



HAL
open science

Les métabolismes oxydatifs extracellulaires : une nouvelle vision des processus de minéralisation du carbone organique du sol

Benoît Keraval

► To cite this version:

Benoît Keraval. Les métabolismes oxydatifs extracellulaires : une nouvelle vision des processus de minéralisation du carbone organique du sol. Biodiversité et Ecologie. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2016. Français. NNT : 2016CLF22740 . tel-01882691v1

HAL Id: tel-01882691

<https://theses.hal.science/tel-01882691v1>

Submitted on 27 Sep 2018 (v1), last revised 5 Nov 2018 (v2)

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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

UNIVERSITE D'AUVERGNE

N° D.U. : 2740

Année : 2016

**Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et
Environnement**

N° d'ordre : 700

THESE

Présentée à l'Université Blaise Pascal en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Ecologie

Soutenue le : 20 octobre 2016

Benoît KERAVAL

**Les métabolismes oxydatifs extracellulaires : une nouvelle
vision des processus de minéralisation du carbone
organique du sol**

sous la direction de M. Christian Amblard

Composition du jury :

AMBLARD CHRISTIAN	Directeur de Recherche, CNRS, Clermont-Ferrand
BALESDENT JEROME	Directeur de Recherche, INRA, Aix en Provence (Rapporteur)
FONTAINE SEBASTIEN	Chargé de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand
QUIQUAMPOIX HERVE	Directeur de Recherche, INRA, Montpellier (Rapporteur)
LEHOURS A-CATHERINE	Maitre de Conférences, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand
MAIRE VINCENT	Professeur, Université du Québec, Trois-Rivières (Examinateur)

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement

UMR CNRS 6023

Université Blaise Pascal

Unité de Recherche sur l'écosystème prairial

UR INRA 874

Remerciements :

Comme vous le verrez dans la suite de ce manuscrit, on représente classiquement le fonctionnement des cycles biogéochimiques des éléments avec des compartiments reliés les uns aux autres par des flux supportés par différents processus. Cette même représentation peut être utilisée pour décrire le fonctionnement d'un projet. Dans mon cas, le bon déroulement de mon projet de thèse n'a été rendu possible que parce que j'ai eu la chance d'être entouré de précieux catalyseurs ayant fait le lien entre les différents compartiments de ce projet. Vous l'aurez compris, ces catalyseurs sont : mes encadrants, mes collègues, mes examinateurs, mes amis et ma famille.

Dans ce chapitre je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse et pour la belle discussion que nous avons eu lors de ma soutenance.

Je remercie Téléphore Sime-Ngando et Pascal Carrère pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires (le LMGE et l'UREP, respectivement). Je remercie Jean-Marc Lobaccaro pour m'avoir accepté au sein de l'école doctorale SVSAE et pour son implication auprès des doctorants de cette école.

Je remercie profondément mes encadrants et amis, Anne-Catherine Lehours, Sébastien Fontaine et Christian Amblard sans qui cette thèse n'aurait jamais été aussi aboutie. Je tiens aussi à remercier Gaël Alvarez dans ce paragraphe car même s'il n'a pas été officiellement considéré comme un de mes encadrants, je peux lui assurer que je l'ai considéré en tant que tel durant toutes ces années. A tous les quatre, je vous remercie de m'avoir attribué votre confiance pour développer ce sujet, pour tous vos conseils avisés sur la construction de ce projet et pour m'avoir laissé libre des orientations que je voulais donner à la recherche sur l'EXOMET. Je vous remercie du temps que vous m'avez accordé afin de me transmettre vos connaissances (qu'elles soient théoriques ou pratiques) et pour m'avoir appris à construire efficacement un projet scientifique et à rédiger correctement mes articles. Outre ces remerciements visant vos qualités professionnelles, je tenais à vous remercier pour votre humanisme, votre capacité d'écoute, votre joie de vivre et pour ce petit brin de folie qui vous anime ; des qualités qui ont fortement contribué au bon déroulement de cette thèse et à notre bonne entente. A nous cinq nous avons construit une superbe équipe qui nous a permis de bien nous amuser sur l'EXOMET et j'espère qu'elle nous permettra de nous amuser ensemble encore pendant longtemps. Merci sincèrement à tous les quatre.

Je tiens à remercier Anne-Hélène Lejeune, Anne-Catherine (encore une fois) et les enseignants du master MGEB (particulièrement Catherine Texier) pour m'avoir accordé leur confiance durant mes années de master. Je sais pertinemment que tout ça n'aurait pas été possible sans votre soutien.

Je remercie toutes les personnes du LMGE et de l'UREP qui ont fait en sorte que chaque journée passée aux laboratoires soit unique et remplie de bons moments. Je remercie particulièrement mes chers amis doctorants avec qui nous avons partagé des moments de joie et de tristesse, des périodes de grande lassitude comme d'enthousiasme : Johan Panek, Stephanie Palesse, Pauline Hernandez, Louis Carles, Jérémy Pessiot, Pierre Joly et Damien Herfurth. Je remercie aussi Raphael Martin et Julien Potier pour m'avoir bien aidé sur les traitements de données de modélisation et de statistique. Je remercie Sandrine Revaillet et Laurence Andanson pour leur aide dans mes expériences. Je remercie Jonathan Colombet avec qui nous avons passé de belles heures à solidifier, à découper et à observer du sol (il existe des trucs plus

solides que le diamant dans le sol de Theix mon Jo !!). Je remercie la participation des stagiaires qui ont travaillé avec motivation et persévérance sur l'EXOMET : Sabrina Chaibi, Maeva Richeux et Audrey Lallement. Je remercie aussi Yvette Dumas, Nathalie Fruquière, Brigitte Chebance, Laurence Benedit et Annick Oudin pour avoir rendu les corvées administratives bien plus simples à gérer. Dans ce paragraphe je tiens aussi à remercier et à encourager mes amis en thèse qui soutiennent leur projet avec toute leur énergie : Benjamin Legrand, Florent Rossi, Laurianne Paris, Iris Lochon et Camille Cros.

J'utiliserai ce paragraphe pour remercier mes amis. Mes petits loups, je m'excuse par avance mais je ne développerai pas plus ces remerciements. Je m'explique, j'estime avoir établi des relations particulières avec chacun d'entre vous, il me serait donc impossible de résumer en quelques lignes les raisons de mes remerciements à votre égard. Cependant, je suis persuadé que vous savez tous à quel point votre amitié m'est chère et à quel point je suis heureux de vous compter dans mon entourage. Je remercie ici Mélanie Gerphagnon (ma très chère amie et coloc du côté Bat), la famille Douds (Frédéric Breysse, Kristell Combe et leur fille Charlotte), Caroline Juery, Kristell Crenn, Vincent Lesniak, Vincent Brasquies, Quentin Rivard, Guillaume Borrel, Julio Arce, Sophie Gédéon, Marielle Curtelin, Dylan Barclay, Natacha Griffaut, Thomas Douellou, David Royer, Michael Boisnoir, Mathilde Rabet, François Enault, Clarisse Mallet, Cyril Jousse, Alexandre Bec, Fanny Perriere, Marion Sabart, Joan Artigas, Nicolas Blot, Mathieu Roudel, Isabelle Mary, Leslie Meyer et Esther Legrand. Merci pour votre présence et votre soutien.

*J'attribue mes dernières lignes de remerciements aux personnes qui me sont le plus chères au monde, les personnes avec qui j'ai évolué et avec qui j'ai partagé ma vie depuis ma plus tendre enfance, ces mêmes personnes qui m'ont constamment soutenu, qui m'ont apporté tant d'amour, qui m'ont permis de me construire et qui m'ont permis de devenir ce que je suis aujourd'hui : mes parents (**Nelly et Alain**), mon grand frère et sa famille (**Yannick, Anne Sophie et leur magnifique fille Solenn**) ainsi que mes petites sœurs (**Anaïs et Aurélie**).*

Pour conclure, je citerai le titre du magnifique calendrier photos que vous m'avez offert : « Le premier jour du reste de ta vie » (film de Rémi Bezançon). Un titre qui peut être accueilli avec une certaine appréhension pour certains, avec espoir pour d'autres. Personnellement, je me lance dans cet avenir sans beaucoup d'appréhensions et avec beaucoup d'enthousiasme car je sais que je vais le construire à vos côtés. Encore une fois, merci à tous.

Benoit Kéralval

RESUME

Les sols représentent une réserve de carbone plus importante que celles de l'atmosphère et de la végétation terrestre combinées. Ce réservoir de carbone impacte directement les concentrations en CO₂ atmosphérique *via* le processus de minéralisation de la matière organique. Comprendre et prédire les flux de carbone dans le sol et entre le sol et l'atmosphère nécessite donc d'appréhender l'ensemble des processus soutenant la minéralisation de la matière organique dans le sol. Jusqu'en 2013, il était communément admis que la respiration par les microorganismes hétérotrophes du sol était la principale voie régulant la minéralisation de la matière organique dans ce compartiment. Cependant, suite à l'observation d'émissions de CO₂ par des sols stérilisés, l'hypothèse d'une voie de minéralisation de matière organique soutenue par des métabolismes oxydatifs extracellulaires (EXOMET) a été proposée.

Les travaux conduits au cours de cette thèse ont visé (i) à établir que les émissions de CO₂ dans des sols stérilisés étaient le fait de métabolismes extracellulaires, (ii) à vérifier le caractère cosmopolite de ce processus quelles que soient les conditions édaphiques (iii) à identifier des facteurs impliqués dans la régulation de l'EXOMET et (iv) à proposer une approche permettant de déterminer sa contribution aux émissions de CO₂ dans des sols vivants.

Les résultats obtenus soutiennent l'hypothèse de l'EXOMET et mettent en exergue que les métabolismes extracellulaires sont régulés par des facteurs et des lois physico-chimiques différentes de celles supportées par les organismes vivants. Les données acquises suggèrent également que l'expression de l'EXOMET pourrait avoir des conséquences importantes pour certains écosystèmes (*e.g.*, rhizosphère) et serait accentuée par les modifications de variables liées au changement climatique (*e.g.*, température, humidité). Compte tenu (i) des premières estimations de la contribution de l'EXOMET aux émissions de CO₂ par les sols, (ii) de son activité au sein de sols aux conditions physico-chimiques variables et (iii) de la potentielle universalité de ce processus tant en milieu terrestre qu'aquatique, il devient important de considérer le rôle de l'EXOMET dans nos futures représentations des cycles biogéochimiques.

Les données présentées dans ce manuscrit, contribuent significativement à la connaissance et à la compréhension de l'EXOMET et de son rôle dans les cycles biogéochimiques. Ils soulignent également qu'un travail conséquent reste à mener pour appréhender les mécanismes sous tendant l'EXOMET et pour caractériser et quantifier ces métabolismes extracellulaires à l'échelle écosystémique.

Mots clés :

Minéralisation du carbone du sol | Métabolismes oxydatifs extracellulaires | Physico-chimie du sol | Enzymologie du sol | Isotopie | Modélisation

ABSTRACT

Soils represent a larger carbon sink than the combined sinks supported by the atmosphere and the terrestrial vegetation. This carbon compartment directly impacts the concentration of atmospheric CO₂ through the organic matter mineralization process. Predict the carbon fluxes between the soil and the atmosphere therefore require a complete understanding of the processes involved in the organic matter mineralization. Until 2013, it was commonly admitted that the respiration supported by heterotrophic microorganisms was the main process through which the soil organic matter mineralization was regulated. However, following the observations of CO₂ emissions from sterilized soils, the hypothesis that carbon organic matter can be mineralized by extracellular oxidative metabolisms (EXOMET) was formulated.

The studies conducted during this thesis aimed at (i) demonstrating that the CO₂ emitted from sterilized soils is effectively partly sustained by EXOMET, (ii) providing evidences that extracellular metabolisms occur in physico-chemical contrasted soils, (iii) identifying factors regulating EXOMET expression and (iv) defining an approach which enables quantification of the CO₂ production through EXOMET in living soils.

Our results support the hypothesis of an EXOMET and highlight that extracellular metabolisms are regulated by different factors and physicochemical laws than those supported by living organisms. Our data also suggest that the EXOMET expression could have important consequences in some ecosystems (*e.g.* rhizosphere) and should be enhanced by variables linked to climate change (*e.g.* temperature, humidity). Given, (i) the contribution of EXOMET to soil CO₂ emissions, (ii) its activity in physico-chemical contrasted soils and (iii) its potential universality in terrestrial and aquatic environments, it become important to consider the role of EXOMET in our future representations of biogeochemical cycles.

The data presented in this manuscript, significantly contribute to our knowledge and understanding of the EXOMET. They also showed that a hard work remains to be done to understand EXOMET mechanisms and to characterize and quantify extracellular metabolisms at ecosystem scale.

Keywords:

Mineralization of soil carbon | Extracellular oxidative metabolism | Soil physico-chemistry | Soil enzymology | Isotope | Modelisation.

INDEX DES FIGURES

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Matières organique des sols :

Figure I.1. Représentation schématique de la structure du sol : Exemple du sol de La Minière (Puget *et al.*, 2000).

Figure I.2. Proportions approximatives en masse des constituants organiques des sols cultivés (Van-Camp *et al.*, 2004).

Figure I.3. Les différentes compositions des minéraux du sol (Calvet *et al.*, 2015).

Figure I.4. Les différentes voies d'apports, de transformations et de pertes de C dans les sols (Trumbore, 2009).

Figure I.5. Les différents pools de SOM en fonction de leur stabilité et de leur temps de renouvellement (γ : years).

Figure I.6. Temps de résidence de la SOM totale et des différents composés organiques constitutifs de la SOM. (Schmidt *et al.*, 2011).

Figure I.7. Visions historique et émergente de la persistance de la SOM. Dans la vision historique (a), la MO stable est considérée comme intégrant les résidus de végétaux préservés et les produits synthétisés de novo comme les substances humiques dont la complexité chimique et la composition les rendent presque inerte à la dégradation microbienne. La vision émergente (b) est que la structure moléculaire (1) de la MO ne détermine pas nécessairement sa stabilité dans le sol. Au contraire, la dynamique de la SOM est gouvernée par de multiples processus (5) conditionnés par les conditions environnementales (*e.g.*, hétérogénéité physique) (Schmidt *et al.*, 2012).

Figure I.8. Distribution globale du SOC en pourcentage des stocks totaux de C présent dans le sol et la phytomasse (Scharlemann *et al.*, 2016).

Figure I.9. Distribution globale du SOC (en tonnes de C par ha) dans le premier mètre de sol (Scharlemann *et al.*, 2016).

Figure I.10. Stocks de carbone organique dans le sol et la phytomasse en fonction des régions climatiques (Scharlemann *et al.*, 2016).

Figure I.11. Profils verticaux de distribution du SOC (Jobbágy & Jackson, 2000).

Figure I.12. Processus affectant la dynamique du SOC (Lal, 2004).

Figure I.13. Flux de C entre les principaux réservoirs de C de la biosphère.

II. Emissions de CO₂ par les sols :

Figure II.1. Localisation des activités enzymatiques des enzymes liées dans le sol (Ruggiero *et al.*, 1996).

Figure II.2. Localisation des enzymes liées à des composantes cellulaires : (i) dans le cytoplasme des cellules microbiennes, (ii) dans l'espace périplasmique des bactéries Gram-négative, (iii) à la surface externe des cellules avec leur site actif exposé vers l'environnement sol, contenues dans des polysomes ou dans des biofilms, (iv) dans des cellules en dormance (spores, kystes), (v) attachées à des cellules mortes ou des débris cellulaires, (vi) relarguées par la lyse cellulaire (Burns *et al.*, 2013).

Figure II.3. Enzymes diffusibles, libres dans le sol (Burns *et al.*, 2013).

Figure II.4. Enzymes liées aux particules organiques et minérales dans le sol (viii) associées dans des complexes enzymes-substrats, (ix) complexées avec la SOM par absorption, piégeage ou copolymérisation, (x) adsorbées à la surface de minéraux argileux, (xi) liées aux tanins (Burns *et al.*, 2013).

Figure II.5. Représentation schématique des méthodes d'immobilisation et de stabilisation des enzymes en Biotechnologie (Weetall, 1993).

Figure II.6. Courbe présentant une cinétique enzymatique basée sur l'équation de Michaelis-Menten : $V_0 = V_{\max} [S]/(K_M+[S])$

Figure II.7. Schéma synthétique de la respiration cellulaire aérobie : une série de réactions d'oxydoréduction (Source : https://fr.wikiversity.org/wiki/Glucides_et_leur_m%C3%A9tabolisme/Catabolisme).

Figure II.8. Les étapes de la glycolyse : durant la séquence de réactions biochimiques, la molécule à 6 C de glucose est oxydée, du pyruvate (ou acide pyruvique) est produit, les électrons sont pris en charge par de NAD⁺ et de l'ATP est formé.(Source : https://fr.wikiversity.org/wiki/Glucides_et_leur_m%C3%A9tabolisme/Catabolisme).

Figure II.9. Les étapes du cycle de Krebs (Source : https://fr.wikiversity.org/wiki/Glucides_et_leur_m%C3%A9tabolisme/Catabolisme).

Figure II.10. Le système de transporteurs d'e⁻ (STE).

Figure II.11. Les principaux processus cataboliques des procaryotes (Source : <http://fr.slideshare.net/valentinanuzzi/ch-7-microbial-metabolism>)

Figure II.12. Représentation schématique des flux de C reliant les principaux compartiments de la biosphère terrestre et leurs interactions avec le compartiment atmosphérique (Ryan & Law, 2005).

Figure II.13. Rôle de l'accessibilité au C du sol pour les microorganismes dans la régulation de la dynamique du C (Schimel & Schaeffer, 2012).

Figure II.14. Le *priming effect*: - pas d'interactions additives entre la décomposition du substrat ajouté et la SOM, (a) accélération de la décomposition de la SOM- *Priming effect* positif, (b) Ralentissement de la décomposition de la SOM- *Priming effect* négatif (Blagodatskaya & Kuzyakov, 2011).

Figure II.15. Modèle conceptuel de la relation entre redondance fonctionnelle et stabilité des écosystèmes (Konopka, 2009).

Figure II.16. Principales zones du sol, caractéristiques régulant le fonctionnement des communautés microbiennes (Schimel & Schaeffer 2012).

Figure II.17. Capacité de la nontronite à réaliser l'oxydation des polyphénols. Le groupe carboxyle contenu dans les composés intermédiaires est secondairement oxydé pour former du CO₂ et des fragments aliphatiques. Les produits intermédiaires et les fragments aliphatiques peuvent se polycondenser (Wang & Huang, 1994).

Figure II.18. Représentation schématique de la '*Regulatory gate hypothesis*'. K1 = transformations abiotiques de la SOM non bio-disponible. K2 = minéralisation biologique de la SOM bio-disponible. Les flèches indiquent que la biomasse microbienne peut créer de la MO bio-disponible et non bio-disponible mais n'est pas capable d'influencer directement les taux du processus K (Kemmitt *et al.*, 2008).

Figure II.19. (A) Schéma simplifié du cycle du DIC dans le sol; (B) fractionnement isotopique des roches carbonates et contribution aux flux de CO₂ (Schindlbacher *et al.*, 2015).

Figure II.20. Effets des radiations solaires sur les pools et les flux de décomposition. Un effet négatif sur un pool indique que les pertes sont supérieures aux apports (King *et al.*, 2012).

Figure II.21. Réponses aux irradiations gamma (A) des champignons et (B) de la biomasse algale des sols (McNamara *et al.*, 2013).

Figure II.22. Réponses aux irradiations gamma des communautés bactériennes de sols (A) secs et (B) humides (McNamara *et al.*, 2013).

Figure II.23. Réponses de la respiration induite par des substrats dans des sols vivants et stérilisés par irradiations gamma, fumigation et autoclavage (Blankinship *et al.*, 2014).

Figure II.24. Réponses, dans des sols vivants et stérilisés par différentes approches, (A) des activités de différentes enzymes hydrolytiques; (B) des activités d'enzymes oxydatives (Blankinship *et al.*, 2014).

Figure II.25. Emissions de CO₂ dans des sols et dans de l'eau durant 4 périodes d'incubation. Les résultats sont exprimés en % de l'atmosphère du microcosme.

(S): sols irradiés, (S+G): sols irradiés + glucose, (S+G+YE): sols irradiés + glucose + extrait de levure, (W+G+YE) : eau stérile+glucose+extrait de levure (Maire *et al.*, 2013).

Figure II.26. Emissions de CO₂ et consommation d'O₂ dans des sols et dans de l'eau durant 4 périodes d'incubation. Les résultats sont exprimés en % du volume de gaz atmosphérique du microcosme. Le code couleur est identique à la figure II.28. (Maire *et al.*, 2013).

Figure II.27. Activités de la (A) Glucose hexokinase (GHK), de la (B) Glucose-6-phosphate isomérase (G6PI) et de la (C) Malate déshydrogénase (MDH) après incorporation dans des sols vivants. Les activités au cours du temps (A_j) sont exprimées en % de l'activité initiale de la solution enzymatique (A₀). Les activités enzymatiques totales (cercles noirs), des enzymes immobilisées (cercles gris) et des enzymes solubles (cercles blancs) sont distinguées (Maire *et al.*, 2013).

Figure II.28. Emissions cumulées de CO₂ dans des sols après différents traitements de stérilisation (Maire *et al.*, 2013).

CHAPITRE II : NOUVELLES PREUVES DE L'EXISTENCE D'EXOMET CONTRIBUANT AUX EMISSIONS DE CO₂ PAR LE SOL :

Figure 1. General experimental design of the study which include our hypothesis, the parameters, the methods and the samples (n=3 for each date and treatment studied) used to test those hypotheses.

Figure 2. Impact of sterilization treatments on cellular density, integrity and functionality.

(a) Cell density enumerated by flow cytometry (FC), (b) cell density and integrity determined by transmission electron microscopy (TEM), (c) TEM photographs of ultrathin sections of soil showing cellular structure in LS, (d) DNA and (e) RNA relative contents in soils (dry mass basis). The percentage of DNA and RNA relative contents was estimated using LS as a reference. Standard deviation was estimated using three replicates per conditions. LS: Untreated soils, IS: irradiated soils, IAS-t: irradiated and autoclaved soils with 't' referring to the time of autoclaving.

Figure 3. Content and isotopic composition of dissolved organic carbon (DOC) and of CO₂ across time and treatments. (a) Content and (b) δ¹³C of dissolved soil organic carbon content (DOC) at the beginning of incubation, (c) daily C-CO₂ emissions rates and (d) δ¹³C of CO₂ released during four periods of incubation, (e) correlation between the carbon isotope discrimination (Δδ¹³C in ‰) induced by the extracellular oxidative metabolism (EXOMET)

and the DOC content. The correlation was calculated from data of sterilized soil treatments (IS, IAS-0.5h, IAS-1h, IAS-1.5h, IAS-2h, IAS-4h) analyzed at the beginning and the end of incubation. Standard deviation was estimated using three replicates per conditions. LS: Untreated soils, IS: irradiated soils, IAS-t: irradiated and autoclaved soils with 't' referring to the time of autoclaving.

Figure 4. Kinetic of the $\delta^{13}\text{C}$ -CO₂ released from an irradiated and autoclaved (4h) soil inoculated with ¹³C-labelled glucose (¹³C-glucose) or with unlabelled glucose (¹²C-glucose) through 32 days of incubation. Standard deviation was estimated using three replicates per treatments.

CHAPITRE III : L'EXOMET DANS DES SOLS AUX PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES CONTRASTÉS.

Figure 1. Geographical location and differences in soil physicochemical properties. Location of soil sampling in (a) France, (b) Boswana, (c) Spain (see Table S.1 for detailed coordinates), and (d-e) differences in the physicochemical properties of soil samples illustrated by a principal component analysis (PCA) performed using standardized quantitative values of edaphic parameters including cations, carbon related variables, soil texture and general parameters (see Table S.2.). The percentage of variability explained by the selected variables is indicated along the PCA axes in fig. e.

Figure 2. Fluxes of O₂ and CO₂ and edaphic properties contributing to soil respiration and EXOMET in living and irradiated soils. (a) CO₂ production and (b) O₂ consumption in living and irradiated soils for the 3 groups of soils defined in the PCA analysis (Fig.1). Note that O₂ consumption was used as a proxy of soil respiration (R_{soil}) and of EXOMET respiration (R_{EXOMET}) in living and irradiated soils, respectively. Hierarchical partitioning analysis (HPA) used to determine the contribution of soil variables that have the most significant correlations with (c) R_{soil} and (d) R_{EXOMET}. (e) Relative contribution of R_{EXOMET} to R_{soil} for the 3 groups of soils defined in the PCA analysis (Fig.1). Pearson correlations (r) between (f) the contribution of EXOMET (R_{EXOMET}/R_{soil}) and the dissolved organic content (DOC) of soil samples (g) O₂ consumption in living and irradiated soils.

Figure S.1. Daily O₂ consumption (a) and CO₂ production (b) per gram of soil in living soils and in irradiated soils; (c) relative contribution of EXOMET to O₂ consumption in soil samples.

Figure S.2. (A) Diagrammatic representation of organic matter, O₂ and CO₂ fluxes through cellular respiration and EXOMETs in soil. [1] represents the dissolution processes of organic matter, [2] and [2'] represent DOC fluxes going to EXOMETs and cellular respiration respectively, [3] and [3'] represent the O₂ inputs consumed by EXOMETs and cellular

respiration respectively, [4] and [4'] represent the CO₂ inputs produce by EXOMETs and cellular respiration respectively, [5] represents the flux that links the atmospheric CO₂ and soil carbonates.

CHAPITRE IV : INACTIVATION DES ECOENZYMES DANS LE SOL ET SES DIFFERENTES FRACTIONS GRANULOMETRIQUES.

Figure 1. (A) General experimental design used for the preparation of the samples (surface soil deep soil, fine sand-size fraction, silt-size fraction and clay size fraction). (B) General experimental design used to measure the inactivation kinetics of MDH and G6Pd ecoenzymes pools in soil samples. E: Enzyme, B: Buffer and S: Samples (which included surface soil deep soil, fine sand-size fraction, silt-size fraction and clay size fraction).

Figure 2. Model applied to optimize the mathematical approach used to simulate the inactivation of ecoenzymes after their addition to the soil matrix. I is the inactivation constant of the ecoenzyme pool (E). I_h and I_l are the inactivation constant of ecoenzyme pools associated to high (E_h) and low (E_l) turnover respectively. s is the constant of transfer which link E_h to E_l .

Figure 3. Simulation of MDH inactivation in the soil bulk using model 1,2 and 3. MDH activity along time (A_t) is expressed as % of its initial activity (orange points). For each date two experimental replicates were analyzed. The full black lines represent the fit of the kinetic model on observed MDH activity over the time. Costs represent the sum of squared residuals between the observed values and our fits.

Figure 4. Activity of MDH (A, C, E and H) and G6Pd (B, D, F and I) over the time following their incorporation in the soil bulk (A, B), the sand size fraction (C, D), the silt size fraction (E, F) and the clay size fraction (G, H). Ecoenzymes activities along time (A_t) is expressed as % of the initial activity of ecoenzymatic solution (A_0) applied to the soil (black points). For each date two experimental replicates were analyzed. The full black lines represent the fit of the kinetic model 3 with observed ecoenzyme activities. The dashed blue lines represent the activity of E_l over the time. The dashed orange lines represent the activity of E_h over the time. I_h and I_l represent the constant of inactivation of E_h and E_l respectively. s represents the constant of transfer from E_h to E_l . Values in brackets represent the confidence interval on the parameters estimations.

Figure 5. Parameter calibration using model 3 to simulate the inactivation of MDH (A) and G6Pd (B) on soil *observed* activities (full line) and on soil *theoretical* activities (dashed lines). Soil *theoretical* activities were calculated as the weighted sum of ecoenzyme activities associated to the sand-, silt-, and clay- fractions relatively to their mass contribution to the soil bulk. I_h and I_l represent the inactivation constants of E_h and E_l respectively. s represents the constant of transfer from E_h to E_l .

CHAPITRE V: DISCUSSION GENERALE.

Figure 1. Modèle théorique simulant la minéralisation de la SOM par la biomasse microbienne et par l'EXOMET. (1) Décomposition par les catalyseurs organo-minéraux du sol (ex. coenzymes et oxydes métalliques) de la SOM non bio-assimilable en substrats bio-assimilables. (2) Flux de DOC assimilés par la biomasse microbienne et par l'EXOMET. (3) Perte de DOC (*e.g.*, par lessivage). (4) Conversion de la biomasse microbienne en MOS ou en COD (*e.g.*, après mort cellulaire). (5) Minéralisation du COD en CO₂ par le métabolisme respiratoire intracellulaire des organismes hétérotrophes. (6) Libération d'écoenzymes par la biomasse microbienne (*e.g.*, par leur excrétion ou suite à la lyse des cellules microbiennes). (7) Processus d'immobilisation des écoenzymes sur les particules organo-minérales du sol. (8) Perte d'écoenzymes libres dans la solution de sol et liées aux particules organo-minérales du sol. (9) Diffusion des molécules carbonées dissoutes entre les différents catalyseurs organo-minéraux supportant l'activité d'EXOMET. (10) Processus de transformation de la roche parentale en catalyseurs minéraux potentiellement impliqués dans l'EXOMET. (11) Processus de minéralisation de la matière organique en CO₂ par les EXOMET. Les flèches en pointillés liées à des vannes grises indiquent que les catalyseurs organo-minéraux impliqués dans l'EXOMET régulent aussi, en partie, la décomposition de la matière organique du sol en matière organique dissoute.

Figure 2. Illustration schématique des effets de l'humidité sur l'activité microbienne du sol. La relation établie entre la respiration des organismes hétérotrophes et la disponibilité en eau est le résultat macroscopique de nombreux effets en interactions. Ψ représente le potentiel hydrique du sol et π le potentiel osmotique des cellules (Moyano *et al.*, 2013).

Figure 3. Présentation synthétique des différentes voies de la méthanogénèse, des substrats utilisés et de l'enthalpie libre des réactions.

INDEX DES TABLEAUX

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE :

I. Matières organiques des sols :

Tableau I.1. Les différents pools de SOM définis selon leurs cinétiques de décomposition et les fractions de MO relatives. (Wander, 2004).

Tableau I.2. Relations entre les différentes formes et composition de SOC et les pools de C (Stockman *et al.*, 2013).

Tableau I.3. Procédures physiques et chimiques de fractionnement du SOC (Stockman *et al.*, 2013).

Tableau I.4. Stock de carbone dans les différents types de sols (Lal, 2004).

II. Emissions de CO₂ par les sols :

Tableau II.1. Exemples d'études réalisées sur la catalyse minérale des réactions d'humification abiotique (Wang & Hardie, 2009).

Tableau II.2. Synthèse des flux de CO₂ « anormaux » mesurés dans des écosystèmes terrestres riches en carbonates et leurs interprétations (Serrano-Ortiz *et al.*, 2010).

Tableau II.3. Synthèse des études publiées comparant l'efficacité des irradiations gamma par rapport aux autres méthodes utilisées pour stériliser les sols (MacNamara *et al.*, 2003).

Tableau II.4. Doses d'irradiation gamma nécessaires pour assurer la stérilité des sols. M, A et O indiquent les traitements pré-irradiations utilisés : M = humidification, A= sol séché à l'air, O= sol séché au four (McNamara *et al.*, 2003).

Tableau II.5. Activité de la G6PI et résultats du modèle utilisé pour la quantification des émissions de CO₂ par les organismes vivants (R_i) et par les métabolismes extracellulaires (R_x) pour 5 sols différents. La contribution de l'EXOMET aux émissions de CO₂ est calculée par $R_x/R_{ni} \times 100$, nd = non déterminé (Maire *et al.*, 2013).

CHAPITRE II : NOUVELLES PREUVES DE L'EXISTENCE D'EXOMET CONTRIBUANT AUX ÉMISSIONS DE CO₂ PAR LE SOL :

Tableau S1. Concentration (ppm) and isotope composition (‰ $\delta^{13}C-CO_2$) of CO₂ accumulated in incubated flasks, quantification of soil CO₂ emissions during the first period

of incubation ($\mu\text{gC g}^{-1}$ soil) and on a daily basis ($\mu\text{gC g}^{-1}$ soil d^{-1}). LS: Untreated soils, IS: irradiated soils, IAS-t: irradiated and autoclaved soils with 't' referring to the time of autoclaving.

Tableau S2. Concentration (ppm) and isotope composition ($\text{‰ } \delta^{13}\text{C-CO}_2$) of CO_2 accumulated in incubated flasks, quantification of soil CO_2 emissions during the second period of incubation ($\mu\text{gC g}^{-1}$ soil) and on a daily basis ($\mu\text{gC g}^{-1}$ soil d^{-1}). LS: Untreated soils, IS: irradiated soils, IAS-t: irradiated and autoclaved soils with 't' referring to the time of autoclaving.

Tableau S3. Concentration (ppm) and isotope composition ($\text{‰ } \delta^{13}\text{C-CO}_2$) of CO_2 accumulated in incubated flasks, quantification of soil CO_2 emissions during the third period of incubation ($\mu\text{gC g}^{-1}$ soil) and on a daily basis ($\mu\text{gC g}^{-1}$ soil d^{-1}). LS: Untreated soils, IS: irradiated soils, IAS-t: irradiated and autoclaved soils with 't' referring to the time of autoclaving.

Tableau S4. Concentration (ppm) and isotope composition ($\text{‰ } \delta^{13}\text{C-CO}_2$) of CO_2 accumulated in incubated flasks, quantification of soil CO_2 emissions during the fourth period of incubation ($\mu\text{gC g}^{-1}$ soil) and on a daily basis ($\mu\text{gC g}^{-1}$ soil d^{-1}). LS: Untreated soils, IS: irradiated soils, IAS-t: irradiated and autoclaved soils with 't' referring to the time of autoclaving.

CHAPITRE III : L'EXOMET DANS DES SOLS AUX PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES CONTRASTES.

Table S1. Locations and GPS coordinates of sampling soils.

Table S2. Values of the 19 physicochemical parameters measured on soil samples. Variables are grouped into the 4 categories (Exchangeable bases, soil texture, carbon related variables, general parameters) used in Fig.1. Abbreviations are defined in Fig.1. The units for parameters are the following: cmol.Kg^{-1} for exchangeable bases and CEC; % for soil texture; mg.g^{-1} soil for TC, OC, IC; $\mu\text{g.g}^{-1}$ soil for DOC and DIC and $\mu\text{S.cm}^{-1}$ for conductivity.

Table S3. Pearson's correlation matrix for the 19 physicochemical parameters measured on soil samples. Variables are grouped into the 4 categories (Exchangeable bases, soil texture, carbon related variables, general parameters) used in Fig.1. Abbreviations are defined in Fig.1. Values in bold indicate significance at $p < 0.05$.

Table S4. CO_2 (in $\mu\text{g CO}_2.\text{g}^{-1}$ soil) and O_2 concentration (in $\mu\text{g O}_2.\text{g}^{-1}$ soil) values recorded at each sampling date (0, 5, 11 and 16 days) throughout the incubation period in (A) living and (B) irradiated soils. The O_2 and CO_2 parameters were measured in 2 replicates (Rep.) per soil sample and per condition (R1 and R2).

Table S5. Pearson's correlation values between O₂ consumption and the physicochemical parameters in living soils and irradiated soils. O₂ consumption is used as a proxy to estimate ^athe total soil respiration ($R_{\text{soil}} = \text{Cellular respiration} + \text{EXOMET respiration}$) in living soils and ^bthe EXOMET respiration (R_{EXOMET}) in irradiated soils. Correlation values between the contribution of R_{EXOMET} to R_{soil} ($R_{\text{EXOMET}}/R_{\text{soil}}$) and the physicochemical parameters were also determined. Variables are grouped into the 4 categories (Exchangeable bases, soil texture, carbon related variables, general parameters) used in Fig.1. Abbreviations are defined in Fig.1. Values in bold indicate significance at $p < 0.05$.

CHAPITRE IV : INACTIVATION DES ECOENZYMES DANS LE SOL ET SES DIFFERENTES FRACTIONS GRANULOMETRIQUES.

Table 1. C and N contents in bulk and soil fractions. Relative mass contribution of soil fraction to the bulk soil.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN (anglais: DNA) : Acide désoxyribonucléique
ARN (anglais: RNA): Acide ribonucléique
CARD-FISH: Catalysed reported deposition – fluorescence *in situ* hybridation
CEC: Capacité d'échange cationique
Clay-F : Fraction argileuse
COD (anglais: DOC): Carbone Organique Dissous
COS (anglais: SOC) : Carbone organique du sol
CRDS : Cavity Ring Down Spectrometer
e⁻ : électron
EE : Enzyme Extracellulaire
EXOMET: Extracellular Oxidative Metabolism
FC: Flow Cytometry
G6Pd: Glucose-6-phosphate dehydrogenase
G6PI: Glucose-6-phosphate isomerase
GHK: Glucose Hexokinase
HPA: Hierarchical Partitioning Analysis
IAS: Irradiated and Autoclaved Soil
IE: Intracellular Enzyme
IS: Irradiated Soil
ISME: International Society of Microbial Ecology
LS: Living Soil
MDH: Malate dehydrogenase
MET (anglais: TEM) : Microscopie Electronique à Transmission
MO (anglais: OM): Matière Organique
MOS (anglais: SOM) : Matière Organique du Sol
OC: Organic Carbon
Ra : Respiration des organismes autotrophes
R_{cell} : Respiration cellulaire
R_{EXOMET} : Minéralisation par l'EXOMET
Rh : Respiration par les organismes hétérotrophes
ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène
Rs: Respiration du sol
Rsoil: Respiration du sol
Sand-F: Fraction sableuse
SIC: Soil Inorganic Carbon
Silt-F: Fraction Limoneuse
STE : Systeme de Transport d'Electrons
TCA : Tricarboxylic Acid
UV: Ultraviolet
YE: Yeast Extract

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	p.1
CHAPITRE I- Synthèse Bibliographique	p.5
I- MATIERES ORGANIQUES DES SOLS	p.5
I.1. Généralités sur la structure des sols	p.5
I.2. Dynamique de la matière organique du sol	p.8
I.2.1. La matière organique des sols- Définition	p.8
I.2.2. Les différents pools de matière organique du sol	p.9
I.2.3. Processus chimiques et physiques conditionnant la dynamique de la matière organique du sol	p.11
I.3. Valeurs et variabilité des stocks de carbone organique des sols	p.13
I.4. Importance du SOC dans le cycle global du carbone	p.15
II- EMISSIONS DE CO₂ PAR LES SOLS	p.16
II.1. La respiration des microorganismes hétérotrophes	p.16
II.1.1. Les microorganismes des sols : biomasse, diversité et structuration spatiale	p.17
II.1.2. La dépolymérisation extracellulaire	p.18
II.1.2.1. Persistance des activités des EE dans le sol	p.19
II.1.2.2. Régulation et écologie des EE	p.23
II.1.3. La respiration des microorganismes hétérotrophes des sols	p.26
II.1.3.1. Généralité sur les processus biochimiques de la respiration cellulaire	p.26
II.1.3.1.1. Vue globale de la respiration cellulaire aérobie	p.26
II.1.3.1.2. Voies métaboliques de la respiration cellulaire aérobie : exemple des cellules eucaryotes	p.26
II.1.3.1.3. Respiration cellulaire chez les procaryotes	p.29
II.1.3.2. La respiration des microorganismes des sols	p.30
II.1.3.2.1. Influence de la température et de l'humidité sur la respiration	p.31
II.1.3.2.2. Qualité et accessibilité de la SOM	p.32
II.1.3.2.3. Propriétés des communautés microbiennes	p.33
II.2. Les processus abiotiques	p.37
II.2.1. La catalyse abiotique	p.37
II.2.2. Catalyse abiotique et « Regulatory Gate hypothesis »	p.40
II.2.3. Contribution des carbonates	p.41
II.2.4. La photo-dégradation	p.44
II.3. Autres processus contribuant aux émissions de CO ₂ par les sols	p.46
II.3.1. Effets des procédures de stérilisation sur les propriétés des sols	p.46
II.3.2. Les activités extracellulaires des enzymes intracellulaires (EI)	p.52
II.3.2.1. Enzymes et/ou minéraux	p.52
II.3.2.2. Métabolismes extracellulaires	p.53
II.3.2.2.1. Arguments en faveur de la maintenance d'une cascade de réactions biochimiques en contexte extracellulaire	p.54
II.3.2.2.2. Stabilisation des EI sur la matrice sol	p.55

II.3.2.2.3. Facteurs conditionnant l'expression des EXOMET	p.56
II.3.2.2.4. Contribution des EXOMET aux émissions de CO ₂ par les sols vivants	p.57
III-Objectifs de la thèse	p.58
CHAPITRE II- Nouvelles preuves de l'existence d'EXOMET contribuant aux émissions de CO₂ par le sol	p.59
CHAPITRE III- Extracellular oxidative metabolism (EXOMET) is overall regulated by dissolved organic carbon content in physicochemical contrasted soils	p.84
CHAPITRE IV- Turnover rates of coenzymes in the bulk soil and soil fractions	p.101
CHAPITRE V- Discussion Générale	p.118
I- EXOMET : mythe ou réalité ?	p.118
II- EXOMET et flux de carbone dans les sols	p.120
III-EXOMET : PERSPECTIVES	p.123
III.1- Mécanismes sous-tendant l'EXOMET	p.123
III.2- Quantifier la contribution relative de l'EXOMET aux flux de C dans des sols vivants	p.125
III.3- Réponse des EXOMETs face au changement climatique : importance de la température et de l'humidité des sols	p.126
III.4- L'EXOMET contribue-t-il à la minéralisation de la MO dans d'autres écosystèmes et concerne t-il d'autres métabolismes ?	p.127
REFERENCES	p.130
ANNEXES	p.156

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Pendant plus de 10000 ans, avant l'ère industrielle, les concentrations en CO₂ atmosphérique ont été maintenues à un niveau stable, compris entre 260 et 280 ppm (**Petit et al., 1999 ; Siegenthaler et al., 2005**). Cependant, depuis la moitié du 18^{ème} siècle, les activités humaines ont induit une augmentation rapide du CO₂ atmosphérique (+100 ppm) (**Lal, 2004**). L'augmentation d'origine anthropique du CO₂ atmosphérique résulte principalement de la combustion des réserves fossiles, de la déforestation, de la production semencière et de la conversion des prairies en terres cultivées, ceci afin de subvenir aux besoins énergétiques et alimentaires d'une population humaine en constante augmentation (9 milliards en 2050 et 10 milliards en 2100). Il est estimé que 8.7Gt de carbone (C) d'origine anthropique sont libérés chaque année dans l'atmosphère (**Stockmann et al., 2013**). A cette libération massive de CO₂ (et autres gaz à effets de serre tels que le CH₄ et le NO₂) est associée la modification de certaines variables climatiques comme (i) l'augmentation de la température moyenne de la surface de la Terre (de 1.1°C à 6.4°C pour la fin du siècle, selon les modèles de prévision) (**Solomon et al., 2007**), (ii) l'altération importante des motifs des événements de précipitations (**Trenberth, 1999**) induisant une intensification des périodes de sécheresse et des événements de précipitations extrêmes (**Mearns et al., 1995 ; Easterling et al., 2000**). De telles modifications climatiques peuvent avoir des conséquences multiples sur le fonctionnement des écosystèmes, la ressource en eau potable, la sécurité alimentaire et la santé humaine. Ce constat est au cœur de préoccupations scientifiques, sociétales et politiques majeures se traduisant, notamment, par l'instauration de quotas [nationaux (*e.g.* loi de programmation fixant les orientations de la politique énergétique (**POPE, loi n° 2005-781 du 13 juillet 2005**) et internationaux (*e.g.* Convention-cadre des Nations Unies sur les changements climatiques (CCNUCC, 1992), protocole de Kyoto (1997))] visant à diminuer les émissions de gaz à effet de serre (GES) notamment de CO₂, principal contributeur au forçage radiatif global (56%). Outre ces objectifs visant à diminuer les émissions de GES d'origine anthropique, les avancées scientifiques montrent qu'il est possible de manipuler les stocks de C en contrôlant les flux liant différents réservoirs. Ainsi, sur les 555±85 PgC de C d'origine anthropique libérés dans l'atmosphère, moins de la moitié s'est accumulé dans ce réservoir (240 ± 10 PgC). Une partie importante a en effet été absorbée dans les « puits de C » que constituent l'Océan (155±30 PgC) et les écosystèmes terrestres non affectés par les modifications des pratiques d'utilisation des terres (160 ± 90 PgC).

Les sols constituent une réserve de C (1500 – 2400 PgC) plus importante que celles de l'atmosphère (760PgC) et de la végétation terrestre (560PgC) combinées (**Lal, 2008**). Ces trois réservoirs s'échangent du C en continu mais avec des temps de renouvellement différents. Au sein de l'écosystème terrestre, le C atmosphérique, très majoritairement sous forme de CO₂, alimente principalement la biomasse végétale *via* le processus de photosynthèse. Une fraction de ce C sera utilisée dans l'accroissement de la biomasse végétale, une autre fraction sera, quant à elle, libérée dans le sol *via* la

rhizodéposition. Le rhizodépôt et la biomasse végétale morte enrichissent le pool de C présent dans le sol. Les molécules carbonées du sol sont sujettes à dégradation, sous l'action de la faune et de la microflore du sol, aboutissant à leur minéralisation, partielle ou totale, sous forme de CO₂. Le CO₂ ainsi produit est ensuite libéré dans l'atmosphère et/ou alimentera la réserve de carbone inorganique du sol sous forme de carbonates (*e.g.* HCO₃⁻, CaCO₃). Ainsi, le stock de C du sol dépend d'un équilibre s'établissant entre les flux de C entrants (*e.g.* végétaux morts, rhizodépôts) et ceux sortants (*via* la minéralisation, lessivage). La vitesse de décomposition de la matière organique du sol dépend non seulement de l'activité des organismes décomposeurs mais aussi de processus bio-physico-chimiques pouvant protéger la matière organique de la biodégradation (*e.g.* stabilisation de la matière organique sur les particules minérales du sol, piégeage de la matière organique au sein de micro-agrégats).

Les modèles prédictifs, simulant le fonctionnement des écosystèmes, représentent des outils précieux permettant de prévoir l'évolution du C dans le sol et son interaction avec le compartiment atmosphérique. L'utilisation de tels outils prédictifs nécessite une juste description des mécanismes impliqués dans les processus de dégradation de la matière organique. Historiquement, les modèles simulaient la minéralisation microbienne à travers des cinétiques du premier ordre qui déterminaient des taux de renouvellement des différentes réserves de carbone du sol. Ces modèles ne permettaient pas de simuler la minéralisation de la matière organique dans des environnements dynamiques. Or, il était communément admis que la dégradation de la matière organique était principalement soutenue par la taille, l'activité spécifique et la composition de la biomasse microbienne (**Fontaine *et al.*, 2003**). De fait, l'intégration de la dynamique du compartiment microbien a considérablement amélioré les performances des modèles prédictifs (**Wieder *et al.*, 2013**) de minéralisation de la matière organique. Cependant, la littérature a souvent montré l'absence de corrélation entre la taille de la biomasse microbienne et les émissions de CO₂ dans des sols soumis à des traitements de stérilisation (irradiations, fumigants, *etc.*) (**Peterson, 1962; Blankinship *et al.*, 2014; Kemmitt *et al.*, 2008; Lensi *et al.*, 1991; Maire *et al.*, 2013**). De telles données suggèrent que les processus impliqués dans la minéralisation de la matière organique du sol ne sont pas encore complètement élucidés.

Dans ce cadre, Maire *et al.* (2013) ont émis l'hypothèse de l'existence de métabolismes oxydatifs extracellulaires (EXOMET) impliqués dans la minéralisation de la matière organique du sol. Selon ces auteurs les enzymes respiratoires, libérées après mort et lyse cellulaire, seraient capables de maintenir leurs activités en dehors du contexte cellulaire et contribueraient substantiellement aux émissions de CO₂ par le sol. Cette hypothèse quelque peu déroutante, car se heurtant au dogme plaçant la cellule comme unité minimale permettant l'organisation de métabolismes oxydatifs, a représenté le socle des recherches menées durant cette thèse.

Ce manuscrit de thèse est organisé autour de 5 chapitres. Dans le premier chapitre est proposée une synthèse bibliographique présentant la composition et les rôles de la

matière organique du sol ainsi que les processus impliqués dans sa minéralisation. Les trois chapitres suivants, rédigés sous forme de publications, présentent les travaux conduits durant cette thèse qui visaient (i) à établir que les émissions de CO₂ observées par **Maire *et al.* (2013)** étaient le fait de métabolismes extracellulaires (*via* l'EXOMET), (ii) à déterminer le caractère cosmopolite de ce processus dans des sols aux conditions contrastées (iii) à identifier des facteurs impliqués dans sa régulation, (iv) à proposer une approche permettant de déterminer sa contribution aux émissions de CO₂ dans des sols vivants.

Dans le dernier chapitre seront discutées, de manière intégrée, les données acquises sur l'EXOMET et l'importance putative de ce processus dans le cycle global du C ainsi que certaines des perspectives inhérentes aux travaux conduits durant cette thèse.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- MATIERES ORGANIQUES DES SOLS

I.1. Généralités sur la structure des sols

Au sein de la biosphère continentale, les sols jouent le rôle de plaque tournante dans la dynamique des éléments chimiques. Ce sont des milieux complexes où des minéraux, des matières organiques (MO) mortes et vivantes, de l'eau et de l'air sont étroitement associés et en interaction. Cet environnement hétérogène est structuré en deux composantes. Une phase solide (agencement architectural de particules solides (minérale et organique) du sol formant des agrégats), et une phase poreuse ou phase des vides [*i.e.*, réseau de pores de différentes tailles, formes et connectivités occupé par des fluides (liquides ou gaz)] (Fig.I.1).

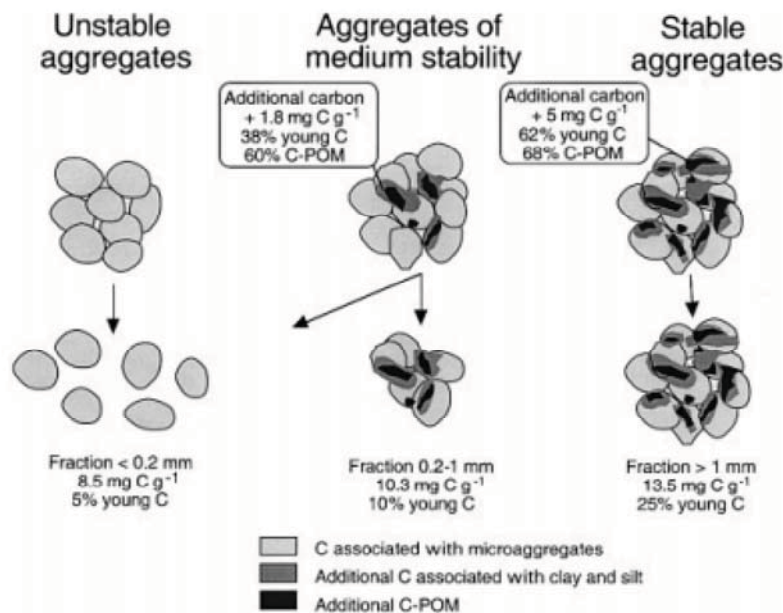


Figure I.1. | Représentation schématique de la structure du sol : Exemple du sol de La Minière (Puget *et al.*, 2000).

La structure du sol varie dans le temps et l'espace. Considérant la dimension spatiale, la répartition verticale des phases solides et poreuses sont des caractéristiques pédologiques importantes pour la compréhension des processus dont les sols sont le siège. En effet, dans un sol, la répartition verticale de la phase solide varie avec la profondeur car les minéraux et les MO ne sont pas uniformément répartis mais présentent une distribution résultant des processus de pédogénèse et des opérations de travail du sol. La structure du sol est également soumise aux variations environnementales telles que les précipitations, l'alternance des cycles gel-dégel, la couverture végétale et le travail du sol induisant ainsi un caractère dynamique.

La manière dont le sol est construit (*e.g.*, forme, taille et cohésion entre les agrégats) a un effet important sur les propriétés fonctionnelles et sur sa stabilité (Donahue *et al.*, 1983) et conditionne donc les processus physiques, chimiques et

biologiques siégeant dans ces systèmes. Concernant les processus physiques, la structure du sol a un impact sur l'eau (sa rétention, son évaporation, sa diffusion), l'aération, la compaction, la formation de croûtes de battance et par extension sur l'érosion hydrique et éolienne (Leguédouis & Le Bissonnais, 2004). Concernant les processus chimiques, la structure influe la sorption et la désorption de composés, le transport de solutés et de polluants et donc conditionne la rétention et la biodégradation de divers composés dans le sol. Enfin, concernant les processus biologiques, la structure du sol conditionne l'habitat microbien, c'est-à-dire le réseau poral, complexe, plus ou moins interconnecté et rempli de gaz et d'eau (Young & Ritz, 2000).

Plus précisément, le système poral permet la présence et la circulation de gaz et de liquide indispensables aux phénomènes physiques, chimiques et biologiques dans les sols (Calvet, 2003). Au sein de ce réseau, l'eau se répartit en films constituant une mosaïque de microenvironnements très variés du point de vue physico-chimique autorisant la présence de communautés microbiennes diversifiées (Jocteur Monrozier *et al.*, 1993). La phase solide, quant à elle, détermine les caractéristiques et l'activité physico-chimique des sols. Cette phase est principalement constituée de minéraux (**Fig.I.2**) dont la nature est liée (i) aux caractéristiques de la roche mère sur laquelle les sols se sont formés et (ii) aux diverses transformations physiques qui ont eu lieu au cours de son altération et de la pédogénèse.

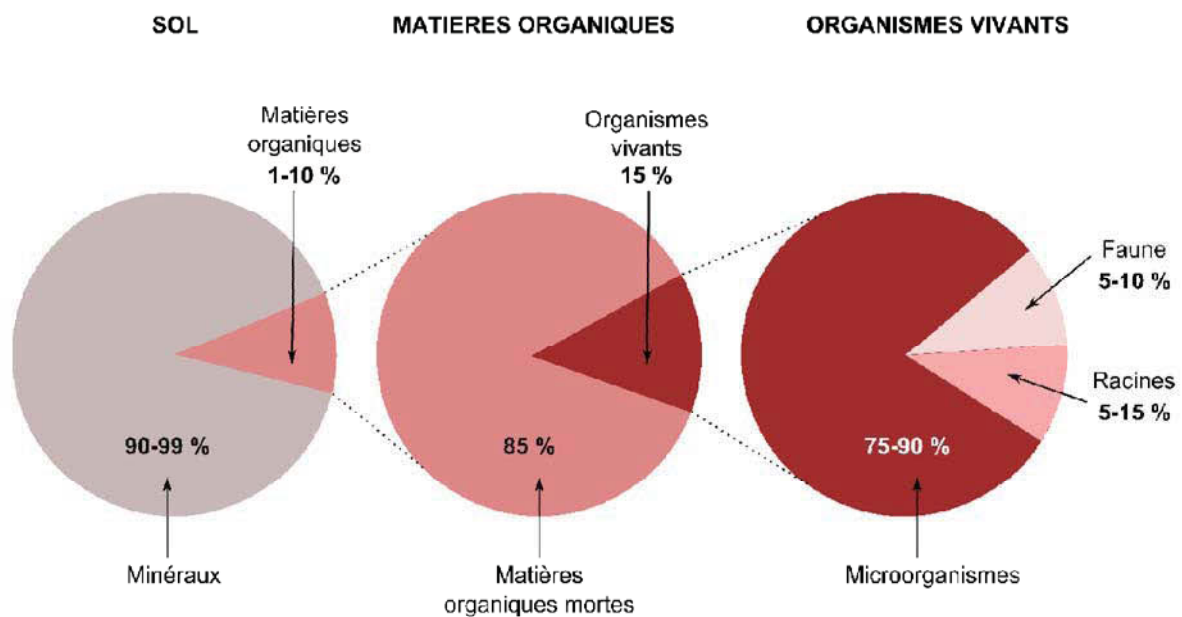


Figure I.2. Proportions approximatives en masse des constituants organiques des sols cultivés (Van-Camp *et al.*, 2004).

La composition des minéraux du sol peut être décrite en considérant les éléments chimiques, la nature des minéraux et la taille des particules minérales (**Fig.I.3**). La MO des sols, autre composant de la phase solide, est très diverse en termes de composition et de structure et peut se définir comme « *tout ce qui est vivant ou a été vivant* » (Calvet *et al.*, 2015) avant minéralisation et inclut les MO d'origine animale, végétale et microbienne (**Fig.I.2**).

I.2. Dynamique de la matière organique du sol

I.2.1. LA MATIERE ORGANIQUE DES SOLS- DEFINITION

|ENCADRE 1|Définitions

Matière organique du sol (SOM)

Le terme SOM englobe toute la MO présente dans les sols, indépendamment de son origine ou de son état de décomposition. La SOM inclut donc la MO vivante (plantes, biomasse microbienne et biomasse faunistique), la MO dissoute, la MO particulaire, l'humus et la matière organique inerte ou fortement carbonisée (e.g., charbon de bois). La définition fonctionnelle de la matière organique du sol exclut les MO > 2 mm (Baldock & Skjemstad, 1999).

Carbone organique du sol (SOC)

La SOM est constituée de quantités significatives de C, H, O, N, P et S. Pour des raisons pratiques, la plupart des méthodes d'analyse utilisées pour déterminer les niveaux de MO du sol déterminent en fait le contenu de carbone organique du sol. Les facteurs de conversion peuvent être appliqués à partir des teneurs en carbone organique du sol pour fournir une estimation du niveau de SOM. Le facteur général de conversion est de 1,72, de sorte que la SOM \approx 1,72 SOC. Toutefois, ce facteur de conversion varie de 1,72 à 2,0 en fonction de l'origine et de la nature de la SOM (Baldock & Skjemstad, 1999).

Carbone inorganique du sol (SIC)

Des quantités importantes de SIC peuvent être présentes dans les sols en particulier dans les régions plus arides et en association avec d'autres matériaux d'origine mafique (calcaires, basaltes). Le carbonate de calcium sous forme de concrétions, de nodules ou de carbonates diffus peut être très abondant dans certains sols. Le SIC peut également être rencontré sous forme de dolomie ou de carbonate de magnésium. Les carbonates peuvent se former dans le sol (origine pédogénique) ou dérivés de la roche mère (origine lithogénique). Le SIC ne contribue pas à la SOM (Drees & Hallmark, 2002).

La définition de la matière organique du sol (*Soil Organic Matter, SOM*) et du carbone organique du sol (*Soil Organic Carbon, SOC*) sont proposées dans l'**Encadré 1**.

Dans la très grande majorité des sols, la fixation du dioxyde de carbone (CO_2) présent dans l'atmosphère par la photosynthèse des plantes est la source initiale de la SOM (**Fig. I.4.**). Un très faible apport peut également provenir de la fixation du CO_2 par les bactéries autotrophes (Tate, 1987) et, dans certains cas, des produits industriels et miniers dérivés du pétrole ou du charbon peuvent également contribuer à la SOM. Néanmoins, à l'échelle globale, ces sources de carbone (C) sont négligeables.

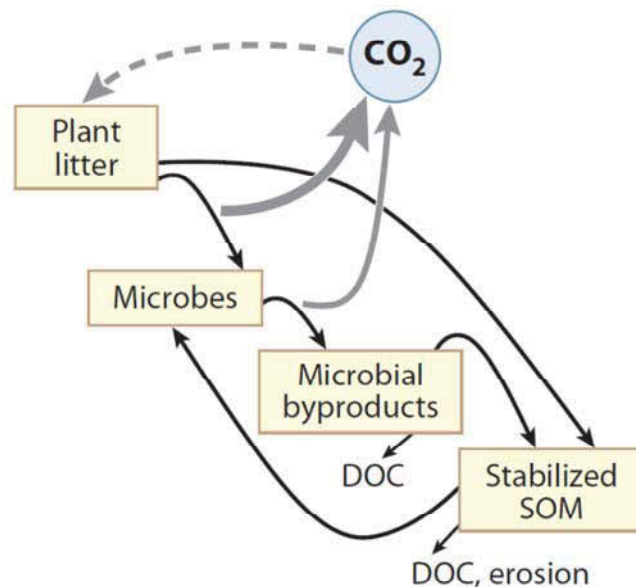


Figure I.4. | Les différentes voies d'apports, de transformations et de pertes de C dans les sols (Trumbore, 2009).

La SOM inclut les résidus végétaux après la mort des plantes (feuille, tige, écorce, fruit, racines), les exsudats racinaires, les cadavres d'animaux et de microorganismes, leurs produits de dégradation, les produits synthétisés par les microorganismes du sol et l'ensemble des organismes vivants dans le sol (faune du sol, microorganismes et racines des végétaux vivants). Cette litière organique, en grande partie issue du matériel végétal, est composée de glucides complexes (cellulose, polysaccharides); de protéines végétales, de cires cuticulaires, de lipides et de

lignine dont la stabilité est, par ordre croissant, la suivante: sucres simples < acides aminés < protéines < cellulose < hémicellulose < lipides, amidons, cires < lignine, tanins (Quideau, 2002). Les hydrates de carbone et une partie des protéines peuvent être rapidement décomposés. La lignine, plus résistante à la dégradation, forme en combinaison avec d'autres composés organiques partiellement décomposés et avec des produits de l'activité microbienne, des MO amorphes très complexes, souvent désignées sous le terme d'humus (Stevenson, 1982).

