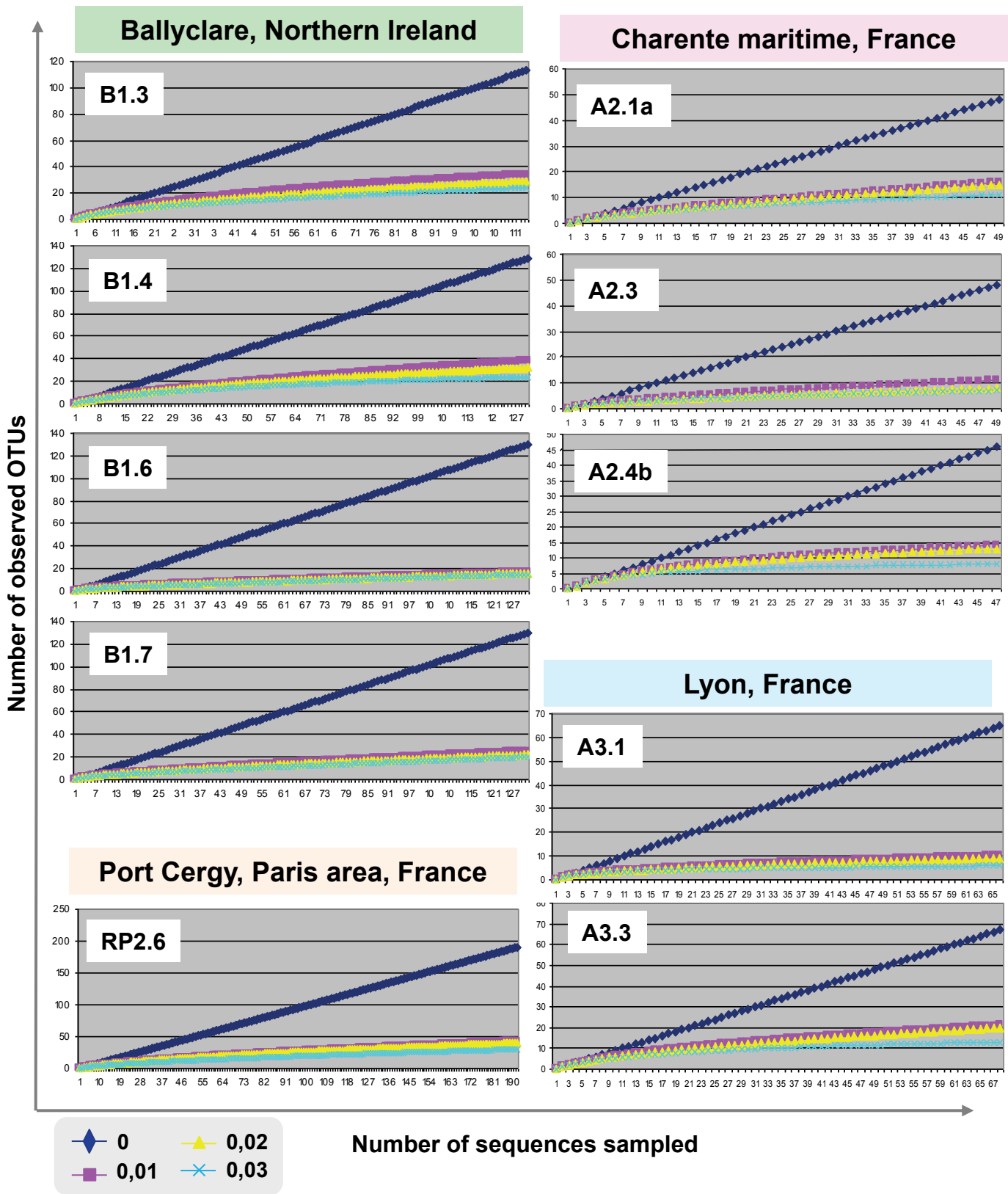
**Table S3.** Computational procedure for the partitioning model using constrained correspondence analyses with covariables. Substr., substrate; Loc., location.

Active components	Covariables	Bacteria			Eukaryotes		
		$\chi^2$	%	P	$\chi^2$	%	P
Inertia		5.142			4.693		
0	PC1 & PC2 & PC3 & Substr. & Loc.	4.770	0.93	<b>0.024*</b>	4.320	0.92	<b>0.023*</b>
1	Substr.	1.968	0.38	<b>0.034*</b>	1.617	0.34	0.258
2	Loc.	1.719	0.33	0.470	1.823	0.39	<b>0.008**</b>
3	PC1	0.691	0.13	<b>0.009**</b>	0.662	0.14	<b>0.033*</b>
4	PC2	0.528	0.10	0.805	0.620	0.13	0.087
5	PC3	0.501	0.10	0.819	0.542	0.12	0.354
6	PC1 & PC2 & PC3	1.720	0.33	0.412	1.824	0.39	<b>0.007**</b>
7	PC1 & PC2 & PC3 & Substr.	3.641	0.71	<b>0.033*</b>	3.380	0.72	<b>0.003**</b>
8	PC1 & PC2 & PC3 & Loc.	2.848	0.55	0.505	2.764	0.59	<b>0.039*</b>
9	Substr. & Loc.	3.641	0.71	<b>0.034*</b>	3.380	0.72	<b>0.005**</b>
10	Substr.	1.922	0.37	0.275	1.557	0.33	0.334
11	Substr.	1.900	0.37	<b>0.013*</b>	1.529	0.33	0.445
12	Substr.	1.922	0.37	0.297	1.557	0.33	0.323
13	Substr.	1.922	0.37	0.277	1.557	0.33	0.340
14	Substr.	1.922	0.37	0.315	1.557	0.33	0.398
15	Loc.	1.673	0.33	0.419	1.763	0.38	0.278
16	Loc.	1.583	0.31	0.750	1.683	0.36	0.079
17	Loc.	1.604	0.31	0.398	1.711	0.36	0.251
18	Loc.	1.129	0.22	0.518	0.940	0.53	0.527
19	Loc.	1.129	0.22	0.383	0.940	0.20	0.441
20	PC1	0.623	0.12	0.539	0.574	0.12	0.599
21	PC1	0.554	0.11	0.496	0.522	0.11	0.366
22	PC1	0.554	0.11	0.387	0.522	0.11	0.357
23	PC1 & PC2 & PC3 & Loc.	2.802	0.54	0.324	2.703	0.58	0.382
24	PC1 & PC2 & PC3 & Substr.	3.507	0.68	0.179	2.497	0.53	0.269
Residual -	-	0.372	0.07	-	0.373	0.08	-

\* p<0.05, \*\* p < 0.01; % refers to the proportion of inertia explained by the model, The significance of each step (P-value) was tested using 10<sup>5</sup> permutations.

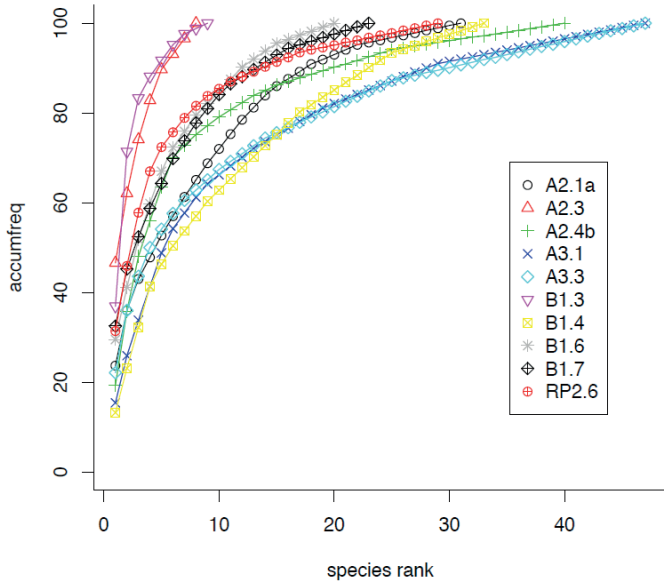


**Figure S1.** Accumulation curves for bacterial SSU rDNA sequences in biofilms from different geographic areas. The accumulation curves have been done at different SSU rDNA similarity cut-off values.

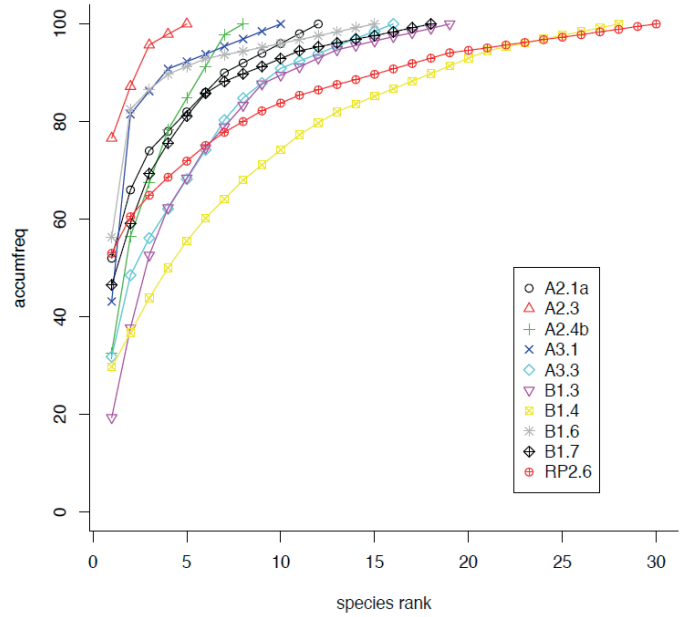


**Figure S2.** Accumulation curves for eukaryotic SSU rDNA sequences in biofilms from different geographic areas. The accumulation curves have been done at different SSU rDNA similarity cut-off values.

## Bacteria



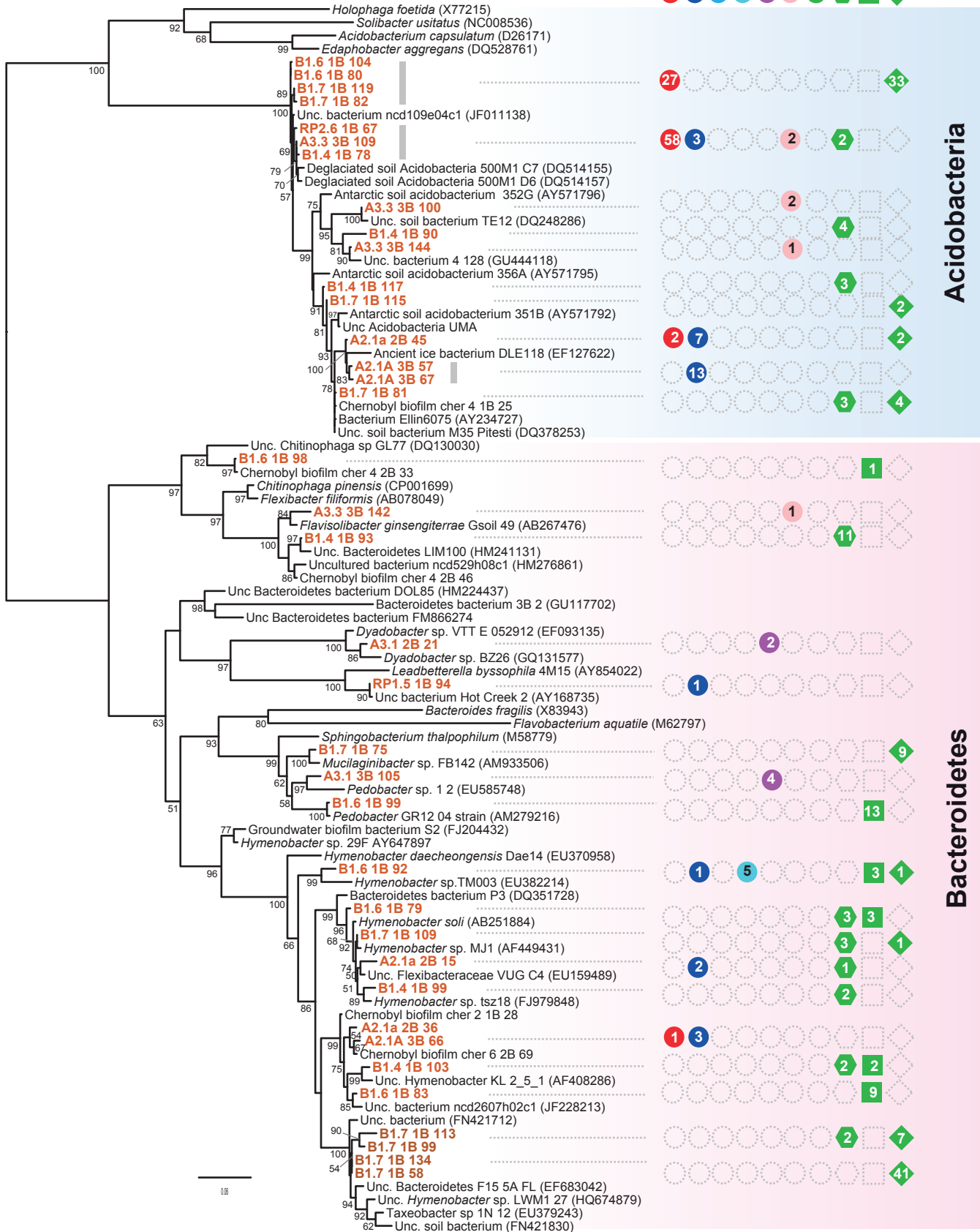
## Eukaryotes



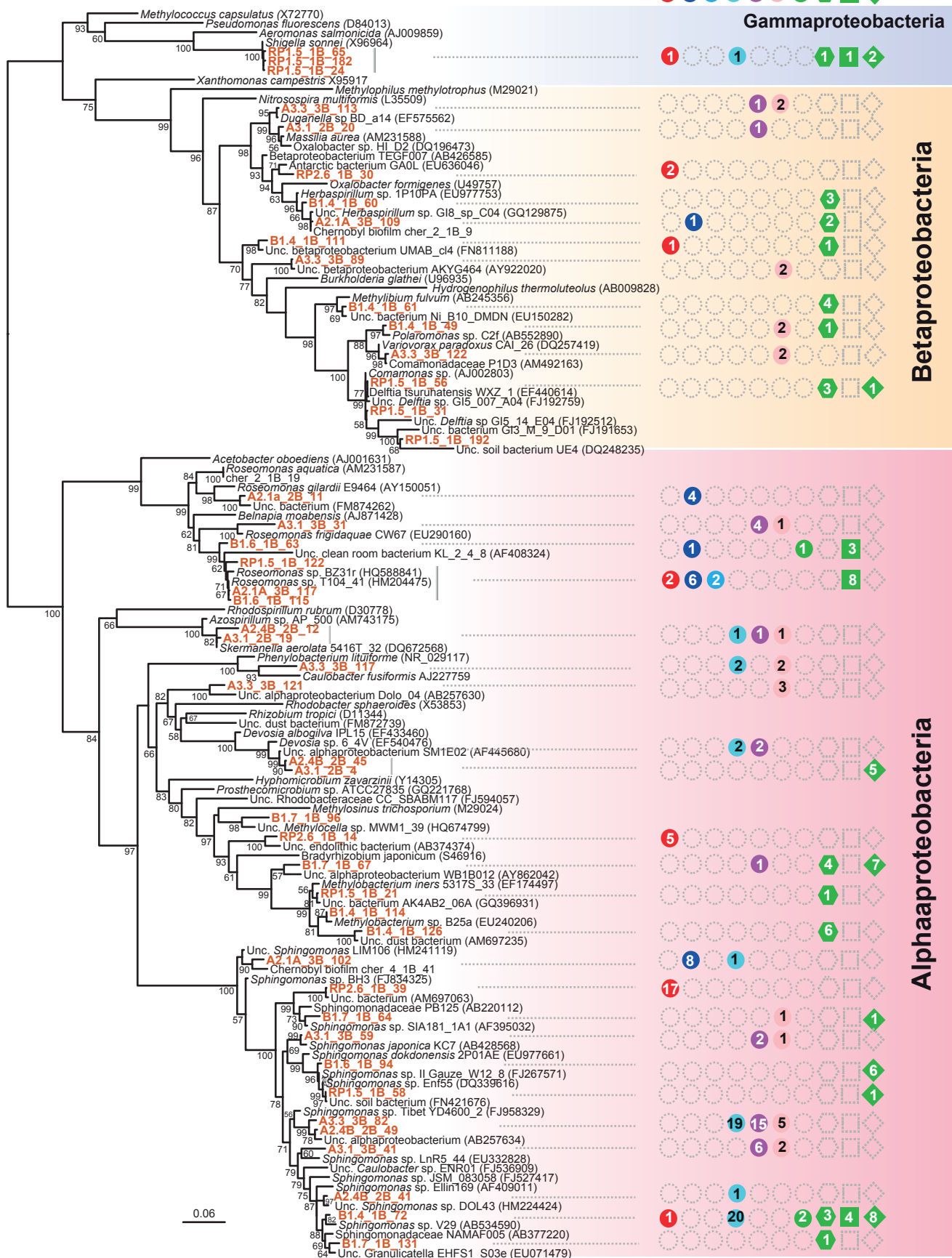
**Figure S3.** Species (OTU) rank–abundance distributions expressed as the cumulative frequencies.

Paris Lyon Charente Ballyclare

RP2.6 A2.1a A2.3 A2.4b A3.1 A3.3 B1.3 B1.4 B1.6 B1.7

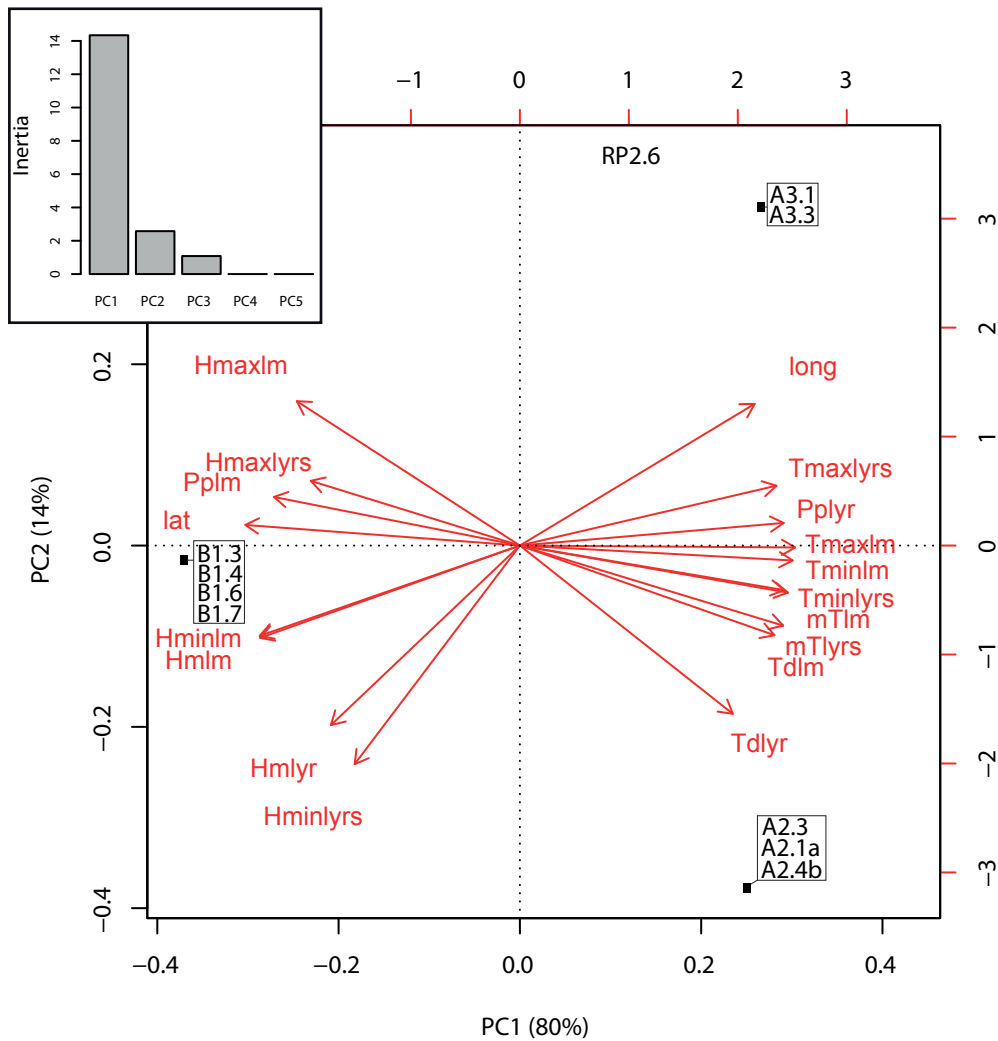


**Figure S4.** Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Acidobacteria and Bacteroidetes identified in epilithic biofilms. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 847 non-ambiguously aligned positions. Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilms samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.



**Figure S5.** Phylogenetic tree of proteobacterial SSU rDNA sequences identified in sunlight-exposed biofilms growing on mineral substrates. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 1226 non-ambiguously aligned positions. Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilms samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.





**Figure S6.** Principal component analysis (PCA) on the 18 environmental variables used to explain community compositions. The biplot for the first two principal components (PCs) displays the correlation between the PC and the original variables. Samples (in black) are also plotted in this space. The insert shows the individual contribution of each PC in explaining the total variance in the data, with the first three PCs explaining 99.9% of the variance in the environmental data. Hmaxlm, maximum humidity of the last month; Hmaxlyrs, maximum humidity of the last year; Pplm, precipitation of last month; Pplyr, precipitation of the last year; Hminlm, minimum humidity of last month; Hmlm, average humidity of last month; Hmlyr, average humidity of last year; Hminlyrs, minimum humidity of last year; Tmaxlyrs, maximum temperature of last year; Tmaxlm, maximum temperature of last month; Tminlm, minimum temperature of last month; Tminlyrs, minimum temperature of last year; mTlm, average temperature of last month; mTlyrs, average temperature of last year; Tdlm, dew point temperature of last month; Tdlyr, dew point temperature of last year; lat, latitude; long, longitude.

#### IV.1.2. Synthèse et discussion autour de l'article 1

Nous avons cherché à caractériser au mieux la diversité microbienne en nous intéressant aux organismes des trois domaines du vivant. Toutefois, malgré la recherche intensive d'archées avec des jeux d'amorces variés, aucun microorganisme appartenant à ce domaine n'a pu être identifié, résultats identiques à ceux obtenus dans le chapitre IV.2 et IV.3. Ces substrats ne sont donc pas favorables au développement d'archées, ou du moins pas en quantité suffisante pour être détectées.

Ce substrat est donc essentiellement colonisé par des bactéries et des eucaryotes unicellulaires. Dans un premier temps, nous avons pu montrer que la composition des communautés microbiennes étudiées est fortement soumise à certaines contraintes environnementales. Notamment, nous avons détecté dans nos échantillons des microorganismes extrémophiles capables de s'adapter à la dessiccation et de résister aux radiations UV. En effet, le substrat où se développent ces communautés microbiennes peut être considéré ou assimilé à un milieu extrême de par son exposition constante aux conditions de dessiccation, d'irradiation, et de faible concentration en nutriments, ce qui est caractéristique des biofilms subaériens (Gorbushina 2007). Cet environnement est ainsi sous forte sélection ; il n'est donc pas étonnant de voir des microorganismes connus pour résister à des conditions extrêmes se développer sur ces surfaces. En particulier, nous avons pu identifier une part importante de bactéries très connues pour leur radiorésistance, appartenant au genre *Deinococcus*, elles ont une capacité à résister à des conditions très extrêmes de dessiccation et d'exposition aux radiations UV et ionisantes. Ces bactéries ont ainsi fait l'objet de nombreuses études, entre autre sur leur génome et leur capacité à le régénérer extrêmement vite et efficacement après des dommages causés par les radiations (Battista, Earl et al. 1999; White, Eisen et al. 1999). La découverte en quantité relativement importante de ce groupe de bactéries dans notre biofilm nous a conduits à proposer l'hypothèse que ces Deinococcales pourraient également être retrouvées sur des substrats similaires mais exposés à d'autres types de radiations très fortes. C'est pour cela que nous avons mené des analyses sur des échantillons de béton prélevés sur un site connu pour les niveaux élevés de radioactivité, Chernobyl (voir chapitre IV.2). Les autres bactéries dominant la composition du biofilm se développant sur le substrat test étudié, sont apparentées au groupe des Actinobacteria et Alphaproteobacteria et dans certains des échantillons des Acidobacteria. Les Acidobacteria fréquemment retrouvées dans le sol, peuvent également coloniser des roches, prenant part dans des biofilms subaériens. Certaines Actinobacteria sont également bien connues pour leur capacité à résister à de nombreux stress, notamment celles appartenant au genre *Rubrobacter*, que nous avons également identifié sur ce substrat (et voir aussi chapitre IV.2). Nous avons également identifié parmi les Alphaproteobacteria, un grand nombre d'OTUs relatives aux *Sphingomonas*, un genre qui est connu pour être impliqué dans la dégradation de

nombreux composés complexes (Stolz 2009), comme des composés aromatiques divers et des composés halogénés, y compris des pesticides, des polluants souvent retrouvés dans les sols et dans les eaux. On note de même la contribution du groupe des cyanobactéries, bactéries photosynthétiques, bien souvent sous estimées quantitativement par des méthodes moléculaires dû au biais introduit par la difficulté à lyser leur paroi. En s'intéressant de manière plus spécifique à la diversité au sein des cyanobactéries, nous avons pu identifier des cyanobactéries se trouvant dans des milieux extrêmes, en particulier associées à la surface ou à l'intérieur des roches (formant des endolithes) dans des milieux désertiques chauds (e.g. Atacama, Tatouine, Sonora) ou froids comme l'Antarctique (Bahl, Lau et al. 2011; Harding, Jungblut et al. 2011).

Concernant les eucaryotes unicellulaires, la communauté est essentiellement composée de champignons du type ascomycètes et en quantité moins importante, basidiomycètes, avec des espèces affiliées à des champignons classiques souvent impliqués dans la formation de moisissures. Les ascomycètes identifiés, peuvent être apparentés au genre *Verrucaria* et *Polycladia*, également souvent retrouvés dans les formations lichéneuses, entre autre sur les façades de monuments (Nascimbene, Thus et al. 2009). De nombreuses algues appartenant aux Chlorophytes et Streptophytes sont aussi présentes de manière très importante, avec entre autre des espèces impliquées dans la formation des lichens (*Trebouxia*), algues adaptées aux rayonnements UV, et également souvent retrouvées sur les façades de monuments et sur les roches (Karsten, Lembcke et al. 2007).

Ainsi dans ce biofilm soumis à forte pression sélective, nous avons mis en évidence beaucoup de microorganismes résistants, mais avec une diversité relativement restreinte en comparaison à d'autres milieux comme les sols ou les systèmes aquatiques. Nous avons ainsi un modèle relativement simple pour pouvoir étudier de problèmes de biogéographie.

Nous avons ensuite réalisé plusieurs types d'analyses statistiques. Nous avons obtenu des indices d'estimation globale de diversité, suivis par des analyses d'ordination non contraintes décrivant la variation de la composition microbienne parmi les échantillons analysés, et, finalement, des analyses d'ordination contraintes par les facteurs environnementaux ou géographiques.

La comparaison par des analyses d'ordination non contraintes, NMDS (IV.1.1. Article 1 Figure 7), des communautés microbiennes prélevées sur des substrats minéraux divers sur le même site géographique, suggère déjà une influence du substrat sur le développement des microorganismes et leur diversité, essentiellement pour les bactéries. Ces différences sont visibles au niveau du NMDS où les 4 types de substrats se répartissent le long de l'axe 1, avec B1.4 et B1.7 (les substrats naturels, calcaire et granite) étant très écartés du reste. Ceci était déjà visible sur les histogrammes représentant la diversité des grands groupes des bactéries (IV.1.1. Article 1 Figure 1). En effet, les bactéries retrouvées sur le substrat contrôle appartenaient essentiellement aux Deinococcales, alors que sur les autres substrats ce sont essentiellement

des bactéries du genre *Bacteroidetes*, et en quantité moins importante des *Acidobacteria* qui dominaient. La diversité des eucaryotes ne semble par contre pas être expliquée par le substrat. Les différents substrats du même site ne sont pas spécialement séparés les uns des autres. L'observation des analyses NMDS nous procurait aussi une autre information qualitative. En effet, on voit une distribution des OTUs bactériennes dispersées un peu partout parmi les sites (IV.1.1. Article 1 Figure 7), ce qui indique que ces OTUS ne caractérisent pas spécifiquement la diversité d'un échantillon. Par contre, au niveau des eucaryotes la situation est différente, car la plupart des OTUs se distribuent à proximité des sites, ce qui indique qu'ils sont plus spécifiques des sites d'échantillons. Les espèces bactériennes semblent plus dispersées globalement que les populations eucaryotes. Ces observations ont été confirmées par des analyses CCA qui montrent que le substrat explique de manière significative la répartition de la diversité bactérienne, alors que la diversité des eucaryotes est mieux expliquée par la géographie (IV.1.1. Article 1 Figure 8). Ceci va dans le sens que les bactéries dispersent mieux et plus facilement que les eucaryotes.

Finalement, pour mieux voir si la distance géographique explique différemment la distribution des espèces eucaryotes et procaryotes en enlevant l'effet substrat, nous avons représenté la distance entre communautés (exprimée comme l'indice de similarité de Sørensen) en fonction de la distance géographique (courbes distance-decay) mais seulement en prenant compte des biofilms se développant sur le substrat composite contrôle. Les résultats montrent que la similarité des communautés eucaryotes diminue avec la distance géographique beaucoup plus nettement que celle de bactéries (dont la pente n'est pas significativement différente de 0). Nos résultats montrent que les paramètres climatiques affectent à la fois la composition des communautés des bactéries et des protistes. Mais, si le substrat est un descripteur significatif pour la composition des populations bactériennes, avec une petite part de la géographie, pour les eucaryotes la géographie est le seul descripteur significatif de la composition de la communauté.

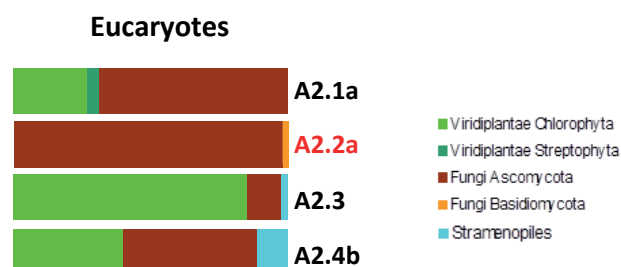
Ceci pourrait être en relation avec des modes de vie différents entre ces deux domaines. Tandis que quasiment toutes les bactéries du biofilm sont sessiles et ont une forte capacité de dispersion, mais aussi d'adaptation, seuls certains eucaryotes unicellulaires, comme des ascomycètes, champignons formant des spores, pourraient connaître ce même mode de vie. Une autre partie des espèces eucaryotes, moins adaptées et moins résistantes ne seraient présentes que de façon épisodique dans un échantillon, introduisant des différences dans la composition de la communauté eucaryote liées à leur capacité plus limitée de dispersion et de survie. Ce pourrait être le cas particulièrement pour des prédateurs (métazoaires, ciliés, etc.).

### IV.1.3. Résultats supplémentaires

Dans cet article, la variable de l'orientation de l'exposition du biofilm n'a pas été prise en compte, mais ces données ont été également utilisées et incorporées aux variables environnementales (Annexe III.2.a). Néanmoins, des analyses statistiques multivariées du même type ont été réalisées sur nos échantillons en incluant cette composante en plus. L'inclusion de ce paramètre montre la même tendance observée par nos analyses mais en y ajoutant du bruit. En effet, cette variable peut être biaisée par le fait que d'autres paramètres multiples peuvent fausser cette donnée, comme la présence d'ombre, ou la protection des vents par un bâtiment proche. Par conséquent, nous avons éliminé cette variable de nos analyses statistiques.

#### IV.1.3.1. Analyse d'un échantillon « atypique »

En plus des échantillons de biofilms sur ces substrats minéraux, nous avons analysé un échantillon minéral composite qui avait été exposé pendant plusieurs années mais sur lequel il n'y avait pas de développement de biofilm visible à l'œil nu. En effet, sur cet échantillon (A2.2a) de Charente-Maritime (Annexe III.1), aucune coloration n'était visible à l'œil, et les analyses réalisées par les techniques de clonage et de séquençage, n'ont pas permis d'amplifier de bactéries (même après une PCR semi-nichée), mais uniquement des eucaryotes (et uniquement des champignons de type ascomycètes). Ces données très différentes de celles obtenues avec tous les autres échantillons montrent une dominance exclusive des champignons ascomycètes (Figure IV.1.3.1). Ces données sont intéressantes parce qu'elles pourraient indiquer que, à cet endroit, les premières formes de dispersion qui arrivent sont les spores de ces champignons, qui attendraient le moment propice pour germer, mais les conditions d'exposition n'ont pas encore permis le développement d'un biofilm. Ces spores sont probablement plus facilement détectées que les bactéries par le fait que, en étant des eucaryotes, elles possèdent le gène SSU rDNA en multi-copies.

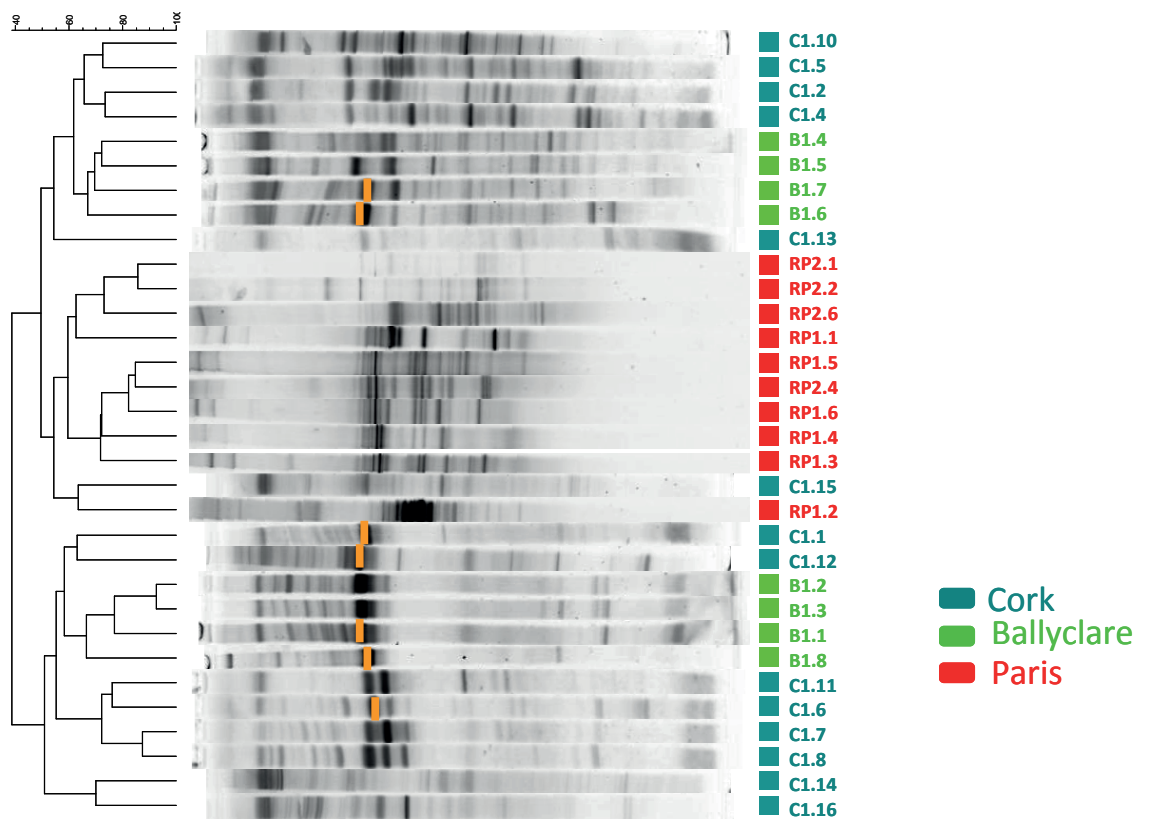


**Figure IV.1.3.1.** Abondance relative des grands groupes d'eucaryotes présents dans l'échantillon A2.2a, versus les autres échantillons de Charente-Maritime.

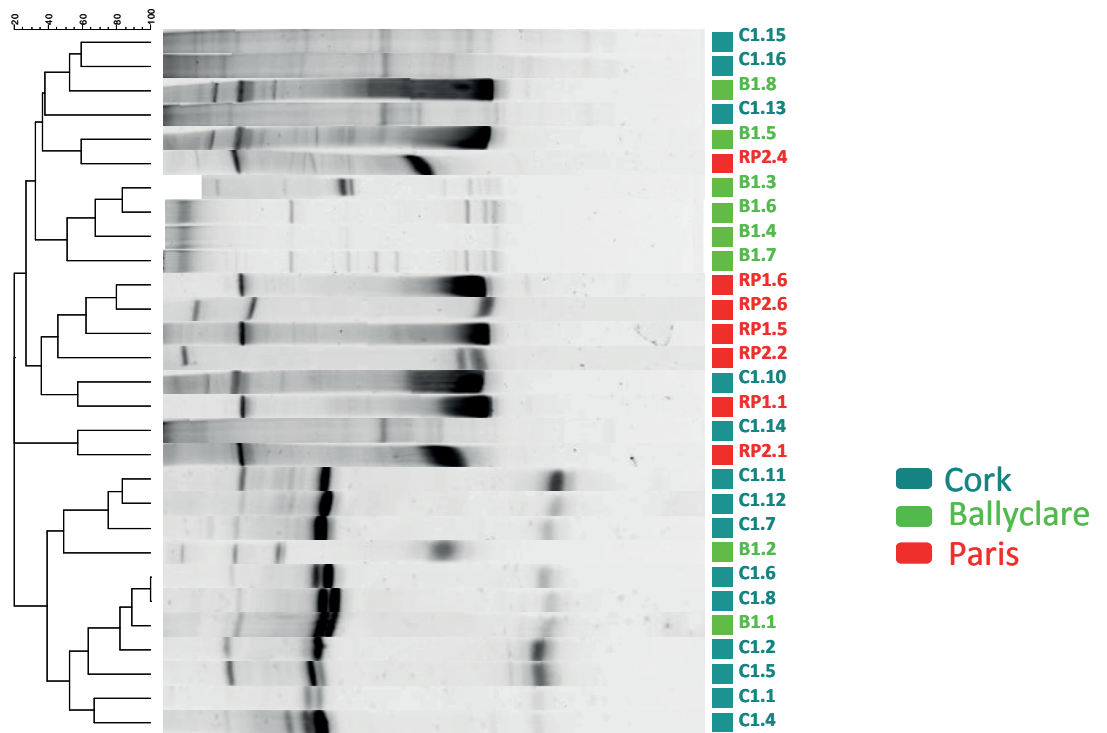
#### IV.1.3.2. Analyse complémentaire d'échantillons en DGGE

Dû au coût et le temps nécessaire pour analyser les données provenant des banques de clones et du séquençage je n'ai analysé qu'un sous-échantillon de tous les échantillons disponibles et récoltés par ces méthodes moléculaires (bien que plus précises). J'ai cependant réalisé sur un plus grand nombre d'échantillons de biofilm se développant sur substrats minéraux (Annexe III.1b) des analyses de diversité bactérienne et eucaryote par des méthodes de fingerprinting par DGGE. J'ai notamment travaillé sur d'autres échantillons provenant de Ballyclare et d'un autre site en Irlande, Cork, ainsi que sur d'autres échantillons de région parisienne. Ce complément d'analyse a permis d'élargir les informations relatives à la diversité des microorganismes retrouvés sur ce type de biofilm, dans différents sites géographiques. J'ai ainsi obtenu des profils DGGE (Figures IV1.3.2a et IV1.3.2b) et à l'aide du logiciel Bionumerics 6.1, j'ai pu reconstruire sur la base de la présence ou absence de bandes, des dendrogrammes de *clustering* des échantillons. Afin de visualiser plus facilement les regroupements des échantillons, j'ai aussi produit des représentations dans l'espace de type MDS *multidimensional scaling* (Figure IV1.3.2c). Les profils DGGE des bactéries présentent un nombre de bandes assez important reflétant la diversité bactérienne au sein des échantillons analysés. A l'inverse, les profils DGGE des eucaryotes sont plus pauvres en bandes. Dans ces profils DGGE obtenus pour les communautés bactériennes, certaines bandes sont retrouvées dans une grande partie des échantillons (indiquées par des bandes orange), correspondant à des bactéries communes à ces différents échantillons, quel que soit le site géographique de prélèvement. Pour une partie, après découpe et séquençage d'ADN de ces bandes intenses, elles correspondaient à des cyanobactéries, montrant bien l'implication de ce groupe de bactéries photosynthétiques dans la communauté du biofilm. L'analyse multidimensionnelle (Figure IV1.3.2c) permet d'avoir une idée, sur la base des profils DGGE bactériens et eucaryotes combinés, des regroupements des échantillons entre eux. Il semblerait que les échantillons de la région parisienne (rouge) soient regroupés entre eux, alors que les échantillons d'Irlande (2 verts) formeraient deux groupes un peu moins distincts (image gauche). Cependant, il est compliqué d'établir dans quelle mesure ces observations sont significatives, car les échantillons sont relativement dispersés partout dans l'espace et leur regroupement n'est pas évident en fonction de l'orientation des axes en 3D (image droite). De plus, lors d'expériences de DGGE, il se produit parfois que des bandes d'un même microorganisme migrent à des endroits différents (par formation de structures secondaires) ce qui peut biaiser l'analyse des profils obtenus ; ou à l'inverse, des microorganismes de séquences différentes ayant des taux de GC similaires qui vont migrer au même endroit ou à proximité.

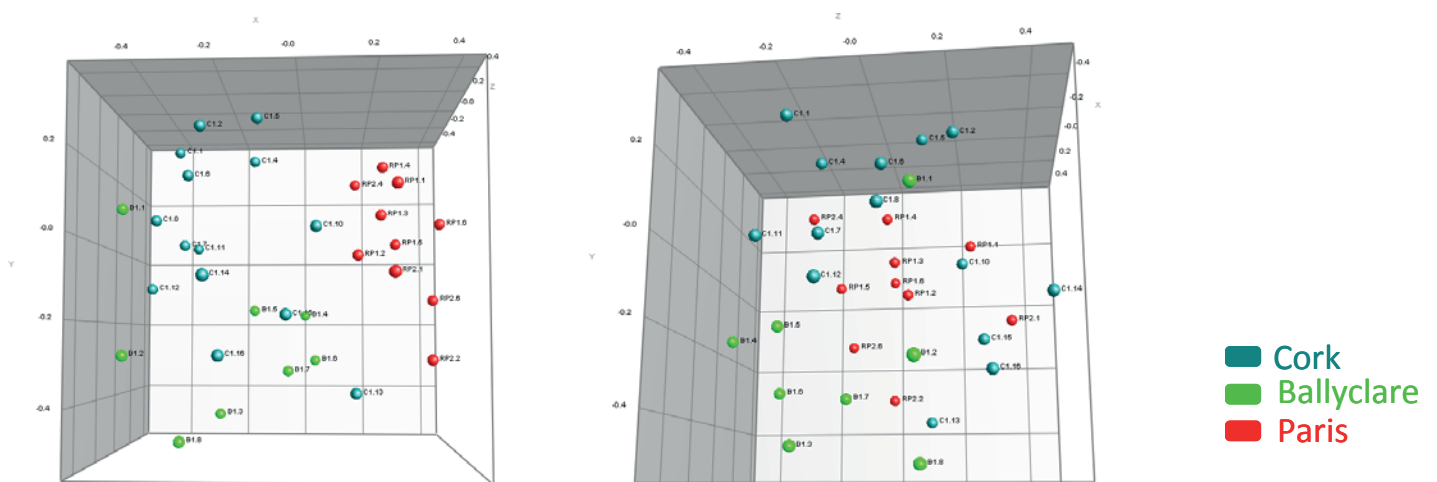
L'analyse DGGE est donc moins précise et moins fiable que les techniques basées sur le clonage et séquençage du SSU rRNA, mais plus rapide et applicable à plus d'échantillons, et permet ainsi de comparer un grand nombre d'échantillons entre eux, sur la base de profils de diversité. Le traitement de ces données par des logiciels performants, permet également de se faire une première idée quant aux regroupements possibles d'échantillons. Toutefois, ces résultats sont à interpréter avec beaucoup de prudence.



**FigureIV1.3.2a.** Dendrogramme représentant les profils de DGGE obtenus pour les bactéries, pour les échantillons supplémentaires analysés à Ballyclare, Cork et en Région parisienne.



**FigureIV1.3.2.b.** Dendrogramme représentant les profils de DGGE obtenus pour les eucaryotes, pour les échantillons supplémentaires analysés à Ballyclare, Cork et en Région parisienne.

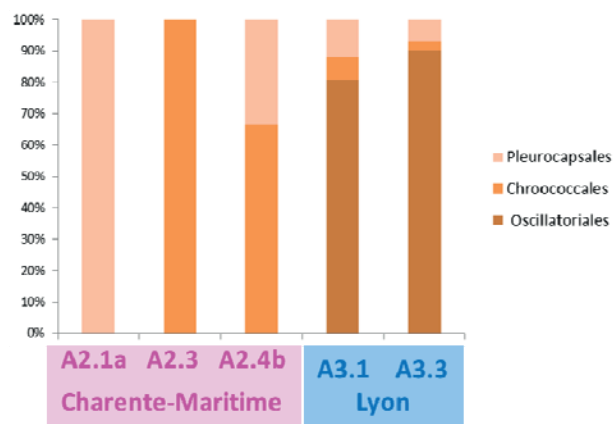


**FigureIV1.3.2.c.** Représentation en « *multidimensionnal scaling* » des profils DGGE (bactéries et eucaryotes) des échantillons de Ballyclare, Cork et Paris.



### IV.1.3.3. Réalisation de banques de clones spécifiques pour les cyanobactéries

Puisque, malgré leur présence relativement modeste dans les banques de clones, les cyanobactéries semblaient importantes en biomasse (observations microscopiques) et puisque leur lyse est plus difficile que celle d'autres bactéries, elles vont donc contribuer moins en ADN à l'ADN communautaire, j'ai également étudié leur diversité de manière plus ciblée en construisant des banques de clones spécifiques pour les cyanobactéries (amorces spécifiques à ce groupe) pour les échantillons de France (Charente-Maritime et Lyon). Ces clonages ont en effet révélé la présence de nombreuses cyanobactéries, Pleurocapsales (4 OTUs) et Chroococcales (2 OTUs) pour les échantillons de Charente-Maritime, et en plus de ces deux groupes des Oscillatoriales (3 OTUs) pour les échantillons de Lyon.



**Figure IV.1.3.3.** Abondance relative des cyanobactéries identifiées dans des banques de clones obtenues avec des amorces spécifiques.

## **IV.2. Résistance naturelle des communautés microbiennes de biofilm exposés aux niveaux de radioactivité de Chernobyl**

Lors des études de diversité réalisées sur un substrat minéral composite à plusieurs localités géographiques (voir chapitre IV.1), une quantité très importante de bactéries appartenant au groupe des Deinococcales mais aussi des Rubrobacterales (Actinobacteria), connues pour être radio-résistantes, avait été mise en évidence. Ces bactéries peuvent être considérées comme des polyextrêmophiles de par leur résistance à plusieurs conditions de vie extrêmes comme les radiations ionisantes et UV mais également la dessiccation. L'identification de façon systématique et quantitativement importante de ce groupe de bactéries dans nos échantillons nous a orientés vers l'examen d'un site géographique bien connu pour son exposition à des fortes doses de radioactivité, Chernobyl. De nombreuses études ont été menées sur les plantes et les animaux sur ce site fortement contaminé par des isotopes radioactifs (Geras'kin, Fesenko et al. 2008), mais très peu portant sur la vie microbienne. Il est pourtant très intéressant d'étudier l'effet d'une telle pression environnementale sur des communautés procaryotes et eucaryotes microscopiques. Ainsi, notre objectif était d'identifier la diversité microbienne associée au biofilms se développant sur des murs de béton à Chernobyl et de la comparer avec celle d'un échantillon de béton provenant d'un site contrôle non exposé dans le Nord de l'Irlande. Cet échantillon a été choisi par sa distance géographique importante à Chernobyl et parce que, étant du béton, on éliminait les différences potentielles liées à l'effet « substrat », sachant que la nature du substrat influence la composition des communautés bactériennes (article 1). L'idée était de tester l'hypothèse que les communautés naturellement résistantes aux irradiations ultraviolettes et à la dessiccation dans des biofilms subaériens pouvaient également être résistantes aux fortes radiations ionisantes le long d'un gradient de radioactivité croissante. De par les caractéristiques de Chernobyl, on s'attendait à retrouver ces bactéries en plus grande quantité. Une autre question à aborder était de savoir si les bactéries des sites plus irradiés mutaient plus et donc évoluaient plus vite que celles des endroits moins irradiés. Ceci a été étudié dans les animaux et les plantes qui vivent à Chernobyl, mais pas sur les microorganismes. Nous avons l'idée d'étudier la phylogénie intraspécifique de ces bactéries en utilisant l'ITS, un marqueur supposé neutre, pour mesurer leur distance évolutive par rapport aux mêmes OTUs éventuellement retrouvées dans des sites non radioactifs. Ceci ne serait possible que si on identifiait des OTUs communs dans tous les sites étudiés. Le fait que l'échantillonnage à Chernobyl avait été réalisé dans des localités avec des taux de radiation différents devait nous permettre d'évaluer l'influence du niveau de radiation sur la composition des communautés microbiennes mais aussi sur les taux de mutations des espèces présentes.

Cette étude a permis en plus d'élargir nos données de biogéographie en ayant un point plus éloigné que ceux de l'étude précédente (voir chapitre IV.1). Ce travail a donné lieu à la publication de l'article « Sunlight-exposed biofilm microbial communities are naturally resistant to Chernobyl ionizing-radiation levels » (Ragon, Restoux, Moreira, Møller, and López-García. 2011. PLoS One 6:e21764).

#### **IV.2.1. Article 2: Sunlight-exposed biofilm microbial communities are naturally resistant to Chernobyl ionizing-radiation levels**

# Sunlight-Exposed Biofilm Microbial Communities Are Naturally Resistant to Chernobyl Ionizing-Radiation Levels

Marie Ragon, Gwendal Restoux, David Moreira, Anders Pape Møller, Purificación López-García\*

Unité d'Ecologie, Systématique et Evolution - CNRS UMR8079, Université Paris-Sud, Orsay, France

## Abstract

**Background:** The Chernobyl accident represents a long-term experiment on the effects of exposure to ionizing radiation at the ecosystem level. Though studies of these effects on plants and animals are abundant, the study of how Chernobyl radiation levels affect prokaryotic and eukaryotic microbial communities is practically non-existent, except for a few reports on human pathogens or soil microorganisms. Environments enduring extreme desiccation and UV radiation, such as sunlight exposed biofilms could in principle select for organisms highly resistant to ionizing radiation as well.

**Methodology/Principal Findings:** To test this hypothesis, we explored the diversity of microorganisms belonging to the three domains of life by cultivation-independent approaches in biofilms developing on concrete walls or pillars in the Chernobyl area exposed to different levels of radiation, and we compared them with a similar biofilm from a non-irradiated site in Northern Ireland. Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria and Deinococcales were the most consistently detected bacterial groups, whereas green algae (Chlorophyta) and ascomycete fungi (Ascomycota) dominated within the eukaryotes. Close relatives to the most radio-resistant organisms known, including *Rubrobacter* species, Deinococcales and melanized ascomycete fungi were always detected. The diversity of bacteria and eukaryotes found in the most highly irradiated samples was comparable to that of less irradiated Chernobyl sites and Northern Ireland. However, the study of mutation frequencies in non-coding ITS regions versus SSU rRNA genes in members of a same actinobacterial operational taxonomic unit (OTU) present in Chernobyl samples and Northern Ireland showed a positive correlation between increased radiation and mutation rates.

**Conclusions/Significance:** Our results show that biofilm microbial communities in the most irradiated samples are comparable to non-irradiated samples in terms of general diversity patterns, despite increased mutation levels at the single-OTU level. Therefore, biofilm communities growing in sunlight exposed substrates are capable of coping with increased mutation rates and appear pre-adapted to levels of ionizing radiation in Chernobyl due to their natural adaptation to periodical desiccation and ambient UV radiation.

**Citation:** Ragon M, Restoux G, Moreira D, Møller AP, López-García P (2011) Sunlight-Exposed Biofilm Microbial Communities Are Naturally Resistant to Chernobyl Ionizing-Radiation Levels. PLoS ONE 6(7): e21764. doi:10.1371/journal.pone.0021764

**Editor:** Vishnu Chaturvedi, New York State Health Department and University at Albany, United States of America

**Received:** April 11, 2011; **Accepted:** June 6, 2011; **Published:** July 13, 2011

**Copyright:** © 2011 Ragon et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** M.R. and this work were financed by a "Convention Industrielle de Formation par la REcherche" (CIFRE) fellowship and its accompanying research contract. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Purificación López-García is an Academic Editor at PLoS.

\* E-mail: puri.lopez@u-psud.fr

## Introduction

The explosion of one of the four nuclear reactors of the Chernobyl nuclear power plant on 26 April 1986 released huge amounts of radioactive elements into the atmosphere that polluted vast areas in adjacent continents. This catastrophic accident initiated involuntarily the largest-scale experiment to date about the effects of ionizing radiation on natural ecosystems. A wealth of studies on the consequences of radiation in Chernobyl have accumulated for more than two decades, revealing associations between levels of radiation and the abundance, distribution, life history and mutation rates of plants and animals (for review see [1,2,3]). Much less is known, however, about the radiation effects in eukaryotic and prokaryotic members of the microbial communities.