La SOM consiste donc en un mélange complexe de substances partiellement décomposées (*i.e.*, polysaccharides, lignine, bio-polymères aliphatiques, tanins, lipides, protéines) dérivées de résidus de plantes (*i.e.*, litière) et de biomasse microbienne et faunistique (Totsche *et al.*, 2010). Bien que la composition élémentaire de la SOM puisse varier en fonction de l'origine de la MO (Kirkby *et al.*, 2011), le rapport C:N:P:S est de l'ordre de 140:10:1:1 (Williams & Donald 1957; Stevenson, 1994; Rice, 2002).

1.2.2. LES DIFFERENTS POOLS DE MATIERE ORGANIQUE DU SOL

Classiquement, la SOM est subdivisée en différents pools de C pouvant se différencier selon leur stabilité (labile, stable, réfractaire, inerte), leur taux de décomposition (rapide, lente, très lente) ou encore leur temps de renouvellement (court, long, très long) (**Fig.I.5**) (Krull *et al.*, 2003; Trumbore, 2009).

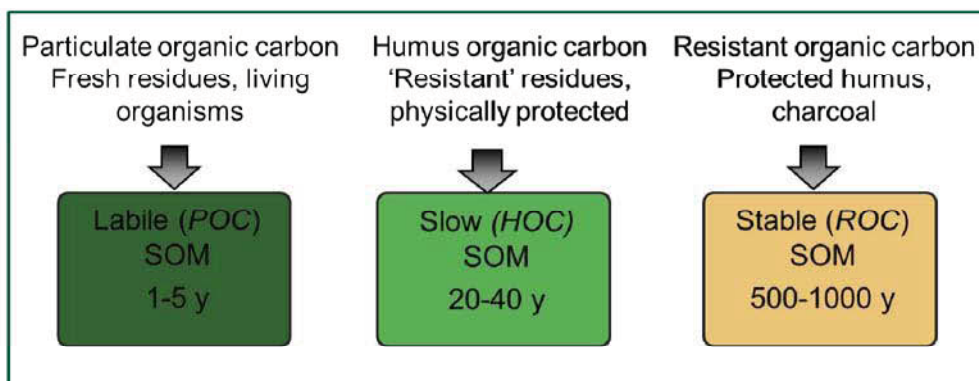


Figure I.5. | Les différents pools de SOM en fonction de leur stabilité et de leur temps de renouvellement (y : years).

Il existe plusieurs méthodes de fractionnement permettant de différencier les différents pools de SOC (**Tab.I.1.**) dont les procédures de fractionnement physique (taille, densité, agrégation) et chimique (solubilité, minéralogie) sont présentées dans le **Tableau I.2.**

Organic Matter Pools, Theorized Kinetics and Function	Procedurally Defined Fractions of Organic Matter
LABILE OR ACTIVE SOM	
<p>Half-life days to a few years</p> <p>Equated with material of recent origin or embodied living components of SOM Material of high nutrient or energy value Physical status (not physically protected) makes soil incorporated matter likely to participate in biologically or chemically based reactions Physical role of materials located at the soil surface and of compounds that promote macroaggregation is transient</p>	<p>Microbial biomass</p> <p>Chloroform-labile SOM Microwave-irradiation-labile SOM Amino compounds Phospholipids</p> <p>Labile substrates</p> <p>Mineralizable C or N, estimated by incubation Substrate induced activity Soluble, extractable by hot water or dilute salts Easily oxidized by permanganate or other oxidants</p> <p>Residues for which chemical formula can be described, inherited from living organisms</p> <p>Litter, vegetative fragments or residues Nonaggregate protected POM Polysaccharides, carbohydrates</p>
SLOW OR INTERMEDIATE SOM	
<p>Half-life of a few years to decades</p> <p>Physical protection, physical status, or location help separate this fraction from the other two fractions</p>	<p>Partially decomposed residues and decay products</p> <p>Amino compounds, glycolproteins Aggregate protected POM</p> <p>Some humic materials</p> <p>Acid/base hydrolysable Mobile humic acids</p>
RECALCITRANT, PASSIVE, STABLE, AND INERT SOM	
<p>Half-life of decades to centuries</p> <p>Recalcitrance because of biochemical characteristics and/or mineral association</p>	<p>Refractory compounds of known origin</p> <p>Aliphatic macromolecules (lipids, cutans, algaenans, suberans) Charcoal Sporopollenins Lignins</p> <p>Some humic substances</p> <p>High molecular weight, condensed SOM Humin Nonhydrolyzable SOM Fine-silt, coarse-clay associated SOM</p>

Tableau I.1. | Les différents pools de SOM définis selon leurs cinétiques de décomposition et les fractions de MO relatives. (Wander, 2004).

Physical fractionation				
Aggregate size fractionation	Particle size fractionation	Density fractionation		
Macroaggregates (>250 μm)/wet sieving/slaking/dispersion (ultrasonic)	Clay-sized, silt-sized and sand-sized particles	Heavy fraction (organo-mineral complexes)	Light fraction	POM (particulate organic matter)
Separated using liquids with a certain density (between 1.6 and 2.0 g cm ⁻³)				
DOC (dissolved organic matter)/less than 0.45 μm in solution				
Chemical fractionation				
Chemical extractions	Hydrolysis	Oxidation		
Used to separate 'humic substances' into humic acids, fulvic acids and humin/based on solubility in alkali and acid solutions, the most common are NaOH and Na ₄ P ₂ O ₇ Microbial biomass C/i.e. chloroform used as fumigant	Used to separate hydrolytic bonding of carbohydrates/protein molecules, etc./for instance HF to separate mineral-OM associations/or HCl to quantify proportion of SOC association with proteins, amino acids, amino sugars	Used to remove labile/active fraction of SOM (i.e. plant residues)/most common agents are H ₂ O ₂ , NaOCl and KMnO ₄		

Tableau I.2. | Procédures physiques et chimiques de fractionnement du SOC (Stockman *et al.*, 2013).

1.2.3. PROCESSUS CHIMIQUES ET PHYSIQUES CONDITIONNANT LA DYNAMIQUE DE LA MATIERE ORGANIQUE DU SOL

La SOM représente un continuum biochimique très complexe dont les temps de résidence pour chacun de ses composés sont très variables (**Tab.I.3.**; Baldock *et al.*, 1991 ; Bol *et al.*, 1996 ; Fontaine *et al.*, 2003 ; Boddy *et al.*, 2007 ; Hill *et al.*, 2008).

Form	Composition	Pool category
Surface plant residue	Plant material residing on the surface of the soil, including leaf litter and crop/pasture material	Fast (or labile) pool Decomposition occurs at a timescale of days to years
Buried plant residue	Plant material greater than 2 mm in size residing within the soil	Fast (or labile) pool Decomposition occurs at a timescale of days to years
Particulate organic matter (POC)	Semi-decomposed organic material smaller than 2 mm and greater than 50 μm in size	Fast (or labile) pool Decomposition occurs at a timescale of days to years
'Humus'	Well decomposed organic material smaller than 50 μm in size that is associated with soil particles	Slow (or stable) pool Decomposition occurs at a timescale of years to decades
Resistant organic carbon (ROC)	Charcoal or charred materials that results from the burning of organic matter (resistant to biological decomposition)	Passive (or recalcitrant) pool Decomposition occurs at a timescale of decades to thousands of years

Tableau I.3. | Relations entre les différentes formes et composition de SOC et les pools de C (Stockman *et al.*, 2013).

La stabilité des différents pools de SOM dépend de la structure intrinsèque des composés organiques (*e.g.*, récalcitrante) mais cette dernière n'est pas suffisante pour expliquer leurs temps de résidence dans le sol. En effet, des études utilisant les isotopes stables de C ont mis en exergue que le temps de résidence de la SOM n'est pas corrélé à sa composition chimique (Amelung *et al.*, 2008). Ainsi, certains composés supposés persistants (*e.g.*, lignine) ont des temps de résidence inférieurs à celui de la SOM totale (**Fig.I.6** ; Knorr, 2005 ; Amelung *et al.*, 2008; Marschner, 2008 ; Schmidt *et al.*, 2011). Par ailleurs, d'autres composés potentiellement labiles (*e.g.*, sucres, acides aminés) peuvent persister dans le sol pendant des décennies (**Fig.I.6**).

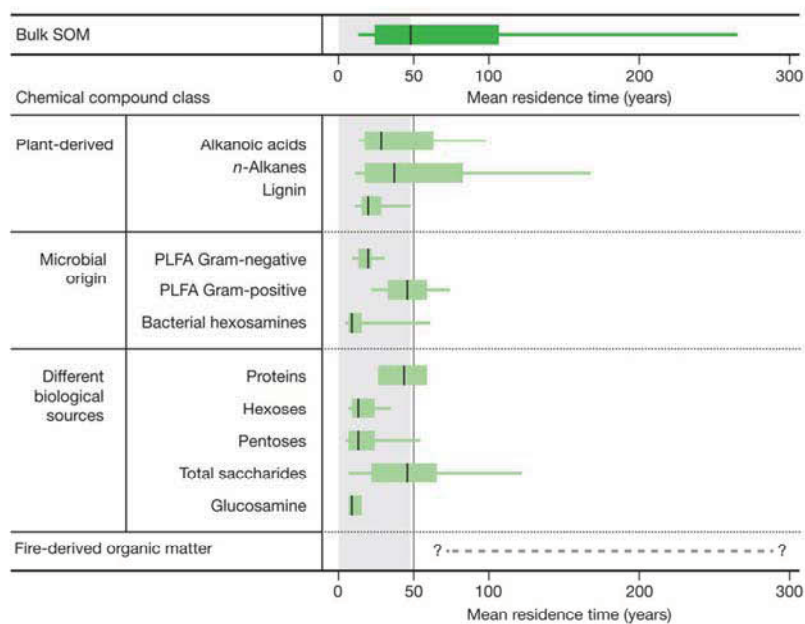


Figure I.6. | Temps de résidence de la SOM totale et des différents composés organiques constitutifs de la SOM. (Schmidt *et al.*, 2011).

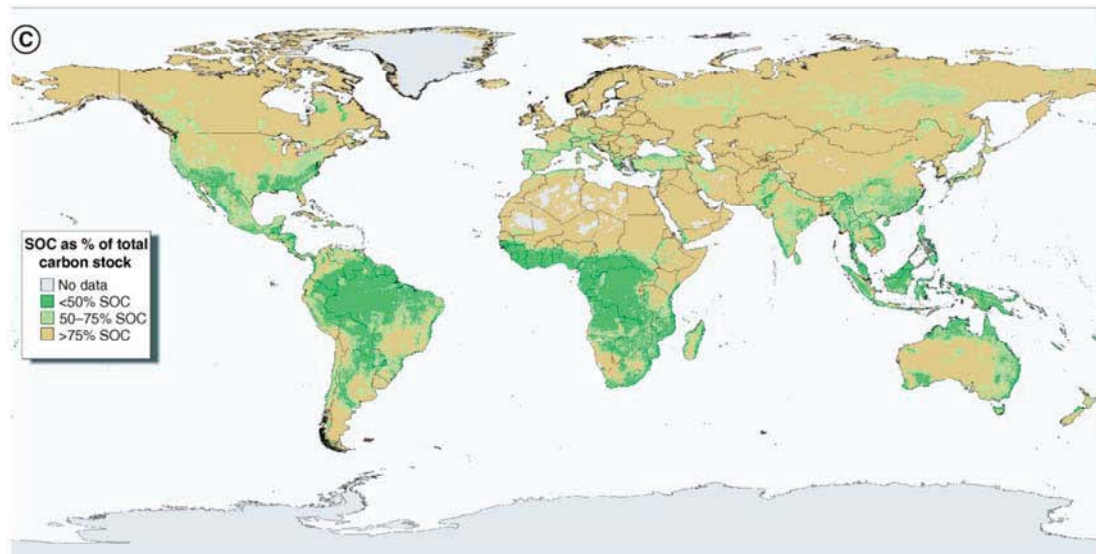


Figure I.8. | Distribution globale du SOC en pourcentage des stocks totaux de C présent dans le sol et la phytomasse (Scharlemann *et al.*, 2016).

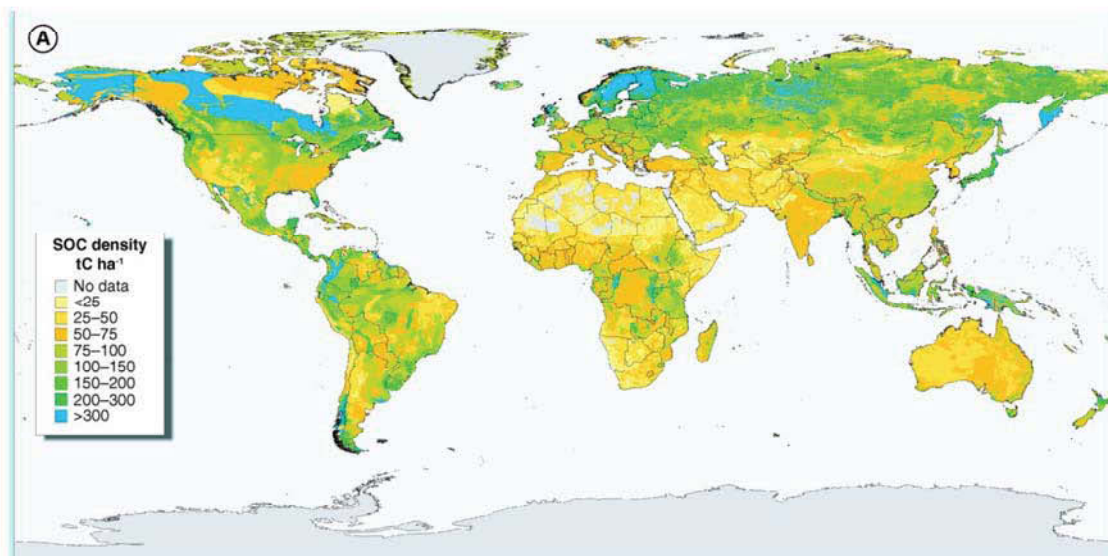


Figure I.9. | Distribution globale du SOC (en tonnes de C par ha) dans le premier mètre de sol (Scharlemann *et al.*, 2016).

La décomposition de la SOM n'est donc pas uniquement dépendante de la structure moléculaire des composés et des facteurs environnementaux intervenant sur l'activité de décomposition (*i.e.*, température, humidité, disponibilité en azote ; Parton *et al.*, 1987 ; Moorhead & Reynolds, 1991 ; Rastetter *et al.*, 1991 ; Currie & Aber, 1997). Certaines propriétés, autres que biochimiques, doivent être considérées lors de l'étude de la persistance des composés de la SOM (Schmidt *et al.*, 2011). Des liaisons chimiques fortes entre la SOM et les minéraux argileux, les minéraux faiblement cristallins et les oxydes de Fe et d'Al peuvent en effet s'établir et offrir une protection à la SOM contre la décomposition oxydative (Singer & Haug 1993) autorisant des temps de résidence plus importants (Mikutta & Kleber, 2005 ; Mikutta *et al.*, 2007). La protection physique de la MO est aussi une variable expliquant les différences de cinétiques de renouvellement entre la SOM et celle des différents composés organiques constitutifs (Dungait *et al.*, 2012) (**Fig.I.7**).

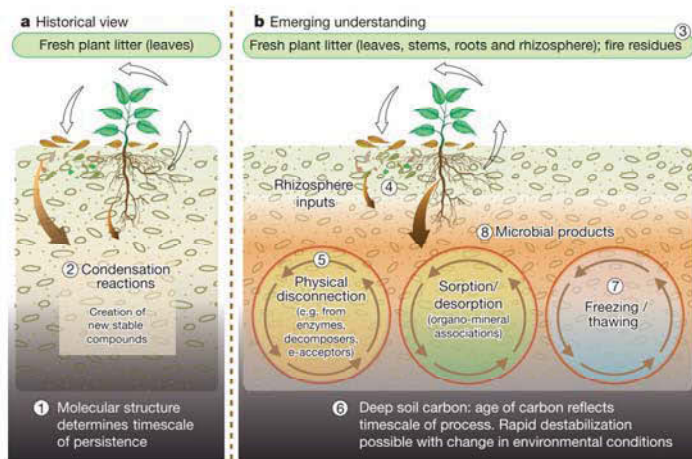


Figure I.7. Visions historique et émergente de la persistance de la SOM. Dans la vision historique (a), la MO stable est considérée comme intégrant les résidus de végétaux préservés et les produits synthétisés de novo comme les substances humiques dont la complexité chimique et la composition les rendent presque inerte à la dégradation microbienne. La vision émergente (b) est que la structure moléculaire (1) de la MO ne détermine pas nécessairement sa stabilité dans le sol. Au contraire, la dynamique de la SOM est gouvernée par de multiples processus (5) conditionnés par les conditions environnementales (*e.g.*, hétérogénéité physique) (Schmidt *et al.*, 2012).

Des études ont ainsi mis en évidence l'influence des agrégats sur l'accumulation de la SOM (Jastrow, 1996 ; Lal, 2004). Dans ce cadre, les micro- et nano-agrégats jouent des rôles importants dans la stabilisation de la MO *via* des processus d'adsorption et de piégeage (Chenu & Plante, 2006). D'un point de vue fonctionnel, l'architecture de l'espace poral contrôlerait le devenir de la MO en conditionnant l'accessibilité des substrats aux cellules microbiennes (Killham *et al.*, 1993) et en influençant l'activité microbienne à travers la diffusion d'oxygène dans les agrégats (Sextone *et al.*, 1985).

I.3. Valeurs et variabilité des stocks de carbone organique des sols

Le C organique représente la principale forme de C du réservoir terrestre (**Fig. I.8, I.9**). Il est stocké dans la biomasse végétale (450 to 650 PgC) (Prentice *et al.*, 2001) et dans la matière organique (vivante et morte) de la litière et des sols (1500 to 2400 PgC) (Batjes, 1996). Une quantité supplémentaire de C ancien est présent dans les sols de zones humides (300 à 700 PgC; Bridgham *et al.*, 2006) et dans le pergélisol (~ 1700 PgC) (Tarnocai *et al.*, 2009). Les sols constituent donc la plus grande réserve de carbone organique à la surface de la Terre et stockent 2 à 4 fois plus de C que le réservoir

Soil order	Area (Mha)	Soil organic carbon		Soil inorganic carbon	
		Density (tons/ha)	Pool (billion tons)	Density (tons/ha)	Pool (billion tons)
Alfisols	1262	125	158	34	43
Andisols	91	220	20	0	0
Aridisols	1570	38	59	290	456
Entisols	2114	42	90	124	263
Gelisols	1126	281	316	6	7
Histosols	153	1170	179	0	0
Inceptisols	1286	148	190	26	34
Mollisols	901	134	121	96	116
Oxisols	981	128	126	0	0
Rocky land	1308	17	22	0	0
Shifting sand	532	4	2	9	5
Spodosols	335	191	64	0	0
Ultisols	1105	124	137	0	0
Vertisols	316	133	42	50	21
Total	13,083		1526		945

Tableau I.4. | Stock de carbone dans les différents types de sols (Lal, 2004).

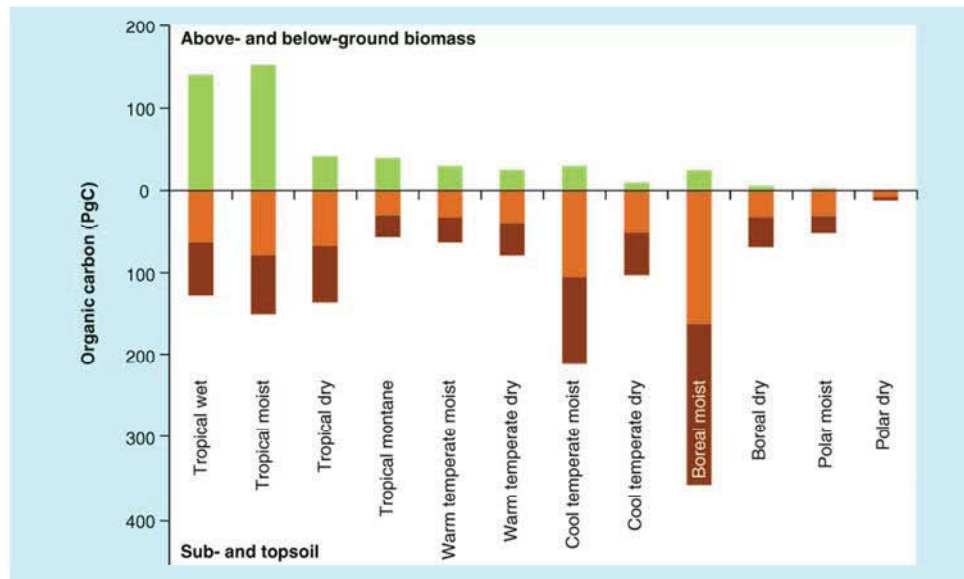


Figure I.10. | Stocks de carbone organique dans le sol et la phytomasse en fonction des régions climatiques (Scharlemann *et al.*, 2016).

atmosphérique. Cependant, les estimations des stocks mondiaux de SOC sont très variables (médiane = 1460 PgC, gamme : 504-3000 PgC, Scharlemann *et al.*, 2014). La concentration en SOC est également extrêmement variable en fonction des types de sols (**Tab.I.4**), des écorégions (**Fig. I.10**) des différents biomes terrestres (**Tab.I.5**, **Fig.I.7**).

Une hétérogénéité spatiale de la distribution du SOC est également observée. Par exemple, 2344 Pg de C organique sont stockés dans les trois premiers mètres du sol avec 54 % (1500 PgC) stocké dans le premier mètre et environ 615 PgC stocké dans les 20 premiers centimètres de sol (Jobbágy & Jackson, 2000; Guo & Gifford, 2002) (**Fig.I.11**).

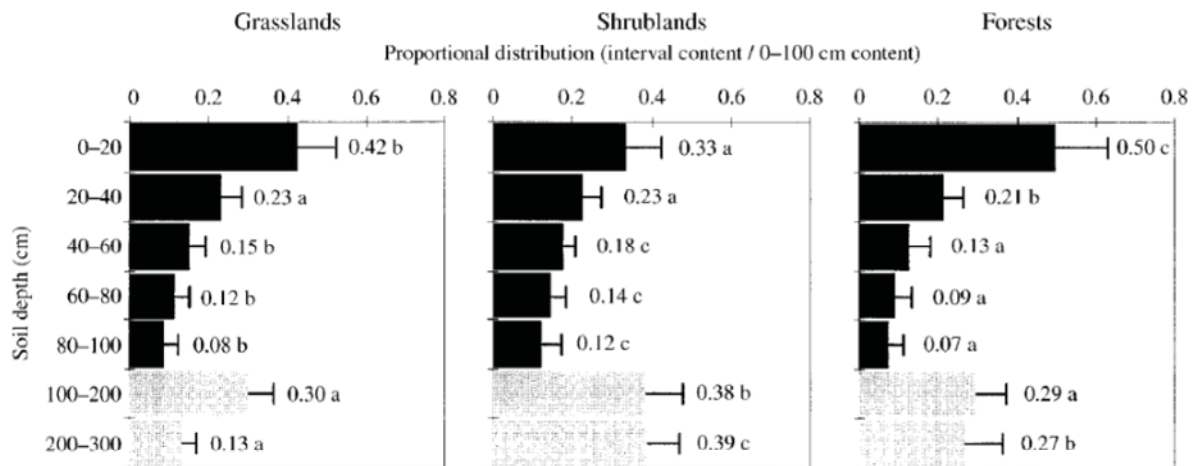


Figure I.11. Profils verticaux de distribution du SOC (Jobbágy & Jackson, 2000).

I.4. Importance du SOC dans le cycle global du carbone

Le CO₂ est absorbé depuis l'atmosphère *via* la photosynthèse des plantes (Production primaire brute (PPB), 123±8 PgC.an⁻¹; Beer *et al.*, 2010). Le C fixé dans la biomasse végétale circule entre les tissus des plantes, la litière et le sol et est émis sous forme de CO₂ dans l'atmosphère *via* la respiration des organismes autotrophes (plantes) et hétérotrophes (animaux et microorganismes du sol) et par certaines perturbations (*e.g.*, feu) sur des échelles de temps très variables (de quelques secondes à quelques milliers d'années). Une quantité importante du C terrestre (~1,7-2,7 PgC.an⁻¹) est transportée des sols vers les écosystèmes aquatiques continentaux. Une fraction de ce C est dégazée sous forme de CO₂ dans l'atmosphère (~0,8-1,2 PgC.an⁻¹) par les rivières et les lacs, une fraction est stockée dans les sédiments organiques d'eau douce (~0,2-0,5 PgC.an⁻¹), et une partie (~0,9 PgC.an⁻¹) est délivrée par les rivières à l'Océan côtier sous forme de CID (~0,1 PgC.an⁻¹), COD (~0,2 PgC.an⁻¹) et COP (~0,1-0,4 PgC.an⁻¹) (Cole *et al.*, 2007; Battin *et al.*, 2009; Tranvik *et al.*, 2009; Aufdenkampe *et al.*, 2011; Seitzinger *et al.*, 2005; Syvitski *et al.*, 2005; Mayorga *et al.*, 2010) (**Fig.I.12**).

Ces valeurs de SOC très importantes, qui contrastent avec les 9 PgC.an⁻¹ d'origine anthropique libérés dans l'atmosphère par la combustion des réserves fossiles de C (charbon, pétrole et gaz) et par la dégradation dans les écosystèmes (**Fig.I.13**), illustrent

l'importance du sol dans le cycle biogéochimique global du C. Par exemple, un changement de seulement 10% dans le pool de SOC serait équivalent à 30 ans d'émissions anthropiques et pourrait considérablement affecter les concentrations de CO₂ dans l'atmosphère (Kirschbaum, 2000). De la même façon, de faibles augmentations des taux d'oxydation du C des sols en raison de l'augmentation des températures pourraient entraîner de nouvelles augmentations de CO₂ dans l'atmosphère (Davidson & Janssens, 2006).

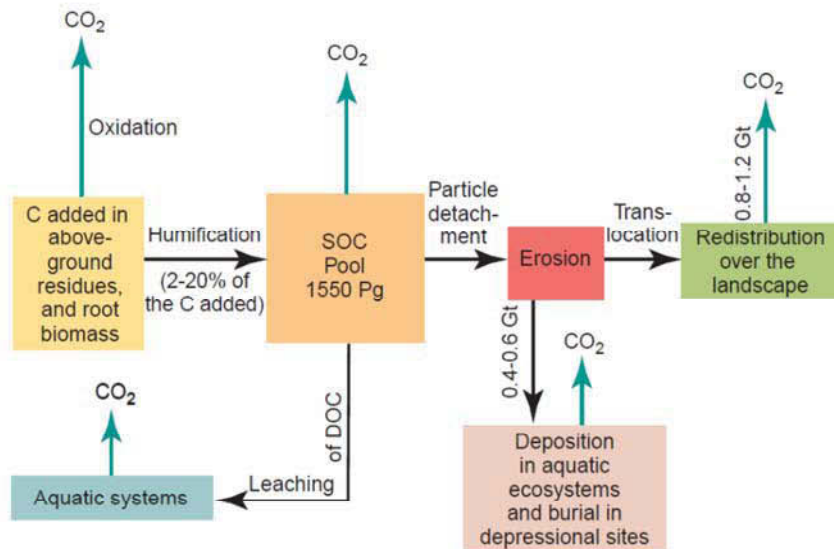


Figure I.12. | Processus affectant la dynamique du SOC (Lal, 2004).

II- EMISSIONS DE CO₂ PAR LES SOLS

II.1. La respiration des microorganismes hétérotrophes

Les sols sont le siège de nombreuses biotransformations résultant des activités catalytiques des diverses enzymes produites, principalement, par les microorganismes. Certaines conduisent à la synthèse de biomolécules (production de biomasse microbienne), d'autres à la formation d'édifices moléculaires complexes et à la construction d'agrégats moléculaires (humification). Le stade ultime des biotransformations est la conversion des MO en éléments chimiques inorganiques (minéralisation), comme le CO₂, par leur oxydation *via* la respiration des microorganismes hétérotrophes, par exemple. La décomposition des MO, majoritairement des bio-macromolécules contenues dans les résidus de plantes, telles que la cellulose, l'hémicellulose, la pectine, la chitine, la lignine et les tanins, nécessite l'intervention de consortia microbiens (Hedges & Oades, 1997; Gessner *et al.*, 2010) et requiert deux étapes principales : (i) la dépolymérisation de la MO insoluble en composés solubles assimilables, majoritairement des monomères et de petits oligomères (< 700 g.mol⁻¹, Hollibaugh & Azam, 1983; Pantoja & Lee, 1999) et (ii)

l'assimilation et l'intégration de ses molécules dans les métabolismes microbiens intracellulaires.

La dépolymérisation, suivie par la minéralisation des produits labiles, par les *Bacteria*, les *Archaea* et les champignons conditionne les cycles du C et des nutriments, la production végétale et les émissions de CO₂ vers l'atmosphère (Burns *et al.*, 2013).

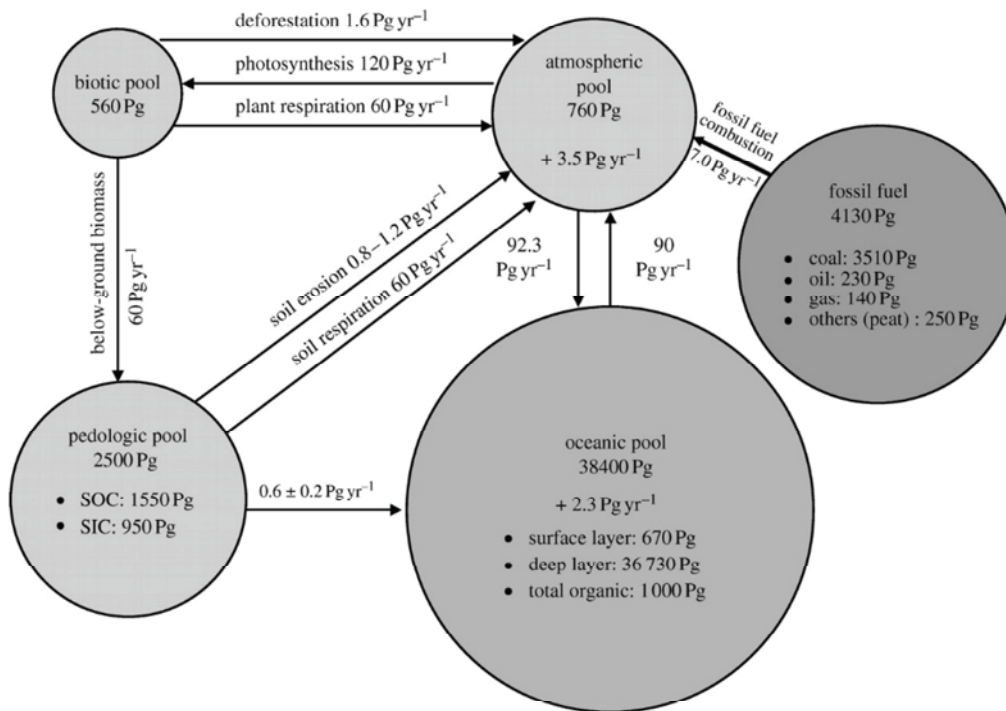


Figure I.13. | Flux de C entre les principaux réservoirs de C de la biosphère

II.1.1. LES MICROORGANISMES DES SOLS : abondance, diversité et structuration spatiale

En termes d'abondance et de diversité, les microorganismes, *i.e.*, procaryotes (bactéries et archées) et champignons, sont les organismes dominants dans les sols (Øvreås, 2000). Selon les estimations par comptage direct, un gramme de sol contient entre 10⁸ et 10¹⁰ microorganismes, mais des analyses basées sur l'ARNr 16S suggèrent que ces abondances seraient supérieures de 2 à 5 ordres de magnitude par rapport aux effectifs dénombrés par comptage direct (Sandaa *et al.*, 1999; Sogin *et al.*, 2006). La grande majorité des microorganismes des sols serait, néanmoins, en état de dormance (Swift *et al.*, 1979). La diversité microbienne dans un sol serait comprise entre 5000 et plus de 1 million d'"espèces" (Gans *et al.*, 2005; Schloss & Handelsman, 2006) dont une très grande majorité de ces espèces reste encore « incultivée » (*e.g.*, Streit & Schmitz, 2004; Lorenz & Eck, 2005; Steele & Streit, 2005). La diversité et le vaste potentiel biocatalytique des microorganismes leur permettent d'exploiter une large gamme de molécules organiques et de sources d'énergie (Handelsman *et al.*, 1998).

En dépit de leur abondance et de leur diversité, les microorganismes vivants occupent moins de 5 % de la surface totale des sols (Ingham *et al.*, 1985), et moins de 0,001% du volume du sol potentiellement habitable. La grande majorité de l'activité biologique se concentre en effet dans des "hot-spots" au sein des agrégats, à la surface des racines et de débris organiques (Parkin, 1987; Nannipieri *et al.*, 2003; Zoppini *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008; Briar *et al.*, 2011). Cependant, la diffusion et la convection de substrats (Poll *et al.*, 2006), des signaux, des métabolites, les enzymes extracellulaires (EE), ainsi que la motilité cellulaire, élargissent considérablement les zones d'influence des microorganismes (Burns *et al.*, 2013). La structuration des microorganismes au sein de microenvironnements est accentuée par la formation de biofilms et d'agrégats par les microorganismes eux-mêmes, leur fournissant des habitats et promouvant leurs activités enzymatiques (Davinic *et al.*, 2012). En effet, lors de la croissance de leurs populations, les microorganismes produisent des polymères résistants à l'hydrolyse (Robert & Chenu, 1992). Ce sont, par exemple, des adhésines impliquées dans la construction de biofilms et autorisant le piégeage et la rétention des microorganismes et de leurs EE coopérant dans la dégradation de la SOM (Burns *et al.*, 2013). Les microorganismes produisent également des exopolysaccharides et des glycoprotéines cimentant ensemble les particules d'argile adjacentes pour former des micro- ou des macro-agrégats (Wright & Upadhyaya, 1998 ; Rillig & Mummey, 2006; Six *et al.*, 2006). L'adhésion aux surfaces des particules organiques confère plusieurs avantages aux microorganismes vivants dans des environnements compétitifs (Gilbert *et al.*, 1993; Lock *et al.*, 1984; Blazina *et al.*, 2011). Ces avantages incluent (i) la protection des bactéries contre la prédation par les protozoaires; (ii) des niveaux plus élevés de nutriments minéraux et organiques que ceux présents dans la phase liquide du sol; (iii) une communication et des échanges (génétiques et métaboliques) facilités entre les microorganismes et, (iv) la concentration et la protection de combinaisons appropriées d'EE (Romani *et al.*, 2008). Néanmoins, l'épuisement des éléments nutritifs sur un site de surface implique la mise en œuvre de mécanismes autorisant la dispersion des cellules vers des sites plus favorables (Gram *et al.*, 2002). En conséquence, la connectivité des phases aqueuses du réseau poral, intermittente dans le sol, devient critique pour le succès des microorganismes. Ainsi, la structure du sol détermine la distribution spatiale des microorganismes au sein du réseau poral et leur accessibilité aux SOM (Ladd *et al.*, 1996; Six *et al.*, 2000; Ritz *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2006). La structure du sol semble également influencer directement sur les communautés microbiennes. En effet, une faible connectivité du réseau poral induit une augmentation de la diversité bactérienne (Carson *et al.*, 2010), et la taille des pores impacte la structure des communautés microbiennes (Ruamps *et al.*, 2011).

II.1.2. LA DEPOLYMERISATION EXTRACELLULAIRE

La décomposition des MO est assurée, en premier lieu, par des EE sécrétées dans le sol par les microorganismes (Skujins & McLaren, 1968; Burns, 1978a; 1982; Burns & Dick, 2002; Nannipieri *et al.*, 2002; Tabatabai & Dick, 2002; Caldwell, 2005; Burns *et al.*,

2013). Les EE sont, par exemple, des oxydases, des hydrolases et des phosphatases autorisant, notamment, (i) la dépolymérisation de la cellulose et de l'hémicellulose (*e.g.*, cellulase, cellobio-hydrolase, β -glucosidase), de la lignine [*e.g.*, phénol-oxydase, peroxydase, principalement produites par les communautés fongiques (Kirk & Ferell, 1987; Blanchette, 1991; Baldrian 2006; Osono, 2007; Sinsabaugh, 2010)], de la chitine (Ratledge, 1994), (ii) l'acquisition de nutriments (*e.g.*, P, N) nécessaires pour supporter les besoins stœchiométriques du métabolisme microbien (*e.g.*, protéase, peptidases Sinsabaugh *et al.*, 1993 ; Baldrian, 2009), (iii) l'oxydation des substances humiques (Spaccini *et al.*, 2000, Freeman *et al.*, 2001).

Bien que plusieurs modèles théoriques simples de décomposition ne prennent en compte que des pools d'une seule EE (*e.g.*, Schimel & Weintraub, 2003), la dépolymérisation extracellulaire résulte en réalité des activités simultanées et/ou séquentielles de différentes EE (Baldrian & Valášková, 2008), dont des EE spécifiques d'un substrat (*e.g.*, enzymes cellulolytique, protéolytique, et phosphatase), et des EE oxydatives non spécifiques (*e.g.*, laccase, peroxydase, Caldwell, 2005; Baldrian, 2006; Sinsabaugh *et al.*, 2009). A titre exemple, une cinquantaine d'EE sont impliquées dans la dégradation des feuilles avant que les produits de faible masse moléculaire n'entrent dans la cellule (Burns & Wallenstein, 2010). Ainsi, bien que les EE puissent diffuser loin de la cellule source (Burns *et al.*, 2013), différentes EE présentent une distribution concomitante dans l'espace au sein de "hot-spots" de décomposition résultant de leur production simultanée en réponse à la présence d'un substrat complexe approprié (Fenner *et al.*, 2011 ; Baldrian, 2014).

Considérant que les microorganismes sont les producteurs, et donc les principaux régulateurs de l'activité des EE, des corrélations significatives entre la biomasse microbienne et l'activité de diverses EE sont fréquemment observées (Baldrian & Šnajdr, 2011). Cependant, il existe des exceptions à cette règle pour plusieurs raisons : (i) une proportion de la biomasse microbienne peut-être métaboliquement inactive pendant certaines périodes de temps (Swift *et al.*, 1979), (ii) le "turn-over" de la biomasse microbienne est plus rapide que celui des EE, une fraction significative de l'activité enzymatique pouvant en effet persister dans le sol longtemps après la mort des producteurs microbiens (Bonmati *et al.*, 1991), (iii) des mécanismes de régulation et des stratégies écologiques existent pour minimiser les coûts liés à la production et à la sécrétion d'EE (Allison *et al.*, 2011).

II.1.2.1. Persistance des activités des EE dans le sol

Le sol est un environnement contraignant pour les EE qui, lorsqu'elles quittent la cellule, peuvent être soumises à des processus de dénaturation, de dégradation, de sorption et de dilution (Burns & Wallenstein, 2010). La maintenance de leurs activités suppose des propriétés de résistance accrues en comparaison de celles requises en contexte intracellulaire. La persistance des activités des EE dans le sol résulte également de mécanismes de stabilisation et de protection *via* des interactions avec les minéraux argileux, les acides humiques et la MO particulaire (Burns 1978; 1982; Burns *et al.*,

2013 ; Nannipieri *et al.*, 2002 ; Joannis *et al.*, 2007 ; Caldwell, 2005; Wallenstein & Weintraub, 2008).

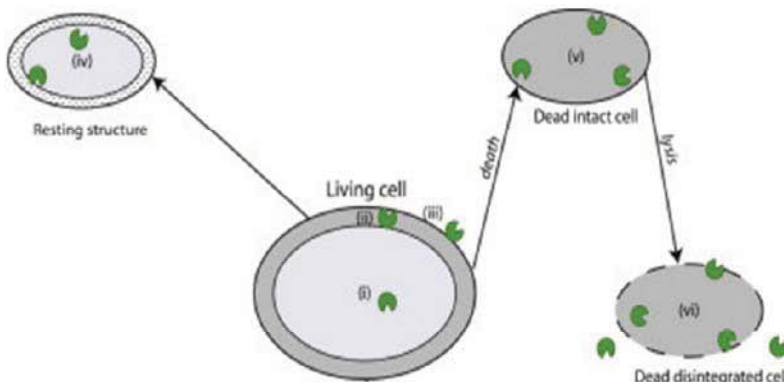
Ce sont les différentes localisations des EE dans le sol (**Fig. II.1**) et la diversité de leurs propriétés et de leurs activités qui optimisent, et garantissent à la communauté microbienne, l'accès à des substrats exogènes solubles (Wallenstein & Burns, 2011).

<p style="text-align: right;">A.</p> <p>Enzymes associated with living proliferating cells</p> <p>Cytoplasmic Periplasmic Bound to cell wall Secreted by living cells</p>	<p style="text-align: right;">B.</p> <p>Enzymes associated with viable but non proliferating cells</p> <p>Microbial spores Resting vegetative cells Protozoan cysts Plant seeds</p>
<p style="text-align: right;">C.</p> <p>Enzymes associated with biological debris</p> <p>Bound to intact dead cells Bound to cell fragments Diffused away from disintegrated cells</p>	<p style="text-align: right;">D.</p> <p>Enzymes associated with soil components</p> <p>Humic substances Clay minerals their substrates</p>

Figure II.1. | Localisation des activités enzymatiques des enzymes liées dans le sol (Ruggiero *et al.* , 1996).

a. EE liées à des composantes cellulaires (Fig. II.2.)

Les pertes diffusionnelles des EE retenues sur la paroi cellulaire sont limitées et ces EE sont également susceptibles d'être configurées afin que leurs sites actifs soient exposés et que les zones sensibles à l'attaque par les protéases soient protégées (Burns *et al.*, 2013). Bien que cette localisation confère une protection certaine aux EE, la probabilité d'accéder à un substrat distant de la cellule est réduite par rapport aux EE diffusibles. Ceci implique que les cellules qui conservent leurs EE sont dépendantes de phénomènes tels que le mouvement brownien (Burns *et al.*, 2013), et/ou de processus chemotaxiques afin d'entrer en contact avec le substrat (*e.g.* Parales & Harwood, 2002). Les EE en contact étroit avec la cellule productrice peuvent également être contenues

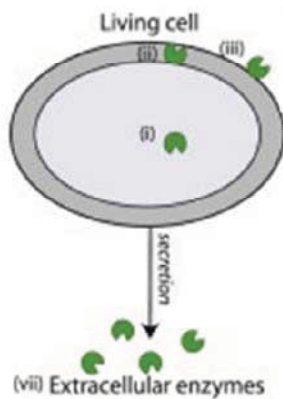


dans un biofilm polysaccharidique (capsule) (Flemming & Wingender, 2002; Romani *et al.*, 2008), ou dans des structures spécialisées (*e.g.*, cellulosomes, polysome) (Bayer *et al.*, 2008 ; Fontes & Gilbert, 2010).

Figure II.2. | Localisation des enzymes liées à des composantes cellulaires : (i) dans le cytoplasme des cellules microbiennes, (ii) dans l'espace périplasmique des bactéries Gram-négative, (iii) à la surface externe des cellules avec leur site actif exposé vers l'environnement sol, contenues dans des polysomes ou dans des biofilms, (iv) dans des cellules en dormance (spores, kystes), (v) attachées à des cellules mortes ou des débris cellulaires, (vi) relarguées par la lyse cellulaire (Burns *et al.*, 2013).

b. *EE diffusibles* (**Fig. II.3.**)

La plupart des EE diffusent à distance de la cellule productrice (Burns *et al.*, 2013).



La résistance de ces EE dans le sol résulte de modifications structurales post-traductionnelles (*e.g.*, glycosylation, pont disulfures) qui confèrent aux EE diffusibles une résistance à la température, aux protéases et aux variations de pH (Zhang & Ten Hagen, 2011 ; Burns *et al.*, 2013). En outre, des antibiotiques et des inhibiteurs de protéases peuvent être co-sécrétés (Kang *et al.*, 2006) suggérant l'existence de mécanismes de défense chimique pour protéger les EE de la dégradation et des "compétiteurs" (Schwarz & Zverlov, 2006).

Figure II.3. | Enzymes diffusibles, libres dans le sol (Burns *et al.*, 2013).

c. *EE liées aux particules organiques et minérales* (**Fig.II.4.**)

Les EE dans le sol sont essentiellement adsorbées sur les minéraux argileux, les acides humiques et la MO particulaire (Kandeler, 1990 ; Burns *et al.*, 2013). L'immobilisation des EE sur des particules organo-minérales du sol peuvent notamment résulter d'interactions s'établissant entre les groupements carboxyles et sulfhydriles des protéines et les groupements phénoliques des acides humiques, et, d'interactions entre les groupements NH_4^+ et les charges négatives supportées par les acides humiques et les argiles (Stotzky, 1986).

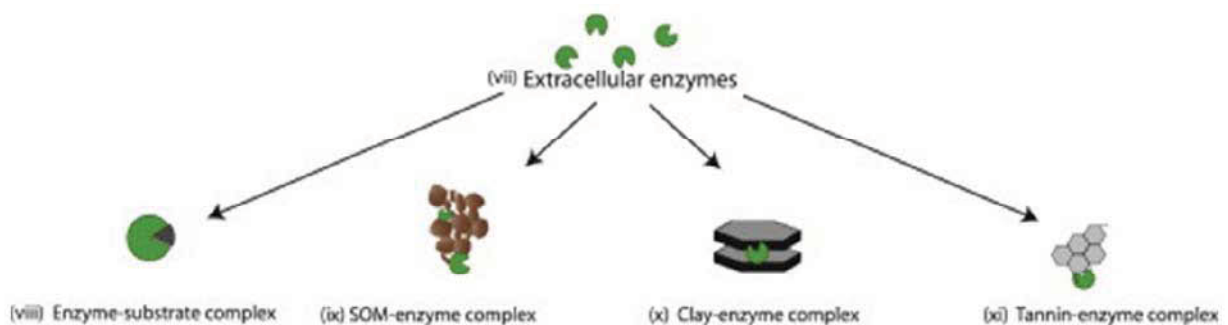


Figure II.4. | Enzymes liées aux particules organiques et minérales dans le sol (viii) associées dans des complexes enzymes-substrats, (ix) complexées avec la SOM par absorption, piégeage ou copolymérisation, (x) adsorbées à la surface de minéraux argileux, (xi) liées aux tanins (Burns *et al.*, 2013).

Les propriétés du sol conditionnant l'adsorption des EE sur les colloïdes sont majoritairement le pH, la capacité d'échange cationique (CEC), la surface et le contenu en MO (Frankenberger & Johanson, 1982). Cependant, les mécanismes d'immobilisation et de stabilisation des activités enzymatiques se produisant naturellement dans le sol ne sont pas encore complètement caractérisés.

Dans le domaine des biotechnologies, les mécanismes principalement utilisés pour immobiliser et stabiliser les enzymes sont l'adsorption, le piégeage, la microencapsulation, les échanges d'ions, la réticulation, la copolymérisation et l'attachement covalent (**Fig. II.5.**).

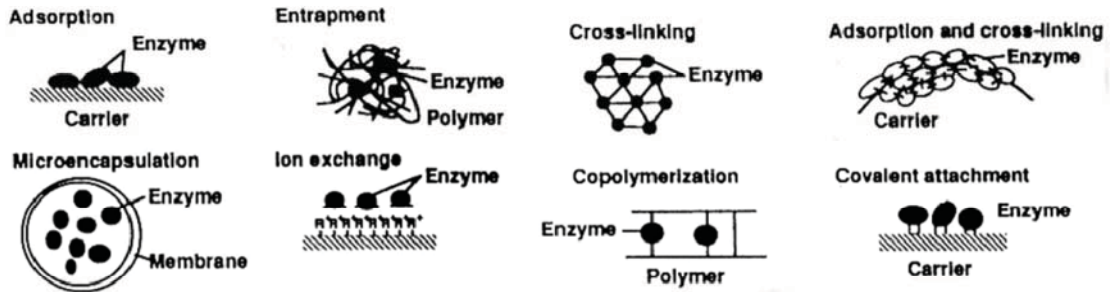
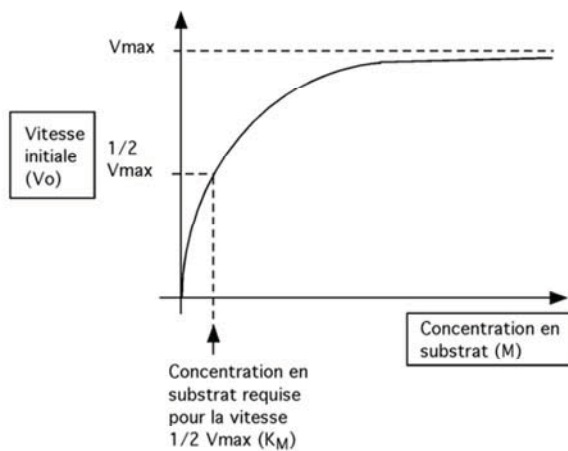


Figure II.5.] Représentation schématique des méthodes d'immobilisation et de stabilisation des enzymes en Biotechnologie (Weetall, 1993).

L'adsorption des EE sur les particules organiques et minérales du sol a deux effets principaux : la protection des enzymes qui conservent ainsi leurs activités pendant des périodes de temps importantes (Burns *et al.*, 1972; Burns, 1986; Boyd & Mortland, 1986; Dick & Tabatabai, 1987) et la modification des paramètres cinétiques enzymatiques (**Fig.II.6**) avec, généralement, une vitesse maximale (V_{max}) de la réaction



enzymatique diminuée et une constante de Michaelis-Menten (K_M) augmentée par rapport aux EE diffusibles (Stotzky, 1986; Quiquampoix, 2000). Cette activité réduite des EE complexées résulte notamment d'une accessibilité restreinte au substrat, de l'obstruction des sites actifs et/ou de changements conformationnels (Allison & Jastrow, 2006; Nannipieri, 2006; Quiquampoix & Burns, 2007).

Figure II.6] Courbe présentant une cinétique enzymatique basée sur l'équation de Michaelis-Menten :
 $V_0 = V_{max} [S]/(K_M+[S])$

Néanmoins, ces EE immobilisées sur les colloïdes du sol représentent un réservoir important de l'activité catalytique potentielle (Burns *et al.*, 2013). Ces dernières pourraient être la première réponse catalytique à des changements dans la disponibilité du substrat, et des générateurs de molécules signal pour la communauté microbienne. Les EE liées aux particules de sol pourraient également assurer le turn-over des substrats durant les périodes où la biomasse microbienne est faible (Stursova & Sinsabaugh, 2008).

d. Cinétiques enzymatiques dans les sols

La description des cinétiques des EE dans les sols est beaucoup plus complexe que dans des milieux homogènes comme les solutions en raison de la modification des paramètres cinétiques enzymatiques due à l'immobilisation des EE. Les effets de l'immobilisation sur le comportement cinétiques des enzymes peuvent être classés en quatre groupes (Goldstein, 1972) :

- *les effets conformationnels et stériques* : l'immobilisation peut conduire à des altérations conformationnelles des enzymes et rendre le site actif inaccessible au substrat,
- *les effets de cloisonnement* : aucun support n'est complètement inerte, les interactions polaires et apolaires avec les composés de faible poids moléculaire peuvent induire des différences dans les concentrations des substrats, des produits, des cofacteurs, etc. présents dans l'environnement du support et dans la solution,
- *les effets du microenvironnement* : les enzymes immobilisées sont présentes dans un environnement différent de celui d'une solution. En conséquence, les interactions enzyme-substrat, ainsi que les étapes subséquentes de la réaction catalytique, peuvent être significativement modifiées,
- *les effets diffusionnels* : la diffusion des substrats et ou des produits à partir du site de la réaction enzymatique peut être restreinte par la présence du support, les concentrations en substrat, produit et cofacteur à proximité immédiate de l'enzyme seront donc différentes de celles en solution.

Quantifier spécifiquement et séparément les activités des EE de celles des enzymes intracellulaires (IE) est également complexe du fait qu'une même enzyme peut (i) présenter plusieurs isoformes [intra- ou extra- cellulaire ; différentes origines (*e.g.*, bactérienne, fongique)] contribuant à l'activité enzymatique globale (Burns 1978b, 1982) et (ii) avoir différentes localisations [intracellulaire, associée à la cellule source (cette dernière pouvant être vivante, morte, proliférant ou non proliférant), diffusible, liée aux particules organo-minérales)].

Il convient également de noter que certaines des enzymes liées (*e.g.*, uréase, phosphatases) ne sont pas extracellulaires *sensu stricto* mais ont été extériorisées à la suite de la mort et de la lyse de la cellule productrice.

II.1.2.2. Régulation et écologie des EE

Les mécanismes extracellulaires de dépolymérisation de la SOM nécessitent l'allocation d'énergie cellulaire pour la synthèse et la sécrétion des EE, pour la formation et l'organisation des transporteurs membranaires internalisant les métabolites et pour l'émission des signaux de production et de détection de substrats potentiels et de microorganismes partenaires (Burns *et al.*, 2013). Bien que représentant un coût énergétique évident pour la cellule, les EE sont un pré-requis pour le succès des microorganismes dépendant de la dégradation des polymères. L'allocation du C et des nutriments pour la production d'EE par ces microorganismes est donc une priorité pour

prévenir la carence nutritive (Schimel & Weintraub, 2003). Ceci reflète les mécanismes de « l'économie » cellulaire : les cellules subissent des pressions pour réduire les besoins énergétiques de la production d'EE mais doivent maintenir une concentration suffisante des produits de la catalyse pour soutenir les fonctions cellulaires et maintenir leur viabilité. La production d'EE requiert entre 1 et 5 % du C et de l'N assimilé par la cellule (Frankena *et al.*, 1988). Plus récemment, il a été estimé que les microorganismes doivent allouer un minimum de 2 % du C assimilé à la production d'EE pour soutenir la biomasse (Schimel & Weintraub, 2003).

La sélection naturelle aura donc tendance à promouvoir, à l'échelle cellulaire et à l'échelle de la communauté, des stratégies de production d'EE qui minimisent les coûts en C et en éléments nutritifs pour la cellule et qui maximisent les bénéfices associés (Allison *et al.*, 2011).

a- Stratégies à l'échelle cellulaire

- Limiter les coûts de production : les ressources contenues dans les protéines extracellulaires (*i.e.*, EE) sont moins susceptibles d'être recyclées que leurs homologues intracellulaires, les coûts de production doivent donc être minimisés. Il a été démontré que le coût en énergie (ATP) de production par unité de masse de protéines sécrétées est significativement inférieur à celui de production des protéines intracellulaires (Smith & Chapman, 2010).

- Réguler les niveaux de production : en situation de stress physiologique ou en l'absence prolongée de substrat, le déficit énergétique résultant de la synthèse et de la sécrétion de l'EE constitutive pourrait être létal pour la cellule (Tiemann & Billings, 2011). Dans ces circonstances, il est probable que la cellule réoriente ses efforts vers de processus qui maintiennent l'intégrité et la viabilité cellulaires. Cependant, les cellules peuvent, dans certains cas, maintenir la sécrétion de très faibles quantités d'EE afin de permettre aux microorganismes de détecter et de réagir aux changements dans la disponibilité du substrat (Allison *et al.*, 2011). Si le substrat est présent, ces enzymes génèrent des signaux constitutifs qui induisent la synthèse d'enzymes supplémentaires (Olander & Vitousek, 2000; Treseder & Vitousek, 2001). La synthèse *de novo* de nombreuses d'EE cellulolytiques est stimulée en présence d'un substrat approprié ou d'un autre inducteur. Par contraste, de nombreuses ligninases répondent à des facteurs de stress tels que le potentiel redox, la force ionique ou le Fe²⁺ (Burns & Wallenstein, 2010). Ainsi, l'induction de la synthèse et de la sécrétion d'EE est généralement gouvernée par des concentrations locales de substrat, même si le substrat lui-même n'est pas l'inducteur effectif.

b- Stratégies à l'échelle de la communauté

Peu de microorganismes sécrètent l'ensemble des EE nécessaires à la solubilisation de polymères complexes et doivent donc coopérer avec d'autres microbes pour produire les métabolites solubles (Gessner *et al.*, 2010). Par ailleurs, même si les EE produites

restent fonctionnelles dans le sol, le substrat peut ne pas être trouvé, et, même si il l'est, la combinaison correcte des EE doit être présente pour que la catalyse se réalise. Aussi, la communauté microbienne dans son ensemble peut modifier la production de différents groupes d'EE pour que cette dernière réponde aux besoins "communautaires" : augmenter l'approvisionnement dans l'élément le plus limitant (Sinsabaugh & Moorhead, 1994 ; Sinsabaugh *et al.*, 2009) et cibler le substrat le plus abondant (Sistla & Schimel, 2012).

- Le "Quorum sensing" : des densités et une composition appropriées de microorganismes sont les conditions *sine qua non* pour la réussite de la catalyse extracellulaire et la prolifération subséquente des populations microbiennes. De nombreux microorganismes (peut-être tous) produisent et répondent à des signaux qui les informent sur leur environnement immédiat (von Bodman *et al.*, 2008). Par exemple, les bactéries libèrent et détectent des molécules qui contrôlent les densités cellulaires (Fuqua *et al.*, 1994 ; Redfield, 2002). Ce phénomène, appelé "*quorum sensing*" (Shank & Kolter, 2009), peut également permettre de détecter le taux de diffusion de molécules sécrétées par les cellules (Ekschmitt *et al.*, 2005).

Il a ainsi été suggéré que les producteurs d'EE pourraient utiliser la détection de molécules auto-inductrices pour détecter l'emplacement, la qualité et la quantité du substrat, et pour réguler, en conséquence, la production d'EE (Allison *et al.*, 2007a ; 2007b). Lorsque la concentration en auto-inducteur dépasserait un certain seuil, indiquant que le substrat, la densité et la composition microbienne sont appropriées, la production d'EE serait induite (Barnard & Salmond, 2007 ; Badri *et al.*, 2009 ; Mathesius, 2009 ; Pang *et al.*, 2009 ; Babalola, 2010).

- La "stratégie charardeur" : la communication au sein des populations microbiennes (*i.e.*, "*quorum sensing*") renforce l'idée que la minéralisation est un processus largement coopératif à l'échelle de la communauté. Cependant, une fois générés, les produits de la dépolymérisation extracellulaire peuvent être interceptés et bénéficier à d'autres microorganismes (*i.e.*, "les charardeurs" (Allison 2005) ou "les opportunistes" (Moorhead & Sinsabaugh, 2006) n'ayant pas investi de ressources et d'énergie dans leur production (Allison 2005). Ainsi, certains groupes microbiens semblent être globalement des producteurs (*e.g.*, Basidiomycetes) alors que les "opportunistes" semblent dominer au sein des *Beta-Proteobacteria* et des *Bacteroidetes* (Fierer *et al.*, 2007).

La présence de charardeurs ralentit le taux de décomposition de la MO en exerçant un effet tampon : toute augmentation de l'efficacité des EE est contrebalancée par une augmentation de l'abondance des charardeurs, ce qui proportionnellement réduit la quantité d'EE produites au niveau de la communauté (Kaiser *et al.*, 2014 ; 2015). Les « interactions sociales » entre producteurs et charardeurs pourraient donc faciliter l'accumulation de C. L'omniprésence des opportunistes exploitant le système des "producteurs" pourrait ainsi être un facteur clé pour certains services écosystémiques tels que la séquestration du C, la rétention de l'N, et l'acclimatation des taux de décomposition à des conditions environnementales fluctuantes.

II.1.3. LA RESPIRATION DES MICROORGANISMES HETEROTROPHES DES SOLS

II.1.3.1. Généralité sur les processus biochimiques de la respiration cellulaire

II.1.3.1.1. Vue globale de la respiration cellulaire aérobie

La respiration cellulaire aérobie est une série spécifique de réactions d'oxydoréductions contrôlées par des enzymes intracellulaires dans laquelle l'O₂ est utilisé comme accepteur final d'électrons (e⁻) et le glucose est oxydé en CO₂ et H₂O. L'énergie chimique contenue dans les liaisons covalentes (O-H, C-H, C-C) de la molécule de glucose est convertie en ATP (**Fig.II.7**).

L'oxydation complète d'une molécule de glucose en CO₂ implique 3 voies métaboliques ou enzymatiques distinctes : la glycolyse, le cycle de Krebs, le système de transporteurs d'e⁻ (STE).