Among eukaryotes, fungi, both mushroom-producing species but also micro-fungi have been relatively well studied in

Chernobyl [2,3], mostly because of their capacity to concentrate radionuclides [4]. This capacity converts them into important agents for radionuclide transfer in two ways. They concentrate and mobilize radionuclides towards organisms at higher trophic levels including humans, e.g. through grazing [5]. They can also regulate radionuclide absorption. For instance, certain mycorrhiza accumulate cesium isotopes preferentially leading to their accumulation in hyphae and thus limiting their transfer to the host plant, though they may behave differently depending on the isotope and the element under consideration [5]. In addition, several micro-fungi from irradiated areas are not only radiotolerant but positively attracted by radionuclides (positive radiotropism), being able to grow upon "hot particles" and degrade them [6]. Furthermore, in some cases ionizing radiation has a positive stimulation on spore germination [7]. By contrast, positive radiotropism and stimulation of spore germination by ionizing

radiation are not observed in fungi isolated from radioactively clean locations [5]. Fungal resistance to radiation is usually attributed to their smaller genomes as compared to animal or plant cells. It is also known that gamma irradiation enhances the expression of genes involved in cell cycle and DNA processing, cell rescue defense and virulence, protein and cell fate, and metabolism, as shown by microarray studies in yeast [8]. However, these factors alone do not explain the extreme radioresistance of some fungi. A key role is played by melanin and related pigments, which are invariably present in the most radiotolerant fungi. Thus, melanized fungal species, most often belonging to the Ascomycetes, colonize the walls of the highly radioactive damaged reactor at Chernobyl [9], and the relative abundance of pigmented fungi has increased in soils of the Chernobyl area [10]. The protective role of melanin is related to its physical shielding properties combined with the ability of quenching cytotoxic free radicals [11]. Furthermore, the exposure to ionizing radiation and other forms of electromagnetic radiation has been shown to increase both the growth of some melanized fungi and the electron transfer properties of melanin. This has led to speculations that these redox properties might even be used to transduce energy for cell metabolism, thereby enhancing growth [11,12].

The study of how radiation affects other microbial eukaryotes is practically non-existent, despite the attention created by micro-fungi in Chernobyl soils and nuclear power plant reactor ruins due to their radioresistant properties. The situation is not much better for prokaryotes. There are a number of studies related to the increase of pathogenic bacteria and viruses, including retroviruses, mostly in relation to human health [13]. However, in these cases a direct radiation effect on the stimulation of, for instance, retroviral activation, cannot be easily disentangled from indirect effects due to impaired immune responses of hosts. One recent study explored the effect of Chernobyl radiation levels on cultivable bacteria and fungi from barn swallow *Hirundo rustica* feathers, which showed a negative effect of radiation on the abundance of cultivable bacteria but not of fungi [14]. However, cultivation approaches are known to yield a very biased view of the existing diversity [15], and changes induced in host metabolism, immune system and health, could indirectly influence the observed changes in the abundance of cultivable bacteria. There are relatively few studies, most of them in soils, about the effects of ionizing radiation on free-living bacteria in the Chernobyl area. These report either a decrease of bacterial diversity in highly irradiated soils or the isolation of resistant bacteria, frequently spore-forming bacilli, which are also resistant to ultraviolet (UV) radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure [16,17,18,19].

In addition to sources related to the use of nuclear power plants, research centers and hospitals, ionizing radiation occurs naturally in certain deep-sea hydrothermal vents, and high levels of radioactivity have been measured in their associated biota [20]. These conditions select for organisms that are naturally resistant to high doses of ionizing radiation (up to 30 kGy), such as *Thermococcus gammatolerans* and other highly radioresistant archaea that have been isolated from the Guaymas basin in the Pacific and the Mid-Atlantic Ridge [21,22]. Extreme desiccation and UV radiation can also select for organisms highly resistant to ionizing radiation. This is not surprising, given that both can lead to similar effects on cellular macromolecules. UV radiation causes a variety of photochemical damages on DNA that, ultimately, may lead to mutations and to single or double strand breaks. These include, notably, the dimerization of adjacent pyrimidine bases, but also other lesions mainly derived from, specifically, UVA-derived oxidative damage [23,24]. Similarly, ionizing radiation produces oxidative damage in DNA and proteins due to the generation of

free radicals [25]. The most radioresistant organisms known to date are the bacteria *Deinococcus radiodurans* (Thermus/Deinococcus group) [26] and *Rubrobacter radiotolerans* (Actinobacteria) [27]. *Deinococcus* and *Rubrobacter* species are frequently retrieved from rocks and soils of cold and hot deserts (e.g. [28,29,30]) or at high altitudes where the protective effect of the atmosphere against UV is diminished [31]. Several species of these genera are resistant to other extreme conditions as well, being thermophilic or resisting alkaline conditions and solvents toxic for many other organisms. Thus, some *Rubrobacter* strains have been isolated from hot springs [32] and wall paintings, where they are responsible for rosy discoloration [33]. Many isolated strains are also resistant to ionizing radiation [32,34], suggesting that organisms adapted to xerophily and UV-radiation are naturally adapted to cope with ionizing radiation as well.

These bacteria use a variety of adaptations. Often, they protect themselves by forming endolithic communities and preventing in this way excessive UV exposure and evaporation in deserts (e.g. [35,36,37]), but the most characteristic adaptations involve efficient DNA repair, pigments and protection from oxidative stress. *D. radiodurans* and *R. radiotolerans* possess extremely effective DNA repair systems [38,39,40,41]. Furthermore, basal DNA repair genes in radioresistant bacteria of the genera *Deinococcus* and *Rubrobacter* evolve under positive selection as compared to their homologs in non-resistant bacteria [42]. The presence of carotenoid pigments is also a constant in radioresistant bacteria [43]. As in the case of melanin in fungi, which provides some fungi resistance levels nearly comparable to those of *Rubrobacter* and *Deinococcus* [11], carotenoid pigments in bacteria also provide a physical shield as well as protection from oxidative stress [44]. In addition to pigments, desiccation- and radiation-resistant bacteria possess mechanisms that limit protein oxidative damage during dehydration, which involve enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems dominated by divalent manganese complexes [41,45,46].

In this study, we assessed the effect of ionizing radiation on communities of microorganisms that might be potentially pre-adapted to it by their natural exposure to sunlight and limited water availability. To this end, we explored the diversity of microorganisms belonging to the three domains of life by cultivation-independent approaches in biofilms developing on concrete walls or pillars in the Chernobyl area exposed to different levels of radiation, and we compared them with a similar concrete biofilm sample from a non-exposed site in Ireland. Our results show that the composition of biofilm microbial communities in the most highly irradiated samples is similar to those of non-irradiated samples, despite increased mutation levels within a same operational taxonomic unit (OTU). Therefore, biofilm communities growing in sunlight exposed substrates appear pre-adapted to ionizing radiation levels at Chernobyl due to their natural adaptation to ambient UV radiation.

## Methods

### Sample selection and background radiation levels

We collected samples of biofilms growing on concrete pillar or wall structures in eight different points from the Chernobyl area close to Prypiat and Vesniane on December 7th, 2007 (Table 1 and Figure 1). Biofilms were dark green to black in color (Figure 1). Chernobyl samples were collected from sites with very different background levels of gamma radiation, ranging from 0.35 to 25  $\mu$ Sv/h, as measured *in situ* (Table 1). Gamma radiation levels in the field were measured at collection points using a hand-held dosimeter (Model: Inspector, SE International, Inc., Summertown, TN, USA) and the

**Table 1.** Location, measured ambient radioactivity at sampling sites, number of sequences analyzed per gene library and Operational Taxonomic Units (OTUs) detected for samples analyzed in this study.

Sample name	Geographic origin	Coordinates	Radiation ( $\mu\text{Sv/h}$ )**	Bacteria SSU rDNA sequences analyzed	Eukaryote SSU rDNA sequences analyzed	Number of bacteria OTUs	Number of eukaryote OTUs
B1.6	Ballyclare, Northern Ireland	54.751, -5.999	0.08*	119	130	20	6
Cher1	Pripyat, Chernobyl	51.23.321, 30.06.746	0.83	-	-	-	-
Cher2	Pripyat, Chernobyl	51.23.118, 30.05.943	8.65	70	94	9	8
Cher3	Pripyat, Chernobyl	51.23.462, 030.03.775	0.97	-	-	-	-
Cher4	Pripyat, Chernobyl (red forest)	51.23.052, 030.02.433	25	137	105	23	15
Cher5	Pripyat, Chernobyl	51.21.561, 030.00.595	0.35	-	-	-	-
Cher6	Pripyat, Chernobyl	51.21.701, 030.00.402	0.76	191	112	24	4
Cher7	Pripyat, Chernobyl	51.17.647, 030.38.568	6.4	-	-	-	-
Cher8	Vesniane, Chernobyl	51.18.380, 029.38.820	4	64	110	2	5

\*This value corresponds to the average radiation levels from three close monitoring stations in Ireland in 2008 (Dundalk, Clones, Malinhead) [48].

\*\*1 Sievert = 1 Gray.

doi:10.1371/journal.pone.0021764.t001

measurements cross-validated with Ukrainian governmental measurements [47]. In addition, we analyzed a similar concrete-associated biofilm sample from a distant geographical location (Ballyclare, Northern Ireland) but comparable latitude, which was considered as an external control in subsequent studies. The sample was collected from a concrete wall on February 19th, 2008. For this sampling point, we made an estimation of background radioactivity level of 0.08  $\mu\text{Sv/h}$  based on the average levels from three close monitoring stations in Ireland in 2008 (Dundalk, Clones, Malinhead, with 0.073, 0.078 and 0.105  $\mu\text{Sv/h}$ , respectively) [48], which coincided with the long-term background radiation levels for the same sites (<http://www.rpii.ie/Monitoring-Stations.aspx>). This value is approximately five-fold lower than the least irradiated site sampled in Chernobyl and 300-fold less than the most irradiated one (Table 1). Ireland was also affected by the Chernobyl accident, and the initial  $^{137}\text{Cs}$ - $^{134}\text{Cs}$  deposition reached concentrations 20-fold higher than pre-catastrophe levels [49], although this represented much lower quantities than those received by most European countries [50]. In past years, the average background radiation levels in Ireland oscillated between 0.05 and 0.12  $\mu\text{Sv/h}$ . In all cases, biofilms were sampled by scratching the concrete surface with an ethanol-inflamed spatula and letting the detached biofilm-covered grains to fall in a sterile tube. Tubes were immediately closed and, once transported to the laboratory, stored at  $-20^\circ\text{C}$  until further processing.

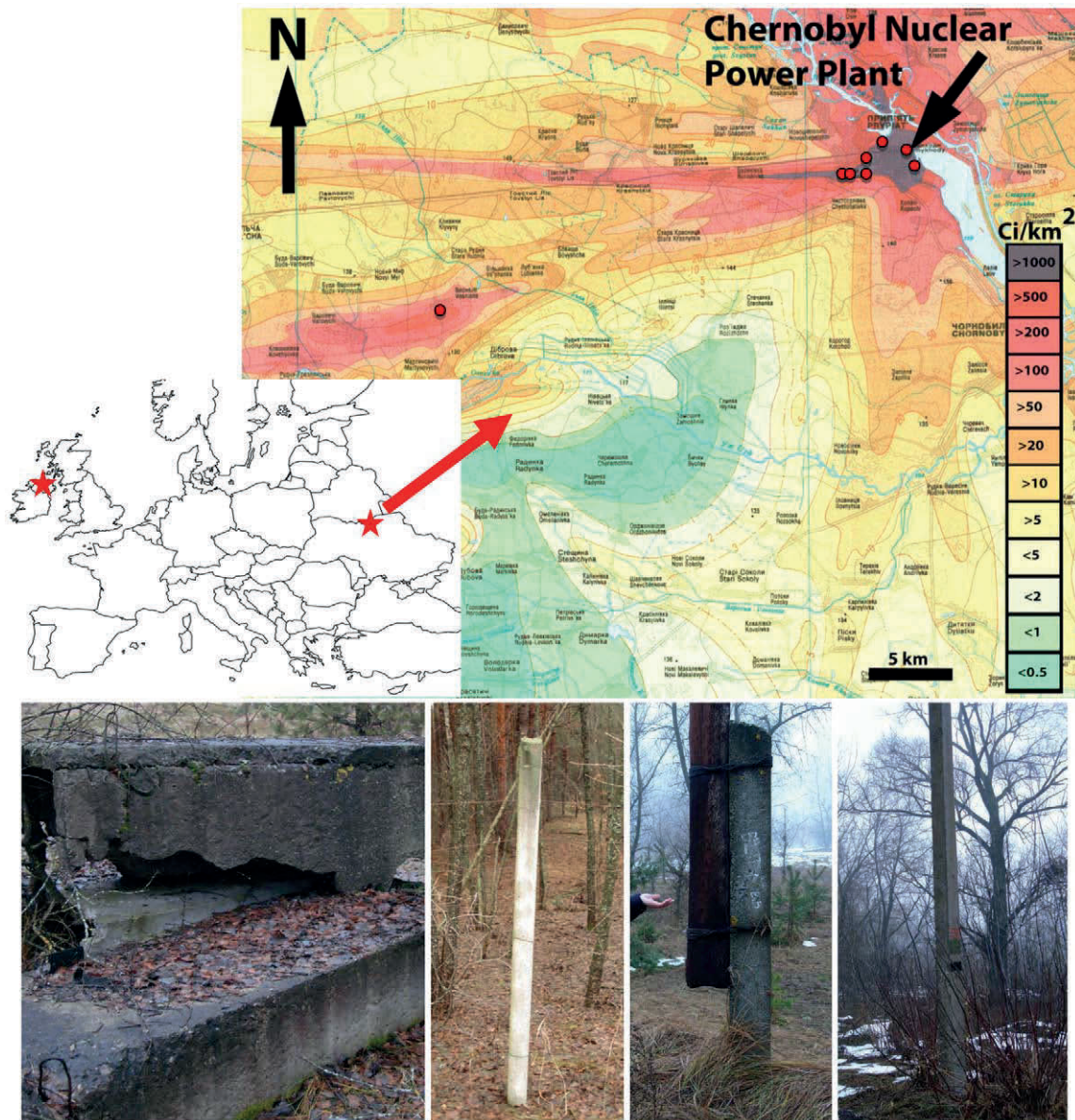
#### DNA purification, PCR amplification of SSU rDNA and ITS regions, library construction and sequence analysis

DNA extraction was done from ca. 250  $\mu\text{l}$  of scratched concrete powder using the Power Soil DNA extraction kit from MoBio (Carlsbad, CA, USA) following the instructions of the manufacturer. DNA was eluted in a final volume of 80  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl, pH 8, and conserved at  $-20^\circ\text{C}$ . Small subunit (SSU) rRNA genes were amplified using specific primers for each domain of life. In the case of bacteria, we additionally amplified the adjacent internal transcribed spacer (ITS) region, using the primers 27F (AGAGTTGATCCTGGCTCAG) and 23S-1R (GGGTT-TCCCATTCGGAAATC). The eukaryotic SSU rDNA was amplified using the specific primers 82F (GAAACTGC-GAATGGCTC) and 1520R (CYGCAGGTTACCTAC). Finally, in order to maximize the chances to amplify archaeal SSU rRNA genes, we used combinations of the following archaea specific primers

with the reverse primer 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT): Ar109 (AC(G/T)GCTGCTCAGTAACACGT), ANMEF (GGC-TCAGTAACACGTGGA), W36 (TCCAGGCCCTACGGGG), and 21F (TTCCGGTTGATCCTGCCGGA). PCR reactions were carried out in 25  $\mu\text{l}$  of reaction buffer containing 1  $\mu\text{l}$  of the eluted DNA, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , dNTPs (10 nmol each), 20 pmol of each primer, and 0.2 U Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen). PCR reactions were performed under the following conditions: 35 cycles (denaturation at  $94^\circ\text{C}$  for 15 s, annealing at 50 to  $55^\circ\text{C}$  for 30 s, extension at  $72^\circ\text{C}$  for 2 min) preceded by 2 min denaturation at  $94^\circ\text{C}$ , and followed by 7 min extension at  $72^\circ\text{C}$ . Clone libraries were constructed using the TopoTA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Clone inserts were PCR-amplified using flanking vector primers, and SSU rDNA partially sequenced with either 1492R or 1520R. Accumulation curves for high-quality partial sequences were constructed using DOTUR [51] at the level of operational taxonomic units (OTUs). OTUs were defined as groups of sequences sharing more than 97% identity at the SSU rRNA gene. SSU rDNA representative of different OTUs were nearly fully sequenced by using forward primers. The ITS regions of members of a same OTU closely related to *Rubrobacter radiotolerans* present in different samples were also sequenced completely. Complete sequences were assembled using Code Aligner (CodonCode Corporation; [www.codoncode.com](http://www.codoncode.com)) prior to phylogenetic analyses.

#### Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE) analysis

Fingerprinting analysis of bacterial and eukaryotic diversity in different samples was carried out by DGGE. For this, short fragments of SSU rDNA were amplified, in bacteria, using the forward GC-clamp-containing primer 341F-GC (CGCCCGCC-GCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCCT-ACGGGAGGCAGCAG), and the reverse primer 534R (ATTA-CGCGGCTGCTGG) and, in eukaryotes, the forward GC-clamp-containing primer 1209F-GC (CGCGCGCCGCGCCCC-GCGCCCGTCCCGCCGCCCGCCCGCAGGTCTGTGA-TGCCC), and the reverse primer 1520R. PCR was carried out using the same reaction mix as above, except for a final concentration of  $\text{MgCl}_2$  of 3 mM for bacteria, and the following conditions: initial denaturation step at  $94^\circ\text{C}$  for 3 min, 20 cycles consisting of a denaturation step at  $94^\circ\text{C}$  for 15 s, an annealing step of 30 s (a touch down procedure with a decreasing annealing



**Figure 1. Sampling sites.** The red stars indicate the two major sampling areas in Northern Ireland and Chernobyl (Ukraine). The map on the right shows the location of the sampling sites in the Chernobyl area according to the background level of radiation ( $\mu\text{Sv/h}$ ) (adapted from [47]). The photographs at the bottom show some examples of biofilms growing on concrete walls or pillars that were sampled. doi:10.1371/journal.pone.0021764.g001

temperature from  $65^{\circ}\text{C}$  to  $55^{\circ}\text{C}$  for the 10 first cycles was applied followed by a hybridization temperature of  $55^{\circ}\text{C}$  for the following 10 cycles) and a polymerization step at  $72^{\circ}\text{C}$  for 1.5 min, and a final step of 7 min (eukaryotes) to 1 h (bacteria) extension at  $72^{\circ}\text{C}$  as recommended in [52]. Migration of PCR products was done in a DGGE-2000 system (CBS Scientific Company) running in parallel 50 bp ladder DNA markers (Promega, Lyon, France). An 8% polyacrylamide gel with a gradient of DNA denaturant agent was cast by mixing solutions of 30% to 60% for bacteria, and 20% to 40% for eukaryotes. 100% denaturant agent is 7 M urea and 40% formamide. 10–15  $\mu\text{l}$  of PCR product were loaded for each sample and the gel was run at 150 V for 6 hours at  $60^{\circ}\text{C}$  in  $0.5\times$  Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer ( $1\times$ : 40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0). After electrophoresis, gels were stained in SYBR Gold (Molecular Probes, Invitrogen, USA), and

then visualized and photographed on a UV transilluminator (TFX-26.LM, VWR International, France). Photographed gels were normalized using the Bionumerics<sup>®</sup> 5 software (Applied-Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium) based on the position of ladder standards. Band positions were assigned manually. Clustering analysis of DGGE patterns was carried out using UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) clustering [53] applying a Jaccard coefficient [54].

#### Phylogenetic analyses

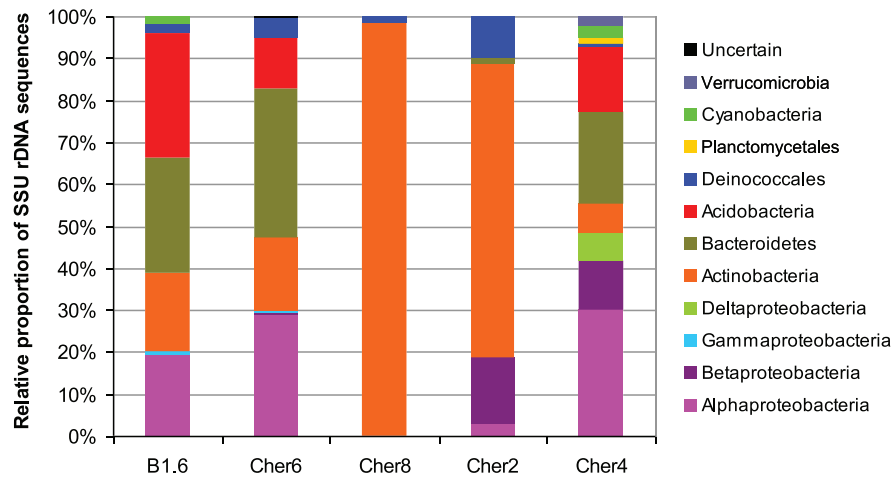
Our sequences were compared to those in GenBank by BLAST [55]. We retrieved the closest sequences identified in this way to include them in an alignment containing also sequences from the closest cultivated members and some representative sequences of the major taxa found. Sequences were aligned using MUSCLE

[56] and the multiple alignment was then manually edited using the program ED from the MUST package [57]. Preliminary neighbor-joining (NJ) trees were constructed for the different prokaryotic taxa in order to choose representative subsets of sequences for further phylogenetic analyses. Finally, phylogenetic trees were then reconstructed using final datasets by maximum likelihood (ML) using TREEFINDER [58] applying a general time reversible (GTR) model of sequence evolution, and taking among-site rate variation into account by using a four-category discrete approximation of a  $\Gamma$  distribution. Gaps and ambiguously aligned positions were excluded from our analysis. ML bootstrap proportions were inferred using 1000 replicates. Phylogenetic trees were viewed using the program FIGTREE (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). The sequences reported in this study have been deposited in GenBank with accession numbers JN020169-JN020245.

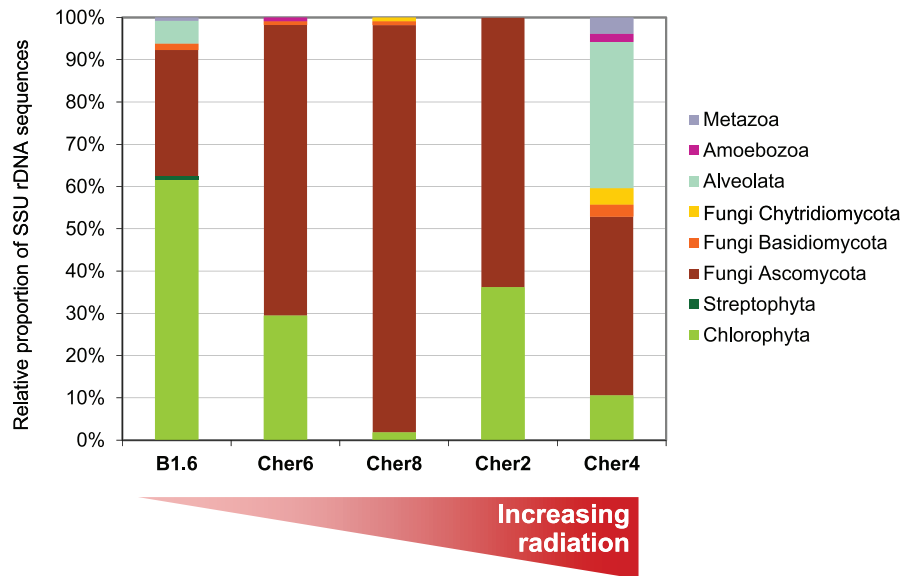
### Modeling the effect of ionizing radiation on genetic diversity at a single OTU level

To model radiation effects on the genetic variability at intra-species (microdiversity) level, we used as samples 36, 20 and 30 SSU rDNA plus ITS sequences belonging to the same *Rubrobacter* OTU coming from three Chernobyl locations differing by their radiation levels (Cher2, Cher6 and Cher8). We compared these sequences to three sequences (Ref-127, Ref-128 and Ref-2 corresponding to clones B1.6-1B-127, B1.6-1B-128 and B1.6-1B-2, respectively) of the same OTU retrieved from the control, non-irradiated Northern Ireland sample. Each datum was obtained by counting the number of differing nucleotides for the ITS (355 bp) and for the SSU rDNA (1387 bp) regions sequenced between each Chernobyl sample and the reference sample. We used a Generalized Linear Model (GLM) [59] to regress the observed variability at the ITS by the SSU rDNA variability (quantitative

## Bacteria



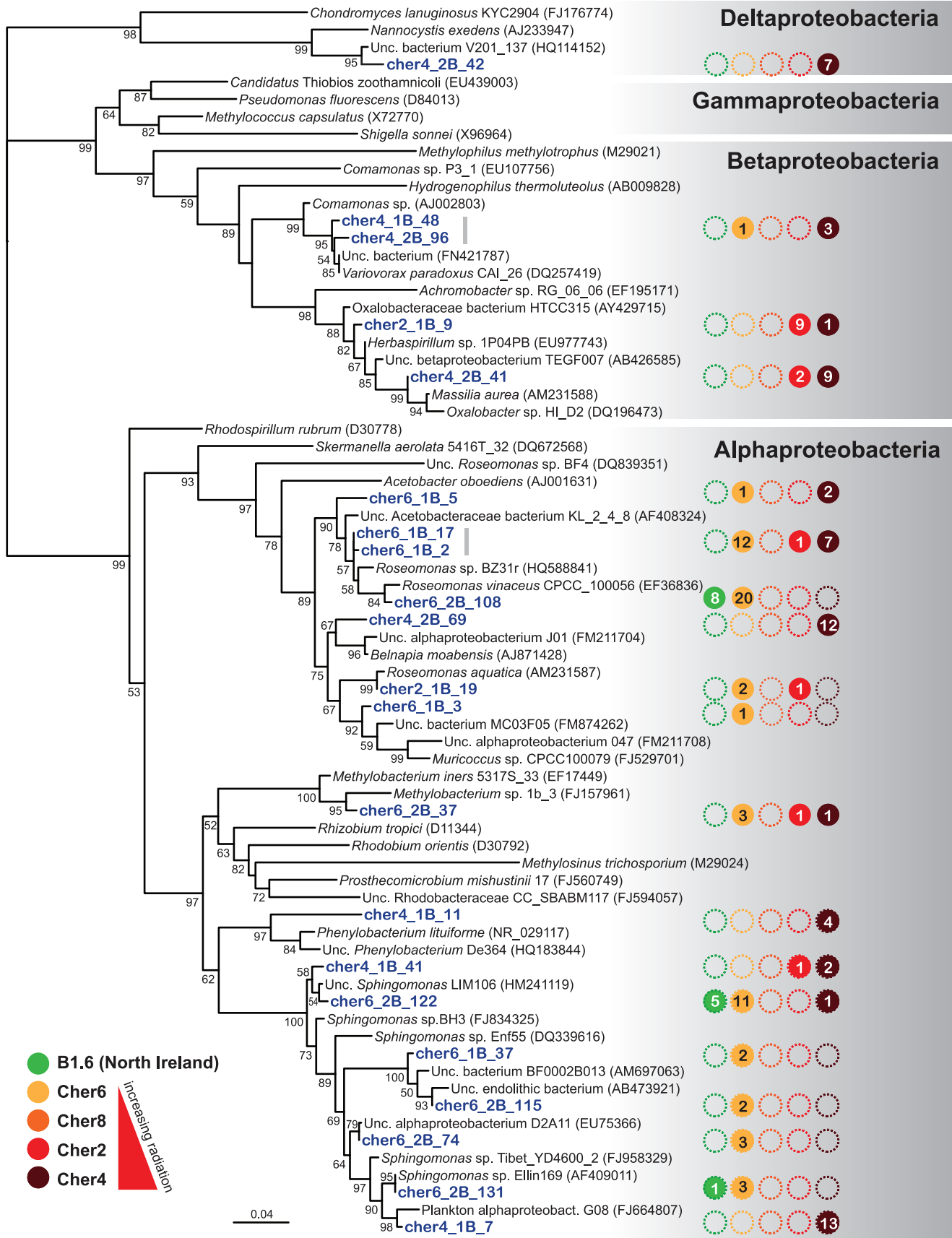
## Eukaryotes



**Figure 2. Relative distribution of major bacterial and eukaryotic taxa in SSU rRNA gene libraries from concrete-associated biofilm microbial communities.**

doi:10.1371/journal.pone.0021764.g002





**Figure 3. Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences from Chernobyl concrete biofilms belonging to the Proteobacteria.** The tree was reconstructed by maximum likelihood using 767 non-ambiguously aligned positions. Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles show the presence of the OTU in the different samples, and the internal number corresponds to the number of occurrences of sequences in the corresponding gene libraries. Unc., uncultured.  
doi:10.1371/journal.pone.0021764.g003

variable). This regression accounts for the control sequence used (qualitative fixed effect) and the Chernobyl population from where it was retrieved (qualitative fixed effect). We assumed that the number of differences for the ITS followed a Poisson distribution and we used a square-root link function to linearize the observed distribution. We only considered interactions up to the second order (the third order interaction term was ignored since it did not bring any additional information). The model was thus designed as follows,

$$\left\{ \begin{array}{l} ITS_{ijk} \sim P(\lambda_{ijk}) \\ \lambda_{ijk} = (\mu + Pop_i + Ref_j + (Pop \times Ref)_{ij} + \beta_{ij} 16S_{ijk})^2 \\ \beta_{ij} = \beta_0 + (\beta \times Pop)_i + (\beta \times Ref)_j. \end{array} \right.$$

With *ITS* and *16S* being the number of different nucleotides of a given sequence against the reference sample sequence for the two DNA regions respectively,  $\mu$  the general mean, *Pop* the population to which the sequence belongs, *Ref* the control reference sequence used for comparison, *Pop*  $\times$  *Ref* the interaction term and  $\beta$  the regression coefficients. The effects were tested using a type III analysis by setting the contrasts to “effects sum equals zero” and applying the *drop1* function. Finally, we computed the adjusted means for each population and reference sample assuming a comparable level of SSU rDNA (*16S*) variability which was the average level of SSU rDNA variability computed over all the dataset. This enables comparing the “real” effect of populations on the genetic variability of the ITS regions for exactly the same level of SSU rDNA variation, i.e. without the confounding effect of SSU rDNA variability. All computations were done using R statistical language R [60] and the “Effects” package [61].

## Results and Discussion

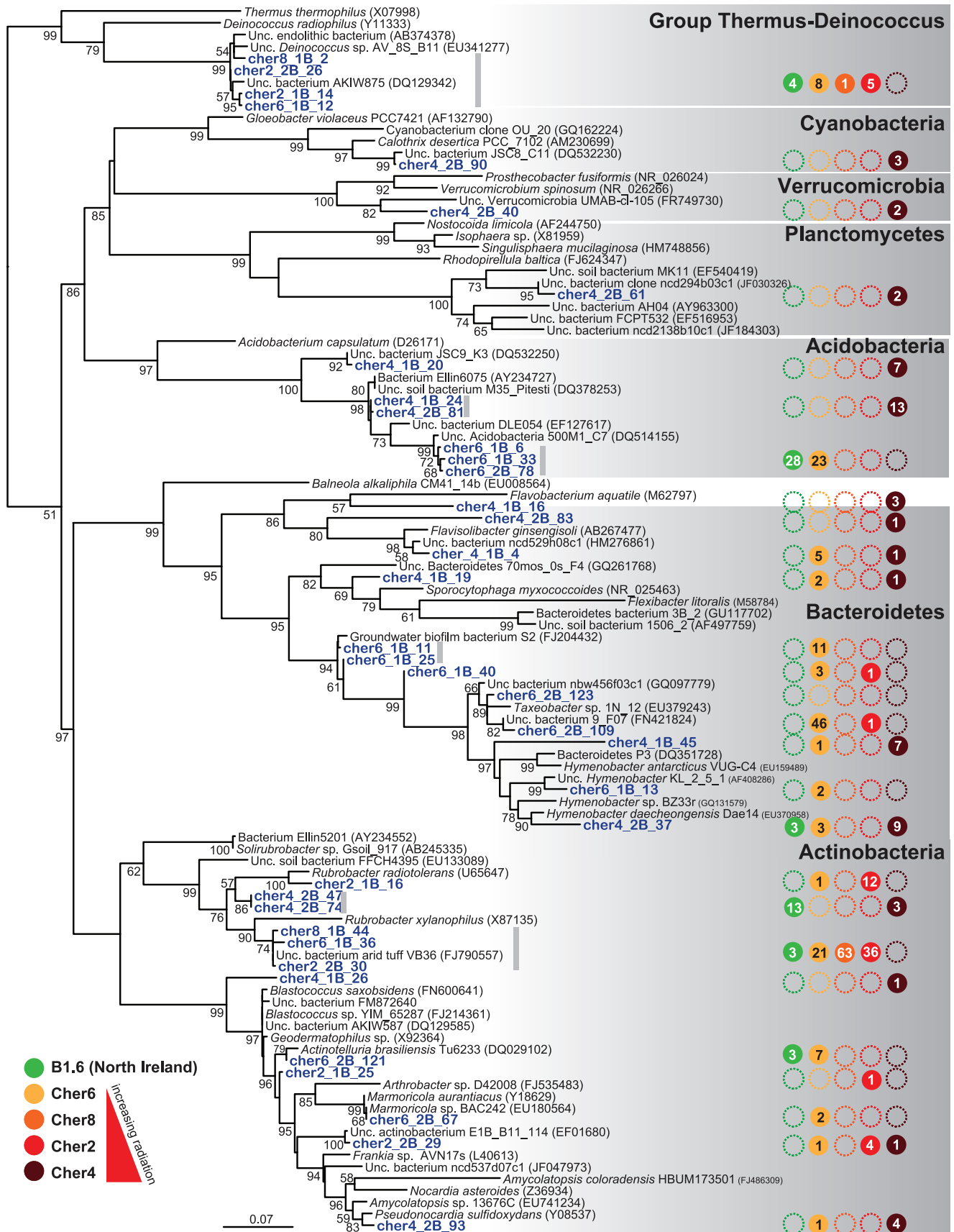
### Prokaryotic diversity of Chernobyl concrete biofilm communities

To carry out in-depth analyses of the microbial diversity associated with the sunlight-exposed biofilms growing on concrete, we made a sub-selection of samples from Chernobyl that covered the whole range of radiation measured plus an outgroup sample from Northern Ireland (Figure 1 and Table 1). First, we aimed at studying the diversity of the two prokaryotic domains, Archaea and Bacteria, in biofilms by amplifying SSU rRNA genes using specific-domain primers. However, in the case of archaea and despite the use of several primer combinations under conditions that are known to allow the amplification of this marker, we failed to obtain amplicons. Since archaea are known to be much less relatively abundant than bacteria in most habitats [62], we also applied nested PCR to maximize the probability of amplifying archaeal SSU rDNA, with identical negative results. This strongly suggests that archaea are not present in this type of biofilms, or, if they occur, they do in far too small amounts to be detectable by molecular methods. This result is in agreement with additional observations in sunlight exposed biofilms on other mineral substrates (Ragon et al., unpublished). Archaea have very rarely been reported to occur on monument surfaces, and when they do in certain particular samples, their diversity corresponds to that of halophilic archaea, which can cope more easily with the higher

osmotic stress often associated to these systems [63,64,65]. Haloalkaliphilic archaea are frequent in paintings, which is likely due to their adaptation to high salt (including metal cation) concentrations and organic solvents [66] [33].

Bacterial SSU rRNA genes were easily amplified together with the adjacent ITS region, and subsequently cloned. The total number of sequences analyzed per sample is given in Table 1. In total, we analyzed nearly six hundred bacterial sequences. Some samples reached saturation rapidly, and therefore, the number of sequences sampled is smaller for the corresponding SSU rDNA libraries. That was in particular the case for Cher8, but also for Cher2 and Cher6. Contrary to our expectations, the sample from the most highly irradiated site, Cher4, was the only one for which saturation was not clearly reached, whereas the sample from Northern Ireland seemed to reach an asymptote, suggesting that Cher4 harbored a higher bacterial diversity (Figure S1). Cher4 diversity was not only higher in terms of OTUs present, but also in terms of higher-order taxa, as deduced from BLAST comparisons with sequences deposited in GenBank and phylogenetic analyses. The relative distribution of sequences in high-rank taxonomic taxa from the most irradiated site, Cher4, resembled more the less radiation-exposed sites, the control Northern Ireland sample (B1.6) and Cher6, than the other Chernobyl sites (Figure 2). These samples shared relative similar proportions of dominant phyla, with Alphaproteobacteria comprising between ca. 20–30% SSU rDNAs in gene libraries, Bacteroidetes between ca. 20–35%, Acidobacteria between ca. 15–30% and Actinobacteria around 20% in B1.6 and Cher6. Actinobacteria were slightly less abundant (ca. 10%) in Cher4, where Betaproteobacteria represented ca. 12% of sequences in gene libraries. By contrast, Cher8, a sample of intermediate background radiation, was very poor in terms of bacterial diversity with 98% Actinobacteria and the remaining 2% corresponding to Deinococcales. The sample Cher2, the second most highly irradiated site had an intermediate profile between Cher8 and the rest, with a highly dominant proportion of Actinobacteria (ca. 70%), 17% of Betaproteobacteria and 10% of Deinococcales, but it also contained Alphaproteobacteria and Bacteroidetes, though in much lower proportions than the rest of samples except Cher8 (Figure 2). Finally, cyanobacterial sequences were only detected, though in relatively low amounts, in the Northern Ireland (B1.6) and Red Forest (Cher4) samples which, being at both extremes of the background radiation levels, showed the highest diversity.

The relatively low diversity of cyanobacteria and their detection in only two of the analyzed samples might seem surprising, since the presence of primary producers is a priori needed to sustain such a high diversity of typical heterotrophic bacteria phyla (Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria, Deinococcales). Some Alphaproteobacteria are photosynthesizers, but this is most probably not the case for most phylotypes encountered in Chernobyl biofilms, since they are not closely related to typically photosynthetic genera (Figure 3). There are two, not mutually exclusive explanations for this. First, a primary production activity seems assured in these samples by eukaryotic algae, which are present in all biofilms sampled (Figure 2; see below). Second, there might also be a bias against cyanobacteria due to their thick sheaths of exopolymeric substances, which makes cell lysis more difficult as compared to other bacteria. Consequently, the amount



**Figure 4. Phylogenetic tree of bacterial SSU rDNA sequences to the exclusion of Proteobacteria retrieved from sunlight-exposed biofilms in Chernobyl.** The tree was reconstructed by maximum likelihood using 634 non-ambiguously aligned positions. Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles show the presence of the OTU in the different samples, and the internal number corresponds to the number of occurrences of sequences in the corresponding gene libraries. Unc., uncultured.  
doi:10.1371/journal.pone.0021764.g004

of cyanobacterial DNA is usually lower, which translates into lower observed frequencies in gene libraries [67].

The overall bacterial diversity observed at the phylum level was paralleled by a relatively high intra-phylum or intra-class diversity in all the studied samples to the exclusion of the low-diversity sample Cher8. The most diverse group was that of the Alphaproteobacteria, with up to 14 different phylotypes or OTUs detected (Figure 3). Alphaproteobacteria constitute an extremely successful group of bacteria, encompassing a wide variety of metabolisms, from photo- and chemoautotrophy to photoheterotrophic and purely heterotrophic strategies [68]. In our samples, the most represented OTUs were related to various members of the genus *Roseomonas*, whose members produced pink-pigmented colonies and have been isolated from a variety of environments, including aquatic systems [68]. The closest cultivated member to any of our OTUs was the heterotrophic *R. aquatica* [69]. We also identified one phylotype branching within the C1-metabolizing bacteria of the genus *Methylobacterium*, also pink-pigmented bacteria frequently isolated from biofilms associated with the same kind of drinking-water systems and lakes [69,70]. Together with relatives of the genus *Roseomonas*, OTUs related to the alphaproteobacterial genus *Sphingomonas* were the most abundant and diverse. Members of this heterotrophic genus are found in a variety of environments, from soils to the deep subsurface and to endolithic communities in Antarctica, being involved in the degradation of complex aromatic compounds [71,72,73]. Together with the Alphaproteobacteria, members of the Betaproteobacteria were also present in the two most highly irradiated samples. Like Sphingomonadales, Betaproteobacteria are frequently involved in the degradation of chloroaromatic compounds, being frequently found in polluted soils and subsurface environments [74,75]. We also detected one deltaproteobacterial OTU related to the gliding-bacteria of the order Myxococcales in Cher4 (Figures 2 and 3).

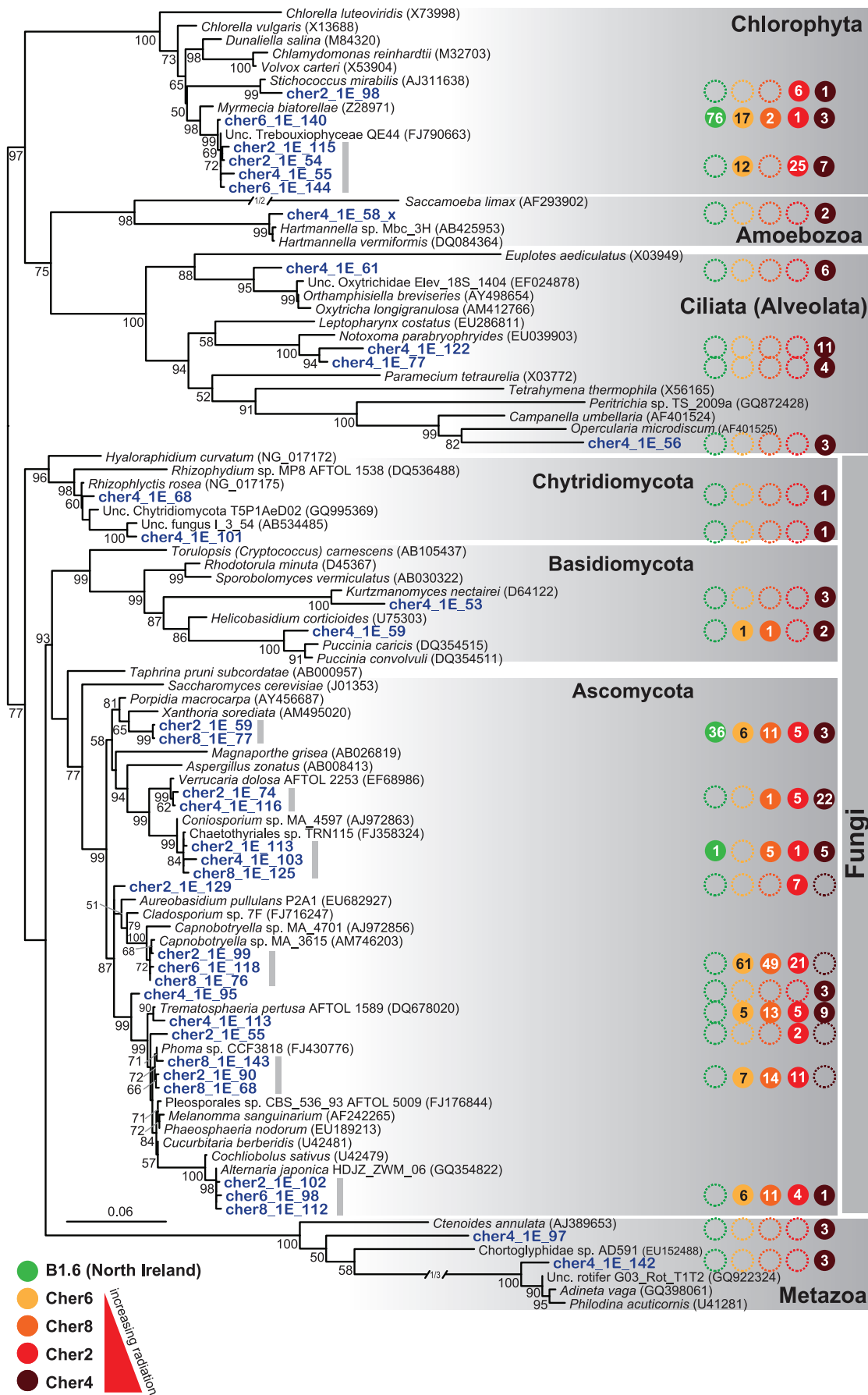
In addition to the Alphaproteobacteria, the two most abundant and diverse groups were Actinobacteria and Bacteroidetes with, respectively, ca. 10 different OTUs detected in the different biofilm samples (Figure 4). Acidobacteria, though relatively abundant, were only represented by three OTUs, which were related to either uncultured acidobacteria from soil or soil isolates [76]. Bacteroidetes, together with members of the less represented phyla Verrucomicrobia and Planctomycetales, are also frequently found in soils and sediments, being fundamentally heterotrophic bacteria. Within the Gram positive Actinobacteria, several OTUs were related to uncultured microorganisms but also to known genera, such as *Marmoricola* or the pigmented *Geodermatophilus*. However, by far, the most represented OTUs were related to the genus *Rubrobacter*, and more particularly, to *R. radiotolerans*, the most radiotolerant bacterium known to date [32,77]. In particular, the OTU represented by sequences cher2\_2B\_30, cher8\_1B\_44 and cher6\_1B\_36 (Figure 4) was dominant in most Chernobyl samples, though not detected in the most irradiated site, Cher4, where other *Rubrobacter*-related OTUs were detected. This OTU was also present in the control Northern Ireland sample. It was the only phylotype detected in the low-diversity Cher8 sample together with one *Deinococcus*-related sequence (Figures 2 and 4). The desiccation- and radiation-resistant Deinococcales were systematically present in all samples, though in low numbers, and were all

closely related to a *Deinococcus* sequence retrieved from an endolithic sample from Weissenstein (AB374378).

### Eukaryotic diversity of Chernobyl concrete biofilm communities

We also characterized the diversity of microbial eukaryotes associated with the sunlight exposed biofilms in Chernobyl and Northern Ireland samples by amplifying, cloning and sequencing SSU rRNA genes. The overall taxonomic distribution of sequences in gene libraries is shown in Figure 2. As in the case of bacteria, the sample from the Red Forest (Cher4) exhibited the largest variety of eukaryotic groups present, being comparable to that of the control sample from Northern Ireland. However, there was a remarkable constancy in all the samples regarding the presence of green algae (Chlorophyta) and ascomycete fungi. These two groups accounted for more than 90% (and up to 100% in the second most irradiated site, Cher2) in all the samples, except for Cher4, where they accounted only for slightly more than 50%. However, their relative proportions varied, with green algae dominating in B1.6 (ca. 60%) and ascomycetes dominating in Chernobyl samples (from 45 to 98%). In the case of Cher4, a relatively large proportion of ciliate (Alveolata) sequences were detected. Since ciliates have two nuclei, with the number of gene copies highly amplified in the macronuclei, the presence of a few cells can lead to an overrepresentation of sequences in the sample. This may be also the case if metazoans are present, since they contribute with more cells per individual and, hence, relatively larger amounts of DNA. For this reason, the relative proportions of these groups in libraries should be interpreted with caution, since they may not reflect actual organismal proportions. Both metazoans (rotifers) and ciliates are present in this sample but also, though in lower proportions, in the North Irish sample. This suggests that the communities of these biofilms are relatively rich. A few minor groups were also detected in various samples. These included a few sequences of basidiomycete fungi in several samples, but also of chytrids, which are flagellated anaerobic fungi, frequently parasitic or living in environments rich in organic matter [78,79].

Ascomycota was not only the most abundant group, but also the most diverse, with ten different OTUs detected in the biofilm samples, many of which were present in several Chernobyl samples and some even in the control Northern Ireland sample (Figure 5). The most widespread phylotype was the one represented by sequences cher2\_1E\_59 and cher8\_1E\_77, which was closely related to sequences of the genus *Xanthoria* (98% identity to *X. parietina*). Though ubiquitous, it was more abundant in the Northern Ireland sample. *Xanthoria* species are usually found as mycobionts in lichens, most often associated with green algae of the genus *Trebouxia* [80]. The most relatively abundant phylotype in samples where it was present (Cher2, Cher6, Cher8) was related to *Capnobotryella* (representative sequences cher2\_1E\_99, cher6\_1E\_118, cher8\_1E\_76). *Capnobotryella* is a black fungus frequently retrieved from monument surfaces, including energy transmission towers, and windows as well as desert areas [81,82,83,84]. *Capnobotryella* appears to colonize lichens in an opportunistic manner [82]. This phylotype was not found in the highly radiated sample Cher4, where another phylotype closely related to *Verrucaria* dominated (Figure 2). *Verrucaria* has been found forming endolithic desert lichens or lichens colonizing newly



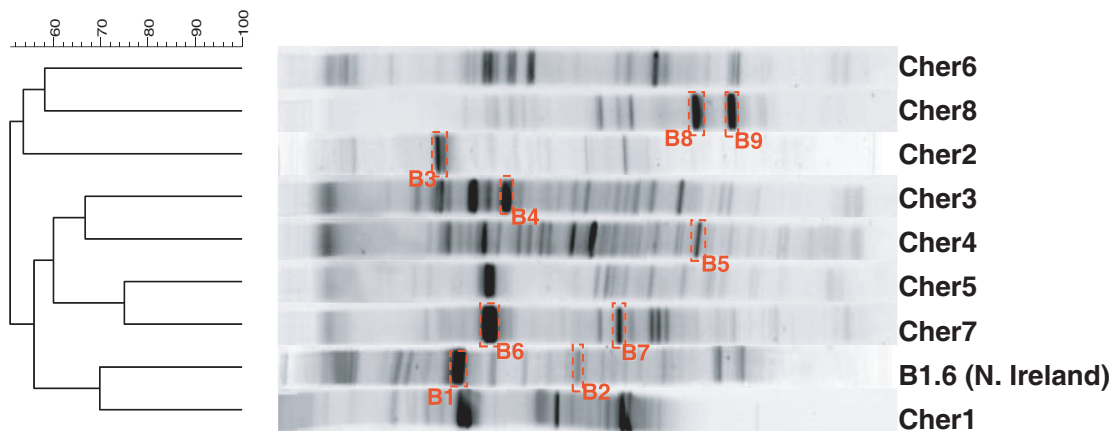
**Figure 5. Phylogenetic tree of eukaryote SSU rDNA sequences from Chernobyl sunlight-exposed biofilms.** The tree was reconstructed by maximum likelihood using 1,199 non-ambiguously aligned positions. Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles show the presence of the OTU in the different samples, and the internal number corresponds to the number of occurrences of sequences in the corresponding gene libraries. Unc., uncultured.  
doi:10.1371/journal.pone.0021764.g005

constructed stone structures [85,86]. In addition to the clearly dominant ascomycetes, we detected two different phylotypes for both basidiomycetes and chytrids, but only in the most diverse sample, Cher4. This sampling point also showed a relatively large diversity of ciliates, with four different phylotypes, suggesting that ciliates do not occur accidentally in this type of samples, but that they are relatively diverse and thrive on the biofilm surface, acting as grazers. Also amoebozoan sequences belonging to the genus *Hartmanniella* were detected in Cher4. Like several of the alphaproteobacteria identified, these amoebae are frequently detected in biofilms of drinking water systems. They usually

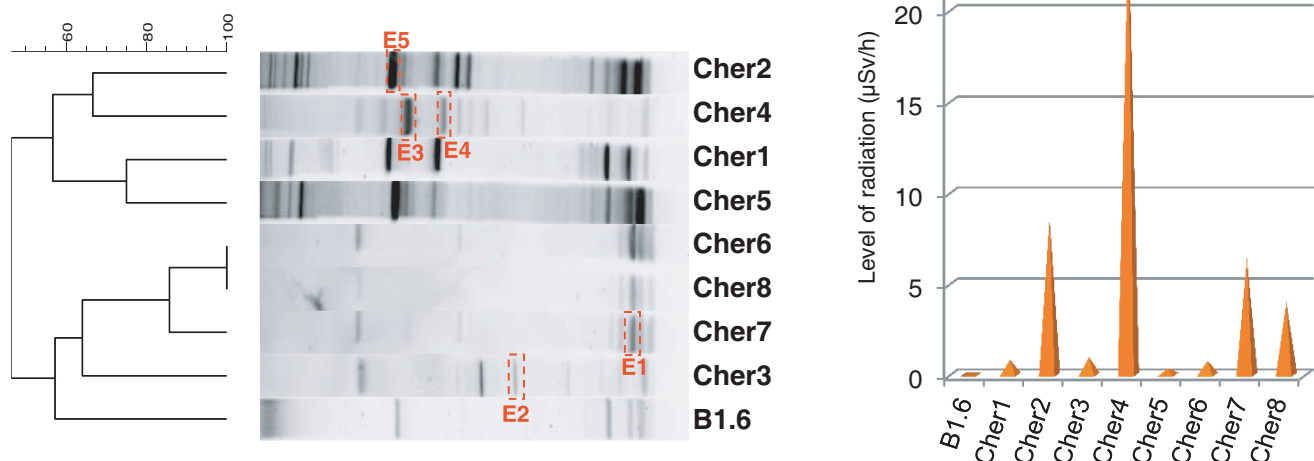
harbor endosymbiotic bacteria, mostly belonging to the Alphaproteobacteria and Chlamydiae [87,88].

Among photosynthetic eukaryotes, although green algae constituted an abundant group in most samples (Figure 2), their diversity was rather poor, in contrast to the ascomycete fungi. Three different phylotypes were identified, two of them were closely related among them and also related to the genus *Trebouxia* (98% similarity), while a third phylotype was related to the genus *Stichococcus*, all within the Trebouxiophyceae (Figure 5). Members of the two genera are known to form lichens, acting as photobionts, and very often they are found in endolithic

## Bacteria



## Eukaryotes



**Figure 6. Cluster analysis of DGGE fingerprints for bacteria (A) and eukaryotes (B) in Chernobyl concrete biofilms.** The histogram shows the relative levels of radioactivity measured *in situ* in Chernobyl samples ( $\mu\text{Sv/h}$ ).  
doi:10.1371/journal.pone.0021764.g006

**Table 2.** Taxonomic affiliation of relatively abundant and distinctive bacterial and eukaryotic SSU rDNA fragments from DGGE gels (Figure 6) and correspondence with sequences from SSU rRNA gene libraries.

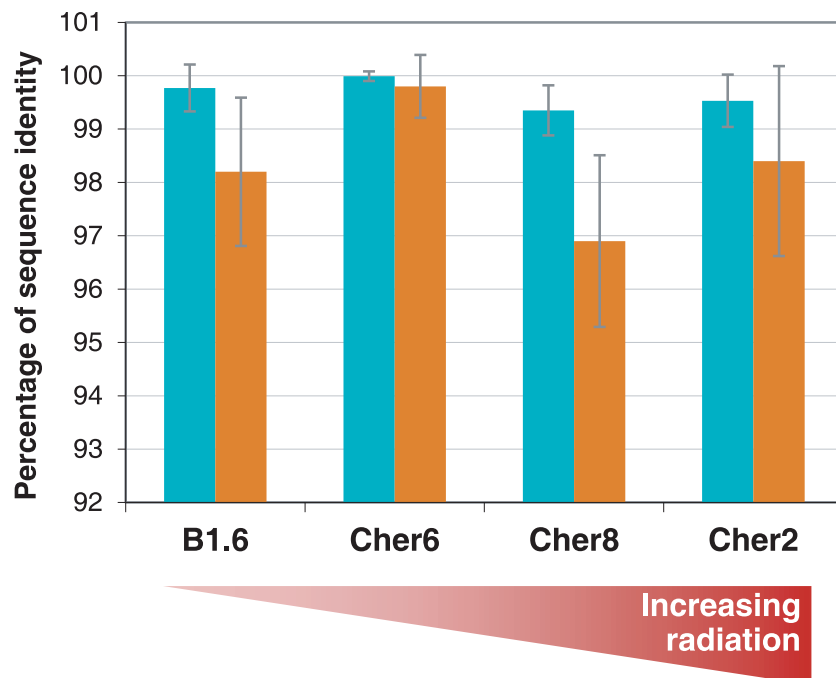
Band	First Hit	% identity	Phylogenetic ascription	Corresponding OTU
<b>BACTERIA</b>				
B1	cher4_2B_90	89	Bacteria; Cyanobacteria; Nostocales	cyanobacteria_OTU1
B2	cher4_2B_41	91	Bacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales	betaproteobacteria_OTU5
B3	cher4_2B_90	88	Bacteria; Cyanobacteria; Nostocales	cyanobacteria_OTU1
B4	cher4_2B_95	100	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria	bacteroidetes_OTU1
B5	cher2_1B_19	94	Bacteria; Alphaproteobacteria	alphaproteobacteria_OTU5
B6	cher4_2B_90	88	Bacteria; Cyanobacteria; Nostocales	cyanobacteria_OTU1
B7	cher6_1B_26	93	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria	bacteroidetes_OTU3
B8	cher2_1B_2	98	Bacteria; Actinobacteria	actinobacteria_OTU14
B9	cher2_1B_2	99	Bacteria; Actinobacteria	actinobacteria_OTU14
<b>EUKARYOTES</b>				
E1	cher2_1E_137	97	Fungi, Ascomycota	ascomycota_OTU5
E2	cher2_1E_115	87	Viridiplantae; Chlorophyta	chlorophyta_OTU3
E3	cher2_1E_113	95	Fungi, Ascomycota	ascomycota_OTU10
E4	cher2_1E_129	95	Fungi, Ascomycota	ascomycota_OTU7
E5	cher4_1E_142	89	Metazoa; Rotifera	metazoa_OTU2

doi:10.1371/journal.pone.0021764.t002

communities. The most abundant phylotype in most samples was closest to the environmental *Trebouxiophyceae* sequence QE44 (FJ790663), which was retrieved from quartz pavement in high altitude tundra of central Tibet [89]. Members of this group also form cryptoendolithic communities in Antarctica [35]. Many *Trebouxiophyta*, including *Trebouxia* species produce mycospor-

ine-like aminoacids, which play an important role in the protection of these lichen-forming algae against UV radiation [90,91]. They are also resistant to metals [92].

Given the co-existence and relative high abundances of *Trebouxia*-related phylotypes with *Xanthoria* and *Verrucaria*, it is likely that they form lichens, perhaps with some intervention of



**Figure 7. Percentage of sequence identity at SSU rRNA genes and adjacent ITS regions in the same *Rubrobacter* OTU from different populations.** Note that the scale at the ordinates begins at 92% to maximize potential differences between samples and markers. The bars correspond to the standard deviation.

doi:10.1371/journal.pone.0021764.g007

**Table 3.** Summary of the tests of the different effects using a deviance analysis using Type III decomposition.

Effects	df	Deviance	F value	Pr(F)	Significance
16S	1	118.33	7.0777	0.008	**
Pop	2	117.11	2.2385	0.109	
Ref	2	115.68	0.7310	0.482	
16SxPop	2	118.33	3.5353	0.031	*
16SxRef	2	115.60	0.6406	0.528	
PopxRef	4	122.25	3.8508	0.005	**

\*P&lt;0.05,

\*\*P&lt;0.01.

16S (SSU rDNA) and all subsequent terms implying this variable are regressors. Pop (Chernobyl population) and Ref (Northern Irish reference sequence) are qualitative effects.

doi:10.1371/journal.pone.0021764.t003

*Capnobotryella*, though both photobiont and mycobiont can exist and disperse as free-living forms [80,93].

### Comparison of DGGE fingerprints from different biofilm communities

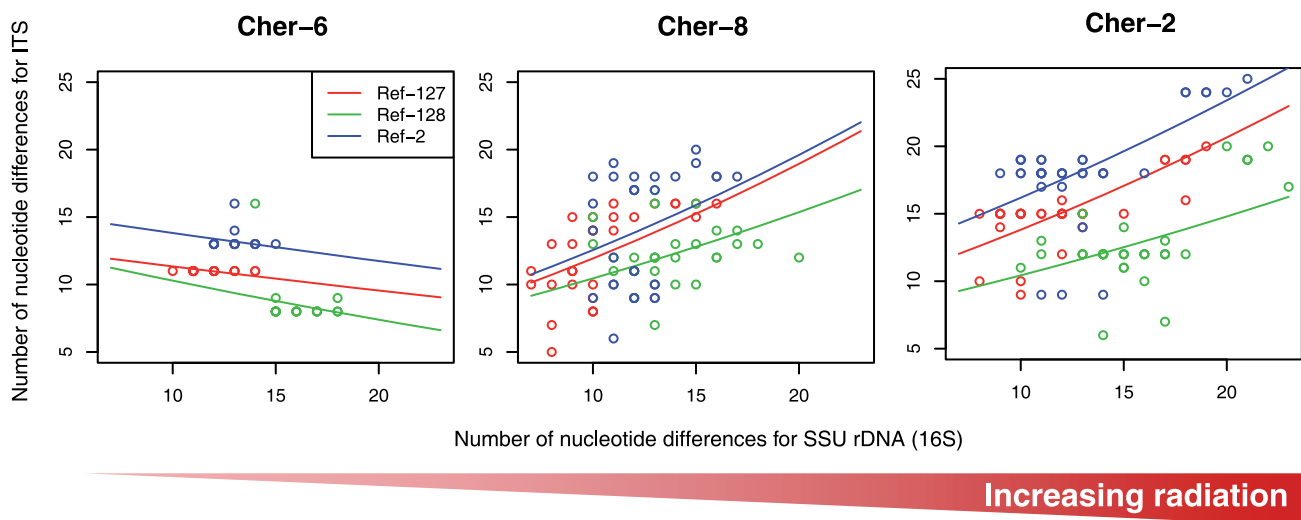
We extended our comparative analysis of diversity profiles to the rest of Chernobyl samples to better cover the range of radiation levels and to limit potential effects due to local heterogeneity. For this, we carried out DGGE fingerprinting analyses for both bacteria and eukaryotes based on the amplification of a SSU rDNA fragment in all Chernobyl samples, including the samples that we analyzed in greater detail by constructing gene libraries, four additional Chernobyl samples (Table 1) plus the control B1.6 sample from Northern Ireland. We then clustered the samples as a function of the presence or absence of bands in the DGGE patterns (Figure 6). The results obtained by this approach confirmed the observation already made by analyzing the SSU rRNA gene libraries. First, the patterns observed, particularly in the case of bacteria, contained numerous bands, suggesting that bacteria are diverse in these samples.

Second, a specific trend that would tend to group DGGE patterns of high radiation versus low radiation samples was not apparent. In the case of bacteria no clear grouping of patterns was visible. In the case of eukaryotes, samples Cher6, Cher7 and Cher8 showed very similar patterns with few bands, although they varied in relative intensities (Figure 6). Actually, the eukaryotic diversity between Cher6 and Cher8 as deduced from gene libraries was qualitatively similar, though in Cher8 ascomycetes proved to be much more abundant than green algae (Figure 2).

In order to facilitate the association between the DGGE patterns and the bacterial and eukaryotic diversity identified by SSU rDNA sequence analysis, we cut off some of the distinctive and more intense bands in gels, purified the DNA and sequenced the SSU rDNA fragments once re-amplified (Figure 6). As shown in Table 2, those bands corresponded to bacterial or eukaryotic lineages already identified in gene libraries. Two of the intense bands, in particular in Cher7, but also in Cher2, corresponded to cyanobacteria, suggesting that these photosynthetic bacteria are also present in samples, but underrepresented in SSU rDNA libraries. The other bacterial DGGE bands that we identified corresponded to Alpha- and Betaproteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria. In the case of eukaryotes, most of the DGGE bands analyzed corresponded to ascomycete fungi, one band to a green alga and another one to a rotifer (Table 2). These data correlated well with the diversity observed from SSU rRNA gene library analysis and confirmed the quantitative importance of some phylotypes.

### Mutation rates in ITS versus SSU rDNA regions in members of the same OTU from samples with different background radiation levels

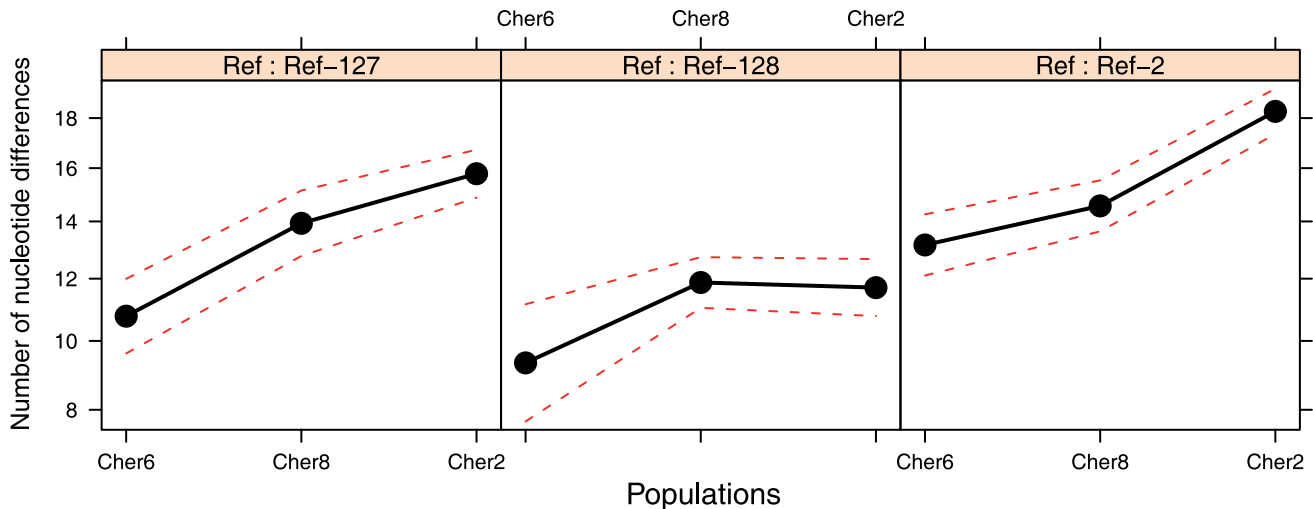
Increased mutation rates have been observed in animals and plants in the Chernobyl region after the accident, and this may also apply to some human-pathogenic bacteria and retroviruses [13]. However, this kind of studies is missing for natural populations of free-living bacteria. We took advantage of the fact that one of the most abundant bacterial OTUs, which is ascribed to the genus *Rubrobacter* (cher2\_2B\_30, cher8\_1B\_44 and cher6\_1B\_36), was present in relative high proportions (>20



**Figure 8. Relationship between SSU rRNA and the corresponding ITS variability (number of differing nucleotides) by comparison with Northern Ireland control sequences.** Each graph corresponds to a sampled location in the Chernobyl area. Each color represents a particular reference sequence: red (Ref-127), green (Ref-128), blue (Ref-2).

doi:10.1371/journal.pone.0021764.g008





**Figure 9. Adjusted means by population of the number of differing nucleotides as compared to the control Northern Ireland sequences (Ref-127, Ref-128, Ref-2 from left to right).** The Y-axis represents the number of expected differences when assuming a similar level of SSU rRNA variation set to the general mean (i.e. ca. 13 differing nucleotides). doi:10.1371/journal.pone.0021764.g009

sequences per sample) in three Chernobyl samples experiencing different ionizing-radiation levels and also in the control sample from Northern Ireland (3 occurrences) (Figure 4). We then sequenced the ITS region adjacent to the SSU rRNA gene for an equivalent number of clones in the Chernobyl samples (20, 30 and 36 for Cher6, Cher8 and Cher2, of increasing background radiation levels, respectively). Since the ITS is a non-coding region, it is generally considered as neutral marker when compared to highly conserved genes subject to strong purifying selection, such as the SSU rRNA gene. If ionizing radiation had a positive effect on the mutation rate of these bacteria, we would expect that a higher number of substitutions or single nucleotide polymorphisms (SNPs) accumulate in the ITS region as compared to the SSU rDNA (the OTU's identity marker within a limited range of sequence identity, usually >97%) as background radiation increases. In our case, there was some variation between populations at the SSU rDNA level, but in all cases the average percentage of nucleotide identity within and among populations was higher than 99%, which corresponds to a conservative definition of OTU for bacteria. The ITS regions were more variable, with averages varying between nearly 97% to nearly 100% nucleotide identity among populations (Figure 7). The highest difference between ITS and SSU rDNA average substitution frequency was found in the low-diversity sample Cher8, and the lowest in Cher6, where both SSU rDNA and ITS regions were remarkably homogeneous. Therefore, despite slight differences between samples in terms of average substitution rates of ITS versus SSU rDNAs, a potential correlation of these with increasing radiation was not apparent from this first-hand inspection. Notably, average SSU rDNA and ITS percentage nucleotide identities were very similar between the non-irradiated North Irish site and the most irradiated sample in this case, Cher2 (Figure 7).

Nevertheless, in order to get a deeper insight in these observations and to fully discern the effects of radiation on both genetic markers we used statistical modeling. This approach allowed us to tell apart the effects of natural phylogenetic variation within a same OTU (linked to the intrinsic SSU rDNA variability) from that of ionizing radiation acting upon a supposedly neutral

marker such as the ITS. We found an overall significant and positive relationship between the variability observed for the SSU rRNA and the ITS sequences when using the Irish external reference (Table 3). First, as expected, larger differences for the SSU rRNA correlated with larger differences for the ITS region within sequences belonging to the same OTU. Interestingly, this statistical analysis revealed a significant effect of the considered population on this relationship (Table 3). The less irradiated Cher-6 population exhibited no relationship between SSU rRNA and ITS variability, whereas the samples from the Cher-8 and Cher-2 populations, subject to increasing radiation levels, exhibited positive correlations, with more phylogenetically divergent SSU rDNA sequences being associated with more divergent ITS sequences (Figure 8). The absence of positive correlation in SSU rDNA/ITS substitution frequency in Cher-6 result is due to the very weak level of ITS variation relative to the SSU rDNA. This might seem surprising since the ITS region should exhibit higher variations than the highly conserved SSU rDNA. However, the Cher-6 sample is the smallest one (20 sequences) and, consequently, a raw data analysis of this kind should be considered with caution. For instance, observed differences at the SSU rRNA among the three sampled populations could lead to misinterpretation about population or reference-sequence effects. To get rid of such potential biases, i.e. of the ITS variability due to natural intra-OTU SSU rDNA variability, we computed adjusted means of the number of expected differences for the ITS region for the same level of SSU rRNA variability that we set to the general mean over all samples (i.e. about 13 different nucleotides per sample with the references sequences). These computations were made using the estimated coefficient of the statistical model (Table S1).

When the effect of intra-OTU SSU rDNA variability was removed, we observed a clear difference between populations at the level of ITS substitution frequency, with the less radiation-exposed site having significantly less ITS mutations than the more exposed sites (Figure 9). Thus, Cher-6, the less radiated population, always exhibited the lowest ITS diversity level (Figure 9) whatever the reference sequence. Moreover, when considering Ref-127 and Ref-2 as control sequences, the divergence ranking was in accordance with the exposure level, most exposed populations exhibiting the highest level of nucleotide

substitutions. The results obtained from the Ref-128 control sequence showed a less clear pattern, with larger confidence intervals, although still showing a clear trend toward less divergent ITS sequences for the Cher-6 population (Figure 9). These results support the hypothesis of a larger mutation rate induced by increasing ionizing-radiation levels around Chernobyl. Furthermore, given that the ITS sequence used in this study was relatively short (355 bp) compared to the SSU rRNA fragment sequence (1387 bp), the use of longer ITS or other neutral marker sequences would probably have strengthened the observed pattern.

### Concluding remarks

In the present work, we explored the microbial diversity of microorganisms forming biofilms on concrete pillars and walls being naturally exposed to sunlight in sites with different levels of background ionizing-radiation in the Chernobyl area and compared it with that found at a geographically distant control site in Northern Ireland. We aimed at describing the microbial diversity in a comprehensive way by studying microorganisms from the three domains of life and at different resolution levels, from the relative distributions of high-rank taxa to OTU and even intra-OTU (“intraspecific”) levels. Despite intense efforts, recurrent failure to amplify archaeal SSU rRNA genes with several primer combinations strongly suggests that members of this domain of life are not present in this type of concrete-associated biofilms or are present in very minor proportions. Although some differences in the relative proportions of bacteria and microbial eukaryotes exist between the different samples, the most characteristic and/or relatively abundant taxonomic groups present in these biofilms seem to be Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria and Deinococcales within the bacteria and green algae (Chlorophyta) and ascomycete fungi (Ascomycota) within the eukaryotes.

Some members of the Actinobacteria (particularly *Rubrobacter* species), Deinococcales and melanized ascomycete fungi are the most radio-resistant organisms known, and it could be hypothesized that their presence in Chernobyl is a consequence of the selection imposed by high ionizing radiation. According to this view, a decrease in the specific diversity should also be observed with increasing radiation. However, our studies indicate that the diversity of bacteria and eukaryotes found in the most highly irradiated samples is comparable (or even higher) than that found in less irradiated Chernobyl sites and in Northern Ireland. This can be seen at different levels of resolution, from high-rank taxa diversity (Figure 2), to OTU diversity (Figures 3, 4, 5) in the samples studied by sequencing clones from SSU rRNA gene libraries, but can also be seen in additional samples from Chernobyl by DGGE fingerprinting analyses (Figure 6). This does not mean that radiation does not affect these microbial communities, since the study of mutation frequencies in non-coding ITS regions versus SSU rRNA genes in members of a same actinobacterial OTU present in samples from Chernobyl and Northern Ireland showed a positive correlation between increased radiation and mutation rates. Therefore, a comparable microbial diversity is maintained in spite of higher mutation rates in sites exposed to increasing radiation levels, which suggests that these organisms are capable of coping with such increased mutation frequency.

Despite this general trend, two Chernobyl samples appeared somewhat divergent from the rest, which might be explained by a

local heterogeneity effect. One corresponds to Cher4 in the Red Forest, which is subject to the highest doses of radiation measured (25  $\mu$ Sv/h; Table 1), and that, paradoxically, exhibited the largest microbial diversity observed, although showing basically the same taxa as the other biofilm samples. The other sample was Cher8, which systematically exhibited a low diversity both for bacteria and eukaryotes, with typical radiation-resistant Actinobacteria and Ascomycota dominating the sample, and with apparent higher mutation frequencies at the ITS versus the SSU rDNA (Figure 7). However, at single-OTU level, Cher8 showed intermediate mutation rates, which is consistent with its intermediate background radiation exposure (Figures 8 and 9). The diversity pattern of Cher8 might perhaps be related to the presence of increased local metal concentrations within the biofilm. Actinobacteria are important in soils enriched in heavy metals [94], and ascomycete fungi are also known to be highly resistant to important metal concentrations [92,95]. At any rate, even if these two slightly different samples were excluded from the analyses, the diversity of the remaining samples (including the outgroup Irish sample) is remarkably similar, despite an increase in mutation rate with increasing ionizing radiation.

Our results show that biofilm microbial communities in the most highly irradiated Chernobyl samples are not significantly different from those of non-irradiated samples, despite the occurrence of higher mutation rates. Therefore, the diversity in these biofilms is not necessarily the consequence of ionizing radiation as a predominant selective pressure, although the latter could lead to an increased fine-scale genetic diversity. On the contrary, our results show that characteristic members of these biofilms, such as Actinobacteria, Deinococcales and pigmented ascomycete fungi, are typical formers of biofilms in UV-exposed areas, rocks and monument surfaces or as endolithic organisms. Therefore, their natural adaptations to UV radiation and to desiccation can be considered as pre-adaptations (*ex-aptations*) to cope with the high levels of ionizing radiation occurring at Chernobyl.

### Supporting Information

**Figure S1** Accumulation curves for SSU rDNA libraries of biofilm samples in Chernobyl (Cher) and Northern Ireland. In all cases, the number of different sequences observed is plotted against the number of sequences analyzed. The different curves in each plot indicate the various cut-off values considered (grey box) from 0 to 5% divergence. Generally, 97–98% identity is used to define OTU levels representing the species level.  
(PDF)

**Table S1** Regression and interaction coefficients estimated using the model described in the Methods section.  
(PDF)

### Acknowledgments

T. A. Mousseau kindly took the photographs of the sample sites in Ukraine.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PLG. Performed the experiments: MR. Analyzed the data: MR GR DM PLG. Contributed reagents/materials/analysis tools: PLG. Wrote the paper: PLG GR MR. Sampling and field measurements: APM.

### References

- Moller AP, Mousseau TA (2006) Biological consequences of Chernobyl: 20 years on. *Trends Ecol Evol* 21: 200–207.
- Geras'kin SA, Fesenko SV, Alexakhin RM (2008) Effects of non-human species irradiation after the Chernobyl NPP accident. *Environ Int* 34: 880–897.

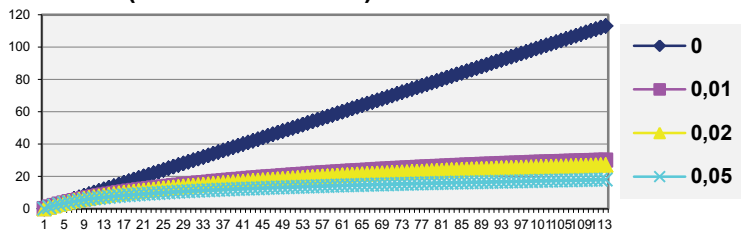
3. Yablokov AV (2009) 9. Chernobyl's radioactive impact on flora. *Ann N Y Acad Sci* 1181: 237–254.
4. Zhdanova NN, Redchits TI, Zheltonozhsky VA, Sadovnikov LV, Gerzabek MH, et al. (2003) Accumulation of radionuclides from radioactive substrata by some micromycetes. *J Environ Radioact* 67: 119–130.
5. Dighton J, Tugay T, Zhdanova N (2008) Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiol Lett* 281: 109–120.
6. Zhdanova NN, Tugay T, Dighton J, Zheltonozhsky V, McDermott P (2004) Ionizing radiation attracts soil fungi. *Mycol Res* 108: 1089–1096.
7. Tugay T, Zhdanova NN, Zheltonozhsky V, Sadovnikov L, Dighton J (2006) The influence of ionizing radiation on spore germination and emergent hyphal growth response reactions of microfungi. *Mycologia* 98: 521–527.
8. Kimura S, Ishidou E, Kurita S, Suzuki Y, Shibato J, et al. (2006) DNA microarray analyses reveal a post-irradiation differential time-dependent gene expression profile in yeast cells exposed to X-rays and gamma-rays. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 51–60.
9. Zhdanova NN, Zakharchenko VA, Vember VV, Nakonechnaya LT (2000) Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycol Res* 104: 1421–1426.
10. Zhdanova NN, Vasilevskaya AI, Artyshkova LV, Sadovnikov YS, Lashko TN, et al. (1994) Changes in micromycete communities in soil in response to pollution by long-lived radionuclides emitted in the Chernobyl accident. *Mycol Res* 98: 789–795.
11. Dadachova E, Casadevall A (2008) Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Curr Opin Microbiol* 11: 525–531.
12. Dadachova E, Bryan RA, Huang X, Moadel T, Schweitzer AD, et al. (2007) Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS ONE* 2: e457.
13. Yablokov AV (2009) 11. Chernobyl's radioactive impact on microbial biota. *Ann N Y Acad Sci* 1181: 281–284.
14. Czirjak GA, Moller AP, Mousseau TA, Heeb P (2010) Microorganisms associated with feathers of barn swallows in radioactively contaminated areas around chernobyl. *Microb Ecol* 60: 373–380.
15. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143–169.
16. Romanovskaia VA, Rokitko PV, Malashenko Iu R (2000) Unique properties of highly radioresistant bacteria. *Mikrobiologiya Z* 62: 40–63.
17. Romanovskaia VA, Rokitko PV, Malashenko Iu R, Krishtab TP, Chernaiia NA (1999) Sensitivity of soil bacteria isolated from the alienated zone around the Chernobyl Nuclear Power Plant to various stress factors. *Mikrobiologiya* 68: 534–539.
18. Romanovskaia VA, Sokolov IG, Rokitko PV, Chernaiia NA (1998) Ecological consequences of radioactive pollution for soil bacteria within the 10-km region around the Chernobyl Atomic Energy Station. *Mikrobiologiya* 67: 274–280.
19. Zavilgelsky GB, Abilev SK, Sukhodolets VV, Ahmad SI (1998) Isolation and analysis of UV and radio-resistant bacteria from Chernobyl. *J Photochem Photobiol B* 43: 152–157.
20. Charmasson S, Sarradin PM, Le Faouder A, Agarande M, Luyen J, et al. (2009) High levels of natural radioactivity in biota from deep-sea hydrothermal vents: a preliminary communication. *J Environ Radioact* 100: 522–526.
21. Jolivet E, L'Haridon S, Corre E, Forterre P, Prieur D (2003) *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 847–851.
22. Jolivet E, Corre E, L'Haridon S, Forterre P, Prieur D (2004) *Thermococcus marinus* sp. nov. and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation. *Extremophiles* 8: 219–227.
23. Cadet J, Sage E, Douki T (2005) Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 571: 3–17.
24. Cadet J, Douki T, Ravanat JL (2010) Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic Biol Med* 49: 9–21.
25. Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, et al. (2007) Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biol* 5: e92.
26. Brooks BW, Murray RGE (1981) Nomenclature for *Micrococcus radiodurans* and other radiation-resistant cocci - Deinococcaceae fam. nov. and *Deinococcus* ge.nov., including 5 species. *Int J Syst Bacteriol* 31: 353–360.
27. Suzuki K, Collins MD, Iijima E, Komagata K (1988) Chemotaxonomic characterization of a radiotolerant bacterium, *Arthrobacter radiotolerans* - description of *Rubrobacter radiotolerans* gen. nov., comb. nov. *FEMS Microbiol Lett* 52: 33–39.
28. de Groot A, Chapon V, Servant P, Christen R, Saux MF, et al. (2005) *Deinococcus deserti* sp. nov., a gamma-radiation-tolerant bacterium isolated from the Sahara Desert. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2441–2446.
29. Chanal A, Chapon V, Benzerara K, Barakat M, Christen R, et al. (2006) The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environ Microbiol* 8: 514–525.
30. Shrivage BV, Dayananda KM, Patole MS, Shouche YS (2007) Molecular microbial diversity of a soil sample and detection of ammonia oxidizers from Cape Evans, McMurdo Dry Valley, Antarctica. *Microbiol Res* 162: 15–25.
31. Wong FKY, Lacap DC, Lau MCY, Aitchison JC, Cowan DA, et al. (2010) Hypolithic microbial community of quartz pavement in the high-altitude tundra of Central Tibet. *Microb Ecol* 60: 730–739.
32. Ferreira AC, Nobre MF, Moore E, Rainey FA, Battista JR, et al. (1999) Characterization and radiation resistance of new isolates of *Rubrobacter radiotolerans* and *Rubrobacter xylanophilus*. *Extremophiles* 3: 235–238.
33. Imperi F, Caneva G, Cancellieri L, Ricci MA, Sodo A, et al. (2007) The bacterial aetiology of rosy discoloration of ancient wall paintings. *Environ Microbiol* 9: 2894–2902.
34. Rainey FA, Ray K, Ferreira M, Gatz BZ, Nobre MF, et al. (2005) Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Appl Environ Microbiol* 71: 5225–5235.
35. de la Torre JR, Goebel BM, Friedmann EI, Pace NR (2003) Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Appl Environ Microbiol* 69: 3858–3867.
36. Pointing SB, Warren-Rhodes KA, Lacap DC, Rhodes KL, McKay CP (2007) Hypolithic community shifts occur as a result of liquid water availability along environmental gradients in China's hot and cold hyperarid deserts. *Environ Microbiol* 9: 414–424.
37. Pellerin A, Laccelle D, Fortin D, Clark ID, Lauriol B (2009) Microbial diversity in endostromatolites (cf. fissure calcrites) and in the surrounding permafrost landscape, Houghton impact structure region, Devon Island, Canada. *Astrobiol* 9: 807–822.
38. White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, et al. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286: 1571–1577.
39. Asgarani E, Terato H, Asagoshi K, Shahmohammadi HR, Ohyama Y, et al. (2000) Purification and characterization of a novel DNA repair enzyme from the extremely radioresistant bacterium *Rubrobacter radiotolerans*. *J Radiat Res (Tokyo)* 41: 19–34.
40. Liu Y, Zhou J, Omelchenko MV, Beliaev AS, Venkateswaran A, et al. (2003) Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4191–4196.
41. Slade D, Radman M (2011) Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 133–191.
42. Sghaier H, Ghedira K, Benkahla A, Barkallah I (2008) Basal DNA repair machinery is subject to positive selection in ionizing-radiation-resistant bacteria. *BMC Genomics* 9: e297.
43. Saito T, Terato H, Yamamoto O (1994) Pigments of *Rubrobacter radiotolerans*. *Arch Microbiol* 162: 414–421.
44. Tian B, Hua YJ (2010) Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus-Thermus* bacteria. *Trends Microbiol* 18: 512–520.
45. Fredrickson JK, Li SM, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Zhai M, et al. (2008) Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? *ISME J* 2: 393–403.
46. Daly MJ (2009) A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat Rev Microbiol* 7: 237–245.
47. Shestopalov VM (1996) Atlas of Chernobyl exclusion zone. Kiev: Ukrainian Academy of Science.
48. RPII (2008) Radioactivity monitoring of the Irish Environment. Dublin: Radiological Protection Institute of Ireland.
49. McAuley IR, Moran D (1989) Radiocesium fallout in Ireland from the Chernobyl accident. *J Radiol Prot* 9: 29–32.
50. Yablokov AV, Nesterenko VB, Nesterenko AV (2009) 8. Atmospheric, water, and soil contamination after Chernobyl. *Ann NY Acad Sci* 1181: 223–236.
51. Schloss PD, Handelsman J (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* 71: 1501–1506.
52. Janse I, Bok J, Zwart G (2004) A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* 57: 279–281.
53. Sokal R, Michener C (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* 38: 1409–1438.
54. Jaccard P (1901) Distribution de la flore alpine dans le bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 37: 241–272.
55. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
56. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792–1797.
57. Philippe H (1993) MUST, a computer package of Management Utilities for Sequences and Trees. *Nucleic Acids Res* 21: 5264–5272.
58. Jobb G, von Haeseler A, Strimmer K (2004) TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol Biol* 4: 18.
59. McCullagh P, Nelder JA (1989) Generalized linear models. Boca Raton, Florida: Chapman & Hall/C.R.C. Press. 511 p.
60. Team RDC (2011) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.
61. Fow J (2003) Effects displays in R for generalized linear models. *J Statistical Software* 8: 1–27.
62. López-García P, Moreira D (2008) Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Res Microbiol* 159: 67–73.

63. Cappitelli F, Principi P, Pedrazzani R, Toniolo L, Sorlini C (2007) Bacterial and fungal deterioration of the Milan Cathedral marble treated with protective synthetic resins. *Sci Total Environ* 385: 172–181.
64. Pinar G, Ripka K, Weber J, Sterflinger K (2009) The micro-biota of a sub-surface monument the medieval chapel of St. Virgil (Vienna, Austria). *Intl Biodet Biodegr* 63: 851–859.
65. Etenauer J, Sterflinger K, Pinar G (2010) Cultivation and molecular monitoring of halophilic microorganisms inhabiting an extreme environment presented by a salt-attacked monument. *Int J Astrobiol* 9: 59–72.
66. Pinar G, Saiz-Jimenez C, Schabereiter-Gurtner C, Blanco-Varela MT, Lubitz W, et al. (2001) Archaeal communities in two disparate deteriorated ancient wall paintings: detection, identification and temporal monitoring by denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Ecol* 37: 45–54.
67. Pinto FL, Thapper A, Sontheim W, Lindblad P (2009) Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Mol Biol* 10: 79.
68. Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2002) *Brock Biology of Microorganisms*, 10th edition. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.
69. Gallego V, Sanchez-Porro C, Garcia MT, Ventosa A (2006) *Roseomonas aquatica* sp. nov., isolated from drinking water. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2291–2295.
70. Nercessian O, Noyes E, Kalyuzhnaya MG, Lidstrom ME, Chistoserdova L (2005) Bacterial populations active in metabolism of C1 compounds in the sediment of Lake Washington, a freshwater lake. *Appl Environ Microbiol* 71: 6885–6899.
71. Fredrickson JK, Balkwill DL, Drake GR, Romine MF, Ringelberg DB, et al. (1995) Aromatic-degrading Sphingomonas isolates from the deep subsurface. *Appl Environ Microbiol* 61: 1917–1922.
72. Hughes KA, Lawley B (2003) A novel Antarctic microbial endolithic community within gypsum crusts. *Environ Microbiol* 5: 555–565.
73. Shi T, Fredrickson JK, Balkwill DL (2001) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* strains isolated from the terrestrial subsurface. *J Ind Microbiol Biotechnol* 26: 283–289.
74. Perez-Pantoja D, De la Iglesia R, Pieper DH, Gonzalez B (2008) Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiol Rev* 32: 736–794.
75. Trefault N, De la Iglesia R, Molina AM, Manzano M, Ledger T, et al. (2004) Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environ Microbiol* 6: 655–668.
76. Sait M, Hugenholtz P, Janssen PH (2002) Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ Microbiol* 4: 654–666.
77. Kausar J, Ohyama Y, Terato H, Ide H, Yamamoto O (1997) 16S rRNA gene sequence of *Rubrobacter radiotolerans* and its phylogenetic alignment with members of the genus *Arthrobacter*, gram-positive bacteria, and members of the family Deinococcaceae. *Int J Syst Bacteriol* 47: 684–686.
78. Barr DJ (1978) Taxonomy and phylogeny of chytrids. *Biosystems* 10: 153–165.
79. Tanabe Y, Watanabe MM, Sugiyama J (2005) Evolutionary relationships among basal fungi (Chytridiomycota and Zygomycota): Insights from molecular phylogenetics. *J Gen Appl Microbiol* 51: 267–276.
80. Bubrick P, Galun M, Frensdorff A (1984) Observations on free-living *Trebouxia* Depuymany and *Pseudotrebouxia* Archibald, and evidence that both symbionts from *Xanthoria parietina* (L) th fr can be found free-living in nature. *New Phytologist* 97: 455–462.
81. Sette LD, Passarini MRZ, Rodrigues A, Leal RR, Simioni KCM, et al. (2010) Fungal diversity associated with Brazilian energy transmission towers. *Fungal Divers* 44: 53–63.
82. Harutyunyan S, Muggia L, Grube M (2008) Black fungi in lichens from seasonally arid habitats. *Stud Mycol* 61: 83–90.
83. Sert H, Sumbul H, Sterflinger K (2007) A new species of *Capnobotryella* from monument surfaces. *Mycol Res* 111: 1235–1241.
84. Schabereiter-Gurtner C, Pinar G, Lubitz W, Rolke S (2001) Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis. *J Microbiol Meth* 47: 345–354.
85. Garvie LA, Knauth LP, Bungartz F, Klonowski S, Nash TH, 3rd (2008) Life in extreme environments: survival strategy of the endolithic desert lichen *Verrucaria rubrocincta*. *Naturwissenschaften* 95: 705–712.
86. Nascimbene J, Thus H, Marini L, Nimis PL (2009) Early colonization of stone by freshwater lichens of restored habitats: a case study in northern Italy. *Sci Total Environ* 407: 5001–5006.
87. Berry D, Xi C, Raskin L (2006) Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr Opin Biotechnol* 17: 297–302.
88. Horn M, Wagner M (2004) Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *J Eukaryot Microbiol* 51: 509–514.
89. Wong FK, Lacap DC, Lau MC, Aitchison JC, Cowan DA, et al. (2010) Hypolithic microbial community of quartz pavement in the high-altitude tundra of central Tibet. *Microb Ecol* 60: 730–739.
90. Karsten U, Friedl T, Schumann R, Hoyer K, Lembecke S (2005) Mycosporine-like amino acids and phylogenies in green algae: Prasiola and its relatives from the Trebouxiphyceae (Chlorophyta). *J Phycol* 41: 557–566.
91. Karsten U, Lembecke S, Schumann R (2007) The effects of ultraviolet radiation on photosynthetic performance, growth and sunscreen compounds in acroterrestrial biofilm algae isolated from building facades. *Planta* 225: 991–1000.
92. Backor M, Fahsel D (2008) Lichen photobionts and metal toxicity. *Symbiosis* 46: 1–10.
93. Wornik S, Grube M (2010) Joint dispersal does not imply maintenance of partnerships in lichen symbioses. *Microb Ecol* 59: 150–157.
94. Gremion F, Chatzinotas A, Harms H (2003) 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* 5: 896–907.
95. Gadd GM (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res* 111: 3–49.

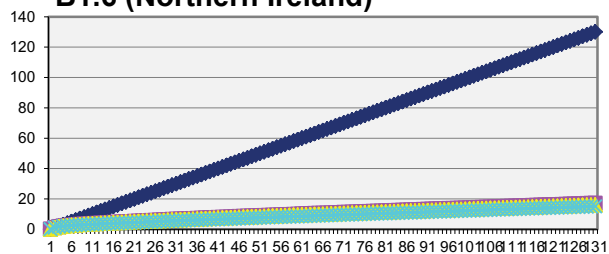
# Bacteria

# Eukaryotes

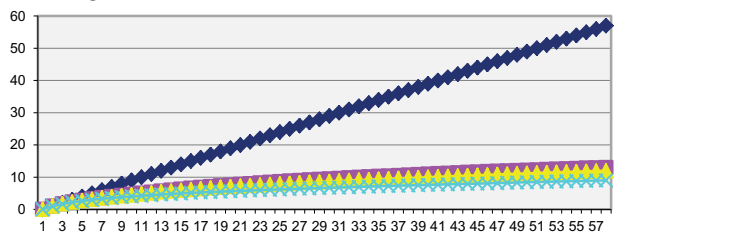
## B1.6 (Northern Ireland)



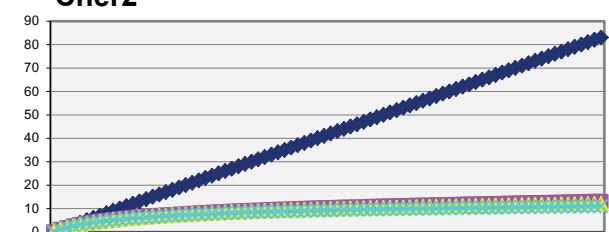
## B1.6 (Northern Ireland)



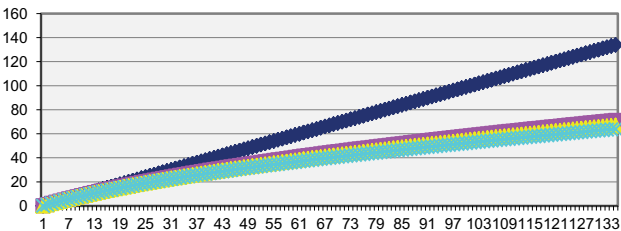
## Cher2



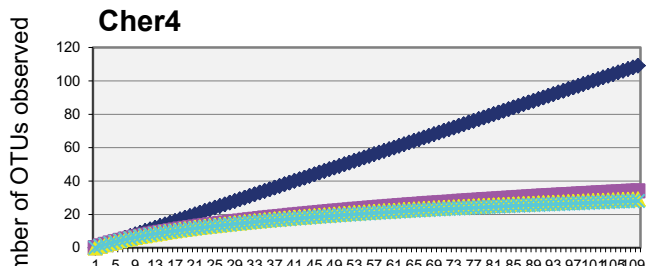
## Cher2



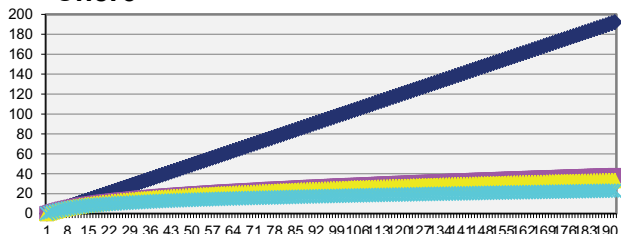
## Cher4



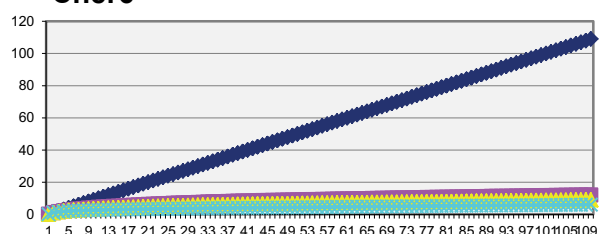
## Cher4



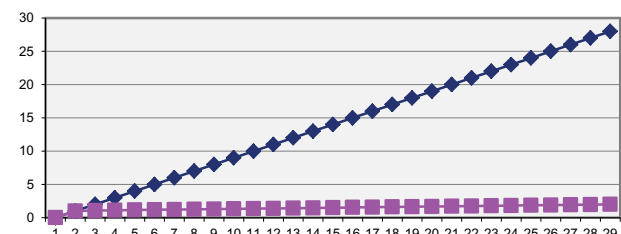
## Cher6



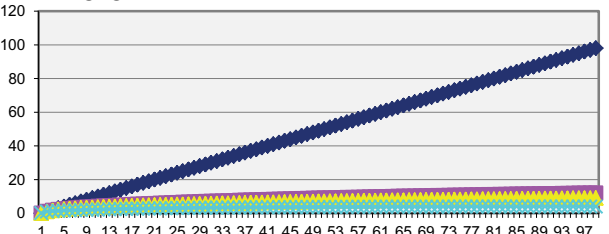
## Cher6



## Cher8



## Cher8



Number of sequences sampled

Number of sequences analyzed

**Figure S1.** Accumulation curves for SSU rDNA libraries of biofilm samples in Chernobyl (Cher) and North Ireland. In all cases, the number of different sequences observed is plotted against the number of sequences analyzed. The different curves in each plot indicate the various cut-off values considered (grey box) from 0 to 5% divergence. Generally, 97-98% identity are used to define OTU levels representing the species level.

**Table S1.** Regression and interaction coefficients estimated using the model described in the Methods section.

**Intercept**      3,091

**16S**              0,041

	<b>Cher-2</b>	<b>Cher-6</b>	<b>Cher-8</b>
<b>Pop</b>	-0,188	0,691	-0,504
<b>16SxPop</b>	0,035	-0,076	0,041

	<b>Ref-127</b>	<b>Ref-128</b>	<b>Ref-2</b>
<b>Ref</b>	-0,061	-0,139	0,201
<b>16SxRef</b>	0,008	-0,014	0,006

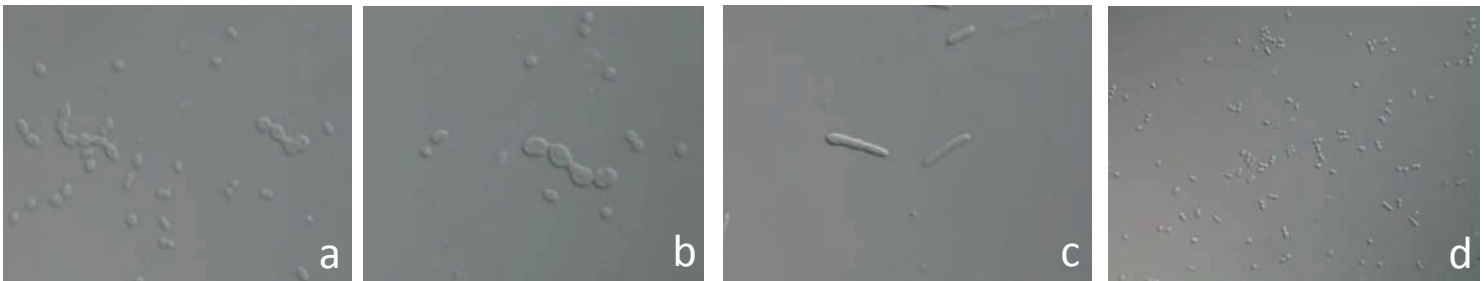
	<b>Cher-2</b>	<b>Cher-6</b>	<b>Cher-8</b>
<b>Ref-127</b>	0,046	-0,077	0,03
<b>Ref-128</b>	-0,151	0,052	0,099
<b>Ref-2</b>	0,105	0,025	-0,129

#### IV.2.2. Synthèse et discussion autour de l'article 2

Contrairement à ce que nous attendions au départ, très peu de Deinococcales, que l'on trouve très souvent dans des endroits fortement irradiés, et que nous avons identifiés précédemment (article 1) ont été identifiées dans les échantillons de Chernobyl. Ces bactéries semblaient même être complètement absentes dans certains échantillons. La composition des communautés bactériennes de Chernobyl (en particulier Cher 6) ressemblait assez à celle de l'échantillon B1.6, un échantillon contrôle du biofilm sur béton provenant d'Irlande du Nord (Article 2. Figure 1). Par contre, en terme de grand groupes eucaryotes, les échantillons de Chernobyl et d'Irlande sont toujours dominés par des champignons et des algues vertes. Ces résultats semblent conforter les conclusions obtenues dans la section précédente qui indiquaient un effet important du substrat pour la composition des communautés bactériennes, mais pas de manière importante pour les eucaryotes (voir chapitre IV.1). A la place de Deinococcales, d'autres groupes de microorganismes radiorésistants ont cependant été identifiés à Chernobyl, notamment des Actinobacteria du genre *Rubrobacter*, qui dominaient largement dans deux des sites étudiés. Nous avons profité de leur présence très répandue pour nous intéresser de manière plus spécifique à une même OTU de *Rubrobacter* retrouvé dans les échantillons de Chernobyl et d'Irlande afin d'étudier le possible effet de la radiation ambiante sur le taux de mutation des microorganismes se développant à Chernobyl. Ce type d'étude a été menée sur des espèces animales et végétales (Ellegren, Lindgren et al. 1997) à Chernobyl mais pas sur des microorganismes, malgré le fait que de par la taille de leurs populations et leur taux de reproduction plus important, les microorganismes peuvent être des meilleurs modèles pour l'étude des effets de la radiation. L'étude de la fréquence de mutation sur la région non codante ITS versus le SSU rRNA dans une OTU très abondante affiliée au genre *Rubrobacter* présente dans la plupart des échantillons a montré une corrélation positive significative entre l'augmentation du niveau de radiation et l'accumulation de mutations. Cela a montré pour la première fois un effet direct de la contamination radioactive de Chernobyl sur le taux de mutation des bactéries en exerçant une pression de sélection très forte sur les bactéries présentes. Cependant, cet effet ne semble pas être suffisamment fort pour changer la composition de cette communauté par rapport à celle typique des sites non contaminés. Ainsi, les communautés microbiennes se développant sur des surfaces naturellement exposées à la lumière solaire semblent capables et pré-adaptées à supporter les niveaux de rayonnements ionisants existant à Chernobyl, très probablement en raison de leur adaptation naturelle au rayonnement UV constant et à la dessiccation fréquente.

### IV2.3. Résultats supplémentaires

En complément de ces analyses moléculaires, j'ai tenté de mettre en culture les bactéries des échantillons de béton récoltés à Chernobyl. Pour cela, j'aiensemencé les échantillons (poudre de béton) sur des milieux classiques de croissance pour les bactéries et en quelques jours des colonies ont pu être observées. J'ai ensuite testé leur résistance aux irradiations ultraviolettes, en irradiant aux UV (de 30 min à 1 heure) des boîtes justeensemencées. Beaucoup moins de colonies se sont développées que sur les boîtes de contrôle. Parmi les colonies résistantes, j'ai ré-isolé chaque colonie indépendamment et par la suite fait une identification taxonomique sur la base du SSU rRNA par amplification et séquençage. Les panneaux a, b et c (FiguresIV2.3.a.b.c), correspondent à des Betaproteobacteria et le panneau d (FigureIV2.3.d) à des Gammaproteobacteria. Les bactéries des panneaux a et b sont affiliées à une bactérie du genre *Massilia*, qui a été retrouvée lors des approches moléculaires (article 2, clone cher4-2B-41). On peut observer sur ces bactéries des effets mutationnels (probablement des mutations sur le système de réplication et/ou la division cellulaire) causés par une irradiation excessive aux UV.



**FigureIV2.3.** Etats frais de bactéries résistantes à une irradiation aux UV, provenant d'échantillons prélevés dans la région de Chernobyl.



### **IV.3. Processus de colonisation microbienne et évolution des communautés de microorganismes lors de la formation du biofilm**

Après avoir étudié les communautés microbiennes qui forment les biofilms matures se développant sur des substrats exposés à l'air et à la lumière solaire, il est intéressant de s'interroger sur comment se forment ces biofilms, c'est à dire, comment se déroule le processus de colonisation de ces substrats minéraux. Il pourrait s'agir aussi bien d'un processus de dispersion ubiquiste (fréquemment observé chez les bactéries) sous la sélection exercée par des facteurs environnementaux, ou bien d'une structuration des communautés par des événements aléatoires de dispersion historiques entraînant une biogéographie (Sloan, Lunn et al. 2006; Whitaker 2006). Très peu d'études sont disponibles quant au processus de colonisation et aux étapes de formation d'un biofilm complexe en milieu naturel et encore moins dans ce type de conditions et sur ce genre de substrat exposé. Par ailleurs, la question de savoir si les procaryotes et les eucaryotes évoluent de la même façon dans la formation d'un même biofilm reste ouverte. Toutefois, la colonisation est l'un des facteurs essentiels pour expliquer la biogéographie (Martiny, Bohannan et al. 2006). Une grande partie des études de formation de biofilm ont été essentiellement menées sur des biofilms à une espèce bactérienne, souvent d'importance médicale (Hall-Stoodley, Costerton et al. 2004); mais des études sur la formation des biofilms complexes en milieu d'eau douce ou marine liée à des problèmes de biofouling (Wood, Hong et al. 2011) prennent de l'ampleur. Pour étudier l'influence de différents facteurs sur la formation d'un biofilm, il est plus aisé de se placer dans un système simplifié, d'où l'intérêt de travailler sur des systèmes de biofilms subaériens (Gorbushina and Broughton 2009), car les pressions environnementales dues à la dessiccation et aux rayonnements UV ont comme conséquence une diversité des communautés microbiennes relativement réduite. Certaines études de colonisation sur des monuments ont été réalisées, avec un intérêt dans la préservation du patrimoine culturel (de Los Rios and Ascaso 2005; Miller, Laiz et al. 2008; de Los Rios, Camara et al. 2009). Dans ce chapitre nous montrons les résultats d'une expérience de suivi des étapes de formation d'un biofilm pendant deux ans sur le même type de substrat artificiel composite que nous avons étudié précédemment (voir chapitre IV.1). La pression sélective à laquelle est soumis ce type de biofilm en fait un système relativement simple pour répondre à ces questions. Pour cela, nous avons eu recours à des expériences d'exposition contrôlées d'échantillons qui ont été analysés à des intervalles réguliers. En parallèle, cette campagne a été réalisée dans trois sites géographiques (Paris, Lyon et Ballyclare) pour pouvoir tester l'influence de la géographie et des différents paramètres environnementaux sur le processus de colonisation. Nous espérons obtenir des informations sur comment se déroule l'établissement du biofilm dans ce type de substrat, quels sont les facteurs qui influencent le

plus la colonisation microbienne (la pression environnementale, la géographie, la dispersion aléatoire). De plus, nous avons voulu répondre à la question de si les communautés procaryotes mais aussi les microorganismes eucaryotes se comportaient de la même manière durant le processus de colonisation et de formation de biofilm.

#### **IV.3.1. Article 3: Distinct colonization patterns for prokaryotes and microbial eukaryotes during epilithic biofilm formation**

**Distinct colonization patterns for prokaryotes and microbial eukaryotes  
5 during epilithic biofilm formation**

Marie Ragon, Gwendal Restoux, David Moreira and Purificación López-García

*Unité d'Ecologie, Systématique et Evolution, CNRS UMR 8079, Université Paris-Sud, 91405*

10 *Orsay Cedex, France*

Correspondence: P López-García, Unité d'Ecologie, Systématique et Evolution, UMR CNRS  
8079, Université Paris-Sud, bâtiment 360, 91405 Orsay Cedex, France. E-mail: [15 \[psud.fr\]\(mailto:puri.lopez@u-psud.fr\)](mailto:puri.lopez@u-</a></p></div><div data-bbox=)

**Running title:** *Bacteria vs. protist colonization processes*

20 **Subject Category:** Microbial population and community ecology

**Keywords:** dispersal, environmental selection, microbial biogeography, multivariate analysis,  
protist, subaerial biofilm

## Abstract

25 A major open question in microbial biogeography is whether the same principles that apply for macroorganisms operate for microbes and whether deterministic factors, related to environmental sorting, or stochastic factors, related to local dispersal history, govern community assembly. However, whether prokaryotic and eukaryotic microorganisms display the same biogeographical behavior with regard to those factors is rarely asked. Here, we approached this question by studying in parallel prokaryote and microbial eukaryote community assembly during colonization processes. For this, we carried out 2-year long colonization experiments by exposing outdoors the same control mineral substrate in three different geographic sites in Northern Ireland and France. We monitored the prokaryotic and eukaryotic diversity along biofilm formation at 6-month intervals by small subunit (SSU) rRNA gene library analysis and DGGE fingerprinting. For bacteria, a time-dependent succession appeared to occur, with likely inactive dispersive forms mainly belonging to Gammaproteobacteria being detected at early stages (0-6 months), biofilm-forming Betaproteobacteria and Bacteroidetes dominating in nascent biofilms (12 months) and Bacteroidetes and/or Actinobacteria later (24 months). Alphaproteobacteria were regularly present from 12 months on, together with other less abundant phyla such as Cyanobacteria and Firmicutes. Eukaryotes were only detected after 6 months, being always dominated by ascomycete and basidiomycete fungi, although green algae appeared in later stages only in the site where biofilms formed faster. Multivariate analyses based both on operational taxonomic units (OTUs) and high-rank taxa showed that whereas colonization time was the most significant factor determining bacterial community structure, geographic location significantly explained microbial eukaryote community assembly. Our results show, first, that heterotrophic bacteria and eukaryotes are pioneer colonizers and that photosynthetic cyanobacteria and algae established later and, second, that colonization patterns for prokaryotes and microbial eukaryotes are clearly distinct. This has important consequences for general biogeography, as it would trigger a crucial shift in the central question being pursued by microbial biogeography. This should not be whether microorganisms follow the biogeographical principles of macroorganisms but whether prokaryotes follow the same biogeographical patterns that eukaryotes, independently of being microbial or not. Our work suggests that the divide is not between macro- and microorganisms, but between prokaryotes and eukaryotes.