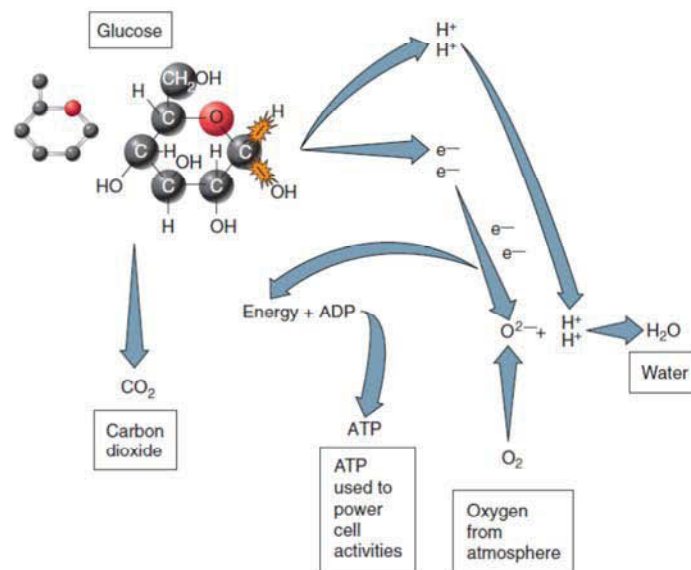


Figure II.7. | Schéma synthétique de la respiration cellulaire aérobie : une série de réactions d'oxydoréduction (Source : https://fr.wikiversity.org/wiki/Glucides_et_leur_m%C3%A9tabolisme/Catabolisme).

II.1.3.1.2. Voies métaboliques de la respiration cellulaire aérobie : exemple des cellules eucaryotes

a- La glycolyse

La glycolyse est une série de réactions enzymatiques se déroulant dans le cytoplasme des cellules. Elle aboutit (i) au clivage d'une molécule de glucose en 2

molécules de phospho-glycéraldéhyde (glycéraldéhyde-3-phosphate) qui subissent une modification supplémentaire pour former du pyruvate ($C_3H_4O_3$), (ii) à la libération d'é- pris en charge par des molécules transporteurs d'e- ($2 NAD^+ \rightarrow 2 NADH$) qui les transfèrent au STE et, (iii) à la formation de 2 molécules d'ATP (**Fig.II.8**). Un apport d'énergie, sous forme d'ATP, est nécessaire pour initier la glycolyse car le glucose est une molécule très stable qui ne se convertit pas spontanément pour libérer de l'énergie.

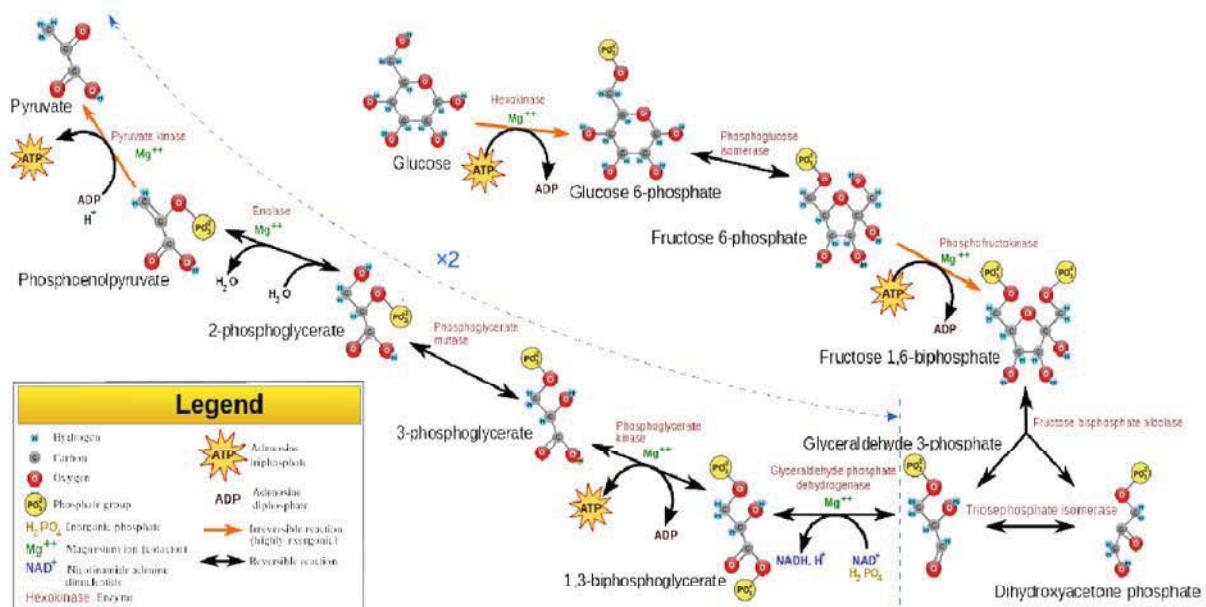
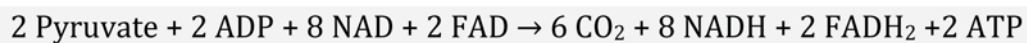


Figure II.8.] Les étapes de la glycolyse : durant la séquence de réactions biochimiques, la molécule à 6 C de glucose est oxydée, du pyruvate (ou acide pyruvique) est produit, les électrons sont pris en charge par de NAD⁺ et de l'ATP est formé. (Source : https://fr.wikiversity.org/wiki/Glucides_et_leur_m%C3%A9tabolisme/Catabolisme).

b- Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide tricarboxylique (TCA)) est une série de réactions enzymatiques se déroulant dans les mitochondries des cellules eucaryotes et impliquant le transfert de l'acide pyruvique depuis le cytoplasme dans la mitochondrie (**Fig. II.9**).



Le cycle de Krebs aboutit à (i) l'oxydation complète d'une molécule de pyruvate en 3 CO₂, (ii) à la libération d'e⁻ pris en charge par des molécules transporteurs d'e⁻ (4 NAD→4 NADH +et et 1FAD→1FADH₂) qui les transfèrent au STE et, (iii) à la formation d'une molécule d'ATP.

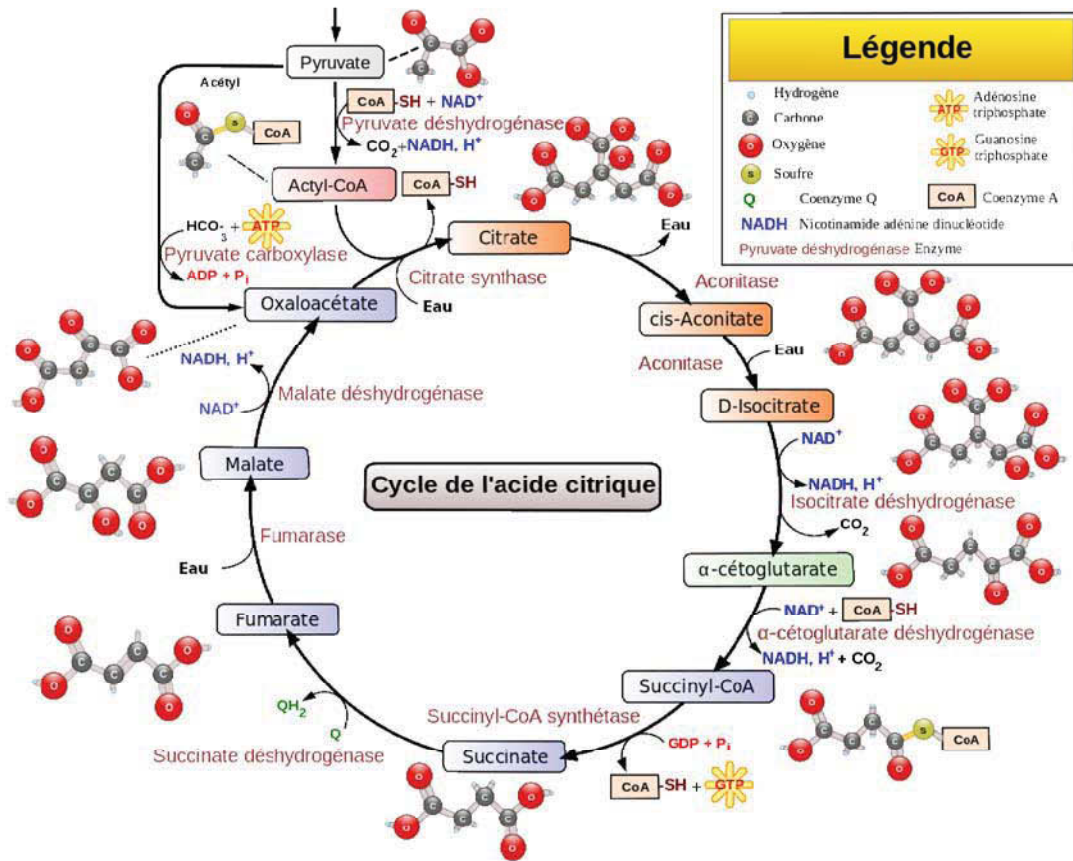


Figure II.9. | Les étapes du cycle de Krebs
 (Source : https://fr.wikiversity.org/wiki/Glucides_et_leur_m%C3%A9tabolisme/Catabolisme).

c- Le système de transporteur d'e⁻ (STE)

L'énergie contenue dans les molécules de NADH et de FADH₂ générées au cours de la glycolyse et du cycle de Krebs est utilisée pour produire de l'ATP par le STE. C'est l'étape finale de la respiration aérobie. Elle consiste en une série de réactions d'oxydoréduction au cours desquelles les e⁻ sont transférés depuis le NADH et le FADH₂ à différentes molécules transporteurs (complexe enzymatique) localisées sur la membrane interne des mitochondries et *in fine* à l'O₂, l'accepteur final d'e⁻. La production d'ATP par le STE implique 2 processus interconnectés : le transfert successif d'e⁻ entre différents transporteurs et la phosphorylation oxydative de l'ADP. Les e⁻ portés par le NADH et le FADH₂ sont transférés au complexe enzymatique I et II, respectivement, où ils perdent une partie de leur énergie. Pris en charge par le coenzyme Q, les e⁻ sont transférés au complexe III. Dans le complexe III, les e⁻ perdent une quantité additionnelle d'énergie et sont transférés au cytochrome c puis au complexe IV et finalement à l'O₂. Les atomes d'oxygène chargés négativement se combinent à l'hydrogène pour former de l'eau (**Fig.II.10**).

Lorsque les e^- perdent de l'énergie dans le complexe I, III et IV, des protons sont pompés dans l'espace inter-membranaire. Il en résulte un gradient de concentration en H^+ . Cette énergie est utilisée pour activer l'ATPase conduisant à la phosphorylation oxydative de l'ADP et donc à la production d'ATP. Pour deux molécules de pyruvate, 32 molécules d'ATP sont produites à partir des e^- de l'hydrogène qui entrent dans le STE.

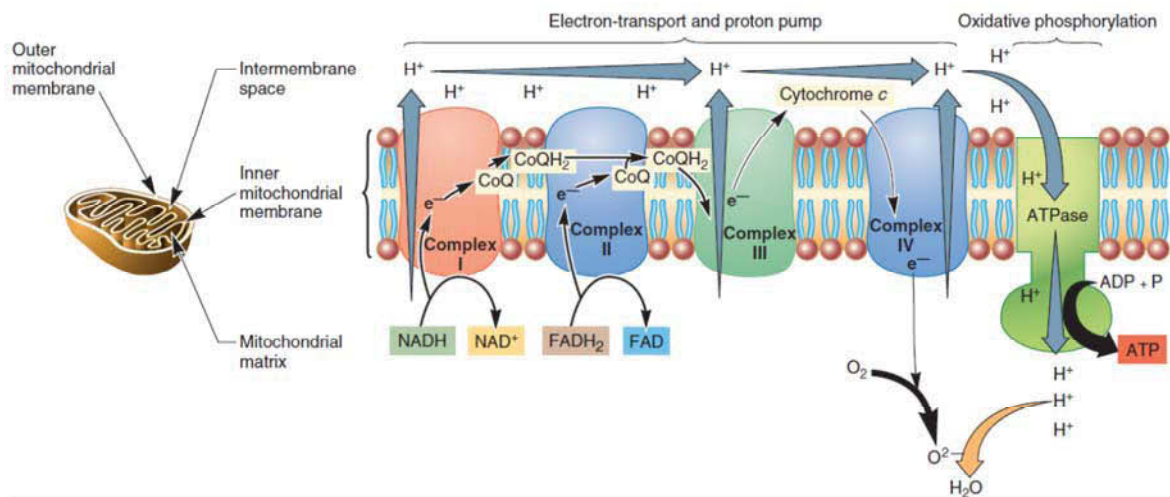


Figure II.10. | Le système de transporteurs d' e^- (STE).

II.1.3.1.3. Respiration cellulaire chez les procaryotes

Les procaryotes ne disposent pas de mitochondries, il existe donc des différences avec la respiration aérobie eucaryote. La membrane plasmique et le cytoplasme des cellules procaryotes réalisent les fonctions de la membrane interne des mitochondries eucaryotes et de la matrice mitochondriale, respectivement. En conséquence, chez les procaryotes, la glycolyse, l'oxydation du pyruvate et le cycle de Krebs sont effectuées dans le cytoplasme et le STE et l'ATPase sont liés à la membrane cellulaire.

Outre la respiration aérobie (utilisant une chaîne respiratoire impliquant l' O_2 comme accepteur final d' e^-), certains procaryotes peuvent également réaliser des processus de fermentation et de respiration anaérobie (Fig. II.11). Ces derniers utilisent une chaîne respiratoire avec les sulfates (sulfato-réduction), les nitrates (dénitrification) et différents accepteurs d' e^- (e.g., méthanogénèse, ferro-réduction) autres que l' O_2 comme accepteurs finaux d' e^- . Les activités de certains microorganismes anaérobies, les *Archaea* méthanogènes, conduisent à l'émission de méthane (CH_4) dans l'atmosphère (Blodau *et al.*, 2007).

Dans les environnements terrestres, les flux de CH_4 sont prédominants dans les sols gorgés d'eau (Itoh *et al.*, 2009 ; Angel *et al.*, 2012), les tourbières (Kellner *et al.*,

2006; Ward *et al.*, 2013), le pergélisol (Bhullar *et al.*, 2013 ; Nakano *et al.*, 2000) et les rizières (Berger *et al.*, 2013; Kao-Kniffin & Zhu, 2013 ; Oo *et al.*, 2013).

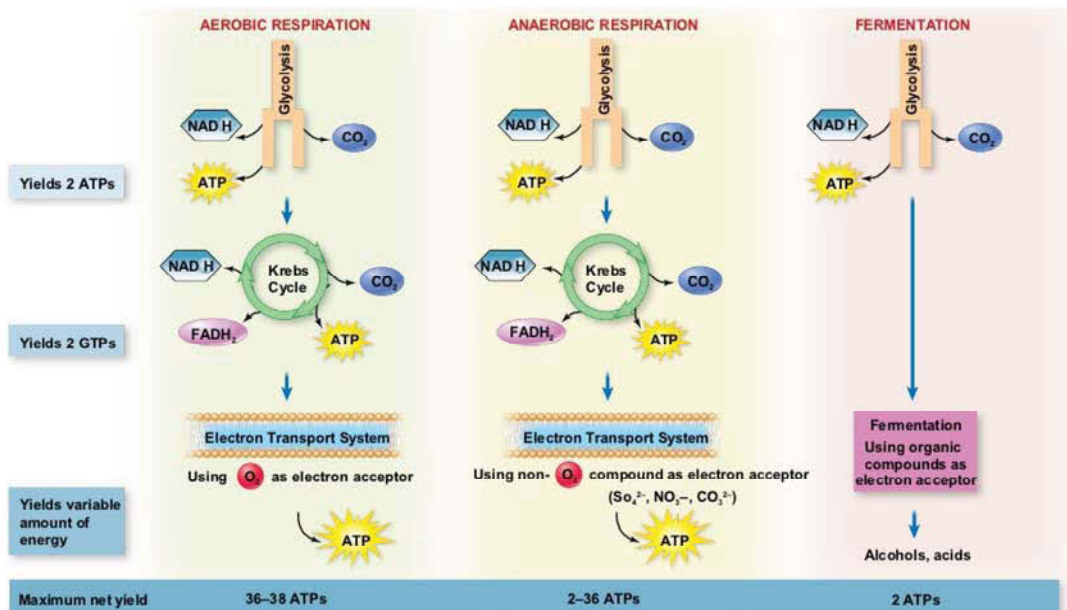


Figure II.11. | Les principaux processus cataboliques des procaryotes

Source : <http://fr.slideshare.net/valentinanuzzi/ch-7-microbial-metabolism>

II.1.3.2. La respiration des microorganismes des sols

Avec environ 68-79 Pg de C-CO₂ libérés chaque année dans l'atmosphère (Raich & Schlesinger, 1992; Raich & Potter, 1995), la respiration du sol est (i) la principale voie de transfert du C (sous forme de CO₂) depuis les écosystèmes terrestres vers l'atmosphère, (ii) influence fortement la production nette des écosystèmes terrestres et, (iii) est la plus susceptible de modifier l'équilibre des cycles biogéochimiques des écosystèmes terrestres (Jenkinson *et al.*, 1991 ; Luo, 2007 ; Bond-Lamberty & Thomson, 2010). En moyenne, 80 % du C assimilé par la photosynthèse est respiré dans le sol et retourne vers l'atmosphère (Law *et al.*, 2002, Goulden *et al.*, 1996; Law *et al.*, 1999b; Janssens *et al.*, 2001), une faible fraction est transformé en humus (Stockmann *et al.*, 2013).

La respiration totale du sol (Rs) se compose de deux éléments : la respiration autotrophe (Ra) et la respiration hétérotrophe (Rh) qui résultent respectivement de la respiration des racines des plantes et des activités microbiennes de décomposition de la SOM (Hanson *et al.*, 2000 ; Ryan & Law, 2005) (**Fig.II.12**). De façon globale, environ la moitié de la respiration du sol est issue de l'activité métabolique des racines et des mycorhizes associées (Hanson *et al.* 2000; Högberg *et al.*, 2001). Cependant, les proportions de Ra et de Rh peuvent varier selon les saisons et entre les écosystèmes (Hanson *et al.*, 2000). Ainsi, la contribution hétérotrophe, qui est, en moyenne dans les forêts, de 54 % par an et de 40 % au cours de la saison de croissance végétative, peut varier de 10 à 95 % en fonction des types d'écosystèmes (Hanson *et al.*, 2000). La respiration des communautés microbiennes résulte majoritairement de la décomposition du matériel organique récemment produit (Trumbore 2000; Giardina *et*

al., 2004). Seule une petite fraction (~10 %) de la respiration du sol provient de la décomposition des composés carbonés les plus âgés et plus récalcitrants (Gaudinski *et al.*, 2000; Trumbore, 2000; Giardina *et al.*, 2004).

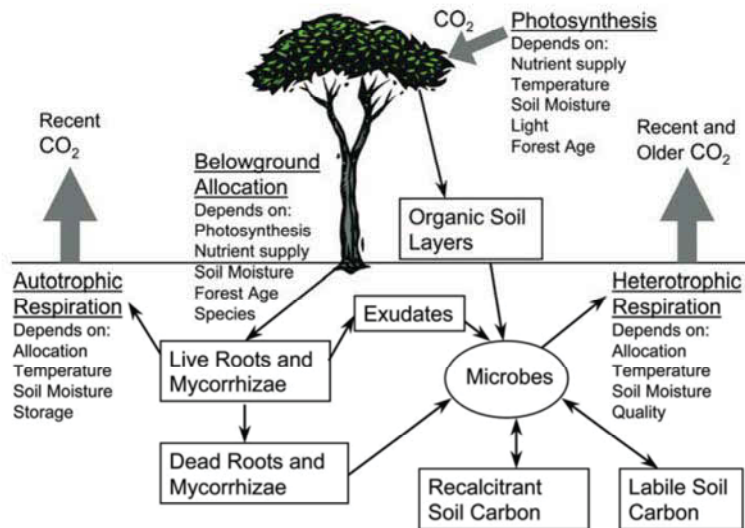


Figure II.12. | Représentation schématique des flux de C reliant les principaux compartiments de la biosphère terrestre et leurs interactions avec le compartiment atmosphérique (Ryan & Law, 2005).

Il est admis que la décomposition de la SOM est majoritairement contrôlée par les conditions biologiques et environnementales plutôt que par la structure moléculaire des substrats organiques (Schmidt *et al.*, 2011). De par leurs effets sur l'activité microbienne, l'humidité et la température exercent, séparément ou en interaction, un contrôle fort sur le taux de décomposition de la litière (Ryan & Law, 2005), ces facteurs sont suivis par la qualité de la SOM (décomposabilité) et la composition de la communauté microbienne du sol (Meentemeyer, 1978; Melillo *et al.*, 1982; Davidson *et al.*, 2000; Moyano *et al.* 2013).

II.1.3.2.1. Influence de la température et de l'humidité sur la respiration

La température et l'humidité sont les principaux facteurs régulant les processus de décomposition de la SOM (Connant *et al.*, 2011; Taggart *et al.*, 2012). La corrélation positive entre les flux de CO₂ issus de la décomposition et la température du sol fournit un outil prédictif global de la décomposition de la SOM (Song *et al.*, 2010; Ceccon *et al.*, 2011). La sensibilité de la décomposition de la SOM à la température s'exprime ainsi comme une valeur de Q₁₀, qui décrit la variation du taux de décomposition de la SOM en réponse à une augmentation de 10 °C. Cette sensibilité de la décomposition de la SOM à la température est particulièrement importante pour déterminer la dynamique du C du sol dans le contexte du changement climatique (Kirschbaum 2000, Davidson *et al.*, 2006a, Zhou *et al.*, 2009). Cependant, la sensibilité à la température peut être sur- ou sous- évaluée par des facteurs qui limitent l'accès au substrat et/ou l'activité microbienne comme par exemple l'humidité (Luo & Zhou, 2006), la teneur en oxygène, la sorption, la formation d'agrégats (Davidson *et al.*, 2006a).

L'impact de l'humidité sur la décomposition de la SOM est plus complexe à évaluer que celui de la température car l'activité microbienne est affectée par plusieurs processus physiques qui dépendent de la teneur en eau comme les mouvements d'eau et de gaz, la diffusion de soluté sur les sites d'activité microbienne, la survie et la motilité des micro-organismes (Rodrigo *et al.*, 1997, Luo & Zhou 2006). En effet, l'altération de la diffusion des solutés et de l'oxygène affecte indirectement l'approvisionnement en substrat et donc les taux de décomposition (Davidson *et al.*, 2006a ; Savage *et al.*, 2009). Des changements brutaux dans la disponibilité en eau des sols affectent particulièrement la respiration au sein de ces derniers. Ainsi des émissions importantes de CO₂ sont observées très rapidement (de quelques minutes à quelques heures) après des infiltrations d'eau dans les sols et sont liées à un transport du CO₂ depuis les strates profondes du sol (Xu *et al.*, 2004 ; Smart & Peñuelas, 2005 ; Luo & Zhou, 2006 ; McCulley *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2009). Sur des échelles de temps plus longues (jours), la ré-humidification stimule la croissance et l'activité microbienne (Iovieno & Bååth, 2008) conduisant à une libération importante et prolongée de CO₂ ("*Effet Birch*", Jarvis *et al.*, 2007). Les taux de respiration peuvent être ainsi 500 % supérieurs après un événement de ré-humidification et ce "*pulse*" peut perdurer de 2 à 6 jours après l'événement (Fierer & Schimel, 2002 ; 2003; Fierer *et al.*, 2003).

II.1.3.2.2. Qualité et accessibilité de la SOM

La disponibilité en substrat est un facteur clé déterminant les taux de respiration du sol (Hanson *et al.*, 2000) dont l'impact, dans certains écosystèmes, peut être supérieur à celui de la température (Janssens *et al.*, 2001; Ekberg *et al.*, 2007). Des corrélations positives entre la disponibilité en substrat et la Rh ont été mises en évidence en conditions expérimentales (Wild *et al.*, 2014) et *in situ* (Janssens *et al.*, 2001; Wan & Luo 2003; Yan *et al.* 2006).

Dans les écosystèmes « naturels », le C organique du sol est constitué d'une diversité de composés organiques qui peuvent être schématiquement séparés en deux fractions : le SOC labile ("*turn over*" rapide), plus facilement dégradable, et le SOC récalcitrant ("*turn over*" lent) souvent difficilement décomposable par les microorganismes du sol (de Graaf *et al.*, 2010). Les taux de respiration microbienne sont, par ailleurs, significativement corrélés à la quantité de SOC labile dans différents sites et à différentes profondeurs de sol (Wang *et al.*, 2004 ; Fang *et al.*, 2005).

La production de CO₂ est supérieure au niveau des couches organiques de surface et diminue avec la profondeur (Fang *et al.*, 2005). Les couches profondes du premier mètre de sol, bien que pouvant représenter plus de 50 % du carbone organique (Batjes, 1996), sont composées de SOM considérée comme plus indisponible pour la décomposition microbienne en regard de (i) leur protection au sein d'agrégats qui limitent l'accessibilité spatiale des microbes aux composés organiques (**Fig.II.13**) et la disponibilité en O₂ (Denef *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2008 ; Kleber & Johnson, 2010), (ii) leur stabilisation résultant d'interactions avec les surfaces minérales et les ions

métalliques (Six *et al.*, 2004; Von Lützow *et al.*, 2006 ; Kleber & Johnson 2010), (iii) leur récalcitrance chimique (Giardina & Ryan, 2000 ; Agren & Bosatta, 2002).

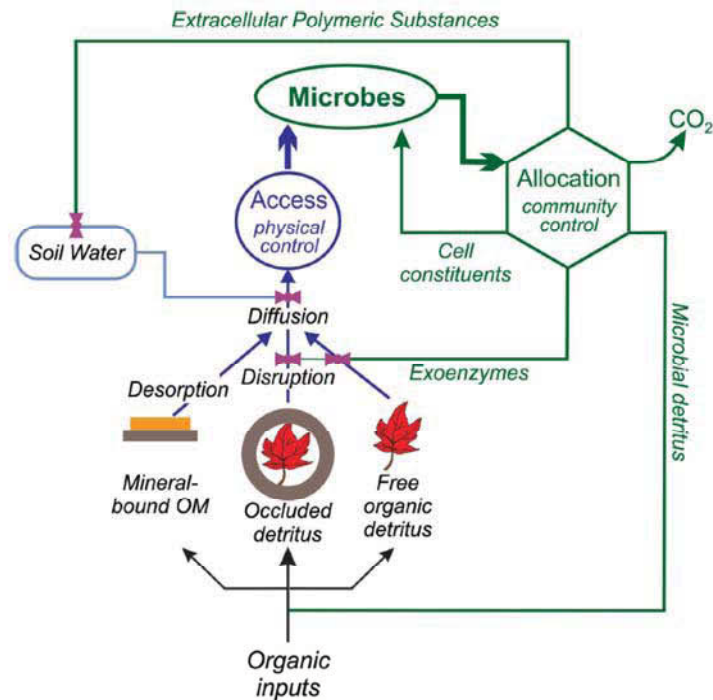


Figure II.13. | Rôle de l'accessibilité au C du sol pour les microorganismes dans la régulation de la dynamique du C (Schimel & Schaeffer, 2012).

II.1.3.2.3. Propriétés des communautés microbiennes

Les propriétés des communautés microbiennes du sol (*e.g.*, biomasse, composition, activité) sont cruciales pour prédire la respiration hétérotrophe et donc le stockage du SOC et les émissions de CO₂ par les sols (Lawrence *et al.*, 2009 ; Davidson *et al.*, 2012, Wieder *et al.*, 2013) mais ces dernières sont encore peu intégrées dans les modélisations du cycle du C terrestre (Fan & Liang, 2015).

a- Dynamique de la biomasse microbienne

Comparativement à la composition de la communauté microbienne et à la cinétique des enzymes, complexes et difficiles à paramétrer, la dynamique de la biomasse microbienne a été une propriété intégrée dans la plupart des modèles biogéochimiques (Fan & Liang, 2015). Ceci est attribuable à au moins trois considérations. D'une part, la biomasse microbienne du sol *per se* est une fraction importante du pool actif de SOC (Todd-Brown *et al.*, 2012). D'autre part, le carbone organique d'origine microbienne contribue fortement au pool de SOC stable, conférant à la biomasse microbienne un rôle important dans la séquestration du C (Cotrufo *et al.*, 2013). Finalement, la respiration hétérotrophe (Rh) microbienne est la principale voie de minéralisation de la matière organique du sol.

Néanmoins, l'importance de la biomasse microbienne sur les taux de Rh reste sujette à débat. En effet, des données expérimentales mettent en exergue que la respiration du sol n'est pas limitée par des diminutions de la biomasse microbienne (Birge *et al.*, 2015).

b- "Priming effect"

La quantité de C organique stockée dans le sol, n'augmente pas nécessairement, il peut même décroître, après un apport de matière organique fraîche (Fontaine *et al.*, 2004). Certaines espèces microbiennes seraient, en effet, capables de dégrader la matière organique plus récalcitrante en utilisant des substrats riches en énergie présents dans la matière organique fraîche. Ce processus est appelé « *priming effect* ». L'apport de C ou d' N peut avoir des effets positifs (*i.e.*, augmentation de la minéralisation du C et de l'N) ou négatifs (*i.e.*, immobilisation) sur les taux de minéralisation de la SOM (*e.g.* Kuzyakov *et al.*, 2000; Fontaine *et al.*, 2003; Sayer *et al.*, 2011 ; Kuzyakov 2010) (**Fig.II.14**).

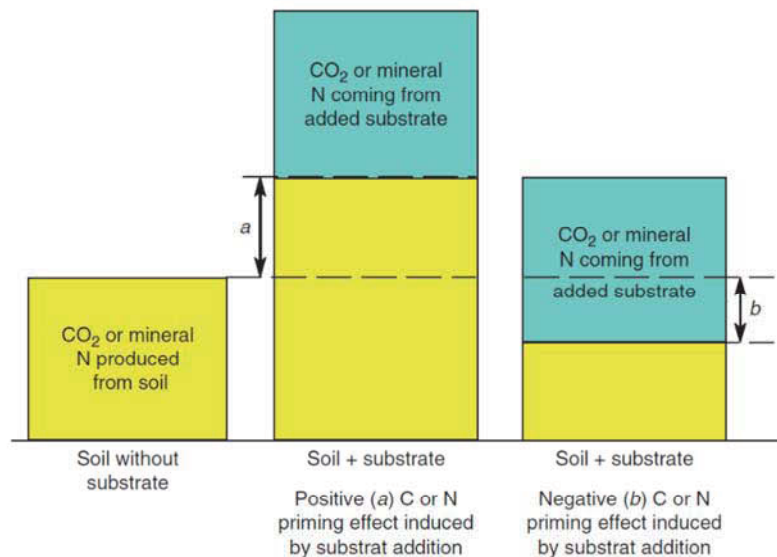


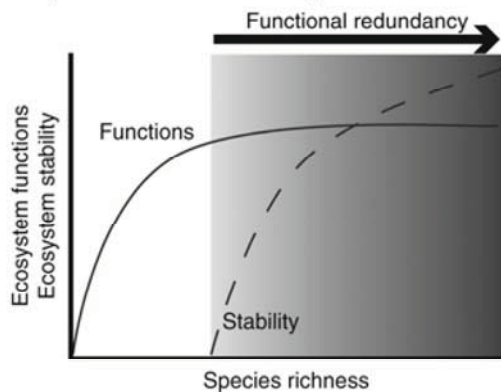
Figure II.14. | Le *priming effect*: - pas d'interactions additives entre la décomposition du substrat ajouté et la SOM, (a) accélération de la décomposition de la SOM- *Priming effect* positif, (b) Ralentissement de la décomposition de la SOM- *Priming effect* négatif (Blagodatskaya & Kuzyakov, 2011).

L'addition de C labile comme le glucose (Dilly & Zyakun, 2008), le fructose, l'acide oxalique (Hamer & Marschner, 2005) ou la cellulose (Fontaine *et al.*, 2007) stimule, généralement, la minéralisation de la SOM. Ces observations sont attribuées à la réactivation de microorganismes en dormance (De Nobili *et al.*, 2001) et à l'augmentation de la biomasse et de l'activité microbienne (Thiessen *et al.*, 2013 ; Wild *et al.*, 2014) conduisant à une augmentation de la production d'enzymes microbiennes (Kuzyakov *et al.*, 2000; Hamer & Marschner, 2005) et à des modifications de la composition et des stratégies de croissance de la communauté microbienne (de Graaf *et al.*, 2010).

c- Composition de la communauté microbienne

Considérant que différents groupes de microorganismes ont des traits fonctionnels distincts et, donc, le potentiel d'influencer différents processus, où et comment ces différences peuvent-elles être exprimées dans l'environnement? L'existence de différences entre les traits de microorganismes ne signifie pas obligatoirement que ces derniers fonctionnent différemment. Plusieurs conditions sont nécessaires pour que la composition de la communauté microbienne du sol influe sur les processus écologiques, comme l'efficacité de la minéralisation de la SOM : (1) les microorganismes doivent différer dans leurs traits fonctionnels, (2) les réactions biologiques doivent être soit une étape limitante dans une séquence de réactions, soit une étape clé contrôlant la vitesse de la réaction (Schimel & Schaeffer, 2012).

Le premier critère dépend de l'étendue des potentialités physiologiques : si tous les



organismes effectuent un processus de manière identique, peu importe lequel est actif pour accomplir le processus fonctionnel en question (*i.e.*, redondance fonctionnelle, **Fig.II.15**). La composition de la communauté microbienne ne peut affecter les processus que s'il existe des variations dans "quand" et "comment" les organismes fonctionnent (Schimel, 1995; Allison & Martiny, 2008).

Figure II.15. | Modèle conceptuel de la relation entre redondance fonctionnelle et stabilité des écosystèmes (Konopka, 2009).

Mais, même si les organismes présents dans une communauté varient dans leurs caractéristiques fonctionnelles, être différent ne suffit pas pour contrôler la dynamique du cycle du carbone. Un critère important est également « *ce que contrôle le processus* » que ce soit en termes de vitesse de réaction ou en termes de nature des produits issus de la réaction (Schimel & Schaeffer, 2012).

-Influence de la composition microbienne à l'échelle temporelle

Considérant les dynamiques saisonnières ou interannuelles, l'influence de la composition de la communauté microbienne sur le cycle du C au sein des écosystèmes ou à l'échelle globale est difficilement perceptible (Schimel & Schaeffer, 2012). A des échelles de temps pertinentes pour le système climatique global (*i.e.*, décennies) la production végétale et décomposition de la litière sont relativement équilibrées, et le stockage et les pertes du C sont fonction des larges réservoirs de carbone lent (*e.g.* SOM stabilisée sur les minéraux, Jobbágy & Jackson, 2000). En conséquence, la séquestration du C est majoritairement contrôlée par la production de matière organique stabilisée (Liang *et al.*, 2011) résultant des voies anaboliques des microbes spécifiques et donc de

la composition des communautés microbiennes (Grandy *et al.*, 2009). La dynamique du C des sols à ces échelles de temps est donc fonction de l'allocation des ressources de groupes spécifiques de microbes qui régulent le devenir de la MO dans les sols minéraux (*e.g.* "Dynamic Energy Budget modeling") (Klanjscek *et al.*, 2012).

-Influence de la composition microbienne à l'échelle spatiale

L'importance de la composition de la communauté microbienne peut être variable en fonction de différents compartiments du sol (*e.g.*, rhizosphère, litière de surface, racines mortes, sol minéraux). Schimel & Schaeffer (2012) postulent que la composition de la communauté microbienne joue un rôle majeur dans le contrôle du cycle du C dans la rhizosphère et les détritiques organiques (litière et racines mortes, **Fig.II.16**).

Dans la rhizosphère, la composition de la communauté microbienne est régulée par des substrats spécifiques, des signaux chimiques émis par les racines et par certaines variables physiques et chimiques (*e.g.*, O_2 , pH) (Jaeger *et al.*, 1999; Hinsinger *et al.*, 2009). L'environnement sélectionne des groupes particuliers de microorganismes (*e.g.*, *Rhizobacteria*) ayant une influence significative sur la croissance des plantes et le cycle du C (Schimel & Schaeffer, 2012).

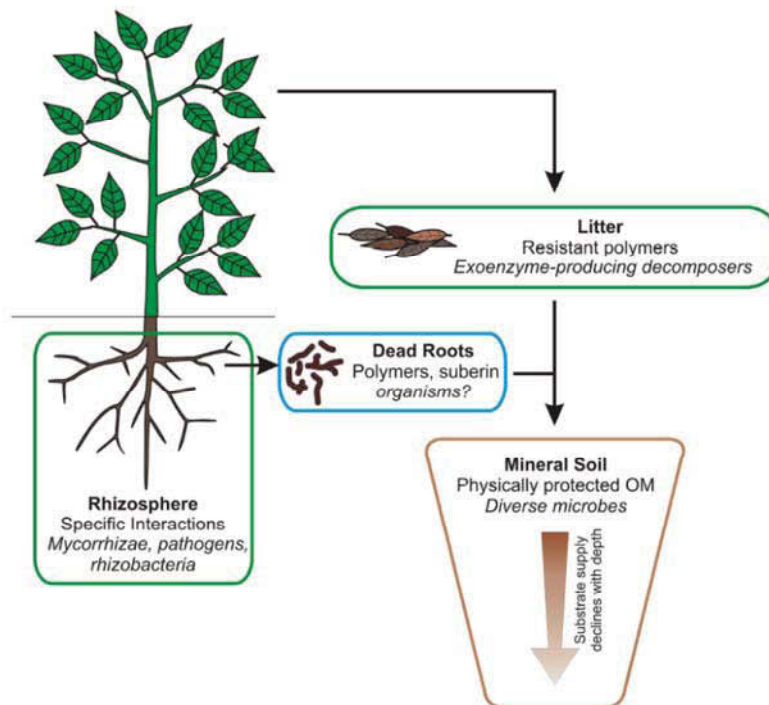


Figure II.16. Principales zones du sol, caractéristiques régulant le fonctionnement des communautés microbiennes (Schimel & Schaeffer 2012).

Les structures chimiques complexes des détritiques organiques non stabilisés, impliquent une étape de dépolymérisation extracellulaire par des EE (Cf. **Partie II.1.2.**) sous contrôle biologique et donc sensible à l'identité des microorganismes producteurs. Par exemple, la cinétique de décomposition de la litière par les communautés natives

associées est plus efficace que celle de communautés d'autres sites, "*The home-field advantage*" (Sinsabaugh & Moorhead, 1994; Schimel *et al.*, 1999; Aneja *et al.*, 2004; Craine *et al.*, 2007; Strickland *et al.*, 2009; Baumann *et al.*, 2011; Freschet *et al.*, 2011; Baldrian *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2012).

Dans les sols minéraux, l'influence de la composition de la communauté microbienne sur la décomposition de la SOM est probablement plus limitée (Schimel & Schaeffer, 2012), cette dernière reflétant majoritairement l'environnement physique et l'accessibilité aux substrats (Schimel & Schaeffer, 2012).

II.2. Les processus abiotiques

Les flux de CO₂ des sols sont majoritairement d'origine biologique (Ma *et al.*, 2015) cependant, les processus abiotiques peuvent contribuer directement (*e.g.*, altération des carbonates, certaines phototransformations) et/ou indirectement (*e.g.*, facilitation de l'activité microbienne) aux émissions de CO₂ par les sols.

II.2.1. LA CATALYSE ABIOTIQUE

Les composés abiotiques du sol ne doivent pas être seulement considérés comme des supports permettant l'adsorption de molécules organiques, mais également comme des surfaces réactives impliquées dans de nombreuses réactions de catalyses biochimiques. En effet, une littérature conséquente démontre que la matrice minérale contribue au pouvoir oxydatif du sol (**Tab. II.1.**) (Huang, 2000). En réalisant des transformations analogues à des catalyses enzymatiques, les catalyses abiotiques conduisent, notamment, à la polymérisation oxydative et à la polycondensation de biomolécules naturelles (*e.g.*, acides aminés, sucres, polyphénols dérivés des résidus de plantes, Huang, 2000) pour former des substances humiques (Shindo & Huang, 1982 ; 1984 ; McBride, 1987 ; 1989a ; 1989b ; Huang, 1991). Des études mettent également en exergue que le Fe peut promouvoir la dégradation de polluants organiques (*e.g.*, Mazellier & Bolte, 1997).

Les oxydes et (oxy-) hydroxydes métalliques ainsi que les argiles minérales sont les plus réactifs dans la médiation des transformations de composés organiques (Scheffer *et al.*, 1959 ; Shindo & Huang, 1984a ; Wang & Huang, 2000a ; 2000b ; Gonzalez & Laird, 2004). Des radicaux libres, tels que les ions super-oxydes, hydroxyle, semiquinone, peuvent également dépolymériser les bio-polymères pour produire des métabolites plus simples (acides aminés, peptides, sucres simples) qui sont intégrés dans le pool de MO dissoute (*e.g.*, Wershaw *et al.*, 1998a,b).

Inorganic Components As Catalysts	Observations	Reference
OXIDES, OXYHYDROXIDES AND SHORT-RANGE ORDERED MINERALS		
Hydrohématite, goethite, hématite, lepidocrocite	Polymerisation of hydroquinone	Scheffer <i>et al.</i> , 1959
Fe(III) oxides	Polymerization of phenolic compounds yields to humic polymers	Shindo & Huang, 1984a
Birnessite (δ -MnO ₂) and Fe(III) oxides	Measurements of O ₂ uptake	McBride, 1987
Birnessite (δ -MnO ₂)	Polymerization of pyrogallol; ring cleavage of pyrogallol and catechol (measurements of CO ₂ release); yields to humic polymers	Wang & Huang, 1992; Majcher <i>et al.</i> , 2000
Birnessite (δ -MnO ₂)	Investigation of the effect of light on ring cleavage of phenolics (measurements of CO ₂ release) and abiotic humification	Lee & Huang, 1995
Short-range ordered Mn(IV), Fe(III), Al and Si oxides	Polymerization of pyrogallol; ring cleavage of pyrogallol (measurements of CO ₂ release); yields to humic polymers	Shindo, 1992; Wang & Huang, 2000a; 2000b
Silicic acid, hydroxyl-Al ions and hydroxyaluminosilicate ions	Polymerization of catechol	Liu & Huang, 2000; 2002
CLAY-SIZE LAYERED SILICATES		
Montmorillonite, illite, kaolinite, vermiculite, halloysite	Polymerization of pyrogallol	Kumada & Kato, 1970
Smectites	Polymerisation of hydroquinone	Thompson & Moll, 1973
Montmorillonite, illite, kaolinite	Polymerization of phenolic compounds ; yields to humic polymers, measurements of O ₂ uptake	Filip <i>et al.</i> , 1977; Wang & Li, 1977; Wang <i>et al.</i> , 1978a ; 1978b
Nontronite, bentonite, kaolinite and quartz	Polymerization of hydroquinone and pyrogallol	Wang & Huang, 1986 ; 1989b ; 1989c
Montmorillonite	Oxidation and polymerization of catechol and pyrogallol	Birkel <i>et al.</i> , 2002
PRIMARY MINERALS		
Olivines, pyroxenes, amphiboles, micas and feldspars	Polymerisation of phenolic compounds; yields of humic substances; measurements of O ₂ uptake	Shindo & Huang, 1985a
NATURAL SOILS		
Oxisol, Inceptisol and silt fraction of Mollisol	IR spectra resembling natural humic substances; yields of humic polymers	Wand <i>et al.</i> , 1978b; 1978c; 1983a
Forest soils (Alfisol and Inceptisol)	Polymerization of phenolic acids	Pohlman & McColl, 1989
Mollisol	Polymerization of pyrogallol ; measurements of CO ₂ release	Wand & Huang, 1989a

Tableau II.1. Exemples d'études réalisées sur la catalyse minérale des réactions d'humification abiotique (Wang & Hardie, 2009).

La montmorillonite, la vermiculite, l'illite et la kaolinite accélèrent ainsi la synthèse de substances humiques en utilisant l'hydroquinone comme précurseur de la réaction d'oxydation (Shindo & Huang, 1985). Inversement, en présence d'O₂, la smectite saturée en Fe³⁺ est impliquée dans la polymérisation des hydroquinones (Wang & Huang, 1987). La birnessite et les oxydes de Fe jouent également un rôle dans l'oxydation des hydroquinones, des résorcinols et des catéchols (Wang *et al.*, 1986 ; Huang, 1990). Les oxydes de Fe auraient un rôle moins important dans ce dernier processus, cependant, selon les auteurs, l'importante concentration en oxydes de Fe, pouvant être retrouvée dans certains sols, suggèrent que leur rôle dans les processus abiotiques de formation de substance humique ne doit pas être négligé.

Certains travaux rapportent également la libération de CO₂ suite au clivage, *via* une catalyse non biologique, de noyaux aromatiques (Wang & Huang, 1994 ; Wang, 1995 ; Lee & Huang, 1995 ; Cheney *et al.*, 1996 ; 1998 ; Majcher *et al.*, 2000) (Fig. II.17). Ainsi, Wang et Huang (1992) ont montré l'implication de la birnessite dans la rupture des structures cycliques des pyrogallols libérant du CO₂. Il a aussi été montré que l'apport en CO₂ lié à la rupture de ces structures cycliques est directement relié à l'activité catalytique des argiles minérales comme la bentonite et la kaolinite (Wang & Huang, 1992).

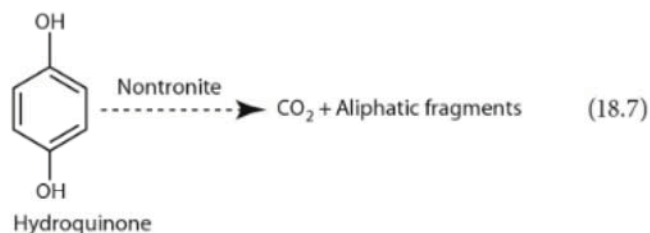
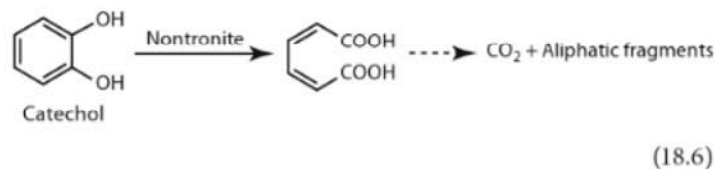
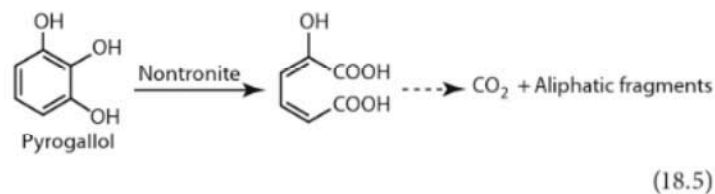


Figure II.17. Capacité de la nontronite à réaliser l'oxydation des polyphénols. Le groupe carboxyle contenu dans les composés intermédiaires est secondairement oxydé pour former du CO₂ et des fragments aliphatiques. Les produits intermédiaires et les fragments aliphatiques peuvent se polycondenser (Wang & Huang, 1994).

Parmi les oxydes métalliques, les oxydes de Fe de Mn sont les plus réactifs dans la facilitation de la transformation des composés organiques incluant : clivage du noyau des polyphénols, désamination, décarboxylation, dé-alkylation des acides aminés, polymérisation des composés phénoliques et leur polycondensation avec les acides aminés et la réaction de Maillard. Par exemple, suite à la désamination oxydative de l'acide glutamique par les oxydes de manganèse, il a été observé la production de NH₄⁺

dans une solution d'acide glutamique traitée par de la birnessite (Traina & Doner, 1985). En présence de Na-montmorillonite, l'acide iso-citrique peut être oxydé et transformé en acide α -céto-glutarique. Le rendement de cette réaction est cependant beaucoup moins important en présence de l'argile qu'en présence de l'enzyme catalysant la même réaction (l'iso-citrate déshydrogénase) (Naidja & Siffert, 1990).

II.2.2. CATALYSE ABIOTIQUE ET « REGULATORY GATE HYPOTHESIS »

Longtemps la minéralisation de la SOM a été considérée comme résultant de l'activité de la biomasse microbienne, et, il était donc admis que ce processus était régulé par la taille, l'activité et la composition de la communauté microbienne (Marschner & Kalbitz, 2003; Fontaine & Barot, 2005). Cependant, des études utilisant des procédures de fumigation-incubation (Jenkinson, 1966; Jenkinson & Powlson, 1976) ont remis en question cette vision en démontrant que la minéralisation de la SOM est très faiblement altérée par des diminutions importantes de la taille, de la diversité et de l'activité des populations microbiennes. Pour expliquer ce phénomène, Kemmitt *et al.* (2008) ont formulé l'hypothèse de la 'Regulatory Gate'. Cette hypothèse considère la minéralisation de la SOM comme un processus se réalisant en deux étapes. Dans un premier temps, la SOM non bio-disponible est altérée par des processus abiotiques pour devenir de la MO bio-disponible (K_1 , **Fig.II.18**). Dans un second temps, cette SOM utilisable par les microorganismes est minéralisée par la biomasse microbienne (K_2 , **Fig.II.18**).

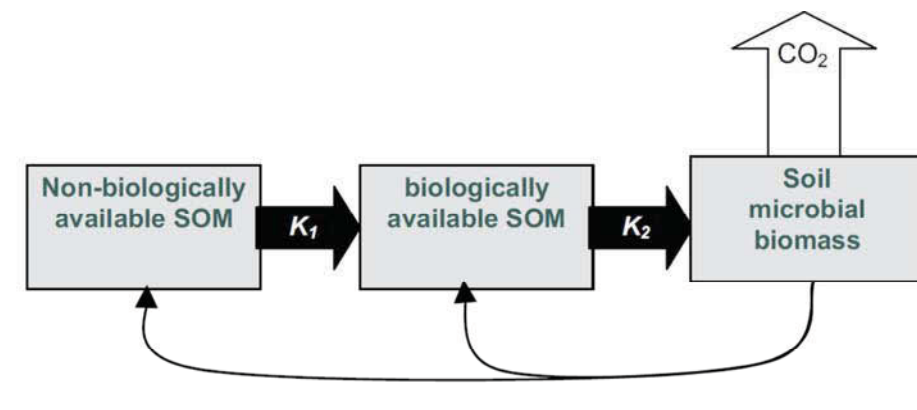


Figure II.18. | Représentation schématique de la 'Regulatory gate hypothesis'. K_1 = transformations abiotiques de la SOM non bio-disponible. K_2 = minéralisation biologique de la SOM bio-disponible. Les flèches indiquent que la biomasse microbienne peut créer de la MO bio-disponible et non bio-disponible mais n'est pas capable d'influencer directement les taux du processus K (Kemmitt *et al.*, 2008).

Selon Kemmitt *et al.* (2008), les mécanismes impliqués dans la conversion abiotique de la SOM, régulant principalement la minéralisation de la MO, peuvent inclure : l'oxydation chimique (*e.g.*, clivage de cycles phénoliques par des oxydes de Mn) (Majcher *et al.*, 2000), l'oxydation par des espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'hydrolyse chimique, la diffusion à partir d'agrégats inaccessibles aux microorganismes, la désorption de composés de la phase solide, l'action d'enzymes extracellulaires stabilisées et/ou une combinaison de ces processus.

La 'Regulatory Gate hypothesis' se heurte ainsi à la vision conceptuelle du rôle de la diversité spécifique et fonctionnelle des communautés microbiennes comme principaux régulateurs des transformations de la MO.

II.2.3. CONTRIBUTION DES CARBONATES

Le postulat, selon lequel les émissions de CO₂ par les sols sont majoritairement le résultat de la minéralisation du SOC, est cohérent dans les sols acides et neutres (Bertrand *et al.*, 2007 ; Serrano-Ortiz *et al.*, 2010 ; Ranmarine *et al.*, 2012 ; Schindlbacher *et al.*, 2015) mais pourrait conduire à une surestimation de la contribution de la respiration pour les émissions de CO₂ dans les sols alcalins (Bertrand *et al.*, 2007). En effet, le réservoir de carbone inorganique des sols (SIC) représente ~ 900 Pg de C (Tab.I.4) stocké sous forme de carbonates (Batjes, 1996; Schlesinger, 1997; Adams & Post, 1999). Le pH élevé et le contenu en carbonates de calcium des sols calcaires, qui représentent ~ 30% des surfaces continentales (Chen & Barak, 1982), sont de nature à favoriser la contribution du SIC aux émissions de CO₂ à l'échelle globale (Stevenson & Verburg, 2006 ; Lal & Kimble, 2000; Emmerich, 2003; Emmerich & Martens, 2006; Tamir *et al.*, 2011).

a. Des études aux résultats contrastés

La proportion des flux de CO₂ total du sol libéré lors du dégazage subséquent à l'altération des carbonates est classiquement considérée comme négligeable (Kuzyakov, 2006) car (i) le taux d'altération des roches carbonatées est faible et (ii) la majorité du C libéré est lessivé. En conséquence, la contribution abiotique du SIC n'est pas prise en considération dans les modélisations des flux de C (*e.g.* Davidson *et al.*, 2002; Giardina & Ryan, 2002; Reichstein *et al.*, 2005).

Reference	Ecosystem and location	Observation	Explanation
Emmerich (2003) <i>Agric. Forest Meteorol.</i>	Semi-arid shrubland/grassland (Arizona, USA)	Large CO ₂ release after dry season rain events CO ₂ release when the soil is dry	Dissolution of carbonates Removal of water from soil solution
Mielnick <i>et al.</i> (2005) <i>Journal of Arid Environ.</i>	Desert grassland (New Mexico, USA)	Large CO ₂ release after rainfall events during dry season	Dissolution of carbonates
Hastings <i>et al.</i> (2005) <i>Global Change Biol.</i>	Desert shrubland (Baja California, Mexico)	Low rates of carbon uptake at night	No turbulence; CAM photosynthesizing plants
Wohlfahrt <i>et al.</i> (2008) <i>Global Change Biol.</i>	Mojave desert (Nevada, USA)	Annual CO ₂ uptake similar to temperate forest or grassland	Crust organisms
Xie <i>et al.</i> (2008) <i>Environ. Geol.</i>	Gubantonggunt Desert (Western China)	Soil CO ₂ uptake	Absorption by alkaline carbonate soil
Kowalski <i>et al.</i> (2008) <i>Agric. Forest Meteorol.</i>	Semi-arid shrubland and grassland (Southeastern Spain)	Large CO ₂ release when soil is dry, windspeed dependence	Precipitation of carbonates; subterranean ventilation
Inglisma <i>et al.</i> (2009) <i>Global Change Biol.</i>	Mediterranean ecosystems (Pianosa Island, Italy)	Decreased relative inorganic CO ₂ release after precipitation events	Strong enhancement of the organic flux

Tableau II.2.] Synthèse des flux de CO₂ « anormaux » mesurés dans des écosystèmes terrestres riches en carbonates et leurs interprétations (Serrano-Ortiz *et al.*, 2010).

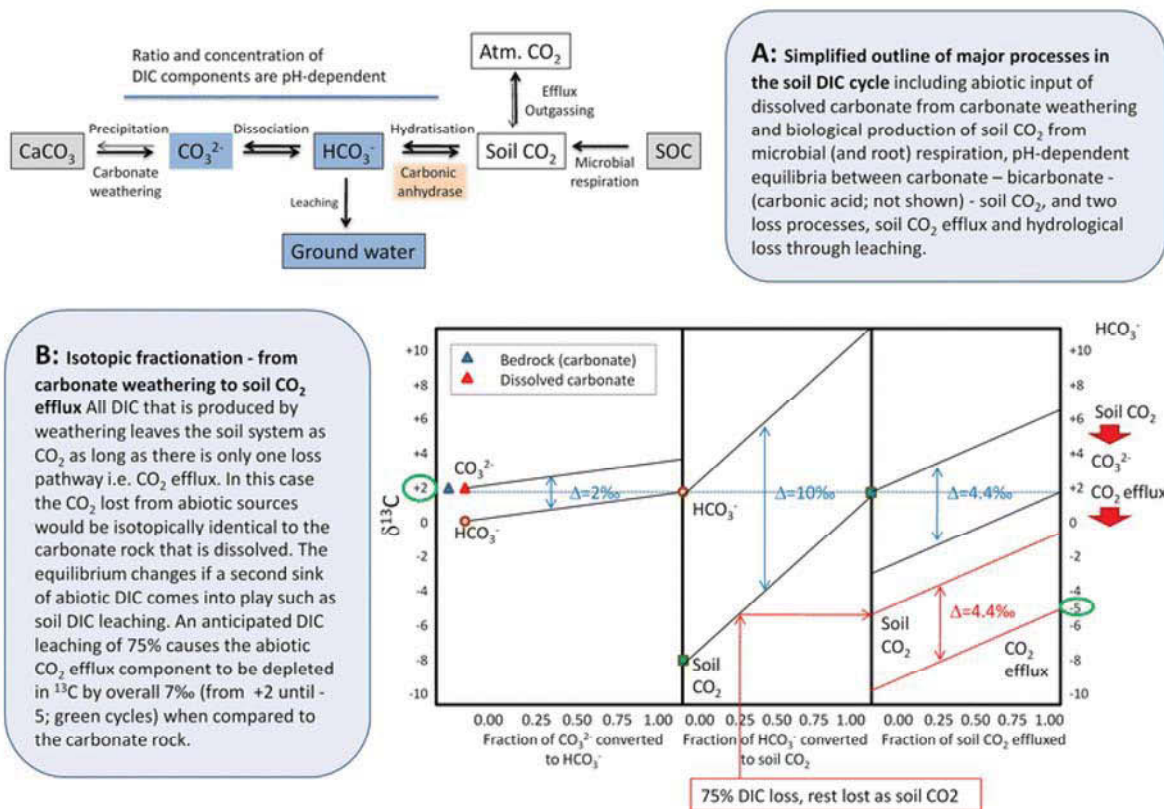


Figure II.19. (A) Schéma simplifié du cycle du DIC dans le sol; (B) fractionnement isotopique des roches carbonates et contribution aux flux de CO₂ (Schindlbacher *et al.*, 2015).

Cependant, un nombre croissant d'études rapportent des fortes contributions abiotiques (10–60 %) aux flux totaux de CO₂ dans des sols cultivés et naturels de différents environnements (Emmerich, 2003; Stevenson & Verburg, 2006; Inglima *et al.*, 2009; Kowalski *et al.*, 2008; Čátera & Ogrinc, 2011; Tamir *et al.*, 2011 ; Plestenjak *et al.*, 2012; Ramnarine *et al.*, 2012; Serrano-Ortiz *et al.*, 2010) (**Tab. II.2.**).

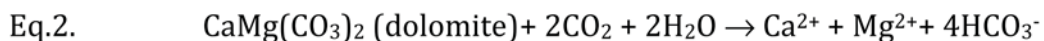
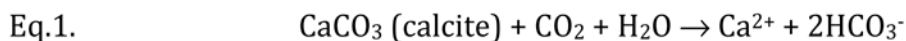
b. Facteurs affectant la contribution des carbonates

L'altération des carbonates est majoritairement contrôlée par la disponibilité en eau et la pression partielle en CO₂ du sol (Schindlbacher *et al.*, 2015). En conséquence, les taux d'altération des carbonates, et donc leur contribution aux flux de CO₂, varient en fonction de la productivité des écosystèmes, du climat et des propriétés de la roche mère (Schindlbacher *et al.*, 2015). L'apport de résidus de culture augmente le taux de production et donc la concentration de CO₂ dans les sols favorisant la dissolution du CaCO₃ (Bertrand *et al.*, 2007). Les successions de périodes sèches et humides peuvent provoquer une absorption ou une libération significative de CO₂ en raison de la précipitation ou de la dissolution des carbonates dans les sols d'environnements arides et semi-arides (Serrano-Ortiz *et al.*, 2010), alors que la précipitation des carbonates jouent un rôle marginal dans les régions tempérées (Schindlbacher *et al.*, 2015). Le type de roche sédimentaire (dolomie ou calcite) influence également la production abiotique de CO₂ considérant que les taux de dissolution et l'intensité de l'altération sont plus faibles pour la dolomie (Morse & Arvidson 2002; Pokrovsky *et al.* 2005).

c. Contribution des carbonates dans les régions tempérées

Dans les régions tempérées humides, la majorité des produits de l'altération des carbonates, les cations (Ca²⁺ et Mg²⁺) et le carbone inorganique dissous (SIC) sont transportés depuis le sol vers les écosystèmes aquatiques (**Fig.II.19**) (Szramek *et al.*, 2007 ; Ciais *et al.*, 2008).

Considérant que du CO₂ est consommé lors la dissolution des carbonates (Eq.1), l'altération des carbonates peut être un puits temporaire de CO₂ atmosphérique ou de CO₂ issu de la respiration du sol sur des échelles régionales ou globales (Liu & Zhao, 1999 ; Gombert, 2002 ; Beaulieu *et al.*, 2012).