## Introduction

In recent years, the massive use of molecular tools to explore microbial diversity has revealed non-random distributions of prokaryotes (bacteria and archaea) and microbial eukaryotes in natural ecosystems, fostering the study of microbial biogeography. Understanding whether the processes explaining such spatial patterns of microbial community structure operate in the same way as for macroorganisms has become a fundamental, yet unsolved, issue in global ecology theory (Green and Bohannan 2006, Lindström and Langenheder 2011, Martiny et al 2006, Ramette and Tiedje 2007). A major open question is whether deterministic or stochastic processes govern microbial community assembly. Deterministic processes would imply species sorting by environmental selection, including local not only abiotic factors but also biotic factors such as interspecific competition, and would fit classical niche theory. The dominance of this type of factors would accommodate well the widely held view in last-century microbiology that microbial community structure results from ubiquitous dispersal and ecological sorting (O'Malley 2007, van Niel 1949). Stochastic processes would imply, on the contrary, that microbial community structure has a strong dependence on dispersal history and local immigration, fitting better neutral community assembly models (Sloan et al 2006, Woodcock et al 2007). Existing examples are either contradictory, favoring determinism (Lindström and Langenheder 2011) or chance (Sloan et al 2006), or show that both occur (Langenheder and Szekely 2011, Whitaker 2006). However, disentangling them is difficult because of the inherent complexity of natural microbial communities and the difficulty to grasp the niches that their members really occupy. To this adds another important open question, whether prokaryotes and microbial eukaryotes share similar biogeographic patterns as some authors claim (Finlay 2002) or not, something that is difficult to deduce from extant studies because in general prokaryotes and microbial eukaryotes are seldom studied in parallel in the same communities at the same phylogenetic depth. Despite their complexity, most microbial biogeography studies concentrate on existing microbial (either prokaryotic or eukaryotic) community composition patterns in natural environments. Surprisingly, very few studies have focused on colonization processes, which may indeed provide answers pertaining to the role of dispersal and selection in community assembly processes. Indeed, colonization is, together with speciation and extinction, an essential determinant of biogeography, being influenced by dispersal, survivability and population size (Martiny et al 2006).

Microbial colonization studies have been carried out essentially in biofilms. Most of them focus on biofilms formed by single model species, such as *Pseudomonas aeruginosa* or

90 *Escherichia coli*, and aim at understanding the molecular basis for adhesion and cell-to-cell  
communication during biofilm formation. Others focus on multispecies biofilms of medical  
interest in human or animal hosts, as biofilms are frequently associated to various  
pathological conditions in humans including cystic fibrosis, dental plaque formation or the  
unsafe settlement on medical devices (Hall-Stoodley et al 2004). With a similar purpose, the  
95 microbial colonization of the human gut is being intensely explored taking into account inter-  
subject variability, diet and genetic factors (Walter and Ley 2011). The formation of biofilms  
on marine industrial settings, water canalization systems or underground pipes has also been  
object of intense investigation from an applied point of view, either to design preventive  
strategies for biofouling or to develop biotechnological applications (Wood et al 2011).

100 Colonization experiments in several natural habitats exist, but most often these studies  
aim at exploring what type of community assembly forms after a given period, often short, of  
time. Examples include the distribution of bacteria in shallow aquifers (Griebler et al 2002),  
prokaryotes and protists in deep-sea vents (Guezennec et al 1998, López-García et al 2003a,  
López-García et al 2003b, McCliment et al 2006) and freshwater streams (Augspurger et al  
105 2010, Roeselers et al 2007). A few studies followed the process of biofilm formation along  
time, for instance in marine snow particles (Kiorboe et al 2003), acid rivers (Aguilera et al  
2007), or streams (Pohlson et al 2010). However, most of these studies remain descriptive and  
few try to correlate community structure with its potential underlying drivers (Augspurger et  
al 2010). Furthermore, many of these natural systems are complex, making very difficult to  
110 tell apart the role of local selective pressures from stochasticity on community assembly.

Discriminating the factors that govern colonization processes may be easier in relatively  
simplified systems. Simplified systems can be implemented by setting an appropriate  
experimental design. For example, a recent study explored early rain-mediated dispersal by  
analyzing microcosms containing sterilized freshwater from rock pools naturally inoculated  
115 by rainwater after incubation for 5 days in the laboratory in the dark (Langenheder and  
Szekely 2011). In this particular case, however, these simplified conditions do not correspond  
to the real situation in nature over longer periods of time where immigration occurs  
continuously and where photosynthetic organisms can also grow. Another possibility is to  
take advantage of natural systems that are less complex. This is the case of subaerial biofilm  
120 communities, i.e. biofilms that develop on rock or other solid surfaces living at the  
atmosphere interface. Because of the strong environmental stress imposed by desiccation and  
UV radiation, the microbial diversity in these communities is relatively reduced, both in terms

of prokaryotic and eukaryotic components, as compared to other ecosystems such as soils or aquatic systems (Gorbushina and Broughton 2009, Ragon et al 2011, Scheerer et al 2009). A few colonization studies on epilithic biofilms exist, mostly to understand and prevent monument biodeterioration. This includes lichen colonization in restored stone habitats (Nascimbene et al 2009), microbial colonization after biocide treatment in dolostone quarries (Camara et al 2011) or laboratory experiments of biofilm formation under controlled conditions (Miller et al 2008). However, subaerial biofilms also offer a good model system to explore the factors that influence community assembly during the colonization process.

In this work, we carried out long-term experiments in three different geographic sites in Northern Ireland and France where the same control mineral substrate was exposed outdoors with the same orientation and sampled every six months for a period of two years. We analyzed the microbial diversity in nascent biofilms in order to determine i) which factors influence more the microbial colonization process during the formation of epilithic biofilms, whether deterministic factors imposed by the strong environmental pressures or stochastic factors related to dispersal history in the different geographic locations, and ii) whether prokaryotes and microbial eukaryotes behave similarly during the colonization process. Our results show that colonization patterns for prokaryotes and microbial eukaryotes are distinct. Whereas colonization time was the most important factor influencing bacterial community structure, geographic location affected most microbial eukaryote communities.

## **Materials and methods**

### *145 Sampling and DNA purification*

Initial sterile plates of exactly the same mineral control substrate (mineral composite) were exposed for two years to the open air in three different geographic sites with the same North orientation: Aubervilliers, in the Paris suburban area, and Servas, close to Lyon, in France, and Ballyclare in Northern Ireland (Table1). One control substrate plate was collected in Ballyclare at time 0 as a control for natural contamination during handling prior to longer outdoor exposure. Mineral plates were sampled every six months (one plate removed at each sampling point) and the color of newly developing biofilms monitored (Table1). Biofilm samples were collected by scraping the surface of the corresponding mineral substrate (5-10 cm<sup>2</sup>) with a sterile spatula. The material collected was stored at -20°C until use. DNA extraction was done from

155 250 µl of scratched powder using the Power soil DNA extraction kit from Mobio (Carlsbad, CA USA) following the instructions of the manufacturer. DNA was eluted in 80 µl of Tris-HCl, pH 8, and conserved at -20°C.

*PCR amplification of SSU rDNA regions, library construction and sequence analysis*

160 Small subunit (SSU) rRNA genes were amplified using specific primers for each domain of life. For bacteria, we also amplified the adjacent internal transcribed spacer (ITS) region, using the primers 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and 23S-1R (GGGTTTCCCCATTCGGAAATC). Eukaryotic SSU rDNA was amplified using specific primers 82F (GAAACTGCGAATGGCTC) and 1520R (CYGCAGGTTACCTAC). In  
165 order, to maximize the chances to amplify archaeal SSU rDNA genes, we used combinations of the following archaea-specific primers with the reverse primer 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT): Ar109F (AC(G/T)GCTGCTCAGTAACACGT), ANMEF (GGCTCAGTAACACGTGGA), W36 (TCCAGGCCCTACGGGG) and 21F (TTCCGGTTGATCCTGCCGGA). PCR reactions were carried out in 25µl of reaction buffer,  
170 containing 1 µl of the eluted DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTPs (10 nmol each), 20pmol of each primer, and 0.2U Taq platinum DNA polymerase (Invitrogen). PCR reactions were performed under the following conditions: 35 cycles (denaturation at 94°C for 15 s, annealing at 50 to 55°C for 30 s, extension at 72°C for 2 min) preceded by 2 min denaturation at 94°C, and followed by 7 min extension at 72°C. Clone libraries were constructed using the TopoTA  
175 cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Clone inserts were PCR-amplified using flanking vector primers, and SSU rDNA partially sequenced with either 1492R or 1520R primers. Accumulation curves for high-quality partial sequences were constructed using DOTUR (Schloss and Handelsman 2005) at the level of operational taxonomic units (OTUs). OTUs were defined as groups of sequences sharing  
180 ≥98% identity at the SSU rRNA gene. Diversity indexes based on defined OTUs were calculated using DOTUR (Table 1). SSU rDNA clones representative of different OTUs were nearly fully sequenced by using forward primers. Complete sequences were assembled using Code Aligner (CodonCode Corporation; www.codoncode.com) prior to phylogenetic analyses.

185



### *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) analysis*

Fingerprinting analysis of bacterial and eukaryotic diversity in different samples was carried out by DGGE. For this short fragments of SSU rDNA were amplified, in bacteria, using the forward GC-clamp primer 341F-GC (CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCA GCAG), and the reverse primer 534R (ATTACCGCGGCTGCTGG), and in eukaryotes, the forward GC-clamp primer 1209F-GC (CGCGCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGCAGGTCTGTGATGCC C), and the reverse primer 1520R. PCR was carried out using the same reaction mix as above except for a final concentration of 3 mM MgCl<sub>2</sub> for bacteria and the following conditions: initial denaturation step at 94°C for 3 min, 20 cycles consisting of a denaturation step at 94°C for 15 s, an annealing step of 30 s (a touch down procedure with a decreasing annealing temperature from 65°C to 55°C for the 10 first cycles was applied followed by a hybridization temperature of 55°C for the following 10 cycles) and a polymerization step at 72°C for 1.5 min, and a final extension step of 7 min (eukaryotes) to 1 h (bacteria) at 72°C. Migration of PCR products was done in a DGGE-2000 system (CBS Scientific Company) together with 50 bp ladder DNA markers (Promega, Lyon, France). DNA fragments were electrophoresed in 8% polyacrylamide gels with a gradient of 30% to 60%denaturing agent for bacteria, and 20% to 40% for eukaryotes. 100% denaturing agent: 7M urea, 40% formamide. 10-15 µl of PCR product were loaded for each sample; gels were run at 150V for 6 hours at 60°C in 0.5X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (1X TAE: 40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0). Gels were stained with SYBR Gold (Molecular Probes, Invitrogen, USA), and then visualized and photographed on a UV transilluminator. Photographed gels were normalized using the Bionumerics® 5 software (AppliedMaths, Saint-Martens-Latem, Belgium) based on the position of ladder standards. Band positions were assigned manually. Clustering analysis of DGGE patterns was carried out using UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) clustering applying a Jaccard coefficient (Jaccard 1901).

### *Phylogenetic analyses*

Our sequences were compared to those in GenBank by BLAST (Altschul et al 1997). We retrieved the closest sequences and included them in an alignment containing also sequences from the closest cultivated members and some representative sequences of the major taxa found. Sequences were aligned using MUSCLE (Edgar 2004) and the multiple alignment was

220 then manually edited using the program ED from the MUST package (Philippe 1993). Gaps  
and ambiguously aligned positions were excluded from our analysis. Preliminary neighbor-  
joining (NJ) trees were constructed for the different taxa in order to choose representative  
subsets of sequences for further phylogenetic analyses. Final phylogenetic trees were then  
reconstructed using final datasets by maximum likelihood (ML) using TREEFINDER (Jobb  
225 et al 2004) applying a general time reversible model of sequence evolution (GTR), and taking  
among-site rate variation into account by using a four-category discrete approximation of a  $\Gamma$   
distribution. ML bootstrap proportions were inferred using 1000 replicates. Phylogenetic trees  
were visualized using the program FIGTREE (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). The  
sequences reported in this study have been deposited in GenBank with accession numbers  
230 XXXXXX-XXXXXX.

#### *Estimates of microbial diversity*

Distance matrices were generated for each clone library using ClustalX software (Larkin et al  
2007) and used as input for DOTUR (Schloss and Handelsman 2005). Richness estimations  
235 were calculated at an OTU cut-off value of 0.02 using DOTUR with default settings (Table  
1). Coverage values were calculated using the Good estimator (Good 1953) following the  
equation  $C = (1 - n/N) \times 100$ , where C is the percentage of coverage of the library, n the number  
of singletons and N the total number of clones examined.

#### 240 *Statistical analyses*

Most statistical analyses were carried out at the OTU level. Since the number of sequences  
analyzed per gene library varied among samples but also the number and nature of gene  
libraries (some based on semi-nested amplification steps), we transformed the count dataset,  
i.e. number of sequences per OTU, to a relative frequency dataset allowing inter-sample  
245 comparisons. We performed multivariate analyses on the dataset thus obtained. First, we  
carried out correspondence analysis (CoA) for bacteria and eukaryote OTUs independently.  
We used 86 bacterial OTUs and 8 samples coming from three locations (Table 1) harvested at  
various times after initial exposure (12 or 24 months for all samples and two additional times,  
a control pre-exposure sample (Bt0) and 6 months (Bt6) for Ballyclare). For eukaryotes we  
250 used 35 OTUs and the same samples as for bacteria except that we discarded the initial

observation (Bt0) since no eukaryotic SSU rDNA amplicons were obtained for this sample. This CoA analysis was also computed for the original dataset expressed at the phylum (or high-rank taxon) level, reducing the number of variables from 86 to 8 for bacteria and from 35 to 5 for eukaryotes. Second, we tested if there was significant clustering of OTUs distributions according to the location or the time at which the observations were made. For this, we used the projection of the data over the axis of the CoA and computed a between-class analysis (BCA). We thus maximized the inertia among groups of observations based on the locations (3 modalities: Bt, St and SG for Ballyclare, Servas and Aubervilliers, respectively) or the time elapsed since the first exposure (4 or 3 modalities: 0 when available, 6, 12 and 24 months). We finally tested for the significance of the resulting clusters using a Monte-Carlo method. We simulated datasets according the null hypothesis of independence of samples and compared the observed proportion of inertia due to the clusters to its distribution using 100,000 permutations. This allowed estimating a simulated p-value. CoA and BCA were additionally computed for another dataset which included, in addition to the OTU data from colonization experiments, bacterial and eukaryotic OTU frequencies for one (2 for St) mature biofilm community for each location (samples exposed for over 4 years and labeled M). This led to 12 and 11 samples for bacteria and eukaryotes respectively. All computations have been made using R (R Development Core Team 2011) and the ade4 R-package (Chessel et al 2004, Dray and Dufoour 2007 ).

270

## Results and discussion

*Global diversity of prokaryotes and microbial eukaryotes during long-term colonization experiments of outdoor-exposed mineral substrates*

275

We studied the diversity of microorganisms colonizing the same mineral substrate during 2-year colonization experiments carried out in parallel in three different geographic locations, which were sampled every 6 months (Table 1). We did this primarily by molecular methods based on the amplification, cloning and sequencing of SSU rRNA genes and defining operational taxonomic units (OTUs) at 98% sequence identity for community comparison purposes. We complemented these studies with DGGE fingerprinting analyses which, although less accurate, allow a rapid overall comparison of community profiles. Since the

construction and analysis of gene libraries are time consuming, these were made at particular time points. Chosen exposure times were 12 and 24 months for all the three sites (Ballyclare, Northern Ireland; Aubervilliers-Paris and Servas-Lyon in France), since nascent, green-colored biofilms were visible already at 12 months in Ballyclare and Servas. In addition, we included a control sample at time 0 corresponding to a mineral plate prior to exposure, which we called Bt0 for convenience. Since all the exposed substrates were prepared at the same time, the diversity identified in this sample would correspond to microbial contaminants introduced during handling and initial contact with ambient air prior to fixation on exposure sample holders, and hence, a control for the rest of the colonization experiment (Figure 1, \* and \*\*). Finally, we also constructed a SSU rDNA gene library from the Ballyclare site at an intermediate sampling point (6 months, Bt6) when no biofilm was visible with the naked eye. This indicated that the microbial biomass was low, which was further confirmed by the fact that all samples without coloration needed a semi-nested PCR re-amplification reaction for SSU rDNA amplicons to be visible on gel and cloned (Table 1). In addition, DGGE profiles from 6-month-exposed samples were relatively similar among them, notably bacteria (Figure 2). In total, we analyzed 1108 and 766 high-quality sequences for bacteria and eukaryotes, respectively. Accumulation curves showed that gene libraries were explored until near-saturation (Figure S1), something also reflected in high coverage values for gene libraries (94 to 98% for most libraries; Table 1).

We aimed at studying the microbial diversity of the three domains of life, bacteria, archaea and eukaryotes. However, similarly to previous studies (Ragon et al 2011) and **Article 1**), we failed to amplify archaea in all our samples. This reinforces the idea that archaea are not present in this kind of biofilms on these mineral substrates or, if they are, they are extremely minor components. We succeeded, although in some cases a nested-PCR was required, in amplifying bacterial and eukaryotic SSU rDNA from all the samples except for eukaryotes at time 0 even after a re-amplification step (Table 1 and Figure 1). Therefore, eukaryotic contaminants were likely not present in mineral plates prior to exposure.

Figure 1 shows the distribution of sequences from gene libraries within high-rank taxonomic groups. In the case of bacteria, there was a clear difference between the patterns observed in  $t=0$  samples (Bt0) and the 6-month-exposed Ballyclare Bt6 and the longer-exposed samples. Bt0 and Bt6 were largely dominated by Gammaproteobacteria (~70%) followed by Bacteroidetes (20-28 %) with minor proportions of other bacterial phyla. By contrast, although Bacteroidetes were always present in later stages in highly variable

proportions between samples, Gammaproteobacteria were not detected any longer. Betaproteobacteria were the most abundant group at 12 months, with proportions of up to 60-70% in Ballyclare and Aubervilliers-Paris; however, they were present only in lower to much lower proportions at 0 and 24 months. Betaproteobacterial proportions at 12 months were only equaled by Bacteroidetes at Servas, Lyon (~30%). At 24 months, the proportion of Bacteroidetes increased up to 40-50% in Aubervilliers-Paris and Servas-Lyon, but also the proportion of Actinobacteria increased in those two samples, especially in Ballyclare Bt24, where Bacteroidetes remained low and Actinobacteria reached ~75% of sequences in gene libraries. Alphaproteobacteria maintained a relatively constant presence and proportion in all samples exposed for 12 and 24 months. Other bacterial phyla, such as the Firmicutes, Deinococcales and Cyanobacteria were present in seemingly low amounts. However, the proportion of cyanobacteria may be underestimated by gene library analyses as was observed previously (**Article 1**). In fact, some intense DGGE bands at 12 and 24 months of exposure corresponded to cyanobacteria (Figure 2 and Table S1). This distribution of sequences among bacterial phyla suggested a time-dependent transition whereby Gammaproteobacteria (0 and 6 months) left the way to Betaproteobacteria and Bacteroidetes (12 months) and then to Bacteroidetes and/or Actinobacteria (24 months), while Alphaproteobacteria were regularly present from 12 months on. However, such a time-dependent trend was not clearly visible from DGGE gels (except for a cluster at 6 months; Figure 2), perhaps due to the complexity of the pattern and to likely confounding factors, such as the possibility that gene fragments from different microorganisms migrate to the same relative position and the fact that several bands in a line may yield the same sequence due to the formation of alternative secondary structures.

The situation in the case of eukaryotes was qualitatively very different to that of bacteria because, as soon as it was possible to amplify their SSU rDNAs (after 6 months), nascent biofilms were dominated by ascomycete and basidiomycete fungi, which together reached 100% of some gene libraries (Figure1). The fungal dominance was further confirmed by sequencing DNA from excised DGGE bands (Figure 2 and Table S1). The two groups maintained relatively similar proportions close to 50% in Bt6 and Bt12, but in the rest of the gene libraries, basidiomycetes appeared to dominate. Apart from fungi, only samples from Servas-Lyon displayed relatively high levels of green algae (Chlorophyta), moderate at 12 months and important at 24 months (~45%). Sequences of alveolates (ciliates) and metazoans (arthropods) were sporadically observed after 12 months. Therefore, for microbial eukaryotes,

a clear trend along time, except for the appearance and increase of green algae in Servas-Lyon  
350 was not apparent at the phylum level.

*OTU-based diversity of bacteria and eukaryotes during epilithic microbial biofilm formation*

At a finer phylogenetic scale, the distribution of the different OTUs detected among samples  
355 reinforced the observation made above for bacteria at phylum level (Figures 3-4 and S3-S4).  
Most bacterial phylotypes detected in Bt0 and Bt6 were absent from longer exposed samples.  
Thus, none of the gammaproteobacterial OTUs, which were mainly related to the ubiquitous  
genera *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, was detected in samples exposed for one year or  
more (Figure 3). Similarly, considering all the bacterial diversity identified, only 2 OTUs  
360 detected in early colonization stages (Bt0 and Bt6) were identified later. Interestingly, one of  
these corresponded to a *Delftia* species (Betaproteobacteria) which became one of the  
dominant OTUs at 12 months. Identical sequences to this OTU were retrieved in spacecraft-  
assembly clean rooms or bioremediation plants (La Duc et al 2009). Betaproteobacteria and in  
particular *Delftia* strains and members of the closely related genus *Variovorax*, are known for  
365 their capacity to degrade complex aromatic compounds (Dejonghe et al 2003), including a  
variety of pesticides, but also compounds from natural sources such as cyanobacterial  
exudates (Breugelmans et al 2007, Edwards and Lawton 2009). In addition to microorganisms  
that are widely distributed and able to degrade complex organics and pollutants, some of our  
betaproteobacterial sequences were related to highly oligotrophic organisms, such as the  
370 *Unibacterium oligocarboniphilum*, which was isolated from purified water (Eder et al 2011).  
As mentioned, Bacteroidetes and Actinobacteria largely increased their proportion with time.  
They encompassed a remarkable OTU diversity (Figure 4). Most Bacteroidetes OTUs were  
related to the genus *Hymenobacter*. Many members of this genus have been detected in cold  
and hot deserts, being resistant to UV and ionizing radiation (Rainey et al 2005). Several  
375 strains have been isolated from Antarctic samples, and produce carotenoids that likely act as  
protectants against radiation (Klassen and Foght 2008). They disperse widely, some having  
been described as airborne bacteria (Buczolits et al 2002). Similarly, the closest relatives to  
our Actinobacteria sequences were retrieved from extreme desert areas (Atacama, Antarctica,  
Sonora), some were psychrophiles. Actinobacteria are recurrently identified in epilithic  
380 biofilms, being very abundant in mature biofilms on the same type of material (Gorbushina  
and Broughton 2009) and **Article 1**). Alphaproteobacteria, although having moderate

proportions, constituted the most diverse group in terms of OTUs, with 23 OTUs (Figure S2). Many of them were related to the genus *Sphingomonas*, of remarkable biosynthetic and degradation properties (including aromatic compounds and hydrocarbons). *Sphingomonas* strains have been isolated from the subsurface and are present in endolithic communities (Hughes and Lawley 2003, Shi et al 2001, Stolz 2009). Other OTUs associated with the genera *Roseomonas* and *Methylobacterium*, usually pink-pigmented due to the presence of carotenoids. Some *Methylobacterium* species are also radioresistant. Several cyanobacterial OTUs were identified (Figure S3). The most abundant corresponded to several OTUs related to *Chroococcidiopsis*, grouping our sequences and environmental sequences retrieved from rock-associated communities and concrete walls. Another abundant cyanobacterial OTU was closely related to *Calothrix desertica*. Finally, some Firmicutes and the same dominant Deinococcales OTU previously detected in mature biofilms (**Article 1**) was identified in Servas St12 and St24 samples, although in low amounts (Figure S3).

Within eukaryotes, the largest OTU diversity was found within the Ascomycota (Figure 5). Many of the identified and abundant OTUs were related to genera producing highly dispersive spores, found very frequently outdoors, such as *Cladosporium*, a dark-pigmented fungal genus which has been also found associated to stone buildings in polluted cities (Sterflinger and Prillinger 2001). Other widely distributed genera detected were *Alternaria*, *Phoma* and *Phaeosphaeria*, some of which are opportunistic plant pathogens. However, we also detected fungi that associate specifically with rocks, such as *Sarcinomyces* or *Coniosporium*, which form endolithic microcolonies in marble (Sterflinger et al 1997, Wollenzien et al 1997). The diversity within Basidiomycetes was somewhat smaller, with fewer, but much more dominant OTUs (Figure 6). These were mainly associated to the yeast basidiomycete genera *Rhodotorula*, *Sporolobomyces*, *Bensingtonia* and *Kondoa*, usually pink or red-pigmented, cosmopolitan, very frequent outdoors. These genera were also present in mature biofilms colonizing the same type of substrates (**Article 1**). Members of *Rhodotorula* and *Sporolobomyces* scavenge nutrients in oligotrophic environments, having been isolated from building surfaces to subsurface aquifers (Ekendahl et al 2003, Sette et al 2010). Green algae were relatively abundant at the Servas site, particularly after 24 months of exposure. All the sequences identified affiliated to the Trebouxiophyceae, a family of light-adapted and UV-resistant microalgae, and in particular to the genera *Chlorella* and *Trebouxia* (Figure S4). Green algae of these two genera are often identified in desert endolithic communities or

colonizing stone monuments (Bubrick et al 1984, Miller et al 2008), and the latter often  
415 associates symbiotically with fungi to form lichens (Bubrick et al 1984).

Desert green algae are much more resistant to desiccation than other algae. Experiments  
of photosynthetic recovery showed that they survived desiccation for at least 4 weeks when  
dried in the dark, and recovered high levels of photosynthetic quantum yield within 1 h of  
rehydration in darkness, while aquatic green algae failed to recover. However, photosynthetic  
420 recovery failed also for several of the tested green algae under illumination (Gray et al 2007).  
This suggests light-sensitivity for survival, and may explain why many of these algae are  
often found in endoliths or crusts. It could also be speculated that their association to dark-  
pigmented fungi helps their survival, since fungi keep certain humidity levels and may act as  
protective shelters, as it is the case in lichens. In this sense, it is interesting to note that green  
425 algae appeared after fungi on the mineral substrates. It might be that fungi disperse much  
easier and have larger effective sizes, thus arriving first, but it might also be that green algae  
necessitate the presence of fungi (or heterotrophic fungi-like bacteria such as the  
Actinobacteria) to develop. Interestingly, the presence of heterotrophic bacteria has been  
shown to facilitate the settlement of eukaryotic algae (Roeselers et al 2007), although the  
430 underlying reasons for it may not be the same.

*Factors influencing bacterial and microbial eukaryotic colonization during the formation of  
435 epilithic biofilms*

Once we had characterized the diversity of bacteria and microbial eukaryotes, we asked  
whether deterministic or stochastic processes had a significant effect on biofilm community  
assembly and whether such effects were similar for bacteria and microbial eukaryotes, as is  
440 often assumed (Finlay 2002); see also **Article 1**). In our case, if deterministic processes  
governed, we would expect that the "everything is everywhere and the environment selects"  
tenet applied. Therefore, we would expect to detect many different organisms dispersing at  
very early stages of colonization experiments but we would expect selection to sort out those  
that are not adapted to the harsh conditions characterizing sunlight-exposed epilithic biofilms,  
445 yielding similar communities irrespective of the geographic site. If stochastic processes were



more influential, we should expect to observe differences from site to site largely because of dispersal history and/or founding effects.

To approach this question, we first carried out a correspondence analysis (CoA) to detect possible inter-dependencies within and between samples and OTUs. We did this separately for bacteria and eukaryotes. As shown in Figure 7, there was a remarkable difference on how variables distributed for the two kinds of microbes. In the case of bacteria, the variables were clearly separated in two distant clusters along the first axis. One cluster was placed on its extreme left and included the time 0 control sample (Bt0, prior to exposure) and Bt6 (6 months of exposure) plus a series of OTUs exclusively detected in those two samples including, notably, all the Gammaproteobacteria. This trend was also clearly visible at much lower phylogenetic resolution, when considering only phyla or similar high-rank taxonomic groups (Figure 7). Axis 1 appeared therefore related to colonization time, since samples from later colonization stages in Ballyclare (Bt12 and Bt24) appeared on its right side 1 aligned along the second axis with all the other variables. Axis 2 also appeared to be related with colonization time, since all the biofilm samples after 24 months plus the Servas St12 sample distributed in the lower part of this axis, something also visible at phylum level (Figure 7). St12 appeared indeed to be in a more advanced stage of colonization, as confirmed both by visual inspection and direct amplification of bacterial SSU rDNA (Table 1) and by comparing the community composition to that observed in mature communities (e.g. increased relative abundance of Actinobacteria, Deinococcales and green algae, see **Article 1**). Actually, from the distribution of variables the two axes appear to discriminate two different processes that depend on time. Axis 1 would separate dispersing, not necessarily active bacteria present in Bt0 and Bt6 from truly biofilm-forming bacteria (all other samples and their associated OTUs). Axis 2 would discriminate samples (bacterial communities) of nascent biofilms according to their state of maturation. This explanation was further reinforced by CoA where examples of mature communities for the three sites (Ballyclare, Bt; Servas, St and Aubervilliers, SG) were included (Figure S5). In this case, Axis 1 discriminated again very clearly between Bt0/Bt6 and their specifically associated OTUs and all the other samples, whereas Axis 2 discriminated early biofilm samples, with all the samples from 12 and 24 months clustering together (upper part of Axis 2), from mature biofilms (lower part of Axis 2). Therefore, CoA for bacteria strongly suggests that bacterial community assembly depends on time, in agreement with deterministic factors being more influential than stochastic ones.

Conversely, multivariate CoA performed on the eukaryotic dataset did not show any particularly strong cluster of OTUs and samples, which were much more dispersed in space, and the same trend was apparent at the phylum level (Figure 7). The only remarkable association appeared to be between St24 and green algae, which were relatively abundant in this sample. Although it is difficult to ascertain on which basis the different axes discriminated OTUs and samples during colonization, it is worth noting that samples coming from the same sites occupied the same quadrants (Figure 7), suggesting a potential site effect. However, when mature biofilm communities were added, samples from early biofilms clustered together (Figure S5), suggesting a potential time-related effect.

To test whether the location or the exposure time influenced significantly the distribution of bacterial and eukaryotic OTUs, we carried out between-class analysis (BCA) based on the corresponding CoAs (Figure 8). Interestingly, whereas the geographic location did not have a significant influence on bacterial communities (31.5% inertia explained;  $p=0.134$ ), it did in the case of microbial eukaryotes (45.9% inertia explained;  $p=0.009$ ). On the contrary, whereas the colonization time was a significant determinant for bacteria (49.3% inertia explained;  $p=0.028$ ), it was not for microbial eukaryotes (34.6% inertia explained;  $p=0.411$ ). Furthermore, when OTUs from mature biofilms on the same substrate and sites were included in the BCA, this trend was confirmed (Figure S6). Only colonization time had a significant effect on bacteria community assembly (44.8% inertia explained;  $p=0.0007$ ), whereas only the geographic site had an influence, although marginally significant (23.7% inertia explained;  $p=0.072$ ), in eukaryotes.

Therefore, we could validate statistically the above observations suggesting that bacterial communities assembled in a time-dependent manner whereas microbial eukaryotic community assembly was influenced by geography.

### *Concluding remarks*

Factors influencing the assembly of microbial communities are actively debated. Some examples suggest that environmental selection predominates, others that neutral processes do. Possibly both intervene, the part of determinism versus stochasticity fluctuating as a function of the particular ecosystem under study. For instance, in ecosystems under strong selection, such as extreme environments including subaerial biofilms, effective species sorting should be expected. However, it is generally assumed that prokaryotes and microbial eukaryotes

510 behave similarly because of their small size (Finlay 2002). This assumption takes place not  
only for the traditional view according to which, microbial species are ubiquitous and  
selection sorts them out, but also when the opposite is observed, i.e. that genetic distance and  
community composition changes as a function of geographical distance. In a previous study  
(**Article 1**), we showed a distinct behavior of prokaryotic versus microbial eukaryote  
515 community assembly in mature biofilms growing in different mineral substrates in three  
different geographic areas. We showed that the nature of the mineral substrate, climatic  
variables and geography had all an influence on community assembly. However, whereas the  
substrate nature was the most determinant factor explaining bacterial community structure,  
the geographic location was the most important factor explaining eukaryotic community  
520 structure. In the present work we aimed at testing whether distinctive prokaryote-versus-  
eukaryote behaviors extended to the colonization process. Our results show that bacteria and  
microbial eukaryotes display also a different behavior during the colonization process, when  
studied in exactly the same samples and at the same phylogenetic depth.

Bacterial community assembly depended on colonization time. During very early stages  
525 (0-6 months), most bacterial OTUs corresponded to ubiquitous genera that were likely  
dispersing as inactive forms, notably Gammaproteobacteria. From 12 months on,  
Gammaproteobacteria were no longer detected, possibly because the presence of active  
bacteria in nascent biofilms overrode them numerically. During biofilm development,  
community assembly depended also on time but, in this case a succession of different lineages  
530 appeared to occur, with Betaproteobacteria leaving the way to Actinobacteria and  
Bacteroidetes, and with the detection of latecomers such as the Deinococcales, which  
characterized mature biofilm communities (**Article 1**). However, the bacterial diversity in the  
nascent biofilms was not yet comparable to mature biofilm communities formed after much  
longer exposure times on the same substrate material ( $t > 4$  years), although bearing some  
535 similarities. For instance, Alphaproteobacteria remain at similar proportions and  
Actinobacteria were highly abundant or dominant. Longer-exposed substrates were  
characterized by very high proportions of Deinococcales. Taking into account the properties  
of high resistance to desiccation and UV radiation of *Deinococcus* species, a possible  
hypothesis is that Deinococcales are favored by selection but that, given their slower growth  
540 and possible lower population sizes (owing to their restriction to particular habitats), they  
appear later as important biofilm components.

In the case of microbial eukaryotes, no clear effect of colonization time on community assembly was observed, exception made of green algae, which were sometimes abundant in later, mature biofilms and which increased their proportion in Servas, the site where biofilms formed faster. This was likely related to milder climatic conditions (higher precipitation, humidity and water condensation) than the other sites during the exposure campaign (Figure S7). By contrast, if time did not appear a strong determinant, community structure depended on the geographic site, corroborating observations made in mature epilithic biofilms from the same areas (**Article 1**). This might be related to the different lifestyles of many late coming eukaryotes, to differential rates of survival as compared to bacteria and to more limited dispersal abilities. For example, the late arrival of green algae may be related to an inferior ability to survive desiccation and irradiation as compared to other members of the community, such as fungi and many bacteria. Indeed, an interesting observation is that, contrary to the expectation that photosynthetic organisms should arrive first in order to sustain the heterotrophic members of the community with their primary productivity, both heterotrophic bacteria and eukaryotes settled clearly first. Many of the heterotrophic bacteria or eukaryotes identified are oligotrophic, able to thrive from trace organics found in dust or rainwater. Whether the late advent of photosynthesizers is due to slower growth rates or whether the presence of heterotrophs actually facilitates the settlement of less desiccation resistant forms by providing water and protected microniches or even providing particular oligonutrients are open questions which require further investigation.

In conclusion, our parallel study of bacteria and microbial eukaryote community assembly during colonization and formation of epilithic biofilms showed that both types of microorganisms display different biogeographical behavior, bacterial communities being largely affected by deterministic factors, species sorting by selection, and microbial eukaryotic communities being significantly explained by stochastic processes related to dispersal history.

### **Acknowledgements**

M.R. and this work were financed by a French *Convention Industrielle de Formation par la Recherche* (CIFRE). We thank Jean Marc Ghigo for helpful discussions.

### **References**

- 575 Aguilera A, Souza-Egipsy V, Gomez F, Amils R (2007). Development and structure of eukaryotic biofilms in an extreme acidic environment, Rio Tinto (SW, Spain). *Microb Ecol* **53**: 294-305.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W *et al* (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- 580 Augspurger C, Karwautz C, Mussmann M, Daims H, Battin TJ (2010). Drivers of bacterial colonization patterns in stream biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 47-57.
- Breugelmans P, D'Huys PJ, De Mot R, Springael D (2007). Characterization of novel linuron-mineralizing bacterial consortia enriched from long-term linuron-treated agricultural soils. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 374-385.
- 585 Bubrick P, Galun M, Frensdorff A (1984). Observations on free-living *Trebouxia* Depuymaly and *Pseudotrebouxia* Archibald, and evidence that both symbionts from *Xanthoria parietina* (L) th fr can be found free-living in nature. *New Phytologist* **97**: 455-462.
- Buczolits S, Denner EB, Vybiral D, Wieser M, Kampfer P, Busse HJ (2002). Classification of three airborne bacteria and proposal of *Hymenobacter aerophilus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 445-456.
- 590 Camara B, De Los Rios A, Urizal M, Alvarez de Buergo M, Varas MJ, Fort R *et al* (2011). Characterizing the microbial colonization of a dolostone quarry: Implications for stone biodeterioration and response to biocide treatments. *Microb Ecol* DOI 10.1007/s00248-011-9815-x.
- 595 Chessel D, Dufour AB, Thioulouse J (2004). The ade4 package – I: One-table methods. *R News* **4/1**.
- Dejonghe W, Berteloot E, Goris J, Boon N, Crul K, Maertens S *et al* (2003). Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1532-1541.
- 600 Dray S, Dufour AB (2007). The ade4 Package : Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* **22-4**.
- Eder W, Wanner G, Ludwig W, Busse HJ, Ziemke-Kageler F, Lang E (2011). Description of *Undibacterium oligocarboniphilum* sp. nov., isolated from purified water, and *Undibacterium pigrum* strain CCUG 49012 as the type strain of *Undibacterium parvum* sp. nov., and emended descriptions of the genus *Undibacterium* and the species *Undibacterium pigrum*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 384-391.
- 605 Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792-1797.
- Edwards C, Lawton LA (2009). Bioremediation of cyanotoxins. *Adv Appl Microbiol* **67**: 109-129.
- 610 Ekendahl S, O'Neill AH, Thomsson E, Pedersen K (2003). Characterisation of yeasts isolated from deep igneous rock aquifers of the fennoscandian shield. *Microb Ecol* **17**: 17.
- Finlay BJ (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* **296**: 1061-1063.
- 615 Good IJ (1953). The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**: 237-264.

- Gorbushina AA, Broughton WJ (2009). Microbiology of the atmosphere-rock interface: how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem. *Annu Rev Microbiol* **63**: 431-450.
- 620 Gray DW, Lewis LA, Cardon ZG (2007). Photosynthetic recovery following desiccation of desert green algae (Chlorophyta) and their aquatic relatives. *Plant Cell Environ* **30**: 1240-1255.
- Green J, Bohannan BJ (2006). Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends Ecol Evol* **21**: 501-507.
- 625 Griebler C, Mindl B, Slezak D, Geiger-Kaiser M (2002). Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an in situ sediment exposure microcosm. *Aquatic Microbiol Ecol* **28**: 117-129.
- Guezennec J, Ortega-Morales O, Raguenes G, Geesey G (1998). Bacterial colonization of artificial substrate in the vicinity of deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiol Ecol* **26**: 88-99.
- 630 Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**: 95-108.
- Hughes KA, Lawley B (2003). A novel Antarctic microbial endolithic community within gypsum crusts. *Environ Microbiol* **5**: 555-565.
- 635 Jaccard P (1901). Distribution de la flore alpine dans le bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* **37**: 241-272.
- Jobb G, von Haeseler A, Strimmer K (2004). TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol Biol* **4**: 18.
- Kiorboe T, Tang K, Grossart HP, Ploug H (2003). Dynamics of microbial communities on marine snow aggregates: colonization, growth, detachment, and grazing mortality of attached bacteria. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3036-3047.
- 640 Klassen JL, Foght JM (2008). Differences in carotenoid composition among *Hymenobacter* and related strains support a tree-like model of carotenoid evolution. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2016-2022.
- 645 La Duc MT, Osman S, Vaishampayan P, Piceno Y, Andersen G, Spry JA *et al* (2009). Comprehensive census of bacteria in clean rooms by using DNA microarray and cloning methods. *Appl Environ Microbiol* **75**: 6559-6567.
- Langenheder S, Szekely AJ (2011). Species sorting and neutral processes are both important during the initial assembly of bacterial communities. *Isme J* **5**: 1086-1094.
- 650 Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H *et al* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- Lindström ES, Langenheder S (2011). Local and regional factors influencing bacterial community assembly. *Environmental Microbiology Reports*: no-no.
- López-García P, Duperron S, Philippot P, Foriel J, Susini J, Moreira D (2003a). Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **5**: 961-976.
- 655 López-García P, Philippe H, Gaill F, Moreira D (2003b). Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental micro-colonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 697-702.

- 660 Martiny JB, Bohannan BJ, Brown JH, Colwell RK, Fuhrman JA, Green JL *et al* (2006).  
Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat Rev Microbiol* **4**: 102-  
112.
- McCliment EA, Voglesonger KM, O'Day PA, Dunn EE, Holloway JR, Cary SC (2006).  
665 Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and  
Nanoarchaeal assemblage. *Environ Microbiol* **8**: 114-125.
- Miller AZ, Laiz L, Gonzalez JM, Dionisio A, Macedo MF, Saiz-Jimenez C (2008).  
Reproducing stone monument photosynthetic-based colonization under laboratory  
conditions. *Sci Total Environ* **405**: 278-285.
- 670 Nascimbene J, Thus H, Marini L, Nimis PL (2009). Early colonization of stone by freshwater  
lichens of restored habitats: a case study in northern Italy. *Sci Total Environ* **407**: 5001-  
5006.
- O'Malley MA (2007). The nineteenth century roots of 'everything is everywhere'. *Nat Rev  
Microbiol* **5**: 647-651.
- 675 Philippe H (1993). MUST, a computer package of Management Utilities for Sequences and  
Trees. *Nucleic Acids Res* **21**: 5264-5272.
- Pohlen E, Marxsen J, Kusel K (2010). Pioneering bacterial and algal communities and  
potential extracellular enzyme activities of stream biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* **71**:  
364-373.
- 680 R Development Core Team (2011). R: A Language and Environment for Statistical  
Computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
- Ragon M, Restoux G, Moreira D, Moller AP, Lopez-Garcia P (2011). Sunlight-exposed  
biofilm microbial communities are naturally resistant to Chernobyl ionizing-radiation  
levels. *PLoS ONE* **6**: e21764.
- 685 Rainey FA, Ray K, Ferreira M, Gatz BZ, Nobre MF, Bagaley D *et al* (2005). Extensive  
diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and  
description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil  
sample. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5225-5235.
- Ramette A, Tiedje JM (2007). Biogeography: an emerging cornerstone for understanding  
prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microb Ecol* **53**: 197-207.
- 690 Roeselers G, van Loosdrecht MC, Muyzer G (2007). Heterotrophic pioneers facilitate  
phototrophic biofilm development. *Microb Ecol* **54**: 578-585.
- Scheerer S, Ortega-Morales O, Gaylarde C (2009). Microbial deterioration of stone  
monuments--an updated overview. *Adv Appl Microbiol* **66**: 97-139.
- 695 Schloss PD, Handelsman J (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining  
operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* **71**:  
1501-1506.
- Sette LD, Passarini MRZ, Rodrigues A, Leal RR, Simioni KCM, Nobre FS *et al* (2010).  
Fungal diversity associated with Brazilian energy transmission towers. *Fungal Diversity*  
**44**: 53-63.
- 700 Shi T, Fredrickson JK, Balkwill DL (2001). Biodegradation of polycyclic aromatic  
hydrocarbons by *Sphingomonas* strains isolated from the terrestrial subsurface. *J Ind  
Microbiol Biotechnol* **26**: 283-289.

- 705 Sloan WT, Lunn M, Woodcock S, Head IM, Nee S, Curtis TP (2006). Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environ Microbiol* **8**: 732-740.
- Sterflinger K, De Baere R, de Hoog GS, De Wachter R, Krumbein WE, Haase G (1997). *Coniosporium perforans* and *C. apollinis*, two new rock-inhabiting fungi isolated from marble in the Sanctuary of Delos (Cyclades, Greece). *Antonie Van Leeuwenhoek* **72**: 349-363.
- 710 Sterflinger K, Prillinger H (2001). Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in an urban environment (Vienna, Austria). *Antonie Van Leeuwenhoek* **80**: 275-286.
- Stolz A (2009). Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 793-811.
- 715 van Niel CB (1949). The 'Delft School' and the rise of general microbiology. *Bacteriol Rev*: 161-174.
- Walter J, Ley RE (2011). The human gut microbiome: Ecology and recent evolutionary changes. *Annu Rev Microbiol* [Epub ahead of print].
- 720 Whitaker RJ (2006). Allopatric origins of microbial species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**: 1975-1984.
- Wollenzien U, de Hoog GS, Krumbein W, Uijthof JM (1997). *Sarcinomyces petricola*, a new microcolonial fungus from marble in the Mediterranean basin. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**: 281-288.
- 725 Wood TK, Hong SH, Ma Q (2011). Engineering biofilm formation and dispersal. *Trends Biotechnol* **29**: 87-94.
- Woodcock S, Van Der Gast CJ, Bell T, Lunn M, Curtis TP, Head IM *et al* (2007). Neutral assembly of bacterial communities. *Fems Microbiology Ecology* **62**: 171-180.



730 **Figure legends**

**Figure 1.** Taxonomic distribution of bacterial and eukaryotic SSU rDNA sequences during colonization and epilithic biofilm formation. Sequences were retrieved from mineral substrates exposed for up to 24 months in three geographic locations in Northern Ireland and France. At  $t=0$ , prior to exposure, the bacterial diversity identified (from semi-nested PCR reactions) was taken as a control of initial contaminants and must have been the same for the three locations (\*). At  $t=0$ , no eukaryotes were detected, even after semi-nested PCR amplification (\*\*). At  $t=6$  months, SSU rDNA libraries were constructed only for Ballyclare, since biofilms were not visible and direct amplification yielded no visible amplicons (\*\*\*) (see also Table 1).

**Figure 2.** Cluster analysis of DGGE fingerprints for bacteria and eukaryotes during mineral colonization and biofilm formation. Numbered bands were cut and the DNA sequenced (see Table S1).

**Figure 3.** Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences belonging to the Gamma- and Beta-Proteobacteria from nascent epilithic biofilms. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 734 non-ambiguously aligned positions. Sequence names in color were obtained in this work; sequences in bold were retrieved from mature biofilm communities (Ragon et al., Article 1). Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilm samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.

**Figure 4.** Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences belonging to the Actinobacteria and Bacteroidetes from nascent epilithic biofilms. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 858 non-ambiguously aligned positions. Sequence names in color were obtained in this work; sequences in bold were retrieved from mature biofilm communities (Ragon et al., Article 1). Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilm samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.

**Figure 5.** Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences belonging to ascomycete fungi from nascent epilithic biofilms. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 1064 non-ambiguously aligned positions and rooted with three basidiomycete sequences. Sequence names in color were obtained in this work; sequences in bold were retrieved from mature biofilm communities (Ragon et al., Article 1). Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilm samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.

**Figure 6.** Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences belonging to basidiomycete fungi from nascent epilithic biofilms. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 1027 non-ambiguously aligned positions and rooted with two ascomycete sequences. Sequence names in color were obtained in this work; sequences in bold were retrieved from mature biofilm communities (Ragon et al., Article 1). Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilm samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.

**Figure 7.** Biplots of correspondence analyses (CoA) of bacterial and eukaryotic variables at two different levels of phylogenetic resolution (OTUs and high-rank taxa) identified in exposed mineral substrates at different colonization times (0, 6, 12 and 24 months, when applicable). Bt, Ballyclare (Northern Ireland); SG, Aubervilliers, Paris (France); St, Servas, Lyon (France).

**Figure 8.** CoA-based between-class analysis of bacterial and eukaryotic OTUs in exposed mineral substrates at different colonization times (0, 6, 12 and 24 months, when applicable). Bt, Ballyclare; SG, Aubervilliers-Paris; St, Servas-Lyon. The percentage of the among-class inertia explained by each axis is indicated in parenthesis. The total proportion of the inertia explained by the classes (i.e. sum over all axis) and the associated simulated p-values (when significant) are indicated in the inset; n.s., non-significant.

**Table 1.** Location, number of SSU rDNA sequences analyzed per gene library and Operational Taxonomic Units (OTUs) detected for subaerial biofilm samples growing on the same mineral substrate in three different locations analyzed in this study. N.D., not done

Sample Name	Geographic origin	Coordinates	Months of exposure	Coloration	Bacteria					Eukaryotes						
					SSU rDNA sequences analyzed	No. of OTUs	Simpson	Shannon	Chao1	% coverage	SSU rDNA sequences analyzed	No. of OTUs	Simpson	Shannon	Chao1	% coverage
<b>Bt0</b>	Ballyclare Northern Ireland	54° 45.112'N 6° 0.156'W	0	none	35*	9	0.41	1.41	15.3	87,8	N.D.	N.D.				
<b>Bt6</b>	Ballyclare Northern Ireland	54° 45.112'N 6° 0.156'W	6	none	61*	11	0.35	1.62	33	96,6	43*	16	0.17	2.16	23.2	81,4
<b>Bt12</b>	Ballyclare Northern Ireland	54° 45.112'N 6° 0.156'W	12	light green	81*	9	0.56	0.92	6.5	96,3	120	20	0.26	1.69	20.25	94
<b>Bt24</b>	Ballyclare Northern Ireland	54° 45.112'N 6° 0.156'W	24	green	189	27	0.23	2.04	20.86	97,8	177	9	0.53	0.96	10	97,7
<b>St12</b>	Servas, Lyon, France	46° 7.960'N 5° 9.897'E	12	green	213	38	0.12	2.37	41	95,7	112	16	0.21	2.05	41.5	96,4
<b>St24</b>	Servas, Lyon, France	46° 7.960'N 5° 9.897'E	24	green	225	36	0.17	2.33	37	95,1	183	18	0.17	2.18	29.43	96,8
<b>SGt12</b>	Aubervilliers, Paris, France	48° 54.889'N 2° 22.872'E	12	none	82*	15	0.14	2.21	35	93,9	46	6	0.35	1.12	4	97,8
<b>SGt24</b>	Aubervilliers, Paris, France	48° 54.889'N 2° 22.872'E	24	green	222	26	0.10	2.75	42.66	97,7	85	16	0.23	1.89	14	96,5

\* Libraries obtained from semi-nested PCR reactions

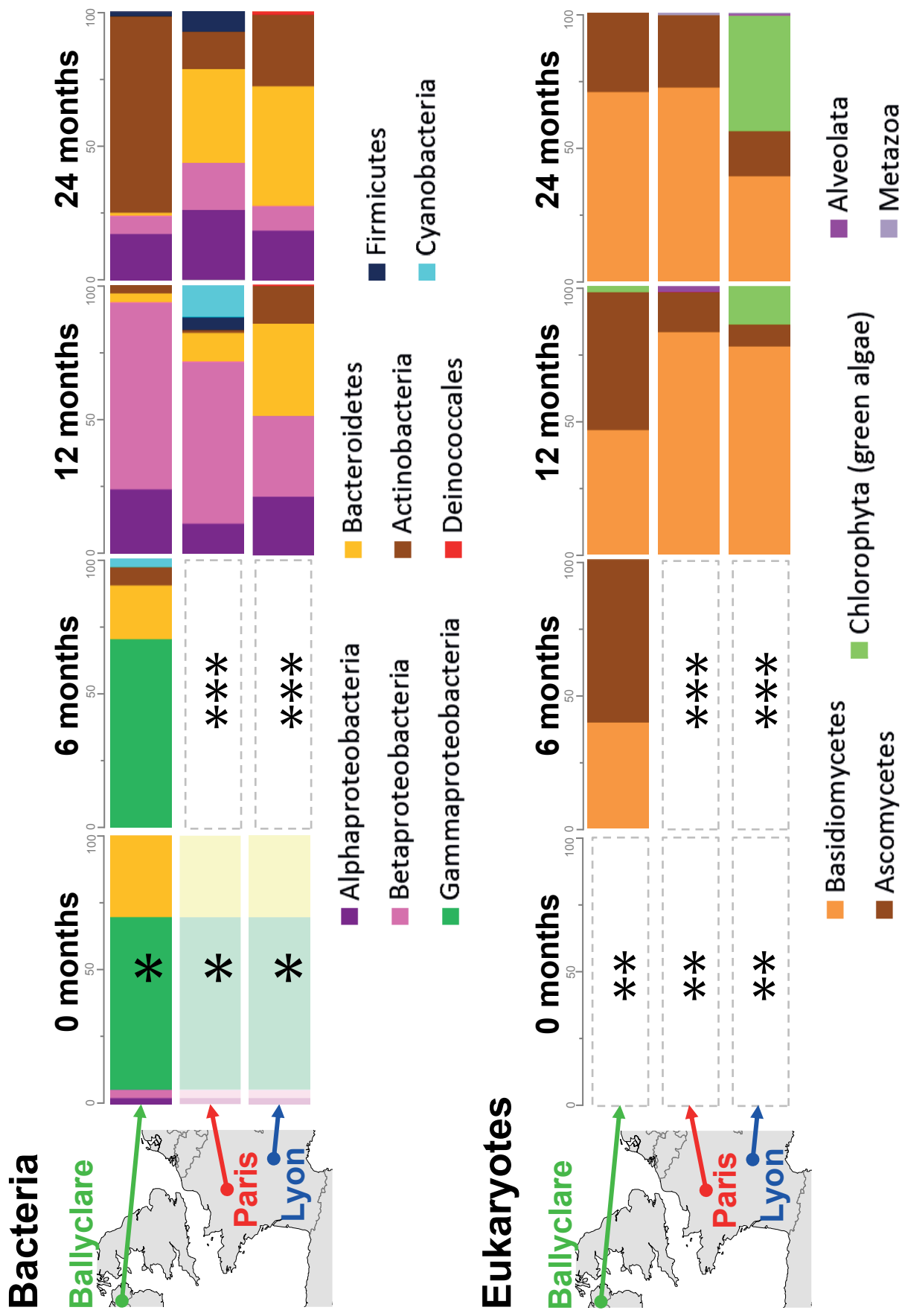
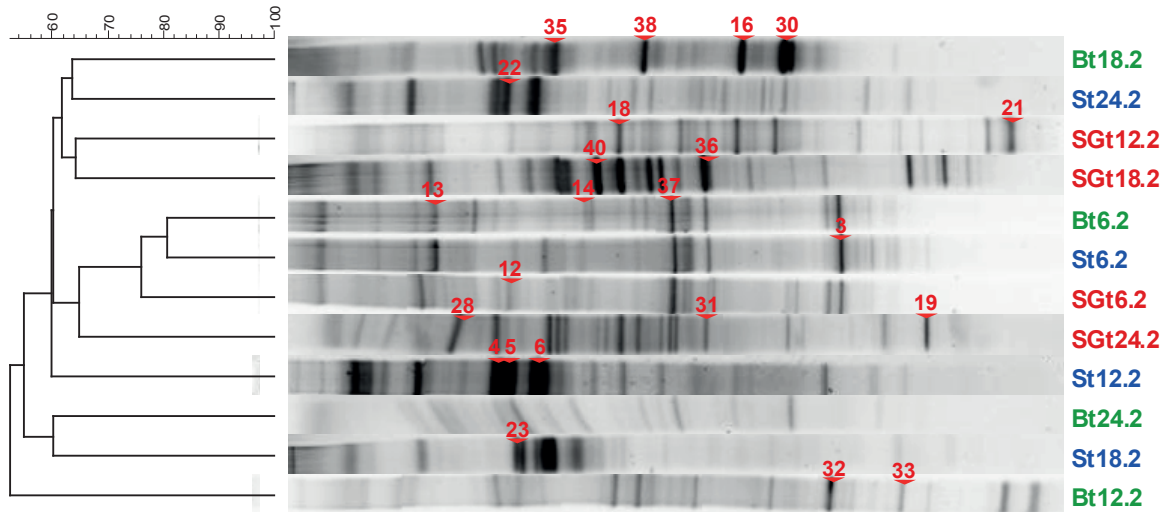
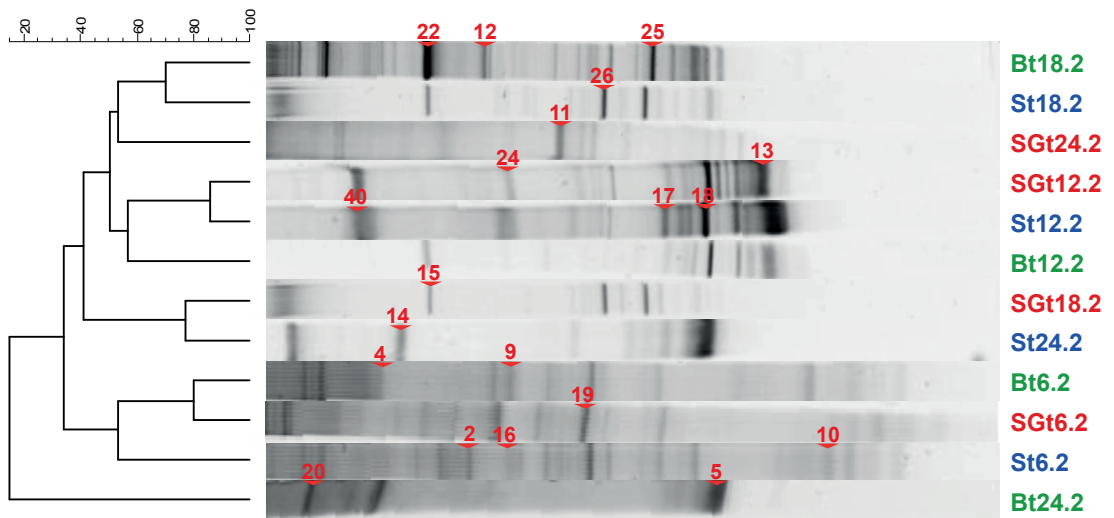


Figure 1. Ragon et al.

## Bacteria



## Eukaryotes



Ballyclare (Northern Ireland)

Aubervilliers, Paris (France)

Servas, Lyon (France)

Figure 2. Ragon et al.



Figure 3. Ragon et al.

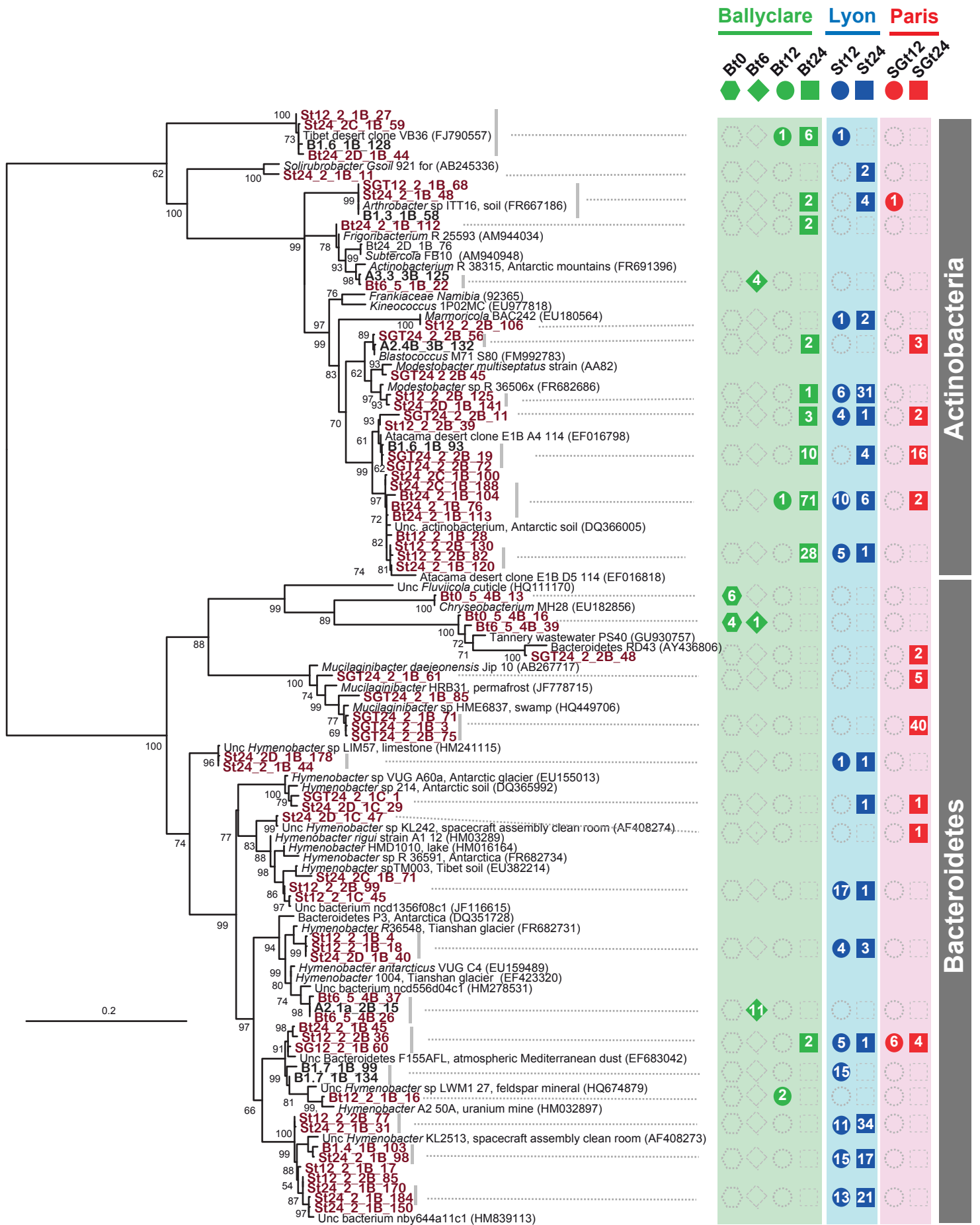


Figure 4. Ragon et al.

**Ballyclare Lyon Paris**

Bt0 Bt6 Bt12 Bt24 St12 St24 SGT12 SGT24

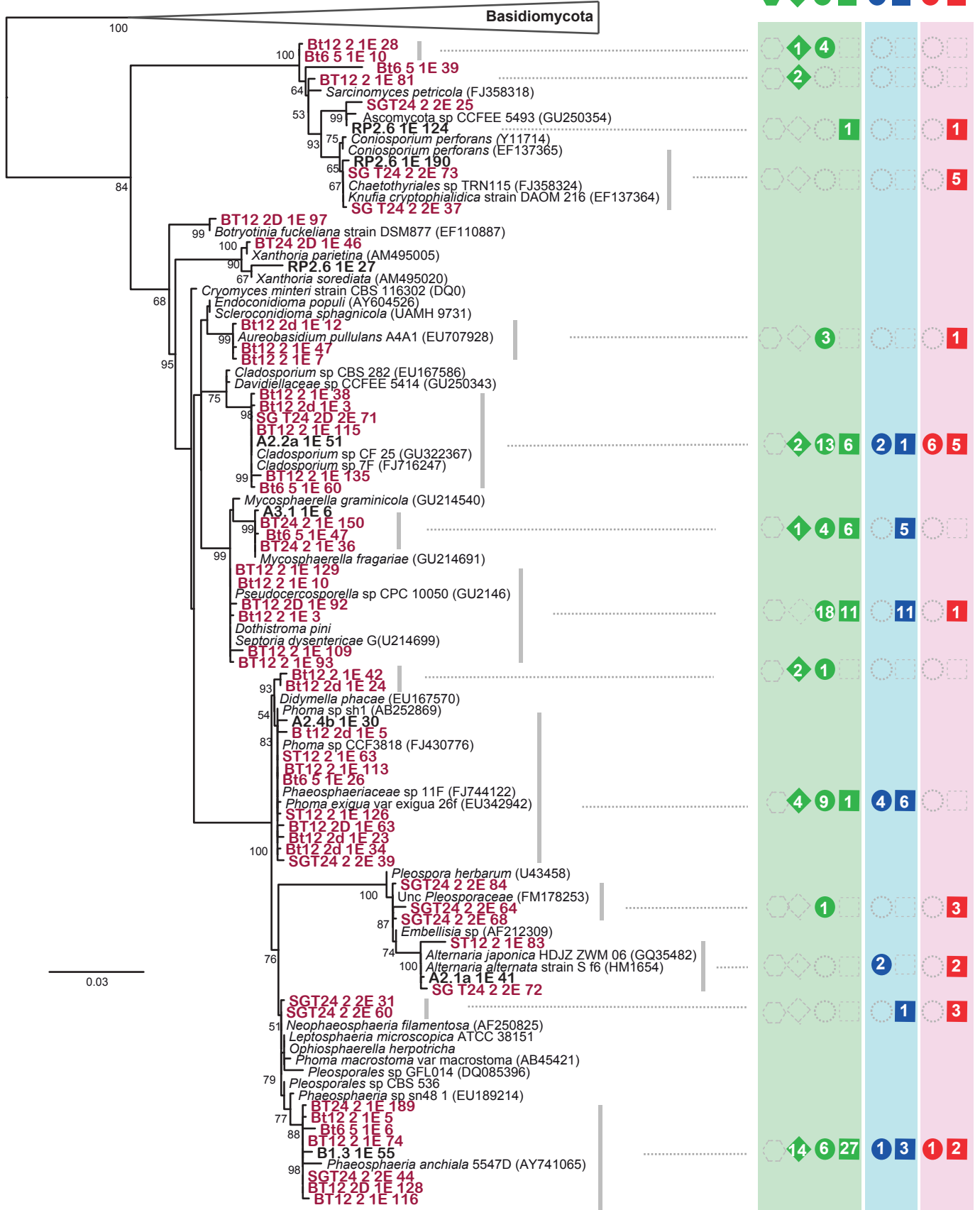


Figure 5. Ragon et al.



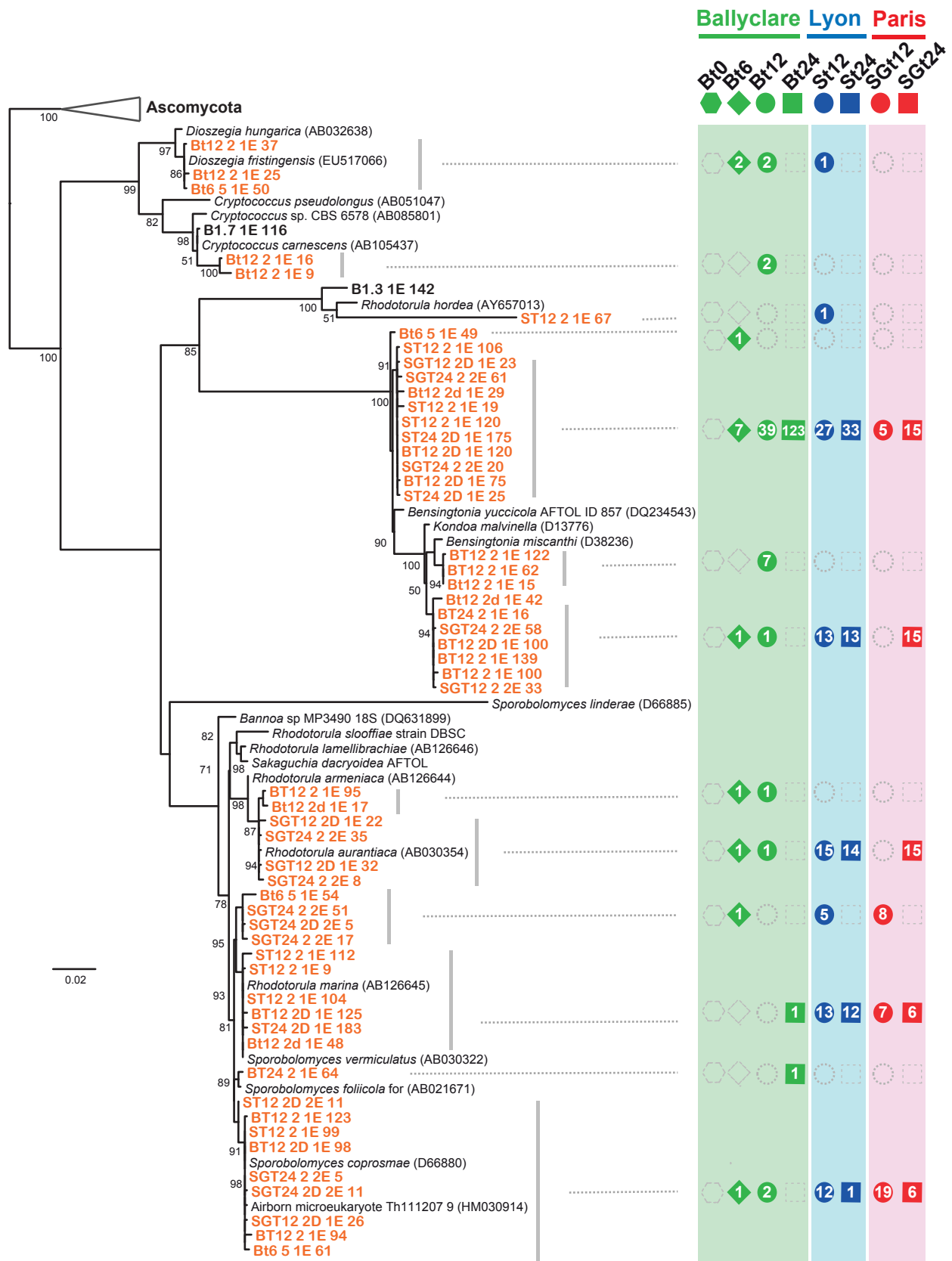
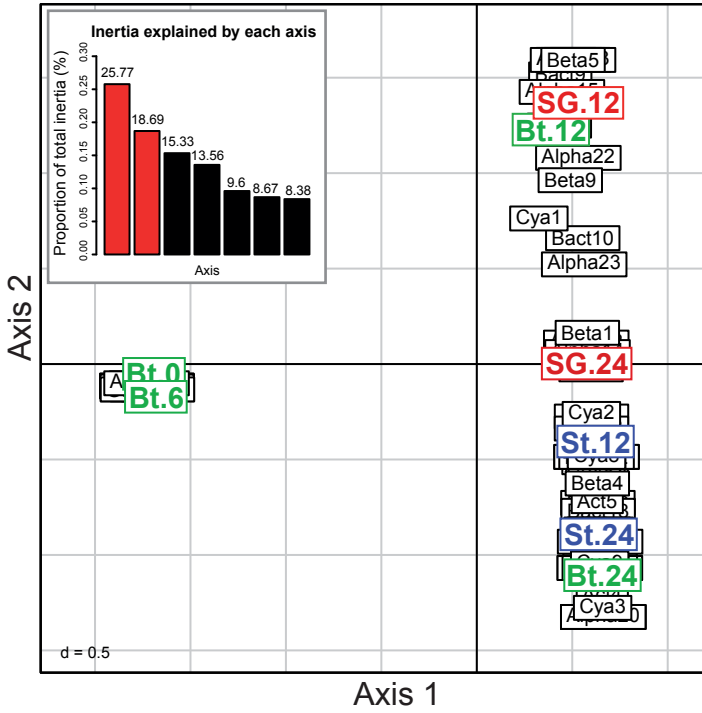


Figure 6. Ragon et al.

Bacteria



Eukaryotes

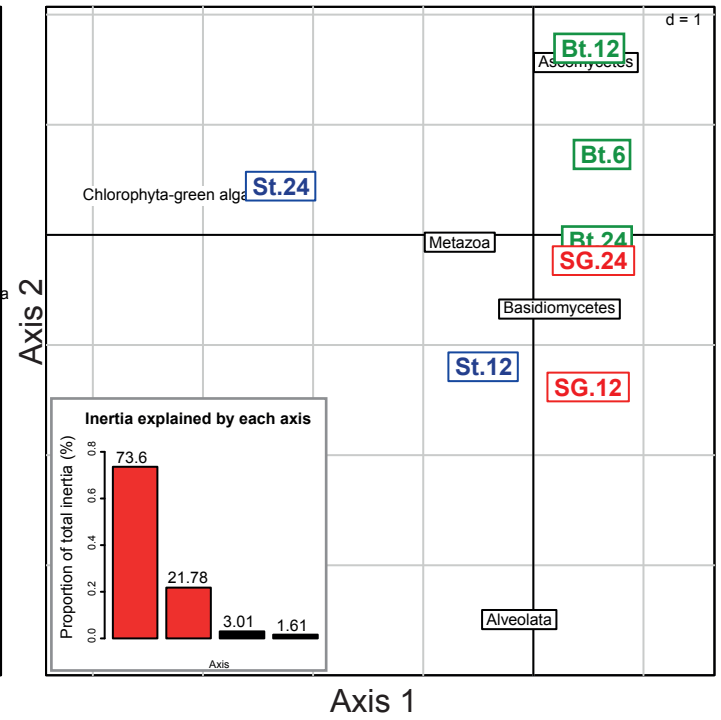
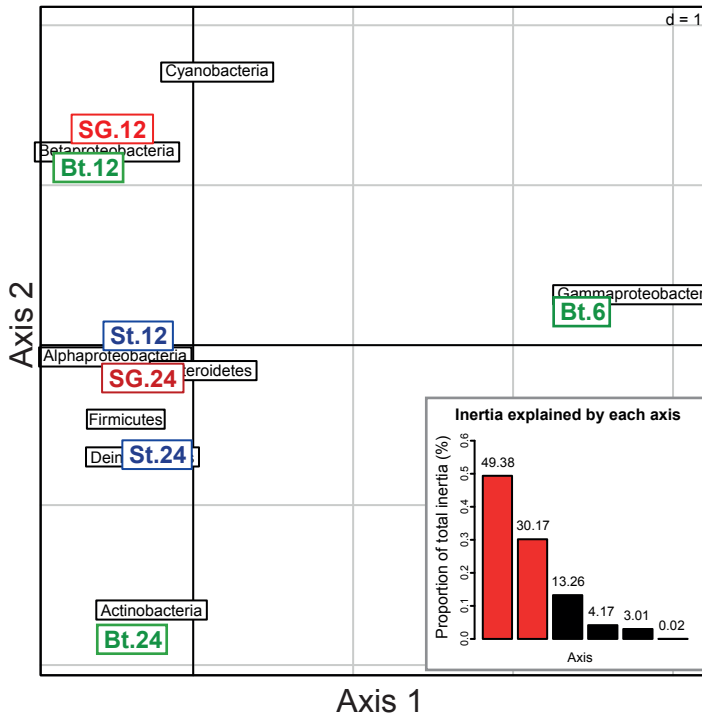
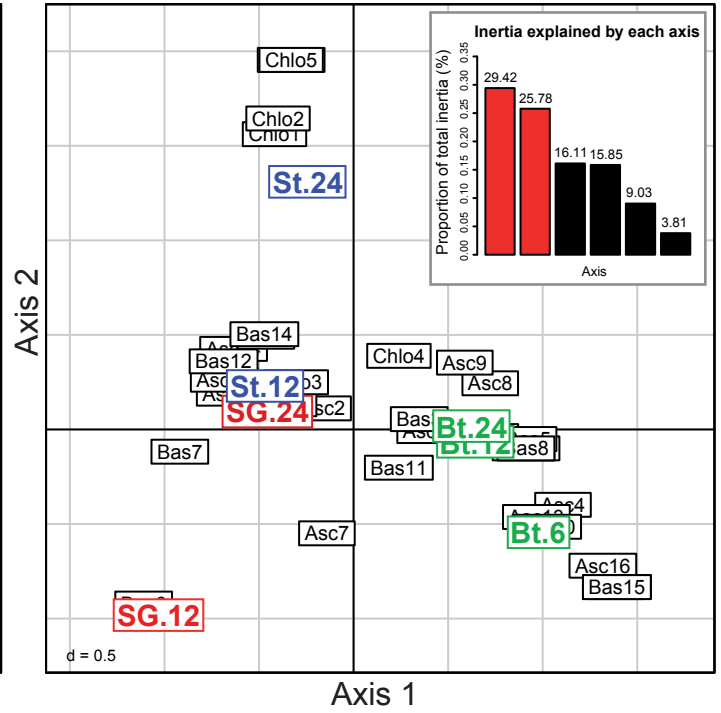


Figure 7. Ragon et al.

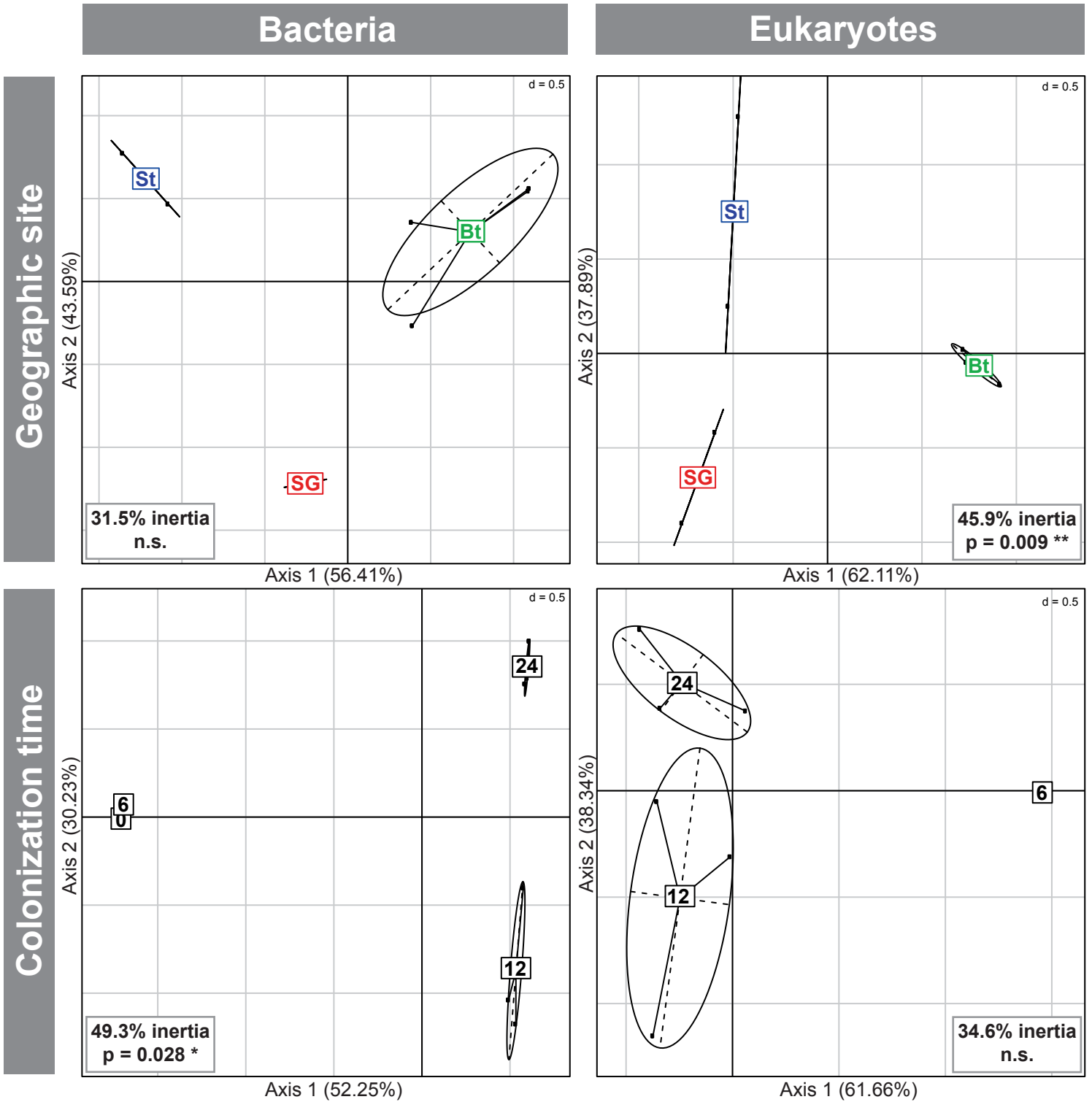
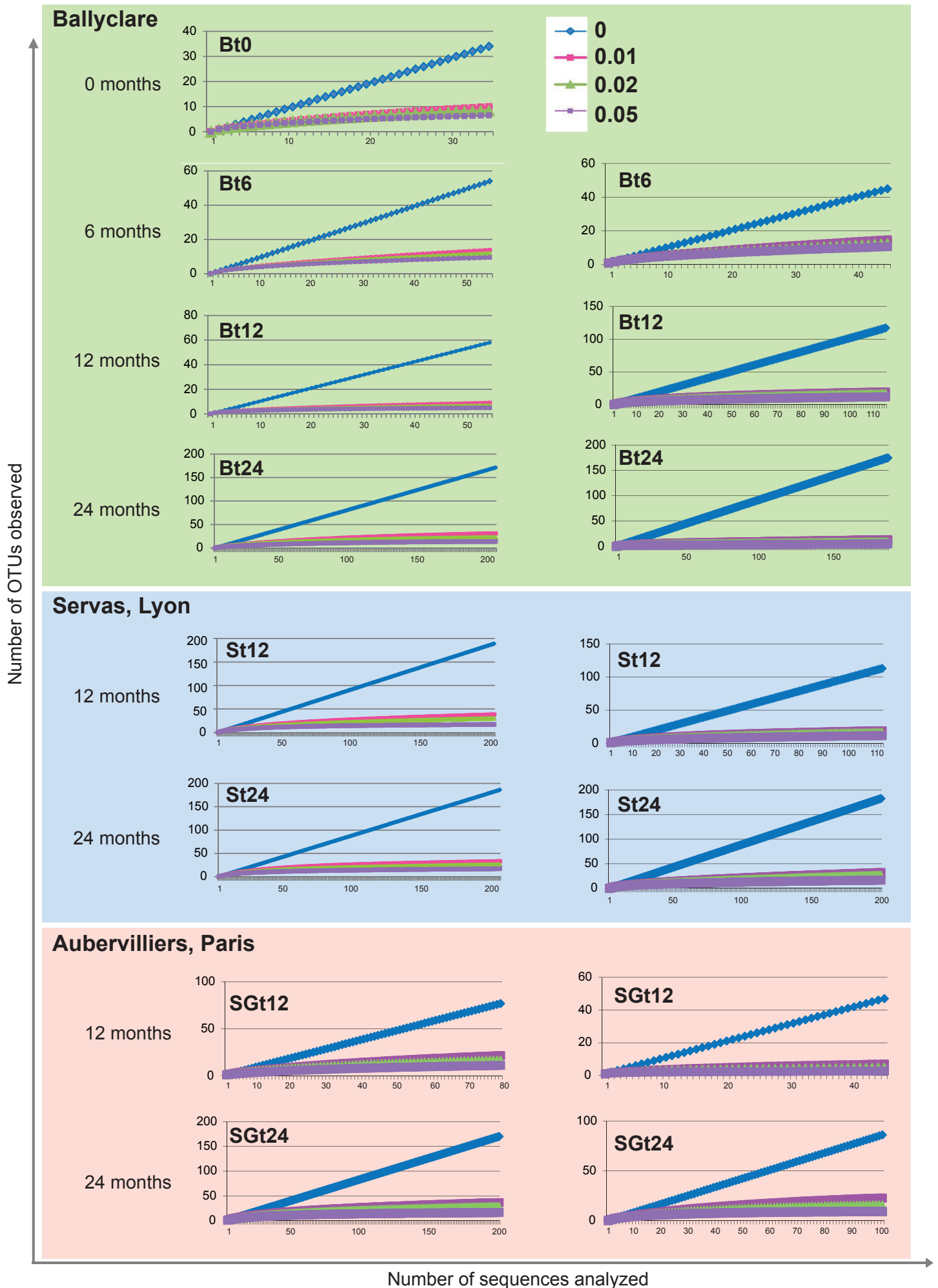


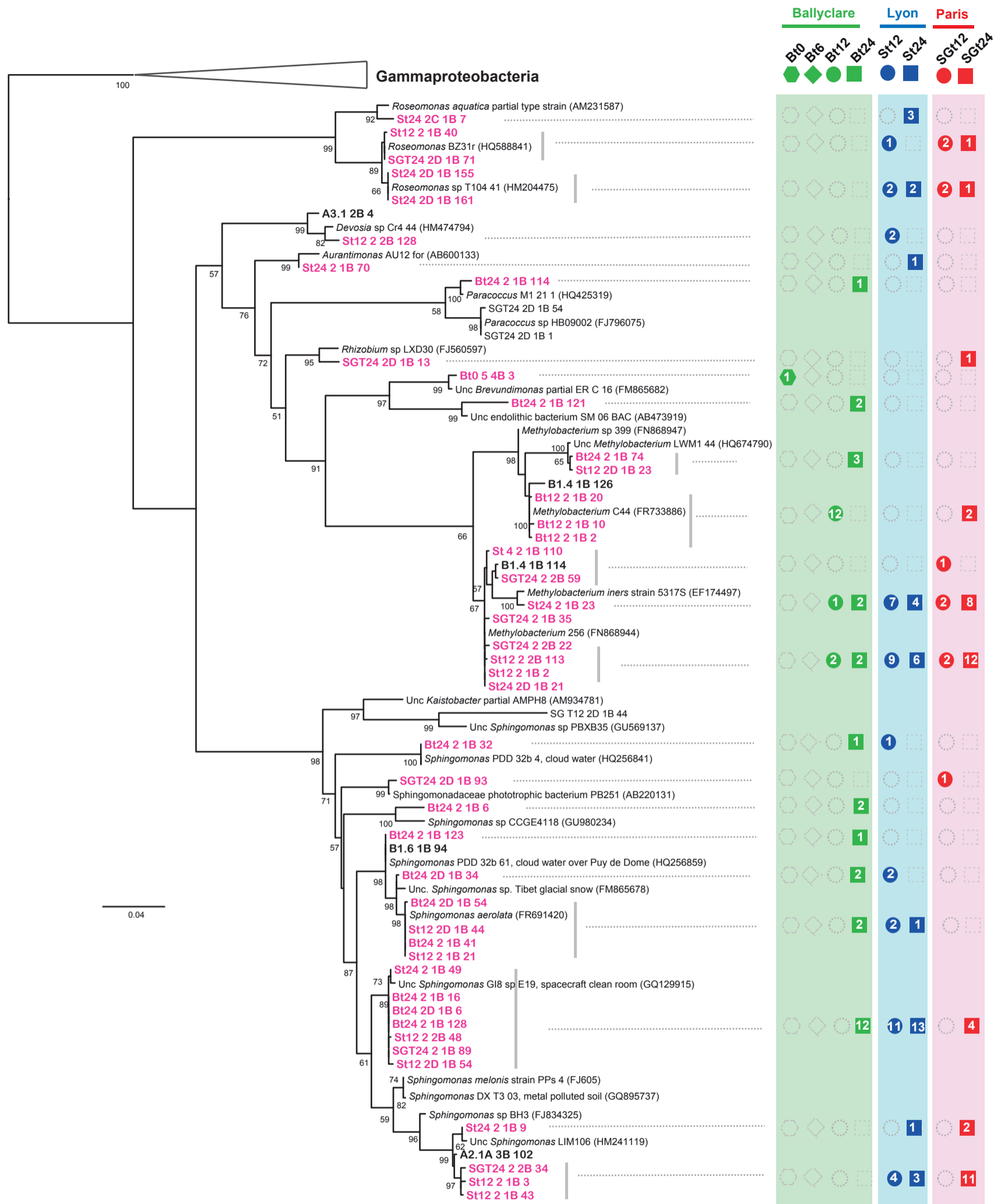
Figure 8. Ragon et al.

# Bacteria

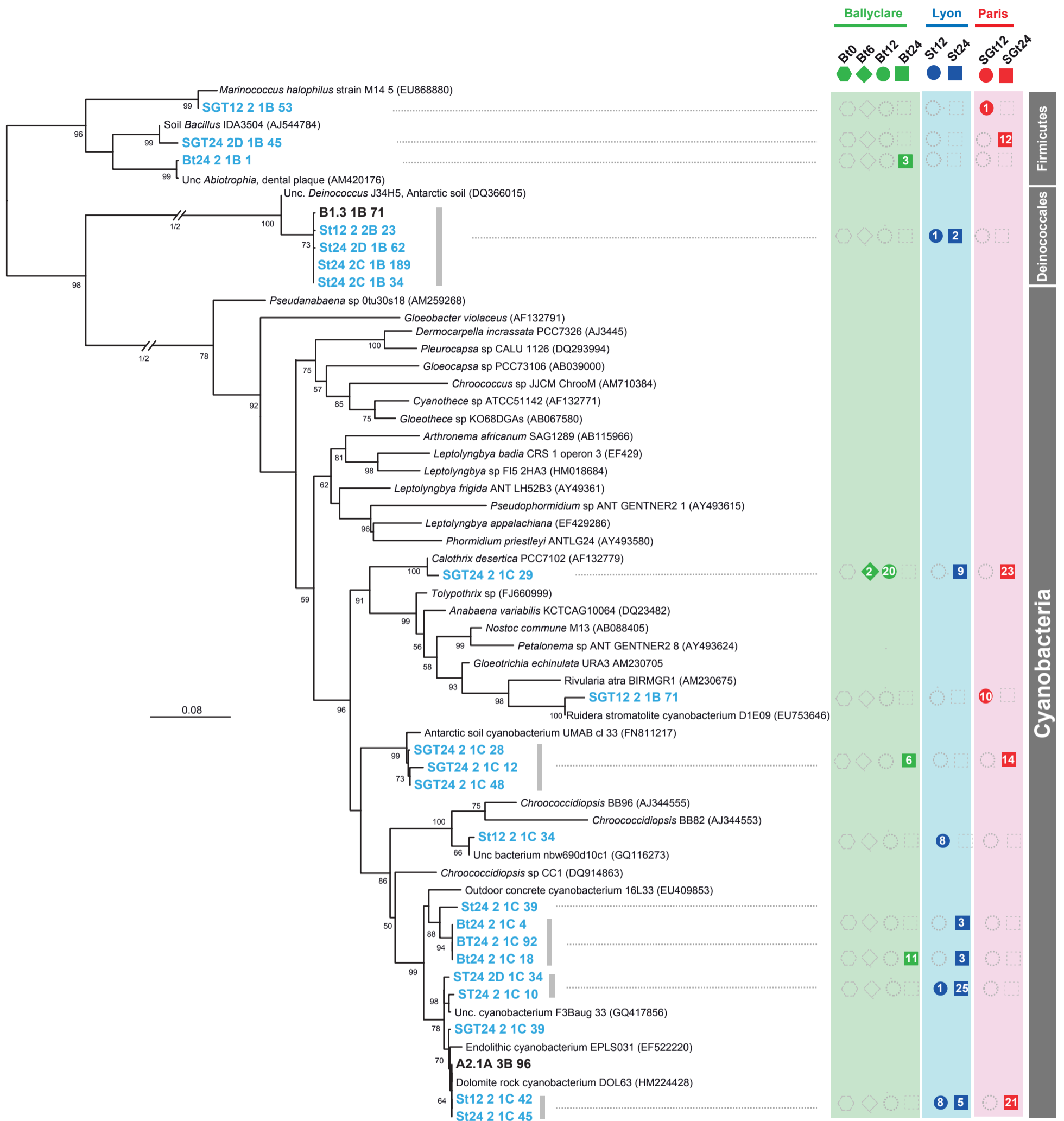
# Eukaryotes



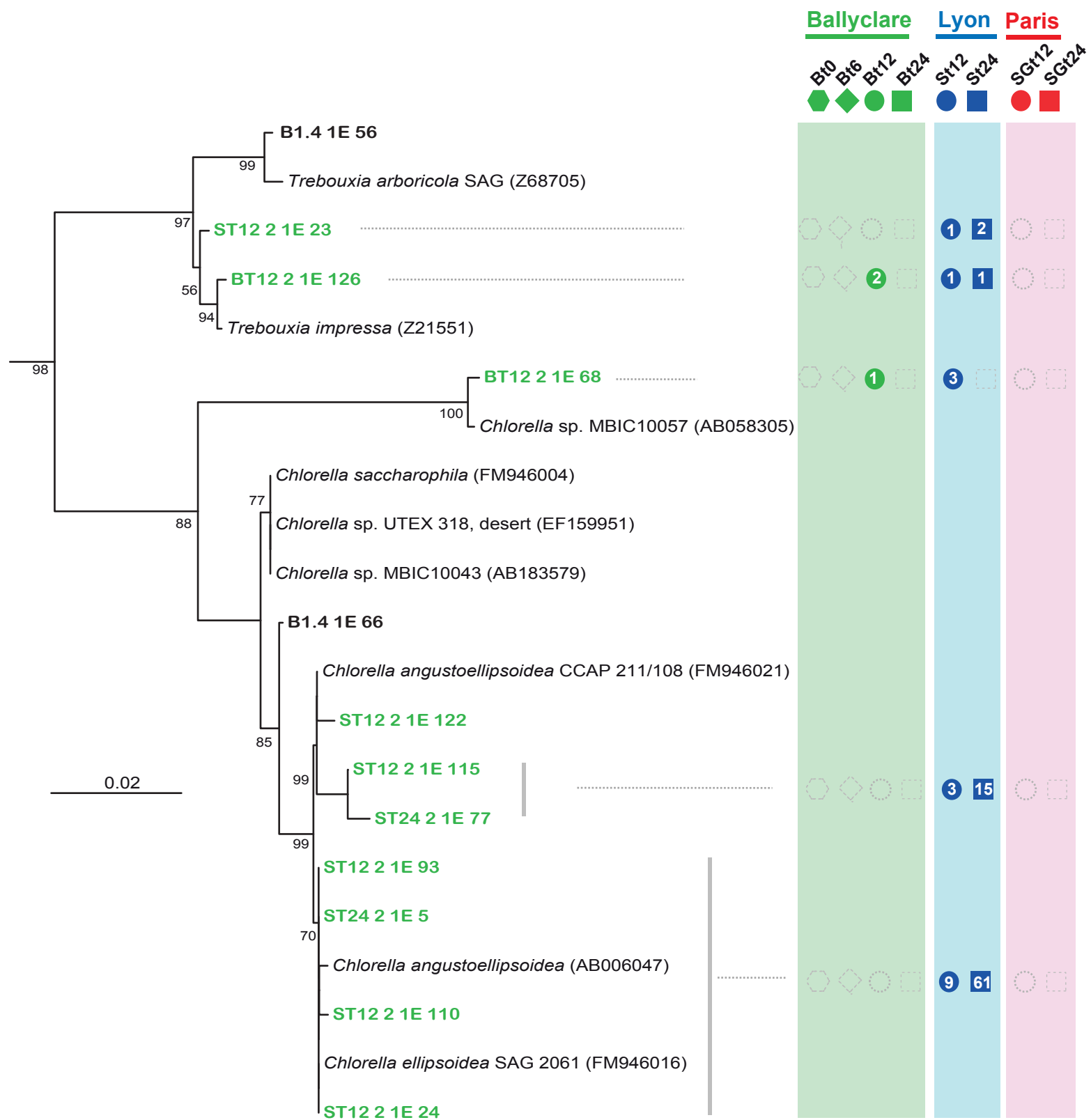
**Figure S1.** Accumulation curves for bacterial and eukaryotic SSU rDNA sequences in biofilms from different geographic areas at different exposure times. The accumulation curves have been done at different SSU rDNA similarity cutoff values.



**Figure S2.** Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences belonging to Alphaproteobacteria from nascent epilithic biofilms. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 839 non-ambiguously aligned positions and rooted with three gammaproteobacterial sequences. Sequence names in color were obtained in this work; sequences in bold were retrieved from mature biofilm communities (Ragon et al., Article 1). Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilm samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.

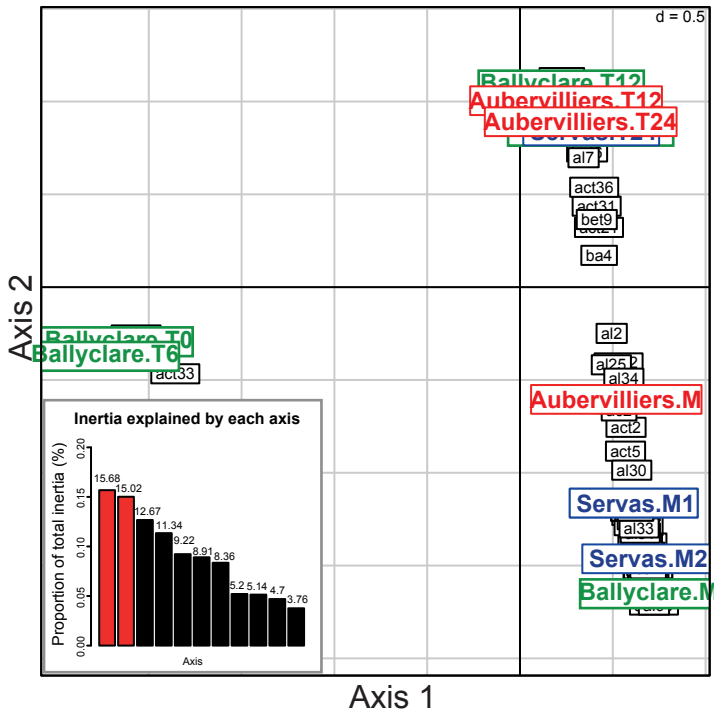


**Figure S3.** Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences belonging to Cyanobacteria, Deinococcales and Firmicutes from nascent epilithic biofilms. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 830 non-ambiguously aligned positions. Sequence names in color were obtained in this work; sequences in bold were retrieved from mature biofilm communities (Ragon et al., Article 1). Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilm samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.

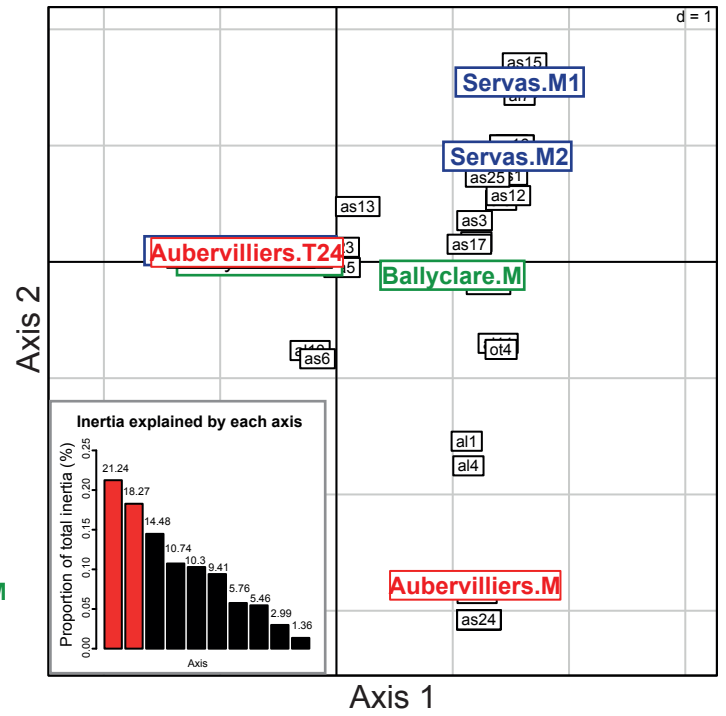


**Figure S4.** Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences belonging to green algae (Chlorophyta) from nascent epilithic biofilms. The tree was reconstructed by maximum likelihood using 1002 non-ambiguously aligned positions and rooted with five Streptophyta. Sequence names in color were obtained in this work; sequences in bold were retrieved from mature biofilm communities (Ragon et al., Article 1). Bootstrap values higher than 50% are given at nodes. Colored circles indicated the number of occurrences of the different OTUs in gene libraries from the different biofilm samples. Accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the number of changes per nucleotide per unit branch length. Unc., uncultured.

## Bacteria

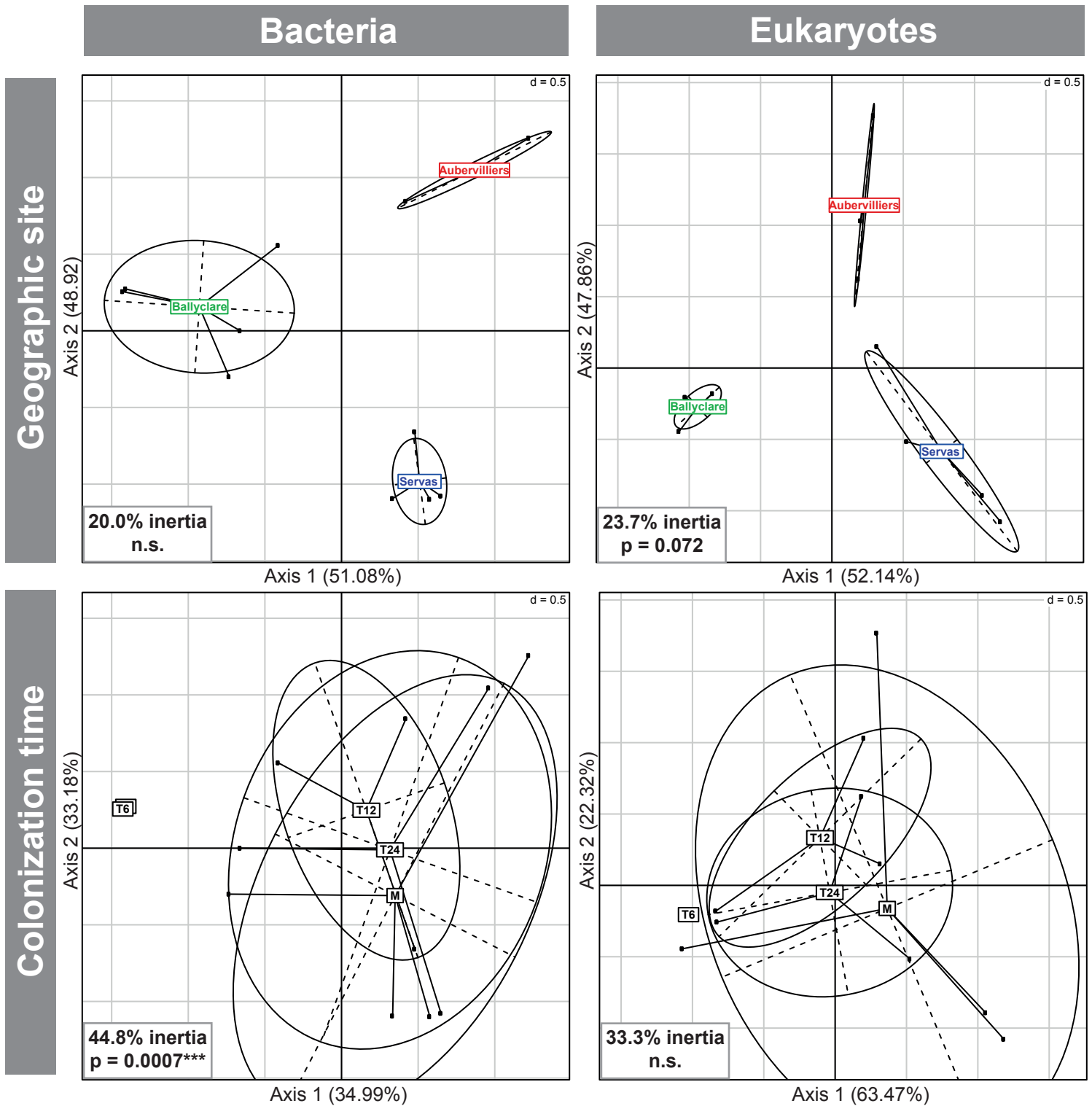


## Eukaryotes

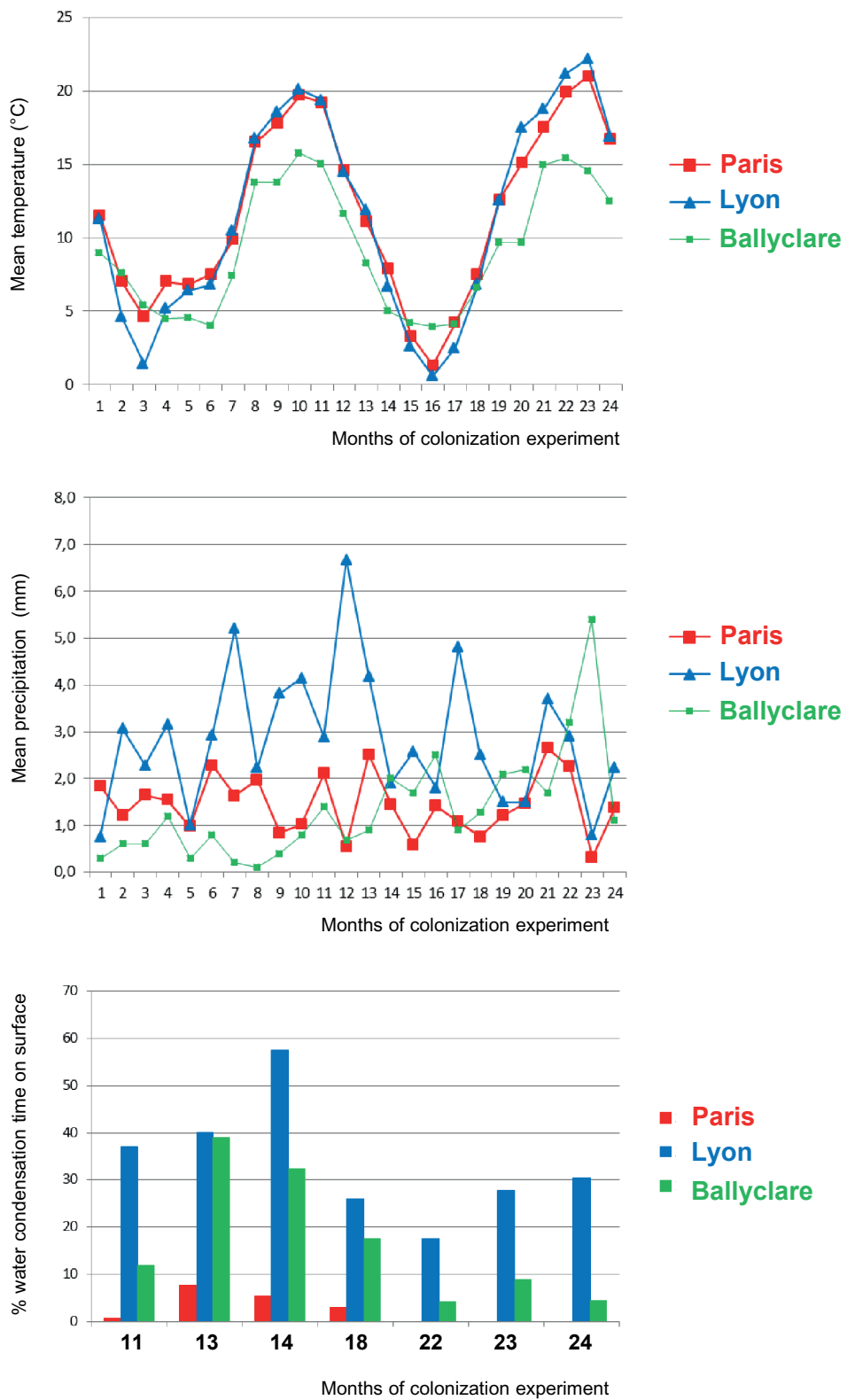


**Figure S** . Biplot of the correspondence analysis (CoA) of bacterial and eukaryotic OTUs identified in the exposed mineral substrates at different colonization times (0, 6, 12 and 24 months) and including mature communities ( $t > 4$  years, labeled M). Ballyclare (Northern Ireland); Aubervilliers, Paris (France); Servas, Lyon (France). Mature biofilm samples from the same mineral support correspond to those from Ragon et al. (Article 1).





**Figure S\***. CoA-based between-class analysis of bacterial and eukaryotic OTUs in exposed mineral substrates at different colonization times (0, 6, 12 and 24 months, when applicable) and including mature communities (t>4 years, labeled M). Ballyclare (Northern Ireland); Aubervilliers, Paris (France); Servas, Lyon (France). The percentage of the among-class inertia explained by each axis is indicated in parenthesis. The total proportion of the inertia explained by the classes (i.e. sum over all axis) and the associated simulated p-values (when significant) are indicated in the inset; n.s., non-significant.



**Figure S7.** Local physical parameters at the three exposure sites collected during colonization experiments. At months 22, 23 and 24, the value was 0 for Paris.