Les émissions abiotiques de CO₂ résultant de la précipitation des carbonates (inverse de l'Eq.1) sont moins significatives dans les sols de zones tempérées car l'eau du sol est en contact avec la surface du sol, les minéraux carbonatés et la phase poreuse du sol. Cependant, dans certaines conditions, des variations dans la pression partielle, l'humidité, la température et/ou le pH peuvent déplacer les conditions d'équilibre vers

le dégazage de CO₂ et, donc, générer un flux transitoire de CO₂ abiotique (**Fig. II.19**) (Schindlbacher *et al.*, 2015).

De nombreuses réactions d'échange dépendant du pH déterminent l'équilibre du DIC (**Fig.II.19**). La production et le relargage d'acides organiques par les racines de plantes et les microorganismes (Attiwill & Adams 1993; van Hees *et al.*, 2005), par les protons issus de la nitrification, par l'oxydation des sulfures organiques ou par les pluies acides peuvent stimuler la dissolution des carbonates et l'émission abiotique de CO₂ (Schindlbacher *et al.*, 2015). Des enzymes, comme les anhydrases carboniques, qui catalysent la conversion du CO₂ en HCO₃⁻ dans la solution du sol (**Fig.II.19**) peuvent affecter positivement les taux de dissolution des carbonates et les émissions abiotiques de CO₂ (Liu *et al.*, 2005; Wingate *et al.*, 2009).

d. Signature isotopique du CO₂ issu de l'altération des carbonates

Les émissions de CO₂ à partir d'un sol, par exemple un sol forestier, sur une roche carbonatée ont pour origine les composantes suivantes, qui diffèrent par leur signature isotopique: (i) la respiration hétérotrophe, (ii) la respiration autotrophe, (iii) l'altération des carbonates, et (iv) le CO₂ atmosphérique entré dans le sol par convection, diffusion ou par l'eau de pluie. La signature isotopique de la respiration hétérotrophe est dans la gamme de celle de la SOM utilisée ($\delta^{13}\text{C}$ entre -24 et -30‰ pour les plantes en C3), mais peut différer de quelques pour mille en raison de la minéralisation préférentielle de substrats spécifiques (Formánek & Ambus, 2004; Werth & Kuzyakov, 2010). La signature isotopique de la respiration autotrophe est dans une gamme similaire, mais peut varier, par exemple, avec des conditions météorologiques qui affectent la discrimination isotopique lors de la photosynthèse (Ekblad & Hogberg, 2001). Le CO₂ issu des carbonates présente une signature isotopique distincte avec des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ proche de zéro alors que le $\delta^{13}\text{C}$ du CO₂ atmosphérique est proche de -8‰ (**Fig.II.19**). En raison de sa signature isotopique caractéristique, le flux de CO₂ abiotique, issu de l'altération des carbonates, influence la signature isotopique du flux total de CO₂, même lorsque sa contribution est faible (Schindlbacher *et al.*, 2015) et peut donc être utilisé pour estimer la contribution du CO₂ abiotique lié à l'altération des carbonates.

II.2.4. LA PHOTO-DEGRADATION

La photo-dégradation est le processus par lequel l'irradiation solaire dégrade des composés organiques, soit directement *via* leur oxydation en composés inorganiques (*e.g.*, CO₂) (Anesio *et al.*, 1999; Brandt *et al.*, 2009), soit indirectement en produisant des radicaux libres et des espèces réactives de l'O₂ (ROS) qui altèrent la composition chimique du carbone organique (Rozema *et al.*, 1997; King *et al.*, 2012) et produisent des matériaux organiques photo-dégradés labiles utilisables par les microorganismes (facilitation microbienne) (Gallo *et al.*, 2006 ; 2009; Day *et al.*, 2007; Austin & Vivanco, 2006; Henry *et al.*, 2008 ; Foereid *et al.*, 2010). Les radiations solaires peuvent également induire la polymérisation et la condensation de la matière organique

II.3. Autres processus contribuant aux émissions de CO₂ par des sols

En raison de son rôle majeur dans les flux de C des écosystèmes, la respiration du sol a fait l'objet de nombreuses études qui ont soulevé un certain nombre de questions. Comment peut-on démêler les composants de ce flux complexe pour comprendre quels processus sous-jacents y contribuent ? Quels sont les contrôles à court-terme et à long-terme sur les composants des flux et comment peuvent-ils être modélisés pour prédire les changements dans le stockage de C dans les écosystèmes terrestres et l'atmosphère ? Répondre à ces interrogations, en regard de la complexité de la matrice sol et des processus sous-jacents (*e.g.*, structure du sol, interactions des composantes biotiques et abiotiques, catalyse abiotique, dynamique spatio-temporelle, diversité des écosystèmes terrestres et des pratiques d'utilisation des terres, flux de C entre les systèmes terrestres et l'atmosphère), représente un défi majeur. A ces interrogations s'adjoint un certain nombre de questions suscitées par des observations récurrentes d'émissions de CO₂ persistantes dans des sols, non calcaires, placés à l'obscurité, et dans lesquels la biomasse et l'activité microbienne ont été réduites à des niveaux indétectables par des procédures de stérilisation. Ces observations mettent en exergue que des incertitudes existent quant au rôle exclusif des processus cellulaires microbiens dans la minéralisation de la SOM, et, suggèrent, que des processus abiotiques et/ou acellulaires, autres que l'altération des carbonates et la photo-oxydation, se produisent dans les sols et contribuent au cycle du C.

II.3.1. EFFETS DES PROCEDURES DE STERILISATION SUR LES PROPRIETES PHYSIQUES, CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES SOLS

En préalable à une présentation des hypothèses relatives à la persistance d'émissions substantielles de CO₂ dans des sols stérilisés, cette section a pour objectif de synthétiser les effets identifiés des procédures de stérilisation sur les propriétés des sols.

a- Méthodes de stérilisation

La stérilisation des sols est une procédure largement utilisée dans les expérimentations écologiques pour éliminer ou réduire l'activité biologique, par exemple dans les études de re-colonisation (Coleman & MacFayden, 1966; Degrange *et al.*, 1997), de dégradation chimique ou de sorption (Tebbe & Reber, 1991; Sandoli *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 2001), ou encore dans les mesures d'activités d'enzymes extracellulaires (Okazaki *et al.*, 1983).

Un large panel de méthodes de stérilisation existe, chacune présentant des effets secondaires propres sur les propriétés chimiques et physiques du sol. Dans ce cadre, des revues générales traitent de l'efficacité comparée de différentes méthodes de stérilisation (*e.g.*, Liegel, 1986, Wolf & Skipper, 1994, Trevors, 1996, MacNamara *et al.*, 2003) (**Tab. II.3.**).

Une majorité d'études a identifié les irradiations gamma comme une méthode efficace et préférable à d'autres approches car, bien qu'étant un biocide effectif, elle affecte moins les propriétés chimiques et physiques des sols (Ramsay & Bawden, 1983). Ainsi, si les fumigants (*e.g.*, formaldéhyde, oxyde d'éthylène) sont efficaces, ils conduisent à l'accumulation de résidus toxiques dans le sol (Eno & Popenoe, 1964; Alpei & Scheu, 1993). L'autoclavage est également utilisé mais peut modifier substantiellement les propriétés physiques du sol (Lotrario *et al.*, 1995; Berns *et al.*, 2008).

Study	γ -Irradiation	Autoclave	Air-dried	Steam	Microwave	Formaldehyde	Propylene oxide	Chloroform	Methyl bromide
Alpei and Scheu (1993)	✓	✓			✓		✓	✓	✓
Arumachalam et al. (1974)	✓			✓					
Bowen and Rovira (1961)	✓			✓			✓		
Chambers and Attiwill (1994)	✓	✓	✓						
Coûteaux (1992)	✓	✓					✓		
Dalton et al. (1989)	✓	✓							✓
Dao et al. (1982)	✓	✓	✓				✓		
Eno and Popenoe (1964)	✓			✓					✓
Jenkinson (1966)	✓	✓	✓					✓	✓
Lotrario et al. (1995)	✓	✓							
Palka (1993)	✓	✓					✓		
Powelson and Jenkinson (1976)	✓	✓	✓					✓	✓
Ramsay and Bawden (1983)	✓	✓							
Salonius et al. (1967)	✓	✓							
Stroetmann et al. (1994)	✓	✓				✓			
Sparling and Berrow (1985)	✓		✓					✓	
Thompson (1990a)	✓			✓					✓
Thompson (1990b)	✓			✓					✓
Tuominen et al. (1994)	✓	✓				✓			
Wolf et al. (1989)	✓	✓			✓		✓	✓	

Tableau II.3. Synthèse des études publiées comparant l'efficacité des irradiations gamma par rapport aux autres méthodes utilisées pour stériliser les sols (MacNamara *et al.*, 2003).

b- Impact de la stérilisation sur les propriétés physiques et chimiques des sols

De manière générale, la stérilisation par irradiation gamma a été jugé comme ayant peu d'impact sur les propriétés physiques du sol (Wolf & Skipper, 1994; McNamara *et al.*, 2003). En effet, la majorité des études ne met pas en évidence de changements significatifs quant à la surface et à la distribution des particules de sol (Griffiths & Burns, 1968; Lensi *et al.*, 1991 ; Mac Namara *et al.*, 2003). L'autoclavage semble quant à lui détruire les structures polysaccharidiques unifiant les micro-agrégats conduisant à leur désagrégation (Berns *et al.*, 2008). Cette destruction des agrégats a une influence sur la surface du sol et sur l'accessibilité à des sites de réactions préalablement "cachés" et à des nutriments initialement stabilisés sur la matrice sol. L'utilisation de biocides chimiques, tel que l'oxyde d'éthylène, conduit quant à elle à des processus d'hydroxyalkylation, à la formation de liaisons éther et à des réactions entre les groupements carboxyles et l'oxyde d'éthylène (Nègre *et al.*, 1995).

Globalement, la stérilisation induit une augmentation de l'extractabilité du manganèse, de l'ammonium et de l'azote organique (Wolf & Skipper, 1994; McNamara *et al.*, 2003) et, également, des teneurs en phosphore, soufre et zinc échangeables. Des résultats variables pour le Cu sont observés (Bowen & Cawse, 1962) et aucune

modification dans les teneurs en Al, Fe et Na extractibles n'a été notée (Wolf *et al.*, 1989). Les relarguages de nutriments observés ont été attribués à la lyse des cellules microbiennes (Bowen & Cawse, 1964), à l'altération de la SOM (Lensi *et al.*, 1991) et à la persistance d'activités enzymatiques (Ramsay & Bawden, 1983; Lensi *et al.*, 1991).

L'augmentation importante du COD notée après stérilisation a été attribuée à la lyse des microorganismes (Berns *et al.*, 2008). En outre, l'altération cellulaire et la destruction de matériel cellulaire sont plus prononcées dans les sols stérilisés par autoclavage. Ainsi, des niveaux élevés de C organique extractibles sont observés après autoclavage (Liegel, 1986; Wolf & Skipper, 1994). Les données sur les effets de la stérilisation sur le pH varient considérablement et aucune tendance n'est généralisable (Arunachalam *et al.*, 1974; Hartel & Alexander, 1983; Thompson, 1990; Lensi *et al.*, 1991; Alpei & Scheu, 1993; Chambers & Attiwill, 1994; Tuominen *et al.*, 1994; Lotrario *et al.*, 1995).

c- Impact de la stérilisation sur les communautés microbiennes des sols

En regard des microorganismes et des bio-macromolécules, l'autoclavage est une méthode plus destructrice que les irradiations gamma (Berns *et al.*, 2008). Si aucun microorganisme n'est cultivable après irradiations gamma ou autoclavage, certains auteurs reportent que, contrairement aux sols autoclavés, des produits d'amplification via des réactions PCR ciblant les bactéries, sont obtenus à partir d'échantillons de sols stérilisés aux rayons gamma (Berns *et al.*, 2008). Les fumigants présentent des effets similaires aux rayonnements gamma en permettant la maintenance de cellules mortes dont l'intégrité cellulaire et certaines bio-macromolécules (*e.g.*, ADN) sont préservées (*e.g.*, Blankinship *et al.*, 2014).

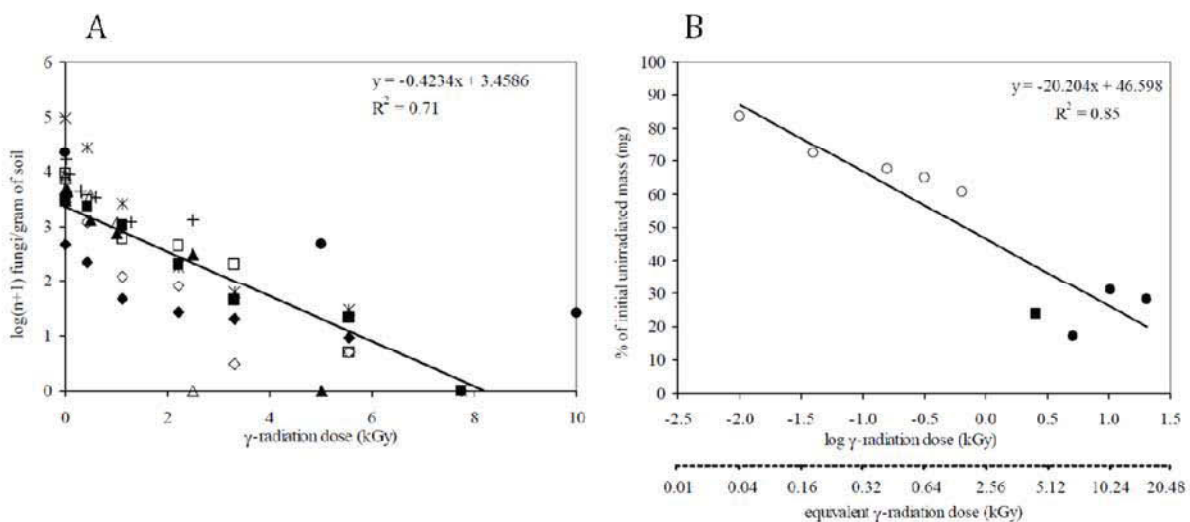


Figure II.21. [Réponses aux irradiations gamma (A) des champignons et (B) de la biomasse algale des sols (McNamara *et al.*, 2013)]

Les irradiations gamma affectent les organismes du sol par ionisation directe des cellules et par la création de radicaux libres toxiques (Jackson *et al.*, 1967). Néanmoins, des différences significatives existent quant à la sensibilité des organismes aux

rayonnements gamma. Cette dernière est dépendante d'une large gamme de facteurs physiologiques incluant, l'activité métabolique, le stade du cycle de vie, la complexité de l'organisme et la structure et la composition du sol (McNamara *et al.*, 2003). En général, plus la taille et la complexité de l'organisme sont importantes, plus sa sensibilité aux irradiations est prononcée.

Des doses de radiations de l'ordre de 0,01 KGy sont suffisantes pour altérer les populations fongiques (Arunachalam *et al.*, 1974) (Fig.II.21A). Les micro-algues du sol semblent être relativement résistantes à des fortes doses de radiations et des doses > 20 kGy sont nécessaires pour les éliminer (Popenoe & Eno, 1962, Shields *et al.*, 1961) (Fig.II.21B). La majorité des populations bactériennes est inactivée à des doses de radiations comprises entre 15 et 25 KGy (Fig.II.22), cependant les doses requises pour assurer la stérilité complète du sol peuvent être plus importantes (McNamara *et al.*, 2003) (Tab.II.4.).

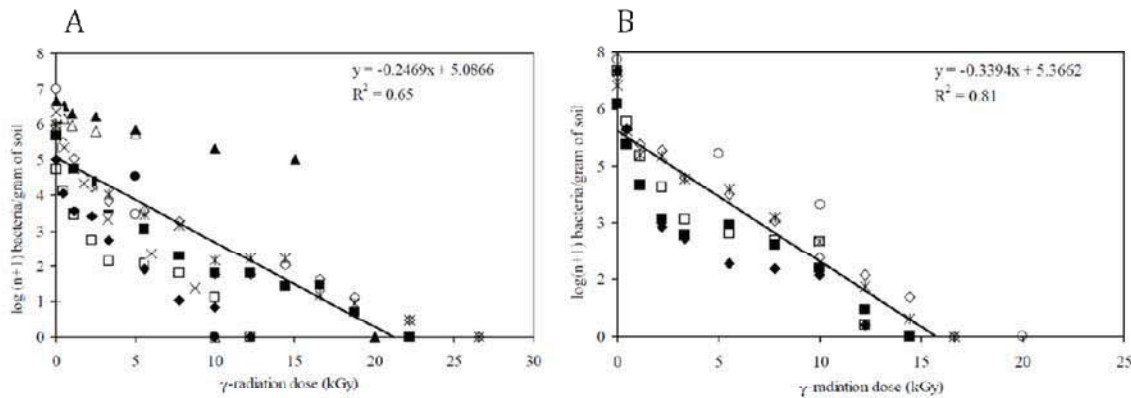


Figure II.22. Réponses aux irradiations gamma des communautés bactériennes de sols (A) secs et (B) humides (McNamara *et al.*, 2013).

Certaines données expérimentales fournissent également des informations sur la sensibilité de certains groupes bactériens aux radiations. Par exemple, *Brevibacterium* survit à des doses de 25 KGy (Skyring & Thompson, 1966; Rovira & Bowen, 1969) mais est éliminé à 40 kGy (Skyring & Thompson, 1966). Parker & Vincent (1981) reportent que *Deinococcus radiodurans* survit à des radiations de l'ordre de 25–35 kGy.

γ-Dose (kGy)	Soil textural description	Sample (g)	Sieve (mm)	Pre-treatment	Study
50–60	Silt loam	1	0.5	A	Wolf et al. (1989)
50	Silt loam	5	2	A	Degrange et al. (1997)
50	Silt loam	10	2	M	Tebbe and Reber (1991)
40	Clay	10	No	O	Skyring and Thompson (1966)
35	Sandy loam	1	0.25	A	Dalton et al. (1989)
30	Loamy sand	31	2	None	Marschner (1993)
30	Clay	–	No	A or M	Salonius et al. (1967)
26	Loam	30	2	A or M	Jackson et al. (1967)
26	Desert-semi-arid*	–	–	None	Shields et al. (1961)
25	Silt loam	10	2	M	Lensi et al. (1991)
25	Silty clay loam	10	2	None	Barrion and Habte (1988)
25	Silt loam	50	2	A	Hartel and Alexander (1983)
25	Silt loam	100	No	None	Ramsay and Bawden (1983)
25	Sand	–	–	M	Bowen and Rovira (1961)
20	Black*	–	2	A	Arunachalam et al. (1974)

Tableau II.4. Doses d'irradiation gamma nécessaires pour assurer la stérilité des sols. M, A et O indiquent les traitements pré-irradiations utilisés : M = humidification, A= sol séché à l'air, O= sol séché au four (McNamara *et al.*, 2003).

La persistance de bactéries dans des sols après des doses de radiations >50 KGy a également été montrée (Coleman & MacFayden, 1966; Rizzuti *et al.*, 1996; Yardin *et al.*, 2000). Une corrélation négative significative entre la densité bactérienne et la dose d'irradiations gamma est observée dans des sols secs ou humides (McNamara *et al.*, 2003, **Fig.II.22**).

d- Impact de la stérilisation sur les enzymes des sols

Les enzymes sont moins sensibles aux radiations que les microorganismes. Après stérilisation aux rayonnements gamma, les enzymes peuvent rester actives pendant plusieurs semaines (McNamara *et al.*, 2003). McLaren *et al.* (1962) ont ainsi observé que des doses de 20 KGy sont suffisantes pour réduire drastiquement les microorganismes du sol mais que les activités des phosphatases et des uréases sont toujours détectables. De la même façon, Voets *et al.* (1965) ont montré que les activités des saccharases, uréases, phosphatases et des enzymes protéolytiques ne sont pas affectées par des doses de radiations de l'ordre de 20 KGy. Différentes enzymes ont cependant différents niveaux de sensibilité aux radiations. Shih & Souza (1978) ont mis en évidence que, dans des sols irradiés à 75 kGy, l'activité des phosphatases représentait ~ 70 % de l'activité initiale, et que l'activité des uréases n'était pas affectée mais que l'activité des décarboxylases était réduite à 0,5 % de son niveau initial. Les enzymes dans les sols minéraux sont plus résistantes aux radiations que dans les sols organiques, ceci peut être dû aux dommages indirects causés par les radicaux libres produits dans la majorité des sols organiques suite aux radiations (Brown 1981). De même, l'activité glucosidase est supérieure dans des sols humides irradiés à 25 kGy par rapport au sol sec (Lensi, 1991). Considérant ces activités enzymatiques résiduelles, Ramsay et Bawden (1983) recommandent de stabiliser les sols, après irradiations gamma, au moins 8 semaines avant le début des expérimentations.

Des activités enzymatiques sont également maintenues dans des sols autoclavés. Les phosphatases (Kiss *et al.*, 1975; Tibbett, 2002) et les phosphodiesterases (Carter *et al.*, 2007) sont ainsi résistantes à l'autoclavage. Plus récemment, la maintenance de l'activité d'enzymes intracellulaires a également été reporté (*e.g.*, Blankinship *et al.*, 2014). Les propriétés du sol qui contribuent à la thermostabilité des enzymes sont la capacité d'échange cationique, le contenu en matière organique et le pH (Tate, 2002). La formation de complexes enzyme-matière organique et/ou enzyme-matière organique-argile permettrait, ainsi, le maintien d'activités catalytiques (*e.g.*, Boyd & Mortland, 1990). Il a été ainsi mis en évidence que la capacité d'échange cationique et le contenu en matière organique stabilisent la structure tridimensionnelle de la phosphodiesterase, lui permettant de se replier après le traitement par autoclavage et donc de maintenir la conformation de son site actif. D'autre part, le relargage d'ions métalliques suite aux traitements stérilisants peut augmenter la stabilité des métalloenzymes (Carter *et al.*, 2007).

e- Impact de la stérilisation sur la respiration des sols

Depuis les années 1960, des émissions persistantes de CO₂ sont observées lors d'études expérimentales conduites sur des microcosmes de sols stérilisés par différentes méthodes (*e.g.* irradiation gamma, fumigation, autoclavage). Les approches, mises en œuvre dans certaines de ces études, visant à déterminer la stérilité de ces microcosmes ont pourtant mis en exergue que la densité, la biomasse et l'activité des microorganismes étaient réduites à des niveaux faibles à indétectables.

Historiquement, Stotzky & Mortensen (1959) reportent que les taux de respiration des sols irradiés sont quasiment identiques à ceux de sols vivants pendant des périodes d'incubation importantes (>50 jours). Cawse (1975) et Cawse & Mableson (1971) ont observé une augmentation rapide des émissions de CO₂ dans les 24 heures suivant l'irradiation de sols. En 1962, Popenoe & Eno notent que l'ajout de glucose, après irradiation des sols, induit, par comparaison avec des sols non traités, une diminution initiale puis une stimulation des émissions de CO₂ pendant 25 jours. D'autres études dans les années 1960-70 mettent en évidence des productions importantes de CO₂ après irradiations, lesquelles, après quelques jours d'incubation, diminuent et sont comparables à celles de sols vivants (Coleman & MacFadyen 1966 ; Clark & Coleman 1970). Cette dynamique des émissions de CO₂ (stimulation initiale puis stabilisation), a également été notée par Ramsay & Bawden (1983). Ces auteurs ont observé des émissions importantes de CO₂ dans les premiers jours suivant l'irradiation et une stabilisation de ces dernières ~21 jours après irradiation (~ 1/3 des émissions de CO₂ de sols "vivants").

Des sols fumigés retrouvent des taux de respiration similaires à ceux observés avant fumigation quelques jours après le traitement, alors que la biomasse après fumigation ne représente que ~10 à 40% de la biomasse initiale (Jenkinson & Powlson, 1976; Lin & Brookes, 1996). D'autres études rapportent, également, que les taux de minéralisation de la MO sont indépendants de la biomasse microbienne, de l'activité et de la structure de la communauté microbienne dans des sols irradiés (Lensi, 1991) ou fumigés (Kemmitt *et al.*, 2008). Ces observations ont conduit Kemmitt *et al.* (2008) à proposer l'hypothèse de la "Regulatory Gate" (**Cf. Partie II.2.2**). Néanmoins, si les facteurs abiotiques sont importants pour la décomposition de la SOM et régulent partiellement les niveaux de SOM sur de longues périodes (Kuzyakov *et al.*, 2009), ils n'interviennent qu'indirectement en conditionnant l'activité des communautés microbiennes dans la minéralisation de la SOM.

Certains auteurs se sont orientés vers des hypothèses "biologiques" pour expliquer la persistance des émissions de CO₂ dans des sols stérilisés. Kuzyakov *et al.* (2009) ont ainsi suggéré que la redondance fonctionnelle des communautés microbiennes autochtones pourrait expliquer la maintenance de la minéralisation de la SOM dans des sols fumigés. Cependant, cette hypothèse semble peu probable s'il on considère la sévérité de l'impact de la fumigation sur les communautés microbiennes (Brookes *et al.*, 2009). Un autre mécanisme proposé pour expliquer la persistance des émissions de CO₂ dans des sols stérilisés est la maintenance des activités enzymatiques (Cawse &

Mableson, 1971, Maire *et al.*, 2013, Blankinship *et al.*, 2014) autorisant des décarboxylations de la MO (Blankinship *et al.*, 2014), voire la reconstruction de métabolismes extracellulaires (EXOMET, Maire *et al.*, 2013). Les observations et hypothèses sous-tendant ces mécanismes seront particulièrement explicitées dans cette synthèse bibliographique puisqu'elles constituent le cœur des travaux présentés dans ce manuscrit.

II.3.2. LES ACTIVITES EXTRACELLULAIRES DES ENZYMES INTRACELLULAIRES (EI)

Considérant la complexité du métabolisme respiratoire (**Cf. Partie II.1.3.1**) et la fragilité des EI, il est dogmatiquement admis que les catalyses enzymatiques impliquées dans la respiration sont des processus strictement intracellulaires (Burns, 1982 ; Makoi & Ndakidemi, 2008). Pourtant, certains auteurs ont mis en évidence des émissions de CO₂ persistantes provenant de l'oxydation de métabolites du cycle de Krebs et de la glycolyse dans des sols stérilisés (Maire *et al.*, 2013; Blankinship *et al.*, 2014).

II.3.2.1. Enzymes et/ou Minéraux

Blankinship *et al.* (2014) ont amendé des sols (stérilisés ou vivants) avec des substrats carbonés, généralement oxydés par des processus métaboliques cellulaires comme la glycolyse et le cycle de Krebs (**Cf. Partie II.1.3.1**). En dépit de l'absence de cellules vivantes, des processus biochimiques conduisant à la production de CO₂ persistent dans les sols stérilisés. La stérilisation par irradiations gamma et par fumigation ne stoppent pas les émissions de CO₂ à partir des substrats du cycle TCA (*i.e.*, pyruvate, citrate, α -cétoglutarate) (**Fig.II.23**).

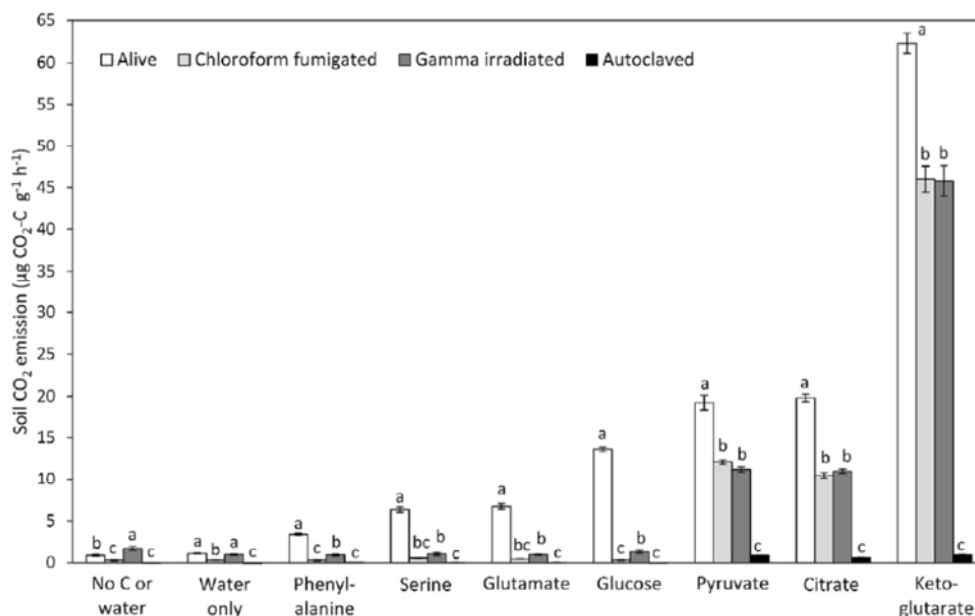


Figure II.23. Réponses de la respiration induite par des substrats dans des sols vivants et stérilisés par irradiations gamma, fumigation et autoclavage (Blankinship *et al.*, 2014).

Ces auteurs ont suggéré que des déshydrogénases du cycle de Krebs restent actives et capables de décarboxyler des molécules présentant un groupement carboxyle. Cependant, les voies biochimiques conduisant à l'oxydation complète du glucose, et des acides aminés en CO_2 semblent être inactives dans les sols stérilisés. Blankinship *et al.* (2014) ont postulé qu'après la lyse cellulaire, la minéralisation du glucose et des acides aminés est stoppée car les enzymes nécessaires à leur oxydation ne sont pas stables dans l'environnement extracellulaires et/ou requièrent l'organisation fournie par les membranes cellulaires. En effet, la respiration à partir de ces substrats implique des transformations liées, notamment, à des systèmes de transporteurs d' e^- (Nelson & Cox 2000) (Cf. **Partie II.1.3.1**). Ces auteurs ont également mis en évidence que si les activités hydrolytiques étaient stoppées suite au traitement par autoclavage (**Fig.II.24A**), les activités oxydatives se maintiennent, voire augmentent, après autoclavage ou combustion du sol (**Fig.II.24B**). Blankinship *et al.* (2014) ont ainsi postulé que l'activité oxydative mesurée dans des sols autoclavés pourrait résulter de processus abiotiques. Par exemple, la combustion augmenterait la capacité oxydative des sols en formant des oxydes de Fe(III) (Certini, 2005 ; Cf. **Partie II.2.1**).

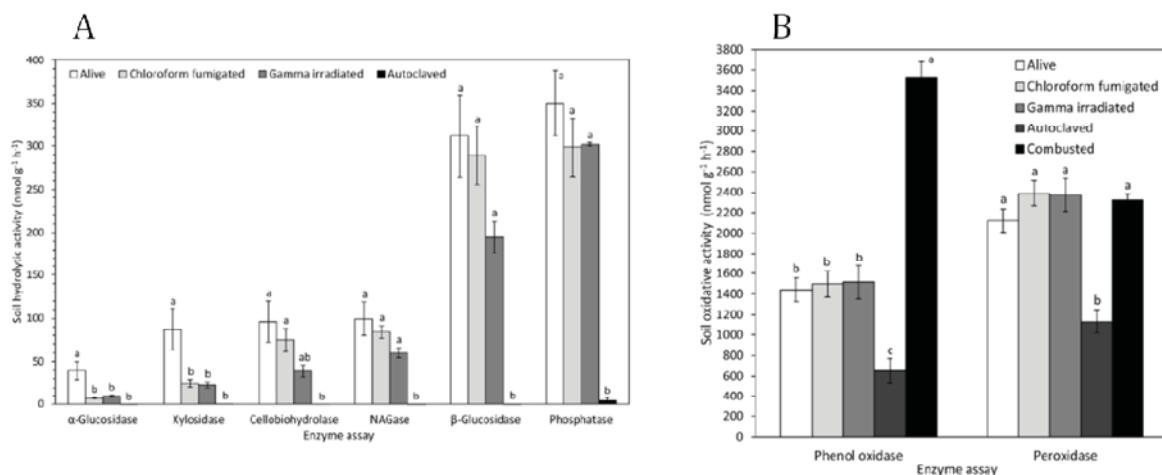


Figure II.24. Réponses, dans des sols vivants et stérilisés par différentes approches, (A) des activités de différentes enzymes hydrolytiques ; (B) des activités d'enzymes oxydatives (Blankinship *et al.*, 2014).

En conclusion, selon Blankinship *et al.* (2014), la persistance des émissions de CO_2 dans les sols stérilisés amendés en substrats organiques serait la résultante de décarboxylases, Et maintenant leurs activités en contexte extracellulaire et ne nécessitant aucun gradient redox mais seulement un contact entre l'enzyme et le substrat. Ces auteurs supportent également l'idée qu'une fraction de la décomposition oxydative dans les sols résulterait de la catalyse minérale (Cf. **Partie II.2.1**).

II.3.2.2. Métabolismes extracellulaires

En plus de noter la persistance d'émissions de CO_2 dans des sols irradiés, où l'activité microbienne est indétectable, Maire *et al.* (2013) ont observé, dans ces sols stérilisés, une oxydation complète du ^{13}C -glucose en ^{13}C - CO_2 . Compte tenu de l'ensemble de leurs observations, ces auteurs ont proposé que les émissions de CO_2 dans les sols sont, pour partie, liées à des voies métaboliques complexes, conduisant à l'oxydation

complète de substrats organiques dans le milieu extracellulaire. Une synthèse détaillée des observations sous-tendant l'hypothèse des métabolismes extracellulaires (EXOMET) sera proposée dans les sections suivantes.

II.3.2.2.1. Arguments en faveur de la maintenance d'une cascade de réactions biochimiques en contexte extracellulaire

Maire *et al.* (2013) ont observé des émissions de $^{13}\text{C}\text{-CO}_2$ dans des sols stérilisés (S) par irradiations gamma, sans et après ajout de ^{13}C -glucose (Fig. II.25). Ces auteurs reportent également que l'apport combiné de glucose (G) et d'extrait cellulaire de levure (YE), contenant les enzymes de la chaîne respiratoire (S+G+YE), induit un flux respiratoire supérieur à celui observé dans les sols non amendés en extrait de levure (S et S+G, Fig. II.25).

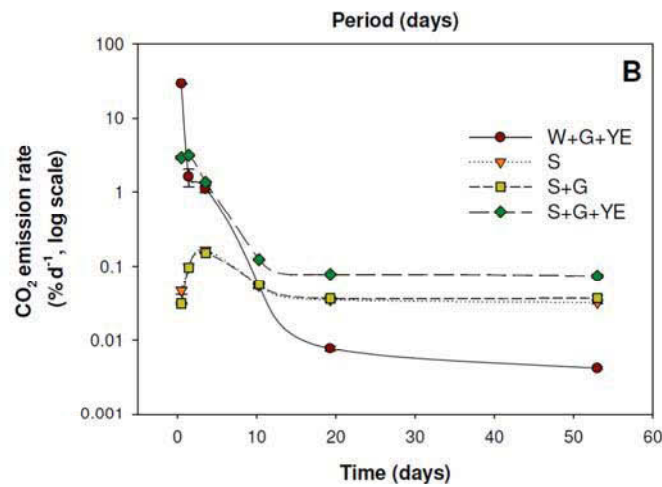


Figure II.25. | Emissions de CO_2 dans des sols et dans de l'eau durant 4 périodes d'incubation. Les résultats sont exprimés en % de l'atmosphère du microcosme. (S): sols irradiés, (S+G): sols irradiés + glucose, (S+G+YE): sols irradiés + glucose + extrait de levure, (W+G+YE) : eau stérile+glucose+extrait de levure (Maire *et al.*, 2013).

Dans leurs microcosmes expérimentaux, le quotient respiratoire (émission de CO_2 /consommation d' O_2) est proche de 1 (Fig.II.26).

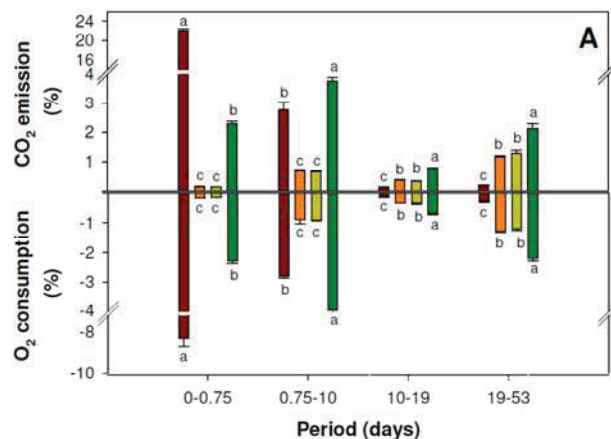


Figure II.26. | Emissions de CO_2 et consommation d' O_2 dans des sols et dans de l'eau durant 4 périodes d'incubation. Les résultats sont exprimés en % du volume de gaz atmosphérique du microcosme. Le code couleur est identique à la figure II.28. (Maire *et al.*, 2013).

Le glucose est une molécule très stable dont l'oxydation physique requiert une température supérieure à 500°C. L'oxydation biochimique du glucose nécessite quant à elle une cascade de réactions biochimiques catalysées par de nombreuses enzymes (Cf. **Partie II.1.3.1**). Selon ces auteurs, l'ensemble de ces données soutient l'hypothèse selon laquelle, dans les sols, une cascade de réactions enzymatiques conduit à l'oxydation complète de carbone organique dans un contexte extracellulaire. Ceci indiquerait que les IE impliquées dans la chaîne respiratoire peuvent maintenir leurs activités hors de la cellule et avoir accès aux substrats et aux cofacteurs nécessaires à leurs activités (Maire *et al.*, 2012 ; 2013). Le transfert d'e⁻ jusqu'à l'accepteur final, l'O₂, serait autorisé par la présence de cytochromes dans les débris cellulaires. Cette hypothèse permettrait la régénération des accepteurs d'e⁻ et expliquerait la persistance des processus observés sur de longues périodes de temps (> 50 jours, **Fig.II.25**)

II.3.2.2.2. Stabilisation des EI sur la matrice sol

Dans les microcosmes de sols stérilisés (S, S+G, S+G+YE, **Fig.II.25**), les émissions de CO₂ persistent et se stabilisent sur de longues périodes de temps (>50 jours, **Fig.II.25**), alors que ces dernières décroissent rapidement dans l'eau (W+G+YE, **Fig.II.25**). Selon Maire *et al.* (2013), ces résultats soulignent le rôle clé des particules organo-minérales du sol dans la stabilisation des enzymes impliquées dans l'EXOMET. Ces auteurs ont ainsi mis en évidence que les interactions entre les particules organo-minérales du sol et des IE catalysant des étapes cataboliques clés de glycolyse (Glucose hexokinase (GHK), Glucose-6-phosphate isomérase (G6PI)) et du cycle de Krebs (Malate déshydrogénase (MDH)) permettent à ces dernières de maintenir 4 à 15% de leurs activités dans la matrice sol (**Fig.II.27**).

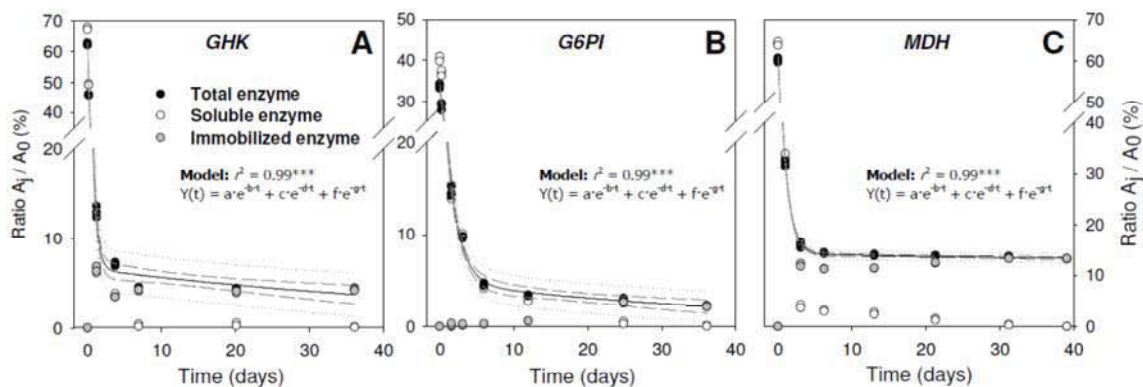


Figure II.27. | Activités de la (A) Glucose hexokinase (GHK), de la (B) Glucose-6-phosphate isomérase (G6PI) et de la (C) Malate déshydrogénase (MDH) après incorporation dans des sols vivants. Les activités au cours du temps (A_t) sont exprimées en % de l'activité initiale de la solution enzymatique (A₀). Les activités enzymatiques totales (cercles noirs), des enzymes immobilisées (cercles gris) et des enzymes solubles (cercles blancs) sont distinguées (Maire *et al.*, 2013).

Maire *et al.* (2013) ont ainsi proposé que la cinétique d'inactivation des enzymes devrait suivre le modèle suivant :

$$Y(t) = a \cdot \exp(-b \cdot t) + c \cdot \exp(-d \cdot t) + f \cdot \exp(-g \cdot t)$$

Avec t , le temps d'incubation ; a , c et f représentant la taille et b , d et g représentant le taux de dégradation des pools d'enzymes dont la vitesse de dégradation est respectivement rapide, intermédiaire et lente. Ce modèle suppose l'existence de trois pools d'enzymes ayant des temps de résidence différents dans le sol. L'utilisation de ce modèle a permis aux auteurs de mettre en évidence que les temps de demi-vie des IE stabilisées sur les particules de sol seraient compris entre 32 et 495 jours. Cette stabilisation conférerait aux IE des avantages et des propriétés similaires à celles des EE liées aux particules de sol, à savoir, une protection contre la protéolyse et une modification des paramètres cinétiques autorisant leurs activités dans des conditions physico-chimiques différentes de celles rencontrées dans le milieu intracellulaire (Cf. **Partie II.1.2.1**).

II.3.2.2.3. Facteurs conditionnant l'expression des EXOMETs

Au vu des données de Maire *et al.* (2013), l'EXOMET pourrait s'exprimer pour des gammes de conditions physico-chimiques plus importantes que celles des métabolismes cellulaires. L'EXOMET serait ainsi résistant aux contaminants chimiques (*i.e.*, chloroformes), aux fortes températures (<150°C), aux fortes radiations (45kGy) (**Fig.II.28**). Cette réponse différenciée des deux métabolismes face aux facteurs environnementaux nécessitera, selon ces auteurs, d'intégrer séparément l'EXOMET et les métabolismes intracellulaires dans les modèles biogéochimiques simulant les flux de C dans le sol et entre le sol et l'atmosphère (Maire *et al.*, 2013).

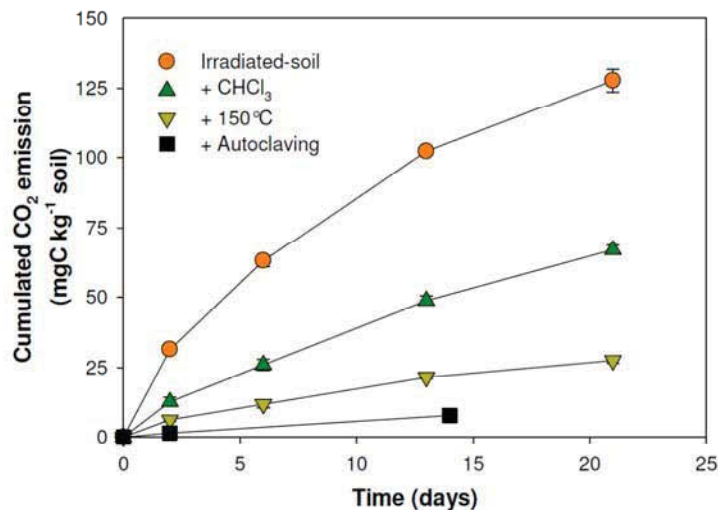


Figure II.28. | Emissions cumulées de CO₂ dans des sols après différents traitements de stérilisation (Maire *et al.*, 2013).

II.3.2.2.4. Contribution des EXOMET aux émissions de CO₂ par les sols vivants

Afin de déterminer la contribution de l'EXOMET à la respiration totale du sol, Maire *et al.* (2013) ont proposé les équations suivantes :

$$\text{(Eq.1)} \quad R_{ni} = R_i + R_x$$

$$\text{(Eq.2)} \quad R_i = k \cdot R_i + R_x$$

Dans ce modèle, la respiration d'un sol vivant (R_{ni}) serait égale à la somme de la respiration cellulaire (R_i) et de l'EXOMET (R_x) (Eq.1). Après irradiations, une fraction k de R_i est convertie en EXOMET *via* la stabilisation sur les particules de sol des IE respiratoires relarguées par la lyse cellulaire. Le paramètre k , compris entre 0 et 1, a été estimé pour différents types de sol en fonction de la fraction de l'activité de la G6PI stabilisée sur les particules de sol (Tab.II.5.). La respiration dans un sol irradié (R_i) serait donc égale à la somme de l'EXOMET (R_x) et de $k \cdot R_i$ (Eq. 2).

G6PI activity (% initial activity)	Sites				
	Bugac	Laqueuille	Ponta Grossa	Soro	Theix
7 days	nd	0.5 ± 0.05	5.1 ± 0.4	nd	10.5 ± 0.9
14 days	nd	0.3 ± 0.03	3.1 ± 0.1	nd	10.0 ± 0.4
Model quantification of the two metabolic pathways of organic C oxidation					
Model inputs					
R_{ni} (mg C-CO ₂ kg ⁻¹)	168.8 ± 2.6	186.4 ± 3.3	162.8 ± 0.9	200.2 ± 1.5	56.4 ± 0.5
R_i (mg C-CO ₂ kg ⁻¹)	98.2 ± 3.2	40.3 ± 1.5	30.6 ± 0.8	34.6 ± 0.9	30.2 ± 0.9
k (%)	nd	0.3 ± 0.03	3.1 ± 0.1	nd	10.0 ± 0.4
Model results					
R_i (mg C-CO ₂ kg ⁻¹)	nd	146.5	136.4	nd	29.1
R_x (mg C-CO ₂ kg ⁻¹)	nd	39.9	26.4	nd	27.3
Contribution of the extracellular oxidative metabolism to CO ₂ emission (%)	nd	21.3	16.2	nd	48.4

Tableau II.5. | Activité de la G6PI et résultats du modèle utilisé pour la quantification des émissions de CO₂ par les organismes vivants (R_i) et par les métabolismes extracellulaires (R_x) pour 5 sols différents. La contribution de l'EXOMET aux émissions de CO₂ est calculée par $R_x/R_{ni} \times 100$, nd = non déterminé (Maire *et al.*, 2013).

Sur la base de ce modèle, Maire *et al.* (2013) ont établi que l'EXOMET contribuerait entre 16 et 48% aux émissions de CO₂ par les sols (Tab.II.5.). Cette contribution substantielle suppose la présence d'une quantité importante d'IE respiratoires dans le sol. Cette réserve résulterait d'une dynamique d'accumulation à long terme d'IE libérées par la lyse cellulaire. La forte concentration d'IE autour des particules du sol faciliterait les échanges des substrats intermédiaires et des cofacteurs entre les IE nécessaires à la cascade de réactions impliquées dans les métabolismes oxydatifs (Maire *et al.*, 2012 ; 2013).

III- OBJECTIFS DE LA THESE

L'hypothèse de l'EXOMET dans le sol, telle que définie par Maire *et al.* (2013), implique que des métabolismes respiratoires s'organisent dans un environnement extracellulaire et, en conséquence, que des chaînes de transferts d'électrons soient fonctionnelles et que des gradients de protons s'établissent sans barrière cellulaire.

Cette hypothèse a soulevé une certaine réserve de la communauté scientifique en soulignant, en particulier, l'existence de potentiels biais méthodologiques. La majorité des résultats obtenus par Maire *et al.* (2013) reposent sur la stérilité des sols étudiés. Pour stériliser leurs sols, ces auteurs ont utilisé des doses de radiations gamma de 45kGy, établies comme suffisantes pour assurer la stérilité des sols. La stérilité des sols a été vérifiée par un panel d'approches méthodologiques incluant (i) une technique de CARD-FISH (marquage fluorescent de la sous unité ribosomale 16S bactérien), (ii) de la microscopie électronique à transmission (sur des extraits cellulaires de sol), (iii) de la quantification de biomasse microbienne et (iv) de la culture cellulaire sur milieux enrichis en nutriments et en C. Du fait des limites associées à chacune de ces méthodes (*e.g.* microorganismes non-cultivables, étape d'extraction des microorganismes de la matrice, aspécificité de marquage avec les sondes oligonucléotidiques), il est évident qu'établir l'absence totale de cellules actives dans une matrice tridimensionnelle telle que le sol est complexe voire impossible.

Ce constat a conduit certains chercheurs à proposer que les émissions de CO₂ observées par Maire *et al.* (2013) n'étaient pas la résultante de l'EXOMET mais de communautés microbiennes radio-résistantes ou de cellules fantômes (cellules morphologiquement intactes mais non proliférantes (Lensi *et al.*, 1991; Ramsay & Bawden, 1983)) n'ayant pas été détectées lors des contrôles de stérilité.

Nous avons donc, dans un premier temps, cherché à apporter des preuves supplémentaires de l'existence d'EXOMET. L'étude présentée dans le chapitre II de ce manuscrit a ainsi mis en exergue que, dans des sols soumis à des traitements de stérilisation drastiques, le fractionnement isotopique du C induit par les métabolismes siégeant dans ces sols ne pouvait résulter d'une activité cellulaire. Cette étude nous a également permis de proposer une approche permettant de quantifier la part relative et absolue de l'EXOMET aux émissions de CO₂ par le sol, ceci sans avoir recours à des traitements de stérilisation.

En étudiant la consommation d'O₂ et de CO₂ dans des sols aux variables physico-chimiques contrastées, nous avons ensuite tenté d'établir le caractère cosmopolite de ce processus dans les sols et d'identifier certains facteurs impliqués dans la régulation de l'EXOMET. Finalement, l'étude de l'inactivation d'écoenzymes, potentiellement impliquées dans l'EXOMET, en fonction des différents fractions granulométriques du sol nous a permis (i) de construire un modèle simulant l'inactivation de ces catalyseurs après leur incorporation dans le sol et (ii) d'étudier l'influence des particules granulométriques et de la structure du sol sur l'inactivation des écoenzymes.

**CHAPITRE II : Nouvelles preuves
de l'existence d'EXOMET
contribuant aux émissions de CO₂
par le sol**

SOIL CARBON DIOXIDE EMISSIONS CONTROLLED BY AN EXTRACELLULAR OXIDATIVE METABOLISM IDENTIFIABLE BY ITS ISOTOPE SIGNATURE.

B. Kéroual^{1,2,3}, **A.-C. Lehours**^{1,2}, **J. Colombet**^{1,2}, **C. Amblard**^{1,2}, **G. Alvarez**^{3,4},
S. Fontaine³

Article accepté dans Biogeosciences

(doi:10.5194/bg-2015-399)

[1] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, BP 10448, 63000, Clermont-Ferrand, France

[2] CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, 63178 Aubière, France

[3] INRA, UR874 (Unité de Recherche sur l'Ecosystème Prairial), 5 Chemin de Beaulieu, 63039 Clermont-Ferrand, France.

[4] Clermont Université, VetAgro Sup, BP 10448, F-6300 Clermont-Ferrand, France

Correspondence to: B. Kéroual (benoit.keraval@gmail.com)

ABSTRACT

Soil heterotrophic respiration is a major determinant of carbon (C) cycle and its interactions with climate. Given the complexity of the respiratory machinery it is traditionally considered that oxidation of organic C into carbon dioxide (CO₂) strictly results from intracellular metabolic processes. Here we show that C mineralization can operate in soils deprived of all observable cellular forms. Moreover, the process responsible of CO₂ emissions in sterilized soils induced a strong C isotope fractionation (up to 50 ‰) incompatible with a respiration of cellular origin. The supply of ¹³C-glucose in sterilized soil led to the release of ¹³CO₂ suggesting the presence of respiratory-like metabolism (glycolysis, decarboxylation reaction, chain of electron transfer) carried out by soil-stabilized enzymes and by soil mineral and metal catalysts. These findings indicate that CO₂ emissions from soils can have two origins: 1) the well-known respiration of soil heterotrophic microorganisms and 2) an extracellular oxidative metabolism (EXOMET) or, at least, catabolism. These two metabolisms should be considered separately when studying effects of environmental factors on the C cycle because they do not likely obey to the same laws and respond differently to abiotic factors.

INTRODUCTION

Mineralization of soil organic matter (SOM) into CO₂ and mineral nutrients is central to the functioning of eco- and agro-systems in sustaining nutrient supply and plant primary production. Soil carbon (C) mineralization is also a major determinant of the global C cycle and climate by releasing from land surfaces an equivalent of ten times the anthropogenic emissions of CO₂ (IPCC, 2007; Paterson and Sim, 2013). Therefore, knowledge of the metabolic pathways by which SOM is oxidized is crucial to predicting both the food production and the climate under a changing environment.

It is traditionally considered that SOM mineralization result from the activity of soil microbial communities through biological catalyzed processes including both extracellular depolymerization and cellular metabolisms. Extracellular depolymerization converts high-molecular weight polymers like cellulose into soluble substrates assimilable by microbial cells. This depolymerization is performed by extracellular enzymes released in soil through microbial cell excretion and lysis (Burns *et al.*, 2013). In cells, assimilated substrates are carried out by a cascade of endoenzymes (Sinsabaugh *et al.*, 2009; Sinsabaugh and Follstad Shah, 2012), along which protons and electrons are transferred from a substrate to intermediate acceptors (*e.g.* NADP) and small C compounds are decarboxylated into CO₂. At the end of the cascade, the final acceptor (*e.g.* O₂ under aerobic conditions) receives the protons and electrons while the gradient of H⁺ generated is used by ATP-synthase to produce ATP (Junge *et al.*, 1997).

Given the complexity of its machinery it is often believed that respiration is strictly an intracellular metabolic process. However, this paradigm is challenged by recurrent observations of persistent substantial CO₂ emissions in soil microcosms where sterilization treatments (*e.g.* γ -irradiations) reduced microbial activities to undetectable levels (Blankinship *et al.*, 2014; Kemmitt *et al.*, 2008; Lensi *et al.*, 1991; Maire *et al.*, 2013; Ramsay and Bawden, 1983; Trevors, 1996). Maire *et al.* (2013) addressed this issue and proposed that extracellular oxidative metabolisms (EXOMET) contribute to soil respiration. According to these authors, intracellular enzymes involved in cell oxidative metabolism are released during cell lysis and retain their activities in soil thanks to the protective role of soil particles. These enzymes are able to oxidize ¹³C-glucose in ¹³CO₂ using O₂ as the final electron acceptor suggesting that all or part of the cascade of biochemical reactions involved in cell oxidative metabolism are reconstructed outside the cell (Maire *et al.*, 2013). As an alternative explanation Blankinship *et al.* (2014) proposed that some decarboxylases, retaining activities outside the cell in sterilized soils, catalyze CO₂ emissions through decarboxylation of intermediary metabolites of the Krebs cycle. Whereas differing in the complexity of the proposed mechanisms, these results (i) suggest that CO₂ emissions from soils are not only dependent to the bio-physicochemical environment provided by the cells, (ii) indicate that the soil micro-environment heterogeneity offers a range of physicochemical conditions allowing endoenzymes to be functional.

Despite these recent advances, the paradigm that only a cell can organize the complex machinery achieving the complete oxidation of organic matter, at ambient temperature, remains established in the scientific community (see published discussions generated by Maire *et al.*, 2012). In this vein, some authors suggested that CO₂ emissions from γ -irradiated soils can result from “ghost cells” (non-proliferating but morphologically intact cells) which conserve some cellular metabolic activities during prolonged periods of time (Lensi *et al.*, 1991; Ramsay and Bawden, 1983).

The objective of the present study was to determine whether a purely extracellular oxidative metabolism (EXOMET) can occur in a soil deprived of active and “ghost” cells. To this aim, high doses of γ -irradiations and different time of soil autoclaving were combined to suppress both biomass and necromass (“ghost” cells). The presence/absence of active and non-active cells in soil was checked by observations with transmission electron microscopy on tangential ultrathin sections of soil, DNA and RNA soil content and flow cytometry. The production and the isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) of CO₂ were monitored in sterilized and non-sterilized soils over 4 periods through 91 days of incubation. We also tested whether the EXOMET in sterilized soils can carry out complex cascade of biochemical reactions (e.g. an equivalent of glycolysis and Krebs cycle) by incorporating ¹³C- labelled glucose and by quantifying emissions of ¹³C-CO₂ (Fig 1).

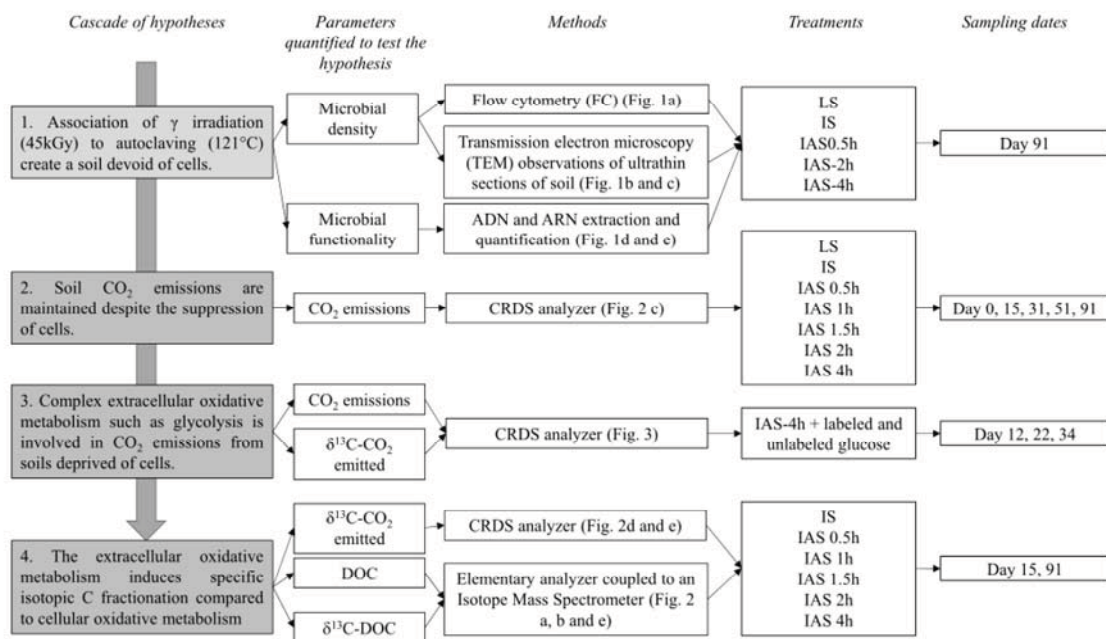


Figure 1: General experimental design of the study which include our hypothesis, the parameters, the methods and the samples (n=3 for each date and treatment studied) used to test those hypotheses.

MATERIAL AND METHODS

Soil sampling, sterilization and incubation

Samples were collected in November 2012 from the 40-60 cm soil layer at the site of Theix (Massif Central, France). The soil is sandy loam Cambisol developed on granitic rock (pH=6.5, carbon content = 23,9±1 g C kg⁻¹). For detailed information on the site see Fontaine *et al.* (Fontaine *et al.*, 2007). Fresh soil samples were mixed, sieved at 2 mm, dried to 10 % and irradiated with gamma ray at 45 kGy (⁶⁰Co, IONISOS, ISO14001, France). To demonstrate the absence of viable cells in soil after irradiation, we inoculated culture medium for bacteria (LB agar) and fungi (Yeast Malt agar) with irradiated soil and we applied CARD-FISH to irradiated soil extracts. Results showed the absence of any microbial proliferation and RNA-producing cells (Maire *et al.*, 2013). After irradiation, some sets of soil samples were exposed to autoclaving at 121°C during variable periods (0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 4 h). Incubated microcosms consisted of 9 g (oven dried basis) samples of sieved soils placed in 120 mL sterile glass flasks capped with butyl rubber stoppers and sealed with aluminum crimps. Microcosms were flushed with a sterilized free CO₂ gas (80 % N₂, 20 % O₂) and incubated in the dark at 20°C for 91 days. Non-irradiated living soil was also incubated as a control. Three microcosm replicates per treatment were prepared. Flasks were sampled at 15, 31, 51 and 91 days of incubation to measure CO₂ fluxes and ¹³C abundance of CO₂. After each measurement, flasks containing soil samples were flushed with a sterilized free CO₂ gas (80 % N₂, 20 % O₂). All manipulations were done under sterile conditions. In the text and the figures LS mean “living soils”, IS mean “irradiated soils” and IAS-t referred to irradiated and autoclaved soils with ‘t’ referring to the time of autoclaving.

Carbon dioxide emissions and their isotope composition (¹³C/¹²C)

The amount and isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) of CO₂ accumulated in flasks during the incubation period were quantified using a cavity ring down spectrometer analyser coupled to a small sample injection module (Picarro 2101-i analyser coupled to the SSIM, Picarro Inc., Santa Clara, CA, USA). A volume of 20 ml of gas was sampled by the analyser. The CO₂ concentration in gas samples ranged from 300 to 2000 ppm of CO₂ in accordance with the operating range of the analyser. The CO₂ concentrations and delta ¹³C of gas samples were measured at a frequency of 30 mn⁻¹ during 10 mn. Value provided by the analyser is the integrated value during these 10 mn of measurement. A reference gas with a known concentration of CO₂ and delta ¹³C was injected between samples. For each period of incubation, the cumulated amount of CO₂ was divided by the duration of the period (in days) to estimate the mean daily CO₂ emission rate.