### IV.3.2. Synthèse et discussion autour de l'article 3

Nos analyses des substrats minéraux exposés le long de deux ans ont montré des changements dans la composition des communautés microbiennes non seulement en terme de proportions mais également de diversité entre les phases initiales de formation du biofilm et les étapes plus avancées. Tout d'abord aucune archée n'a été détectée dans ces biofilms exposés (résultats en accord avec les articles 1&2). La communauté microbienne semble évoluer le long du temps d'autant plus pour les bactéries que pour les eucaryotes, mais semble aussi se diversifier. Au début de la colonisation, les bactéries dominantes sont essentiellement des Gammaproteobacteria et des Bacteroidetes, et pour les eucaryotes uniquement des champignons et en majorité de type ascomycètes. Puis le long du temps, la diversité change et les premiers organismes détectés se font plus rares, laissant place à une diversité plus importante, avec apparition de nouveaux groupes d'Alphaproteobacteria, mais également de Betaproteobacteria, d'Actinobacteria et dans certains échantillons des Cyanobacteria et des Deinococcales. Les eucaryotes se diversifient également avec plus de champignons de type basidiomycètes et dans les échantillons les plus colonisés la présence d'algues vertes. Certaines OTUs ne sont retrouvées que dans les premières étapes, d'autres uniquement sur la fin et certaines perdurent tout au long de la formation du biofilm. C'est le cas, et ce de façon très évidente pour les OTUs relatives aux Gammaproteobacteria (mais aussi certains Bacteroidetes), qui dominant largement aux premiers temps des expériences de colonisation et qui ensuite disparaissent du biofilm. Certaines OTUs persistent quant à elles tout le long de la colonisation et de la formation du biofilm, certaines Bacteroidetes relatives aux *Hymenobacter*, retrouvés fréquemment dans les déserts (Rainey, Ray et al. 2005) ou encore des Alphaproteobacteria relatives à *Sphingomonas* et *Methylobacterium*, producteurs de pigments. Ces groupes de microorganismes semblent donc avoir persistés parmi le pool des bactéries initiales qui ont été sélectionnées par les conditions environnementales. De manière surprenante, les phototrophes ne semblent pas être les premiers colonisateurs majoritaires, comme on aurait pu s'y attendre. Ce processus inversé où les hétérotrophes interviennent dans les étapes initiales de formation du biofilm permettant ensuite aux phototrophes de coloniser le substrat a été observé au moins dans une expérience de colonisation de surfaces en milieu aquatique sous conditions particulières d'exposition à la lumière (Roeselers, van Loosdrecht et al. 2007). Notre étude étend cette observation à des biofilms épilithiques, la majorité de cyanobactéries semble apparaître plus tard dans la colonisation ou du moins sont détectées plus tardivement. Etant donné le peu de microorganismes aux premières phases de développement du biofilm et donc le peu d'ADN disponible, il se pourrait que les cyanobactéries bien que présentes ne soient pas détectées aussi par des questions d'hétérogénéité. Mais aussi, il a été observé dans les résultats du chapitre IV.1, que la proportion de

cyanobactéries dans la communauté du biofilm est peut être supérieure à ce que les résultats des banques de clones semble indiquer. Les analyses menées en fingerprint ont d'ailleurs révélées que ces bactéries photosynthétiques étaient bien présentes dans le biofilm. Les cyanobactéries ne semblent de toute manière pas être majoritaires dans les étapes initiales d'établissement du biofilm.

Concernant les eucaryotes, les ascomycètes et les basidiomycètes dominants au début semblent quant à eux persister tout le long de la formation du biofilm. Il semblerait donc déjà que les procaryotes et les eucaryotes n'adoptent pas les mêmes types de comportements lors du processus de colonisation. Concernant les eucaryotes photosynthétiques, aucune algue n'a été détectée aux premiers temps de colonisation, mais uniquement à partir de 12 mois et de façon encore plus importante à 24 mois et uniquement au site de Lyon. Il semblerait que la localisation géographique et les conditions environnementales particulièrement favorables (plus d'humidité) facilitent un développement plus rapide de ce biofilm et une évolution de la communauté eucaryote. Les communautés microbiennes, qu'il s'agisse des procaryotes ou des eucaryotes semblent de toute façon évoluer et se diversifier le long de la colonisation en terme d'OTUs. La diversification est certainement plus importante pour les procaryotes, lié peut être à leur capacité de dispersion mais également au fait que déjà dans des communautés mûres, les bactéries sont souvent plus diverses que les eucaryotes.

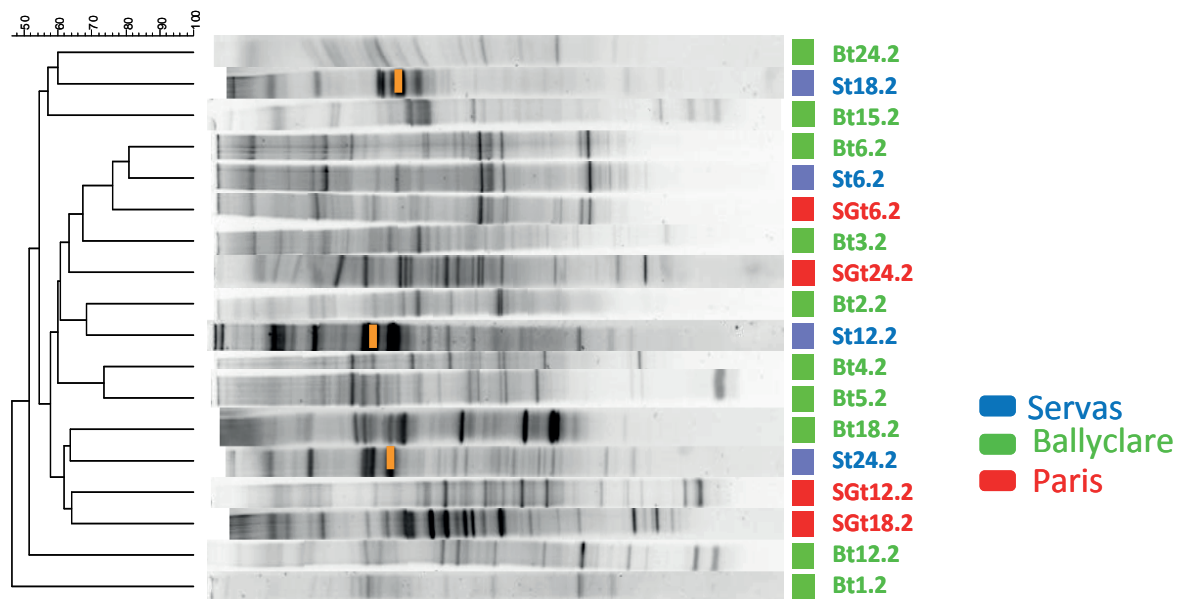
On observe également une influence importante de la géographie, en particulier en ce qui concerne la vitesse de colonisation et la diversité microbienne. Ainsi, le site de Servas (Lyon), présentant les conditions climatiques les plus favorables (humidité et température, Annexe III.2.b et III.2.c) montrait une communauté microbienne procaryote et eucaryote plus développée et plus diverse mais surtout établie de manière plus précoce. De plus, il s'agit du seul site parmi les trois où des algues vertes (Chlorophyta) ont été détectées, ces algues constituant une composante très importante dans les communautés mûres. Il semblerait donc que la localisation géographique ait un effet plus important pour les eucaryotes que pour les procaryotes, résultat en accord avec ceux du chapitre IV.1.

Ces observations ont été fortement soutenues par les analyses statistiques mise en œuvre sur ces données. En effet, les analyses de correspondance menées à l'échelle phylogénétique de l'OTU montraient, que l'évolution des communautés bactériennes était fortement liée à un effet « temps d'exposition », alors que pour les eucaryotes, leur diversité était influencée significativement par la localisation géographique.

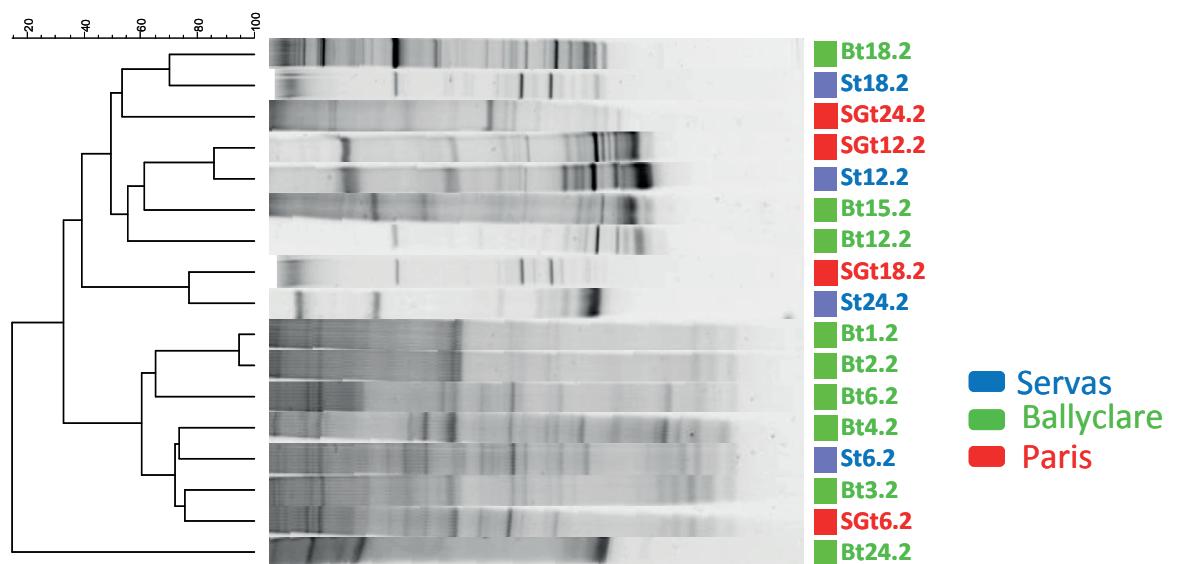
### IV3.3. Résultats supplémentaires

#### IV3.3.1. Analyse d'échantillons supplémentaires par fingerprint

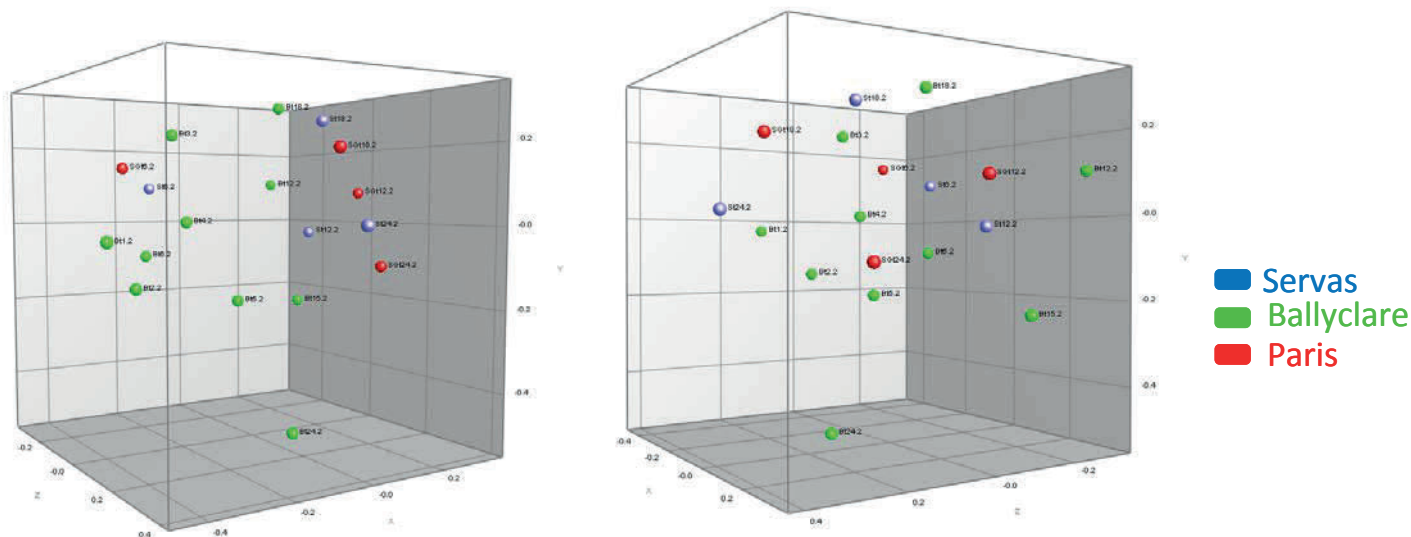
En plus des échantillons analysés dans l'article 3, j'ai réalisé des expériences de DGGE sur d'autres échantillons du même substrat minéral exposé, pour les bactéries et les eucaryotes. Les échantillons analysés correspondent à un échantillonnage plus régulier notamment sur le site de Ballyclare entre 0 et 24 mois d'exposition. Aucun regroupement net en fonction du temps de colonisation ou du site géographique n'est visible pour les bactéries (Figure IV.3.3.1.a). Dans le cas des eucaryotes, on semblerait voir un regroupement des profils DGGE des premiers temps de colonisation (jusqu'à 6 mois) et d'un autre côté des échantillons obtenus après 12 mois d'exposition. Ces observations semblent aller à l'encontre de celles obtenues par l'analyse des OTUs (article 3). Cependant comme dit en IV1.3.3., les observations issues des données de fingerprint sont à prendre et à interpréter avec beaucoup de précaution, dû aux limites expérimentales de cette technique (co-migration de bandes, structures secondaires). Le nombre des bandes de profils DGGE semble indiquer une diversité plus faible pour les eucaryotes que pour les bactéries, ce qui est en accord avec l'ensemble des autres analyses moléculaires. Sur les profils bactériens, on voit aussi l'apparition de bandes plus intenses le long de la colonisation (indiquées par des bandes orange) identifiées comme appartenant à des cyanobactéries. L'identification d'autres bandes a révélé des groupes de bactéries identiques à ceux retrouvés via les approches de clonage et séquençage (Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes). Les bandes découpées et identifiées des profils eucaryotes correspondent de façon quasi exclusive à des champignons de type ascomycète ou basidiomycète. La représentation en MDS (*Multi Dimensionnal Scaling*) des profils DGGE bactéries et eucaryotes combinés (Figure IV3.3.1.c) ne montre pas de regroupement qui semble significatif; un regroupement des échantillons issus des premiers temps de la colonisation pourrait éventuellement se distinguer (image à gauche, ellipse noire), mais une fois de plus les échantillons semblent être dispersés partout dans l'espace si on oriente la représentation autrement (image à droite).



**Figure IV3.3.1.a.** Dendrogramme des profils DGGE des bactéries obtenus pour les échantillons complémentaires analysés issus de la campagne d'exposition.



**Figure IV3.3.1.b.** Dendrogramme des profils DGGE des eucaryotes obtenus pour les échantillons complémentaires analysés issus de la campagne d'exposition.



**Figure IV3.3.1.c.** Représentation en « *multidimensionnal scaling* » des profils DGGE bactériens et eucaryotes combinés des échantillons supplémentaires issus de la campagne d'exposition de Ballyclare, Servas et Paris.

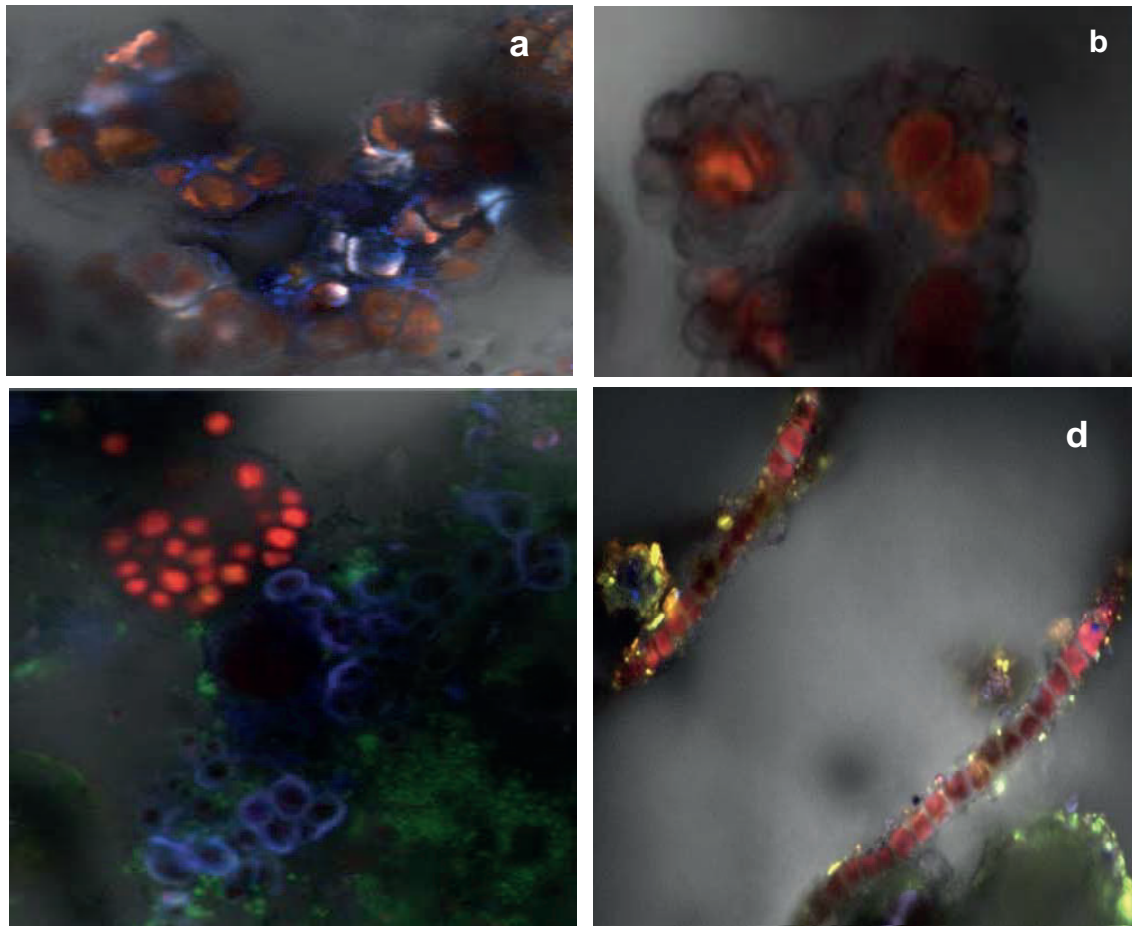
### IV3.3.2. Observations et analyses en microscopie confocale

Sur les échantillons à 24 mois d'exposition pour les 3 sites géographiques (Ballyclare, Paris et Lyon), j'ai également réalisé des observations de microscopie confocale dans le but de visualiser les microorganismes à fluorescence naturelle, produisant différents types de pigments. J'ai ainsi pu observer 4 différents morphotypes de cyanobactéries ainsi que des cellules eucaryotes.

Le site de Servas (Lyon) était le plus divers en terme de morphotypes et on pouvait en compter 4 (FigureIV3.3.2.a b c et d), alors que Ballyclare ne présentait qu'un seul morphotype (FigureIV3.3.2.a) et l'échantillon du site de Paris les morphotypes a et d. Cependant, il faut tenir compte de la possible hétérogénéité locale de la zone de prélèvement du biofilm qui était discontinu. Sur le panneau c, l'échantillon est coloré au Syto 9 (colorant de l'ADN) et on peut ainsi voir la présence en vert, des bactéries non photosynthétiques. On peut observer la grosseur de ces cyanobactéries comparé aux autres bactéries hétérotrophes (en vert). Ainsi même si les cyanobactéries pourraient sembler être plus importantes en biomasse, elles ne le sont probablement pas en quantité.

La microscopie confocale permet aussi d'obtenir des spectres d'émission de fluorescence pour une cellule individuelle donnée afin de mettre en évidence la présence de différents pigments. J'ai ainsi pu

identifier différents types de pigments présents chez ces microorganismes photosynthétiques à savoir : la chlorophylle, des caroténoïdes ainsi que des phycobiliprotéines.

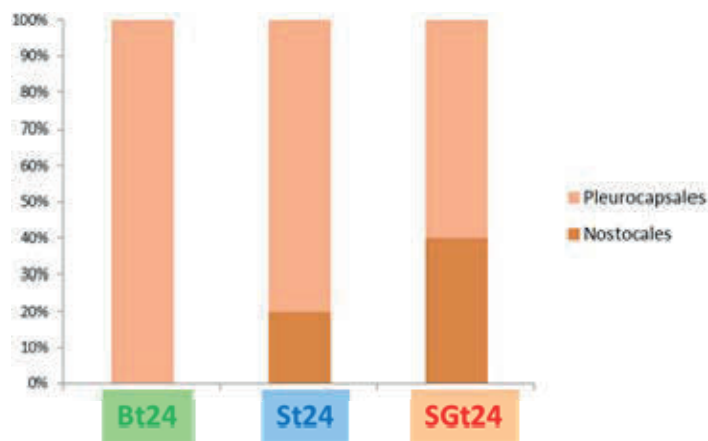


**FigureIV.3.3.2.** Photographies en microscopie confocale sur les échantillons à 24 mois d'exposition des sites d'exposition Ballyclare, Servas et Paris. a, b et c correspondent à des cyanobactéries de type unicellulaires; d correspond à des cyanobactéries de type filamenteuses.



### IV3.3.3. Banques de clones spécifiques pour les cyanobactéries

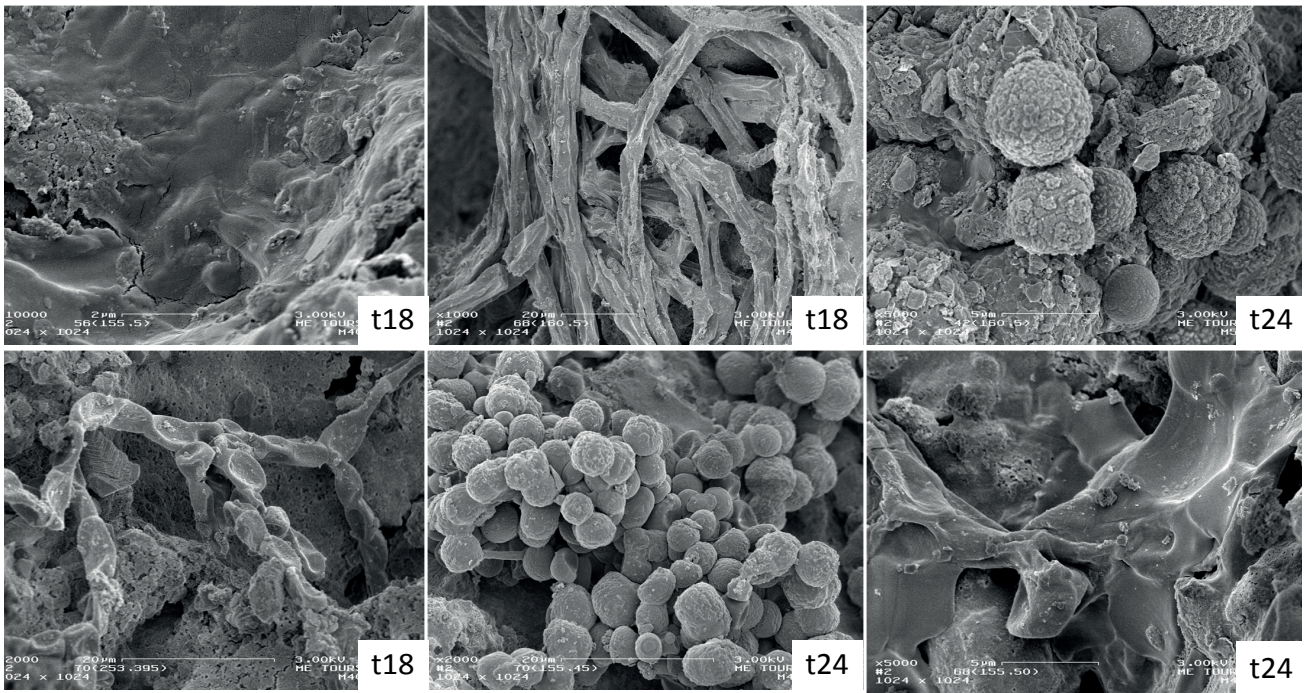
De la même manière que pour les échantillons issus des communautés des biofilms matures, j'ai construit des banques de clones spécifiques pour les cyanobactéries pour certains échantillons, notamment les temps de 24 mois d'exposition (censés être les plus colonisés), pour les 3 sites géographiques, dans l'idée de mettre en évidence la diversité au sein des cyanobactéries. En effet, nous avons le sentiment que les cyanobactéries étaient sous estimées dans les banques de clones des bactéries, probablement par un biais dû à la lyse plus difficile des cyanobactéries à cause de leur gaines d'exopolysaccharides. La majorité des cyanobactéries identifiées sont des Pleurocapsales (7 OTUs) dans les échantillons des 3 sites géographiques, et à Servas et Aubervilliers on détecte également des Nostocales (2 OTUs). Ces résultats confirment bien l'implication des cyanobactéries dans les biofilms analysés.



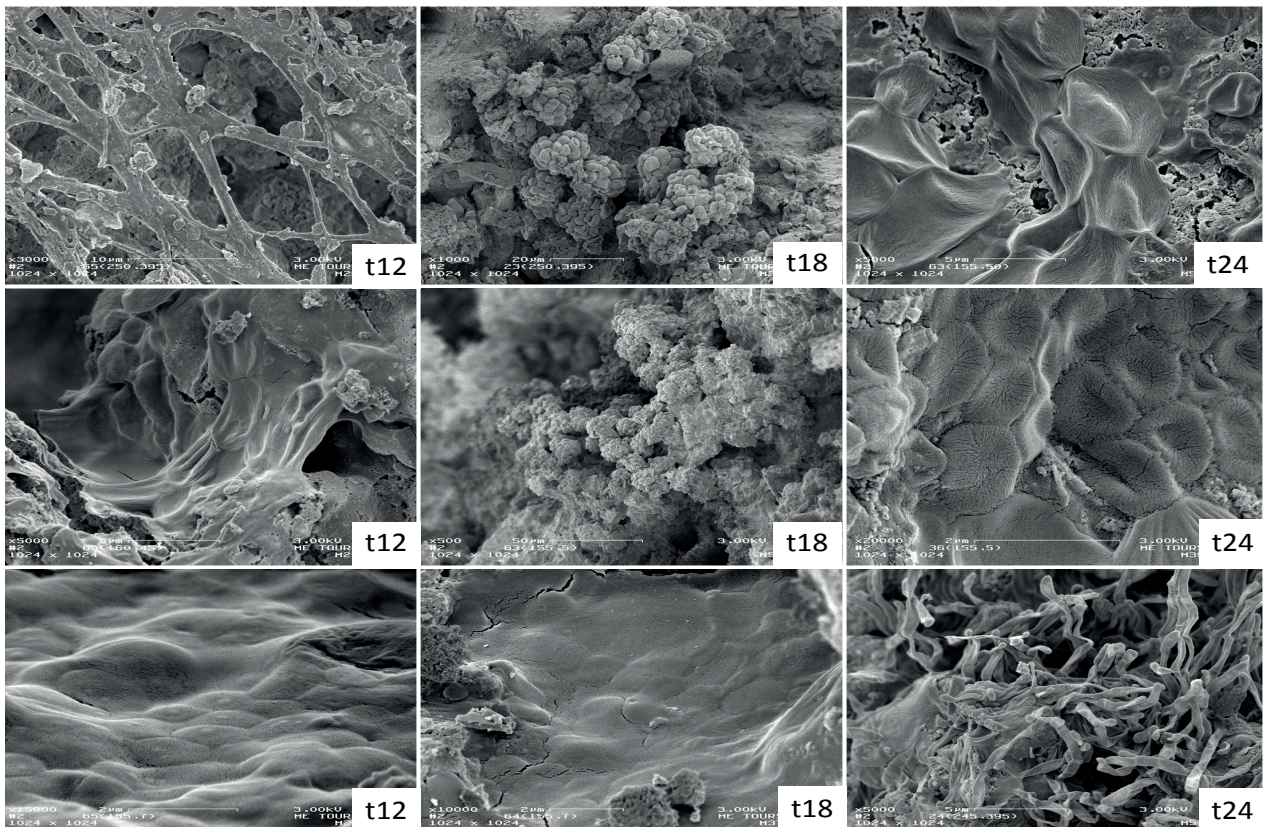
**FigureIV3.3.3.** Abondance relative des cyanobactéries identifiées dans des banques de clones obtenues avec des amorces spécifiques pour les cyanobactéries pour les échantillons à 24 mois d'exposition pour Ballyclare (Bt), Servas (St), Aubervilliers (SGt).

#### **IV3.3.4. Suivi du développement du biofilm par SEM et TEM**

Afin de visualiser le développement du biofilm au cours du temps, un suivi par microscopie à balayage a été effectué de manière régulière pour les différents échantillons des 3 sites géographiques. Quand les biofilms semblaient suffisamment développés, des observations en microscopie électronique à transmission ont été réalisées. Pour les 3 sites géographiques étudiés, on distingue ainsi une diversité morphologique de plus en plus importante (même si elle reste limitée) au cours de la colonisation avec apparition d'une matrice probablement d'exopolysaccharides ; le recouvrement du substrat semble être de plus en plus important ; on voit également une augmentation de l'épaisseur du biofilm sur les photographies de coupe réalisées en MET (FigureIV3.3.3). Pour le site de Servas, on observe que l'installation de la matrice recouvrant la surface est plus précoce que dans les autres sites analysés (colonisation plus rapide, cohérent avec nos analyses moléculaires). De ce fait, la diversité morphologique des microorganismes présents sur ce site est masquée, car ils sont dissimulés sous cette matrice recouvrant rapidement l'intégralité de la surface.

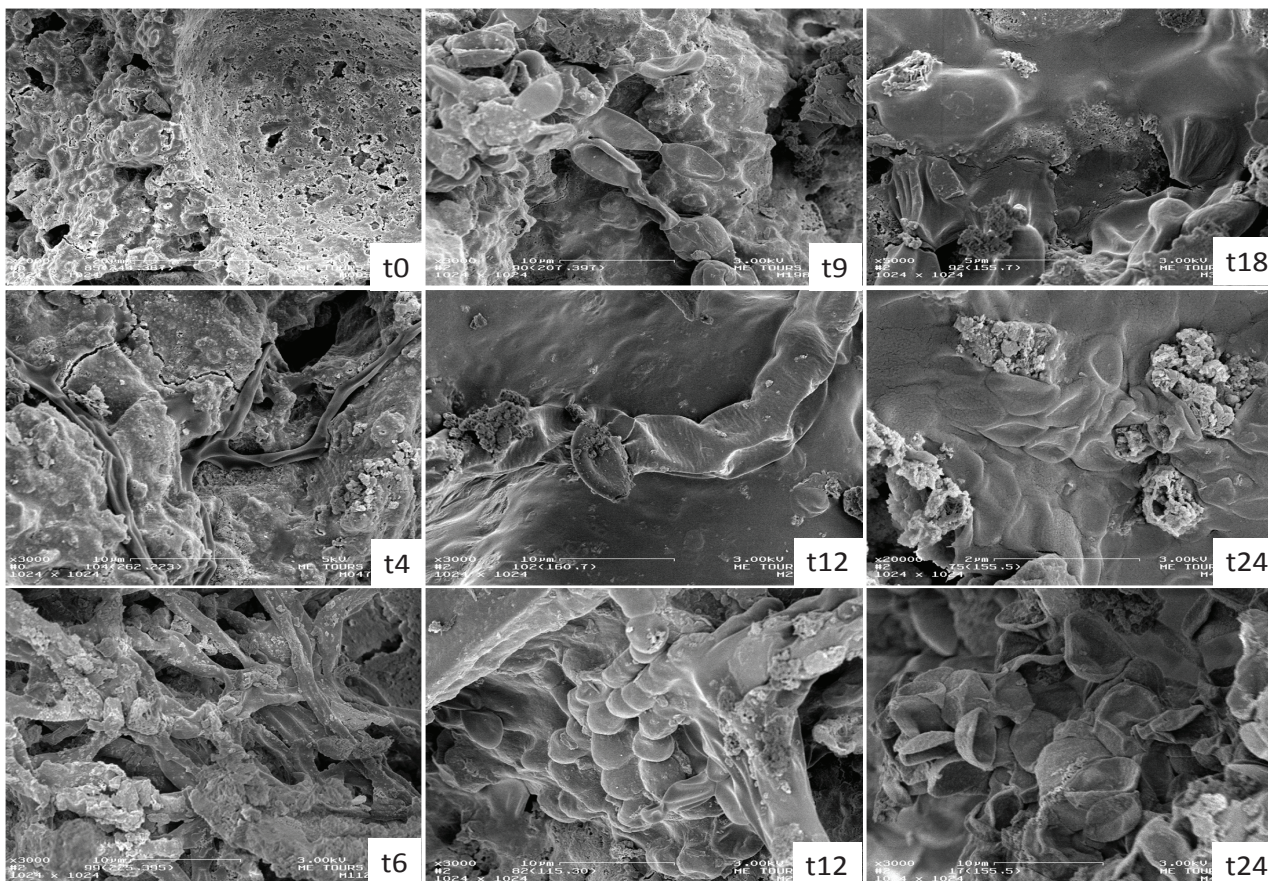


Microscopie Electronique à Balayage sur les échantillons d'Aubervilliers à 18 et 24 mois d'exposition

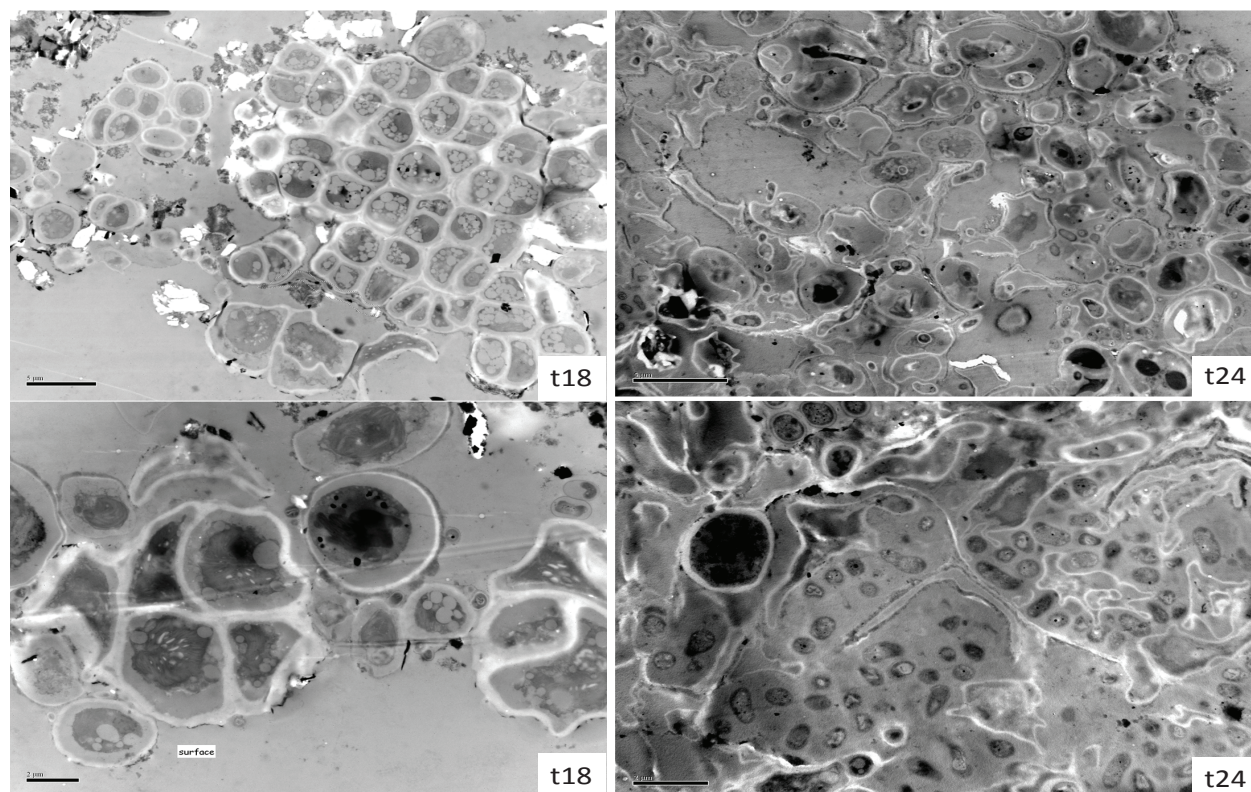


Microscopie Electronique à Balayage sur les échantillons de Servas à 12, 18 et 24 mois d'exposition

**IV3.3.4.** Suivi visuel de l'évolution du biofilm par microscopie



Microscopie Electronique à Balayage sur les échantillons de Ballyclare de 0 à 24 mois d'exposition



Microscopie Electronique à Transmission sur les échantillons de Ballyclare à 18 et 24 mois d'exposition  
**IV3.3.4. Suivi visuel de l'évolution du biofilm par microscopie**

## DISCUSSION GENERALE

Cette thèse avait comme objectif d'étudier la diversité microbienne globale des trois domaines du vivant associée à des biofilms subaériens qui se développent sur des substrats minéraux exposés dans différents sites géographiques. Nos analyses ont permis d'identifier des communautés d'une diversité relativement importante, mais soumise à une forte sélection de par l'exposition constante à des conditions environnementales relativement adverses, notamment le stress hydrique et le fort rayonnement UV, entraînant la dessiccation. De ce fait, malgré leur ubiquité, ces environnements peuvent être considérés comme « extrêmes », même s'ils ne ressemblent pas à première vue aux environnements extrêmes classiques, tels que les sources hydrothermales chaudes, les milieux alcalins ou les lacs hypersalés. Ceci explique que seulement un certain nombre d'espèces microbiennes puissent se développer dans ce biofilm, en particulier des microorganismes présentant des résistances à des stress variés. Il est intéressant de remarquer l'absence d'espèces d'archées dans nos échantillons. Malgré le fait connu que les archées dominent dans beaucoup d'environnements extrêmes (par exemple à haute température, salinité, pH, etc.) et qu'elles sont aussi abondantes dans les systèmes plus traditionnels (sols, lacs, océans), nous n'avons pas réussi à les détecter dans aucun des biofilms examinés. Pour de raisons qui restent à déterminer, les systèmes que nous avons étudiés semblent être défavorables au développement des archées. En plus de cette absence, même si nos biofilms contiennent une diversité microbienne non négligeable, elle reste très réduite si on la compare avec celle d'autres environnements très étudiés, comme les sols ou la plupart des milieux aquatiques, qui hébergent une énorme diversité microbienne (Pedros-Alio 2006; Schloss and Handelsman 2006) comparé à celle que nous avons pu mettre en évidence. En effet la plus part des microorganismes détectés dans nos échantillons sont des microorganismes typiques d'environnements désertiques, adaptés à la dessiccation et aux radiations. C'est le cas des bactéries appartenant au groupe des Deinococcales, mais également d'autres microorganismes (bactéries et eucaryotes) produisant des pigments leur servant de protection/écran contre les radiations UV. Parmi les adaptations les plus importantes, on note en effet, la production de nombreux pigments, et pratiquement tous les groupes majoritaires de microorganismes détectés dans nos échantillons sont connus pour en faire. Ainsi, l'ubiquité et la relative simplicité des communautés microbiennes que nous avons étudiées font que ce type de biofilm est un bon modèle simplifié pour approcher plusieurs problèmes en écologie microbienne dont la biogéographie.

Les groupes de bactéries hétérotrophes communément retrouvées dans nos échantillons sont diverses, regroupant en plus des Deinococcales, des Alphaproteobacteria, des Betaproteobacteria, des Actinobacteria, des Acidobacteria, des Bacteroidetes. Dans les communautés identifiées dans des biofilms matures, exposés de longue date, ces groupes de bactéries sont retrouvés de manière assez constante avec cependant des variations dans les proportions des différents phylums. Les Deinococcales fréquemment identifiées sont affiliées au genre *Deinococcus*, bactérie pouvant être retrouvée dans des zones fortement irradiées (Peltola, Neu et al. 2008), souvent dans des environnements considérés comme extrêmes (Zhang, Hou et al. 2010). L'autre lignée de bactérie identifiée dans nos échantillons bien connue pour sa radio-résistance est affiliée au genre *Rubrobacter*, chez les Actinobacteria. Les membres de ce genre ayant également la capacité de se développer dans des environnements très extrêmes, ont récemment été impliqués dans des structures de type endolithique (Pellerin, Lacelle et al. 2009). Nous avons identifié des OTUs qui correspondent à ce genre de manière plus importante et constante dans les échantillons de biofilm de béton provenant de la région de Chernobyl à proximité de l'ancienne centrale nucléaire. *Deinococcus*, qu'on attendait plus facilement à retrouver sur cet endroit, n'a été pourtant détecté qu'en faible proportion, possiblement dû à d'autres facteurs liés, par exemple, à la nature du substrat. D'ailleurs sur ce type de substrats fortement irradiés, on a pu observer une diversité microbienne comparable à celle des sites non contaminés, notamment en Irlande. Ceci pourrait être expliqué par une pré-adaptation des communautés se développant sur ce genre de surfaces exposées à la radiation solaire. En effet, quel que soit l'endroit géographique où le biofilm se forme, ces communautés microbiennes sont constamment soumises à des stress environnementaux, en particulier le rayonnement UV et le stress hydrique, et ont donc dû s'adapter à ces conditions pour survivre. La radioactivité sur le site de Chernobyl n'est qu'un facteur de sélection en plus, mais pour lequel les communautés microbiennes étaient déjà pré-adaptées. Cependant, il a été possible de détecter un effet de la radiation ionisante sur les microorganismes des biofilms prélevés dans la région de Chernobyl (article 2). En effet, on a pu détecter une accumulation de mutations sur la région non codante ITS (considérée neutre) versus le gène SSU rRNA dans l'OTU majoritaire de *Rubrobacter*, impliquant une pression de sélection importante sur ces organismes. Ainsi, malgré le fait que les communautés microbiennes de Chernobyl résistent au niveau de radioactivité présent sur ce site, elles semblent posséder un taux de mutation supérieur à celui observé sur d'autres sites non contaminés. Sur le long terme, il est probable que cette augmentation du taux de mutation puisse avoir des conséquences sur la vitesse d'évolution et la spéciation de ces microorganismes.

D'autres bactéries comme, les Acidobacteria et Alphaproteobacteria identifiées peuvent aussi être détectées dans des milieux contaminés (Sanchez-Andrea, Rodriguez et al. 2011), mais également jouer un rôle dans la détoxification des sols comme les membres du genre *Sphingomonas* (Sorensen, Ronen et al.

2001). Les Alphaproteobacteria sont présentes de manière récurrente et peuvent participer à l'élaboration du biofilm. Beaucoup d'entre elles sont pigmentées, certaines peuvent être photosynthétiques, même si nous n'avons pas identifié des OTUs dont on puisse clairement établir un phénotype photosynthétique. Certaines, notamment du genre *Methylobacterium* qui est le genre le plus abondant dans tous les biofilms étudiés avec le genre *Sphingomonas*, possèdent un système de *Quorum Sensing* (Poonguzhali, Madhaiyan et al. 2007; Simoes, Simoes et al. 2007). Les Gammaproteobacteria, groupe très divers de bactéries retrouvées aussi bien dans les sols que dans les océans, sont dominantes dans les étapes initiales de formation du biofilm, mais très peu (ou pas) dans les communautés matures. Celles qui dominent appartiennent au genre *Pseudomonas*, un genre ubiquiste. Ceci, plus le fait qu'il faut utiliser une étape de ré-amplification pour les détecter, nous laissent à penser qu'il s'agit de cellules probablement inactives en train de disperser mais qui ne feront pas partie du biofilm dès lors qu'il commencera à se développer. A ces bactéries hétérotrophes, composantes essentielles à ce genre de biofilm épilithique, se rajoutent également des phototrophes comme les cyanobactéries. Malgré le fait qu'elles ne soient détectées qu'en faible quantité dans nos banques de clones, les cyanobactéries sont bien présentes. Ceci a été d'ailleurs confirmé par la réalisation en parallèle des banques de clones en utilisant des amorces spécifiques pour les cyanobactéries et le séquençage d'ADN des bandes DGGE. Elles sont aussi bien mises en évidence par les observations microscopiques optique, confocale et électronique. Leur faible détection par des méthodes moléculaires peut être biaisée par le fait qu'elles sont souvent entourées par des gaines d'exopolysaccharides. Leur lyse cellulaire étant moins efficace, il y aurait moins d'ADN cyanobactérien dans l'ADN communautaire. Mais il pourrait y avoir un léger biais d'amorces défavorisant leur amplification avec les amorces générales des bactéries. Toutefois, elles sont belles et bien amplifiées par les amorces bactériennes. Finalement, même si elles dominent en biomasse, en étant des cellules de tailles nettement plus grosses que les autres bactéries, leur nombre cellulaire peut être bien inférieur à celui des bactéries hétérotrophes (voir **FigureIV.3.3.2.**). Les cyanobactéries que nous avons identifiées appartiennent à différents groupes, la majorité aux ordres Pleurocapsales et Nostocales, et de manière plus épisodique, des Oscillatoriales. Certaines des Pleurocapsales et Nostocales, comme *Calothrix desertica*, sont des bactéries retrouvées aussi dans des environnements extrêmes exposés à la dessiccation (Dillon, Miller et al. 2003). Une OTU assimilable à *Calothrix desertica* est l'un des phylotypes de cyanobactéries le plus abondants et le plus précoces dans nos biofilms. Les Nostocales sont des cyanobactéries filamenteuses souvent endolithiques, ayant la capacité à creuser la roche ou le substrat qu'elles colonisent. Ainsi, on sait que les cyanobactéries ont également cette capacité à se développer dans des environnements extrêmes ou contaminés (Al-Thukair, Abed et al. 2007; Zeng, Zhao et al. 2008).

A ces bactéries photosynthétiques qui font partie des biofilms de manière relativement abondante, si non en nombre, au moins en biomasse, se rajoutent les eucaryotes unicellulaires photosynthétiques, comme les algues vertes, qui ensemble vont soutenir l'activité du biofilm. Les algues identifiées sont pour la majorité affiliées au genre *Chlorella* ou *Trebouxia*, cette dernière étant de manière récurrente impliquée dans la formation de lichens (Casano, del Campo et al. 2011) mais pas nécessairement (Bubrick, Galun et al. 1984). La composante photosynthétique, et notamment les algues vertes, est très importante dans les biofilms matures, cependant ces microorganismes phototrophes ne sont pas retrouvés, du moins de manière importante dans les phases initiales de développement du biofilm. Ceci peut être lié à plusieurs facteurs, dont une dispersion moins efficace, une croissance plus lente ou des besoins en nutriments qui pourraient être mobilisés par des hétérotrophes, par exemple, ou à un milieu trop sélectif au début. Ce dernier facteur pourrait surtout s'appliquer aux algues vertes. Les algues pourraient avoir besoin d'un biofilm hétérotrophe en cours d'établissement qui offre de la rétention d'eau et peut être des oligoéléments et une protection écran contre les radiations solaires pour s'y développer.

Concernant les autres eucaryotes unicellulaires associés à ce type de substrat, on retrouve beaucoup de champignons de type ascomycète comme *Verrucaria*, associé dans les formations de lichens, et également des ascomycètes très présents dans la nature (Sterflinger and Prillinger 2001), producteurs de mycotoxines comme les *Phoma*, souvent parasites opportunistes des plantes et animaux, aussi classiquement impliqués dans la formation des moisissures. Les basidiomycètes que j'ai identifié de façon majoritaire sont affiliés au genre *Sporobolomyces* et *Rhodoturula*, qui sont tous les deux des champignons très répandus retrouvés dans l'eau ou dans le sol, mais aussi sur la surface des roches producteurs des pigments.

Puis, dans les communautés de biofilm qui semblent bien installés et matures, on peut également identifier des protistes comme des ciliées, des amibes ou encore des métazoaires témoignant probablement de la stabilité et de la solidité du biofilm qui offre déjà une surface établie au broutage et à la protection.

En résumé, les communautés microbiennes présentes dans ce type de substrat sont soumises à une forte sélection environnementale, et sont bien souvent composées d'organismes hétérotrophes et photosynthétiques qui vont pouvoir facilement résister à de nombreux stress, mais également disperser, via des formes de résistance ou spores.

Ce travail m'a également permis de montrer l'influence du substrat sur la diversité microbienne associée à ce type de surface colonisée. En effet, il a déjà été montré que des caractéristiques physicochimiques différentes de surface peuvent influencer sur la composition microbienne d'une communauté (Scheerer, Ortega-Morales et al. 2009). Nous avons pu identifier des communautés microbiennes spécifiques du substrat où elles se développent, pouvant être liées entre autre au degré de



porosité de la surface ou à des différences de composition chimique des substrats (voir chapitre IV.1). Cet effet n'a été observé que pour les bactéries contrairement aux eucaryotes. Dans le substrat minéral composite contrôle, un grand nombre de bactéries appartenant au genre *Deinococcus* ont été identifiées alors que dans les autres substrats (calcaire, granite, béton) se développaient majoritairement des bactéries appartenant au groupe des Bacteroidetes, notamment du genre *Hymenobacter*, mais pas des Deinococcales. Des Actinobacteria étaient également retrouvées dans les divers échantillons, appartenant au genre *Rubrobacter*, une autre bactérie très connue pour sa radiorésistance (résultats en accord avec ceux de l'article 2). Par conséquent, pour le reste des analyses de biogéographie, nous avons donc tenu compte de cet effet substrat spécifique et n'avons considéré que le substrat contrôle minéral qui était donc exactement le même pour les différents sites et temps d'exposition.

Les débats autour de la biogéographie des microorganismes sont très en vogue en ce moment, avec la remise en question de l'idée de Baas-Becking ("*everything is everywhere but the environment selects*"). Cependant, beaucoup de travaux de biogéographie microbienne n'ont pas tenu compte de ce problème potentiel d'effet substrat et ont comparé des communautés microbiennes établies dans des biotopes qui pouvaient être très divers du point de vue physicochimique (Cho and Tiedje 2000)(e.g., des sols avec minéralogies différentes ou des environnements aquatiques avec des hydrochimies distinctes). Dans ce travail, les questions autour de la biogéographie microbienne ont pu être abordées grâce à la simplicité et la reproductibilité de notre système d'étude. Les analyses statistiques mises en œuvre dans ce travail sont venues confirmer un sentiment déjà donné par les données moléculaires au niveau de la distribution des séquences en phylums et en OTUs dans les différents échantillons. La distribution des différentes OTUs bactériennes (en utilisant des analyses multivariées) mettent en avant que les bactéries présentes dans ce type de biofilm sont assez ubiquitaires sur ce type de substrat et peuvent disperser facilement. En effet, on observait une distribution large et homogène des espèces bactériennes non localisées autour des sites géographiques ; la localisation géographique n'était donc pas un facteur descripteur dans la répartition des bactéries. A l'inverse, la diversité des eucaryotes présents dans les biofilms semblent plus soumis et décrits par la localisation géographique. D'une part, les OTUs sont agrégées autour des sites géographiques dans les NMDS et les analyses de corrélation entre la distance compositionnelle des communautés et distance géographique se sont également révélées significatives pour les microorganismes eucaryotes mais pas pour les procaryotes.

Les modes de vie différents de ces groupes de microorganismes, des capacités à se disperser non similaires pourraient être une explication à ces différences notoires. En effet, les bactéries ont une capacité à se disperser communément admise ; les bactéries identifiées, capables de s'adapter à divers stress,

peuvent ainsi être véhiculées par l'air (Li, Gao et al. 2011; Rauch, Graef et al. 2006) et se déposer sur ce type de surface à n'importe quel endroit et y former des biofilms. Les eucaryotes unicellulaires quant à eux, peuvent plus ou moins être séparés en deux groupes : ceux capables de former des spores très résistantes, comme la plus part des champignons, pouvant aussi par ce fait être véhiculés par l'air et connaître le même mode de dispersion que la plupart des bactéries (Li, Gao et al. 2011). En effet, les ascomycètes et basidiomycètes sont retrouvés de façon assez récurrente dans les différents biofilms étudiés et aux différentes étapes de formation du biofilm. De l'autre côté, on trouve des eucaryotes unicellulaires dont les spores (algues vertes) ou d'autres formes de résistance comme des kystes (e.g. ciliés, amibes) sont peut-être moins résistants. Il faudrait alors que biofilm soit suffisamment établi pour s'y installer (pour les prédateurs-brouteurs), ou que les conditions environnementales deviennent plus favorables (pour les algues). Une capacité à disperser réduite pourrait expliquer que ces organismes soient plus spécifiques d'une biofilm à maturité et dépendant d'une localité géographique précise.

Enfin, lors de ma thèse j'ai également pu étudier la formation et les étapes de colonisation de ce type biofilm, en prenant en considération les communautés procaryotes et eucaryotes, ce qui n'a jamais été entrepris à ce niveau. La simplicité de notre système d'étude nous a offert la possibilité de réaliser ce genre d'analyse. Nous avons ainsi pu observer une variation et une évolution dans les communautés microbiennes procaryotes et eucaryotes, entre le début et la maturation du biofilm. Les bactéries déjà plus diverses dans les premiers temps de colonisation, sembleraient se diversifier plus explicitement que les eucaryotes au cours du temps. Toutefois, la diversité des OTUs eucaryotes est toujours inférieur à celles de bactéries, y compris dans les communautés matures. Dans les toutes premières étapes de formation du biofilm, les bactéries sont majoritairement représentées par les Gammaproteobacteria. Une colonisation précoce par des Gammaproteobacteria a été observée dans le milieu marin, mais une connexion avec notre modèle d'étude ne peut pas être faite en raison de la nature très différente des écosystèmes et du fait que les Gammaproteobacteria ne font pas partie des biofilms épilithiques détectés plus tardivement, alors qu'elles le sont dans le milieu marin (Webster and Negri 2006; Lee, Nam et al. 2008). Puis, on peut détecter l'apparition de nouveaux groupes comme les Cyanobacteria, les Betaproteobacteria, les Actinobacteria, les Alphaproteobacteria et surtout une diversité croissante au sein même de ces groupes, au cours de la colonisation. Ces bactéries sont également des microorganismes produisant des pigments de protection et capables de s'adapter à des conditions environnementales extrêmes, comme décrit plus haut. Nous avons également mis en évidence et ce tout le long de la colonisation, de nombreux microorganismes qui peuvent être impliqués dans la dégradation de composés chimiques complexes, trouvés fréquemment dans l'environnement (eau, sols), à la fois naturels (exsudats des cyanobactéries ou des bactéries des sols) ou

artificiels, comme des herbicides (Sorensen, Ronen et al. 2001). La dispersion de pesticides par l'air, véhiculés par l'eau de pluie ou des particules de sol sur ces substrats pourrait être une explication pour la présence importante de ces organismes. D'ailleurs, la décomposition de ces substrats pourrait être une source de carbone et d'énergie pour certaines Betaproteobacteria (*Delftia*, *Variovorax*) et Alphaproteobacteria (*Sphingomonas*) (Dejonghe, Berteloot et al. 2003). Une abondance particulière de ces organismes pourrait donc peut être prise comme une indication d'une pollution environnementale par des pesticides. Dans les abondances naturelles des biofilms, elles sembleraient plutôt dégrader les exsudats des cyanobactéries (Edwards and Lawton 2009).

Concernant les eucaryotes, la communauté reste essentiellement dominée par les champignons microscopiques jusqu'aux deux ans d'exposition. On note cependant une variation dans les proportions de champignons ascomycètes et basidiomycètes entre le début de la colonisation et la fin de la campagne d'exposition. Le groupe d'eucaryotes impliquant le plus de changement dans la communauté est l'apparition d'algues vertes dans les échantillons les plus colonisés, c'est-à-dire 24 mois d'exposition mais de manière presque exclusive sur le site de Servas, qui a des conditions d'humidité plus élevée et donc, probablement plus favorables au développement des algues vertes. La composition des communautés microbiennes à 24 mois d'exposition, laisse penser que le biofilm n'est pas encore arrivé à un stade de maturation stable si on compare cette diversité avec celle retrouvée dans les communautés des biofilms matures (chapitre IV.1). En effet, dans ces dernières, les algues vertes (Chlorophyta) essentiellement mais parfois aussi des Streptophyta, sont une composante majeure de la diversité eucaryote de ce type de biofilm. On détectait aussi dans ces biofilms matures la présence de prédateurs ou brouteurs comme des amibes ou des ciliés, qui pourraient être un signe de maturité du biofilm ; le biofilm étant stable et établi, ces prédateurs pourraient alors ainsi venir se nourrir sur le biofilm. Lors de la campagne d'exposition, et même à 24 mois d'exposition très peu de séquences correspondant à des prédateurs ou brouteurs potentiels ont été détectés, en comparaison aux échantillons des biofilms matures. Il semblerait que les communautés de bactéries aient un développement plus rapide, même si un stade mature ne semble pas complètement atteint. Un état de maturité supérieur pour la composante procaryote pourrait être facilité par le mode de dispersion ubiquiste et leur résistance, ainsi que par des processus adaptatifs plus développés et une croissance plus rapide. L'exposition contrôlée dans 3 sites géographiques, suggèrent que des conditions environnementales favorables (humidité, température) ainsi que la localisation géographique influent l'établissement des communautés microbiennes, notamment dans la vitesse de colonisation du substrat. Des observations similaires, notamment par rapport à l'influence de l'humidité et de la lumière ont été faites sur le développement de biofilms sur des monuments historiques (Sanchez-Moral, Luque et al. 2005). En effet, les substrats exposés sur le site de Servas sont colonisés plus rapidement et les

communautés sont plus diverses que les substrats exposés dans les deux autres localisations, Paris et Ballyclare, ce qui est surtout notable pour la présence d'algues vertes. Les observations moléculaires sont corrélées avec les suivis réguliers en microscopie où on voyait également un envahissement de la surface du substrat plus rapide à Servas.

Finalement, l'une des conclusions les plus importantes de ces expériences de colonisation est le comportement différent des procaryotes et des microorganismes eucaryotes pendant la formation des biofilms. Des analyses statistiques multivariées ont montré que le temps de colonisation influe de manière importante sur la composition de la communauté des bactéries, alors que le site géographique explique mieux la composition de celle des eucaryotes. Ceci va dans le sens que pour les bactéries le principe de "tout est partout mais l'environnement sélectionne" s'applique bien alors que pour les eucaryotes il y a des barrières à la dispersion peut être liées à une résistance différente ou à d'autres traits de vie.

## CONCLUSION

Ce travail avait comme objectifs principaux l'étude de la biogéographie microbienne, à la fois des procaryotes et des eucaryotes, et des processus de colonisation en utilisant comme modèle des biofilms épilithiques ou subaériens se développant sur des substrats minéraux. Pour atteindre ces objectifs nous avons caractérisé la diversité microbienne par des méthodes moléculaires d'analyse de banques de gènes SSU rDNA et de fingerprinting par DGGE.

L'analyse de la diversité microbienne des biofilms matures (exposition moyenne 4,7 ans) récoltés sur un substrat minéral contrôle exposé en plusieurs régions géographiques (Ballyclare, Irlande du Nord ; Paris, Charente Maritime, Lyon en France) ainsi que du béton, du calcaire et du granite a montré :

- Une diversité microbienne des bactéries et des eucaryotes relativement variée, avec des organismes photosynthétiques et surtout hétérotrophes, mais restreinte comparée à d'autres environnements. Les archées étaient absentes de tous les échantillons analysés.
- Les bactéries sont dominées dans le substrat contrôle par des Actinobacteria et des Deinococcales, parfois des Acidobacteria, et celles-ci et des Bacteroidetes dans les autres substrats. Les Alphaproteobacteria sont toujours présentes en proportion modérée. Les Cyanobacteria sont présentes en proportion relativement modeste.
- Les eucaryotes sont toujours dominés par des champignons ascomycètes (Ascomycota) et des algues vertes (Chlorophyta), parfois des Streptophyta. Certaines des algues et des champignons détectés sont connus pour former des lichens. D'autres lignées de protistes comme les ciliés (Ciliata, Alveolata) ou des amibes (Amoebozoa) sont détectés en quantités faibles.
- L'ensemble de la diversité montre une communauté caractéristique des environnements extrêmes, par conséquent soumise à une forte sélection environnementale, avec des microorganismes typiques des déserts froids et chauds et des communautés endolithiques, connus pour leur résistance à la dessiccation et aux radiations ultraviolettes dont ils se protègent, entre autres, en produisant des pigments.
- Des analyses statistiques multivariées montrent une influence des variables environnementales climatiques sur la structure des communautés, mais alors que la composition des communautés bactériennes est significativement dépendante du substrat, celle de microorganismes eucaryotes l'est du site géographique.

L'analyse de la diversité microbienne des biofilms matures récoltés sur du béton en Irlande du Nord et dans la région de Chernobyl le long d'un gradient d'exposition croissante à des radiations ionisantes a montré :

- Une diversité globale dans les biofilms irradiés à Chernobyl des bactéries et eucaryotes, les archées n'ayant pas été détectées, très similaire à celle présente dans l'échantillon non-irradié du même type de substrat en Irlande du Nord. Les bactéries sont dominées par des Actinobacteria, des Bacteroidetes, des Acidobacteria et des Alphaproteobacteria, avec des proportions mineures d'autres phylums. Les eucaryotes sont toujours dominés par ascomycètes et algues vertes.
- Les microorganismes des communautés des biofilms épilithiques semblent donc pré-adaptés à la résistance aux radiations ionisantes par leur adaptation naturelle à la dessiccation et aux radiations ultraviolette.
- Malgré ces adaptations, les radiations ionisantes induisent un taux de mutation supérieur à Chernobyl comme le montre l'analyse des séquences des SSU rDNA et des ITS adjacents dans une même OTU affiliée à *Rubrobacter* (Actinobacteria).

L'analyse de la diversité des bactéries et des microorganismes eucaryotes lors du processus de colonisation et de formation des biofilms sur un substrat minéral contrôlé exposé en trois régions géographiques (Ballyclare, Irlande du Nord; Aubervilliers-Paris et Servas-Lyon en France) pendant deux ans a montré :

- Une succession temporelle qualitative des groupes des bactéries avec les Gammaproteobacteria et, en moindre proportion des Bacteroidetes, dominant dans les premières étapes (0-6 mois), et des Betaproteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria et Alphaproteobacteria augmentant leur proportion (à partir de 12 mois). Les Cyanobacteria apparaissent relativement tôt mais en faible proportion.
- Après une absence initiale des eucaryotes, les groupes dominants dès 6 mois sont les champignons ascomycètes et basidiomycètes, les algues vertes apparaissant plus tardivement.
- Les biofilms du site de Servas se forment plus rapidement et semblent posséder des communautés typiques de phases plus avancées de colonisation. Ceci est en corrélation avec des précipitations et des taux de condensation de l'eau en surface plus importants que dans les autres sites.
- Les bactéries et les eucaryotes hétérotrophes colonisent le substrat minéral avant les organismes photosynthétiques, et plus particulièrement les algues vertes. Ils pourraient donc faciliter la

colonisation par les organismes photosynthétiques plus tardivement en maintenant l'humidité locale et offrant une protection et/ou des oligonutriments.

- Des analyses statistiques multivariées montrent que le temps de colonisation explique significativement la composition des communautés bactériennes alors que le site géographique d'exposition a une influence plus importante sur les microorganismes eucaryotes.

## PERSPECTIVES

La connaissance acquise sur la composition de ces biofilms exposés, et sur leur formation et les facteurs influençant cette colonisation et leur diversité, nous ouvre la voie à bien d'autres questions. Il serait notamment intéressant de :

- Poursuivre les expériences de colonisation dans le temps pour suivre le processus complet jusqu'à l'état de maturation des biofilms et ce pour les 3 sites géographiques. Réaliser des clonages supplémentaires à 6 mois pour les procaryotes et eucaryotes des échantillons de Servas et Aubervilliers, afin de confirmer (ou non) les observations faites dans les étapes très initiales de formation du biofilm.
- Pour s'assurer de la fiabilité de nos résultats, ces analyses (campagne d'exposition) nécessiteraient des répliquâts afin de vérifier la reproductibilité de notre étude.
- Réaliser des analyses statistiques similaires à celles réalisées avec les OTUs, avec les données de DGGE (avec les communautés des biofilms matures et celles de la campagne d'exposition, qui inclut un point additionnel à 18 mois).
- Les sites géographiques choisis pour ces études restent en zone tempérée et assez proches les uns des autres. Il serait intéressant d'effectuer ce même type de recherche dans d'autres sites plus éloignés et soumis à des pressions environnementales différentes.
- La colonisation substrat spécifique, nous oriente également à effectuer ces expériences sur d'autre type de substrat, d'une composition différente.
- Idée de développement de biofilms intelligents pour la bioremédiation et la dégradation de composés polluants (idée déjà évoquée par Moons (Moons, Michiels et al. 2009)).



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agogue, H., D. Lamy, et al. "Water mass-specificity of bacterial communities in the North Atlantic revealed by massively parallel sequencing." *Mol Ecol* **20**(2): 258-74.
- Al-Thukair, A. A., R. M. Abed, et al. (2007). "Microbial community of cyanobacteria mats in the intertidal zone of oil-polluted coast of Saudi Arabia." *Mar Pollut Bull* **54**(2): 173-9.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-402.
- Andersson, S. G., A. Zomorodipour, et al. (1998). "The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria." *Nature* **396**(6707): 133-40.
- Angel, R., M. I. Soares, et al. "Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient." *Isme J* **4**(4): 553-63.
- Augspurger, C., C. Karwautz, et al. "Drivers of bacterial colonization patterns in stream biofilms." *FEMS Microbiol Ecol* **72**(1): 47-57.
- Bahl, J., M. C. Lau, et al. (2011). "Ancient origins determine global biogeography of hot and cold desert cyanobacteria." *Nat Commun* **2**: 163.
- Baillie, G. S. and L. J. Douglas (2000). "Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents." *J Antimicrob Chemother* **46**(3): 397-403.
- Baker, B. J., G. W. Tyson, et al. (2009). "Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities." *Appl Environ Microbiol* **75**(7): 2192-9.
- Balestrino, D., J. M. Ghigo, et al. (2008). "The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides." *Environ Microbiol* **10**(3): 685-701.
- Barns, S. M., C. F. Delwiche, et al. (1996). "Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(17): 9188-93.
- Barns, S. M., R. E. Fundyga, et al. (1994). "Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(5): 1609-13.
- Bass, D., T. A. Richards, et al. (2007). "DNA evidence for global dispersal and probable endemicity of protozoa." *BMC Evol Biol* **7**: 162.
- Battista, J. R., A. M. Earl, et al. (1999). "Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation?" *Trends Microbiol* **7**(9): 362-5.
- Bayles, K. W. (2007). "The biological role of death and lysis in biofilm development." *Nat Rev Microbiol* **5**(9): 721-6.
- Beloin, C., A. Roux, et al. (2008). "*Escherichia coli* biofilms." *Curr Top Microbiol Immunol* **322**: 249-89.
- Blankenship, J. R. and A. P. Mitchell (2006). "How to build a biofilm: a fungal perspective." *Curr Opin Microbiol* **9**(6): 588-94.
- Bowman, J. P. and R. D. McCuaig (2003). "Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment." *Appl Environ Microbiol* **69**(5): 2463-83.
- Bridier, A., D. Le Coq, et al. "The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging." *PLoS One* **6**(1): e16177.
- Brown, P. B. and G. V. Wolfe (2006). "Protist genetic diversity in the acidic hydrothermal environments of Lassen Volcanic National Park, USA." *J Eukaryot Microbiol* **53**(6): 420-31.
- Casano, L. M., E. M. del Campo, et al. (2011). "Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus competition?" *Environ Microbiol* **13**(3): 806-18.

- Casteleyn, G., F. Leliaert, et al. "Limits to gene flow in a cosmopolitan marine planktonic diatom." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(29): 12952-7.
- Cavalier-Smith, T. (2004). "Only six kingdoms of life." Proc Biol Sci **271**(1545): 1251-62.
- Chandra, J., D. M. Kuhn, et al. (2001). "Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance." J Bacteriol **183**(18): 5385-94.
- Cho, J. C. and J. M. Tiedje (2000). "Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil." Appl Environ Microbiol **66**(12): 5448-56.
- Colwell, R. R. and A. Huq (1998). "Global microbial ecology: biogeography and diversity of *Vibrios* as a model." J Appl Microbiol **85** Suppl 1: 134S-137S.
- Cooper, J. E. and E. J. Feil (2004). "Multilocus sequence typing--what is resolved?" Trends Microbiol **12**(8): 373-7.
- Crispim, C. A. and C. C. Gaylarde (2005). "Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: a review." Microb Ecol **49**(1): 1-9.
- Crispim, C. A., P. M. Gaylarde, et al. (2003). "Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic buildings." Curr Microbiol **46**(2): 79-82.
- Cuzman, O. A., S. Ventura, et al. "Biodiversity of phototrophic biofilms dwelling on monumental fountains." Microb Ecol **60**(1): 81-95.
- De Kievit, T. R., M. D. Parkins, et al. (2001). "Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Antimicrob Agents Chemother **45**(6): 1761-70.
- de Los Rios, A. and C. Ascaso (2005). "Contributions of in situ microscopy to the current understanding of stone biodeterioration." Int Microbiol **8**(3): 181-8.
- de Los Rios, A., B. Camara, et al. (2009). "Deteriorating effects of lichen and microbial colonization of carbonate building rocks in the Romanesque churches of Segovia, Spain." Sci Total Environ **407**(3): 1123-34.
- de Vargas, C., R. Norris, et al. (1999). "Molecular evidence of cryptic speciation in planktonic foraminifers and their relation to oceanic provinces." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2864-8.
- de Wit, R. and T. Bouvier (2006). "Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say?" Environ Microbiol **8**(4): 755-8.
- Dejonghe, W., E. Berteloot, et al. (2003). "Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading variovorax strain." Appl Environ Microbiol **69**(3): 1532-41.
- DeLong, E. F. and N. R. Pace (2001). "Environmental diversity of bacteria and archaea." Syst Biol **50**(4): 470-8.
- Demirjian, D. C., F. Moris-Varas, et al. (2001). "Enzymes from extremophiles." Curr Opin Chem Biol **5**(2): 144-51.
- Dillon, J. G., S. R. Miller, et al. (2003). "UV-acclimation responses in natural populations of cyanobacteria (*Calothrix* sp.)." Environ Microbiol **5**(6): 473-83.
- Doolittle, W. F. and O. Zhaxybayeva (2009). "On the origin of prokaryotic species." Genome Res **19**(5): 744-56.
- Dove, S. L., J. K. Joung, et al. (1997). "Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts." Nature **386**(6625): 627-30.
- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity." BMC Bioinformatics **5**: 113.
- Edwards, C. and L. A. Lawton (2009). "Bioremediation of cyanotoxins." Adv Appl Microbiol **67**: 109-29.
- Ekelund, F., R. Ronn, et al. (2001). "Quantitative estimation of flagellate community structure and diversity in soil samples." Protist **152**(4): 301-14.
- el Fantroussi, S., L. Verschuere, et al. (1999). "Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles." Appl Environ Microbiol **65**(3): 982-8.

- Ellegren, H., G. Lindgren, et al. (1997). "Fitness loss and germline mutations in barn swallows breeding in Chernobyl." Nature **389**(6651): 593-6.
- Feldgarden, M., N. Byrd, et al. (2003). "Gradual evolution in bacteria: evidence from *Bacillus* systematics." Microbiology **149**(Pt 12): 3565-73.
- Fenchel, T. and B. J. Finlay (2006). "The diversity of microbes: resurgence of the phenotype." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1475): 1965-73.
- Fernandes, P. (2006). "Applied microbiology and biotechnology in the conservation of stone cultural heritage materials." Appl Microbiol Biotechnol **73**(2): 291-6.
- Fierer, N. and R. B. Jackson (2006). "The diversity and biogeography of soil bacterial communities." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(3): 626-31.
- Finlay, B. J. (2002). "Global dispersal of free-living microbial eukaryote species." Science **296**(5570): 1061-3.
- Flemming, H. C. and J. Wingender "The biofilm matrix." Nat Rev Microbiol **8**(9): 623-33.
- Foissner, W. (1999). "Protist diversity: estimates of the near-imponderable." Protist **150**(4): 363-8.
- Follows, M. J., S. Dutkiewicz, et al. (2007). "Emergent biogeography of microbial communities in a model ocean." Science **315**(5820): 1843-6.
- Friedmann, E. I., M. Hua, et al. (1988). "Cryptoendolithic lichen and cyanobacterial communities of the Ross Desert, Antarctica." Polarforschung **58**(2-3): 251-9.
- Fuhrman, J. A., K. McCallum, et al. (1992). "Novel major archaeobacterial group from marine plankton." Nature **356**(6365): 148-9.
- Gaylarde, C. C., B. O. Ortega-Morales, et al. (2007). "Biogenic black crusts on buildings in unpolluted environments." Curr Microbiol **54**(2): 162-6.
- Gaylarde, P. M., C. A. Crispim, et al. (2005). "Cyanobacteria from Brazilian building walls are distant relatives of aquatic genera." Omic **9**(1): 30-42.
- Geras'kin, S. A., S. V. Fesenko, et al. (2008). "Effects of non-human species irradiation after the Chernobyl NPP accident." Environ Int **34**(6): 880-97.
- Gevers, D., F. M. Cohan, et al. (2005). "Opinion: Re-evaluating prokaryotic species." Nat Rev Microbiol **3**(9): 733-9.
- Golubic, S., G. Radtke, et al. (2005). "Endolithic fungi in marine ecosystems." Trends Microbiol **13**(5): 229-35.
- Gorbushina, A. A. (2007). "Life on the rocks." Environ Microbiol **9**(7): 1613-31.
- Gorbushina, A. A., A. Beck, et al. (2005). "Microcolonial rock inhabiting fungi and lichen photobionts: evidence for mutualistic interactions." Mycol Res **109**(Pt 11): 1288-96.
- Gorbushina, A. A. and W. J. Broughton (2009). "Microbiology of the atmosphere-rock interface: how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem." Annu Rev Microbiol **63**: 431-50.
- Gorbushina, A. A., W. E. Krumbein, et al. (2002). "Rock surfaces as life indicators: new ways to demonstrate life and traces of former life." Astrobiology **2**(2): 203-13.
- Greenberg, E. P. (2003). "Bacterial communication and group behavior." J Clin Invest **112**(9): 1288-90.
- Griffiths, R. I., B. C. Thomson, et al. "The bacterial biogeography of British soils." Environ Microbiol.
- Guillou, L., W. Eikrem, et al. (2004). "Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems." Protist **155**(2): 193-214.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, et al. (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." Nat Rev Microbiol **2**(2): 95-108.
- Harding, T., A. D. Jungblut, et al. (2011). "Microbes in high arctic snow and implications for the cold biosphere." Appl Environ Microbiol **77**(10): 3234-43.
- Harrison, J. J., H. Ceri, et al. (2007). "Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms." Nat Rev Microbiol **5**(12): 928-38.

- Held, N. L. and R. J. Whitaker (2009). "Viral biogeography revealed by signatures in *Sulfolobus islandicus* genomes." *Environ Microbiol* **11**(2): 457-66.
- Heydorn, A., A. T. Nielsen, et al. (2000). "Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT." *Microbiology* **146** (Pt 10): 2395-407.
- Heyrman, J., J. Verbeeren, et al. (2005). "Six novel *Arthrobacter* species isolated from deteriorated mural paintings." *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(Pt 4): 1457-64.
- Hugenholtz, P. and N. R. Pace (1996). "Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach." *Trends Biotechnol* **14**(6): 190-7.
- Ivars-Martinez, E., G. D'Auria, et al. (2008). "Biogeography of the ubiquitous marine bacterium *Alteromonas macleodii* determined by multilocus sequence analysis." *Mol Ecol* **17**(18): 4092-106.
- Janssen, P. H., P. S. Yates, et al. (2002). "Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia." *Appl Environ Microbiol* **68**(5): 2391-6.
- Jobb, G., A. von Haeseler, et al. (2004). "TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics." *BMC Evol Biol* **4**: 18.
- Karsten, U., S. Lembcke, et al. (2007). "The effects of ultraviolet radiation on photosynthetic performance, growth and sunscreen compounds in aeroterrestrial biofilm algae isolated from building facades." *Planta* **225**(4): 991-1000.
- Keller, L. and M. G. Surette (2006). "Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective." *Nat Rev Microbiol* **4**(4): 249-58.
- Keller, M. and K. Zengler (2004). "Tapping into microbial diversity." *Nat Rev Microbiol* **2**(2): 141-50.
- Kolenbrander, P. E., R. J. Palmer, Jr., et al. (2010). "Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance." *Nat Rev Microbiol* **8**(7): 471-80.
- Kolter, R. and E. P. Greenberg (2006). "Microbial sciences: the superficial life of microbes." *Nature* **441**(7091): 300-2.
- Kunin, V., S. He, et al. (2008). "A bacterial metapopulation adapts locally to phage predation despite global dispersal." *Genome Res* **18**(2): 293-7.
- Kurland, C. G. and S. G. Andersson (2000). "Origin and evolution of the mitochondrial proteome." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4): 786-820.
- Lam, J., R. Chan, et al. (1980). "Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis." *Infect Immun* **28**(2): 546-56.
- Latasa, C., C. Solano, et al. (2006). "Biofilm-associated proteins." *C R Biol* **329**(11): 849-57.
- Lee, J. W., J. H. Nam, et al. (2008). "Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces." *J Microbiol* **46**(2): 174-82.
- Lepere, C., I. Domaizon, et al. (2007). "Community composition of lacustrine small eukaryotes in hyper-eutrophic conditions in relation to top-down and bottom-up factors." *FEMS Microbiol Ecol* **61**(3): 483-95.
- Lepere, C., I. Domaizon, et al. (2008). "Unexpected importance of potential parasites in the composition of the freshwater small-eukaryote community." *Appl Environ Microbiol* **74**(10): 2940-9.
- Li, L., M. Gao, et al. (2011). "Removal of airborne microorganisms emitted from a wastewater treatment oxidation ditch by adsorption on activated carbon." *J Environ Sci (China)* **23**(5): 711-7.
- Lopez-Garcia, P. (2005). "Extremophiles." *LECTURES IN ASTROBIOLOGY, VOL 1*.
- Lopez-Garcia, P. and D. Moreira (2008). "Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology." *Res Microbiol* **159**(1): 67-73.
- Lopez-Garcia, P., H. Philippe, et al. (2003). "Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 697-702.
- Lopez-Garcia, P., F. Rodriguez-Valera, et al. (2001). "Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton." *Nature* **409**(6820): 603-7.

- Lopez-Garcia, P., A. Vereshchaka, et al. (2007). "Eukaryotic diversity associated with carbonates and fluid-seawater interface in Lost City hydrothermal field." Environ Microbiol **9**(2): 546-54.
- Martiny, J. B., B. J. Bohannan, et al. (2006). "Microbial biogeography: putting microorganisms on the map." Nat Rev Microbiol **4**(2): 102-12.
- Mayr, E. (1948). "The bearing of the new systematics on genetical problems; the nature of species." Adv Genet **3b**(2): 205-37.
- McNamara, C. J., T. D. t. Perry, et al. (2006). "Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site." Microb Ecol **51**(1): 51-64.
- Miller, A. Z., L. Laiz, et al. (2008). "Reproducing stone monument photosynthetic-based colonization under laboratory conditions." Sci Total Environ **405**(1-3): 278-85.
- Moons, P., C. W. Michiels, et al. (2009). "Bacterial interactions in biofilms." Crit Rev Microbiol **35**(3): 157-68.
- Moreira, D. and P. Lopez-Garcia (2002). "The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world." Trends Microbiol **10**(1): 31-8.
- Nascimbene, J., H. Thus, et al. (2009). "Early colonization of stone by freshwater lichens of restored habitats: a case study in northern Italy." Sci Total Environ **407**(18): 5001-6.
- Nemergut, D. R., E. K. Costello, et al. "Global patterns in the biogeography of bacterial taxa." Environ Microbiol **13**(1): 135-44.
- O'Grady, N. P., M. Alexander, et al. (2002). "Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections." Infect Control Hosp Epidemiol **23**(12): 759-69.
- Oda, Y., B. Star, et al. (2003). "Biogeography of the purple nonsulfur bacterium *Rhodospseudomonas palustris*." Appl Environ Microbiol **69**(9): 5186-91.
- Ortega-Morales, B. O., A. Lopez-Cortes, et al. (2001). "Extracellular polymers of microbial communities colonizing ancient limestone monuments." Methods Enzymol **336**: 331-9.
- Ortega-Morales, O., J. Guezennec, et al. (2000). "Phototrophic biofilms on ancient Mayan buildings in Yucatan, Mexico." Curr Microbiol **40**(2): 81-5.
- Pace, N. R. (1997). "A molecular view of microbial diversity and the biosphere." Science **276**(5313): 734-40.
- Palleroni, N. J. (1997). "Prokaryotic diversity and the importance of culturing." Antonie Van Leeuwenhoek **72**(1): 3-19.
- Papke, R. T., N. B. Ramsing, et al. (2003). "Geographical isolation in hot spring cyanobacteria." Environ Microbiol **5**(8): 650-9.
- Pedros-Alio, C. (2006). "Marine microbial diversity: can it be determined?" Trends Microbiol **14**(6): 257-63.
- Pellerin, A., D. Lacelle, et al. (2009). "Microbial diversity in endostromatolites (cf. Fissure Calcretes) and in the surrounding permafrost landscape, Haughton impact structure region, Devon Island, Canada." Astrobiology **9**(9): 807-22.
- Peltola, M., T. R. Neu, et al. (2008). "Architecture of *Deinococcus geothermalis* biofilms on glass and steel: a lectin study." Environ Microbiol **10**(7): 1752-9.
- Philippe, H. (1993). "MUST, a computer package of Management Utilities for Sequences and Trees." Nucleic Acids Res **21**(22): 5264-72.
- Poole, K. and R. Srikumar (2001). "Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance." Curr Top Med Chem **1**(1): 59-71.
- Poonguzhali, S., M. Madhaiyan, et al. (2007). "Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals is widespread in gram-negative *Methylobacterium*." J Microbiol Biotechnol **17**(2): 226-33.
- Potts, M. (1994). "Desiccation tolerance of prokaryotes." Microbiol Rev **58**(4): 755-805.
- Rainey, F. A., K. Ray, et al. (2005). "Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample." Appl Environ Microbiol **71**(9): 5225-35.

- Rappe, M. S., S. A. Connon, et al. (2002). "Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade." *Nature* **418**(6898): 630-3.
- Rappe, M. S. and S. J. Giovannoni (2003). "The uncultured microbial majority." *Annu Rev Microbiol* **57**: 369-94.
- Redford, A. J., R. M. Bowers, et al. "The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves." *Environ Microbiol* **12**(11): 2885-93.
- Roeselers, G., M. C. Loosdrecht, et al. (2008). "Phototrophic biofilms and their potential applications." *J Appl Phycol* **20**(3): 227-235.
- Roeselers, G., M. C. van Loosdrecht, et al. (2007). "Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development." *Microb Ecol* **54**(3): 578-85.
- Roeselers, G., B. Zippel, et al. (2006). "On the reproducibility of microcosm experiments - different community composition in parallel phototrophic biofilm microcosms." *FEMS Microbiol Ecol* **58**(2): 169-78.
- Rothschild, L. J. and R. L. Mancinelli (1990). "Model of carbon fixation in microbial mats from 3,500 Myr ago to the present." *Nature* **345**(6277): 710-2.
- Rothschild, L. J. and R. L. Mancinelli (2001). "Life in extreme environments." *Nature* **409**(6823): 1092-101.
- Sanchez-Andrea, I., N. Rodriguez, et al. (2011). "Microbial Diversity of Anaerobic Sediments of Rio Tinto: a Natural Acid and High Heavy Metals Content Environment." *Appl Environ Microbiol*.
- Sanchez-Moral, S., L. Luque, et al. (2005). "Deterioration of building materials in Roman catacombs: the influence of visitors." *Sci Total Environ* **349**(1-3): 260-76.
- Sandaa, R., V. V. Torsvik, et al. (1999). "Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution." *FEMS Microbiol Ecol* **30**(3): 237-251.
- Sauer, K., A. K. Camper, et al. (2002). "Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm." *J Bacteriol* **184**(4): 1140-54.
- Scheerer, S., O. Ortega-Morales, et al. (2009). "Microbial deterioration of stone monuments--an updated overview." *Adv Appl Microbiol* **66**: 97-139.
- Schloss, P. D. and J. Handelsman (2005). "Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness." *Appl Environ Microbiol* **71**(3): 1501-6.
- Schloss, P. D. and J. Handelsman (2006). "Toward a census of bacteria in soil." *PLoS Comput Biol* **2**(7): e92.
- Sendamangalam, V., O. K. Choi, et al. "The anti-biofouling effect of polyphenols against *Streptococcus mutans*." *Biofouling* **27**(1): 13-9.
- Simoes, L. C., M. Simoes, et al. (2007). "Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water." *Appl Environ Microbiol* **73**(19): 6192-200.
- Slapeta, J., D. Moreira, et al. (2005). "The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes." *Proc Biol Sci* **272**(1576): 2073-81.
- Sloan, W. T., M. Lunn, et al. (2006). "Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure." *Environ Microbiol* **8**(4): 732-40.
- Sorensen, S. R., Z. Ronen, et al. (2001). "Isolation from agricultural soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon." *Appl Environ Microbiol* **67**(12): 5403-9.
- Staley, J. T. (2006). "The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**(1475): 1899-909.
- Stephen, J. R., Y. J. Chang, et al. (1999). "Microbial characterization of a JP-4 fuel-contaminated site using a combined lipid biomarker/polymerase chain reaction--denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)-based approach." *Environ Microbiol* **1**(3): 231-41.

- Sterflinger, K. and H. Prillinger (2001). "Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in an urban environment (Vienna, Austria)." Antonie Van Leeuwenhoek **80**(3-4): 275-86.
- Stewart, P. S. and M. J. Franklin (2008). "Physiological heterogeneity in biofilms." Nat Rev Microbiol **6**(3): 199-210.
- Stoeck, T., F. Bruemmer, et al. (2007). "Evidence for local ciliate endemism in an alpine anoxic lake." Microb Ecol **54**(3): 478-86.
- Stolz, A. (2009). "Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads." Appl Microbiol Biotechnol **81**(5): 793-811.
- Stoodley, P., K. Sauer, et al. (2002). "Biofilms as complex differentiated communities." Annu Rev Microbiol **56**: 187-209.
- Taylor, J. W., E. Turner, et al. (2006). "Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1475): 1947-63.
- Taylor, M. W., P. J. Schupp, et al. (2005). "Biogeography of bacteria associated with the marine sponge *Cymbastela concentrica*." Environ Microbiol **7**(3): 419-33.
- Teitzel, G. M. and M. R. Parsek (2003). "Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*." Appl Environ Microbiol **69**(4): 2313-20.
- Torsvik, V., K. Salte, et al. (1990). "Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria." Appl Environ Microbiol **56**(3): 776-81.
- Urzi, C. and P. Albertano (2001). "Studying phototrophic and heterotrophic microbial communities on stone monuments." Methods Enzymol **336**: 340-55.
- Urzi, C., L. Brusetti, et al. (2001). "Biodiversity of Geodermatophilaceae isolated from altered stones and monuments in the Mediterranean basin." Environ Microbiol **3**(7): 471-9.
- Vercraene-Eairmal, M., B. Lauga, et al. "Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure." Chemosphere **81**(7): 837-43.
- Vyverman, W., E. Verleyen, et al. (2007). "Historical processes constrain patterns in global diatom diversity." Ecology **88**(8): 1924-31.
- Ward, D. M. (1998). "A natural species concept for prokaryotes." Curr Opin Microbiol **1**(3): 271-7.
- Watnick, P. I. and R. Kolter (1999). "Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm." Mol Microbiol **34**(3): 586-95.
- Wawrik, B., D. Kutliev, et al. (2007). "Biogeography of actinomycete communities and type II polyketide synthase genes in soils collected in New Jersey and Central Asia." Appl Environ Microbiol **73**(9): 2982-9.
- Webster, A. and E. May (2006). "Bioremediation of weathered-building stone surfaces." Trends Biotechnol **24**(6): 255-60.
- Webster, N. S. and A. P. Negri (2006). "Site-specific variation in Antarctic marine biofilms established on artificial surfaces." Environ Microbiol **8**(7): 1177-90.
- Whitaker, R. J. (2006). "Allopatric origins of microbial species." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1475): 1975-84.
- Whitaker, R. J., D. W. Grogan, et al. (2003). "Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea." Science **301**(5635): 976-8.
- White, O., J. A. Eisen, et al. (1999). "Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1." Science **286**(5444): 1571-7.
- Whitman, W. B., D. C. Coleman, et al. (1998). "Prokaryotes: the unseen majority." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6578-83.
- Wierzchos, J., C. Ascaso, et al. (2006). "Endolithic cyanobacteria in halite rocks from the hyperarid core of the Atacama Desert." Astrobiology **6**(3): 415-22.
- Woese, C. R. (1987). "Bacterial evolution." Microbiol Rev **51**(2): 221-71.

- Woese, C. R. and G. E. Fox (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(11): 5088-90.
- Woese, C. R. and R. Gupta (1981). "Are archaeobacteria merely derived 'prokaryotes'?" Nature **289**(5793): 95-6.
- Woese CR, K. O., Wheelis ML. (1990). "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jun;87(12):4576-9.
- Woese, C. R., L. J. Magrum, et al. (1978). "Archaeobacteria." J Mol Evol **11**(3): 245-51.
- Woese, C. R., E. Stackebrandt, et al. (1985). "A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa." Syst Appl Microbiol **6**: 143-51.
- Wood, T. K., S. H. Hong, et al. (2011). "Engineering biofilm formation and dispersal." Trends Biotechnol **29**(2): 87-94.
- Yang, X., H. Beyenal, et al. (2000). "Quantifying biofilm structure using image analysis." J Microbiol Methods **39**(2): 109-19.
- Zablen, L. B., M. S. Kissil, et al. (1975). "Phylogenetic origin of the chloroplast and prokaryotic nature of its ribosomal RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(6): 2418-22.
- Zeng, W. L., F. F. Zhao, et al. (2008). "[Decontamination of heavy metals in wastewater by transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 with mouse metallothionein-I gene]." Huan Jing Ke Xue **29**(3): 738-44.
- Zhang, S., S. Hou, et al. (2010). "Bacterial community in the East Rongbuk Glacier, Mt. Qomolangma (Everest) by culture and culture-independent methods." Microbiol Res **165**(4): 336-45.



**Annexe III.1a. Caractéristiques des échantillons analysés par approche moléculaire de clonage et séquençage.**

	Origine géographique	Type de substrat	Coordonnées	Altitude (m)	Orientation	Coloration	Années d'exposition	Séquences de SSU rRNA pour les bactéries	Nb OTUs pour bactéries	Séquences de SSU rRNA pour les eucaryotes	Nb OTUs eucaryotes
<b>A3.1</b>	Lyon	Minéral composite	46° 12.147'N 5° 11.397'E	224	Nord	vert	7	201	47	65	10
<b>A3.3</b>	Lyon	Minéral composite	46° 12.147'N 5° 11.397'E	224	Nord	vert	7	172	47	66	16
<b>A2.1a</b>	Charente-maritime	Minéral composite	45° 56.624'N 1° 18.363'O	6	Nord-Est	vert, rouge, noir	2	186	31	50	12
<b>A2.2a</b>	Charente-maritime	Minéral composite	45° 25.192'N 0° 17.536'O	78	Nord-Est	rien de visible	3			41	4
<b>A2.3</b>	Charente-maritime	Minéral composite	46° 1.924'N 1° 22.732'O	9	Ouest	rouge	3	58	8	47	5
<b>A2.4b</b>	Charente-maritime	Minéral composite	46° 9.481'N 1° 9.216'O	7	Nord	vert	5	254	40	46	8
<b>B1.3</b>	Ballyclare	Minéral composite	54° 45.112'N 6° 0.156'O	76	Ouest	vert	3	84	10	114	19
<b>B1.4</b>	Ballyclare	calcaire	54° 45.112'N 6° 0.156'O	76	Sud	jaune, vert		121	33	128	28
<b>B1.6</b>	Ballyclare	béton	54° 45.112'N 6° 0.156'O	76	Sud	multi couleurs		112	20	126	15
<b>B1.7</b>	Ballyclare	granite	54° 45.112'N 6° 0.156'O	76	Sud	multi couleurs		126	23	127	18
<b>RP1.5</b>	Courbevoie	Minéral composite	48° 53.809'N 2° 15.392'E	40	Nord-Ouest	noir, vert	7	190	15	171	26
<b>RP2.6</b>	Port Cergy	Minéral composite	49° 1.887'N 2° 3.619'E	39	Sud-Ouest	noir, vert	8	185	29	185	30
<b>Cher1</b>	Pripyat (Tchernobyl)	béton	51° 23.321'N 30° 6.746'E	112							
<b>Cher2</b>	Pripyat (Tchernobyl)	béton	51° 23.118'N 30° 5.943'E	113				70	13	93	12
<b>Cher3</b>	Pripyat (Tchernobyl)	béton	51° 23.462'N 30° 3.775'E	117							
<b>Cher4</b>	Pripyat (Tchernobyl)	béton	51° 23.052'N 30° 2.433'E	118				124	27	93	20
<b>Cher5</b>	Pripyat (Tchernobyl)	béton	51° 21.561'N 30° 0.595'E	121							
<b>Cher6</b>	Pripyat (Tchernobyl)	béton	51° 21.701'N 30° 0.402'E	121				193	27	115	8
<b>Cher7</b>	Pripyat (Tchernobyl)	béton	51° 17.647'N 30° 38.568'E	113				64	2	107	9
<b>Cher8</b>	Vesniane	béton	51° 18.380'N 29° 38.820'E	136							
<b>Bt0</b>	Ballyclare	Minéral composite	54° 45.112'N 6° 0.156'O	76	Nord	rien de visible	0	35	9	0	0
<b>Bt6</b>	Ballyclare	Minéral composite	54° 45.112'N 6° 0.156'O	76	Nord	rien de visible	1/2	61	11	43	16
<b>Bt12</b>	Ballyclare	Minéral composite	54° 45.112'N 6° 0.156'O	76	Nord	vert	1	81	9	120	20
<b>Bt24</b>	Ballyclare	Minéral composite	54° 45.112'N 6° 0.156'O	76	Nord	vert	2	189	27	177	9
<b>St12</b>	Servas	Minéral composite	46° 7.960'N 5° 9.897'E	267	Nord	vert	1	213	38	112	16
<b>St24</b>	Servas	Minéral composite	46° 7.960'N 5° 9.897'E	267	Nord	vert	2	225	36	183	18
<b>SG12</b>	Aubervilliers	Minéral composite	48° 54.889'N 2° 22.872'E	37	Nord	rien de visible	1	82	15	46	6
<b>SGt24</b>	Aubervilliers	Minéral composite	48° 54.889'N 2° 22.872'E	37	Nord	vert	2	222	26	85	16

**Annexe III.1b. Caractéristiques des échantillons supplémentaires analysés par approches de type fingerprinting, DGGE**

Nom de l'échantillon	Origine géographique	Type de substrat	Orientation	Coloration
C1.1	Cork	Minéral composite	Sud	vert
C1.2	Cork	Minéral composite	Est	vert
C1.3	Cork	ardoise	Ouest	
C1.4	Cork	Minéral composite	Nord	vert
C1.5	Cork	Minéral composite	Ouest	vert
C1.6	Cork	Minéral composite	Est	vert
C1.7	Cork	Minéral composite	Ouest	vert
C1.8	Cork	Minéral composite	Nord	vert
C1.9	Cork	granite	Est	noir
C1.10	Cork	granite	Est	vert
C1.11	Cork	Minéral composite	Sud	vert
C1.12	Cork	Minéral composite	Sud	vert
C1.13	Cork	granite	Est	vert
C1.14	Cork	granite	Est	vert
C1.15	Cork	granite	Ouest	vert
C1.16	Cork	écorce	Ouest	vert
B1.1	Ballyclare	Minéral composite	Nord	vert
B1.2	Ballyclare	Minéral composite	Ouest	vert
B1.3	Ballyclare	Minéral composite	Ouest	vert
B1.4	Ballyclare	calcaire	Sud	vert-jaune
B1.5	Ballyclare	granite	Ouest	vert-jaune
B1.6	Ballyclare	béton	Sud	vert-jaune
B1.7	Ballyclare	granite	Sud	vert
B1.8	Ballyclare	béton	Sud	jaune
RP1.1	Courbevoie	Minéral composite	est	gris
RP1.2	Courbevoie	Minéral composite	Nord-Ouest	gris
RP1.3	Courbevoie	Minéral composite	Sud	Gris
RP1.4	Courbevoie	Minéral composite	sud	Gris
RP1.5	Courbevoie	Minéral composite	Nord	Gris
RP1.6	Courbevoie	Minéral composite	Ouest	Gris
RP2.1	Port Cergy	Minéral composite	Nord-Ouest	vert
RP2.2	Port Cergy	Minéral composite	Sud	vert
RP2.3	Port Cergy	Minéral composite	Nord	vert
RP2.4	Port Cergy	Minéral composite	Nord	Gris
RP2.5	Port Cergy	Minéral composite	Ouest	vert
RP2.6	Port Cergy	Minéral composite	Ouest	vert

**Annexe III.2.a. Paramètres environnementaux des sites géographiques étudiés en IV.1.**

	Ballyclare				Région Parisienne				Charente-Maritime				Lyon		
	<b>B1.4</b>	<b>B1.6</b>	<b>B1.7</b>	<b>B1.3</b>	<b>RP1.5</b>	<b>RP2.6</b>	<b>A2.1a</b>	<b>A2.2a</b>	<b>A2.3</b>	<b>A2.4b</b>	<b>A3.1</b>	<b>A3.3</b>			
	Calcaire	Béton	Granite	Minéral composite	Minéral composite		Minéral composite		Minéral composite		Minéral composite		Nord	Nord	
Sud	Sud	Sud	Ouest	Nord-Ouest	Sud-Ouest	Nord-Est	Nord-Est	Ouest	Nord	Nord	Nord	Nord	Nord	Nord	
Substrat															
Orientation															
Température moyenne mois avant prélèvement (°C)	5	5	5	5	15	15	17,7	17,7	17,7	17,7	14,5	14,5	14,5	14,5	
Température moyenne année avant prélèvement (°C)	10	10	10	10	11,9	11,9	14,4	14,4	14,4	14,4	13,3	13,3	13,3	13,3	
Température minimale mois avant prélèvement (°C)	1	1	1	1	9	9	10	10	10	10	9	9	9	9	
Température minimale année avant prélèvement (°C)	6	6	6	6	7	7	9	9	9	9	9	9	9	9	
Température maximale mois avant prélèvement (°C)	8	8	8	8	19	19	21	21	21	21	21	21	21	21	
Température maximale année avant prélèvement (°C)	13	13	13	13	15	15	16	16	16	16	18	18	18	18	
Précipitations moyennes mois avant prélèvement (mm)	16,8	16,8	16,8	16,8	16,6	16,6	10,6	10,6	10,6	10,6	9,9	9,9	9,9	9,9	
Précipitations moyennes année av. prélèvement (mm)	17	17	17	17	45	45	70,8	70,8	70,8	70,8	91,3	91,3	91,3	91,3	
Température de Rosée mois avant prélèvement (°C)	2	2	2	2	8,9	8,9	12,24	12,24	12,24	12,24	7,8	7,8	7,8	7,8	
Température de Rosée année avant prélèvement (°C)	7	7	7	7	6,8	6,8	10,9	10,9	10,9	10,9	8,8	8,8	8,8	8,8	
Humidité moyenne mois avant prélèvement (%)	86,8	86,8	86,8	86,8	71	71	75	75	75	75	68	68	68	68	
Humidité moyenne année avant prélèvement (%)	85,1	85,1	85,1	85,1	74,5	74,5	82,5	82,5	82,5	82,5	78,1	78,1	78,1	78,1	
Humidité minimale mois avant prélèvement (%)	72,6	72,6	72,6	72,6	45,4	45,4	50,8	50,8	50,8	50,8	37,1	37,1	37,1	37,1	
Humidité minimale année avant prélèvement (%)	69,6	69,6	69,6	69,6	53,1	53,1	67,5	67,5	67,5	67,5	54,8	54,8	54,8	54,8	
Humidité maximale mois avant prélèvement (%)	97,5	97,5	97,5	97,5	90,3	90,3	84,1	84,1	84,1	84,1	93,2	93,2	93,2	93,2	
Humidité maximale année avant prélèvement (%)	96,7	96,7	96,7	96,7	91,3	91,3	92,4	92,4	92,4	92,4	95,3	95,3	95,3	95,3	

**Annexe III.2.b. Paramètres environnementaux des sites géographiques étudiés en IV.3. obtenus par des données météorologiques locales.**

Mois après début exposition	LE BOURGET				AMBERIEU				BELFAST				
	Température moyenne (°C)	Précipitations moyennes quotidiennes (mm)	Humidité relative minimale %	Humidité relative maximale %	Humidité relative moyenne %	Température moyenne (°C)	Précipitations moyennes quotidiennes (mm)	Humidité relative minimale %	Humidité relative maximale %	Humidité relative moyenne %	Température moyenne (°C)	Précipitations moyennes quotidiennes (mm)	Point de rosée moyen (°C)
1	11,5	1,8	63	96	80	11,3	0,8	57	96	77	9,0	0,3	9,4
2	7	1,2	65	95	80	4,6	3,1	66	95	81	7,7	0,6	6,6
3	4,6	1,6	71	94	83	1,4	2,3	79	97	88	5,5	0,6	4,3
4	7	1,5	67	93	80	5,2	3,2	64	96	80	4,5	1,2	4,2
5	6,8	1,0	57	92	75	6,4	1,0	47	94	71	4,6	0,3	3,7
6	7,5	2,3	54	92	73	6,8	2,9	47	93	70	4,0	0,8	2,9
7	9,9	1,6	44	92	68	10,5	5,2	45	93	69	7,4	0,2	3,6
8	16,5	2,0	42	88	65	16,8	2,2	42	91	67	13,8	0,1	7,4
9	17,8	0,8	45	88	67	18,6	3,8	49	92	71	13,8	0,4	8,6
10	19,7	1,0	37	86	61	20,1	4,1	42	93	68	15,8	0,8	11,9
11	19,2	2,1	46	89	67	19,4	2,9	46	95	71	15,1	1,4	12,7
12	14,6	0,6	45	90	68	14,5	6,7	54	96	75	11,7	0,7	10,2
13	11,1	2,5	58	93	76	11,9	4,2	63	95	79	8,3	0,9	6,7
14	7,9	1,4	70	93	82	6,7	1,9	67	95	81	5,1	2	5,2
15	3,3	0,6	75	93	84	2,6	2,6	73	95	84	4,2	1,7	2,9
16	1,3	1,4	68	93	80	0,6	1,8	69	95	82	4,0	2,5	2,7
17	4,2	1,1	63	92	77	2,5	4,8	62	96	79	4,2	0,9	3,5
18	7,5	0,8	45	89	67	6,8	2,5	46	96	71	6,6	1,27	4,9
19	12,6	1,2	44	90	67	12,6	1,5	46	96	71	9,7	2,1	6,5
20	15,1	1,5	50	90	70	17,5	1,5	39	90	65	9,7	2,2	7
21	17,5	2,7	43	87	65	18,8	3,7	41	96	69	15,0	1,7	9,6
22	19,9	2,3	37	86	62	21,2	2,9	36	93	65	15,5	3,2	11,9
23	21	0,3	33	83	58	22,2	0,8	34	94	64	14,6	5,4	12,4
24	16,7	1,4	46	90	68	16,9	2,2	54	98	76	12,5	1,1	10,4

**Annexe III.2.c. Paramètres environnementaux des sites géographiques étudiés en IV.3. obtenus par des données « testo ».**

Mois après début exposition	Aubervilliers						Servas							
	Température minimale (°C)	Température maximale (°C)	Température moyenne (°C)	Humidité relative minimale %	Humidité relative maximale %	Humidité relative moyenne %	% de temps ou l'eau condense en surface	Température minimale (°C)	Température maximale (°C)	Température moyenne (°C)	Humidité relative minimale %	Humidité relative maximale %	Humidité relative moyenne %	% de temps ou l'eau condense en surface
1	1,7	24,8	12,4	26,2	99,9	78,8	0	-2,8	26,3	10,6	35,7	99,9	89,1	21
2	-2,9	17,1	7,7	37,4	99,8	81,3	0	-7,6	20,5	4,4	43,7	99,9	91,2	31
3	-5,3	14,5	4,7	42,2	99,9	84,9	0	-8,1	14,4	1,3	57,8	99,9	96,0	37
4	-2,1	16	7,5	29,1	99,9	79,0	0	-5,7	18,4	4,5	45,5	99,9	91,4	45
5	-2,7	20,2	7,4	22,3	99,9	74,7	0	-5,7	17,8	5,2	43,1	99,9	84,7	40
6	-1,4	21,4	8,2	29,7	99,9	75,0	0	-25,8	22,5	6,6	28	99,9	80,6	58
7	0	30,7	11,7	15,3	99,9	66,2	0	-2,9	37,2	11,7	19,1	99,9	75,8	47
8	7,5	36,7	19,5	13,4	99,9	57,7	0	5	29,2	17,1	28,3	99,9	77,1	48
9	9,2	38	19,9	18,7	99,8	59,7	0	6,7	36	18,7	29,5	99,9	81,0	32
10	11,6	42,5	21,9	12,6	99,9	55,2	0	8,7	35,7	20,3	33,9	99,9	77,9	26
11	12,6	44,2	20,7	15,7	99,9	63,4	1	7,7	33,7	19,0	30,5	99,9	83,3	25
12	7,1	30,6	16,3	19,2	99,9	65,9	0	3,7	30,5	14,4	39,6	99,9	86,5	19
13	1,6	26,5	12,2	31,8	99,9	78,3	8	1	25,8	11,3	42,9	99,9	90,1	27
14	-1,3	20,5	8,5	43	99,9	83,8	5	-5	19,2	6,3	51	99,9	93,6	17
15	-5,1	13,6	3,7	42	99,9	86,0	11	-8,2	10	1,8	53,2	99,9	96,5	28
16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-10,6	11,9	-0,6	51,8	99,9	95,4	30
17	-4,1	19,8	5,0	30,6	99,9	80,2	8	-6,2	17,7	2,6	37,1	99,9	88,8	27
18	0,4	23,7	8,9	14,8	99,9	66,1	3	-4,3	21,5	6,8	27,4	99,9	77,6	25
19	4,7	30,5	14,4	10,6	99,9	64,4	1	2,4	25,1	13,1	26,5	99,9	75,6	19
20	6,8	36,7	17,1	14,2	99,9	65,6	0	4,7	37,3	18,0	27,3	99,9	71,0	27
21	9,2	34,7	18,7	21,9	99,9	62,7	2	8,4	34,8	19,0	30,7	99,9	76,0	17
22	13,4	36,9	21,5	14,5	99,9	55,8	0	9,5	37	21,8	22,2	99,9	70,1	28
23	12,1	42,6	23,5	11,1	99,9	51,0	0	7,2	40,6	21,9	17,3	99,9	73,0	28
24	10	38,9	18,5	17	99,9	65,5	0	5,6	31,4	17,3	26,4	99,9	81,7	30

n.d., not determined

Mois après début exposition	Ballyclare							% de temps où l'eau condense en surface
	Température minimale (°C)	Température maximale (°C)	Température moyenne (°C)	Humidité relative minimale %	Humidité relative maximale %	Humidité relative moyenne %	Humidité relative %	
1	-0,3	24,1	11,7	42,5	99,9	87,6		
2	-1,9	17,4	8,1	40,6	99,9	92,3		
3	-2,8	14,4	5,7	54,3	99,9	92,0		
4	-1,6	14	5,2	60,9	99,9	95,1		
5	-4,5	17,5	6,0	42,8	99,9	88,3		
6	-3,8	20,2	6,1	30,3	99,9	83,5		
7	-1,3	25,3	9,1	27,3	99,9	74,9		
8	2,2	34,7	14,6	26,2	99,9	69,9		
9	5,2	32,2	14,7	25,8	99,9	73,7		
10	4,7	30,5	16,3	33,2	99,9	82,3		
11	5,7	27,2	15,5	40,2	99,9	88,8	12	
12	3,1	29,4	13,3	34,4	99,9	86,8	n.d.	
13	-1,4	22,3	8,8	37,2	99,9	89,8	39	
14	-1,9	18,1	6,5	50,6	99,9	92,1	32	
15	-28,4	12,7	2,4	56,1	99,9	95,2	n.d.	
16	-5,3	40,2	5,0	13,4	99,9	87,2	n.d.	
17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
18	-5,5	25,9	6,2	47,1	99,9	97,1	18	
19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
22	6	29,1	15,6	30,8	99,9	81,5	4	
23	6,6	28,4	15,2	35,2	99,9	86,3	9	
24	2,5	33,3	13,4	24,7	99,9	83,6	4	

n.d., not determined

## Annexe IV.1. 1. Table des OTUs bactériens identifiés dans l'article 1

Sequence	OTUs		Ballyclaire		Charente-Maritime			Paris		Lyon			Acc. Number	% id	First Hit Blast	Phylogenetic ascription
	B1.3	B1.4	B1.6	B1.7	RP1.5	RP2.6	A2.1a	A2.3	A2.4b	A3.1	A3.3					
B1.4-1B-105		3								1	7	AB245333.1	97	Rubrobacteridae bacterium Gsoil 1167	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae	
A2.1a-3B-98						3	1			3	2	AB245336.1	97	Solirubrobacter sp. Gsoil 921	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae	
A3.3-3B-91											3	EU289511.1	98	Uncultured bacterium clone 2.9A	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae	
B1.6-1B-128					2	22	6	9		16		EF016819.1	97	Uncultured actinobacterium clone E1B-E12-114	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae	
A2.1a-3B-97		4				8				1		A1571811.1	96	Uncultured Rubrobacter sp. clone 354H	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae	
A2.1a-3B-116		12				7						DO366004.1	98	Uncultured actinobacterium	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae	
A3.1-3B-40										1		FM677677.1	97	Uncultured Rubrobacter sp. clone 354H	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae	
A2.1a-3B-119						5						AJ243870.1	96	Rubrobacter radiotolerans	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae	
B1.4-1B-62	1											AM295338.1	93	Marmoricola aequoreus	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
A3.3-3B-118						7	3			7	3	AB521671.1	96	Pseudonocardia sp. MN08-A0270	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
A3.3-3B-58						5	2			2	11	EU119255.1	98	Pseudonocardia sp. HBU179244	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
A3.3-3B-110										15	1	HM001291	98	Pseudonocardia sp. TS1116-13	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
A3.1-2B-38										1		AJ252828.1	92	Pseudonocardia petroleophila	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
A2.4b-3B-36		3				1						EU741234	99	Amycolatopsis sp. J13676C	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
A3.3-3B-99											1	EF612299.1	99	Amycolatopsis sp. K6-08	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
B1.7-1B-110		1										EU180557.1	99	Mycobacterium sp. BAC86	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
B1.3-1B-79	1									1		DO351736.1	96	Actinobacterium P23	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
B1.7-1B-62		11		5								EU939310.1	97	Humicoccus sp. KCTC 19426	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
A3.1-3B-98						1				1		EF540514.1	99	Micrococccineae bacterium 4_C16_66	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
A2.4b-3B-57						7						EF540514	99	Micrococccineae bacterium 4_C16_66	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
B1.3-1B-58	29											FJ267578.1	99	Arthrobacter sp. I_GA_A_3_9	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
A3.1-3B-78										3		GO199743.1	99	Arthrobacter sp. 210_41	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
RP1.5-1B-140						1				3		GO496063.1	97	Frigoribacterium sp. ZS314	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
A3.3-3B-125										11	3	GU321353.1	98	Frigoribacterium sp. NMC14	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
RP1.5-1B-51						1						HQ256793	99	Frigoribacterium sp. PDD-24b-20	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
B1.4-1B-109	2											FJ897522.1	99	Phycococcus aerophilus strain N1b-b3	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
B1.4-1B-104		12										AB546283.1	96	Phycococcus sp. IR48-RCA110	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
B1.4-1B-68		5										AM399397.1	98	Lapillibacterium sp. jejuensis	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
B1.4-1B-73		2		4								NR_026425.1	95	Demetria terrigena strain HK1 0089	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	
B1.3-1B-55	4									1		X92365.1	96	Frankiaceae	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales	