Content and isotope composition of dissolved organic carbon (DOC)

At the beginning and at the end of the incubation ($t = 15$ and $t = 91$ days), DOC was extracted from 5 g of soil with a 30 mM K₂SO₄ solution. After filtration through 1.6 μm (GE Healthcare, Life Sciences, WhatmanTM, Glass microfiber filters), extracts were lyophilized. The lyophilized samples were analyzed with an elementary analyzer (EA Carlo ERBA NC 1500) coupled to an Isotope Ratio Mass Spectrometer (Thermo Finnigan DELTA S) to determine their carbon content and isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$).

Isotope systematic

We use standard δ notation for quantifying the isotopic composition of CO₂ and of DOC: the ratio R of ¹³C/¹²C in the measured sample is expressed as a relative difference (denoted $\delta^{13}\text{C}$) from the Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) international standard material. The carbon isotope composition is expressed in parts per thousand (‰) according to the expression: $\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{sample}}/ R_{\text{VPDB}} - 1) \times 1000$. The carbon isotope fractionation was calculated as follows: $\Delta\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = (\delta^{13}\text{C}\text{-DOC} - \delta^{13}\text{C}\text{-CO}_2)/(1 + \delta^{13}\text{C}\text{-CO}_2)$.

Soil cell density

At the end of the incubation setting ($t = 91$ days), cells were separated from soil particles and enumerated by FC. One gram of soil was mixed with 10 mL of pyrophosphate buffer (PBS 1X, 0.01 M Na₄P₂O₇) and shaken for 30 min in ice at 70 rpm on a rotary shaker. After shaking, the solution was sonicated 3 times (1 min each) in a water bath sonicator (Fisher Bioblock Scientific 88156, 320W, Illkirch, France). Larger particles were removed by centrifugation (800 \times g, 1 min); the supernatant was fixed with paraformaldehyde (4 % final concentration) and stored at 4°C prior to quantification analysis. Total cells counts were performed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Sciences, San Jose, CA, USA) equipped with an air-cooled laser, providing 15 mW at 488 nm with the standard filter set-up. Samples were diluted into 0.02 μm filtered TE buffer, stained with SYBR Green 1 (10,000 fold dilution of commercial stock, Molecular Probes, Oregon, USA) and the mixture was incubated for 15 min in the dark. The cellular abundance was determined on plots of side scatter versus green fluorescence (530 nm wave-length, fluorescence channel 1 of the instrument). Each sample was analyzed for 1 min at a rate of 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. FCM list modes were analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences, version 4.0). Cell density was expressed as cells \times g⁻¹ of soil (dry mass).

Density and integrity of cells

At the end of the incubation setting ($t = 91$ days), abundance of unicellular organisms (prokaryotic and eukaryotic) with a preserved morphology was quantified on soil ultrathin sections (90 nm thick) by TEM. Each step of the soil inclusion protocol was followed by

centrifugation (12000 x g, 2 min) to pellet soil samples. Aliquot of soil sample (0.05 g) was fixed for 1 hour in 1.5 mL of a Cacodylate buffer pH 7.4 (0.2 M cacodylate, 6 % glutaraldehyde and 0.15 % ruthenium red). Soil was washed three times with cacodylate 0.1 M buffer during 10 min. Post fixation was conducted with the 0.1 M cacodylate buffer containing 1 % of osmic acid. To facilitate the further penetration of propylene oxide, soil dehydration was made through a gradient of ethanol: 50 % ethanol (3 x 5 min), 70 % ethanol (3 x 15 min), 100 % ethanol (3 X 20 min) solutions. To improve the resin permeation, the sample was incubated in a propylene oxide bath (3 x 20 min). To allow the sample to soak resin, soil sample was incubated overnight in a bath containing propylene oxid and Epon 812 resin (ration 1:1), and secondary eliminated by flipping. After polymerization of cast resin on soil preparations (48 h, 50°C), the narrower parts of the molded and impregnated aggregates were pyramidally shaped with a Reichert TM60 ultramill and finally ultra-thin sections (90 nm) were performed with a diamond knife (Ultra 45°, MF1845, DIATOME, Biel-Bienne, Switzerland; Ultramicrotome Ultracut S, Reichert Jung Laica, Austria). Soil cuts were collected onto 400-mesh Cu electron microscopy grid supported with carbon-coated Formvar film (Pellanne Instruments, Toulouse, France). Each grid was negatively stained for 30 s with uranyl acetate (2 %), rinsed twice with 0.02 µm distilled water and dried on a filter paper. Soil ultrathin sections were analyzed using a JEM 1200EX TEM (JEOL, Akishima, Japan). Abundance of morphologically intact cells were expressed as cells x mm⁻² of soil.

Soil DNA and RNA content

Two grams of soil were collected at the end of the incubation setting (t= 91 days). Genomic DNA and total RNA were extracted from soil samples and purified using the PowerSoil DNA isolation kit and the PowerSoil total-RNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc.), respectively. DNA and RNA content of soil communities were visualized by electrophoresis on a 1 % agarose gel containing ethidium bromide (0.5 g.mL⁻¹) normalized with a 1 kbp size marker (Invitrogen). Negative control was performed as well. Following electrophoresis, agarose gels were analyzed using ImageJ software (available at <http://imagej.nih.gov/ij/>). The band intensities were used to quantify the relative content of soil DNA and RNA in sterilized soils related to living soil.

Soil incubations with ¹³C₆-labelled-glucose

Samples (9 g, dry mass basis) of irradiated (45 kGy) and autoclaved (121 °C, 4 h) soil were incubated after addition of sterile solutions (1.53 mL of a 0.086 M glucose solution) of unlabelled- or of ¹³C₆- glucose (¹³C Abundance = 99 %). This amendment corresponds to 2.6 mg glucose g⁻¹ soil. Incubation and gas measurements were performed as previously described.

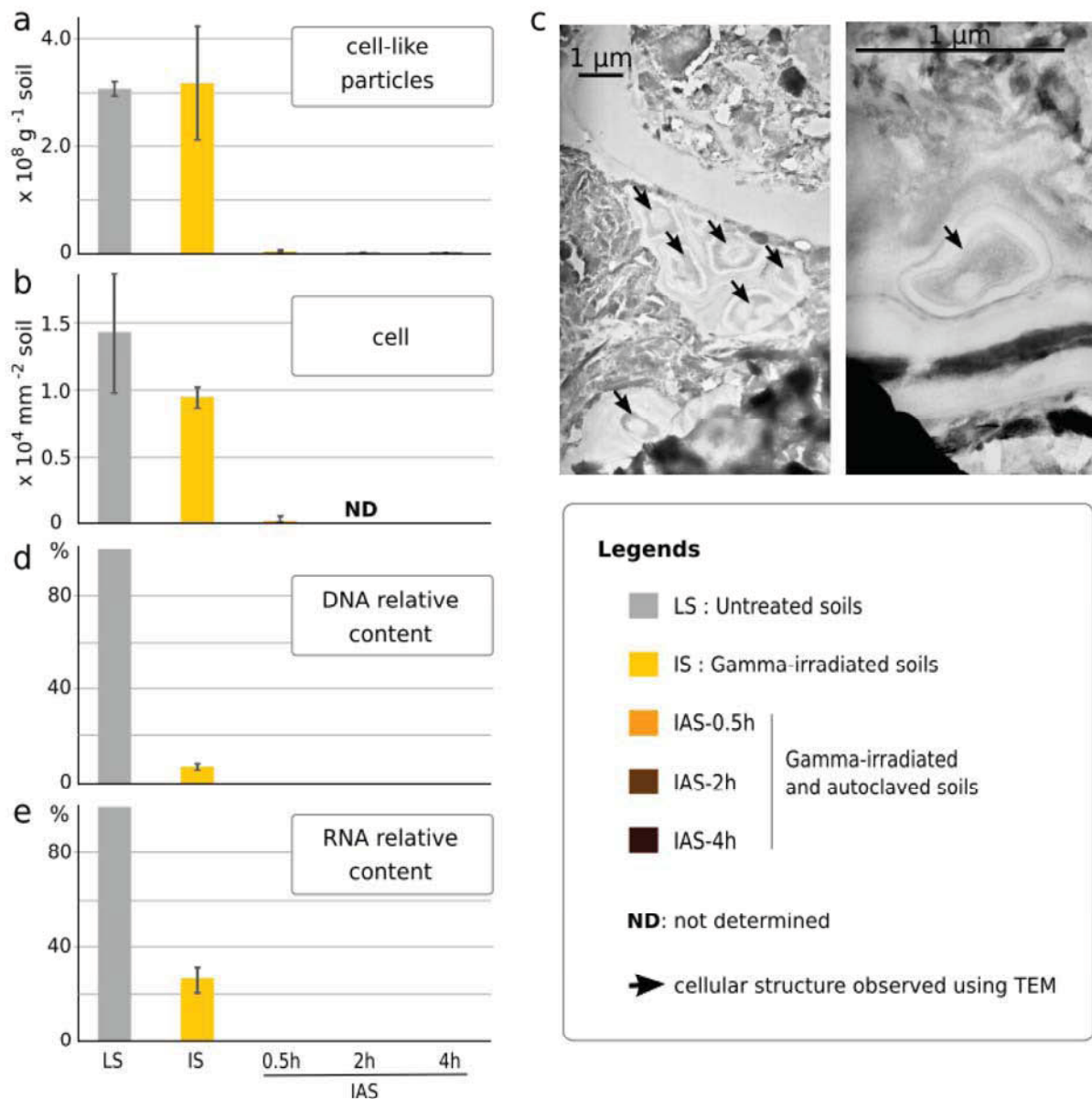


Figure 2: Impact of sterilization treatments on cellular density, integrity and functionality. (a) Cell density enumerated by flow cytometry (FC), (b) cell density and integrity determined by transmission electron microscopy (TEM), (c) TEM photographs of ultrathin sections of soil showing cellular structure in LS, (d) DNA and (e) RNA relative contents in soils (dry mass basis). The percentage of DNA and RNA relative contents was estimated using LS as a reference. Standard deviation was estimated using three replicates per conditions. LS: Untreated soils, IS: irradiated soils, IAS-t: irradiated and autoclaved soils with 't' referring to the time of autoclaving.

Statistical analyses

Each treatment was prepared in triplicate (n=3). One-Way ANOVA analysis was used to test the involvement significance of sterilization treatments on CO₂ emissions, δ¹³C-CO₂, DOC, and δ¹³C-DOC. Normality was tested using the Shapiro-Wilk test (p>0.05). Equality of variances were tested with a Leven's Test (p<0.05). Student test analyses were used to test the significance of the difference (p<0.05) obtained between each conditions and each sampling dates and for each parameters evaluated during this study. Those statistical analyses were performed using the PAST software V3.04 (Anon, n.d.).

RESULTS

Effect of sterilization treatments

Microbial cell density and soil DNA and RNA content

Gamma-irradiations did not significantly reduce cellular density as revealed by flow cytometry ($3.1 \times 10^8 \pm 1.3 \times 10^7$ cell.g⁻¹ in living soil, LS, *versus* $3.2 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^8$ cell.g⁻¹ in irradiated soil, IS, **Fig. 2a**) and transmission electron microscopy ($1.4 \times 10^4 \pm 4.3 \times 10^3$ in LS *versus* $9.5 \times 10^3 \pm 0.7 \times 10^2$ cell.g⁻¹ in IS, **Figs. 2b and 2c**). However, two proxies of cellular functionality and activity (DNA and RNA) were substantially decreased by irradiations (-93.5 % ± 1 % for DNA and -74 % ± 6 % for RNA, **Figs. 2d and 2e**). Moreover, RNA and DNA streaks observed on electrophoresis gels indicated that the nucleic acid content of irradiated soils was largely degraded (data not shown).

The combination of γ-irradiations and autoclaving decreased cell densities by two orders of magnitude in irradiated and autoclaved soil, IAS (**Fig. 2a**). Results from flow cytometry and transmission electron microscopy showed that the cell density was reduced to < 2% compared to LS. After autoclaving, transmission electron microscopy revealed that the cell density was reduced to undetectable values (**Figs. 2b**). According to transmission electron microscopy and nucleic acid extract results (**Figs. 2b, 2d and 2e**), the remaining flow cytometry signal in IAS is attributed to auto fluorescent particles and unspecific binding of the fluorescent dyes on debris.

Dissolved organic carbon (DOC) and its isotopic composition

Both γ-irradiations and autoclaving modified the soil chemistry as revealed by the analysis of the aqueous phase at the beginning of the experiment. The aqueous phase contained much more DOC in irradiated soil than in untreated soil (37 ± 3 μg C.g⁻¹ to 303 ± 17 μg C.g⁻¹ in LS and IS, respectively (**Fig. 3a**). Autoclaving further increased DOC content which gradually accumulated according to the time of autoclaving, from 557 ± 11 μg C.g⁻¹ with 0.5 h of autoclaving to 1060 ± 28.4 μg C.g⁻¹ after 4 h of autoclaving (**Fig. 3a**). Similarly, the δ¹³C-DOC gradually increased from -27.4 ± 0.4 ‰ in LS to -24.9 ± 0.12 ‰ in IAS-4h (**Fig. 3b**). In

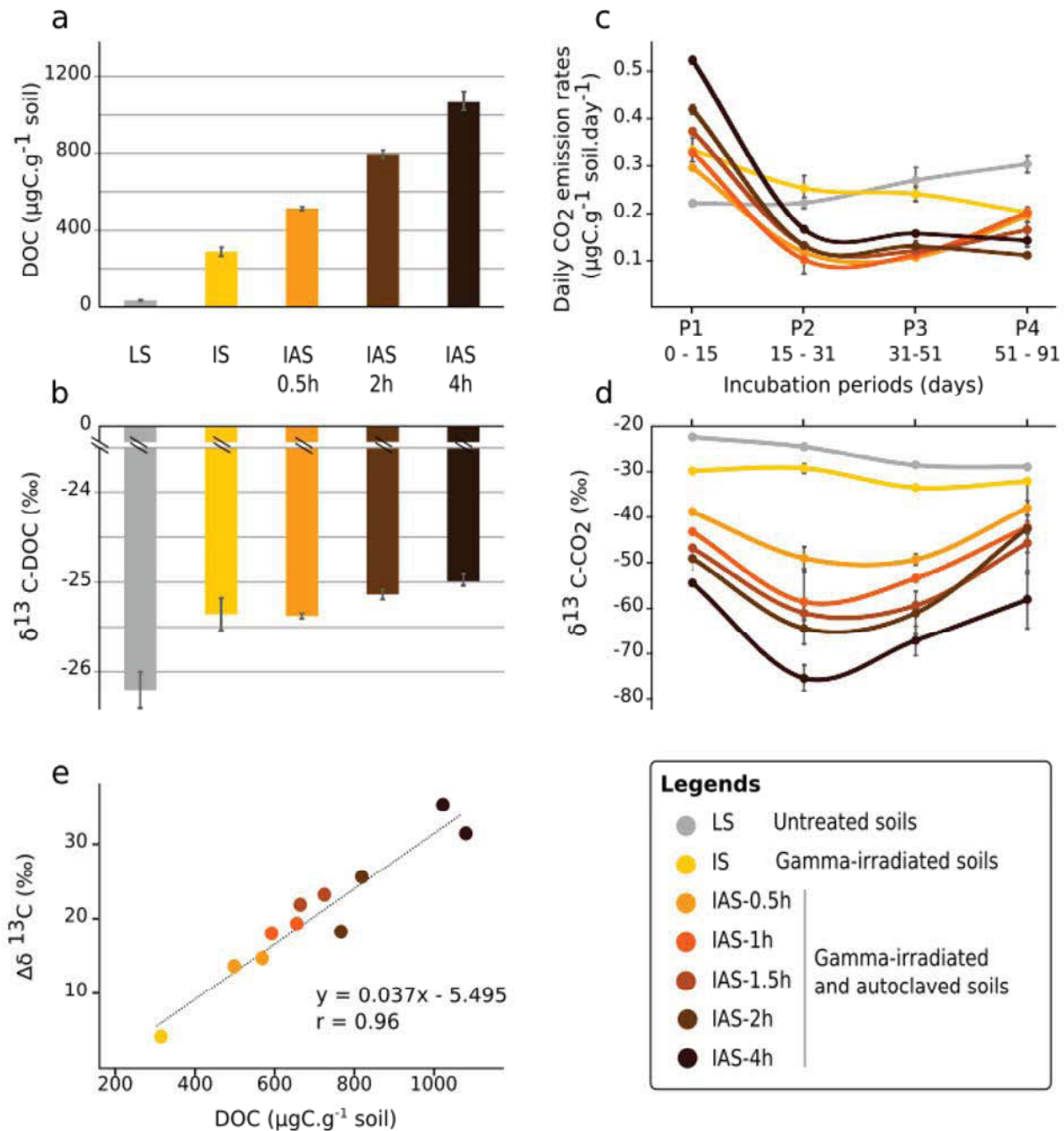


Figure 3: Content and isotopic composition of dissolved organic carbon (DOC) and of CO₂ across time and treatments.

(a) Content and (b) $\delta^{13}\text{C}$ of dissolved soil organic carbon content (DOC) at the beginning of incubation, (c) daily C-CO₂ emissions rates and (d) $\delta^{13}\text{C}$ of CO₂ released during four periods of incubation, (e) correlation between the carbon isotope discrimination ($\Delta\delta^{13}\text{C}$ in ‰) induced by the extracellular oxidative metabolism (EXOMET) and the DOC content. The correlation was calculated from data of sterilized soil treatments (IS, IAS-0.5h, IAS-1h, IAS-1.5h, IAS-2h, IAS-4h) analyzed at the beginning and the end of incubation. Standard deviation was estimated using three replicates per conditions. LS: Untreated soils, IS: irradiated soils, IAS-t: irradiated and autoclaved soils with 't' referring to the time of autoclaving.

all soil microcosms, DOC content and $\delta^{13}\text{C}$ of DOC did not significantly change over time (data not shown).

All soil microcosms emitted CO₂ during all the incubation (**Fig. 3c**). Cumulated CO₂ emissions from LS and IS were not significantly ($p < 0.05$) different throughout the 91 days of incubation (24.4 ± 1.5 and $21.9 \pm 1.3 \mu\text{gC.g}^{-1}$ in LS and IS, respectively) but were significantly ($p < 0.05$) higher than in IAS ($16.8 \pm 1.5 \mu\text{gC.g}^{-1}$).

The daily CO₂ emission rate, DER, increased significantly ($p < 0.05$) from P1 to P4 in LS whereas DER gradually declined in IS (**Fig. 3c**). All IAS microcosms exhibited similar dynamics of DER: the high DER recorded during P1 strongly decreased during P2 and stabilized thereafter (**Fig. 3c**).

The $\delta^{13}\text{C}$ -CO₂ from LS decreased through the 4 periods, from $-22.2 \pm 0.1\text{‰}$ to $-28.9 \pm 0.3\text{‰}$. The $\delta^{13}\text{C}$ -CO₂ strongly decreased with the intensity of sterilization treatments, from $-29.2 \pm 1\text{‰}$ in IS to $-75.4 \pm 2.8\text{‰}$ in IAS with 4h of autoclaving (**Fig. 3d**). This pattern of values was maintained throughout the incubation but the difference of $\delta^{13}\text{C}$ -CO₂ between living and sterilized soils was maximal during the two intermediate periods (P2 and P3).

Carbon isotope fractionation during DOC mineralization

The $\delta^{13}\text{C}$ strongly deviated between DOC and CO₂ in all sterilized soil microcosms (**Fig. 3e**) indicating substantial C isotope fractionation during DOC mineralization. This isotope fractionation gradually increased with the intensity of the autoclaving treatment, from $13.2 \pm 0.7 \text{‰}$ in IAS with 0.5h of autoclaving to $31 \pm 2.5 \text{‰}$ in IAS with 4 h of autoclaving. The isotope fractionation was significantly and positively correlated to the DOC content ($r = 0.96$, **Fig. 3e**). The $\delta^{13}\text{C}$ deviation between DOC and CO₂ in LS was $< 4\text{‰}$ (data not shown).

Response of sterilized soil to supply of unlabelled and ¹³C₆ labelled glucose

The supply of unlabelled or labelled glucose in IAS with 4h of autoclaving did not significantly change total CO₂ emissions (data not shown). The $\delta^{13}\text{C}$ values of CO₂ released from microcosms with unlabelled glucose ranged from $-40.2 \pm 0.6 \text{‰}$ to $-53.8 \pm 1.2 \text{‰}$ (**Fig. 4**). The CO₂ released from microcosms with ¹³C-glucose showed progressive ¹³C enrichment with time, from $\delta^{13}\text{C} = 127.8 \pm 1.3 \text{‰}$ to $657 \pm 1.7 \text{‰}$ after 12 and 34 days of incubation, respectively (**Fig. 4**). At the end of the incubation, the amount of ¹³C-glucose released as CO₂ corresponded to 0.01% of glucose input.

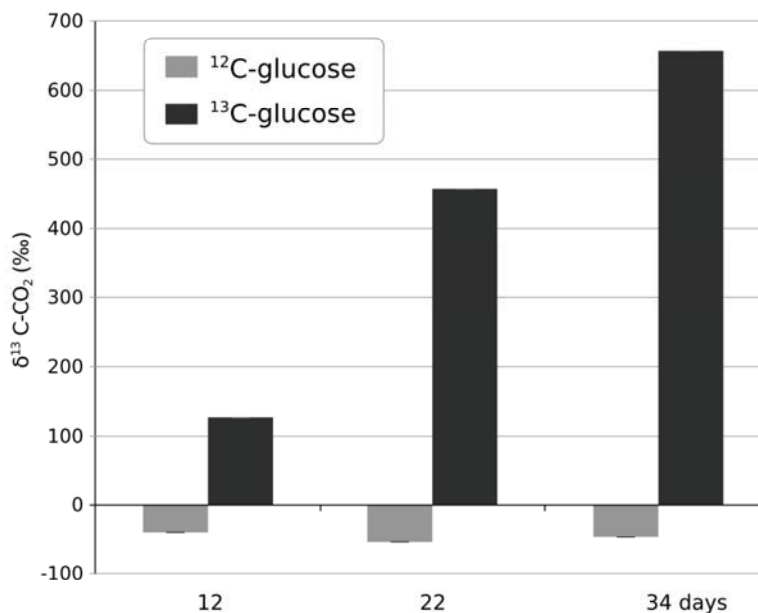


Figure 4: Kinetic of the $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ released from an irradiated and autoclaved (4h) soil inoculated with ^{13}C -labelled glucose (^{13}C -glucose) or with unlabelled glucose (^{12}C -glucose) through 32 days of incubation. Standard deviation was estimated using three replicates per treatments.

DISCUSSION

Irradiation & autoclaving: an efficient combination to remove all traces of cell from soils.

Demonstrating that complex soil matrices are truly devoid of intact cell is a challenging task. In previous studies, measures for assessing abundance and activity of cells in γ -irradiated soils ranged from cultivation (Blankinship *et al.*, 2014; Maire *et al.*, 2013), live-dead staining (Blankinship *et al.*, 2014), fluorescent *in situ* hybridization (Maire *et al.*, 2013), biomass estimation (Maire *et al.*, 2013), to biomarkers concentrations (Buchan *et al.*, 2012). All gave the same conclusion: a high proportion of dead but intact cells remained after γ -irradiations of soil samples (Blankinship *et al.*, 2014; Lensi *et al.*, 1991; Maire *et al.*, 2013). We found a similar result using flow cytometry, transmission electron microscopy and estimation of DNA and RNA content of soil (Fig.2).

To remove the remaining cells, we combined γ -irradiations with a time-gradient of autoclaving to analyze the kinetics of microbial cellular lysis. To ensure that none cell with a preserved morphology remained in soil aggregates we performed *in situ* observations with transmission electron microscopy on tangential ultrathin sections of soil. This approach allows avoiding the pitfalls of methods involving dilute suspensions of soil extracts (*i.e.* incomplete elution of microorganisms (Li *et al.*, 2004). The combination of both

sterilization treatments allowed suppressing all observable cell structure (**Fig.2**). Our results also indicate that the sterility of soil microcosms was maintained until the end of incubation.

By destroying the microbial biomass and releasing its content in soil, the sterilization treatments led to an accumulation of DOC (**Fig.3a**). The increasing DOC accumulation with increasing time of autoclaving likely resulted from desorption of organic carbon from soil particles (**Berns et al., 2008**) and/or from depolymerization of carbohydrates (**Tuominen et al., 1994**) since microbial biomass was mostly lysed after 0.5h of autoclaving.

Body of evidence for EXOMET

The irradiated and autoclaved soils showed persistent (>91 days) and substantial soil CO₂ emissions (50-80% of CO₂ emissions compared to LS). Those CO₂ emissions can hardly be ascribed to residual activities of living and “ghost” cells since the sterilizing treatments removed all observable cell structure. Moreover, the substantial C isotope fractionation (from 13 ‰ to 35 ‰, **Fig.3e**) induced by the process responsible of CO₂ emissions is incompatible with a respiration of cellular origin. A substantial contribution of soil carbonates to CO₂ emissions is unlikely because (i) the inorganic carbon pool is very small in the acidic soil used in this study (**Fontaine et al., 2007**), (ii) the isotopic composition of CO₂ did not reflect the signature of soil carbonates (**Bertrand et al., 2007**). The decarboxylation of organic compounds by a combustion induced by sterilization treatments is also excluded because (i) CO₂ emissions were persistent throughout the incubation, (ii) the C isotope fractionation during organic C combustion is typically weak (~3‰) (**Turney et al., 2006**). Finally, irradiation and heating induce a heavy oxidative stress through the formation of hydroperoxides, carboxyls and free radicals. These highly reactive oxidants can lead to organic matter oxidation and decarboxylation. However, this oxidative process can hardly explain the persistent CO₂ emissions observed in our experiment since the half-life of highly reactive oxidants is extremely short (i.e. 10⁻⁹ s for free radicals). Moreover, **Blankinship et al. (2014)** have shown that the persistence of soil CO₂ emissions after microbial biomass suppression (or at least reduction) is not specific to irradiated soil but also occurs with other methods of sterilization such as chloroform fumigation and autoclaving.

The most parsimonious explanation of persistence of CO₂ emissions (**Fig. 3c**) and O₂ consumption (**Maire et al., 2013**) after soil sterilization is an extracellular oxidative metabolism (EXOMET). By EXOMET we suggest a cascade of chemical reactions where electrons are transferred from organic matter to redox mediators (i.e. NAD⁺/NADH, Mn³⁺/Mn²⁺) and finally to O₂. Those reactions can be catalyzed by respiratory enzymes stabilized on soil particles (**Maire et al., 2013**) and by minerals and metals present in soil (**Blankinship et al., 2014; Majcher et al., 2000**). The evidence of a complex oxidative

metabolism is supported by the oxidation of ¹³C-glucose in ¹³CO₂ (**Fig. 4**). Indeed, glucose is a stable molecule which must undergo many biochemical transformations before being oxidized in carbon dioxide. The glucose decarboxylation (**Fig. 4**) and concurrent O₂ consumption (**Maire et al., 2013**) suggest that EXOMET is able to reconstitute an equivalent of glycolysis and Krebs cycle.

Mineral catalysts are stable and soil-stabilized enzymes are protected against denaturation (Carter *et al.*, 2007; Gianfreda and Ruggiero, 2006; Nannipieri, 2006; Nannipieri *et al.*, 1996; Stursova and Sinsabaugh, 2008). This stability of soil catalysts likely contributes to the maintenance of glucose oxidation and CO₂ emissions after soil exposure to high temperature and pressure (autoclaving). **Maire et al. (2013)** have already pointed at the exceptional resistance of soil CO₂ emissions to high temperature, pressure and toxics. However, by providing here the evidence of an oxidation of ¹³C-labelled glucose in γ -sterilized soil exposed to high temperature and pressure, we show that the complex metabolic pathways of the EXOMET are maintained under these extreme conditions.

Origin of the C isotope fractionation during EXOMET

Our results indicated that the EXOMET preferentially oxidizes organic molecules containing light (¹²C) over heavy (¹³C) carbon atoms. Similar strong isotope fractionation has already been described during wet abiotic oxidation of oxalic acid (**Grey et al., 2006**). The preferential conversion of substrate containing lighter isotopes agrees with classical kinetic and thermodynamic laws. The presence of ¹³C atoms in a substrate slows its conversion rate because of the higher activation energy request to induce the reaction (**Christensen and Nielsen, 2000; Heinzle et al., 2008**). Classical works on thermodynamic also indicate that the isotopic fractionation is dependent on substrate concentration (**Agren et al., 1996; Goevert and Conrad, 2009; Wang et al., 2015**). Under limited substrate concentration, the isotope fractionation decreases because the heavy molecules left over during the first stages of reaction are finally carried out by the process. Consistently, our results show that the isotopic fractionation induced by the EXOMET was positively correlated to DOC content (**Fig. 2e**). However, the causal link between the magnitude of fractionation and the DOC content is not certain since the correlation emerges from a compilation of results obtained after different sterilization treatments. Further studies should analyze this causal link in experiments where the DOC content is directly manipulated and the change over time of the isotopic composition of DOC is quantified.

Previous studies (**Blair et al., 1985; Zyakun et al., 2013**) have shown that, contrary to EXOMET, cells induced no or few (< 4‰) C isotope fractionation during respiration. This difference between cell respiration and EXOMET can be explained by two processes. First, substrate absorption by microbial cells is typically limited by substrate diffusion, a process that does not or weakly fractionate isotopes. Second, cells maintain a limited quantity of

substrates in the cytoplasm by regulating their substrate absorption and reserves (Button, 1998). This limited substrate availability prevents the preferential use of light C isotope during biochemical reactions of cell respiration.

It is well known that the delta ¹³C of CO₂ emitted from soils shows circadian cycle and seasonal fluctuations that reaches up to 5‰ (Moyes *et al.*, 2010). However, it is difficult to link these fluctuations to a modification of metabolic pathways of soil respiration (living respiration versus EXOMET) in response to environmental changes since numerous other processes can contribute to these fluctuations. Moreover, it is likely that the EXOMET does not induce much C isotope fractionation in non-sterilized soils since the DOC content is typically low (Fig. 3a) (Liu *et al.*, 2015). Therefore, addition of large amount of DOC is necessary to reveal the C fractionation induced by the EXOMET in non-sterilized soils.

Towards a quantification of EXOMET and cellular respiration in living soils

Our findings support the idea that CO₂ emissions from soils are driven by two major oxidative metabolisms: (1) the well-known respiration of soil biota, (2) an EXOMET carried out by soil stabilized enzymes and soil minerals and metals. A first quantification of these metabolisms has been made by Maire *et al.* (2013) suggesting that the EXOMET contributes from 16 to 48 % of soil CO₂ emissions. However, Maire *et al.* (2013) pointed at the need of another method to confirm this substantial contribution of EXOMET. Indeed, their method can lead to some biases. For instance, the soil irradiation used to block cellular activities and estimate the EXOMET induces a flush of respiration due to the release of substrates and enzymes from microbial biomass. This side effect of soil sterilization leads to an overestimation of EXOMET by releasing enzymes and cofactors in soil.

The difference in C isotope fractionation between EXOMET and cellular respiration offers another method of quantification of those metabolisms applicable on non-sterilized living soils. The development of this method first requires a quantification of the isotope fractionation (‰ delta ¹³C) and its dependence to DOC content occurring during cell respiration ($\Delta^{13}\text{C}_{\text{cell}}$) and EXOMET ($\Delta^{13}\text{C}_{\text{EXOMET}}$). Our results provide an example of estimation of $\Delta^{13}\text{C}_{\text{EXOMET}}$ (Fig. 3e), though further studies are needed to verify the genericity of this estimation in other soils. $\Delta^{13}\text{C}_{\text{cell}}$ for soil microorganisms can be estimated with cell cultures using soil inoculum and different substrate concentrations. This quantification allows determining the isotope composition of CO₂ (‰ delta ¹³C) released by cell respiration ($\delta^{13}\text{C-CO}_{2\text{cell}}$) and EXOMET ($\delta^{13}\text{C-CO}_{2\text{EXOMET}}$) in function to DOC content and isotope composition of DOC ($\delta^{13}\text{C-DOC}_{\text{sample}}$):

$$\delta^{13}\text{C-CO}_{2\text{cell}} = \delta^{13}\text{C-DOC}_{\text{sample}} - \Delta^{13}\text{C}_{\text{cell}} \quad (1)$$

$$\delta^{13}\text{C-CO}_{2\text{EXOMET}} = \delta^{13}\text{C-DOC} - \Delta^{13}\text{C}_{\text{EXOMET}} \quad (2)$$

with $\Delta^{13}\text{C}_{\text{cell}}$ and $\Delta^{13}\text{C}_{\text{EXOMET}}$ are functions of DOC content. Based on our results, $\Delta^{13}\text{C}_{\text{EXOMET}}$ can be determined as

$$\Delta^{13}\text{C}_{\text{EXOMET}} = 0.037 \times [\text{DOC}] - 5.495$$

where [DOC] is dissolved organic C content ($\mu\text{g C g}^{-1}$ soil).

Given that the C isotope fractionation depends on an excess of available substrate, substantial amount of DOC must be added to the living soil before quantifying EXOMET and cell respiration. After substrate addition, cellular respiration (R_{cell}) and EXOMET (R_{EXOMET}) can be separated using the classical isotope mass balance equations:

$$R_{\text{soil}} = R_{\text{cell}} + R_{\text{EXOMET}} \quad (3)$$

$$\delta^{13}\text{C-CO}_{2\text{soil}} \times R_{\text{soil}} = \delta^{13}\text{C-CO}_{2\text{cell}} \times R_{\text{cell}} + \delta^{13}\text{C-CO}_{2\text{EXOMET}} \times R_{\text{EXOMET}} \quad (4)$$

where R_{soil} and $\delta^{13}\text{C-CO}_{2\text{soil}}$ are respectively the total CO₂ emitted by the amended soil ($\mu\text{g C-CO}_2 \text{ kg}^{-1}$ soil) and its isotopic composition (‰ delta ¹³C). R_{soil} and $\delta^{13}\text{C-CO}_{2\text{soil}}$ must be measured in hours following the substrate addition before any substantial growth of soil microorganisms which would lead to an over-estimation of cell respiration. This short-term measurement is also a prerequisite to prevent the microbial uptake of the heavy C isotope left over by the EXOMET. $\delta^{13}\text{C-CO}_{2\text{cell}}$ and $\delta^{13}\text{C-CO}_{2\text{EXOMET}}$ must be estimated in separate experiments as previously described. Therefore, the two unknowns R_{cell} and R_{EXOMET} can be determined by solving the two equations.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Collectively, our results tend to sustain the hypothesis through which soil C mineralization is driven by the well-known microbial mineralization and an EXOMET carried out by soil-stabilized enzymes and by soil mineral and metal catalysts. These two metabolisms may explain why soil C mineralization is not always connected to size and composition of the microbial biomass (**Kemmitt *et al.*, 2008**) and why experimental reduction of these microbial components has moderate effects on mineralization rate (**Griffiths *et al.*, 2001**). Moreover, these two metabolisms should be considered separately when studying effects of environmental factors on the C cycle because they do not likely obey to the same laws and respond differently to environmental factors. Soil microorganisms have tight physiological constraints comprising specific environmental conditions (temperature, moisture) and needs in energy and nutrients. The EXOMET is resistant to extreme conditions (e.g. autoclaving) thanks to soil stabilization of enzymes and depends on microbial turnover for the supply of respiratory enzymes. These two metabolisms may interact in many different ways: microbial cells and EXOMET likely compete for available substrates; dying cells are a source of respiratory enzymes and substrate for the EXOMET etc. Further studies are

necessary to better understand processes at play and predict the relative importance of EXOMET and cell respiration across ecosystems and climates.

Overall our findings have several implications for biology. They challenge the belief of cell as the minimum structure unit able to organize and achieve cascades of chemical reactions leading to complete oxidation of organic matter. They also suggest that soils have played a key role in the origin of life. Previous studies have shown the role of soil minerals in the concentration and polymerization of amino-acids and nucleic-acids in protein-like molecule during the prebiotic period (**Hazen, 2006 ; Bernal, 1949**). Our results show that, when all relevant molecules are present, complex biochemical reactions underpinning bioenergetics of life (respiration) can occur spontaneously in the soil. Thus, the first ancestral oxidative metabolisms may have occurred in soil before it has been included in the first cell.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the project '*Adaptation and responses of organisms and carbon metabolism to climate change*' of the program CPER (French Ministry of Research, CNRS, INRA, Région Auvergne, FEDER) and by the project EXCEED of the program PICS (CNRS). B. Kéralval was supported by a PhD fellowship from the Région Auvergne and the FEDER.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

This work arose from an idea of S.F. and A.C.L.. B.K, S.F, A.C.L, G.A and C.A designed the experiment. B.K and J.C conducted the experiments. B.K analyzed the data. S.F. identified the C isotope fractionation and conceived the model of quantification. B.K, S.F, A.C.L, G.A and C.A co-wrote the paper.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no conflict of interest

REFERENCES

- Agren, G. I., Bosatta, E. and Balesdent, J.: Isotope discrimination during decomposition of organic matter: A theoretical analysis, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 60(4), 1121–1126, 1996.
- Bernal, J. D.: The Physical Basis of Life, *Proc. Phys. Soc. B*, 62(10), 597, doi:10.1088/0370-1301/62/10/301, 1949.
- Berns, A. E., Philipp, H., Narres, H.-D., Burauel, P., Vereecken, H. and Tappe, W.: Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy, *European Journal of Soil Science*, 59(3), 540–550, doi:10.1111/j.1365-2389.2008.01016.x, 2008.

- Bertrand, I., Delfosse, O. and Mary, B.: Carbon and nitrogen mineralization in acidic, limed and calcareous agricultural soils: Apparent and actual effects, *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 276–288, doi:10.1016/j.soilbio.2006.07.016, 2007.
- Blair, N., Leu, A., Muñoz, E., Olsen, J., Kwong, E. and Des Marais, D.: Carbon isotopic fractionation in heterotrophic microbial metabolism, *Appl Environ Microbiol*, 50(4), 996–1001, 1985.
- Blankinship, J. C., Becerra, C. A., Schaeffer, S. M. and Schimel, J. P.: Separating cellular metabolism from exoenzyme activity in soil organic matter decomposition, *Soil Biology and Biochemistry*, 71, 68–75, doi:10.1016/j.soilbio.2014.01.010, 2014.
- Buchan, D., Moeskops, B., Ameloot, N., De Neve, S. and Sleutel, S.: Selective sterilisation of undisturbed soil cores by gamma irradiation: Effects on free-living nematodes, microbial community and nitrogen dynamics, *Soil Biology and Biochemistry*, 47, 10–13, doi:10.1016/j.soilbio.2011.12.014, 2012.
- Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D., Weintraub, M. N. and Zoppini, A.: Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions, *Soil Biology and Biochemistry*, 58, 216–234, doi:10.1016/j.soilbio.2012.11.009, 2013.
- Button, D. K.: Nutrient Uptake by Microorganisms according to Kinetic Parameters from Theory as Related to Cytoarchitecture, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3), 636–645, 1998.
- Carter, D. O., Yellowlees, D. and Tibbett, M.: Autoclaving kills soil microbes yet soil enzymes remain active, *Pedobiologia*, 51(4), 295–299, doi:10.1016/j.pedobi.2007.05.002, 2007.
- Christensen, B. and Nielsen, J.: Metabolic network analysis. A powerful tool in metabolic engineering, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 66, 209–231, 2000.
- Fontaine, S., Barot, S., Barré, P., Bdioui, N., Mary, B. and Rumpel, C.: Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply, *Nature*, 450(7167), 277–280, doi:10.1038/nature06275, 2007.
- Gianfreda, L. and Ruggiero, P.: Enzyme Activities in Soil, in *Nucleic Acids and Proteins in Soil*, edited by P. P. Nannipieri and D. K. Smalla, pp. 257–311, Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- Goevert, D. and Conrad, R.: Effect of substrate concentration on carbon isotope fractionation during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* and *M. acetivorans* and in rice field soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(9), 2605–2612, doi:10.1128/AEM.02680-08, 2009.
- Grey, D. C., Damon, P. E., Haynes, C. V. and Long, A.: Carbon-isotope fractionation during wet oxidation of oxalic acid., *Radiocarbon*, 11(1), 1–2, doi:10.2458/azu_js_rc.11.178, 2006.
- Griffiths, B. S., Ritz, K., Wheatley, R., Kuan, H. L., Boag, B., Christensen, S., Ekelund, F., Sørensen, S. J., Muller, S. and Bloem, J.: An examination of the biodiversity–ecosystem function relationship in arable soil microbial communities, *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12–13), 1713–1722, doi:10.1016/S0038-0717(01)00094-3, 2001.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., and Ryan, P. D.: PAST: Palaeontological Statistics Software package for education and data analysis, *Palaeontol. Electron.*, 4, 1–9, 2001.
- Hazen, R. M.: Presidential Address to the Mineralogical Society of America, Salt Lake City, October 18, 2005 Mineral surfaces and the prebiotic selection and organization of biomolecules, *American Mineralogist*, 91(11–12), 1715–1729, doi:10.2138/am.2006.2289, 2006.
- Heinzle, E., Yuan, Y., Kumar, S., Wittmann, C., Gehre, M., Richnow, H.-H., Wehrung, P., Adam, P. and Albrecht, P.: Analysis of ¹³C labeling enrichment in microbial culture applying metabolic

- tracer experiments using gas chromatography–combustion–isotope ratio mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 380(2), 202–210, doi:10.1016/j.ab.2008.05.039, 2008.
- IPCC: Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis, Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, edited by: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., and Miller, H. L., Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 130–234, 2007b.
- Junge, W., Lill, H. and Engelbrecht, S.: ATP synthase: an electrochemical ransducer with rotatory mechanics, *Trends in Biochemical Sciences*, 22(11), 420–423, doi:10.1016/S0968-0004(97)01129-8, 1997.
- Kemmitt, S. J., Lanyon, C. V., Waite, I. S., Wen, Q., Addiscott, T. M., Bird, N. R. A., O'Donnell, A. G. and Brookes, P. C.: Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass—a new perspective, *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 61–73, doi:10.1016/j.soilbio.2007.06.021, 2008.
- Lensi, R., Lescure, C., Steinberg, C., Savoie, J.-M. and Faurie, G.: Dynamics of residual enzyme activities, denitrification potential, and physico-chemical properties in a γ -sterilized soil, *Soil Biology and Biochemistry*, 23(4), 367–373, doi:10.1016/0038-0717(91)90193-N, 1991.
- Li, D., Velde, B. and Zhang, T.: Observations of pores and aggregates during aggregation in some clay-rich agricultural soils as seen in 2D image analysis, *Geoderma*, 118(3–4), 191–207, doi:10.1016/S0016-7061(03)00193-9, 2004.
- Liu, E., Chen, B., Yan, C., Zhang, Y., Mei, X. and Wang, J.: Seasonal Changes and Vertical Distributions of Soil Organic Carbon Pools under Conventional and No-Till Practices on Loess Plateau in China, *Soil Science Society of America Journal*, 79(2), 517, doi:10.2136/sssaj2014.02.0069, 2015.
- Maire, V., Alvarez, G., Colombet, J., Comby, A., Despinasse, R., Dubreucq, E., Joly, M., Lehours, A.-C., Perrier, V., Shahzad, T. and Fontaine, S.: An unknown oxidative metabolism substantially contributes to soil CO₂ emissions, *Biogeosciences*, 10(2), 1155–1167, doi:10.5194/bg-10-1155-2013, 2013.
- Maire, V., Alvarez, G., Colombet, J., Comby, A., Despinasse, R., Dubreucq, E., Joly, M., Lehours, A.-C., Perrier, V., Shahzad, T. and Fontaine, S.: An unknown oxidative metabolism substantially contributes to soil CO₂ emissions, *Biogeosciences Discuss.*, 9, 8663, 2012.
- Majcher, E. H., Chorover, J., Bollag, J.-M. and Huang, P. M.: Evolution of CO during Birnessite-Induced Oxidation of C-Labeled Catechol, *Soil Science Society of America Journal*, 64(1), 157, doi:10.2136/sssaj2000.641157x, 2000.
- Moyes, A. B., Gaines, S. J., Siegwolf, R. T. W. and Bowling, D. R.: Diffusive fractionation complicates isotopic partitioning of autotrophic and heterotrophic sources of soil respiration, *Plant Cell Environ.*, 33(11), 1804–1819, doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02185.x, 2010.
- Nannipieri, P.: Role of Stabilised Enzymes in Microbial Ecology and Enzyme Extraction from Soil with Potential Applications in Soil Proteomics, in *Nucleic Acids and Proteins in Soil*, edited by P. P. Nannipieri and D. K. Smalla, pp. 75–94, Springer Berlin Heidelberg, 2006.

- Nannipieri, P., Sastre, I., Landi, L., Lobo, M. C. and Pietramellara, G.: Determination of extracellular neutral phosphomonoesterase activity in soil, *Soil Biology and Biochemistry*, 28(1), 107–112, doi:10.1016/0038-0717(95)00108-5, 1996.
- Paterson, E. and Sim, A.: Soil-specific response functions of organic matter mineralization to the availability of labile carbon, *Glob Change Biol*, 19(5), 1562–1571, doi:10.1111/gcb.12140, 2013.
- Pignatello, J. J., Oliveros, E. and MacKay, A.: Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36(1), 1–84, doi:10.1080/10643380500326564, 2006.
- Ramsay, A. J. and Bawden, A. D.: Effects of sterilization and storage on respiration, nitrogen status and direct counts of soil bacteria using acridine orange, *Soil Biology and Biochemistry*, 15(3), 263–268, doi:10.1016/0038-0717(83)90069-X, 1983.
- Sinsabaugh, R. L. and Follstad Shah, J. J.: Ecoenzymatic Stoichiometry and Ecological Theory, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 313–343, doi:10.1146/annurev-ecolsys-071112-124414, 2012.
- Sinsabaugh, R. L., Hill, B. H. and Follstad Shah, J. J.: Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment, *Nature*, 462(7274), 795–798, doi:10.1038/nature08632, 2009.
- Stursova, M. and Sinsabaugh, R. L.: Stabilization of oxidative enzymes in desert soil may limit organic matter accumulation, *Soil Biology and Biochemistry*, 40(2), 550–553, doi:10.1016/j.soilbio.2007.09.002, 2008.
- Trevors, J. T.: Sterilization and inhibition of microbial activity in soil, *Journal of Microbiological Methods*, 26(1–2), 53–59, doi:10.1016/0167-7012(96)00843-3, 1996.
- Tuominen, L., Kairesalo, T. and Hartikainen, H.: Comparison of Methods for Inhibiting Bacterial Activity in Sediment, *Appl Environ Microbiol*, 60(9), 3454–3457, 1994.
- Turney, C. S. M., Wheeler, D. and Chivas, A. R.: Carbon isotope fractionation in wood during carbonization, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(4), 960–964, doi:10.1016/j.gca.2005.10.031, 2006.
- Wang, G., Jia, Y. and Li, W.: Effects of environmental and biotic factors on carbon isotopic fractionation during decomposition of soil organic matter, *Sci. Rep.*, 5, doi:10.1038/srep11043, 2015.
- Zyakun, A. M., Kochetkov, V. V., Baskunov, B. P., Zakharchenko, V. N., Peshenko, V. P., Laurinavichius, K. S., Anokhina, T. O., Siunova, T. V., Sizova, O. I. and Boronin, A. M.: Use of glucose and carbon isotope fractionation by microbial cells immobilized on solid-phase surface, *Microbiology*, 82(3), 280–289, doi:10.1134/S0026261713030156, 2013.

Supporting online Material for “Soil carbon dioxide emissions controlled by an extracellular oxidative metabolism identifiable by its isotope signature”.

Carbon dioxide emissions and their isotope composition (¹³C/¹²C)

The amount and isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) of CO₂ accumulated in flasks during the incubation periods were quantified using a cavity ring down spectrometer (CRDS) analyser coupled to a small injection system (Picarro 2131-i analyser, Picarro Inc., Santa Clara, CA, USA). For each period of incubation, the cumulated amount of CO₂ was divided by the duration of the period (in days) to estimate the mean daily C-CO₂ emission rate. The 1st period of incubation (P1) ranged from day 0 to 15, the 2nd period ranged from day 15 to 31, the 3rd period ranged from day 31 to 51 and the 4th period ranged from day 51 to 91.

Tableau S1| Concentration (ppm) and isotope composition (‰ δ¹³C-CO₂) of CO₂ accumulated in incubated flasks, quantification of soil CO₂ emissions during the first period of incubation (µgC g⁻¹ soil) and on a daily basis (µgC g⁻¹ soil d⁻¹). LS: Untreated soils, IS: irradiated soils, IAS-t: irradiated and autoclaved soils with 't' referring to the time of autoclaving.

Incubation Periods (day)	Treatment	Replicates	δ ¹³ C-CO ₂ (‰)	Mean δ ¹³ C-CO ₂ (‰)	SD Mean δ ¹³ C-CO ₂ (‰)	CO ₂ (ppm)	SD CO ₂ (ppm)	CO ₂ (µgC g ⁻¹ soil)	SD CO ₂ (µgC g ⁻¹ soil)	Mean CO ₂ per condition (µgC g ⁻¹ soil)	SD Mean CO ₂ per condition (µgC g ⁻¹ soil)	Daily CO ₂ emissions rates (µgC g ⁻¹ soil d ⁻¹)	SD Daily CO ₂ emissions rates (µgC g ⁻¹ soil d ⁻¹)
P1 (0-15 day)	LS	1	-22,3	-22,3	0,1	545,59	0,64	3,28	0,00	3,31	0,08	0,22	0,01
		2	-22,3			567,76	0,64	3,41	0,00				
		3	-22,2			542,19	0,57	3,26	0,00				
	IS	1	-29,8	-29,7	0,6	765,86	0,69	4,60	0,00	5,00	0,38	0,33	0,03
		2	-30,3			893,27	0,86	5,36	0,01				
		3	-29,0			838,38	0,69	5,03	0,00				
	IAS 0,5h	1	-39,2	-38,9	0,3	732,71	0,76	4,40	0,00	4,43	0,04	0,30	0,00
		2	-38,8			745,43	0,76	4,48	0,00				
		3	-38,6			737,20	0,64	4,43	0,00				
	IAS 1h	1	-42,7	-43,2	0,5	828,88	0,81	4,98	0,00	4,92	0,06	0,33	0,00
		2	-43,3			809,32	0,74	4,86	0,00				
		3	-43,7			822,15	0,88	4,94	0,01				
	IAS 1,5h	1	-47,2	-46,8	0,8	938,11	0,88	5,63	0,01	5,59	0,08	0,37	0,01
		2	-45,9			938,87	0,83	5,64	0,00				
		3	-47,3			915,83	0,95	5,50	0,01				
	IAS 2h	1	-46,9	-49,0	2,6	1060,47	0,85	6,37	0,01	6,29	0,15	0,42	0,01
		2	-48,4			1019,26	0,85	6,12	0,01				
		3	-51,9			1062,89	1,01	6,38	0,01				
	IAS 4h	1	-54,2	-54,4	0,8	1318,09	1,17	7,91	0,01	7,84	0,11	0,52	0,01
		2	-53,8			1316,29	1,13	7,90	0,01				
		3	-55,3			1284,71	1,22	7,71	0,01				

Tableau S2| Concentration (ppm) and isotope composition (‰ $\delta^{13}\text{C-CO}_2$) of CO₂ accumulated in incubated flasks, quantification of soil CO₂ emissions during the second period of incubation ($\mu\text{gC g}^{-1}$ soil) and on a daily basis ($\mu\text{gC g}^{-1}$ soil d⁻¹). LS: Untreated soils, IS: irradiated soils, IAS-t: irradiated and autoclaved soils with 't' referring to the time of autoclaving.

Incubation Periods (day)	Conditions	Replicates	$\delta^{13}\text{C-CO}_2$	Mean $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ per condition	SD Mean $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ per condition	CO ₂ (ppm)	SD CO ₂ (ppm)	CO ₂ ($\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil)	SD CO ₂ ($\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil)	Mean CO ₂ per condition ($\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil)	SD Mean CO ₂ per condition ($\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil)	Daily CO ₂ emissions rates ($\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil.d ⁻¹)	SD Daily CO ₂ emissions rates ($\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil.d ⁻¹)
P2 (15-31 day)	LS	1	-24,9	-24,4	0,7	563,31	0,61	3,38	0,00	3,55	0,19	0,22	0,01
		2	-24,6			585,87	0,60	3,52	0,00				
		3	-23,7			624,76	0,53	3,75	0,00				
	IS	1	-28,4	-29,2	1,0	688,67	0,50	4,14	0,00	4,04	0,43	0,25	0,03
		2	-30,4			734,05	0,56	4,41	0,00				
		3	-28,8			594,93	0,50	3,57	0,00				
	IAS 0,5h	1	-46,4	-49,0	2,4	318,33	0,42	1,91	0,00	1,88	0,05	0,12	0,00
		2	-51,3			303,00	0,36	1,82	0,00				
		3	-49,3			315,71	0,48	1,90	0,00				
	IAS 1h	1	-56,9	-58,6	6,5	308,57	0,46	1,85	0,00	1,63	0,48	0,10	0,03
		2	-65,7			178,82	1,13	1,07	0,01				
		3	-53,0			325,47	0,47	1,95	0,00				
	IAS 1,5h	1	-62,7	-61,0	1,5	345,29	0,49	2,07	0,00	2,10	0,02	0,13	0,00
		2	-59,7			353,46	0,39	2,12	0,00				
		3	-60,7			348,06	0,40	2,09	0,00				
	IAS 2h	1	-62,9	-64,4	3,6	360,30	0,52	2,16	0,00	2,10	0,05	0,13	0,00
		2	-68,5			345,19	0,42	2,07	0,00				
		3	-61,9			345,93	0,38	2,08	0,00				
	IAS 4h	1	-74,5	-75,4	2,8	444,82	0,57	2,67	0,00	2,66	0,03	0,17	0,00
		2	-78,6			438,24	0,60	2,63	0,00				
		3	-73,2			446,32	0,58	2,68	0,00				

Tableau S3| Concentration (ppm) and isotope composition (‰ δ¹³C-CO₂) of CO₂ accumulated in incubated flasks, quantification of soil CO₂ emissions during the third period of incubation (µgC g⁻¹ soil) and on a daily basis (µgC g⁻¹ soil d⁻¹). LS: Untreated soils, IS: irradiated soils, IAS-t: irradiated and autoclaved soils with 't' referring to the time of autoclaving.

Incubation Periods (day)	Conditions	Replicates	δ ¹³ C-CO ₂	Mean δ ¹³ C-CO ₂ per condition	SD Mean δ ¹³ C-CO ₂ per condition	CO ₂ (ppm)	SD CO ₂ (ppm)	CO ₂ (µgC.g ⁻¹ soil)	SD CO ₂ (µgC.g ⁻¹ soil)	Mean CO ₂ per condition (µgC.g ⁻¹ soil)	SD Mean CO ₂ per condition (µgC.g ⁻¹ soil)	Daily CO ₂ emissions rates (µgC.g ⁻¹ soil.d ⁻¹)	SD Daily CO ₂ emissions rates (µgC.g ⁻¹ soil.d ⁻¹)
P3 (31-51 day)	LS	1	-28,7	-28,5	0,2	992,91	1,07	5,96	0,01	5,38	0,54	0,27	0,03
		2	-28,3			879,56	0,95	5,28	0,01				
		3	-28,4			816,15	0,87	4,90	0,01				
	IS	1	-33,6	-33,5	0,1	803,80	0,88	4,83	0,01	4,81	0,31	0,24	0,02
		2	-33,5			850,10	0,91	5,10	0,01				
		3	-33,4			747,05	0,84	4,49	0,01				
	IAS 0,5h	1	-48,4	-49,3	1,2	369,47	0,55	2,22	0,00	2,13	0,07	0,11	0,00
		2	-50,6			346,76	0,51	2,08	0,00				
		3	-48,8			349,53	0,49	2,10	0,00				
	IAS 1h	1	-53,3	-53,4	0,8	370,80	0,54	2,23	0,00	2,25	0,02	0,11	0,00
		2	-54,3			377,53	0,52	2,27	0,00				
		3	-52,6			374,32	0,51	2,25	0,00				
	IAS 1,5h	1	-58,6	-59,4	0,6	410,55	0,54	2,47	0,00	2,40	0,06	0,12	0,00
		2	-59,9			397,59	0,57	2,39	0,00				
		3	-59,5			391,45	0,55	2,35	0,00				
	IAS 2h	1	-62,6	-61,0	4,7	434,68	0,57	2,61	0,00	2,60	0,22	0,13	0,01
		2	-64,7			394,88	0,53	2,37	0,00				
		3	-55,7			468,08	0,44	2,81	0,00				
	IAS 4h	1	-64,7	-67,2	3,3	523,01	0,66	3,14	0,00	3,14	0,01	0,16	0,00
		2	-71,0			521,36	0,65	3,13	0,00				
		3	-65,8			523,33	0,69	3,14	0,00				

Tableau S4| Concentration (ppm) and isotope composition (‰ $\delta^{13}\text{C-CO}_2$) of CO₂ accumulated in incubated flasks, quantification of soil CO₂ emissions during the fourth period of incubation ($\mu\text{gC g}^{-1}$ soil) and on a daily basis ($\mu\text{gC g}^{-1}$ soil d⁻¹). LS: Untreated soils, IS: irradiated soils, IAS-t: irradiated and autoclaved soils with 't' referring to the time of autoclaving.

Incubation Periods (day)	Conditions	Replicates	$\delta^{13}\text{C-CO}_2$	Mean $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ per condition	SD Mean $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ per condition	CO ₂ (ppm)	SD CO ₂ (ppm)	CO ₂ ($\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil)	SD CO ₂ ($\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil)	Mean CO ₂ per condition ($\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil)	SD Mean CO ₂ per condition ($\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil)	Daily CO ₂ emissions rates ($\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil.d ⁻¹)	SD Daily CO ₂ emissions rates ($\mu\text{gC.g}^{-1}$ soil.d ⁻¹)
P4 (51-91 day)	LS	1	-29,2	-28,9	0,3	2227,18	1,88	13,37	0,01	12,12	1,16	0,30	0,03
		2	-28,7			1845,87	1,70	11,08	0,01				
		3	-28,8			1983,85	1,75	11,91	0,01				
	IS	1	-31,7	-32,1	0,6	1336,64	1,36	8,03	0,01	8,07	0,28	0,20	0,01
		2	-31,9			1393,13	1,35	8,36	0,01				
		3	-32,8			1300,80	1,33	7,81	0,01				
	IAS 0,5h	1	-39,6	-38,0	1,6	1101,03	47,47	6,61	0,29	7,77	1,02	0,19	0,03
		2	-36,4			1356,65	46,98	8,15	0,28				
		3	-38,0			1423,38	20,55	8,55	0,12				
	IAS 1h	1	-43,4	-42,1	1,2	1491,06	19,03	8,95	0,11	8,05	0,79	0,20	0,02
		2	-41,8			1252,70	14,53	7,52	0,09				
		3	-41,1			1278,13	8,12	7,67	0,05				
	IAS 1,5h	1	-46,8	-45,7	2,0	1109,78	5,02	6,66	0,03	6,59	0,07	0,16	0,00
		2	-47,0			1094,46	5,02	6,57	0,03				
		3	-43,4			1086,82	4,98	6,53	0,03				
	IAS 2h	1	-50,7	-42,4	10,0	749,51	1,61	4,50	0,01	4,43	0,07	0,11	0,00
		2	-31,3			726,59	1,56	4,36	0,01				
		3	-45,1			739,53	1,59	4,44	0,01				
	IAS 4h	1	-50,9	-58,1	6,3	954,21	1,03	5,73	0,01	5,69	0,04	0,14	0,00
		2	-62,6			947,28	1,05	5,69	0,01				
		3	-60,7			939,84	1,03	5,64	0,01				

CHAPITRE III : L'EXOMET dans des sols aux paramètres physico-chimiques contrastés.

Remarque : Afin d'apporter une preuve supplémentaire de l'absence de cellules actives après stérilisation des sols par des irradiations gamma, nous réaliserons un marquage des cellules actives par une approche de CARD-FISH sur chacun des sols étudiés. Nous ciblerons, par cette technique, l'ARNr16S qui est un indicateur de la viabilité des cellules procaryotes. Cette « Short Communication » sera soumis dans The ISME Journal et a été rédigé selon les exigences de ce journal.