B1.4-1B-92	Act40	2	1	NR_028600.1	99	Kineosporia rhamnosa strain I-132	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
A2.1a-3B-64	Act41		1	EU977818.1	98	Kineococcus sp. rP02MC	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
A2.4b-3B-55	Act42		1	EU977818	90	Kineococcus sp. rP02MC	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
A3.3-3B-105	Act43		1	EU977818.1	94	Kineococcus sp. rP02MC	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
B1.7-1B-118	Act44		2	L40613.1	95	Frankia sp. (strain AVN17s)	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
A2.1a-3B-101	Act45		9	AY250865.1	97	Uncultured actinobacterium clone FBP218	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
A3.1-3B-120	Act46		1	AB245397.1	95	Actinomycetales bacterium Gsoil 1632	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
A2.4b-3B-139	Act47		4	AJ316570	96	Blastococcus sp. BC512	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
A2.4b-3B-31	Act48		1	EF016803	98	Uncultured actinobacterium_E1B_B11_114	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
A2.1a-3B-84	Act49	2	6	EF016798.1	98	Uncultured actinobacterium clone E1B-A4-114	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
RP2.6-1B-121	Act51		1	FM877676.1	96	Uncultured actinobacterium	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
A3.1-3B-116	Act53	2	49	AJ430193.1	98	Blastococcus aggregatus	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
RP1.5-1B-101	Act54		42	FJ214361	99	Blastococcus sp. YIM_65287	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
RP1.5-1B-132	Act55		2	AJ430193	99	Blastococcus aggregatus	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales
RP2.6-1B-24	Dei1	3	1	AB374378	99	Uncultured Deinococcus sp. clone 100M2_A8	Bacteria; Deinococcus-Thermus; Deinococcales
B1.3-1B-72	Dei2	10	2	DQ514091.1	99	Uncultured Deinococcus sp. clone J34H5	Bacteria; Deinococcus-Thermus; Deinococcales
B1.3-1B-71	Dei3	31	6	DQ366015.1	97	Uncultured Deinococcus sp. clone J34H5	Bacteria; Deinococcus-Thermus; Deinococcales
A3.3-3B-54	Dei5	3	1	DQ366015.1	97	Uncultured Deinococcus sp. clone J34H5	Bacteria; Deinococcus-Thermus; Deinococcales
A3.1-3B-118	Dei6		5	DQ366015.1	97	Uncultured Deinococcus sp. clone J34H5	Bacteria; Deinococcus-Thermus; Deinococcales
A2.1a-3B-59	Dei7		44	EU341277.1	98	Uncultured Deinococcus sp. clone AV_8S-B11	Bacteria; Deinococcus-Thermus; Deinococcales
B1.6-1B-108	Dei8	2	6	EU341288.1	99	Uncultured Deinococcus sp. clone AV_8R-S-C09	Bacteria; Deinococcus-Thermus; Deinococcales
A2.4b-1C-33	Cya1		1	DQ293994.1	97	Pleurocapsa sp. CALU 1126	Bacteria; Cyanobacteria; Pleurocapsales
A3.3-1C-62	Cya2		2	FR798926	99	Chroococcus sp. 2T05h	Bacteria; Cyanobacteria; Chroococcales
A3.3-1C-28	Cya3		24	AY493612	98	Leptolyngbya frigida ANT_L52B.3	Bacteria; Cyanobacteria; Oscillatoriales
A3.1-1C-45	Cya4		31	gbIEF429298.1	93	Leptolyngbya bacia CRS-1	Bacteria; Cyanobacteria; Oscillatoriales
B1.6-1B-88	Cya6	1	2	AY493580.1	99	Phormidium pristleyi ANT_GENTNER2.4	Bacteria; Cyanobacteria; Oscillatoriales
B1.7-1B-98	Cya9	1	1	AY493596.1	96	Coleodesmium sp. ANT_LH52B.5	Bacteria; Cyanobacteria; Nostocales
B1.7-1B-78	Cya10	2	3	EU009149.1	94	Rivularia sp. MU24 UAM-305	Bacteria; Cyanobacteria; Nostocales
A2.1a-1C-5	Cya11		6	FJ805854.1	97	Uncultured Chroococcidiopsis sp. clone AR2_1	Bacteria; Cyanobacteria; Pleurocapsales
A2.1a-3B-96	Cya12		4	FJ805854.1	98	Uncultured Chroococcidiopsis sp. clone AR2_1	Bacteria; Cyanobacteria; Pleurocapsales
A3.1-1C-7	Cya13		1	FJ805928.1	93	Uncultured Chroococcidiopsis sp. clone AS3_4	Bacteria; Cyanobacteria; Pleurocapsales
RP2.6-1B-91	Cya14		2	JF087630.1	99	Uncultured bacterium clone ncd1064b05c	Bacteria; Cyanobacteria; Pleurocapsales
RP1.5-1B-65	Gam1	1	1	X96964	99	S. sonnei	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria



A3.3-3B-89	Delta1	1	1	1	AY830778.1	99	Uncultured Myxococcales bacterium clone 77-2	Bacteria; Proteobacteria; Deltaiproteobacteria
A3.1-2B-20	Beta1	1	1	1	AB491967	94	Uncultured Burkholderiales bacterium	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
A3.3-3B-113	Beta2	1	2	2	EF575562.1	99	Duganella sp. BD-e14	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
RP2.6-1B-30	Beta3	2	2	2	HQ595212.1	97	Uncultured beta proteobacterium clone IC3058	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
B1.4-1B-60	Beta4	3	1	1	EU977753.1	98	Herbaspirillum sp. 1P10PA	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
A2.1a-3B-109	Beta5	2	1	1	GOJ29875.1	99	Uncultured Herbaspirillum sp. clone G18-sp-C04	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
B1.4-1B-111	Beta6	1	1	1	AJ505863.1	94	Herbaspirillum sp. PIV-34-1	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
RP1.5-1B-192	Beta7	5	5	5	FJ205993	97	Delftia sp_M1	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
RP1.5-1B-56	Beta8	3	1	130	EU707799	99	Delftia sp_XYJ6	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
B1.4-1B-49	Beta9	1	2	2	GP000316.1	99	Polaromonas sp. JS666	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
A3.3-3B-122	Beta10	2	2	2	AM492163.1	99	Comamonadaceae bacterium P-1D3	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
A3.3-3B-89	Beta11	1	1	1	AY922020	99	Uncultured beta proteobacterium clone AKYG464	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
B1.4-1B-61	Beta12	4	1	1	EU150282.1	98	Uncultured bacterium clone Ni_B10_DMDN	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
A3.3-3B-117	Alpha1	2	2	2	NR_029117.1	95	Phenylobacterium lituliforme strain Fail3	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales
A2.4b-2B-45	Alpha2	2	2	2	AF445680.1	98	Uncultured alpha proteobacterium clone SM1E02	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
A3.1-2B-4	Alpha3	2	2	2	GU441678	98	Devosia sp. Cr7-05	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
A3.3-3B-121	Alpha5	3	3	3	AB257630.1	96	Uncultured alpha proteobacterium	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria
B1.7-1B-67	Alpha6	4	7	1	AY862042.1	96	Uncultured alpha proteobacterium clone WB1B012	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
RP1.5-1B-21	Alpha7	3	3	3	EF174497	99	Methylobacterium iners_5317S_33	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
B1.4-1B-114	Alpha8	1	1	1	EU240206.1	99	Methylobacterium sp. strain B25a	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
B1.4-1B-126	Alpha9	6	1	1	AY616142.1	97	Methylobacterium radioliferans	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
B1.7-1B-96	Alpha10	5	5	5	AJ431385.2	96	Methylosinus trichosporium	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
RP2.6-1B-14	Alpha11	5	5	5	GO221768	93	Prosthecomicrobium sp._ATCC_27835	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
A2.1a-3B-102	Alpha12	8	1	1	FJ834325.1	97	Sphingomonas sp. BH3	Bacteria; Proteobacteria; Sphingomonadales
B1.7-1B-64	Alpha13	1	1	1	AF395032.1	97	Sphingomonas sp. SIA181-1A1	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
RP2.6-1B-39	Alpha14	17	17	17	AB220112	95	Sphingomonadaceae bacterium_PB125	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
A3.1-3B-41	Alpha15	6	2	2	EU332828.1	96	Sphingomonas sp. LnR5-44	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
A2.4b-2B-41	Alpha16	1	1	1	HM224424.1	99	Uncultured Sphingomonas sp. clone DOL43	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
B1.7-1B-131	Alpha17	1	1	1	HQ439186.1	97	Sphingomonas sp. SPC-1	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
B1.4-1B-72	Alpha18	2	4	8	AB377220.1	97	Sphingomonadaceae bacterium NAMAF005	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
RP1.5-1B-58	Alpha20	3	1	3	AF395031	99	Sphingomonas sp. M3C203B_B	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
B1.6-1B-94	Alpha21	6	6	6	FJ267571.1	99	Sphingomonas sp. IL_Gauze_W_12_8	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
A3.1-3B-59	Alpha22	2	2	2	AB428568.1	98	Sphingomonas japonica	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
A3.3-3B-82	Alpha24	19	15	5	FJ536909.1	97	Uncultured Sphingomonas sp. clone ENR01	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
A3.1-2B-19	Alpha25	1	1	1	HQ717395.1	98	Azospirillum sp. LH-CAB12	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales

A2.1a-3B-117	Alpha26	8	3	2	6	2	99	<a href="#">HM204475.1</a>	Roseomonas sp. T104-41	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
RP1.5-1B-122	Alpha27	13	13				98	<a href="#">AY167826</a>	Roseomonas sp. SAFR_014	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
B1.6-1B-63	Alpha28	1	3	1	1		98	<a href="#">AF408324.1</a>	Uncultured Acetobacteraceae bacterium clone KL-2-4-8	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
A2.1a-2B-11	Alpha29	4	4	4			95	<a href="#">NR_029061.1</a>	Roseomonas gilardii strain 5424	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
A3.1-3B-31	Alpha30	4	4	4	1		96	<a href="#">EU290160.2</a>	Roseomonas frigidaquae strain CW67	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
RP1.5-1B-67	Aci1	10	10				99	<a href="#">DQ514157</a>	Uncultured Acidobacteria bacterium_500M1_D6	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
B1.4-1B-78	Aci2	2	58	3			99	<a href="#">DQ514157.1</a>	Uncultured Acidobacteria bacterium clone 500M1_D6	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
B1.7-1B-82	Aci3	16	1	1			95	<a href="#">AY571796.1</a>	Uncultured Acidobacteria bacterium clone 352G	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
B1.6-1B-104	Aci4	33	27				96	<a href="#">AY571795.1</a>	Uncultured Acidobacteria bacterium clone 356A	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
A3.3-3B-144	Aci5	4	1	1			98	<a href="#">DQ513986.1</a>	Uncultured Acidobacteria bacterium clone 100M1_C7	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
B1.4-1B-90	Aci6	4	2	2			95	<a href="#">AY571796.1</a>	Uncultured Acidobacteria bacterium clone 352G	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
A3.3-3B-100	Aci7	13	13				96	<a href="#">AY571792.1</a>	Uncultured Acidobacteria bacterium clone 351B	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
A2.1a-3B-57	Aci8	2	2	7			97	<a href="#">FN811211.1</a>	Uncultured Acidobacteria bacterium	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
A2.1a-2B-45	Aci9	3	4	4			98	<a href="#">AY571792.1</a>	Uncultured Acidobacteria bacterium clone 351B	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
B1.7-1B-81	Aci10	3	2	2			97	<a href="#">DQ378253</a>	Uncultured Acidobacteria bacterium	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
B1.7-1B-115	Aci11	3	3				97	<a href="#">AY571792.1</a>	Uncultured Acidobacteria bacterium clone 351B	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
B1.4-1B-117	Aci12	3	3				97	<a href="#">AY571792.1</a>	Uncultured Acidobacteria bacterium clone 351B	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
B1.6-1B-98	Bact1	1					94	<a href="#">DQ130030.1</a>	Uncultured Chitinophaga sp. clone GL77	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria
A3.3-3B-142	Bact2	11	1	1			96	<a href="#">AB267476.1</a>	Flavisolbacter ginsengiterrae	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria
B1.4-1B-93	Bact3	11	4	4			95	<a href="#">FM866277.1</a>	Uncultured Bacteroidetes bacterium	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria
A3.1-3B-105	Bact5	13	9	9			95	<a href="#">AB267722.1</a>	Pedobacter daechungensis	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria
B1.6-1B-99	Bact6	13	13				98	<a href="#">AM279216.1</a>	Pedobacter GR12-04	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria
B1.7-1B-75	Bact7	13	9	9			97	<a href="#">AM933506.1</a>	Mucilaginibacter sp. FB14.2	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria
RP1.5-1B-94	Bact10	4	4	1			93	<a href="#">AY854022</a>	Leadbeiterella byssophila_4M15	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria
A3.1-2B-21	Bact11	4	2	2			93	<a href="#">EF093135.1</a>	Dyadobacter sp. VTT E-052912	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
B1.6-1B-92	Bact12	3	1	1	5		95	<a href="#">EU382214.1</a>	Hymenobacter sp. XTM003	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
B1.4-1B-103	Bact13	2	2	2			97	<a href="#">AF408273.1</a>	Uncultured Hymenobacter group bacterium clone KL-2-5-13	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
A2.1a-3B-66	Bact14	2	1	1			94	<a href="#">AF408273.1</a>	Uncultured Hymenobacter group bacterium clone KL-2-5-13	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
B1.6-1B-83	Bact15	9	9	2			95	<a href="#">AF408273</a>	Uncultured Hymenobacter group bacterium clone KL-2-5-13	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
A2.1a-2B-36	Bact16	1	2	2			92	<a href="#">AF408273.1</a>	Uncultured Hymenobacter group bacterium clone KL-2-5-13	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
A2.1a-2B-15	Bact17	3	1	1			94	<a href="#">AB251884.1</a>	Hymenobacter sp. PB17	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
B1.7-1B-109	Bact18	3	1	1			99	<a href="#">AF449431.1</a>	Hymenobacter sp. MJ1	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
B1.6-1B-79	Bact19	3	3	3			97	<a href="#">AB251884.1</a>	Hymenobacter soli	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
B1.4-1B-99	Bact20	2	2	2			97	<a href="#">FJ979848.1</a>	Hymenobacter sp. Isz18	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia

B1.7-1B-99	Bact21	2	EF683042.1	96	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone F15_5A_FL	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
B1.7-1B-113	Bact22	7	EU379243.1	96	Taxeobacter sp. 1N-12	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
B1.7-1B-134	Bact23	41	EF683042.1	97	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone F15_5A_FL	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia

## Annexe IV.1.2. Table des OTUs eucaryotes identifiés dans l'article 1

Sequence	OTUs	Baillyclaire	Paris	Charente-Maritime	Lyon	Acc. Number	% id	First Hit Blast	Phylogenetic ascription
B1.4-1E-132	Stram1	1				AM490822.1	96	Heterococcus chodatii	Eukaryota; stramenopiles; Xanthophyceae
RP2.6-1E-12	Stram2	2	3	1	5	AM695636	99	Botrydiodiposidaceae sp. PAB_485	Eukaryota; stramenopiles; Xanthophyceae
B1.6-1E-70	Strep1	4	1	1		EU434019.1	98	Klebsormidium flaccidum strain SAG 7.91	Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta
B1.4-1E-117	Strep2	1				EU434019.1	94	Klebsormidium flaccidum strain SAG 7.91	Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta
A3.1-1E-14	Strep3	6	1	1	25	X95935	97	Pottia truncata	Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta
A2.1a-1E-2	Chlo1	2		4	36	DQ399586.1	97	Printzina lagenifera	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Ulvophyceae
B1.4-1E-136	Chlo2	1				FJ648515.1	97	Ellipochloris sp. SAG 2117	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta
A2.1a-1E-10	Chlo3	9		2	4	AY762607.1	95	Trebouxioiphyte sp. UR7/5	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
B1.4-1E-66	Chlo4	5				EF159951.1	99	Chlorella sp. UTEX 318	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta
A2.1a-1E-32	Chlo5			7		JF304471	99	Phyllosiphon arisari isolate PY9a1	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
B1.7-1E-58	Chlo6	1	8	2		EU878373.1	95	Pairetochloris alveolatis strain UTEX 836	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta
B1.3-1E-88	Chlo7	1		1	1	AY762604.1	98	Trebouxioiphyte sp. UR47/4	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta
B1.3-1E-62	Chlo8	11	2			EU434029.1	97	Stichococcus bacillaris strain SAG 335-3	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta
A3.3-1E-55	Chlo10	7	2	1	1	AB080310.1	98	Trebouxia erici	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
A3.3-1E-1	Chlo13	4			3	AF513369.1	95	Myrmecia sp. H1VF1	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
B1.4-1E-144	Chlo15	3		2		Z21551.1	98	T. impressa	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta
B1.4-1E-56	Chlo16	44	3	2	1	Z68705.1	98	T. arboricola (SAG 219-1a)	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta
B1.4-1E-119	Chlo18	1				Z21553	98	Trebouxia asymmetrica	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
RP2.6-1E-176	Chlo19	1	1	2		Z68705	98	T. arboricola (SAG_219_1a)	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
B1.7-1E-3	Chlo20			3	2	Z21553.1	98	T. asymmetrica	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
RP2.6-1E-186	Chlo21	5	11	72	29	Z68705	99	T. arboricola (SAG_219_1a)	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
B1.6-1E-109	Alve1	1	2	5		EF023975.1	98	Oxytrichidae environmental sample clone Amb_18S_1444	Eukaryota; Alveolata; Ciliophora
RP2.6-1E-73	Alve2			7	1	EF526759	94	Unc marine_eukaryote_NA2_2B12	Eukaryota; Alveolata; Ciliophora
RP1.5-1E-183	Amoe1			1		AY187083	99	Lycogala flavofuscum	Eukaryota; Amoebozoa; Mycetozoa
B1.7-1E-85	Amoe2			2	1	AY183449.1	94	Physarum didermoides	Eukaryota ; Amoebozoa; Mycetozoa

A3.1-1E-27	Meta1			28	4	EF091428.1	93	<i>Eriochthonius minutissimus</i>	Metazoa; Arthropoda; Chelicerata		
A3.1-1E-46	Meta2			1		AF287232	90	<i>Microcaeculus</i> sp. JCO-1999	Metazoa; Arthropoda; Chelicerata		
B1.7-1E-108	Meta3		1	1		EF620404.1	99	<i>Isophysibius prosoptomus</i> voucher Ip-Nlvaa-1	Metazoa; Tardigrada		
RP2.6-1E-6	Fun1			5		EF565163	92	<i>Blastocladiiales</i> sp. TJ_2007a	Eukaryota; Fungi; Blastocladiomycota; Blastocladiomycetes		
B1.4-1E-50	Fun2	2				AY635826.1	92	<i>Entophycitis helioformis</i> isolate AFTOL-ID 40	Eukaryota; Fungi; Chytridiomycota; Chytridiomycetes		
RP2.6-1E-99	Fun3		1	1		EF565163	92	<i>Blastocladiiales</i> sp. TJ_2007a	Eukaryota; Fungi; Blastocladiomycota; Blastocladiomycetes		
RP1.5-1E-156	Bas1		8			AB032627	99	<i>Cryptococcus dimenmae</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
RP1.5-1E-150	Bas2	1	1			FM178233	99	<i>Unc Tremellomycetes</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
B1.7-1E-116	Bas3	2	1	2		AB105437.1	98	<i>Cryptococcus carnescens</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
RP1.5-1E-30	Bas4		9			AB085800	99	<i>Cryptococcus</i> sp. CBS_2993	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
RP1.5-1E-192	Bas5		4			AB032654	99	<i>Cryptococcus vishniacii</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
RP1.5-1E-141	Bas6		25			D13460	99	<i>Fiobasidium floriforme</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
RP1.5-1E-52	Bas7		1			D78330	97	<i>Bullera unica</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
B1.4-1E-126	Bas8	2	2			AB030354.1	98	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
RP1.5-1E-3	Bas9		11	2		AB126645	97	<i>Rhodotorula marina</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
RP1.5-1E-129	Bas10		21			D66880	98	<i>Sporobolomyces coprosmae</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
B1.3-1E-142	Bas11	2				AY707092.1	99	<i>Leucosporidium scottii</i> isolate AFTOL-ID 718	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
RP2.6-1E-113	Bas12		1			D64122	96	<i>Kurtzmanomyces nectairei</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
RP1.5-1E-130	Bas14	5	9			D13776	98	<i>Kondoa malvinella</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
B1.3-1E-143	Bas15	22	5			D13776.1	98	<i>Kondoa malvinella</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota		
A2.1a-1E-27	Asc1	1	4	26	5	5	21	AY779280.1	97	<i>Norrlinia peltigericola</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
A2.1a-1E-21	Asc2			1				AY779280.1	97	<i>Norrlinia peltigericola</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP2.6-1E-190	Asc3	1	2	4	14	1	1	Y11714	98	<i>C_perforans</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP2.6-1E-148	Asc4	1	1	1	2	1	1	FJ358319	97	<i>Chaetothyriales</i> sp. TRN1	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP1.5-1E-146	Asc5		12					AJ972863	96	<i>Contiosporium</i> sp. MA_4597	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP2.6-1E-124	Asc6		4	4				AJ972863	97	<i>Contiosporium</i> sp. MA_4597	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP2.6-1E-157	Asc7		7					AJ972863	97	<i>Contiosporium</i> sp. MA_4597	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
A2.4b-1E-13	Asc8		1				1	EF413618.1	93	<i>Cyphellophora laciniata</i> isolate AFTOL-ID	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP2.6-1E-146	Asc9	1	2	1				AJ972862	97	<i>Rhinodiadella</i> sp. MA_4765	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP2.6-1E-15	Asc10		1					Y11714	98	<i>C_perforans</i>	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
B1.6-1E-56	Asc11		1					AJ972862.1	98	<i>Rhinodiadella</i> sp. MA 4765	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
A3.3-1E-12	Asc12		4				4	AF242258.1	93	<i>Acrosperrum compressum</i> specimen-voucher UME 31704	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
A2.1a-1E-41	Asc13		21	1	2	17	3	DG678016.1	95	<i>Allemaria</i> sp. CBS 174.52	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota

RP1.5-1E-147	Asc16	4	1	U04238	99	Leptosphaeria maculans_Unity	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
A3.3-1E-13	Asc17	4	4	AB454217	99	Phoma macrostoma var. macrostoma	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
B1.3-1E-55	Asc18	21	4	FJ176844.1	97	Pleosporales sp. CBS 536.93 isolate AFTOL-ID 5009	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
A2.4b-1E-30	Asc19	5	15	EF532930.1	96	Phoma sp. RMF1	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP1.5-1E-25	Asc20	3	7	EU682927	96	Aureobasidium pullulans_P2A1	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
B1.6-1E-95	Asc22	33	97	AF241542.1	97	Physcia alipolia	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
B1.6-1E-116	Asc23	4	98	AM498768.1	98	Xanthoria candelaria	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP2.6-1E-27	Asc24	1	99	AM495020	99	Xanthoria soriediata	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
B1.7-1E-96	Asc25	59	2	AM498768.1	99	Xanthoria candelaria	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
B1.4-1E-57	Asc27	9	95	AF091589.1	95	Lecania cyrtella	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP2.6-1E-173	Asc28	7	98	DO066714	98	Cryomyces mineri_CBS_116302	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
A2.2a-1E-51	Asc29	2	1	EU343113	99	Davidiella tassiana clone 104ssu-11	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP1.5-1E-47	Asc30	2	2	EU343025	98	Teratosphaeria microspora_36i	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
A3.1-1E-6	Asc31	7	1	EU167605.1	98	Mycosphaerella fragariae strain CBS 719.84	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
B1.3-1E-65	Asc32	1	97	AY840527.2	97	Cercospora beticola strain CBS 116456	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP1.5-1E-42	Asc33	2	98	AM746202	98	Capnobotryella sp. MA_3612	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP2.6-1E-122	Asc34	2	99	AM746203	99	Capnobotryella sp. MA_3615	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
RP1.5-1E-15	Asc35	3	1	AJ972856	99	Capnobotryella sp. MA_4701	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
A3.3-1E-3	Asc36	17	2	AB015778.1	96	Pseudogymnoascus roseus	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota

## Annexe IV.2.1. Table des OTUs bactériens identifiés dans l'article 2

Sequence	OTUs	Chernobyl			Acc. Number	% identity	First hit blast	Phylogenetic ascription
		Cher2	Cher4	Cher6				
cher6-2B-74-1345	Alpha1			3	AY315166	98	Glacier bacterium_FXS25	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
cher6-2B-37-1398bp	Alpha2	1	1	3	AB500945	99	Methylobacterium sp_GSL_1	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
cher4-1B-11-2109bp	Alpha3		4		AJ244710.1	94	Brevundimonas sp_V4.BP.05	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteriales
cher6-1B-3-1883bp	Alpha4			1	AF538712.1	89	Roseomonas mucosa strain MDA5527	Bacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
cher6-1B-5	Alpha5	2	1	1	AF537332.1	97	Roseomonas sp_SAFR-014	Bacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
cher6-1B-17	Alpha6	1	7	12	AF408324.1	96	Uncultured Acetobacteraceae bacterium clone KL-2-4-8	Bacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
cher6-2B-108-1421	Alpha7		20		EF368368	99	Roseomonas vinaceus_CPCC_100056	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
cher6-2B-122-1448bp	Alpha8	1	1	11	FJ834325	98	Sphingomonas sp_BH3	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
cher6-2B-131-1380	Alpha9		3		AF409011	82	Sphingomonas sp_Ellin169	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
cher4-1B-7	Alpha10	13			CP000699.1	98	Sphingomonas wittichii RW1	Bacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
cher6-2B-115-1447bp	Alpha11		2		EU423301	98	Sphingomonas sp_BXN7_9	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
cher4-2B-69	Alpha12	12			EU379242.1	98	Paracraurococcus sp_1N-11	Bacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
cher2-1B-19	Alpha13	1	2		AB208552.1		Roseomonas aquatica	Bacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
cher4-1B-41	Alpha14	1	2		AF537332.1		Sphingomonas sp_BF14	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
cher6-1B-37	Alpha15		2		AF408325.1	98	Uncultured Sphingomonadaceae bacterium clone KL-2-4-1	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
cher4-2B-96	Beta1	3	1		AF523042.1	96	Uncultured Aquabacterium sp. clone B-14	Betaproteobacteria; Burkholderiales
cher2-1B-9	Beta2	9	1		CP000269.1	93	Janthinobacterium sp. Marseille	Betaproteobacteria; Burkholderiales
cher4-2B-41	Beta3	2	9		AY167838.1	99	Janthinobacterium agaricidammosum strain SAFR-022	Betaproteobacteria; Burkholderiales
cher4-2B-42-1444bp	Delta1		7		AY996823.1	93	Nannocystis sp_91213	Deltaproteobacteria; Myxococcales
cher6-2B-78-1414	Acido1		23		AY234727	99	Unc Acidobacteria_bacterium_500M1_C7	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
cher4-1B-20	Acido2	7			DO532358.1	94	Uncultured Acidobacteria bacterium clone 100M1_A10	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
cher4-2B-81	Acido3	13			AY571792.1	97	Uncultured Acidobacteria bacterium clone 351B	Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales
cher2-2B-26-1386bp	Deino1	5	8	1	DO386015.1	99	Uncultured Deinococcus sp. clone J34H5	Bacteria; Deinococcus-Thermus; Deinococci
cher4-1B-16	Bac1	3			DO010158.1	97	Uncultured bacterium clone F001_F8, then Flavisolibacter ginsengiterrae	Bacteria; Bacteroidetes; Flavisolibacter
cher4-2B-83	Bac2	1			DO483725.2	88	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone TK-NE7	Bacteria; Bacteroidetes
cher4-1B-4	Bac3	5	1		DO010158.1	87	Uncultured bacterium clone F001_F8, then Flavisolibacter ginsengiterrae	Bacteria; Bacteroidetes; Flavisolibacter
cher4-1B-19	Bac4	1	2		CP000383.1		Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
cher6-1B-40-1763bp	Bac5	1	3		EE683048.1	94	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone F27_4H_FL	Bacteria; Bacteroidetes
cher6-1B-11-1745bp	Bac6		11		DO980929.2	95	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone F27_4H_FL	Bacteria; Bacteroidetes

cher4-1B-45	Bac7	7			Y18837.1	94	Taxeobacter sp. Txc1	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
cher6-1B-13-1433bp	Bac8	2			AF408273.1	94	Uncultured Hymenobacter group bacterium clone KL-2-5-13	Bacteria; Bacteroidetes; Flaviscilbacter
cher4-2B-37-1395bp	Bac9	9	3		Y18837.1	98	Hymenobacter chitiniivorans	Bacteria; Bacteroidetes; Flaviscilbacter
cher6-2B-109-1378bp	Bac10	1	46		EU379243	97	Taxeobacter sp. TN_12	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia
cher2-1B-16	Actino1	7	1		J65647.1	93	Rubrobacter radiotolerans	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae
cher4-2B-47-1456bp	Actino2	3			AY571811.1	94	Uncultured Rubrobacter sp. clone 354H	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae
cher2-2B-30	Actino3	36	21	63	EF016819.1	96	Uncultured actinobacterium clone E1B-E12-114	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae
cher4-1B-26	Actino4	1			AJ316572.1	86	Blastococcus sp. BC517	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae
cher4-2B-93	Actino5	4	1		FJ817377.1	98	Pseudonocardia sp. YIM 63158	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae
cher6-2B-67-1430	Actino6		2		EU180664	99	Marmoricola sp. BAC242	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae
cher2-2B-29	Actino7	4	1		EF016815.1	98	Uncultured actinobacterium clone E1B-D1-114	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae
cher2-1B-25	Actino8	1			DO493441.1	82	Uncultured bacterium clone TWE34, then Nocardia farcinica IFM 10152	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae
cher6-2B-121-1492	Actino9		7		DO029102	99	Actinotelluria brasiliensis_Tu6233	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae
cher4-2B-90	Cya1	3			AJ133164.1	94	Calothrix sp. PCC 7714	Bacteria; Cyanobacteria; Nostocales
cher4-2B-40	Verru1	2			DO450787.1	89	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone E12_WMSP1	Bacteria; Verrucomicrobia
cher4-2B-61		2			EU979098.1	93	Uncultured planctomycete clone g89	Bacteria; Planctomycetes



## Annexe IV.2.2. Table des OTUs eucaryotes identifiés dans l'article 2

Sequence	OTUs				Chernobyl	Acc. Number	% id	First Hit Blast	Phylogenetic ascription
	Cher2	Cher4	Cher6	Cher8					
cher2-1E-99	Asc1	21	61	49	AM746203.1	98	Capnobotryella sp. MA 3615	Fungi; Dikarya; Ascomycota	
cher4-1E-95	Asc2	3			AF242265.1	98	Melanomma sanguinarum strain UPSC 1924	Fungi; Dikarya; Ascomycota	
cher4-1E-113	Asc3	5	9	13	AY016350.1	99	Pleomassaria siparia	Fungi; Dikarya; Ascomycota	
cher2-1E-55	Asc4	2			DQ678017.1	98	Lophiostoma crenatum isolate AFTOL-ID 1581	Fungi; Dikarya; Ascomycota	
cher2-1E-90	Asc5	11			AB454203.1	97	Phoma destructiva	Fungi; Dikarya; Ascomycota	
cher2-1E-102	Asc6	4	1	11	GQ354822.1	98	Alternaria japonica_HDJZ_ZWIM_06	Fungi; Dikarya; Ascomycota	
cher2-1E-129	Asc7	7			AJ972809.2	97	Sarcinomyces sp. MA 4760	Fungi; Dikarya; Ascomycota	
cher2-1E-59	Asc8	5	3	11	AF241541	98	Xanthoria parietina	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota	
cher2-1E-74	Asc9	5	22	1	EF689864.1	98	Verrucaria canella isolate AFTOL-ID 2292	Fungi; Dikarya; Ascomycota	
cher2-1E-113	Asc10	1	5	5	FJ358324.1	98	Chaetothyriales sp. TRN115	Fungi; Dikarya; Ascomycota	
B1.6-1E-143	Asc11				AM498768.1	96	Xanthoria candelaria	Fungi; Dikarya; Ascomycota	
cher4-1E-59	Bas1	2	1	1	DQ354510.1	98	Uromyces appendiculatus isolate AFTOL-ID 976	Fungi; Dikarya; Basidiomycota	
cher4-1E-53	Bas2	3			D64122.1	93	Kurtzmanomyces nectairei	Fungi; Dikarya; Basidiomycota	
cher4-1E-101	Chytr1	1			DQ322624.1	95	Olpidium brassicae isolate AFTOL-ID 633	Fungi; Chytridiomycota; Chytridiomycetes	
cher4-1E-68	Chytr2	1			AF164251	95	Rhizophlyctis sp.	Fungi; Chytridiomycota; Chytridiomycetes	
cher2-1E-98	Chlo1	6	1		DQ275460.1	90	Stichococcus deasonii strain UTJEX 1706	Viridiplantae; Chlorophyta	
cher6-1E-140	Chlo2	1	3	17	Z21551.1	98	T. impressa	Viridiplantae; Chlorophyta	
cher2-1E-115	Chlo3	25	7	12	Z68705.1	98	T. arboicola (SAG 219-1a)	Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae	
cher4-1E-61	Alveo1	6			EF024878.1	97	Oxytrichidae environmental sample clone Elev_18S_1404	Alveolata; Ciliophora	
cher4-1E-122	Alveo2	11			EU039885.1	98	Bresslauides discoideus	Alveolata; Ciliophora	
cher4-1E-77	Alveo3	4			EU039893.1	97	Colpoda cucullus	Alveolata; Ciliophora	
cher4-1E-56	Alveo4	3			AF401524.1	90	Campanella umbellaria	Alveolata; Ciliophora	
cher4-1E-58	Amoe1	2			EF378674.1	97	Hartmannella sp. T5-4	Amoebozoa; Tubulinea	
cher4-1E-97	Meta1	3			EF632497.1	96	Milnesium sp. CJS-2007a isolate MinT_056	Metazoa; Tardigrada	
cher4-1E-142	Meta2	3			GQ398061.1	98	Adineta vaga	Metazoa; Rotifera	

### Annexe IV.3.1. Table des OTUs bactériens identifiés dans l'article 3

Sequence	OTUs	Ballyclare			Servas			Aubervilliers			Acc. Number	% id	First Hit Blast	Phylogenetic ascription
		B10	B12	B24	S12	S24	SG12	SG24	SG12	SG24				
SH12-2-1C-45	Bact1				17	1				HM016164.1	97	Hymenobacter sp. HMD1010	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia	
SGT24-2-1C-1	Bact3					1		1		EU155013.1	97	Hymenobacter sp. VUG-A60a	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia	
ST24-2D-1C-47	Bact4						1			AF408274.1	99	Uncultured Hymenobacter sp. clone KL-2-4-2	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia	
SH12-2-1B-134	Bact5				15					HM839113.1	97	Uncultured bacterium clone nbj644a11c1	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia	
SH12-2-1B-77	Bact6				11	34				AF408273.1	96	Uncultured Hymenobacter group bacterium clone KL-2-5-13	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia	
ST12-2-2B-85	Bact7				13	21				HM839113.1	98	Uncultured bacterium clone nbj644a11c1	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia	
ST24-2-1B-98	Bact8				15	17				AF408273.1	97	Uncultured Hymenobacter group bacterium clone KL-2-5-13	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia	
BH12-2-1B-16	Bact9		2							HM032897.1	97	Hymenobacter sp. A2-50A	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia	
BT24-2-1B-45	Bact10			2	5	1	6	4		EF683042.1	98	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone F15_5A_FL	Bacteria; Bacteroidetes	
B16-5-4B-26	Bact11	11								EF423320.1	96	Hymenobacter sp. 1004	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia	
SH12-2-1B-4	Bact12				4	3				FR682731.1	97	Hymenobacter sp. R-36548	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia	
ST24-2-1B-44	Bact13				1	1				HM241115.1	98	Uncultured Hymenobacter sp. clone LIM57	Bacteria; Bacteroidetes; Cytophagia	
SGT24-2-1B-85	Bact14						4			JF778715.1	95	Mucilaginibacter sp. HRB31	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria	
SGT24-2-1B-61	Bact15						5			AE267171.1	95	Mucilaginibacter daejeonensis	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria	
SGT24-2-1B-3	Bact16						40			HQ449706.1	97	Mucilaginibacter sp. HME6837	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria	
B16-5-4B-39	Bact17	4	1							GU930757.1	96	Flavobacteriaceae bacterium PS40(2010) strain PS40	Bacteria; Bacteroidetes; Flavobacteria	
SGT24-2-2B-48	Bact18						2			AY436806.1	95	Bacteroidetes bacterium RD4.3	Bacteria; Bacteroidetes	
B10-5-4B-13	Bact19	6								EU182856.1	99	Chryseobacterium sp. MH28	Bacteria; Bacteroidetes; Flavobacteria	
SGT12_2_1B_31	Bact21							1		HQ111170.1	89	Uncultured <i>Fluviicola</i> sp. clone cuticle_2.22	Bacteria; Bacteroidetes; Flavobacteria	
SGT24-2-1C-29	Cya1	2	20			9		23		AF132779	98	<i>Calothrix desertica</i> PCC7103	Bacteria; Cyanobacteria; nostocales	
SH12-2-1C-42	Cya2				8	5		21		HM224428.1	99	Uncultured cyanobacterium clone DOL63	Bacteria; Cyanobacteria; pleurocapsales	
BT24-2-1C-4	Cya3			11		3				HM224428.1	96	Uncultured cyanobacterium clone DOL63	Bacteria; Cyanobacteria; pleurocapsales	
ST24-2-1C-39	Cya4					3				EU409853.1	95	Uncultured cyanobacterium clone 16L33	Bacteria; Cyanobacteria; pleurocapsales	
SGT12-2-1B-71	Cya5						10			EU753646.1	97	Uncultured cyanobacterium clone D1E09	Bacteria; Cyanobacteria; Nostocales	
SGT24-2-1C-28	Cya6			6				14		FN811217.1	99	Uncultured cyanobacterium UMAB c63	Bacteria; Cyanobacteria; pleurocapsales	
SH12-2-1C-34	Cya7				8					GG116273.1	98	Uncultured bacterium clone nbw690d10c1	Bacteria; Cyanobacteria; Pleurocapsales	
SH12_2_1C_16	Cya8				1					JF733406.1	97	Uncultured Cyanobacterium sp. clone LI08st2	Bacteria; Cyanobacteria	
ST24-2-1C-10	Cya9				1	25				HQ595208.1	99	Uncultured cyanobacterium clone IC3040	Bacteria; Cyanobacteria; Pleurocapsales	
ST12-2-2B-23	Dei1				1	2				DQ366015.1	97	Uncultured <i>Deinococcus</i> sp. clone J34H5	Bacteria; Deinococcus-Thermus; Deinococci	
SGT24-2D-1B-45	Fir1						12			AJ644784.1	99	<i>Bacillus</i> sp. IDA3504	Bacteria; Firmicutes; Bacillales	
BT24-2-1B-1	Fir2			3						AM420176.1	99	Uncultured <i>Abiotrophia</i> sp.	Bacteria; Firmicutes	
SGT12-2-1B-53	Fir3							1		EU868880.1	99	<i>Marinococcus halophilus</i> strain M14-5	Bacteria; Firmicutes; Bacillales	
ST24-2-1B-11	Act1						2			AB245336.1	96	<i>Solirubrobacter</i> sp. Gsoil 921	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae	
ST24-2C-1B-59	Act2		1		6	1				FJ790557.1	98	Uncultured bacterium clone VB36	Bacteria; Actinobacteria	
ST12-2-2B-81	Act3		1	71	10	6		2		DQ366005.1	98	Uncultured actinobacterium	Bacteria; Actinobacteria	
ST24-2-1B-120	Act4			28	5	1				EF016818.1	96	Uncultured actinobacterium clone E1B-D5-114	Bacteria; Actinobacteria	
ST12-2-2B-39	Act5			3	4	1		2		EF016811.1	97	Uncultured actinobacterium clone E1B-C10-114	Bacteria; Actinobacteria	
SGT24-2-2B-19	Act6			10		4		16		EF016798.1	98	Uncultured actinobacterium clone E1B-AA-114	Bacteria; Actinobacteria	
ST12-2-2B-125	Act7			1	6	31				FR682686.1	98	<i>Modestobacter</i> sp. R-36506	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae	
SGT24-2-2B-56	Act8			2				3		FM992787.1	99	<i>Blastococcus</i> sp. M71_S80	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae	

B16-5-1B-22	Act9	4							FR691396.1	97	Actinobacterium R-38315	Bacteria; Actinobacteria
BT24-2D-1B-76	Act10		2						AM940948.1	99	Subtercola sp. FB10	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae
BT24-2-1B-112	Act11		2						AM944034.1	99	Frigoribacterium sp. R-25593	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales
SGT12-2-1B-68	Act12		2		4	1			FR667186.1	99	Arthrobacter sp. ITT16	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae
ST12-2-2B-106	Act13			1	2				FU180564.1	99	Marmotocila sp. BAC242	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae
B16-5-4B-42	Gamma1	2							FJ937924.1	96	Pseudomonas sp. LS197	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria
B10-5-4B-22	Gamma3	5	7						FN377702.1	99	Enhydrobacter sp. KB3-12	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria
B10-5-4B-15	Gamma4	3	4						FN386747.1	99	Enhydrobacter aerossacus	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria
B16-5-4B-9	Gamma5	1	1						HM629335.1	94	Acinetobacter sp. YC-X2	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria
B16-5-4B-27	Gamma6	1	2						AJ293690.2	99	Acinetobacter sp. phenon 4	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria
B16-5-2B-26	Gamma7	11	23						AM913961.1	99	Pseudomonas sp. LD126	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria
B16_5_4B_1	Gamma8	1							JF202816.1	89	Uncultured bacterium clone ncd2505a09c1	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria
ST12-2-1B-43	Alpha1		4	3		11			HM241119.1	97	Uncultured Sphingomonas sp. clone LIM106	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
ST24-2-1B-9	Alpha2			1		2			FJ834325.1	98	Sphingomonas sp. BH3	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
SH12-2-1B-21	Alpha3		2	2	1				FR691420.1	99	Sphingomonas aerolais	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
BT24-2D-1B-34	Alpha4		2	2					FM865678.1	99	Uncultured Sphingomonas sp.	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
BT24-2-1B-123	Alpha5		1						HQ256859.1	100	Sphingomonas sp. PDD-32b-61	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
BT24-2-1B-16	Alpha6		12	11	13	4			GO129915.1	99	Uncultured Sphingomonas sp. clone G18-sp-E19	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
SGT24-2D-1B-93	Alpha7					1			AB220131.1	99	Sphingomonadaceae bacterium PB251	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
BT24-2-1B-6	Alpha8		2						GU980234.1	96	Sphingomonas sp. CCGE4118	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
SGT24-2D-1B-13	Alpha10					2			FJ560597.1	94	Rhizobium sp. LXD30	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
ST24-2-1B-70	Alpha11			1					AB600133.1	98	Aurantimonas sp. AU12	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
ST12-2-1B-2/113	Alpha12		2	1	9	6	2	12	FN868944.1	99	Methylobacterium sp. 256	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
SG24-2-2B-59	Alpha13					1			FN868944.1	95	Methylobacterium sp. 256	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
ST24-2-1B-23	Alpha14		1	2	7	4	2	8	EF174497.1	98	Methylobacterium iners strain 5317S-33	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
BT12-2-1B-20	Alpha15		12					2	FR733886.1	99	Methylobacterium sp. C44	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
BT24-2-1B-74	Alpha16		3						HQ674790.1	99	Uncultured Methylobacterium sp. clone LWM1-44	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
BT24-2-1B-114	Alpha17		1						HQ425319.1	98	Paracoccus sp. M1-21-1	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodocyclales
ST12-2-2B-128	Alpha19				2				HM474794.1	98	Devosia sp. Cr4-44	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
BT24-2-1B-121	Alpha20		2						AB473919.1	98	Uncultured endolithic bacterium	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria
B10-5-4B-3	Alpha21	1							FM865682.1	99	Uncultured Brevundimonas sp.	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales
SH12-2-1B-40	Alpha22		1	2	1				HQ588841.1	99	Roseomonas sp. BZ31r	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
ST24-2D-1B-155	Alpha23		2	2	2	1			HM204475.1	99	Roseomonas sp. T104-41	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
ST24-2C-1B-7	Alpha24				3				AM231597.1	98	Roseomonas aquatica	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales
B24-2-1B-32	Alpha25		1	1					HQ256841	99	Sphingomonas PDD 32b 4	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales
ST12-2-1B-22	Beta1		4	8	3	5	19		GG861460.1	99	Variovorax sp. LZA10	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales
BH12-2d-B44	Beta2	1	39	5	18	2	41	4	CP000884.1	99	Delftia acidovorans SPH-1	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales
BT24-2D-1B-87	Beta3							6	HQ418458.1	98	Uncultured Alcaligenaceae bacterium clone 58_4c7	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales
SH12-2-1B-76	Beta4			3	1				AY237409.1	97	Beta proteobacterium HUJ12	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
SGT12-2-1B-43	Beta5					4			FR691425.1	97	Beta proteobacterium R-37018	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
SH12-2-1B-30	Beta6		5						GO129875.1	98	Uncultured Herbaspirillum sp. clone G18-sp-C04	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales
ST12-2-2B-110	Beta7		5						FN386763.1	99	Herbaspirillum sp. Sco-D19	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales
SH12-2-1B-73	Beta8		7	1	1	1			GU295961.1	99	Oxalicibacterium sp. JCN-21	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales
SGT12-2D-1B-58	Beta9		3						GO379228.1	96	Undibacterium sp. EM 1	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales
ST24-2C-1B-26	Beta10				7				FN386763.1	97	Herbaspirillum sp. Sco-D19	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales
SH12_2_1B_6	Beta12					1			FU977743.1	99	Herbaspirillum sp. 1P04PB	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales

### Annexe IV.3.2. Table des OTUs eucaryotes identifiés dans l'article 3

Sequence	OTUs		Ballyclaire		Servas		Aubervilliers		Acc. Number	% id	First Hit Blast	Taxonomic affiliation
	Bt0	Bt6	Bt12	Bt24	St12	St24	SG12	SG24				
SGT24-2-E-25				1				1	<a href="#">GU250354.1</a>	99	Ascomycota sp. CCFEE 5493	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
SGT24-2-E-37							5	5	<a href="#">EF137364.1</a>	99	Knufia cryptohalidica strain DAOM 216555	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
BT12-2-1E-81		1	4						<a href="#">EF137365.1</a>	99	Coniosporium perforans strain CBS 885.95	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
Bt6-5-1E-39		2							<a href="#">FJ358318.1</a>	96	Sarcinomyces petricola isolate CBS 101157	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
BT12-2-1E-115		2	13	6	2	1	6	5	<a href="#">FJ716247.1</a>	99	Cladosporium sp. 7F	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
BT24-2-1E-36		1	4	6		5			<a href="#">GU214691.1</a>	99	Mycosphaerella fragariae strain CPC 4903	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
Bt12-2-1E-3			18	11		11		1	<a href="#">GU214699.1</a>	99	Septoria dysentericae strain CPC 12328	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
Bt12-2-1E-7/47			3					1	<a href="#">EU707932.1</a>	99	Aureobasidium pullulans strain DSM 3042	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
ST12-2-1E-83					2			2	<a href="#">HM165489.1</a>	98	Alternaria alternata strain S-f6	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
SGT24-2-E-84		1					3	3	<a href="#">AF212309.2</a>	99	Embellisia sp. DAR 74619	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
BT12-2D-1E-128		14	6	27	1	3	1	2	<a href="#">AY741066.1</a>	99	Phaeosphaeria anchialia strain 5552A	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
SGT24-2-E-31					1			3	<a href="#">AF250825.1</a>	100	Neophaeosphaeria filamentosa	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
ST12-2-1E-63		4	9	1	4	6			<a href="#">FJ744122.1</a>	99	Phaeosphaeriaceae sp. 11F	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
Bt12-2d-1E-24		2	1						<a href="#">EU167570.1</a>	98	Didymella phacae strain CBS 184.55	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota
BT12-2-1E-62			7						<a href="#">DQ234543.1</a>	99	Bensingtonia yuccicola isolate AFTOL-ID 857	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota
SGT12-2-E-33		1	1	13	13		15	15	<a href="#">DQ234543.1</a>	99	Bensingtonia yuccicola isolate AFTOL-ID 857	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota
ST12-2-1E-129		7	39	123	27	33	5	15	<a href="#">DQ234543.1</a>	99	Bensingtonia yuccicola isolate AFTOL-ID 857	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota
SGT24-2D-2E-5		1			5		8	2	<a href="#">AB126645.1</a>	99	Rhodotorula marina	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota
BT24-2-1E-64				1					<a href="#">AB021671.1</a>	99	Sporobolomyces follicola	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota
BT12-2D-1E-98		1	2		12	1	19	6	<a href="#">AB021671.1</a>	99	Sporobolomyces follicola	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota
ST24-2D-1E-183			1	1	13	12	7	6	<a href="#">AB030322.1</a>	99	Sporobolomyces vermiculatus	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota
Bt12-2-1E-16		2	2						<a href="#">AB105437.1</a>	98	Cryptococcus carnescens	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota
Bt12-2-1E-25/37		2	2		1				<a href="#">EU517066.1</a>	99	Dioszegia frisingensis strain AS 2.3763	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota
BT12-2-1E-95		1	1					3	<a href="#">AB030354.1</a>	99	Rhodotorula aurantiaca	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota
ST12-2-1E-67					1				<a href="#">AY657013.1</a>	93	Rhodotorula hordea isolate AFTOL-ID 674	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota
SGT24-2-E-35		1	1		15	14		15	<a href="#">AB126645.1</a>	94	Rhodotorula marina	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota

B16-5-1E-49	Bas15	1			DQ234543.1	92	Bensingtonia yuccicola isolate AFTOL-ID 857	Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota
ST12-2-1E-115	Chlo1	3	15		FM946021.1	99	Chlorella angustoeilipsoidea	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
ST12-2-1E-122	Chlo2	9	61		AB006047.1	99	Chlorella angustoeilipsoidea	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
BT12-2-1E-68	Chlo3	1	3		AB056305.1	99	Chlorella sp. MBIC10057	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
BT12-2-1E-126	Chlo4	2	1	1	Z21551.1	99	T.impressa	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
S12-2-1E-23	Chlo5	1	2		Z21551.1	91	T.impressa	Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Trebouxiophyceae
S24-2-1E-10	Alveo1		1	1	AF060452	96	Pseudoplatyophrya nana	Eukaryota; Alveolata; Ciliophora
S24-2-1E-15	Meta1		1		AJ566092	99	Mysidium columbiae	Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Crustacea
SGT24-2-2E-63	Meta2	1			EU003189	99	Parasitohabditis obtusa_18S	Eukaryota; Metazoa; Nematoda; Chromadorea