EXTRACELLULAR OXIDATIVE METABOLISM (EXOMET) IS OVERALL REGULATED BY DISSOLVED ORGANIC CARBON CONTENT IN PHYSICO-CHEMICAL CONTRASTED SOILS

Kéralval Benoit^{1,2,3}, Lehours Anne-Catherine^{1,2}, Lallement Audrey³,
Alvarez Gaël^{3,4}, Maestre Fernando⁵, Ochoa Victoria⁵, Amblard
Christian^{1,2}, Fontaine Sébastien³

Proposed as a short communication in ISME journal

Authors affiliations:

¹ Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, BP 10448, 63000, Clermont-Ferrand, France

² CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, 63178 Aubière, France

³ INRA, UR874 (Unité de Recherche sur l'Ecosystème Prairial), 5 Chemin de Beaulieu, 63039 Clermont-Ferrand, France.

⁴ Clermont Université, VetAgro Sup, BP 10448, F-6300 Clermont-Ferrand, France

⁵ Área de Biodiversidad y Conservación, Departamento de Biología y Geología, Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología, Universidad Rey Juan Carlos, Calle Tulipán Sin Número, 28933 Móstoles, Spain.

* to whom correspondence should be addressed

Benoit KERAVAL

Address : LMGE, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 1 impasse Amélie Murat, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France

E-mail : benoit.keraval@gmail.com

Keywords: Soil C Mineralization, Extracellular Oxidative Metabolisms

Funding: This work was supported by the project '*Adaptation and responses of organisms and carbon metabolism to climate change*' of the program CPER (French Ministry of Research, CNRS, INRA, Région Auvergne, FEDER) and by the project EXCEED of the program PEPS (CNRS). B. Kéralval was supported by a PhD fellowship from the Région Auvergne and the FEDER.

Author contributions: This work arose from an idea of B.K, S.F. and A.C.L. B.K, S.F and A.L designed the experiment. B.K, A.L and A.C.L conducted the experiments. B.K analyzed the data. B.K, S.F, A.C.L, G.A and C.A co-wrote the paper.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

ABSTRACT

Recent studies demonstrated that soil organic carbon (SOC) mineralization is supported by (i) the intracellular respiration of heterotrophic microorganisms and (ii) by extracellular oxidative metabolisms (EXOMET). Using O₂ consumption and CO₂ production as proxies of SOC mineralization in living and γ -irradiated soil samples, we provide evidence that EXOMET is a ubiquitous process in physicochemical contrasted soils. Our results (i) show that EXOMET contribution to soil respiration (up to 58 %) is mainly regulated by dissolved organic carbon (DOC) content whatever the edaphic properties and (ii) sustain that EXOMET is partly driven by the turnover of the microbial biomass. Highlighting the EXOMET potential to short-circuit the DOC in soils, this study emphasizes that EXOMET could have a major impact on agro- and ecosystems services and on the global carbon biogeochemical cycle.

TEXT

By releasing from land surfaces an equivalent of ten times the anthropogenic emissions of CO₂, soil organic carbon (SOC) mineralization represents one of the largest terrestrial sources of CO₂ flux (Hanson *et al.*, 2000; Kuzyakov, 2006) and can significantly impact atmospheric CO₂ concentration, carbon (C) sequestration, climate change and the global C balance (Lal and Kimble, 2000; Paterson and Sim, 2013). SOC mineralization is traditionally considered as only driven by soil microbial activities (R_{cell}). However, recurrent observations of persistent substantial CO₂ emissions in soil microcosms where sterilization treatments reduced microbial activities to undetectable levels challenged this paradigm (*e.g.*, Peterson, 1962; Lensi *et al.*, 1991; Maire *et al.*, 2013; Blankinship *et al.*, 2014; Kéroual *et al.*, 2016). Numerous hypotheses emerged to explain such unexpected observations including, for example, the “Regulatory Gate hypothesis” (Kemmitt *et al.* 2008) or the “ghost respiration” (Lensi *et al.*, 1991). More recently, some studies gave evidence that besides R_{cell}, extracellular oxidative metabolisms (EXOMETs), involving cellular enzymes released by microbial cell lysis, stabilized and protected by soil particles, and also mineral catalysts (*e.g.*, clay and metal oxides) contribute to the soil respiration (R_{soil}) (Maire *et al.*, 2013; Kéroual *et al.* 2016). These studies demonstrated that EXOMETs occur and substantially contribute (R_{EXOMET}) to CO₂ emissions in some specific soils (Maire *et al.*, 2013; Kéroual *et al.*, 2016). However, it seems obvious that R_{EXOMET} might be highly variable according to edaphic properties.

The objective of the present study was to provide a first insight into the significance of EXOMET in physico-chemical contrasted soils and into the soil physicochemical properties globally regulating R_{EXOMET}. Soil samples (n=22) were collected from different sites in France (n=5), Spain (n=11) and Botswana (n=6) (**Fig.1a to 1c; Table S.1**) and were characterized by ~20 physicochemical variables (**Fig.1d, Table S.2 and S.3**). Soils discriminated according to their latitudinal locations into 3 major groups exhibiting notably “low”, “intermediate” and “high” C content (**Fig.1e**) whereas others variables (*e.g.*, cation exchange capacity, aridity index) contribute to their differences (**Fig.1d**).

We recorded O₂ consumption and CO₂ production over a 16-day incubation period in γ -irradiated and non-irradiated soil microcosms (**Fig.2a and 2b, Fig.S.1, Table S.4**). By reducing the microbial biomass to undetectable levels (**see SI**), we assumed that γ -irradiations allowed quantifying CO₂ emissions from abiotic processes (Maire *et al.*, 2013; Kéroual *et al.*, 2016). Whereas we acknowledge a possible contribution of carbonates to CO₂ emissions in alkaline soils (Serrano-Ortiz *et al.*, 2010; **Table S.2; Fig.S.2**), it is worth noting that the electron transfer to O₂ was maintained since the emission of CO₂ was coupled to the consumption of O₂ (**Fig. 2a and 2b**) as observed by Maire *et al.* (2013). Collectively, these results gave evidence that R_{EXOMET} occur in a wide range of physicochemical contrasted soils.

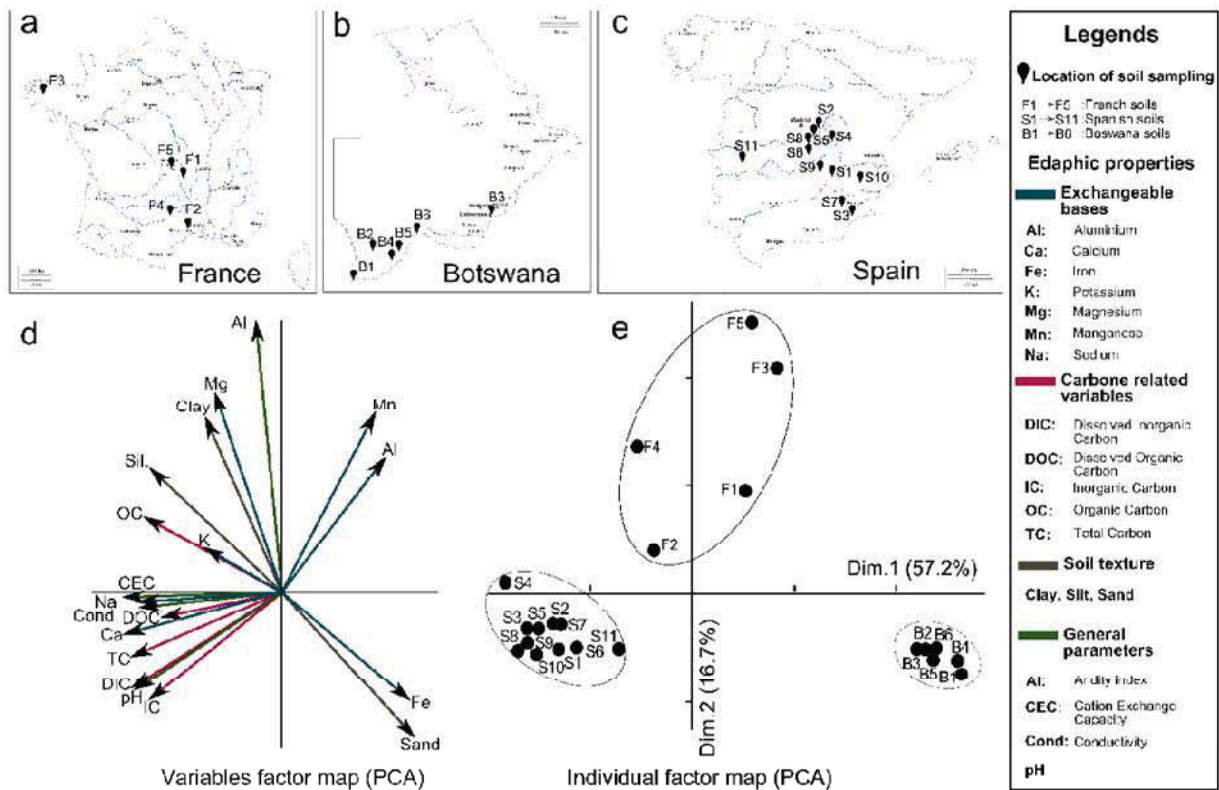


Figure 1| Geographical location and differences in soil physicochemical properties. Location of soil sampling in (a) France, (b) Botswana, (c) Spain (see Table S.1 for detailed coordinates), and (d-e) differences in the physicochemical properties of soil samples illustrated by a principal component analysis (PCA) performed using standardized quantitative values of edaphic parameters including cations, carbon related variables, soil texture and general parameters (see Table S.2.). The percentage of variability explained by the selected variables is indicated along the PCA axes in fig. e.

Using O_2 consumption as a proxy of EXOMET expression in γ -irradiated soils (see SI), we found that R_{EXOMET} was significantly higher in french and spanish soils than in boswana soils (Fig. 2b). Considering the contrasted physicochemical properties of these soils (Fig.1d, Table S.2), we expected to identify factors regulating R_{EXOMET} using a hierarchical partitioning analysis (HPA) including the variables most significantly correlated with O_2 consumption (Table S.5). We identified that organic carbon (OC) and dissolved organic carbon (DOC) factors greater controlled R_{soil} and R_{EXOMET} expressions, respectively (Fig.2c and 2d). Whereas awaited for R_{soil} (e.g., Kuzyakov, 2002; Raich and Schlesinger, 1992), the relationship between DOC and R_{EXOMET} , beyond the influence of other edaphic factors, was important. Indeed, as EXOMET is carried out by enzymes stabilized on soil particles, we had first hypothesized that factors reflecting the soil texture (i.e., clay) would be the most contributing ones. Anyway, the strong R_{EXOMET} -DOC correlation (Table S.5), apart from challenging our assumption, demonstrates that R_{EXOMET} might substantially derives the DOC flux suggesting (i) a spatiotemporal variability of R_{EXOMET} in soils, (ii) that EXOMET may “short-circuit” DOC with strong implication, notably in the rhizosphere, for the soil C and nutrient cycles and on the primary production.

The contribution of R_{EXOMET} to R_{soil} ranged between 13-58 % (Fig. S.1) but was not significantly different between soil groups (Fig.1e). This observation may appear unexpected in regard to the strong link between DOC content and R_{EXOMET}/R_{soil} (Fig.2f, Table S.5) but, it clearly illustrates the connection between microbial cell respiratory activities and EXOMET. Indeed, R_{soil} and R_{EXOMET} were significantly positively correlated (Fig. 2g) sustaining that EXOMET are partly driven by the turnover of the microbial biomass and so by the pool of cellular enzymes released after cell lysis (Maire *et al.*, 2013; Kéroual *et al.*, 2016). To be more pragmatic, the key underlying idea is: greater is the microbial heterotrophic respiration; greater is the EXOMET expression in a soil.

Throughout the history of science, unexplained scientific phenomena have been accompanied by a set of plausible hypotheses. In this vein, the EXOMET concept is a parsimonious explanation of the persistence of respiratory processes in sterilized soils and is supported by a body of evidences (Maire *et al.*, 2013; Kéroual *et al.*, 2016). Understanding of EXOMET has progressed substantially during recent years (Maire *et al.* 2013; Kéroual *et al.*, 2016) and the arguments both for and against it will mature. Finding data supporting that this conceptual model is not restricted to a specific range of soils suggest that EXOMET can be ubiquitous in soils. Our estimation of R_{EXOMET} contribution to R_{soil} is in a similar range of that determined by Maire *et al.* (2013) (16 to 48 %). Collectively these studies emphasize that EXOMET contribution may be important in soils. However, a hard work remains to be done to better understand and quantify EXOMET. Obviously, experimental design leads to an overestimation of EXOMET contribution because irradiation treatments (i) induce DOC release (McNamara *et al.*, 2003; Kéroual *et al.*, 2016) and (ii) remove the putative competition between R_{cell} and R_{EXOMET} . It therefore becomes crucial to develop a method allowing direct quantification of EXOMETs in living soils because the contribution of each individual

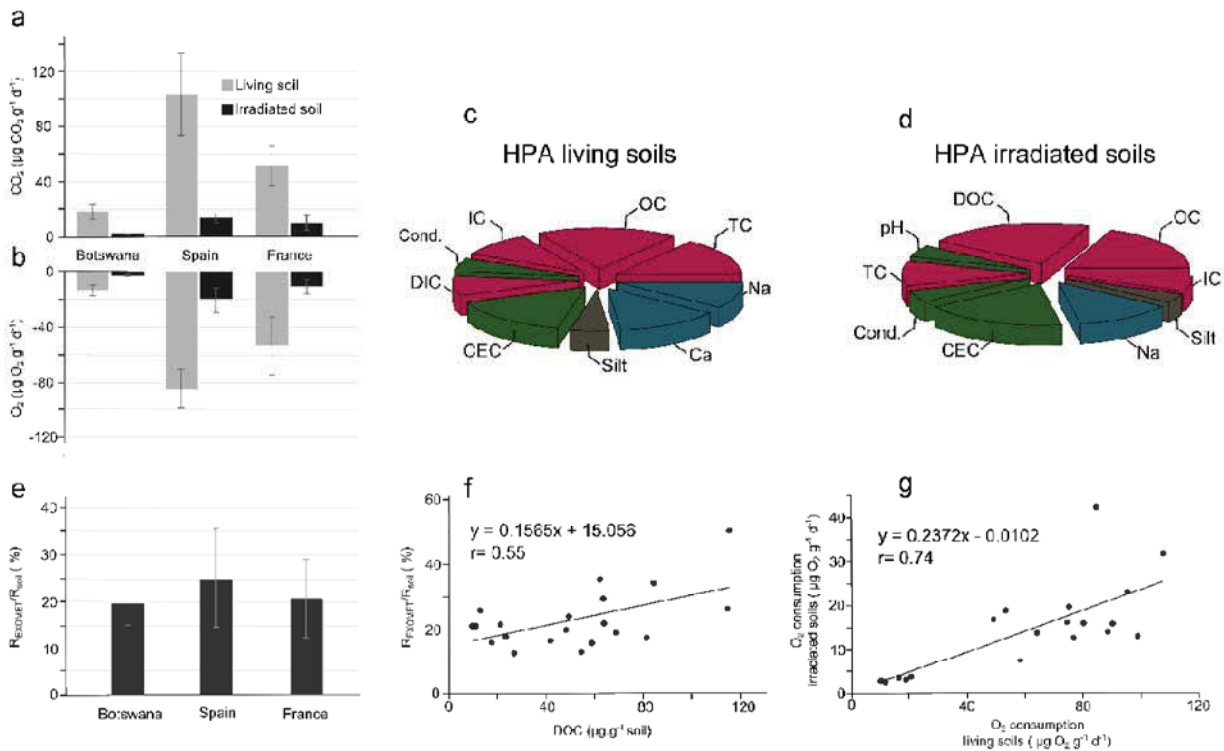


Figure 2| Fluxes of O₂ and CO₂ and edaphic properties contributing to soil respiration and EXOMET in living and irradiated soils. (a) CO₂ production and (b) O₂ consumption in living and irradiated soils for the 3 groups of soils defined in the PCA analysis (Fig.1). Note that O₂ consumption was used as a proxy of soil respiration (R_{soil}) and of EXOMET respiration (R_{EXOMET}) in living and irradiated soils, respectively. Hierarchical partitioning analysis (HPA) used to determine the contribution of soil variables that have the most significant correlations with (c) R_{soil} and (d) R_{EXOMET}. (e) Relative contribution of R_{EXOMET} to R_{soil} for the 3 groups of soils defined in the PCA analysis (Fig.1). Pearson correlations (r) between (f) the contribution of EXOMET (R_{EXOMET}/R_{soil}) and the dissolved organic content (DOC) of soil samples (g) O₂ consumption in living and irradiated soils.

processes (R_{cell} and R_{EXOMET}) is explicitly required to predict patterns accurately and to integrate EXOMET in SOC mineralization and soil C cycle models.

Acknowledgments:

This work was supported by the project '*Adaptation and responses of organisms and carbon metabolism to climate change*' of the program CPER (French Ministry of Research, CNRS, INRA, Région Auvergne, FEDER) and by the project EXCEED of the program PICS (CNRS). B. Kéroual was supported by a PhD fellowship from the Région Auvergne and the FEDER

References

- Blankinship JC, Becerra CA, Schaeffer SM, Schimel SM. (2014). Separating cellular metabolism from exoenzyme activity in soil organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* **71**: 68–75
- Hanson PJ, Edwards NT, Garten CT, Andrews JA. (2000). Separating root and soil microbial contributions to soil respiration: a review of methods and observations. *Biogeochemistry* **48**: 115–146.
- Kéroual B, Lehours AC, Colombet J, Amblard C, Alvarez G, Fontaine S. (2016). Soil carbon dioxide emissions controlled by an extracellular oxidative metabolism identifiable by its isotope signature. *Biogeosciences* doi:10.5194
- Kuzyakov Y. (2006). Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 425-448
- Kuzyakov Y. (2002). Factors affecting rhizosphere priming effects. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **165**:382-396.
- Lal RJ, Kimble JM. (2000). Pedogenic carbonates and the global carbon cycle. In: Lal, R., Kimble, J.M., Eswaran, H., Stewart, B.A. (Eds.), *Global Change and Pedogenic Carbonate*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–14.
- Lensi R, Lescure C, Steinberg C, Savoie JM, Faurie G. (1991). Dynamics of residual enzyme activities, denitrification potential, and physio-chemical properties in a γ -sterilized soil. *Soil Biology and Biochemistry* **23**:367–373.
- Maire V, Alvarez G, Colombet J, Comby A, Despinasse R, Dubreucq E, Joly M, Lehours AC, Perrier V, Shahzad T, Fontaine S. (2013). An unknown oxidative metabolism substantially contributes to soil CO₂ emissions. *Biogeosciences* **10**: 1155–1167.
- McNamara NP, Black HIJ, Beresford NA, Parekh NR. (2003). Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Applied Soil Ecology* **24**:117-132.
- Paterson E, Sim A. (2013). Soil-specific response functions of organic matter mineralization to the availability of labile carbon. *Global Change Biology* **19**: 1562–1571
- Peterson GH. (1962). Respiration of soil sterilized by ionizing radiations. *Soil Science* **94**: 71–74.
- Raich JW, Schlesinger WH. (1992). The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate. *Tellus* **44B**: 81-99.
- Serrano-Ortiz P, Roland M, Sanchez-Moral S, Janssens IA, Domingo F, Goddéis Y, Kowalski AS. (2010). Hidden, abiotic CO₂ flows and gaseous reservoirs in the terrestrial carbon cycle: review and perspectives. *Agricultural and Forest Meteorology* **150**:321–329.

Supplementary data for “Extracellular oxidative metabolisms (EXOMETs) are overall regulated by dissolved organic carbon content in worldwide soils”.

Supporting Material

Soil sampling and characterization

Samples were collected between December 2012 and July 2013 from the 5-20 cm soil layer at 22 sites located in France, Spain and Botswana (**Table S.1**). Fresh soil samples were mixed, sieved at 2 mm, and dried to 10 %. The 19 variables presented in **Table S.2** were determined on each soil sample. Soil pH was measured using a pH meter in a 1:2.5 mass:volume soil and water suspension. Sand, clay and silt content were quantified according to Kettler *et al.* (2001). Organic C was determined by colorimetry after oxidation with a mixture of potassium dichromate and sulfuric acid (Anderson and Ingram, 1993). CEC was quantified by measuring the absorbance of the cobaltihexamine chloride ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$) following the protocol NF-ISO23470. Exchangeable cations were quantified using a cobaltihexamine chloride buffer for the exchange reaction following the protocol NF-ISO 23470. We obtained values of the aridity index (AI) from the data interpolations provided by Worldclim (Zomer *et al.*, 2006; <http://www.cgiar-csi.org/data/climate/item/51-global-aridity-and-pet-database>). DOC was extracted from 5 g of soil with a 30 mM K_2SO_4 solution, filtered through 1.6 μm (GE Healthcare, Life Sciences, Whatman™, Glass microfiber filters). The filtered extracts were kept at -20°C until analysis with a TOC-L CPH (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

Soil incubation and measurements of CO_2 emission and O_2 consumption

Non-irradiated and γ -irradiated (45kGy, ^{60}Co , IONISOS, ISO14001, France) soil microcosms consisted of 15 g (oven dried basis) samples of sieved soils placed in 120 mL sterile glass flasks capped with butyl rubber stoppers and sealed with aluminum crimps. Microcosms were flushed with a sterilized free CO_2 gas (80 % N_2 , 20 % O_2) moistened at -100kPa with sterilized water and incubated in the dark at 20°C for 16 days. To avoid contamination of sterilized soil, each sampling was destructive. We have incubated two microcosm replicates per soil sample, per sampling date (day 5, 11 and 16) and per treatment (irradiated and non-irradiated). All manipulations were done under sterile conditions. Flasks were sampled at 5, 11 and 16 days of incubation to measure CO_2 and O_2 concentrations in the gaseous phase (Chrompack 438 gas chromatograph, Packard Instruments, Downersgrove, IL, USA) (**Table S.4**).

Estimation of R_{soil} and R_{EXOMET}

The total soil respiration (R_{soil}) and the respiration through EXOMET (R_{EXOMET}) were estimated using O_2 consumption as a proxy in living and gamma-irradiated soils, respectively. Considering that $R_{\text{soil}} = \text{Cellular respiration } (R_{\text{cell}}) + R_{\text{EXOMET}}$, the contribution of R_{EXOMET} to R_{soil} was estimated as following: $R_{\text{EXOMET}}/R_{\text{soil}} = (\text{O}_2 \text{ consumption in } \gamma\text{-irradiated soils} / \text{O}_2 \text{ consumption in living soils}) \times 100$.

Soil sterility tests

Dilute nutrient Luria Bertani (LB) and yeast malt (YM) agar plates were prepared using standard media (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD). Both LB and YM were autoclaved. Soil extract were prepared, for each soil sample, by incubating 2 g of fresh live and of irradiated soil sampled after 16 days of incubation in 10 mL of pyrophosphate buffer for 1 h. The mixture was centrifuged (3000 *g*, 2 min) and 200 μ L of supernatant were inoculated on both LB and YM agar plates. All plates were prepared in a UV-sterilized laminar-flow hood. None fungi or bacterial colony was observed on LB and YM agar plate after 72-h of incubation at 25°C.

Statistical analyses

We used a t-statistics to test the significance of the difference between the coefficient of the regressions and 0. t-statistics were computed using the software R 3.2.1 (R Core Team, 2015). Correlations between the respiration in living soils, irradiated soils and the relative contribution of EXOMETs to the soil respiration were investigated through the computation of Pearson correlation coefficients (and their associated p-values) using the software R 3.2.1. The inter-correlation between the different soil parameters were estimated using the same method (results are given in **Table S.3**). To distinguish soil variables that have high independent correlation with the soil respiration and the relative EXOMETs contribution to soil O₂ consumption we used a hierarchical portioning analysis using the software R 3.2.1.

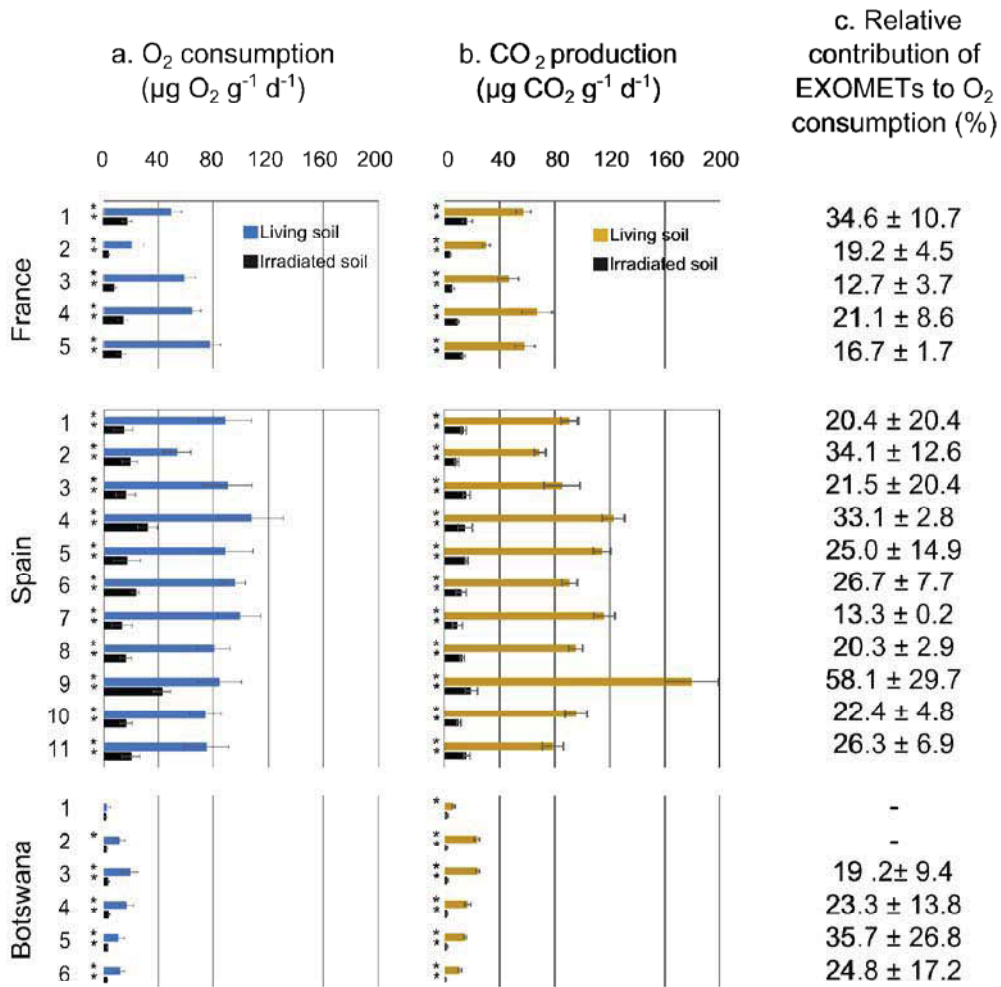


Figure S.1| Daily O₂ consumption (a) and CO₂ production (b) per gram of soil in living soils and in irradiated soils; (c) relative contribution of EXOMET to O₂ consumption in soil samples.

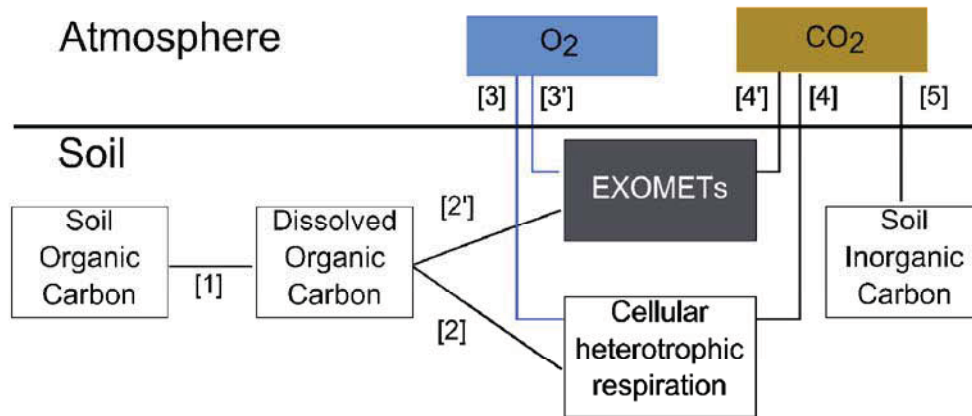


Figure S.2| (A) Diagrammatic representation of organic matter, O₂ and CO₂ fluxes through cellular respiration and EXOMETs in soil. [1] represents the dissolution processes of organic matter, [2] and [2'] represent DOC fluxes going to EXOMETs and cellular respiration respectively, [3] and [3'] represent the O₂ inputs consumed by EXOMETs and cellular respiration respectively, [4] and [4'] represent the CO₂ inputs produce by EXOMETs and cellular respiration respectively, [5] represents the flux that links the atmospheric CO₂ and soil carbonates.

Table S.1| Locations and GPS coordinates of sampling soils.

Soil N°	Country	Site	GPS coordinates	
			Latitude	Longitude
F1	France	<i>Brioude</i>	45.2955639	3.38648056
F2	France	<i>Murvielle-lès-Montpellier</i>	43.6113361	3.77199722
F3	France	<i>Pleyben</i>	48.2263444	-3.96982778
F4	France	<i>Roquetaillade</i>	44.0994917	2.89818889
F5	France	<i>Theix</i>	45.7189583	3.03171389
S1	Spain	<i>Barrax</i>	39.0445806	-2.20146111
S2	Spain	<i>Camporeal</i>	40.3390028	-3.38331667
S3	Spain	<i>Carrascoy</i>	37.8173833	-1.28436667
S4	Spain	<i>Huelves</i>	40.0425917	-2.88421389
S5	Spain	<i>Morata</i>	40.2299028	-3.43721389
S6	Spain	<i>Ontigola</i>	40.0097028	-3.57241111
S7	Spain	<i>Sierra Espuña</i>	37.8624194	-1.54023333
S8	Spain	<i>Titulcia</i>	40.1377556	-3.56988056
S9	Spain	<i>Villarobledo</i>	39.2683139	-2.60156389
S10	Spain	<i>Yecla</i>	38.6122139	-1.11011111
S11	Spain	<i>Zorita</i>	39.2863667	-5.69971389
B1	Botswana	<i>Bokspits</i>	-26.9004361	20.6981083
B2	Botswana	<i>Khawa</i>	-26.2834694	21.3665417
B3	Botswana	<i>Middlepits</i>	-24.619075	25.9095278
B4	Botswana	<i>Phirima</i>	-26.26	22.188
B5	Botswana	<i>Tsabong</i>	-26.02	22.4055556
B6	Botswana	<i>Werda</i>	-25.2683333	23.275

Table S.2| Values of the 19 physicochemical parameters measured on soil samples. Variables are grouped into the 4 categories (Exchangeable bases, soil texture, carbon related variables, general parameters) used in Fig.1. Abbreviations are defined in Fig.1. The units for parameters are the following: cmol.Kg⁻¹ for exchangeable bases and CEC; % for soil texture; mg.g⁻¹ soil for TC, OC, IC; µg.g⁻¹ soil for DOC and DIC and µS.cm⁻¹ for conductivity.

Soil N°	Exchangeable bases							Soil texture		
	Mg	Na	K	Fe	Mn	Al	Ca	Sand	Clay	Silt
F1	0.315	0.0487	0.153	0.0384	0.006	0.182	0.623	96.63	2.25	1.12
F2	0.247	0.0249	0.139	0.0151	0.0073	0.0821	0.48	95.56	3.33	1.11
F3	0.231	0.0213	0.136	0.012	0.0059	0.0709	0.618	95.65	1.09	3.26
F4	0.189	0.0193	0.127	0.0265	0.0079	0.148	0.704	96.63	0.00	3.37
F5	0.264	0.0227	0.124	0.0207	0.0071	0.109	0.917	96.74	1.09	2.17
S1	0.168	0.0177	0.0968	0.0168	0.0057	0.103	0.486	92.31	2.20	5.49
S2	0.976	0.114	0.637	0.0075	<0,005	0.0412	21.9	59.18	5.99	34.82
S3	1.04	0.118	0.297	<0,005	<0,005	0.0201	18.1	44.37	6.24	49.38
S4	1.17	0.21	0.55	0.007	<0,005	0.0357	19.5	48.96	7.23	43.81
S5	2.7	0.109	0.394	<0,005	<0,005	0.0267	27.6	48.93	6.17	44.89
S6	1.39	0.141	0.394	<0,005	<0,005	0.0203	18.3	54.42	6.83	38.75
S7	0.828	0.135	0.679	0.0063	<0,005	0.0397	16.7	49.39	3.86	46.75
S8	1.43	0.163	0.612	0.0063	<0,005	0.0344	22.1	52.40	4.13	43.46
S9	0.712	0.122	0.283	<0,005	<0,005	<0,02	20.6	49.78	9.18	41.04
S10	1.13	0.122	0.705	0.0076	<0,005	0.039	27	60.42	2.21	37.38
S11	0.99	0.148	0.566	<0,005	<0,005	<0,02	21.8	59.37	5.84	34.79
B1	0.837	0.142	0.332	0.0124	<0,005	0.0694	20.9	74.28	6.62	19.09
B2	1.82	0.0332	1.51	0.007	0.0127	0.0375	5.72	70.00	6.67	23.33
B3	0.467	0.112	0.606	0.0052	<0,005	0.0334	13.5	42.22	10.00	47.78
B4	0.736	0.0873	0.306	<0,005	0.0083	0.294	4.47	32.22	3.33	64.44
B5	3.51	0.0658	0.557	<0,005	<0,005	<0,02	11.4	42.22	16.67	41.11
B6	3.63	0.106	0.117	0.0081	0.0256	0.201	9.45	55.56	13.33	31.11

Soil N°	Carbon related variables					General parameters			
	TC	OC	IC	DOC	DIC	CEC	Al	pH	Conductivity
F1	1.50	1.04	0.46	9.58	0.04	<1	0.09	6.53	19.37
F2	2.38	1.45	0.93	13.80	0.02	<1	0.13	6.22	32.54
F3	2.74	2.25	0.49	17.76	0.24	<1	0.27	6.24	36.11
F4	2.83	2.14	0.69	11.30	0.00	<1	0.15	6.16	35.56
F5	2.79	2.99	0.00	12.96	0.00	1.2	0.17	6.30	46.92
S1	2.33	1.68	0.65	9.70	0.00	<1	0.17	6.04	20.20
S2	94.57	31.75	62.36	58.74	65.24	20.9	0.34	8.10	320.48
S3	99.37	20.47	79.17	62.06	45.80	17.7	0.42	8.18	328.78
S4	99.87	31.17	64.37	81.32	63.60	18.5	0.32	7.97	224.07
S5	106.90	43.22	67.82	63.40	62.58	28.9	0.41	7.69	213.68
S6	109.33	31.86	76.78	68.86	61.28	18.1	0.37	8.02	291.54
S7	101.73	20.32	83.13	49.40	58.30	16.1	0.37	8.07	207.36
S8	75.13	25.93	49.48	54.40	72.28	21.8	0.39	7.56	299.30
S9	112.67	17.89	94.74	48.08	53.62	20	0.36	8.05	542.03
S10	72.80	44.95	25.50	115.34	72.34	26.4	0.35	8.01	316.76
S11	94.63	28.35	66.54	63.80	81.32	21.2	0.35	8.11	241.84
B1	55.70	29.69	27.41	114.66	59.30	20.7	0.38	7.60	171.88
B2	20.51	21.95	0.00	84.26	0.62	8.46	0.67	6.40	180.90
B3	21.93	15.21	6.72	23.44	44.66	13.1	0.73	8.07	160.90
B4	22.09	21.53	0.56	26.92	0.16	5.29	1.55	5.95	114.50
B5	23.71	17.48	6.23	21.24	32.18	14.9	0.81	7.62	185.30
B6	33.47	34.81	0.00	41.86	0.46	13.2	0.99	5.97	173.60

Table S.3| Pearson's correlation matrix for the 19 physicochemical parameters measured on soil samples. Variables are grouped into the 4 categories (Exchangeable bases, soil texture, carbon related variables, general parameters) used in Fig.1. Abbreviations are defined in Fig.1. Values in bold indicate significance at $p < 0.05$.

	Mg	Na	K	Fe	Mn	Al	Ca	Sand	Clay	Silt	TC	OC	IC	DOC	DIC	CEC	Al	pH	Cond.
Mg	1	0.18	0.20	-0.45	0.32	-0.07	0.26	-0.45	0.76	0.33	0.15	0.52	-0.01	0.17	0.07	0.41	0.42	0.05	0.19
Na		1	0.18	-0.56	-0.44	-0.34	0.02	-0.66	0.30	0.67	0.00	0.71	0.70	0.61	0.04	0.79	0.03	0.74	0.64
K			1	-0.32	-0.13	-0.41	0.28	-0.30	0.08	0.29	0.08	0.34	0.09	0.09	0.27	0.32	0.12	0.30	0.27
Fe				1	0.32	0.33	-0.59	0.06	-0.56	-0.04	-0.62	-0.57	-0.55	-0.31	-0.52	-0.64	-0.46	-0.57	-0.64
Mn					1	0.67	-0.58	0.26	0.09	-0.31	-0.54	-0.17	-0.60	-0.27	-0.74	-0.50	0.41	-0.79	-0.41
Al						1	-0.58	0.13	-0.24	-0.08	-0.54	-0.21	-0.58	-0.37	-0.67	0.57	-0.77	-0.53	
Ca							1	-0.57	0.26	0.58	0.07	0.84	0.75	0.72	0.94	0.99	-0.15	0.06	0.77
Sand								1	-0.59	-0.98	-0.56	-0.59	-0.46	-0.26	-0.49	-0.62	-0.60	-0.55	-0.59
Clay									1	0.43	0.17	0.32	0.09	0.07	0.16	0.36	0.44	0.30	0.35
Silt										1	0.59	0.49	0.28	0.51	0.61	0.57	0.57	0.55	0.57
TC											1	0.68	0.96	0.85	0.84	-0.21	0.82	0.81	
OC												1	0.46	0.68	0.88	0.19	0.53	0.56	
IC													1	0.78	0.70	-0.32	0.79	0.77	
DIC														1	0.63	0.72	-0.11	0.52	0.51
CEC															1	0.90	-0.28	0.92	0.69
Al																1	-0.05	0.81	0.76
pH																	1	-0.27	-0.05
Cond.																		1	0.73

Table S.4| CO₂ (in µg CO₂.g⁻¹ soil) and O₂ concentration (in µg O₂.g⁻¹ soil) values recorded at each sampling date (0, 5, 11 and 16 days) throughout the incubation period in (A) living and (B) irradiated soils. The O₂ and CO₂ parameters were measured in 2 replicates (Rep.) per soil sample and per condition (R1 and R2).

LIVING SOILS (A)									
Soil sample	Rep.	CO ₂ production				O ₂ consumption			
		Sampling date				Sampling date			
		0	5	11	16	0	5	11	16
B1	R1	0	67.11	66.02	105.24	1678.55	1579.19	1680.02	1651.04
B1	R2	0	65.63	72.82	124.86	1678.55	1611.08	1575.09	1621.39
B2	R1	0	175.57	244.56	363.02	1678.55	1459.24	1451.54	1506.88
B2	R2	0	185.25	274.67	423.17	1678.55	1464.97	1493.30	1438.97
B3	R1	0	183.66	309.90	389.12	1678.55	1462.76	1492.78	1485.33
B3	R2	0	167.19	269.88	387.05	1678.55	1477.34	1369.92	1213.97
B4	R1	0	128.45	203.83	329.74	1678.55	1520.62	1599.81	1285.79
B4	R2	0	157.45	197.45	237.57	1678.55	1487.72	1517.69	1432.48
B5	R1	0	115.36	155.57	243.68	1678.55	1527.31	1625.18	1550.55
B5	R2	0	111.06	170.44	258.00	1678.55	1534.33	1571.18	1382.71
B6	R1	0	99.90	130.23	193.19	1678.55	1539.01	1498.69	1417.90
B6	R2	0	111.58	138.74	185.83	1678.55	1559.66	1522.08	1544.79
S1	R1	0	592.12	895.21	1450.54	2563.99	1703.80	1575.12	1477.99
S1	R2	0	613.74	968.55	1614.57	2563.99	1653.30	1398.52	561.03
S2	R1	0	460.41	788.75	1155.64	2130.69	1835.19	1603.47	1387.26
S2	R2	0	552.44	787.88	1157.30	2130.69	1521.91	1553.48	1003.34
S3	R1	0	689.52	1165.13	1684.32	2552.17	1679.92	1361.57	573.84
S3	R2	0	704.62	1168.83	1078.00	2552.17	1677.18	1463.55	1439.53
S4	R1	0	879.67	1449.41	2023.67	2871.59	1727.20	1072.81	1471.16
S4	R2	0	982.90	1415.01	2086.79	2871.59	1629.89	1460.81	648.56
S5	R1	0	817.85	1325.59	1923.25	2664.52	1660.03	1099.85	1342.73
S5	R2	0	827.46	1342.59	1868.49	2664.52	1697.07	1068.91	1189.96
S6	R1	0	670.25	992.23	1460.83	2460.62	1649.11	1319.47	800.84
S6	R2	0	626.53	1005.59	1588.82	2460.62	1707.99	1406.06	874.29
S7	R1	0	796.92	1239.18	1953.71	2690.95	1686.17	1105.58	1179.28
S7	R2	0	815.74	1159.30	1991.10	2690.95	1670.93	1373.14	920.97
S8	R1	0	645.92	1056.87	1577.27	2294.03	1814.66	1424.31	1159.78
S8	R2	0	634.39	983.31	1613.60	2294.03	1542.44	1529.90	653.53
S9	R1	0	1366.06	2455.80	2928.21	2435.61	1878.47	1054.31	878.65
S9	R2	0	1530.42	2646.36	2805.94	2435.61	1478.63	1214.63	1319.21
S10	R1	0	817.25	1250.32	1640.48	2429.27	1772.50	1448.29	994.03
S10	R2	0	666.66	1041.00	1549.60	2429.27	1584.60	1578.72	1278.69
S11	R1	0	676.82	767.33	1327.13	1678.55	1620.86	1507.03	379.64
S11	R2	0	595.87	883.95	1402.22	1678.55	1595.93	787.87	580.24
F1	R1	0	302.90	739.44	955.51	2094.29	1825.92	1480.92	1320.84
F1	R2	0	542.59	691.08	905.54	2094.29	1531.18	1598.18	1184.97
F2	R1	0	256.94	357.30	517.61	1678.55	1318.46	1527.07	1127.32
F2	R2	0	260.30	344.83	505.92	1678.55	1524.84	1535.70	1400.57
F3	R1	0	496.56	682.96	781.81	2285.85	1674.76	1589.49	1256.05
F3	R2	0	537.18	666.24	788.87	2285.85	1682.34	1564.71	1263.56
F4	R1	0	775.83	974.10	1303.44	2072.64	1771.33	1334.95	974.23
F4	R2	0	525.43	787.81	973.82	2072.64	1585.77	1544.76	1011.79
F5	R1	0	525.43	787.81	973.82	2354.89	1680.28	1491.28	1049.64
F5	R2	0	622.73	765.12	986.33	2354.89	1676.82	1378.91	1038.07

IRRADIATED SOILS (B)									
Soil sample	Rep.	CO ₂ production				O ₂ consumption			
		Sampling date (in day)				Sampling date (in day)			
		0	5	11	16	0	5	11	16
B1	R1	0.00	26.26	10.90	50.10	1678.55	1655.08	1675.31	1648.70
B1	R2	0.00	13.56	11.77	16.26	1678.55	1659.59	1644.68	1658.20
B2	R1	0.00	18.14	17.94	27.51	1678.55	1602.03	1633.10	1645.13
B2	R2	0.00	17.38	17.73	24.06	1678.55	1647.49	1646.74	1644.20
B3	R1	0.00	17.15	23.91	32.11	1678.55	1646.58	1653.69	1628.84
B3	R2	0.00	18.56	28.15	26.89	1678.55	1653.69	1626.71	1625.47
B4	R1	0.00	15.95	20.38	26.32	1678.55	1665.20	1651.19	1634.60
B4	R2	0.00	15.44	25.29	28.35	1678.55	1652.09	1624.92	1610.90
B5	R1	0.00	14.46	16.18	25.86	1678.55	1652.63	1647.47	1630.61
B5	R2	0.00	10.04	19.18	25.08	1678.55	1669.41	1640.13	1642.40
B6	R1	0.00	9.71	9.86	16.49	1678.55	1660.60	1653.83	1646.30
B6	R2	0.00	9.45	12.16	19.25	1678.55	1674.93	1667.91	1626.55
S1	R1	0.00	124.02	139.19	205.51	1678.55	1376.70	1386.71	1279.48
S1	R2	0.00	105.26	155.22	276.22	1678.55	1427.21	1452.67	1545.09
S2	R1	0.00	93.01	117.04	159.73	1678.55	1503.63	1471.52	1481.07
S2	R2	0.00	95.38	109.79	145.42	1678.55	1497.32	1491.04	1200.63
S3	R1	0.00	107.63	145.01	336.19	1678.55	1415.87	1390.62	1539.35
S3	R2	0.00	106.98	128.77	221.14	1678.55	1424.93	1483.27	1227.26
S4	R1	0.00	140.71	180.45	246.76	1678.55	1333.47	1192.31	1218.74
S4	R2	0.00	126.15	183.17	-	1678.55	1332.97	1186.95	-
S5	R1	0.00	122.46	215.77	253.04	1678.55	1461.83	1248.71	1536.77
S5	R2	0.00	99.19	186.29	257.06	1678.55	1414.97	1306.02	-
S6	R1	0.00	95.34	144.54	195.30	1678.55	1487.13	1398.78	1332.52
S6	R2	0.00	123.28	160.16	-	1678.55	1531.48	1349.31	-
S7	R1	0.00	123.92	209.57	187.34	1678.55	1535.59	1305.89	1531.53
S7	R2	0.00	134.10	-	113.33	1678.55	1609.93	1304.36	1545.30
S8	R1	0.00	126.94	175.21	223.45	1678.55	1597.76	1373.87	1476.38
S8	R2	0.00	110.02	145.42	214.94	1678.55	1544.57	1586.79	1362.85
S9	R1	0.00	194.45	258.81	314.18	1678.55	1316.62	1078.52	1074.86
S9	R2	0.00	224.10	254.27	-	1678.55	1455.33	1101.00	-
S10	R1	0.00	105.91	123.71	185.54	1678.55	1638.08	1415.86	1465.76
S10	R2	0.00	108.10	122.86	173.46	1678.55	1449.85	1519.92	1355.12
S11	R1	0.00	166.61	190.83	276.06	1678.55	1400.34	1286.63	1433.59
S11	R2	0.00	162.49	210.83	284.98	1678.55	1405.30	1465.54	1218.73
F1	R1	0.00	31.61	119.69	191.81	1678.55	1651.37	1581.11	1460.45
F1	R2	0.00	104.15	122.73	365.64	1678.55	1640.27	1566.56	1333.20
F2	R1	0.00	40.51	44.02	74.03	1678.55	1638.93	-	1607.94
F2	R2	0.00	43.72	41.99	69.17	1678.55	1648.00	1629.45	1624.29
F3	R1	0.00	71.21	71.64	104.02	1678.55	1606.05	1565.93	1530.54
F3	R2	0.00	63.47	63.21	106.14	1678.55	1587.24	1557.86	1581.31
F4	R1	0.00	88.17	111.67	163.48	1678.55	1533.82	1450.00	1366.23
F4	R2	0.00	91.51	103.54	165.47	1678.55	1507.39	1497.13	1521.00
F5	R1	0.00	123.22	167.21	228.29	1678.55	1596.79	1497.40	1469.10
F5	R2	0.00	124.36	163.94	235.68	1678.55	1488.47	1441.22	1473.94

Table S.5| Pearson's correlation values between O₂ consumption and the physicochemical parameters in living soils and irradiated soils. O₂ consumption is used as a proxy to estimate ^athe total soil respiration (R_{soil} = Cellular respiration + EXOMET respiration) in living soils and ^bthe EXOMET respiration (R_{EXOMET}) in irradiated soils. Correlation values between the contribution of R_{EXOMET} to R_{soil} ^c(R_{EXOMET}/R_{soil}) and the physicochemical parameters were also determined. Variables are grouped into the 4 categories (Exchangeable bases, soil texture, carbon related variables, general parameters) used in Fig.1. Abbreviations are defined in Fig.1. Values in bold indicate significance at p < 0.05.

Proxy	O ₂ consumption		
	Living soils	Irradiated soils	Living soils
Soil type			
Estimated parameter	^a R _{soil}	^b R _{EXOMET}	^c R _{EXOMET} /R _{soil}
Exchangeable bases			
Mg	0.52	0.4	-0.04
Na	0.81	0.54	-0.1
K	0.35	0.42	0.26
Fe	-0.65	-0.48	0.11
Mn	-0.32	-0.34	-0.16
Al	-0.31	-0.39	-0.28
Ca	0.86	0.81	0.25
Soil texture			
Sand	-0.68	-0.46	0.19
Silt	0.68	0.48	-0.14
Clay	0.34	0.13	-0.28
C related variables			
TC	0.85	0.67	0.11
OC	0.88	0.84	0.28
IC	0.71	0.51	0.03
DOC	0.67	0.81	0.51
DIC	0.75	0.4	0.16
General parameters			
CEC	0.88	0.83	0.24
AI	0.16	-0.006	-0.35
pH	0.64	0.59	0.19
Conductivity	0.71	0.59	0.11

Chapitre IV : Inactivation des écoenzymes dans le sol et ses différentes fractions granulométriques.

Exemple de la Malate déshydrogénase (MDH) et de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6Pd)

***Remarques :** Les suivis d'inactivation de la MDH et de la G6Pd ont demandé des mises au point importantes des protocoles de mesures d'activités de ces enzymes dans le sol. Pour cette raison, seules les cinétiques d'inactivation de ces deux enzymes n'ont pu être mesurées durant cette thèse. Les mesures d'inactivation de deux enzymes extracellulaires (ex. une glucosidase, une cellobiohydrolase) dans le sol sont envisagées afin d'alimenter les résultats présentés ci-après. Cette étude sera proposée au journal *Soil Biology and Biochemistry* et a été rédigée selon les exigences de ce journal.*

TURNOVER RATES OF ECOENZYMES IN THE BULK SOIL AND SOIL FRACTIONS

B. Kéralval ^{1,2,3}, G. Alvarez ^{3,4}, R. Martin ³, L. Andanson ⁴, M. Richeux ³,
S. Slouma ³, A.C. Lehours^{1,2}, C. Amblard ^{1,2}, S. Fontaine ³

Proposed in Soil Biology and Biochemistry

Authors affiliations:

[1] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, BP 10448, 63000, Clermont-Ferrand, France

[2] CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, 63178 Aubière, France

[3] INRA, UR874 (Unité de Recherche sur l'Ecosystème Prairial), 5 Chemin de Beaulieu, 63039 Clermont-Ferrand, France.

[4] Clermont Université, VetAgro Sup, BP 10448, F-6300 Clermont-Ferrand, France

* to whom correspondence should be addressed

Benoit KERAVAL

Present address : LMGE, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 1 impasse Amélie Murat, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France

E-mail : benoit.keraval@gmail.com

ABSTRACT

By hydrolyzing and oxidizing structurally diverse compounds, soil ecoenzymes play a major role in the turnover of soil organic matter and its mineralization. In this study, we used a physical fractionation procedure to extract the sand, the silt and the clay fractions from soil. We followed the inactivation of two ecoenzymes (the malate dehydrogenase and the glucose-6-phosphate dehydrogenase) in the soil bulk and in its different fractions. Those kinetics allow us to develop a modeling approach which simulate the inactivation of ecoenzymes when released in the soil matrix. The two enzymes showed different sensitivity to the soil environment which may be the reflect of the intrinsic proprieties of the enzyme and of the interaction established between soil particles and its ultrastructure.

INTRODUCTION

Ecoenzyme encompass all enzymes located outside the confines of intact cell membranes regardless of whether such enzymes enter the environment by secretion or cell lysis (Sinsabaugh *et al.*, 2009). Ecoenzymes convert complex soil organic matter into low molecular weight compounds available by microorganisms and their respiration machinery. Recently, studies showed that ecoenzymes trigger extracellular oxidative metabolisms (EXOMET) which contribute to soil CO₂ emissions (Maire *et al.*, 2013; Kéroual *et al.*, 2016). First estimations suggest that EXOMET contribute from 16 to 48% to soil CO₂ emissions. Those two metabolisms follow different bio-physico-chemical laws and should be considered differentially when studying the impact of climate change on biogeochemical cycles.

Numerical models are useful tools to study the fluxes between ecosystem component and to predict the sensitivity and the response of environment against changing environmental and climatic variables. Historically, earth system models simulated microbial decomposition through first-order kinetics that determine turnover rates of soil C pools. Then, the explicit inclusion of soil microbial dynamics has been shown to improve the performance of these models (Wieder *et al.*, 2013). Moreover, it is increasingly reorganized that the ecoenzymes are the limiting factor in the organic matter decomposition by microorganisms and studies started to integrate this pool into models of SOM decomposition (Allison, 2005; Schimel and Weintraub, 2003; Sinsabaugh and Moorhead, 1994; Vetter *et al.*, 1998; Fontaine *et al.*, 2003). Surprisingly, the turnover rates of ecoenzymes in soil remain understood, therefore those models mostly considered a single pool of enzyme with a uniform turnover in soil.

Once released in the soil matrix, ecoenzymes escape to the cell control and diffuse in the soil matrix where they undergo interactions with other organic molecules, soil minerals, microorganisms and broader environmental variables such as pH, water potential and temperature. Some of these are more resilient than other because of their structural properties. For example, some are glycosylated and have disulfide bonds which confer to the ecoenzyme thermostability, a broad pH range for activity and resistance to proteases for example. Moreover, many ecoenzymes become stabilized through association with clay minerals, humic acids and particulate organic matter and retain significant levels of activity for prolonged periods of time in soil (Burns *et al.*, 2013). Adsorption mechanisms through cation exchanges, the van der Waals force, the ionic and hydrophobic bonds can retain the ecoenzyme to the clay surfaces. The ion exchanges, trapping within organic networks, the ionic and covalent bonds should, in turn, participate to the stabilization process between the enzyme and the humic matter (Burns *et al.*, 1982, 1986; Tietjen and Wetzel, 2003).

Various studies which used soil compartmentalization (clay-, silt-, sand-sized fractions) showed that the distribution of ecoenzymes in the soil matrix is not uniform. It has also been observed that the enzyme turnover varies and depend on the spatial location of the enzyme within the soil fractions (Allison and Jastrow 2006; Marx *et al.* 2005). For example, it has been showed that the invertase activity is mainly associated to the silt and clay fractions (Stemmer *et al.*, 1998) and that the phenol oxidase activity was at least three time greater in the clay fraction than in other soil fractions (Allison and Jastrow, 2006). However, the origin of this distribution of ecoenzyme activities remain uncertain. This distribution may be attribute to (i) to the location of their substrate, (ii) to the organism responsible for their production and (iii) to accumulation of the enzyme at sites of preferential adsorption as a result of their surface active properties (Kanazawa and Filip, 1986; Kandeler *et al.*, 1999). The turnover rates of ecoenzyme within those soil fractions and their contribution to the overall ecoenzyme activities have not yet been assessed.

In this study we have aimed to determine the impact of the soil bulk, the different soil fractions and their interactions on the turnover of the MDH and G6Pd. Those enzymes were chosen because of their potential implication in the mineralization of soil organic matter by EXOMET. Therefore, we have followed the inactivation of those two enzymes over the time after their incorporation in the soil bulk, the sand-, the silt- and the clay- size fractions.

MATERIAL AND METHODS

Soil sampling and preparation

Soil samples were collected in October 2013 from the 40-60 cm soil layer at the site of Theix (Massif Central, France). The soil is a sandy loam Cambisol developed on granitic rock (pH=6.5, carbon content = 23.9 ± 1 g C kg⁻¹). For detailed information on the site see Fontaine *et al.* (2007). The fresh soil sample was mixed, sieved at 2 mm, dried to 10 % and sieved at 200 μ m.

Soil fractionation

The different size fractions were separated using a physical fractionation of the soil, commonly used those last years (Stemmer *et al.*, 1998). 50g (dry mass) of soil was shaken at 50rpm with rotatory shaker during 16 hours in bottles which contained 190mL of water and 20 balls (diameter 5mm of diameter). This soil suspension was then dispersed using a probe-type ultrasonic disaggregator set to 8W during 5 min (two times 2.5 min) (final energy applied to the soil = 172J g⁻¹ soil). This soil solution was sieved at 200 μ m and the coarse sand fraction (>200 μ m) was eliminated.

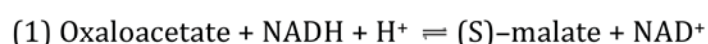
The soil solution was then sieved at 50 μ m to extract the fine sand fraction (sand-F: 50 μ m to 200 μ m). The fine sand fraction was carefully washed on the sieve with 200ml of cooled water in order to remove the silts and clays. The remaining soil solution was then centrifuged at 200g in order to extract the silt size fraction (silt-F: 2 μ m to 50 μ m). The silt fraction was washed by resuspending the pellet in 100 mL of water and centrifuge at 200g (this washing step was repeated 5 times). After each centrifugation, the supernatant was collected and centrifuged at 3900g to extract the “clay fraction” (clay-F: 0 μ m to 2 μ m). This protocol was repeated enough time to extract a sufficient quantity of each fractions (**Fig.1A**). The term “fraction” defines the minerals and the organic matter associated to the different particle sizes.

Enzymes addition experiment

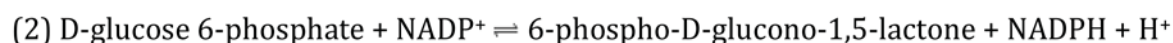
Enzymes solutions of malate dehydrogenase (MDH: EC.1.1.1.37) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6Pd: EC.1.1.1.49) were separately added to bulk soils (surface and deep soils) and to particle size fractions (clay-F, silt-F and sand-F) (**Fig.1B**). For each condition, controls without enzyme were also prepared. We added 30 units of MDH, 90 units of G6Pd to 50mg of each soil samples. These amount were determined to ensure a measurable enzyme activity in all treatments after two days of incubation. Enzyme activities were measured after 2, 5, 8, 15 and 25 days. Samples with and without enzymes were incubated at 25°C and at -100kPa in the dark. Eight replicates were prepared for each treatment.

Principle of enzyme essays

For each enzyme, the enzyme activities were quantified in microcosms where the studied enzymatic reactions were the limiting factor (Nardi et al, 2007). Substrates, cofactors and intermediary enzymes of the enzymatic reaction system were mixed in a buffer solution and incorporated in excess in bulk soils and soil fractions samples. The activity of MDH was quantified by measuring the oxidation of NADH in NAD⁺ following the reaction:



The activity of G6Pd was quantified by measuring the reduction of NADP⁺ in NADPH following the reaction:



The production of NADPH and the consumption of NADH were followed by spectrophotometry at 340nm (PowerWave XS2, Biotek inc.) on kinetics of about 30 min with 4 measurement times (**Fig. 1B**). As suggest by Maire *et al.* (2013), we increased the concentration of the buffer and the Mg²⁺ than those commonly used in the quantification of those enzyme activities in order to better control the pH and to precipitate the humic acids that could hamper the quantification of NADH and NADPH by spectrophotometry.

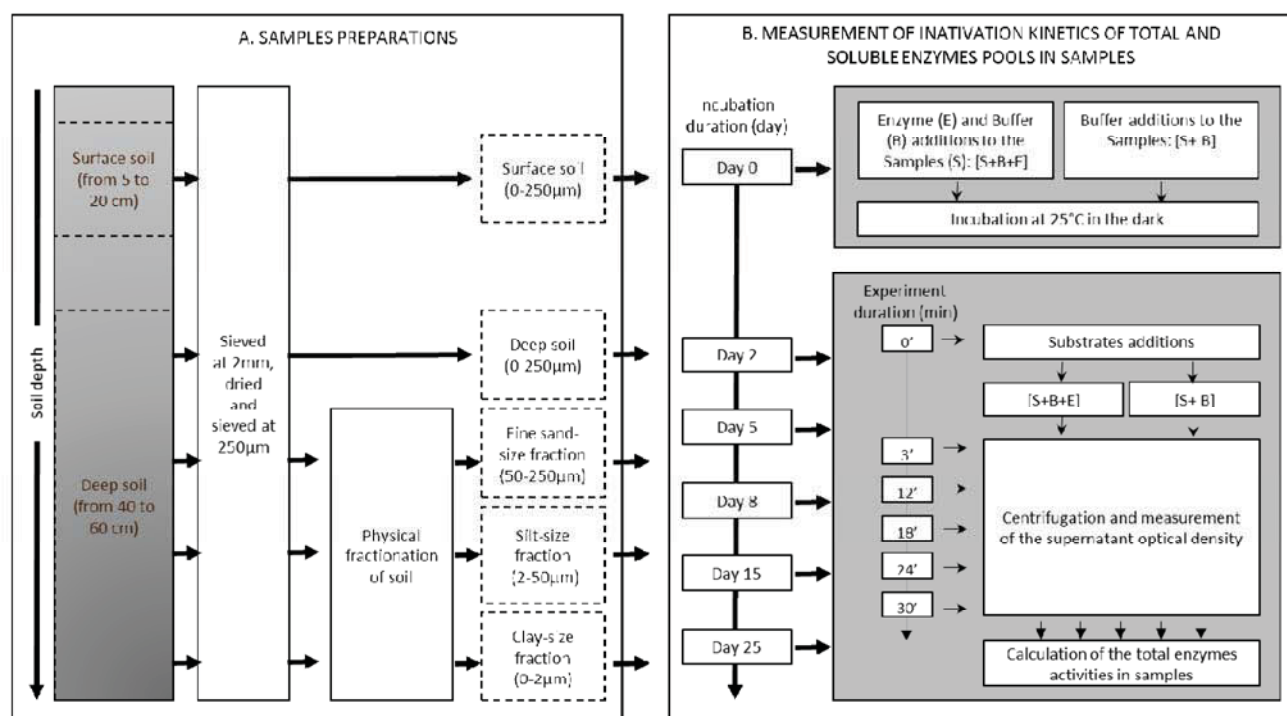


Figure 1: (A) General experimental design used for the preparation of the samples (surface soil deep soil, fine sand-size fraction, silt-size fraction and clay size fraction). (B) General experimental design used to measure the inactivation kinetics of MDH and G6Pd ecoenzymes pools in soil samples. E: Enzyme, B: Buffer and S: Samples (which included surface soil deep soil, fine sand-size fraction, silt-size fraction and clay size fraction).

Quantification of the ecoenzymes activities

50 mg of soil samples (with and without enzymes) mixed to 400 μL of the buffer solution containing substrates, co-factors (see Sect. 4.1.3.5) were incubated during 30min. Duplicates of samples were collected at 4 different times over the incubation. At each time, those samples were centrifuged at 6 000 \times g during 1 min. 250 μL of supernatant containing soluble enzymes, co-factors and substrates was transferred into a microplate (quartz microplate, Hellma analytics, Germany) and the DO was immediately measured by spectrometry at 340 nm (PowerWave XS2, Biotek inc) (**Fig.1B**). For each of the two enzymes, the enzymatic reaction system and the method of enzyme activity measurement were as follows:

- MDH: 50mg of soil samples with or without MDH was amended with 400 μL of solution containing a buffer (KPO_4 100 mM, pH = 6.6), oxaloacetate (1.5 mM), NADH (1.5 mM) and Mg^{2+} (32 mM). Dehydrogenation of NADH during the chemical transformation of ox-aloacetate to L-malate was measured by spectrometry at 340 nm.
- G6Pd: 50mg of soil samples with or without G6Pd was amended with 400 μL of solution containing a buffer (Tris HCl, 100 mM, pH = 8.5), glucose-6-phosphate (1.5 mM), NADP^+ (1.5 mM), Mg^{2+} (32 mM). Hydrogenation of NADP^+ during the chemical transformation of glucose-6-phosphate to phosphoglucono- δ -lactone was measured by spectrometry at 340 nm.

Modeling approach

The kinetics of ecoenzyme inactivation in bulk soils and in soil fractions were fit to three different models (**Fig. 2**):

- The model 1 considers a single pool of ecoenzyme which continuously inactivate (**Fig. 2A**):

$$(2) \quad dE/dt = -l E$$

where, E is the activity of the enzyme and l is the constant of inactivation of E.

- The model 2 considers two pools of ecoenzymes, one associates to a high turnover rate (E_h) and the other one to a low turnover rate (E_l). E_l feeds E_h . E_h is linked to an inactivation constant (l_h) (**Fig. 2B**):

$$(3) \quad dE/dt = dE_h/dt + dE_l/dt$$

$$(4) \quad dE_h/dt = -s E_h - l_h E_h$$

$$(5) \quad dE_l/dt = s E_h$$

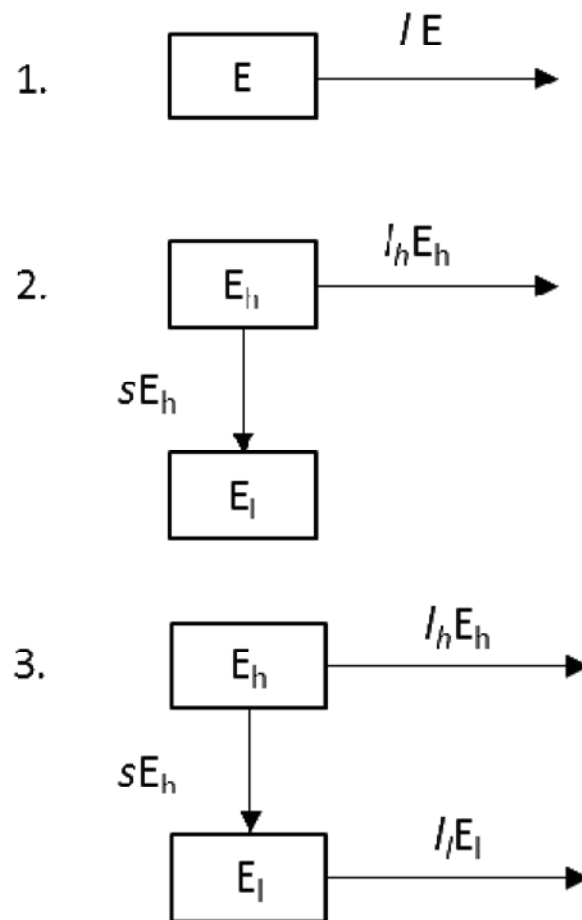


Figure 2: Model applied to optimize the mathematical approach used to simulate the inactivation of ecoenzymes after their addition to the soil matrix. I is the inactivation constant of the ecoenzyme pool (E). I_h and I_l are the inactivation constant of ecoenzyme pools associated to high (E_h) and low (E_l) turnover respectively. s is the constant of transfer which link E_h to E_l .

- The model 3 considers two pools of ecoenzymes, one associates to a high turnover rate (E_h) and the other one to a low turnover rate (E_l). E_l feeds E_h . E_h and E_l are both linked to inactivation constants (l_h and l_l respectively) (**Fig. 2C**):

$$(6) \frac{dE}{dt} = \frac{dE_h}{dt} + \frac{dE_l}{dt}$$

$$(7) \frac{dE_h}{dt} = -s E_h - l_h E_h$$

$$(8) \frac{dE_l}{dt} = s E_h - l_l E_l$$

l_l , l_h and s constants and their confidence intervals were estimated using VenSim software (Ventana Systems, Inc). We have computed the model costs (sum of squared residuals) using the software R 3.2.1 (R Core Team, 2015). We also computed the soil bulk *theoretical* activities as the weighted sum of ecoenzyme activities associated to the sand-, silt-, and clay- fractions relatively to their mass contribution to the soil bulk.

RESULTS

Soils and deep soil fractions characteristics

After the elimination of the coarse sand-sized fraction, the soil was mainly composed by silt-sized particles (520.78 ± 30.08 g kg⁻¹) followed by clay-sized particles (264.9 ± 16.3 g kg⁻¹) and fine sand-sized particles (207.2 ± 24 g kg⁻¹) (**Table 1**). The C concentration was not significantly different between the silt-sized fractions (silt-F) and the clay-sized fractions (clay-F) (420 ± 14 g kg⁻¹ soil and 409 ± 8 g kg⁻¹ soil, respectively). However, the C concentration in the fine sand-sized fraction (sand-F) was two times lower than in clay-F and silt-F (217 ± 5 g kg⁻¹ soil). The C:N ratio increased with the increase of the particles size (clay-F= 8.44 ± 0.24 , silt-F= 10.50 ± 0.11 and sand-F= 12.17 ± 0.21).

	Weight (%) from soil layer 40-60cm	C (g kg ⁻¹)	N (g kg ⁻¹)	C/N
Soil bulk		$34,6 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,1$	$10,20 \pm 0,20$
Sand fraction	$20,72 \pm 2,4$	$21,7 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,0$	$12,17 \pm 0,21$
Silt fraction	$52,78 \pm 3,08$	$40,9 \pm 0,8$	$3,9 \pm 0,1$	$10,50 \pm 0,11$
Clay fraction	$26,49 \pm 1,63$	$42,0 \pm 1,4$	$5,0 \pm 0,0$	$8,44 \pm 0,24$

Table 1: C and N contents in bulk and soil fractions. Relative mass contribution of soil fraction to the bulk soil.

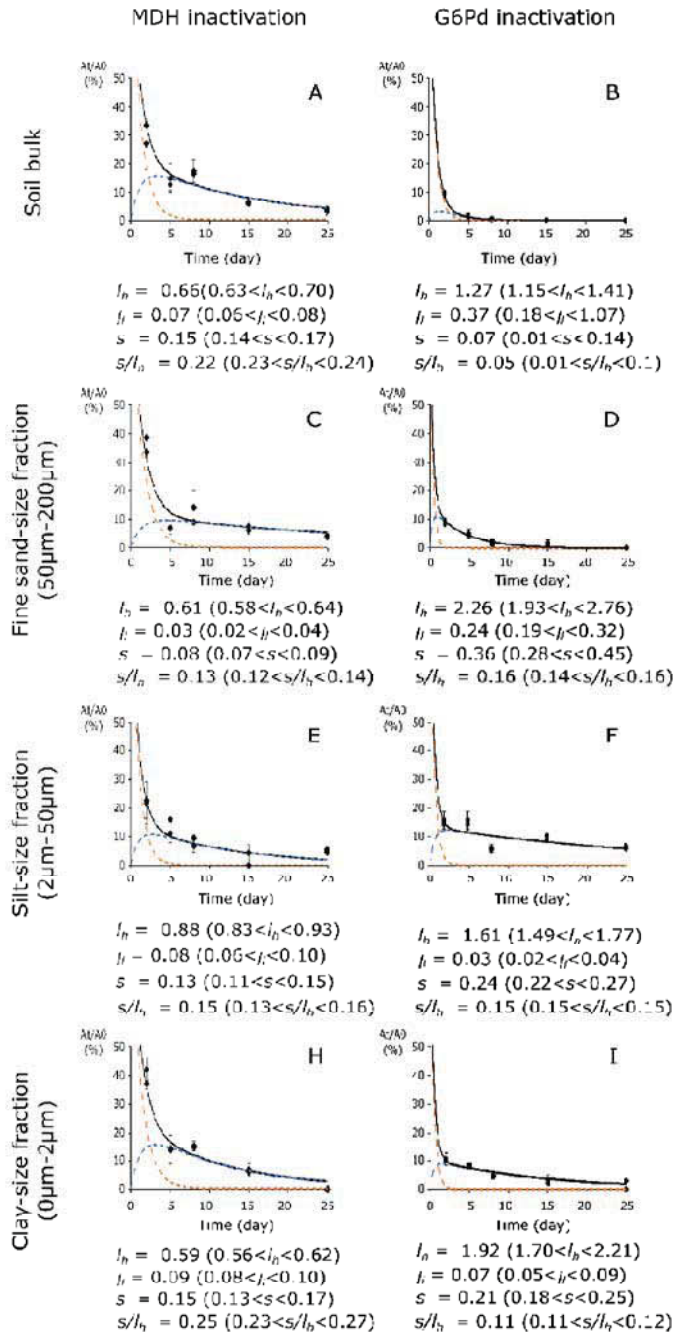


Figure 4: Activity of MDH (A, C, E and H) and G6Pd (B, D, F and I) over the time following their incorporation in the soil bulk (A, B), the sand size fraction (C, D), the silt size fraction (E, F) and the clay size fraction (G, H). Ecoenzymes activities along time (A_t) is expressed as % of the initial activity of ecoenzymatic solution (A_0) applied to the soil (black points). For each date two experimental replicates were analyzed. The full black lines represent the fit of the kinetic model 3 with observed ecoenzyme activities. The dashed blue lines represent the activity of E_i over the time. The dashed orange lines represent the activity of E_h over the time. l_h and l_i represent the constant of inactivation of E_h and E_i respectively. s represents the constant of transfer from E_h to E_i . Values in brackets represent the confidence interval on the parameters estimations.

Enzyme activity in bulk and soil fractions

Each kinetic of ecoenzyme inactivation followed the same pattern: an important inactivation rate between the first two days of incubation (P1) and a smaller inactivation rate between the 5th and the 25th of incubation (P2). MDH activity lost between 60.5±3.6% and 77.8±0.7% of its activity during P1 (69.7±4.6%, 63.6±3.5%, 77.8±0.7% and 60.5±3.6% in bulk, sand-F, silt-F and clay-F respectively). Then it lost between 4.0±1.4% and 14.4±1.1% of its activity during P2 (11.4±3.7%, 4.0±1.4%, 5.2±1.8% and 14.4±1.1% in bulk, sand-F, silt-F and clay-F, respectively). MDH reached 3.6±0.3%, 4.2±0.1%, 5.1±0.6 and 0% of its initial activity at the end of the incubation in bulk, sand-F, silt-F and clay-F respectively. G6Pd activity lost between 85.1±1.1% and 91±0.8% of its activity during P1 (90.5±0.5%, 91±0.8%, 85.1±1.1% and 89.8±0.4% in bulk, sand-F, silt-F and clay-F respectively). Then it lost between 0.9±0.4% and 4.7±4.4% of its activity during P2 (0.9±0.4%, 3.5±1.8%, 3.9±6.4% and 4.7±4.4% in bulk, sand-F, silt-F and clay-F respectively). No measurable activities were quantifiable at the end of the incubation instead in the silt-F where it reached 6.1±0.7% of its initial activity.

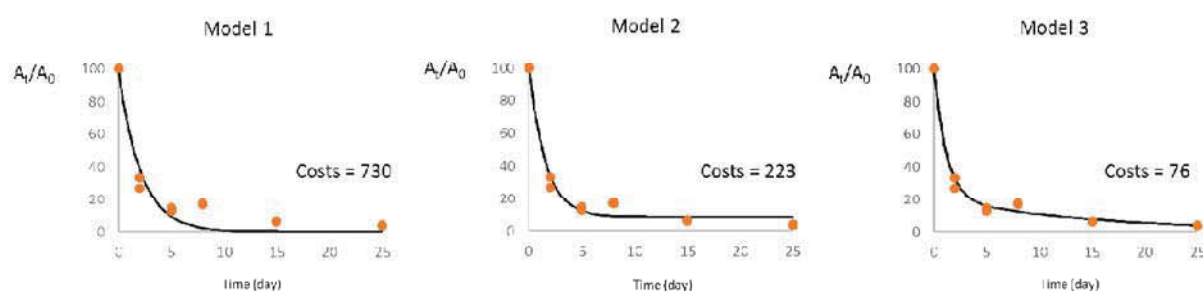


Figure 3: Simulation of MDH inactivation in the soil bulk using model 1, 2 and 3. MDH activity along time (A_t) is expressed as % of its initial activity (orange points). For each date two experimental replicates were analyzed. The full black lines represent the fit of the kinetic model on observed MDH activity over the time. Costs represent the sum of squared residuals between the observed values and our fits.

Using the results of the MDH inactivation activity in the deep soil we computed that the sum of squared residuals between the observed values and our fits were equal to 730, 223 and 76 with model 1, 2 and 3 respectively (**Fig.3**). As a consequence, we used model 3 to simulate the ecoenzyme inactivation after their addition to the soil matrix (**Fig.4**). The fast cycling MDH ($E_{h\ MDH}$) pool was associated to inactivation constants ($l_{h\ MDH}$) which ranged from 0.59 to 0.88 in bulk and soil fractions (0.66, 0.61, 0.88 and 0.59 for bulk, sand-, silt- and clay-size fractions, respectively). $l_{h\ MDH}$ was not significantly different between sand-F and clay-F but was significantly higher in silt-F than in sand-F and clay-F. The slow cycling MDH ($E_{l\ MDH}$) pool was associated to inactivation constants ($l_{l\ MDH}$) which ranged from 0.03 to 0.09 in bulk and soil fractions (0.07, 0.03, 0.08 and 0.09 for bulk, sand-, silt- and clay-size fractions, respectively). $l_{l\ MDH}$ was not significantly different between silt-F and clay-F but was significantly lower in sand-F than in silt-F and clay-F. The constant which linked $E_{h\ MDH}$

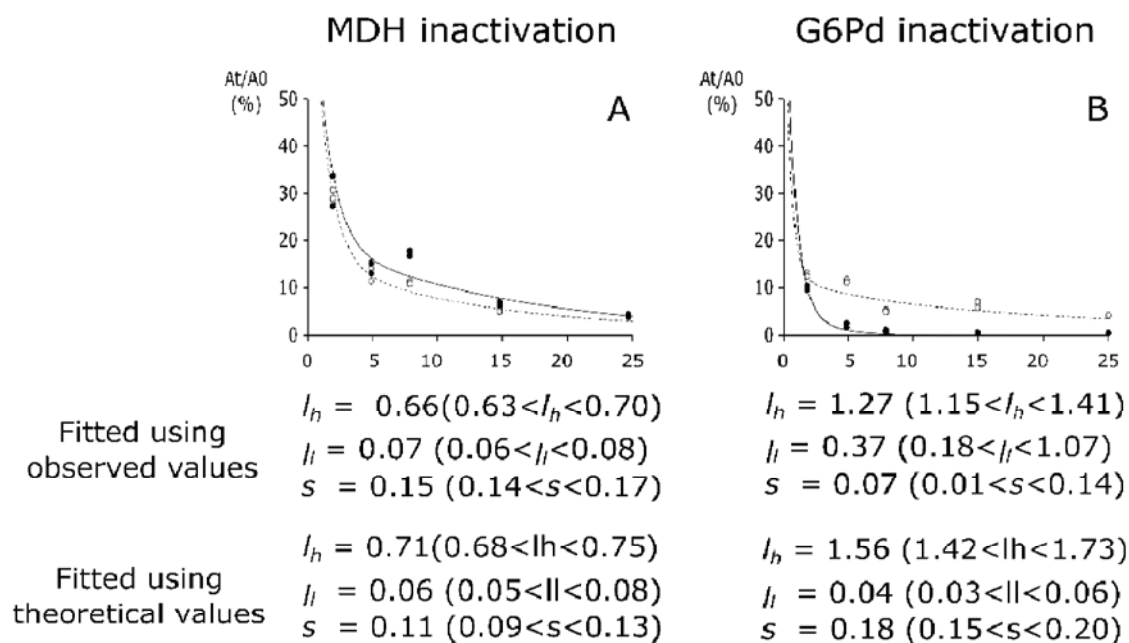


Figure 5: Parameter calibration using model 3 to simulate the inactivation of MDH (A) and G6Pd (B) on soil *observed* activities (full line) and on soil *theoretical* activities (dashed lines). Soil *theoretical* activities were calculated as the weighted sum of ecoenzyme activities associated to the sand-, silt-, and clay- fractions relatively to their mass contribution to the soil bulk. l_h and l_l represent the inactivation constants of E_h and E_l respectively. s represents the constant of transfer from E_h to E_l .

to $E_{I\ MDH}$ (S_{MDH}) ranged from 0.08 to 0.15 (0.15, 0.08, 0.11 and 0.15 for bulk, sand-, silt- and clay-size fractions, respectively). The S_{MDH} was not significantly different between silt-F and clay-F but was significantly lower in sand -F than in clay-F and silt-F.

The $E_{h\ G6Pd}$ pool was associated to $l_{h\ G6Pd}$ which ranged from 1.27 to 2.26 in bulk and soil fractions (1.27, 2.26, 1.61 and 1.92 for bulk, sand-, silt- and clay-size fractions, respectively). l_h was significantly different between sand-F and silt-F. The slow cycling G6Pd ($E_{I\ G6Pd}$) pool was associated to inactivation constants ($l_{I\ G6Pd}$) which ranged from 0.03 to 0.37 in bulk and soil fractions (0.37, 0.24, 0.03 and 0.07 for bulk, sand-, silt- and clay-size fractions, respectively). $l_{I\ G6Pd}$ was significantly different between each fraction. The constant which linked $E_{h\ G6Pd}$ to $E_{I\ G6Pd}$ (S_{G6Pd}) ranged from 0.15 to 0.36 (0.15, 0.36, 0.24 and 0.21 for bulk, sand-, silt- and clay-size fractions, respectively). The S_{G6Pd} was not significantly different between silt-F and clay-F but was significantly higher in sand-F than in clay-F and silt-F.

Studying the MDH inactivation, s/l_h ratios were not significantly different between soil bulk and clay-F but were significantly higher than in silt-F and in sand-F. Studying the G6Pd inactivation, s/l_h in soil bulk was significantly lower than in clay-F, silt-F and sand-F. s/l_h in clay-F was significantly lower than in silt-F and sand-F and no significant difference were measured between silt-F and sand-F. s/l_h were significantly higher in the soil bulk and in the clay-F between MDH and G6PD. No significant difference was computed in silt-F and sand-F between MDH and G6Pd.

Parameters calibration using the soil *theoretical* ecoenzyme activities showed that $l_{h\ MDH}$ and $l_{I\ MDH}$ were not significantly different from the one obtained using the *observed* ecoenzyme activities for the model calibration. S_{MDH} was significantly smaller using theoretical ecoenzyme activities than using observed ones to calibrate the model. $l_{h\ G6Pd}$, $l_{I\ G6Pd}$ and S_{G6Pd} were significantly different between calibration which used *theoretical* and *observed* ecoenzyme activities (Fig.5).

DISCUSSION

Modelling ecoenzyme activities in soil

By hydrolyzing and oxidizing structurally diverse compounds, soil ecoenzymes play a major role in the mineralization of the organic matter. Monitoring the MDH and the G6Pd inactivation over the time allowed us to optimize the modeling approach that simulate the inactivation of ecoenzyme activities in the soil bulk and soil fractions since their release in the extracellular soil matrix (Fig.2 and 3). This model integrates two ecoenzymes pools characterized by a high and a low turnover rate which are both linked to inactivation constants. The fast-cycling ecoenzyme pool supply the slow-cycling ecoenzyme pool. In the natural soil system, free ecoenzymes are supposed to be short-lived unless they are protected from proteolysis upon adsorption by soil mineral or entrapment by humic

colloids (Burns, 1982; Burns and Dick, 2002). In this model the fast-cycling pool may refer to free ecoenzymes in soil solution and the low-cycling pool may, in turn, refer to immobilized ecoenzymes. The observed inactivation in soil may reflect the protein inactivation through its denaturation or the modification of the apparent values of the ecoenzyme kinetics parameters like k_{cat} (the catalytic activity of enzymes), K_m (the half saturation constant of Michaelis-Menten) and EA (the activation energy of the reaction) (Sinsabaugh and Follstad Shah, 2012; Razavi *et al.*, 2015).

Ecoenzyme inactivation in soil bulk and in soil fractions

Whether in the soil or its different fractions, the two ecoenzymes showed contrasted responses to inactivation. The soil bulk and its fractions lead to a faster inactivation of the G6Pd than of the MDH. This observation was globally verified for the fast- and for the slow-cycling ecoenzyme pools. Those results may be partly explained by the improved thermostable configuration of the MDH, which is isolated from an extreme thermophilic bacterium (*Thermus flavus*), compared to G6Pd, which is isolated from a mesophilic bacterium (*Leuconostoc mesenteroides*). However, the constants associated to the flux that link the fast- and the slow-cycling pool are higher for G6Pd than for MDH in each soil fraction. It should reflect an improved preservative role of soil fraction on the G6Pd activity compared to MDH activity. Those results can be related to the co-relation which links the enzyme properties and specific characteristics of the organo-mineral matter associated to each fraction and their degrees of humification in the soil. The differences between s_{MDH} and s_{G6Pd} probably reflect qualitative differences in the organic or in the mineral matter of the different soil fractions, differences in the ability of organic and mineral matter and of organo-mineral complexes to immobilize specific enzymes and to promote their activity for a long time (Busto and Perez-Mateos, 2000). Even if the soil fractions showed less pronounced effect for the transfer from the MDH fast- to the MDH slow-cycling pool than in the G6Pd case, its intrinsic stability balances its inactivation. This balance effect is reflected by the s/l_h ratio which shows that the combined influence of the intrinsic stability of the enzyme and the protective influence of particle size fraction have the same weight when studying MDH and G6Pd inactivation in sand-F and in silt-F. However, clay particles showed a higher preservative role on the MDH activity relatively to its intrinsic stability which was not verified for the G6Pd.

Applying low ultrasonication forces completely dispersed macro- and micro- aggregates. The separation procedure, by sieving and centrifugation, allowed us to effectively extract the different size fractions (clay-F, silt-F and sand-F) as revealed by (i) the microscopy (data not shown) and by (ii) the decline of C:N ratios towards the smaller fractions (**Tab. 1**) (Ahmed and Oades, 1984). Soil aggregates are formed by mineral associations with particulate organic matter (POM) via temporary binding agents (e.g. fungal hyphae, plant roots, polysaccharides) (Six *et al.*, 2000 and Six *et al.*, 2004). Microaggregates (size <200 μ m:

such as fine sand-, silt- and clay-sized fraction) are formed within macroaggregates (size > 200 µm) around POM. The parameter calibrations on *observed* and *theoretical* ecoenzyme activities revealed that this macro-structuration of the soil do not play significant effect on the inactivation of the MDH ecoenzyme. However, this soil structuration is likely to have a major impact on the inactivation of the G6Pd ecoenzyme. In fact, the inactivation of the fast-cycling G6Pd pool was significantly accentuated, the inactivation of slow-cycling G6Pd pool was significantly repressed and the transfer rate between the two pools was significantly on the wane when studying *theoretical* inactivation. Clearly, some mechanism implied in the macro-structuration of the soil must prevent this ecoenzymes to maintain its activity in soil.

CONCLUSION

In soil and soil fractions, the mineralization through cellular respiration and EXOMET depend on the turnover rates of ecoenzyme activities which themselves rely on the enzyme production and its inactivation rate when released within the soil matrix. As represented by the MDH and G6Pd inactivation kinetics, each soils ecoenzymes should respond differentially to the extracellular environment. This respond may depend on various properties such as the intrinsic ecoenzyme properties and its biological and physico-chemical interactions with soil organo-mineral particles. In this study we designed a modelling approach that simulate the inactivation of ecoenzyme in soil. If confirmed with other ecoenzymes and physico-chemical contrasted soils, the inclusion of the ecoenzyme activities through this approach should increase the performance of models that simulate the functioning of agro- and ecosystem and which project climate and carbon cycle feedbacks.

REFERENCES

- Ahmed, M., Oades, J.M., 1984. Distribution of organic matter and adenosine triphosphate after fractionation of soils by physical procedures. *Soil Biology and Biochemistry* 16, 465–470. doi:10.1016/0038-0717(84)90053-1
- Allison, S.D., 2005. Cheaters, diffusion and nutrients constrain decomposition by microbial enzymes in spatially structured environments. *Ecology Letters* 8, 626–635. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00756.x
- Allison, S.D., Jastrow, J.D., 2006. Activities of extracellular enzymes in physically isolated fractions of restored grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry, Ecosystems in Flux: Molecular and stable isotope Assessments of Soil Organic Matter Storage and Dynamics Symposium: Ecosystems in Flux: Molecular and stable isotope Assessments of Soil Organic Matter Storage and Dynamics* 38, 3245–3256. doi:10.1016/j.soilbio.2006.04.011
- Burns, R.G., 1982. A. D. McLaren Memorial Issue Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14, 423–427. doi:10.1016/0038-0717(82)90099-2
- Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N., Zoppini, A., 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current

- knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry* 58, 216–234. doi:10.1016/j.soilbio.2012.11.009
- Burns, R.G., Dick, R.P., 2002. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*. CRC Press.
- Busto, M.D., Perez-Mateos, M., 2000. Characterization of β - d-glucosidase extracted from soil fractions. *European Journal of Soil Science* 51, 193–200. doi:10.1046/j.1365-2389.2000.00309.x
- Fontaine, S., Barot, S., Barré, P., Bdioui, N., Mary, B., Rumpel, C., 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450, 277–280. doi:10.1038/nature06275
- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L., 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry* 35, 837–843. doi:10.1016/S0038-0717(03)00123-8
- Kanazawa, S., Filip, Z., 1986. Distribution of microorganisms, total biomass, and enzyme activities in different particles of brown soil. *Microbial Ecology* 12, 205–215. doi:10.1007/BF02011205
- Kandeler, E., Palli, S., Stemmer, M., Gerzabek, M.H., 1999. Tillage changes microbial biomass and enzyme activities in particle-size fractions of a Haplic Chernozem. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1253–1264. doi:10.1016/S0038-0717(99)00041-3
- Kéralval, B., Lehours, A.C., Colombet, J., Amblard, C., Alvarez, G., Fontaine, S., 2016. Soil carbon dioxide emissions controlled by an extracellular oxidative metabolism identifiable by its isotope signature. *Biogeosciences Discussions* 1–25. doi:10.5194/bg-2015-399
- Maire, V., Alvarez, G., Colombet, J., Comby, A., Despinasse, R., Dubreucq, E., Joly, M., Lehours, A.-C., Perrier, V., Shahzad, T., Fontaine, S., 2013. An unknown oxidative metabolism substantially contributes to soil CO₂ emissions. *Biogeosciences* 10, 1155–1167. doi:10.5194/bg-10-1155-2013
- Marx, M.-C., Kandeler, E., Wood, M., Wermbter, N., Jarvis, S.C., 2005. Exploring the enzymatic landscape: distribution and kinetics of hydrolytic enzymes in soil particle-size fractions. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 35–48. doi:10.1016/j.soilbio.2004.05.024
- Nardi, S., Muscolo, A., Vaccaro, S., Baiano, S., Spaccini, R., Piccolo, A., 2007. Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 3138–3146. doi:10.1016/j.soilbio.2007.07.006
- Razavi, B.S., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2015. Nonlinear temperature sensitivity of enzyme kinetics explains canceling effect—a case study on loamy haplic Luvisol. *Frontiers in Microbiology* 6, 1126. doi:10.3389/fmicb.2015.01126
- Schimel, J.P., Weintraub, M.N., 2003. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 549–563. doi:10.1016/S0038-0717(03)00015-4
- Sinsabaugh, R.L., Hill, B.H., Follstad Shah, J.J., 2009. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature* 462, 795–798. doi:10.1038/nature08632
- Sinsabaugh, R.L., Moorhead, D.L., 1994. Resource allocation to extracellular enzyme production: A model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 1305–1311. doi:10.1016/0038-0717(94)90211-9
- Sinsabaugh, R.L., Shah, J.J.F., 2012. Ecoenzymatic Stoichiometry and Ecological Theory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43, 313–343. doi:10.1146/annurev-ecolsys-071112-124414
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., Deneff, K., 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research, Advances in Soil Structure Research* 79, 7–31. doi:10.1016/j.still.2004.03.008
- Six, J., Paustian, K., Elliott, E.T., Combrink, C., 2000. *Soil Structure and Organic Matter*. Soil Science

- Society of America Journal 64, 681. doi:10.2136/sssaj2000.642681x
- Stemmer, M., Gerzabek, M.H., Kandeler, E., 1998. Organic matter and enzyme activity in particle-size fractions of soils obtained after low-energy sonication. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 9–17. doi:10.1016/S0038-0717(97)00093-X
- Tietjen, T., Wetzel, R.G., 2003. Extracellular enzyme-clay mineral complexes: Enzyme adsorption, alteration of enzyme activity, and protection from photodegradation. *Aquatic Ecology* 37, 331–339. doi:10.1023/B:AECO.0000007044.52801.6b
- Vetter, Y.A., Deming, J.W., Jumars, P.A., Krieger-Brockett, B.B., 1998. A Predictive Model of Bacterial Foraging by Means of Freely Released Extracellular Enzymes. *Microbial Ecology* 36, 75–92. doi:10.1007/s002489900095
- Wieder, W.R., Bonan, G.B., Allison, S.D., 2013. Global soil carbon projections are improved by modelling microbial processes. *Nature Climate Change* 3, 909–912. doi:10.1038/nclimate1951

CHAPITRE V

DISCUSSION GENERALE

I- EXOMET : mythe ou réalité ?

Se heurtant au dogme plaçant la cellule comme unité minimale et essentielle à la réalisation des métabolismes oxydatifs, l'EXOMET soulève un certain nombre d'interrogations inhérentes à la complexité des cycles biochimiques et à la fragilité des enzymes intracellulaires. Comme toute nouvelle théorie, l'EXOMET a été accueillie avec une certaine réserve par la communauté scientifique, comme en témoigne les commentaires suscités par la première publication relative à ce processus (Maire *et al.*, 2012). Avant d'engager la discussion sur l'EXOMET, il me semble important de répondre à certaines interrogations légitimement et couramment formulées par la communauté scientifique.

(1) Le sol utilisé comme matrice est-il (réellement) stérile ?

Quelque soit la méthode de stérilisation utilisée (irradiation *gamma*, fumigation au chloroforme, autoclavage) (**Chapitre I - II.3.1**), il est de mon point de vue impossible d'affirmer qu'un sol est stérile. Le sol est une matrice tridimensionnelle complexe au sein de laquelle les interactions microorganismes/minéraux/MO sont multiples. Dans ce type d'interrogations, nous nous heurtons à la sensibilité des méthodes utilisées permettant la détection et/ou le dénombrement des microorganismes viables. Ainsi, je ne certifierais pas, qu'après irradiations, les sols étudiés ne contenaient aucune cellule active résiduelle, mais je peux affirmer que les approches méthodologiques mises en œuvre (CARD-FISH, extraction ADN et ARN, culture, MET) (Maire *et al.*, 2013 ; Kéroual *et al.*, 2016) n'ont pas permis de détecter des cellules viables et/ou actives dans nos échantillons. Je peux aussi affirmer, selon les données de la littérature et celles obtenues durant cette thèse (Kéroual *et al.*, 2016), que la discrimination isotopique (du ^{12}C et du ^{13}C) soutenue par des métabolismes issus de sols stériles et ceux issus de microorganismes hétérotrophes cultivés (Blair *et al.*, 1991) sont significativement différentes.

(2) EXOMET ou respiration fantôme ?

Il pourrait être postulé que des « fantômes cellulaires » incapables de biosynthèse mais dont l'enveloppe membranaire intacte abriterait des endoenzymes toujours fonctionnelles seraient à l'origine des émissions de CO_2 observées dans des sols stérilisés (Lensi *et al.*, 1991). Un argument opposable est que l'internalisation du carbone organique, afin de le rendre accessible aux enzymes intracellulaires, implique un mécanisme de transport (facilité et/ou actif) et donc un maintien de l'activité cellulaire. La perte de l'intégrité membranaire des cellules suite à l'irradiation, notée par Maire *et al.* (2013), incite également à réfuter cette hypothèse.

Cependant, bien que difficilement soutenable, l'hypothèse de la respiration fantôme restait, suite aux travaux de Maire *et al.* (2012, 2013) une alternative plus aisément acceptable par la communauté scientifique (Maire *et al.*, 2012). Impliquant une compartimentation cellulaire du métabolisme, la respiration fantôme ne remet, en effet, pas en question le rôle clé de la cellule dans l'expression des métabolismes. Aussi, dans le cadre de cette thèse et afin de s'affranchir de l'hypothèse de la respiration fantôme, nous avons (i) appliqué des procédures de stérilisation drastiques couplant un traitement par irradiation et un autoclavage et (ii) développé un protocole permettant d'observer directement des coupes tangentielles ultrafines de sections de sol, par microscopie électronique à transmission, afin d'éviter les biais (*e.g.*, élution incomplète) liés à la remise en suspension des microorganismes du sol (Kéroual *et al.*, 2016, **Chapitre II**). Le couplage de ces approches a permis de mettre en évidence qu'aucune cellule intacte n'était observable après le traitement stérilisant appliqué. Ceci a fourni des arguments suffisamment robustes, pour nous convaincre, ainsi que les relecteurs et éditeurs de la publication (Kéroual *et al.*, 2016), que les émissions CO₂ observées dans des sols stérilisés n'étaient pas le fait de cellules fantômes.

(3) EXOMET : un processus purement physico-chimique ?

En dépit du rôle protecteur que la matrice sol exerce sur les enzymes, ces résultats se confrontent à un des fondamentaux de la Biologie, à savoir la dénaturation thermique des protéines. Aussi, un questionnement, à nouveau plus que légitime, est implicite : l'EXOMET n'est-il pas « simplement » la résultante de processus purement abiotiques ?

Des processus physiques peuvent-ils altérer la matière organique à un niveau tel que cette dernière atteigne son degré d'oxydation maximal (CO₂) ?

La littérature et les échanges que j'ai pu avoir avec les collaborateurs de ce projet m'orientent à penser qu'aucune composante purement physique ne peut expliquer l'EXOMET. Si la thermolyse peut conduire à la production de gaz à partir de matière organique, les conditions nécessaires à la dissociation chimique des molécules (T°C > 500°C, condition sub-oxique, déshydratation) sont bien loin de celles utilisées dans les expérimentations conduites sur l'EXOMET (Maire *et al.*, 2013, **cf. Chapitre II et III**).

Peut-on également s'affranchir du système des carbonates pour expliquer les émissions de CO₂ ?

Les carbonates peuvent, en effet, représenter une fraction substantielle du carbone inorganique dans le sol (Adams & Post, 1999). Si la proportion de CO₂ issue des carbonates et émise par les sols peut être importante (Ramnarine *et al.*, 2012), cette composante ne pouvait pas expliquer les émissions de CO₂ observées dans les conditions expérimentales de Maire *et al.* (2013) et celles présentées dans le **chapitre II** de ce manuscrit (Kéroual *et al.*, 2016). Les arguments principaux soutenant cette affirmation sont : (i) le pH (= 6.2) du sol utilisé n'est pas favorable à la dissolution des carbonates,

(ii) une consommation d'O₂ concomitante à la production de CO₂ (quotient respiratoire ≈ 1) a été observée, (iii) la minéralisation du glucose marqué au ¹³C dans le sol stérilisé.

Un mécanisme lié à la catalyse minérale pourrait-il être envisagé ?

Je dois reconnaître que ce point est le plus délicat à appréhender. Les minéraux, les argiles, par exemple, sont connus pour leur capacité à adsorber des molécules organiques et à catalyser leur oligomérisation (Hashizume, 2012). Il a également été rapporté, dans la littérature, la capacité des argiles à catalyser des réactions de décarboxylation conférant à ces particules une fonction similaire à certaines métallo-enzymes biologiques (Naidja & Siffert, 1990). Si nous acceptons l'idée que la catalyse minérale, seule, est responsable des émissions de ¹³C-CO₂ issues de l'oxydation du ¹³C-glucose (Maire *et al.*, 2013 ; Kéroual *et al.*, 2016), nous nous devons d'accepter l'idée qu'un ensemble de réactions catalytiques en chaîne, similaire ou non de celles se réalisant dans la glycolyse et le cycle de Krebs se réalise *via* une catalyse purement minérale. Pourquoi pas ? Mais, le cas échéant, un système dans lequel les minéraux ou les complexes organo-minéraux sont absents ne devrait pas conduire à des émissions de CO₂. Or, en 2013, Maire et ses collaborateurs ont montré que des émissions de CO₂, certes non persistantes, étaient observées lors de l'ajout d'enzymes intracellulaires allochtones (*i.e.*, extrait de levure) dans de l'eau (Maire *et al.*, 2013).

Ne pas retenir l'hypothèse d'une catalyse purement minérale, n'implique pas que je ne considère pas que les minéraux puissent contribuer à l'EXOMET (Kéroual *et al.*, 2016). Ce point de vue est par ailleurs partagé par la communauté scientifique comme en témoignent les commentaires dans *Biogeoscience Discussion* suscités lors de la publication de l'article « *Soil carbon dioxide emissions controlled by an extracellular oxidative metabolism identifiable by its isotope signature* » (Kéroual *et al.*, 2016). Nous avons donc élargi la définition de l'EXOMET, proposée initialement par Maire *et al.* (2013), en y intégrant le rôle des catalyseurs minéraux. Ainsi nous suggérons que l'EXOMET serait « une cascade de réactions chimiques catalysées par des enzymes respiratoires immobilisées par des particules du sol et par des catalyseurs minéraux et métalliques transférant les électrons de la MO au dioxygène *via* des intermédiaires redox (*e.g.*, NAD⁺/NADH, Mn³⁺/Mn²⁺) » (Kéroual *et al.*, 2016).

II- EXOMET et flux de C dans les sols

Si à l'heure actuelle, un travail conséquent reste à mener pour établir la contribution d'EXOMET à la minéralisation du SOC et au flux de CO₂ des écosystèmes terrestres, les études, de Maire *et al.* (2013) et celles présentées dans ce manuscrit (cf. **Chapitres II et III**), soulignent que l'universalité de ce processus (**Chapitre III**) pourrait conduire à revoir les bases conceptuelles de la minéralisation de la MO des sols et les modèles de flux de C dans ces écosystèmes. En effet, considérer l'EXOMET implique d'admettre l'existence (i) d'une troisième voie de libération de CO₂ dans l'atmosphère, autre que la respiration autotrophe et hétérotrophe et (ii) de flux de matière, encore non considérés,

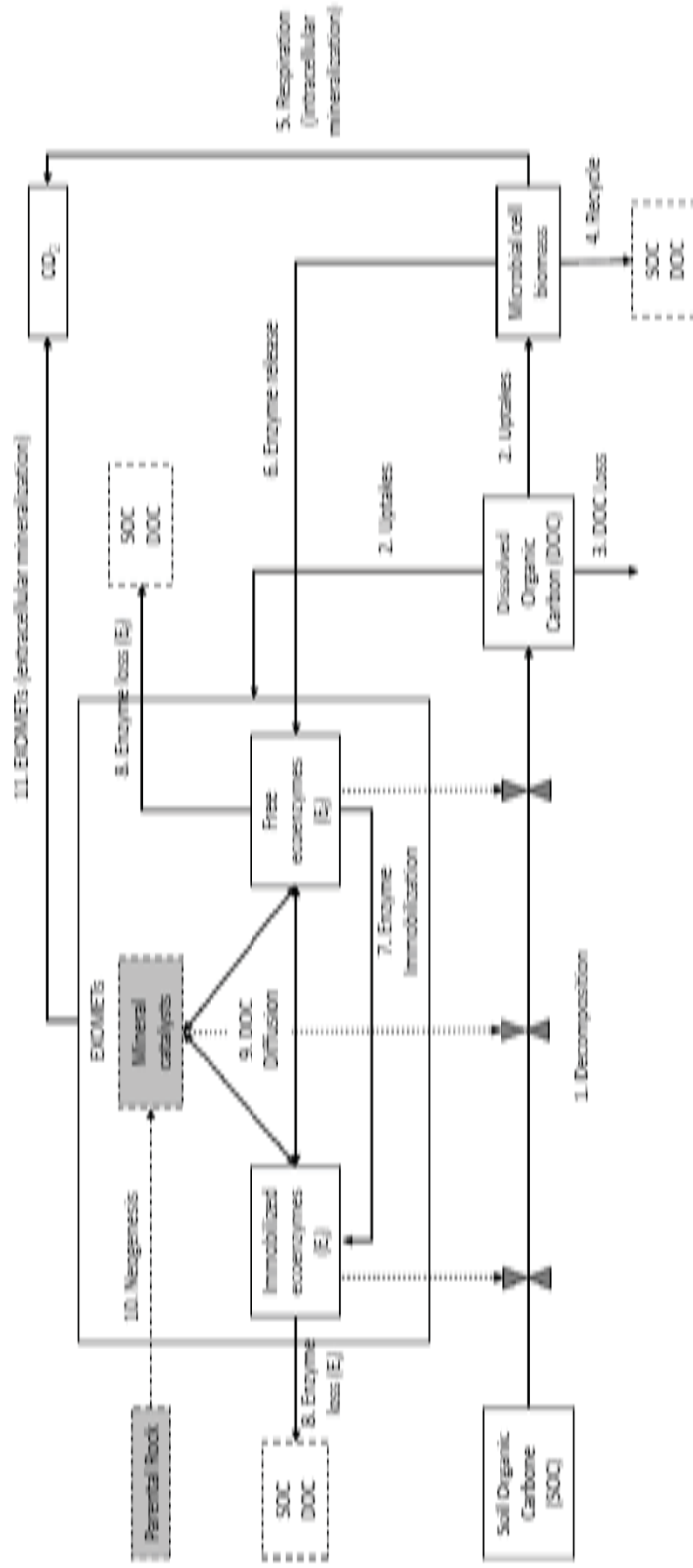


Figure 2: Modèle théorique simulant la minéralisation de la SOM par la biomasse microbienne et par l'EXOMET. (1) Décomposition par les catalyseurs organo-minéraux du sol (ex. écoenzymes et oxydes métalliques) de la SOM non bio-assimilable en substrats bio-assimilables. (2) Flux de DOC assimilés par la biomasse microbienne et par l'EXOMET. (3) Perte de DOC (e.g. par lessivage). (4) Conversion de la biomasse microbienne en MOS ou en CO₂ (e.g. après mort cellulaire). (5) Minéralisation du CO₂ en CO₂ par le métabolisme respiratoire intracellulaire des organismes hétérotrophes. (6) Libération d'écoenzymes par la biomasse microbienne (e.g. par leur estréon ou suite à la lyse des cellules microbiennes). (7) Processus d'immobilisation des écoenzymes sur les particules organo-minérales du sol. (8) Perte d'écoenzymes libres dans la solution de sol et liées aux particules organo-minérales du sol. (9) Diffusion des molécules carbonées dissoutes entre les différents catalyseurs organo-minéraux supportant l'activité d'EXOMET. (10) Processus de transformation de la roche parentale en catalyseurs minéraux potentiellement impliqués dans l'EXOMET. (11) Processus de minéralisation de la matière organique en CO₂ par les EXOMET. Les flèches en pointillés liées à des vannes grises indiquent que les catalyseurs organo-minéraux impliqués dans l'EXOMET régulent aussi, en partie, la décomposition de la matière organique du sol en matière organique dissoute.

pouvant conduire à réévaluer la paramétrisation de modèles simulant les flux de C dans le sol et son transfert vers l'atmosphère.

Même si la mise en exergue d'EXOMET suggère une dichotomie des processus de la minéralisation de la MO des sols, elle n'en réconcilie pas moins deux écoles de pensées. En effet, la minéralisation de la SOM est considérée, selon les visions, comme principalement régulée (i) par la taille, l'activité spécifique et la composition de la communauté microbienne (Marschner and Kalbitz, 2003; Fontaine and Barot, 2005) ou (ii) par des processus abiotiques (Kemmitt et al., 2008). La mise en évidence des EXOMETs permet de proposer une vision fédératrice des flux de matière dans le sol dans laquelle la minéralisation de la matière organique est régulée par (i) la taille, l'activité spécifique et la composition des communautés microbiennes, (ii) le renouvellement et l'activité d'écoenzymes issues des communautés microbiennes du sol, (iii) la néogénèse de minéraux argileux et d'oxydes métalliques, (iv) l'activité spécifique de catalyseurs organo-minéraux (v) la disponibilité des substrats pour les cellules microbiennes et pour les différents catalyseurs extracellulaires du sol (**Fig. 1**).

Comme précédemment observé par Maire *et al.* (2013), les résultats acquis au cours de cette thèse montrent que l'EXOMET (i) restent actifs même après avoir été soumis à des conditions (*i.e.*, stress thermique, chimique, irradiations) réduisant la vie cellulaire à des niveaux indétectables et (ii) sont régulés par des lois physicochimiques différentes de celles du métabolisme cellulaire (**cf. Chapitre II**). En conséquence les métabolismes cellulaires et l'EXOMET devront être considérés indépendamment dans les modèles de la minéralisation du SOC. Il apparaît également que l'EXOMET puisse présenter une dynamique spatiotemporelle (**cf. Chapitre III**). En effet, les études conduites au cours de cette thèse ont révélé l'importance du carbone organique dissout (COD) dans la régulation de l'expression relative de l'EXOMET (**cf. Chapitre III**). Si les données supportant que l'EXOMET court-circuite efficacement le COD sont confirmées par des études subséquentes sur des sols vivants, une telle conclusion pourrait avoir des implications majeures sur les flux de C au sein d'environnements riches en COD (e.g., rhizosphère) ou soumis à des fluctuations climatiques.

(1) EXOMET et rhizosphère

La rhizosphère est un environnement renfermant des réserves importantes de COD. Entre 15 et 40% du C fixé par la photosynthèse des plantes sont libérés dans le sol *via* la rhizo-déposition (Kuzyakov & Domanski, 2000 ; Hutsch *et al.*, 2002). Majoritairement constitués de carbohydrates (Hutsch *et al.*, 2002 ; Derrien *et al.*, 2006), les rhizo-dépôts constituent ainsi une source de C disponible aisément métabolisable par les microorganismes et l'EXOMET. Ceci explique que 64 à 86% du C issu des exsudats racinaires soit minéralisés en CO₂ (Werth & Kuzyakov, 2008). Du fait de l'absence de paroi

cellulaire, les métabolites impliqués dans l'EXOMET devraient être plus sujets au lessivage que ceux impliqués dans la minéralisation cellulaire. Les pertes de nutriments vers les strates inférieures du sol *via* l'EXOMET devraient ainsi, en

théorie, limiter leur disponibilité pour les plantes. La déviation préférentielle du COD vers l'EXOMET pourrait donc avoir une influence négative sur le développement des plantes relativement aux concentrations de COD du sol.

(3) EXOMET et changement climatique

Les modèles de prédiction du climat prévoient une augmentation des périodes d'assèchement des sols et l'intensification d'évènements extrêmes de pluviométrie. Or, de façon combinée, ces évènements (i) provoquent une altération du potentiel hydrique du sol en créant des stress osmotiques importants induisant la lyse partielle de la biomasse microbienne du sol (Turner *et al.*, 2003) et (ii) favorisent la rupture des micro- et des macro-agrégats du sol induisant une libération de COD initialement piégé au sein de ces agrégats (Miller *et al.*, 2005). Après ré-humectation des sols, il est communément observé une libération importante du CO₂ non corrélée à la diminution de la taille de la biomasse microbienne du sol (Fiere & Schimel, 2003 ; Gordon *et al.*, 2008). Ceci pourrait s'expliquer par (i) une disponibilité en substrats plus importante pour les microorganismes après réhumectation et (ii) une stimulation de l'expression de l'EXOMET (*e.g.*, libération d'écoenzymes *via* la lyse microbienne, augmentation des concentrations en COD). Extrapolés à l'échelle globale, ces phénomènes pourraient avoir des conséquences importantes sur la contribution relative de l'EXOMET dans la minéralisation de la SOM.

III- EXOMET : Perspectives

L'étude de l'EXOMET ouvre de nombreuses perspectives de recherches fondamentales et appliquées ne pouvant pas toutes être référencées dans ce manuscrit. Ces deux domaines de recherche sont étroitement liés, en témoigne le dépôt d'un brevet suite aux données acquises sur l'EXOMET dans le cadre de cette thèse. Néanmoins, j'axerai cette section autour de 4 projets de recherche « fondamentale » que je considère comme prioritaires afin d'approfondir nos connaissances sur l'EXOMET et leurs implications potentielles sur les cycles biogéochimiques globaux.

III.1- Mécanismes sous-tendant l'EXOMET

Le modèle que nous avons élaboré permettant de simuler l'inactivation des écoenzymes potentiellement impliquées dans l'EXOMET (la MDH et la G6Pd) dans un sol (Kéroual *et al.*, **chapitre IV**) montre que leur temps moyen de résidence est inférieur à 25

jours. Comment, dès lors, expliquer que des émissions significatives de CO₂ persistent de 30 jours à plusieurs années dans des sols dont la biomasse microbienne et les activités des écoenzymes ont été réduites à des seuils indétectables ? En effet, nous avons pu montrer dans l'étude présentée dans le **chapitre II** de ce manuscrit que la minéralisation du glucose dans des sols stérilisés par irradiations gamma est observée pendant plus de 30 jours (Kéroual *et al.*, 2016). Maire *et al.* (2013) ont également démontré que cette dernière pouvait être > 50 jours dans des sols stérilisés amendés en enzymes allochtones (*i.e.*, extraits cellulaires de levure). De plus, des résultats, récemment obtenus, montrent des émissions significatives de ¹³C-CO₂ sur des périodes supérieures à trois ans par des sols stérilisés, supplémentés ou non d'un extrait d'enzymes mitochondriales et d'une solution de ¹³C₆-glucose (données non présentées dans ce manuscrit).

Deux principales hypothèses peuvent être formulées : (i) les écoenzymes maintiennent des niveaux d'activités suffisants pouvant expliquer les flux de CO₂ mais ne pouvant être détecté ou quantifié par les méthodes développées durant cette thèse, (ii) l'EXOMET organise des cascades métaboliques, qui bien qu'aboutissant à la consommation d'O₂ et à la production de CO₂, sont très différentes de celles pouvant être rencontrées dans le contexte respiratoire cellulaire.

Afin de tester ces hypothèses, l'étude du métabolome de sols stériles supplémentés ou non en enzymes mitochondriales semble être une approche pertinente. Une approche de métabolomique permettant l'analyse comparative de profils métaboliques devrait permettre l'identification des métabolites présents dans les extraits de sol par une approche de Résonance Magnétique Nucléaire et de Chromatographie Liquide couplée à de la Spectrométrie de Masse (Metabolic Profiler, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, UMR-CNRS 6296). Ce projet est d'ores et déjà initié en collaboration avec l'UMR-CNRS 6296. Le sol présentant un *continuum* de molécules biochimiques très diversifiées masquant les signaux des molécules cibles, les premières étapes de ce projet ont visé à établir des protocoles fiables et optimaux d'extraction et de purification des métabolites ciblés (*e.g.*, choix du solvant et de la température d'extraction, utilisation d'une ultrafiltration sur les extraits de sol, *etc.*, données non présentées). La phase d'analyse du métabolome devrait débuter en octobre 2016, et visera à déterminer si, dans la matrice sol, des métabolismes complexes (*e.g.* cycle des acides tricarboxyliques : ATC) peuvent s'établir dans un contexte extracellulaire. Elle sera réalisée comme suit : (1) obtention d'une matrice sol biologiquement inactive, (2) extraction et purification d'enzymes mitochondriales de levure (*Saccharomyces cerevisiae*), (3) incorporation et incubation des enzymes mitochondriales extraites, de ¹³C-Citrate (intermédiaire du cycle ATC) et de cofacteurs (*e.g.* NAD⁺, FAD⁺, Coenzyme A, GDP) dans la matrice sol biologiquement inerte, (4) mesure des activités enzymatiques des décarboxylases du cycle ATC (isocitrate déhydrogénase, malate déhydrogénase), et analyse de la composition isotopique du CO₂ émis, (5) étude du métabolome afin de déterminer si le cycle ATC est reconstitué dans la matrice sol stérile (si oui, l'est-il intégralement ou partiellement ?).

III.2- Quantifier la contribution relative de l'EXOMET aux flux de C dans des sols vivants

Si l'irradiation reste la méthode la plus adaptée pour séparer les métabolismes intracellulaires et l'EXOMET, tout en minimisant l'impact sur la physique et la chimie du sol, cette méthode ne permet pas de quantifier la contribution absolue et relative de l'EXOMET dans la minéralisation de la SOM.

Les principales raisons en sont que :

- (i) la réduction de la vie à des niveaux indétectables (par les méthodes analytiques utilisées dans nos études), par les irradiations, supprime la compétition pour les substrats entre les métabolismes intra- et extra- cellulaires,
- (ii) la libération d'enzymes intracellulaires, potentiellement impliquées dans l'EXOMET, induite lors de la lyse de la biomasse microbienne par les irradiations, entraîne une surestimation de l'importance de l'EXOMET,
- (iii) la libération de DOC par la lyse de la biomasse microbienne provoque une déviation préférentielle du DOC vers l'EXOMET induisant une surestimation de l'importance de l'EXOMET,
- (iv) les irradiations peuvent induire ou réprimer l'expression de catalyseurs organo-minéraux, encore méconnus, impliqués dans l'EXOMET ayant pour conséquence une sur- ou une sous- estimation de l'expression de l'EXOMET.

Les estimations de la contribution de l'EXOMET aux émissions de CO₂ par les sols, réalisées par Maire *et al.* (2013) et dans le cadre de cette thèse (**Chapitre III**), sont dans des proportions relativement similaires. Néanmoins, je n'en demeure pas moins persuadé que ces estimations doivent être confirmées et évaluées par une approche non biaisée. Le fractionnement isotopique induit par l'EXOMET nous a permis de développer un modèle massique isotopique (Kéroual *et al.*, 2016) ouvrant des perspectives quant à la possibilité de quantifier simultanément l'importance relative de la respiration hétérotrophe et de l'EXOMET dans des sols vivants (Kéroual *et al.*, 2016). Tester ce modèle, en conditions expérimentales et étendre secondairement ces études à l'échelle écosystémique est donc une perspective importante dans la poursuite des recherches sur l'EXOMET.

III.3- Réponse des EXOMETs face au changement climatique : importance de la température et de l'humidité des sols

La température (*e.g.* Schimel 1995; Schlesinger & Andrews 2000) et la teneur en eau des sols (*e.g.*, Davidson *et al.*, 1998) représentent les principaux facteurs abiotiques régulant la minéralisation de la SOM. Les modèles d'évolution du climat prévoient (i) que la température moyenne de la surface de la Terre devrait augmenter de 1.1 à 6.4°C pour la fin du siècle (Solomon *et al.*, 2009) et (ii) des altérations importantes des motifs des événements de précipitations (Trenberth, 1999). En conséquence, les périodes de sécheresses et les événements de précipitations extrêmes devraient être plus fréquents (Mearns *et al.*, 1995 ; Easterling *et al.*, 2000). Or, durant les périodes d'assèchement, le contenu en eau du sol diminue et les couches d'eau des pores du sol deviennent de plus en plus discontinues (**Fig. 2**). Il a aussi été montré que les activités enzymatiques et microbiennes diminuent avec l'assèchement du sol (Or *et al.*, 2007) et cessent quand le potentiel hydrique devient extrêmement faible (Cook et Orchard, 2008 ; Schimel *et al.*, 1999).

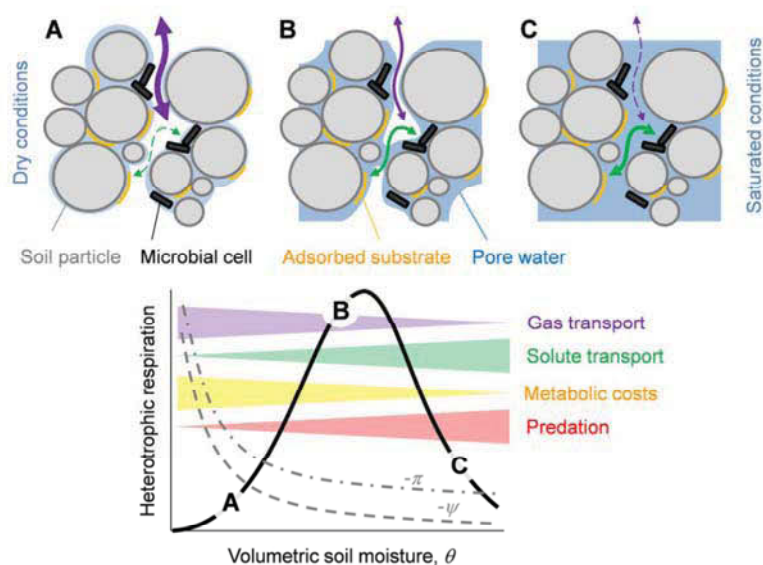


Figure 2 : Illustration schématique des effets de l'humidité sur l'activité microbienne du sol. La relation établie entre la respiration des organismes hétérotrophes et la disponibilité en eau est le résultat macroscopique de nombreux effets en interactions. Ψ représente le potentiel hydrique du sol et π le potentiel osmotique des cellules (Moyano *et al.*, 2013).

En outre, ces variables climatiques vont aussi influencer (i) la morphologie, la physiologie et la biochimie des plantes (McDowell *et al.*, 2013 ; Osakabe *et al.*, 2014), (ii) l'activité photosynthétique (Frank *et al.*, 2015), (iii) la quantité et la qualité des apports en molécules organiques dans les sols (Sanaullah *et al.*, 2014).

L'effet des variables température et humidité et leur effet combiné sur la minéralisation de la SOM par la biomasse microbienne et l'EXOMET doivent ainsi être estimés par une approche expérimentale en microcosmes sur des sols vivants (non calcaires) soumis à différentes conditions de températures et de potentiels hydriques. L'application du modèle massique isotopique (**cf. Chapitre II**) nous permettra d'estimer la contribution absolue et relative des deux métabolismes aux émissions de CO₂ dans l'atmosphère. Il sera également nécessaire d'intégrer dans les futures études les producteurs primaires (*i.e.*, biomasse végétale) au sein de mésocosmes expérimentaux en conditions contrôlées. Ce projet pourrait être le fruit d'une collaboration engageant nos équipes clermontoises, spécialisées sur l'étude de l'EXOMET (UR-INRA-UREP et UMR-CNRS-LMGE), et l'institut d'Ecologie de l'Université d'Innsbruck (Autriche) dont les recherches visent à appréhender l'impact d'évènements extrêmes sur les sols et les cycles biogéochimiques des éléments.

III.4- L'EXOMET contribue-t-il à la minéralisation de la MO dans d'autres écosystèmes et concerne-t-il d'autres métabolismes ?

L'EXOMET, comme nous l'avons vu précédemment, se heurte au dogme considérant la cellule comme unité minimale et nécessaire pour l'accomplissement des métabolismes respiratoires. Dans le cadre des travaux conduits au cours de cette thèse, nous avons pu mettre en évidence l'universalité de l'EXOMET, réalisant des réactions catalytiques analogues à la glycolyse et au cycle de Krebs dans les sols (**cf. Chapitres II et III**). Déterminer si l'EXOMET se réalise dans d'autres écosystèmes et peut être effectif pour d'autres métabolismes respiratoires aurait des implications quant (i) aux cycles biogéochimiques globaux et (ii) aux mécanismes ayant permis l'émergence de la Vie sur notre planète.

(1) Extension de l'étude de l'EXOMET à d'autres écosystèmes et métabolismes

Considérant les données dont nous disposons actuellement, il apparaît pragmatique de concentrer ces études (i) sur des écosystèmes dont les caractéristiques peuvent être favorables au maintien des activités écoenzymatiques, (ii) à des métabolismes impliquant des substrats facilement traçables par des approches isotopiques, (iii) à des voies cataboliques produisant des métabolites impactant significativement le budget global du C. Dans ce cadre, l'étude de l'EXOMET pourrait être étendue à la méthanogénèse (*i.e.*, production biologique de CH₄) dans des environnements sédimentaires lacustres. En effet :

- en raison de leur structure tridimensionnelle et de leur composition organo-minérale, les environnements sédimentaires semblent présenter les propriétés requises pour la stabilisation des enzymes,
- les sédiments lacustres sont le siège d'une méthanogénèse intense représentant 30 à 80% de la minéralisation anaérobie de la MO (Kuivila *et al.*, 1989; Bédard et Knowle, 1991).

La méthanogénèse est une voie métabolique uniquement réalisée par certains groupes d'*Archaea* anaérobies spécialisées dans l'utilisation d'un nombre restreint de substrats à 1 ou 2 atomes de C (**Fig. 3**),

- le forçage radiatif associé au CH₄ est le deuxième plus important après le CO₂ et contribuerait à environ 30 % du forçage radiatif total (Forster *et al.*, 2007). Bien que ne représentant que 0,9 % de la surface de la planète, les écosystèmes lacustres sont responsables de 6 à 16 % des émissions de CH₄ dans l'atmosphère (Bastviken *et al.*, 2004).





PATHWAYS	SUBSTRATES	REACTION	THERMODYNAMICS
ACETOTROPHIC	 Acetate	Acetate → CH ₄ + H ₂ O	ΔG° = -31 kJ/mol CH ₄
METHYLOTROPHIC	 Methylated-compounds  Methanol	H ₂ + Methanol → CH ₄ + H ₂ O	ΔG° = -112 kJ/mol CH ₄
HYDROGENOTROPHIC	 H ₂ /CO ₂ Formate	4H ₂ + CO ₂ → CH ₄ + 2H ₂ O	ΔG° = -135 kJ/mol CH ₄

Figure 3 : Présentation synthétique des différentes voies de la méthanogénèse, des substrats utilisés et de l'enthalpie libre des réactions.

Ces études pourront être entreprises sur les sédiments profonds du lac Pavin. En effet, des concentrations importantes en CH₄ sont notées dans les strates sédimentaires profondes de ce lac et, l'acétate (**Fig. 3**) a été identifié comme le précurseur très majoritaire de ce métabolite dans cet environnement (Lehours *et al.*, 2007). Pourtant, l'absence de corrélation entre les concentrations en CH₄ et les densités et l'activité des *Archaea* acétotrophes productrices de CH₄ dans cet environnement soulève un certain nombre d'interrogations (Borrel *et al.*, 2012). Aussi, les hypothèses suivantes peuvent être formulées : (i) le CH₄ est produit par l'activité de méthanogènes encore non identifiées, (ii) le CH₄ résulte des activités passées de méthanogènes et la faible diffusion de ce gaz conduit à son accumulation dans les strates profondes, (iii) le CH₄ résulte d'une expression substantielle d'EXOMETs mimant les voies cataboliques de la méthanogénèse.

Concernant cette dernière hypothèse, et sur la base de l'expérience et des procédures expérimentales maîtrisées par le LMGE et l'UREP, des échantillons de sédiments pourront être collectés, irradiés et incubés en conditions anoxiques. Le suivi de la production de CH₄ sera réalisé suite à l'addition de ¹³C-acétate dans les microcosmes expérimentaux. Si les résultats valident l'hypothèse de l'EXOMET, il pourra être envisagé l'étude du métabolome en se basant sur l'expérience acquise et les collaborations développées lors de l'étude du métabolome des sols irradiés (**cf. Discussion Générale - Partie III.1**).

(2) EXOMET et origine de la Vie

Dans les publications de Maire *et al.* (2013) et celle présentée dans le **chapitre II** de ce manuscrit (Kéraval *et al.*, 2016), il est fait référence à l'implication de l'EXOMET quant aux théories sur l'origine de la Vie. Il existe, à l'heure actuelle, des dizaines de modèles théoriques voulant expliquer les processus ayant permis l'émergence de la Vie sur Terre. Ce constat est le reflet de notre incapacité à établir un scénario unique et consensuel permettant d'expliquer l'origine du vivant. Les études conduites sur l'EXOMET, qui mettent en évidence des voies biochimiques complexes similaires aux voies énergétiques empruntées par la Vie, supportent l'hypothèse selon laquelle les premiers métabolismes ont pu se dérouler avant la compartimentation cellulaire. Si les futures études permettent (i) de transposer l'ubiquité de l'EXOMET observée dans les sols (**Chapitre III**) à d'autres écosystèmes et (ii) peuvent étendre son implication à d'autres métabolismes, comme la méthanogénèse qui est l'un des métabolismes les plus primitifs apparus sur Terre (Kasting & Siefert, 2002), les théories sur l'origine de la Vie devront peut-être intégrer l'EXOMET dans les mécanismes potentiels ayant permis l'émergence de la Vie sur notre planète.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Adams JM, Post WM (1999) A preliminary estimate of changing calcrete carbon storage on land since the last Glacial Maximum. *Global and Planetary Change* 20: 243-256.
- Adams, J. M. and Post, W. M.: A preliminary estimate of changing calcrete carbon storage on land since the Last Glacial Maximum, *Global and Planetary Change*, 20(4), 243-256, doi:10.1016/S0921-8181(99)00015-6, 1999.
- Ågren GI, Bosatta E (2002) Reconciling differences in predictions of temperature response of soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 34:129-132.
- Allison SD (2005) Cheaters, diffusion and nutrients constrain decomposition by microbial enzymes in spatially structured environments. *Ecology Letters* 8: 626-635.
- Allison SD, Gartner T, Holland K, Weintraub M, Sinsabaugh R (2007) Soil enzymes: linking proteomics and ecological processes. In: Hurst, C., Crawford, R., Garland, J., Lipson, D., Mills, A., Stetzenbach, L. (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*, third ed. ASM, Washington DC, USA, pp. 704-711.
- Allison SD, Jastrow JD (2006) Activities of extracellular enzymes in physically isolated fractions of restored grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry* 38 : 3245-3256.
- Allison SD, Martiny JBH (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 11512-11519.
- Allison SD, Weintraub MN, Gartner TB, Waldrop MP (2011) Evolutionary economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function. In: Shukla, G., Varma, A. (Eds.), *Soil Enzymology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 229-243.
- Allison VJ, Condron LM, Peltzer DA, Richardson SJ, Turner BL (2007b) Changes in enzyme activities and soil microbial community composition along carbon and nutrient gradients at the Franz Josef chronosequence, New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 1770-1781.
- Alphei J, Scheu S (1993) Effects of biocidal treatments on biological and nutritional properties of a mull-structured woodland soil *Geoderma* 56: 435-448.
- Amelung W, Brodowski S, Sandhage-Hofmann A, Bol R (2008) Combining biomarker with stable isotope analyses for assessing the transformation and turnover of soil organic matter. *Advances in Agronomy* 100 : 155-250.
- Aneja MK, Sharma S, Munch JC, Schloter M (2004) RNA fingerprinting -a new method to screen for differences in plant litter degrading microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 59: 223-231.
- Anesio AM, Tranvik LJ, Graneli W (1999) Production of inorganic carbon from aquatic macrophytes by solar radiation. *Ecology*: 80, 1852-1859.
- Angel R, Claus P, Conrad R (2012) Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *The ISME Journal* 6: 847-862.
- Arunachalam G, Oblisami G, Rangaswami G (1974) Effect of gamma radiation on certain microbial and chemical properties of two soil types. *The Madras Agricultural Journal* 61: 992-996.
- Attiwill PM, Adams MA (1993) Nutrient cycling in forests. *New Phytologist* 124:561-582.
- Aufdenkampe AK, Mayorga E, Raymond P, Melack JM, Doney SC, Alin S, Aalto R, Yoo K (2011) Riverine coupling biogeochemical cycles between land, oceans and atmosphere, *Frontiers in Ecology and Environment* 9:53-60
- Austin AT, Vivanco L (2006) Plant litter decomposition in a semi-arid ecosystem controlled by photodegradation. *Nature* 442:555-558.

B

- Babalola OO (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters* 32: 1559-1570.
- Badri DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 642-650.
- Baldock J, Currie G, Oades J (1991) Organic matter as seen by solid state ¹³C NMR and pyrolysis tandem mass spectrometry. In: *Advances in Soil Organic Matter Research: The Impact on Agriculture and the Environment*, (ed Wilson WS) pp. 45-60. The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Baldock JA, Skjemstad JO (1999) Soil organic carbon /Soil organic matter. In Peverill, KI, Sparrow, LA and Reuter, DJ (eds). *Soil Analysis - an interpretation manual*. CSIRO Publishing Collingwood Australia.
- Baldrian P (2006) Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215-242.
- Baldrian P (2009) Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil and Environment*. 55:370-378.
- Baldrian P (2014) Distribution of extracellular enzymes in soils: spatial heterogeneity and determining factors at various scales. *Soil Science Society of America Journal* 78: 11-18.
- Baldrian P, Kolařík M, Stursová M, Kopecký J, Valášková V, Větrovský T, Zifčáková L, Šnajdr J, Rídl J, Vlček C, Voříšková J (2012) Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *The ISME journal* 6: 248-258.
- Baldrian P, Šnajdr J (2011) Lignocellulose-degrading enzymes in soils. In: G. Shukla and A. Varma, editors, *Soil enzymology*. Springer-Verlag, Berlin. p. 167-186.
- Baldrian P, Valášková V (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Review* 32:501-521.
- Barnard AML, Salmond GPC (2007) Quorum sensing in *Erwinia* species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 415-423.
- Bastviken, D., Cole, J., Pace, M. and Tranvik, L.: Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate, *Global Biogeochem. Cycles*, 18(4), GB4009, doi:10.1029/2004GB002238, 2004.
- Batjes NH (1996) Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *European Journal of Soil Science* 47: 151-163.
- Battin TJ, Luysaert S, Kaplan LA, Aufdenkampe AK, Richter A, Tranvik LJ (2009) The boundless carbon cycle. *Nature Geosciences* 2: 598-600.
- Baumann K, Marschner P, Kuhn TK, Smernik RJ, Baldock JA (2011) Microbial community structure and residue chemistry during decomposition of shoots and roots of young and mature wheat (*Triticum aestivum* L.) in sand. *European Journal of Soil Science* 62: 666-675.
- Bayer EA, Lamed R, White BA, Flint HJ (2008) From cellulosomes to cellulosomes. *Chemical Record* 8: 364-377.
- Beaulieu E, Godderis Y, Donnadieu Y, Labat D, Roelandt C (2012) High sensitivity of the continental-weathering carbon dioxide sink to future climate change. *Nature Climate Change* 2:346-349.
- Bédard, C. and Knowles, R.: Hypolimnetic O₂ Consumption, Denitrification, and Methanogenesis in a Thermally Stratified Lake, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48(6), 1048-1054, doi:10.1139/f91-123, 1991.
- Beer C, Reichstein M, Tomelleri E, Ciais P, Jung M, Carvalhais N, Rödenbeck C, Arain A, Baldocchi D, Bonan GB, Bondeau A, Cescatti A, Lasslop G, Lindroth A, Lomas M, Luysaert S, Margolis H, Oleson KW, Rouspard O, Veernendaal E, Viovy N, Williams C, Woodward FI,

- Papale D (2010) Terrestrial gross carbon dioxide uptake: Global distribution and covariation with climate. *Science* 329:834–838.
- Berger S, Jang I, Seo J, Kang H, Gebauer G (2013) A record of N₂O and CH₄ emissions and underlying soil processes of Korean rice paddies as affected by different water management practices. *Biogeochemistry* 115: 317–332.
- Berns AE, Philipp H, Narres HD, Burauel P, Vereecken H, Tappe W (2008) Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy. *European Journal of Soil Science* 59: 540–550.
- Bertrand I, Delfosse O, Mary B (2007) Carbon and nitrogen mineralization in acidic, limed and calcareous agricultural soils: Apparent and actual effects. *Soil Biology and Biochemistry* 39 : 276–288
- Bhullar GS, Edwards PJ, Venterink HO (2013) Variation in the plant-mediated methane transport and its importance for methane emission from intact wetland peat mesocosms. *Journal of Plant Ecology* 6: 298–304.
- Birge HE, Conant RT, Follett RF, Haddix ML, Morris SJ, Snapp SS, Wallenstein MD, Paul EA (2015) Soil respiration is not limited by reductions in microbial biomass during long-term soil incubations. *Soil Biology and Biochemistry* 81:304–310.
- Birkel U, Gerold G, Niemeyer J (2002) Abiotic reactions of organics on clay mineral surfaces. *Developments in Soil Science* vol 28: 437–447.
- Blagodatskaya E, Kuzyakov Y (2011) Priming effects in relation to soil conditions – mechanisms. *Encyclopedia of Agrophysics*. pp.657–667.
- Blanchette RA (1991) Delignification by wood-decay fungi. *Annual Review of Phytopathology* 29: 381–398.
- Blankinship JC, Becerra CA, Schaeffer SM, Schimel SM (2014) Separating cellular metabolism from exoenzyme activity in soil organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 71: 68–75
- Blažina M, Najdek M, Fuks D, Smodlaka N (2011) Microbial communities in northern Adriatic mucilaginous aggregates: insight into the early phase of aggregate formation. *Hydrobiologia* 658: 213–220.
- Blodau C, Roulet NT, Heitmann T, Stewart H, Beer J, Lafleur P, Moore TR (2007) Belowground carbon turnover in a temperate ombrotrophic bog. *Global Biogeochemical Cycles*, 21: GB1021.
- Boddy E, Hill PW, Farrar J, Jones DL (2007) Fast turnover of low molecular weight components of the dissolved organic C pool of temperate grassland field soils. *Soil Biology and Biochemistry* 39 : 827–835
- Bol R, Huang Y, Meridith JA, Eglinton G, Harkness DD, Ineson P (1996) The ¹⁴C age and residence time of organic matter and its lipid constituents in a stagnohumic gley soil. *European Journal of Soil Science* 47 : 215–222
- Bond-Lamberty B, Thomson AM (2010) A global database of soil respiration measurements, *Biogeosciences* 7:1321–1344.
- Bonmati M, Ceccanti B, Nanniperi P (1991) Spatial variability of phosphatase, urease, protease, organic carbon and total nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 23:391–396.
- Borrel, G., Lehours, A.-C., Crouzet, O., Jézéquel, D., Rockne, K., Kulczak, A., Duffaud, E., Joblin, K. and Fonty, G.: Stratification of Archaea in the Deep Sediments of a Freshwater Meromictic Lake: Vertical Shift from Methanogenic to Uncultured Archaeal Lineages, *PLOS ONE*, 7(8), e43346, doi:10.1371/journal.pone.0043346, 2012.
- Bowen GD, Rovira AD (1961) Plant growth in irradiated soil. *Nature* 191: 936–937.
- Bowen HJM, Cawse PA (1962) The effect of ionizing radiation on the availability of inorganic ions in soils. In: *Proceedings of the Symposium on the Use of Radioisotopes in Soil-Plant Nutrition Studies*, Bombay. International Atomic Energy Agency, Vienna, 26 February–2 March 1962, pp. 17–30
- Bowen HJM, Cawse PA (1964) Some effects of gamma radiation on the composition of the soil solution and soil organic matter. *Soil Science* 98: 358–361.

- Boyd SA, Mortland MM (1986) Selective effects of smectite-organic complexes on the activities of immobilized enzymes. *Journal of Molecular Catalysis* 34:1-8.
- Boyd SA, Mortland MM (1990) Enzyme interactions with clays and clay organic matter complexes. In: Bollag, J.-M., Stotzky, G. (Eds.), *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp. 1-28.
- Brandt LA, Bohnet C, King JY (2009) Photochemically induced carbon dioxide production as a mechanism for carbon loss from plant litter in arid ecosystems. *Journal of Geophysical Research*, 114 :G02004.
- Briar SS, Fonte SJ, Park I, Six J, Scow K, Ferris H (2011) The distribution of nematodes and soil microbial communities across soil aggregate fractions and farm management systems. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 905-914.
- Bridgman SD, Megonigal JP, Keller JK, Bliss NB, Trettin C (2006) The carbon balance of North American wetlands. *Wetlands* 26:889-916
- Brookes PC, Kemmitt SJ, Addiscott TM, Bird N (2009) Reply to Kuzyakov *et al.*'s comments on our paper: 'Kemmitt, S., Lanyon, C.V., Waite, I.S., Wen, Q., O'Donnell, A.G., Brookes, P.C., 2008. Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass- a new perspective. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 61-73. *Soil Biology and Biochemistry* 41 : 440-443.
- Brown KA (1981) Biochemical activities in peat sterilized by gamma-irradiation. *Soil Biology and Biochemistry* 13: 469-474.
- Burns RG (1978a) *Soil Enzymes*. Academic Press, New York.
- Burns RG (1978b) Enzymes in soil: some theoretical and practical considerations. In: Burns, R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*. Academic Press, New York, pp. 295-339.
- Burns RG (1982) Enzyme activity in soil - location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14: 423-427.
- Burns RG (1986) Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids. Special Publication No.19. In: Huang, P.M., Schnitzer, M. (Eds.), *Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 429-451.
- Burns RG, Dick RP (2002) *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology, and Applications*. Marcel Dekker, New York.
- Burns RG, Pukite AH, McLaren AD (1972) Concerning the location and persistence of soil urease. *Soil Science Society of America Proceedings* 36: 308-311.
- Burns RG, Wallenstein MD (2010) Microbial extracellular enzymes and natural and synthetic polymer degradation in soil: current research and future prospects. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World 1 - 6 August 2010, Brisbane, Australia.
- Burns RG, DeForest JL, Marxsen J, Sinsabaugh RL, Stromberger MD, Wallenstein MD, Weintraub MN, Zoppini A (2013) Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry* 58:216-234.

C

- Caldwell BA (2005) Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiologia* 49 :637.
- Calvet JC, Fritz N, Berne C, Piguet B, Maurel W, Meurey C (2015) Impact of gravels and organic matter on the thermal properties of grassland soils in southern France, *SOIL Discussions* 2: 737-765.
- Calvet R (2003) *Le sol: propriétés et fonctions*. France Agricole Editions.
- Carson JK, Gonzalez-Quinones V, Murphy DV, Hinz C, Shaw JA, Gleeson DB (2010) Low pore connectivity increases bacterial diversity in soil. *Applied Environmental Microbiology* 76: 3936-3942.

- Calvet R, Chenu C, Houot S (2015) Les matières organiques des sols- rôles agronomiques et environnementaux. 2nd Ed. France Agricole, pp. 351.
- Carter DO, Yellowlees D, Tibbett M (2007) Autoclaving kills soil microbes yet soil enzymes remain active. *Pedobiologia* 51: 295-299.
- Čátera M, Ogrinc N. (2011) Soil respiration rates and in natural beech forest (*Fagus sylvatica* L.) in relation to stand structure. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 47:221–237.
- Cawse PA (1975) Microbiology and biochemistry of irradiated soils. In: Paul, E.A., McLaren, A.D. (Eds.), *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, New York, pp. 213–267.
- Cawse PA, Mableson KM (1971) The effect of gamma-radiation on the release of carbon dioxide from fresh soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 2: 421–431.
- Ceccon C, Panzacchi P, Scandellari F, Prandi L, Ventura M, Russo B, Millard P, Tagliavini M (2011) Spatial and temporal effects of soil temperature and moisture and the relation to fine root density on root and soil respiration in a mature apple orchard. *Plant Soil* 342:195–206.
- Certini G (2005) Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia* 143: 1–10
- Chambers DP, Attiwill PM (1994) The ash-bed effect in *Eucalyptus regnans* forest: chemical, physical and microbiological changes in soil after heating or partial sterilisation. *Australian Journal of Botany* 42: 739-749.
- Chen Y, Barak P (1982) Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in Agronomy* 35: 217-240.
- Chenu C, Plante AF (2006) Clay-sized organo-mineral complexes in a cultivation chronosequence: revisiting the concept of the 'primary organo-mineral complex'. *European Journal of Soil Science* 57: 596- 607.
- Ciais P, Borges AV, Abril G, Meybeck M, Folberth G, Hauglustaine D, Janssens IA (2008) The impact of lateral carbon fluxes on the European carbon balance. *Biogeosciences* 5:1259-1271.
- Clark BW, Coleman DC (1970) Comparative study of the effects of acute and chronic gamma irradiation on total soil respiration. *Pedobiologia* 10: 199–206.
- Clark DB, Mercado LM, Sitch S, Jones CD, Gedney N, Best MJ, Pryor M, Rooney GG, Essery RLH, Blyth E, Boucher O, Harding RJ, Huntingford C, Cox PM (2011) The joint UK land environment simulator (JULES), model description– Part2:carbon fluxes and vegetation dynamics. *Geoscientific Model Development* 4: 701-722.
- Cole JJ, Prairie YT, Caraco NF, McDowell WH, Tranvik LJ, Striegl RG, Duarte CM, Kortelainen P, Downing JA, Middelburg JJ, Melack J (2007) Plumbing the global carbon cycle: Integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. *Ecosystems* 10: 172– 185
- Coleman C, MacFayden A (1966) The recolonization of gamma-irradiated soils by small arthropods. *Oikos* 17: 62–70.
- Conant RT, Ryan MG, Ågren GI, Birge HE, Davidson EA, Eliasson PE, Evans SE, Frey SD, Giardina CP, Hopkins FM, Hyvönen R, Kirschbaum MUF, Lavelle JM, Leifeld J, Parton WJ, Steinweg JM, Wallenstein MD, Wetterstedt JAM, Bradford MA (2011) Temperature and soil organic matter decomposition rates-synthesis of current knowledge and a way forward. *Global Change Biology* 17:3392–3404.
- Cook, F. J. and Orchard, V. A.: Relationships between soil respiration and soil moisture, *Soil Biology and Biochemistry*, 40(5), 1013–1018, doi:10.1016/j.soilbio.2007.12.012, 2008.
- Cotrufo MF, Wallenstein MD, Boot CM, Deneff K, Paul E (2013) The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Global Change Biology* 19:988-995.
- Coûteaux MM (1992) Decomposition of cells and empty shells of testate amoebae (Rhizopoda, Testacea) in an organic-acid soil sterilized by propylene oxide fumigation, autoclaving, and γ -ray irradiation. *Biology and Fertility of Soils* 12: 290–294.
- Craine JM, Morrow C, Fierer N (2007) Microbial nitrogen limitation increases decomposition. *Ecology* 88: 2105–2113.

- Crawford JW, Deacon L, Grinev D, Harris JA, Ritz K, Singh BK, Young I (2012) Microbial diversity affects self-organization of the soil-microbe system with consequences for function. *Journal of the Royal Society Interface* 9: 1302-1310.
- Currie WS, Abet JD (1997) Modeling leaching as a decomposition process in humid, montane forests. *Ecology* 78: 1844-1860.

D

- Dalton BR, Blum U, Weed SB (1989) Plant phenolic acids in soils: sorption of ferulic acid by soil and soil components sterilized by different techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 1011-1018.
- Dao TH, Marx DB, Lavy TL, Dragun J (1982) Effect, and statistical evaluation, of soil sterilization on aniline and diuron adsorption isotherms. *Soil Science Society of America Journal* 46: 963-969.
- Davidson EA, Janssens IA (2006) Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, 440: 165-173.
- Davidson EA, Richardson AD, Savage KE, Hollinger DY (2006) A distinct seasonal pattern of the ratio of soil respiration to total ecosystem respiration in a spruce-dominated forest. *Global Change Biology* 12:230-239.
- Davidson EA, Samanta S, Caramori SS, Savage K (2012) The dual Arrhenius and Michaelis-Menten kinetics model for decomposition of soil organic matter at hourly to seasonal time scales. *Global Change Biology* 18: 371-384
- Davidson EA, Savage KE, Bolstad P *et al.* (2002) Belowground carbon allocation in forests estimated from litterfall and IRGAbased soil respiration measurements. *Agriculture and Forest Meteorology* 113: 39-51.
- Davidson EA, Verchot LV, Cattanio JH, Ackerman IL, Carvalho JEM (2000) Effects of soil water content on soil respiration in forests and cattle pastures of Eastern Amazonia. *Biogeochemistry* 48: 53-69.
- Davidson, E. A., Belk, E. and Boone, R. D.: Soil water content and temperature as independent or confounded factors controlling soil respiration in a temperate mixed hardwood forest, *Global Change Biology*, 4(2), 217-227, doi:10.1046/j.1365-2486.1998.00128.x, 1998.
- Davinic M, Fultz LM, Acosta-Martinez V, Calderon FJ, Cox SB, Dowd SE, Allen VG, Zak JC, Moore-Kucera J (2012) Pyrosequencing and mid-infrared spectroscopy reveal distinct aggregate stratification of soil bacterial communities and organic matter composition. *Soil Biology and Biochemistry* 46: 63-72.
- Day TA, Zhang ET, Ruhland CT (2007) Exposure to solar UV-B radiation accelerates mass and lignin loss of *Larrea tridentata* litter in the Sonoran Desert. *Plant Ecology* 193: 185-194.
- De Graaff MA, Classen AT, Castro HF, Schadt CW (2010) Labile soil carbon inputs mediate the soil microbial community composition and plant residue decomposition rates *New Phytologist* 188: 1055-1064.
- De Nobili M, Contin M, Mondini C, Brookes PC (2001) Soil microbial biomass is triggered into activity by trace amounts of substrate. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1163-1170.
- Degrange V, Lensi R, Bardin R (1997) Activity, size and structure of a *Nitrobacter* community as affected by organic carbon and nitrite in sterile soil. *FEMS Microbiology and Ecology* 24: 173-180.
- Denef K, Six J, Paustian K, Merckx R (2001) Importance of macroaggregate dynamics in controlling soil carbon stabilization: shortterm effects of physical disturbance induced by dry-wet cycles. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 2145-2153.
- Derrien, D., Marol, C., Balabane, M. and Balesdent, J.: The turnover of carbohydrate carbon in a cultivated soil estimated by ¹³C natural abundances, *European Journal of Soil Science*, 57(4), 547-557, doi:10.1111/j.1365-2389.2006.00811.x, 2006.

- Dick WA, Tabatabai MA (1987) Kinetics and activities of phosphatase-clay complexes. *Soil Science* 143:5-15.
- Dilly O, Zyakun A (2008) Priming effect and respiratory quotient in a forest soil amended with glucose. *Geomicrobiology Journal* 25: 425-431.
- Donahue RL, Miller RW, Shickluna JC (1983) *Soils: An Introduction to Soils and Plant Growth*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs. New Jersey.
- Drees LR, Hallmark CT (2002) Inorganic carbon analysis. . In Rattan Lal (ed). *Encyclopedia of Soil Science*. Marcel Dekker. New York.
- Dungait JA, Hopkins DW, Gregory AS, Whitmore AP (2012) Soil organic matter turnover is governed by accessibility not recalcitrance, *Global Change Biology* 18: 1781-1796.

E

- Easterling DR, Evans JL, Groisman PY, Karl TR, Kunkel KE, Ambenje P, (2000) Observed Variability and Trends in Extreme Climate Events: A Brief Review. *Bulletin of the American Meteorological Society* 81: 417-425.
- Easterling, D. R., Evans, J. L., Groisman, P. Y., Karl, T. R., Kunkel, K. E. and Ambenje, P.: Observed Variability and Trends in Extreme Climate Events: A Brief Review, *Bull. Amer. Meteor. Soc.*, 81(3), 417-425, doi:10.1175/1520-0477(2000)081<0417:OVATIE>2.3.CO;2, 2000.
- Ekberg A, Buchmann N, Gleixner G (2007) Rhizospheric influence on soil respiration and decomposition in a temperate Norway spruce stand. *Soil Biology and Biochemistry* 39:2103-2110.
- Ekblad A, Högberg P (2001) Natural abundance of ¹³C in CO₂ respired from forest soils reveals speed of link between tree photosynthesis and root respiration. *Oecologia* 127:305-308
- Ekschmitt K, Liu MQ, Vetter S, Fox O, Wolters V (2005) Strategies used by soil biota to overcome soil organic matter stability e why is dead organic matter left over in the soil? *Geoderma* 128: 167-176.
- Emmerich WE (2003) Carbon dioxide fluxes in a semiarid environment with high carbonate soils. *Agricultural and Forest Meteorology* 116: 91-102.
- Emmerich WE, Martens DA (2006) Separation of soil organic and inorganic CO₂ fluxes. ASA-CSSA-SSSA Annual Meeting November 12-16, 2006, Indianapolis, IN.
- Eno CF, Popenoe H (1964) Gamma radiation compared with steam and methyl bromide as a soil sterilizing agent. *Proceedings of the Soil Science Society of America* 28: 533-535.
- Ettema CH, Wardle DA (2002) Spatial soil ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 177-183.

F

- Fan Z, Liang C (2015) Significance of microbial asynchronous anabolism to soil carbon dynamics driven by litter inputs. *Scientific Reports* 5:9575.
- Fang C, Smith P, Moncrieff JB, Smith JU (2005) Similar response of labile and resistant soil organic matter pools to changes in temperature. *Nature* 433: 57-59.
- Fenner N, Williams R, Toberman H, Hughes S, Reynolds B, Freeman C (2011) Decomposition 'hotspots' in a rewetted peatland: Implications for water quality and carbon cycling. *Hydrobiologia* 674:51-66.
- Fierer N, Bradford MA, Jackson RB (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88:1354-1364.
- Fierer N, Schimel JP (2002) Effects of drying-rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biology and Biochemistry* 34:777-787.

- Fierer N, Schimel JP (2003) A proposed mechanism for the pulse in carbon dioxide production commonly observed following the rapid rewetting of a dry soil. *Soil Science Society of America Journal* 67:798–805.
- Fierer N, Schimel JP, Holden PA (2003) Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 167-176.
- Fierer, N. and Schimel, J. P.: A Proposed Mechanism for the Pulse in Carbon Dioxide Production Commonly Observed Following the Rapid Rewetting of a Dry Soil, *Soil Science Society of America Journal*, 67(3), 798, doi:10.2136/sssaj2003.0798, 2003.
- Filip Z, Flaig W, Rietz E (1977) Oxidation of some phenolic substances as influenced by clay minerals. *Soil Org. Matter Stud. Symp.* 2: 91-96.
- Flemming HC, Wingender J (2002) Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance. In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, vol. 3. Wiley, New York, NY. pp. 1223-1231.
- Foereid B, Bellarby J, Meier-Augenstein W, Kemp H (2010) Does light exposure make plant litter more degradable? *Plant Soil* 333:275-285.
- Fontaine S, Barot S (2005) Size and functional diversity of microbe populations control plant persistence and long-term soil carbon accumulation. *Ecology Letters* 8: 1075-1087.
- Fontaine S, Barot S, Barre P, Bdioui N, Mary B, Rumpel (2007) Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450: 277-281.
- Fontaine S, Mariotti A, Abbadie L (2003) The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry* 35: 837-843.
- Fontes C, Gilbert HJ (2010) Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. In: Kornberg, R.D., Raetz, C.R.H., Rothman, J.E., Thorner, J.W. (Eds.), *Annual Review of Biochemistry*, vol. 79. Annual Reviews, Palo Alto, USA, pp. 655-681.
- Formánek P, Ambus P (2004) Assessing the use of $\delta^{13}\text{C}$ natural abundance in separation of root and microbial respiration in a Danish beech (*Fagus sylvatica* L.) forest. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18:897–902
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D. W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D. C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M. and Van Dorland, R.: Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. Chapter 2, [online] Available from: http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:39002468 (Accessed 13 July 2016), 2007.
- Frank, D., Reichstein, M., Bahn, M., Thonicke, K., Frank, D., Mahecha, M. D., Smith, P., van der Velde, M., Vicca, S., Babst, F., Beer, C., Buchmann, N., Canadell, J. G., Ciais, P., Cramer, W., Ibrom, A., Miglietta, F., Poulter, B., Rammig, A., Seneviratne, S. I., Walz, A., Wattenbach, M., Zavala, M. A. and Zscheischler, J.: Effects of climate extremes on the terrestrial carbon cycle: concepts, processes and potential future impacts, *Glob Change Biol*, 21(8), 2861–2880, doi:10.1111/gcb.12916, 2015.
- Frankena J, Van Verseveld HW, Stouthamer AH (1988) Substrate and energy costs of the production of exocellular enzymes by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology and Bioengineering* 32: 803-812.
- Frankenberger Jr WT, Johanson JB (1982) Effect of pH on enzyme stability in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 14:433-437.
- Freeman C, Ostle N, Kang H (2001) An enzymic 'latch' on a global carbon store. *Nature* 409:149.
- Freschet GT, Aerts R, Cornelissen JHC (2011) Multiple mechanisms for trait effects on litter decomposition: moving beyond home-field advantage with a new hypothesis. *Journal of Ecology* 100: 619–630.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria—the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176: 269-275.

G

- Gallo ME, Porrás-Alfaro A, Odenbach KJ, Sinsabaugh RL (2009) Photoacceleration of plant litter decomposition in an arid environment. *Soil Biology and Biochemistry* 41:1433-1441.
- Gallo ME, Sinsabaugh RL, Cabaniss SE (2006) The role of ultraviolet radiation in litter decomposition in arid ecosystems. *Applied Soil Ecology* 34: 82-91.
- Gans J, Wolinsky M, Dunbar J (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387-1390.
- Gaudinski JB, Trumbore SE, Davidson EA, Zheng SH (2000) Soil carbon cycling in a temperate forest: radiocarbon-based estimates of residence times, sequestration rates and partitioning of fluxes. *Biogeochemistry* 51: 33-69.
- Gehrke C, Johanson U, Callaghan TV, Chadwick D, Robinson CH (1995) The impact of enhanced ultraviolet-B radiation on litter quality and decomposition processes in *Vaccinium* leaves from the sub-Arctic. *Oikos* 72:213-222
- Gessner MO, Swan CM, Dang CK, McKie BG, Bardgett RD, Wall DH, Haettenschwiler S (2010) Diversity meets decomposition. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 372-380.
- Giardina CP, Binkley D, Ryan MG, Fownes JH and Senock RS (2004) Belowground carbon cycling in a humid tropical forest decreases with fertilization. *Oecologia* 139: 545-550.
- Giardina CP, Ryan MG (2002) Soil surface CO₂ efflux, litterfall, and total belowground carbon allocation in a fast growing Eucalyptus plantation. *Ecosystems* 5:487-499.
- Gilbert P, Evans DJ, Brown MRW (1993) Formation and dispersal of bacterial biofilms in vivo and in situ. *Journal of Applied Bacteriology-Symposium* 74: 67S-78S.
- Gilbert, W.: Origin of life: The RNA world, *Nature*, 319(6055), 618-618, doi:10.1038/319618a0, 1986.
- Goldstein L (1972) Microenvironmental effects on enzyme catalysis. A kinetic study of polyanionic and polycationic derivatives of chymotrypsin. *Biochemistry* 11 : 4072-84.
- Gombert P (2002) Role of karstic dissolution in global carbon cycle. *Global Planet Change* 33:177-184.
- Gordon, L. J., Peterson, G. D. and Bennett, E. M.: Agricultural modifications of hydrological flows create ecological surprises, *Trends in Ecology & Evolution*, 23(4), 211-219, doi:10.1016/j.tree.2007.11.011, 2008.
- Goulden ML, Munger JW, Fan SM, Daube BC, Wofsy SC (1996) Measurements of carbon sequestration by long-term eddy covariance: methods and a critical evaluation of accuracy. *Global Change Biology* 2: 169-182.
- Gram L, Grossart HP., Schlingloff A, Kiørboe T (2002) Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4111-4116.
- Grandy AS, Strickland MS, Lauber CL, Bradford MA, Fierer N (2009) The influence of microbial communities, management, and soil texture on soil organic matter chemistry. *Geoderma* 150: 278-286.
- Griffiths E, Burns RG (1968) Effects of gamma irradiation on soil aggregate stability. *Plant Soil* 28: 169-172.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. and Altman, S.: The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme, *Cell*, 35(3), 849-857, doi:10.1016/0092-8674(83)90117-4, 1983.
- Guo LB, Gifford RM (2002) Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Global Change Biology* 8: 345-360.

H

- Hamer U, Marschner B (2005) Priming effects in soils after combined and repeated substrate additions. *Geoderma* 128: 38-51.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry and Biology* 5: R245-R249.
- Hanson PJ, Edwards NT, Garten CT, Andrews JA (2000) Separating root and soil microbial contributions to soil respiration: a review of methods and observations. *Biogeochemistry* 48: 115-146.
- Hartel PG, Alexander M (1983) Decline of cowpea rhizobia in acid soils after gamma-irradiation. *Soil Biology and Biochemistry* 15: 489-490.
- Harvey GR, Boran DA, Chesal LA, Tokar JM (1983) The structure of marine fulvic and humic acids. *Marine Chemistry* 12: 119-132.
- Hashizume, H.: Role of Clay Minerals in Chemical Evolution and the Origins of Life, in *Clay Minerals in Nature - Their Characterization, Modification and Application*, edited by M. Valaskova, InTech. [online] Available from: <http://www.intechopen.com/books/clay-minerals-in-nature-their-characterization-modification-and-application/role-of-clay-minerals-in-chemical-evolution-and-the-origin-of-life> (Accessed 12 July 2016), 2012.
- Hastings SJ, Oechel WC, Muhlia-Melo A (2005) Diurnal, seasonal and annual variation in the net ecosystem CO₂ exchange of a desert shrub community (*Sarcocaulis*) in Baja California, Mexico. *Global Change Biology* 11: 1-13.
- Hedges JL, Oades JM (1997) Comparative organic geochemistries of soils and marine sediments. *Organic Geochemistry* 27: 319-361.
- Henry HAL, Brizgys K, Field CB (2008) Litter decomposition in a California annual grassland: interactions between photodegradation and litter layer thickness. *Ecosystems* 11:545-554.
- Hill PW, Farrar JF, Jones DL (2008) Decoupling of microbial glucose uptake and mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40 : 616-624.
- Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil* 321: 117-152.
- Högberg P, Nordgren A, Buchmann N, Taylor AFS, Ekblad A, Högberg MN, Nyberg G, Ottosson-Löfvenius M, Read DJ (2001) Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature* 411: 789-792
- Hollibaugh JT, Azam F (1983) Microbial degradation of dissolved proteins in seawater. *Limnology and Oceanography* 28:1104-1116.
- Huang PM, Hardie AG (2009) Formation Mechanisms of Humic Substances in the Environment. *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems* 41-109.
- Huang, PM, Berthelin, J, Bollag JM, McGill WB (1995) *Environmental Impacts of Soil Component Interactions: Land Quality, Natural and Anthropogenic Organics*, CRC Press.
- Hütsch, B. W., Augustin, J. and Merbach, W.: Plant rhizodeposition — an important source for carbon turnover in soils, *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 165(4), 397-407, doi:10.1002/1522-2624(200208)165:4<397::AID-JPLN397>3.0.CO;2-C, 2002.

I

- Ingham RE, Trofymow JA, Ingham ER, Coleman DC (1985) Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecological Monographs* 55: 119-140.

- Inglima I, Alberti G, Bertolini T, Vaccari FP, Gioli B, Miglietta F, Cotrufo MF, Peressotti A (2009) Precipitation pulses enhance respiration of Mediterranean ecosystems: the balance between organic and inorganic components of increased soil CO₂ efflux. *Global Change Biology* 15: 1289-1301.
- Iovieno P, Baath E (2008) Effect of drying and rewetting on bacterial growth rates in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 400-407.
- Itoh M, Ohte N, Koba K (2009) Methane flux characteristics in forest soils under an East Asian monsoon climate. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 388-395.

J

- Jackson NE, Corey JC, Frederick LR, Picken Jr JC (1967) Gamma irradiation and the microbial population of soils at two water contents. *Soil Science Society of America* 31: 491-494.
- Jaeger CHI, Lindow SE, Miller W, Clark E, Firestone MK (1999) Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2685-2690.
- Janssens IA, Lankreijer H, Matteucci G, Kowalski AS, Buchmann N, Epron D, Pilegaard K, Kutsch W, Longdoz B, Grunwald T, Montagnani L, Dore S, Rebmann C, Moors EJ, Grelle A, Rannik U, Morgenstern K, Oltchev S, Clement R, Gudmundsson J, Minerbi S, Berbigier P, Ibrom A, Moncrieff J, Aubinet M, Bernhofer C, Jensen NO, Vesala T, Granier A, Schulze ED, Lindroth A, Dolman AJ, Jarvis PG, Ceulemans R, Valentini R (2001) Productivity overshadows temperature in determining soil and ecosystem respiration across European forests. *Global Change Biology* 7: 269-278.
- Jarvis P, Rey A, Petsikos C, Wingate L, Rayment M, Pereira J, Banza J, David J, Miglietta F, Borghetti M, Manca G, Valentini R (2007) Drying and wetting of Mediterranean soils stimulates decomposition and carbon dioxide emission: the 'Birch effect'. *Tree Physiology* 27: 929-940.
- Jastrow JD (1996) Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral-associated organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 28: 665-676.
- Jenkinson DS (1966) Studies on the decomposition of plant material in soil. II. *Journal of Soil Science* 17:280-302.
- Jenkinson DS, Adams DE, Wild A (1991) Model estimates of CO₂ emissions from soil in response to global warming. *Nature* 351: 304-306.
- Jenkinson DS, Powlson DS (1976) The effects of biocidal treatment on metabolism in soil. I. Fumigation with chloroform. *Soil Biology and Biochemistry* 8:167-177.
- Joanisse GD, Bradley RL, Preston CM, Munson AD (2007) Soil enzyme inhibition by condensed litter tannins may drive ecosystem structure and processes: the case of *Kalmia angustifolia*. *New Phytologist* 175: 535-546.
- Jobbágy EG, Jackson RB (2000) The vertical distribution of soil organic carbon and its relations to climate change and vegetation. *Ecological Applications* 10: 423-436.
- Jocteur Monrozier L, Guez P, Chalamet A, Bardin R, Martins J, Gaudet JP (1993) Distribution of microorganisms and fate of xenobiotic molecules in unsaturated soil environments. *Science of the total environment* 136: 121-133.

K

- Kaiser C, Franklin O, Dieckmann U, Richter A (2014) Microbial community dynamics alleviate stoichiometric constraints during litter decay. *Ecology Letters* 17:680-690.
- Kaiser C, Franklin O, Richter A, Dieckmann U (2015) Social dynamics within decomposer communities lead to nitrogen retention and organic matter build-up in soils. *Nature Communications* 6:8960.

- Kandeler E (1990) Characterization of free and adsorbed phosphatases in soils. *Biology and Fertility of Soils* 9:199-202.
- Kang SH, Barak Y, Lamed R, Bayer EA, Morrison M (2006) The functional repertoire of prokaryote cellulosomes includes the serpin superfamily of serine proteinase inhibitors. *Molecular Microbiology* 60:1344-1354.
- Kao-Kniffin J, Zhu B (2013) A microbial link between elevated CO₂ and methane emissions that is plant species-specific. *Microbial Ecology* 66:621-629.
- Kasting, J. F. and Siefert, J. L.: Life and the Evolution of Earth's Atmosphere, *Science*, 296(5570), 1066-1068, doi:10.1126/science.1071184, 2002.
- Kellner E, Baird AJ, Oosterwoud M, Harrison K, Waddington JM (2006) Effect of temperature and atmospheric pressure on methane ebullition from near-surface peats, *Geophysical Research Letters* 33:L18405.
- Kemmitt SJ, Lanyon CV, Waite IS, Wen Q, Addiscott TM, Bird NRA, O'Donnell AG, Brookes PC (2008) Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass- a new perspective. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 61-73.
- Kéroual, B., Lehours, A. C., Colombet, J., Amblard, C., Alvarez, G. and Fontaine, S.: Soil carbon dioxide emissions controlled by an extracellular oxidative metabolism identifiable by its isotope signature, *Biogeosciences Discussions*, 1-25, doi:10.5194/bg-2015-399, 2016.
- Killham K (1994) *Soil Ecology*. Cambridge University Press.
- Killham K, Amato M, Ladd JN (1993) Effect of substrate location in soil and soil pore water regime on carbon turnover. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 57-62.
- Kim JS, Dungan RS, Crowley D (2008) Microarray analysis of bacterial diversity and distribution in aggregates from a desert agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils* 44: 1003-1011.
- King JY, Brandt LA, Adair EC (2012) Shedding light on plant litter decomposition: advances, implications and new directions in understanding the role of photodegradation. *Biogeochemistry* 111:57-81.
- Kirk TK, Ferrell RL (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41:465-505.
- Kirkby CA, Kirkegaard JA, Richardson AE, Wade LJ, Blanchard C, Batten G (2011) Stable soil organic matter: A comparison of C:N:P:S ratios in Australian and other world soils. *Geoderma* 163: 197-208.
- Kirschbaum MUF (2000) Will changes in soil organic carbon act as a positive or negative feedback on global warming. *Biogeochemistry* 48: 21-51.
- Kirschbaum MUF (2000): Will changes in soil organic carbon act as a positive or negative feedback on global warming. *Biogeochemistry* 48: 21-51.
- Kiss S, Dragan-Bularda M, Radulescu D (1975) Biological significance of enzymes accumulated in soil. *Advances in Agronomy* 27:25-87.
- Klanjscek T, Nisbet RM, Priester JH, Holden PA (2012) Modeling physiological processes that relate toxicant exposure and bacterial population dynamics. *PLoS ONE* 7: 26955.
- Kleber M, Johnson MG (2010) Advances in understanding the molecular structure of soil organic matter: implications for interactions in the environment. In: Sparks, D.L. *Advances in Agronomy*. Amsterdam: Elsevier Science, p.77-142.
- Knorr W, Prentice IC, House JI, Holland EA (1998) Long-term sensitivity of soil carbon turnover to warming. *Paleoceanography* 13 : 150-160
- Kowalski AS, Serrano-Ortiz P (2007) On the relationship between the eddy covariance, the turbulent flux, and surface exchange for a trace gas such as CO₂. *Boundary-Layer Meteorology* 124: 129-141.
- Kowalski AS, Serrano-Ortiz P, Janssens IA, Sánchez-Moral S, Cuezva S, Domingo F, Alados-Arboledas L (2008) Can flux tower research neglect geochemical CO₂ exchange? *Agricultural and Forest Meteorology* 148 :1045-1054.

- Krull ES, Baldock JA, Skjemstad JO (2003) Importance of mechanisms and processes of the stabilization of soil organic matter for modelling carbon turnover. *Functional Plant Biology* 30: 207-222.
- Kuivila, K. M., Murray, J. W., Devol, A. H. and Novelli, P. C.: Methane production, sulfate reduction and competition for substrates in the sediments of Lake Washington, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 53(2), 409–416, doi:10.1016/0016-7037(89)90392-X, 1989.
- Kumada K, Kato H (1970): Browning of pyrogallol as affected by clay minerals: I. Classification of Clay Minerals Based their Catalytic Effects on the Browning Reaction of Pyrogallol. *Soil Science and Plant Nutrition* 16(5): 195–200.
- Kuzyakov Y (2006) Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 425-448
- Kuzyakov Y (2010) Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1363-1371.
- Kuzyakov Y, Blagodatskaya E, Blagodatsky S (2009) Comments on the paper by Kemmitt, *et al.* (2008) 'Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomassa new perspective [Soil Biology & Biochemistry 40, 61–73]: the biology of the regulatory gate. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 435–439.
- Kuzyakov Y, Friedel JK, Stahr K (2000) Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1485-1498.
- Kuzyakov, Y, Domanski, G (2008) Carbon input by plants into the soil. Review, *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 163:421–431,

L

- Ladd JN, Foster RC, Nannipieri P, Oades JM (1996) Soil structure and biological activity, in: *Soil Biochemistry*, In: Stotzky, G., Bollag, J.M. (Eds.). Marcel Dekker, New-York, 23-28.
- Lal RJ (2004) Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123:1-22.
- Lal RJ (2008) Sequestration of atmospheric CO₂ in global carbon pools. *Energy & Environmental Science* 1: 86–100.
- Lal RJ, Kimble JM (2000) Pedogenic carbonates and the global carbon cycle. In: Lal, R., Kimble, J.M., Eswaran, H., Stewart, B.A. (Eds.), *Global Change and Pedogenic Carbonate*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–14.
- Law BE, Falge E, Gu L, Baldocchi DD, Bakwin P, Berbigier P, Davis K, Dolman AJ, Falk M, Fuentes JD, Goldstein A, Granier A, Grelle A, Hollinger D, Janssens IA, Jarvis P, Jensen NO, Katul G, Mahli Y, Matteucci G, Meyers T, Monson R, Munger W, Oechel W, Olson R, Pilegaard K, Paw KT, Thorgeirsson H, Valentini R, Verma S, Vesala T, Wilson K, Wofsy S (2002) Environmental controls over carbon dioxide and water vapor exchange of terrestrial vegetation. *Agricultural and Forest Meteorology* 113: 97-120.
- Law BE, Ryan MG, Anthoni PM (1999b) Seasonal and annual respiration of a ponderosa pine ecosystem. *Global Change Biology* 5: 169-182.
- Lawrence CR, Neff JC, Schimel JP (2009) Does adding microbial mechanisms of decomposition improve soil organic matter models? A comparison of four models using data from a pulsed rewetting experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 41:1923–1934
- Leguédou S, Le Bissonnais Y (2004) Size fractions resulting from an aggregate stability test, interrill detachment and transport. *Earth Surface Processes and Landforms* 29: 1117-1129.
- Lehours, A.-C., Evans, P., Bardot, C., Joblin, K. and Gérard, F.: Phylogenetic Diversity of Archaea and Bacteria in the Anoxic Zone of a Meromictic Lake (Lake Pavin, France), *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(6), 2016–2019.

- Lensi R, Lescure C, Steinberg C, Savoie JM, Faurie G (1991) Dynamics of residual enzyme activities, denitrification potential, and physico-chemical properties in a γ -sterilized soil. *Soil Biology and Biochemistry* 23:367–373.
- Lensi, R., Lescure, C., Steinberg, C., Savoie, J.-M. and Faurie, G.: Dynamics of residual enzyme activities, denitrification potential, and physico-chemical properties in a γ -sterilized soil, *Soil Biology and Biochemistry*, 23(4), 367–373, doi:10.1016/0038-0717(91)90193-N, 1991.
- Liang C, Cheng G, Wixon DL, Balsler TC (2011) An absorbing Markov chain approach to understanding the microbial role in soil carbon stabilization. *Biogeochemistry* 106: 303–309.
- Liegel LJ (1986) Effects of sterilization procedures on the biological, chemical, and physical properties of soils: a review. *Turrialba* 36: 11–19.
- Lin Q, Brookes PC (1999) An evaluation of the substrate-induced respiration method. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1969–1983.
- Liu C, Huang PM (2000) Catalytic effects of hydroxy-aluminium and silicic acid on catechol humification A2. *Humic Substances: Structure, Models and Functions*, Ghabbour EA and Davies G eds. Royal Society of Chemistry. Cambridge UK 253-270.
- Liu C, Huang PM (2002) Role of hydroxy-aluminosilicate ions (proto-imogolite sol) in the formation of humic substances. *Organic Geochemistry* 33: 295–305.
- Liu Y, Van Dijk AIJM, De Jeu RAM, Holmes TRH (2009) An Analysis on spatiotemporal variations of soil and vegetation moisture from a 29 year satellite derived dataset over mainland Australia. *Water Resources Research* 45: W07405.
- Liu Z, Yuan D, Dreybrodt W (2005) Comparative study of dissolution rate-determining mechanisms of limestone and dolomite. *Environmental Geology* 49:274–279.
- Liu Z, Zhao J (1999) Contribution of carbonate rock weathering to the atmospheric CO₂ sink. *Environmental Geology* 39:1053–1058
- Lock MA, Wallace RR, Costerton JW, Ventullo RM, Charlton SE (1984) River epilithon: toward a structural-functional model. *Oikos* 42:10-22.
- Lorenz P, Eck J (2005) Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology* 3: 510-516.
- Lotrario JB, Stuart BJ, Lam T, Arands RR, O'Connor OA, Kosson DS (1995) Effects of sterilization methods on the physical characteristics of soil: implications for sorption isotherm analyses. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 54 : 668–675.
- Luo Y (2007) Terrestrial carbon cycle feedback to climate warming, *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 38:683-712.
- Luo Y, Zhou X (2006) *Soil Respiration and the Environment*, Academic, San Diego, Calif.
- Luo YM, Yan WD, Christie P (2001) Soil solution dynamics of Cu and Zn in a Cu- and Zn-polluted soil as influenced by γ -irradiation and Cu-Zn interaction. *Chemosphere* 42: 179–184.

M

- Ma J, Li Y, Liu R (2015) The abiotic contribution to total CO₂ flux for soils in arid zone. *Biogeosciences* 12 : 11217-11244.
- Ma RY, Zhang JL, Cavaleri MA, Sterck F, Strijk JS, Cao KF (2015): Convergent Evolution towards High Net Carbon Gain Efficiency Contributes to the Shade Tolerance of Palms (Arecaceae). *PLOS ONE* 10.
- Maire V, Alvarez G, Colombet J, Comby A, Despinasse R, Dubreucq E, Joly M, Lehours AC, Perrier V, Shahzad T, Fontaine S (2012) An unknown respiration pathway substantially contributes to soil CO₂ emissions, *Biogeosciences Discussions* 9: 8663–8691.
- Maire V, Alvarez G, Colombet J, Comby A, Despinasse R, Dubreucq E, Joly M, Lehours AC, Perrier V, Shahzad T, Fontaine S (2013) An unknown oxidative metabolism substantially contributes to soil CO₂ emissions, *Biogeosciences* 10: 1155–1167.

- Maire V, Alvarez G, Colombet J, Comby A, Despinasse R, Dubreucq E, Joly M, Lehours AC, Perrier V, Shahzad T, Fontaine S (2012) An unknown respiration pathway substantially contributes to soil CO₂ emissions, *Biogeosciences Discussions* 9: 8663–8691.
- Maire, V., Alvarez, G., Colombet, J., Comby, A., Despinasse, R., Dubreucq, E., Joly, M., Lehours, A.-C., Perrier, V., Shahzad, T. and Fontaine, S.: An unknown oxidative metabolism substantially contributes to soil CO₂ emissions, *Biogeosciences*, 10(2), 1155–1167, doi:10.5194/bg-10-1155-2013, 2013.
- Majcher EH, Chorover J, Bollag JM, Huang PM (2000) Evolution of CO₂ during birnessite-induced oxidation of ¹⁴C-labeled catechol. *Soil Science Society of America Journal* 64: 157–163.
- Majcher EH, Chorover J, Bollag JM, Huang PM (2000) Evolution of CO₂ during birnessite-induced oxidation of ¹⁴C-labeled catechol. *Soil Science Society of America Journal* 64: 157–163
- Makoi JHR, Ndakidemi PA (2008) Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. *Afr J Biotechnol* 7:181–191.
- Manzoni S, Porporato A (2009) Soil carbon and nitrogen mineralization: theory and models across scales. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 1355–1379.
- Marschner B, Brodowski S, Dreves A *et al.* (2008) How relevant is recalcitrance for the stabilization of organic matter in soils? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171 : 91–110.
- Marschner B, Kalbitz K (2003) Controls on bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma* 113 : 211–235.
- Marschner, B. and Kalbitz, K.: Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils, *Geoderma*, 113(3–4), 211–235, doi:10.1016/S0016-7061(02)00362-2, 2003.
- Mathesius U (2009) Comparative proteomic studies of root-microbe interactions. *Journal of Proteomics* 72: 353–366.
- Mayorga E, Seitzinger SP, Harrison JA, Dumon E, Beusen AHW, Bouwman AF, Fekete BM, Kroeze C, van Drecht G (2010) Global nutrient export from WaterSheds 2 (NEWS 2): model development and implementation, *Environmental Modelling Software* 25: 837–853.
- McBride MB (1987) Adsorption and Oxidation of Phenolic Compounds by Iron and Manganese Oxides¹, *Soil Science Society of America Journal* 51: 1466–1472.
- McCulley RL, Archer SR, Boutton TW, Hons FM, Zuberer DA (2004) Soil respiration and nutrient cycling in wooded communities developing in grassland. *Ecology* 85:2804–2817
- McDowell, N. G., Fisher, R. A., Xu, C., Domec, J. C., Hölttä, T., Mackay, D. S., Sperry, J. S., Boutz, A., Dickman, L., Gehres, N., Limousin, J. M., Macalady, A., Martínez-Vilalta, J., Mencuccini, M., Plaut, J. A., Ogée, J., Pangle, R. E., Rasse, D. P., Ryan, M. G., Sevanto, S., Waring, R. H., Williams, A. P., Yezzer, E. A. and Pockman, W. T.: Evaluating theories of drought-induced vegetation mortality using a multimodel–experiment framework, *New Phytol*, 200(2), 304–321, doi:10.1111/nph.12465, 2013.
- McLaren AD, Luse RA, Skujins JJ (1962) Sterilization of soil by irradiation and some further observations on soil enzyme activity. *Proceedings of the Soil Science Society of America* 26: 371–377.
- McNamara NP, Black HIJ, Beresford NA, Parekh NR (2003) Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Applied Soil Ecology* 24:117–132.
- Mearns LO, Giorgi F, McDaniel L, Shields C (1995) Results from the Model Evaluation Consortium for Climate Assessment Analysis of daily variability of precipitation in a nested regional climate model: comparison with observations and doubled CO₂ results. *Global and Planetary Change* 10, 55–78.
- Mearns, L. O., Giorgi, F., McDaniel, L. and Shields, C.: Results from the Model Evaluation Consortium for Climate Assessment Analysis of daily variability of precipitation in a nested regional climate model: comparison with observations and doubled CO₂ results, *Global and Planetary Change*, 10(1), 55–78, doi:10.1016/0921-8181(94)00020-E, 1995.
- Meentemeyer V (1978) Macroclimate and Lignin Control of Litter Decomposition Rates. *Ecology* 59: 465–472.

- Melillo JM, Aber JD, Muratore JF (1982) Nitrogen and lignin control of hardwood leaf litter decomposition dynamics. *Ecology* 63:621-626.
- Mielnick P, Dugas WA, Mitchell K, Havstad K (2005) Long-term measurements of CO₂ flux and evapotranspiration in a Chihuahuan desert grassland. *Journal of Arid Environments* 60: 423-436.
- Mikutta M, Kleber R J (2005) Poorly crystalline minerals protect organic carbon in clay subfractions from acid subsoil horizons *Geoderma* 128:106-115.
- Mikutta R, Mikutta C, Kalbitz K, Scheel T, Kaiser K, Jahn R (2007) Biodegradation of forest floor organic matter bound to minerals via different binding mechanisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71: 2569-2590.
- Miller, A. E., Schimel, J. P., Meixner, T., Sickman, J. O. and Melack, J. M.: Episodic rewetting enhances carbon and nitrogen release from chaparral soils, *Soil Biology and Biochemistry*, 37(12), 2195-2204, doi:10.1016/j.soilbio.2005.03.021, 2005.
- Moorhead DL, Reynolds JF (1991) A general model of litter decomposition in the northern Chihuahuan Desert. *Ecological Modelling* 59: 197-219.
- Moorhead DL, Sinsabaugh RL (2006) A theoretical model of litter decay and microbial interaction. *Ecological Monographs* 76: 151-174.
- Mopper K, Zhou X, Keiber RJ, Kieber DJ, Sikorski RJ, Jones RD (1991) Photochemical degradation of organic carbon and its impact on the oceanic carbon cycle. *Nature* 353: 60-62.
- Mopper K, Kieber D, Stubbins A (2015) Marine photochemistry: Processes and impacts, in *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, edited by D. A. Hansell and C. A. Carlson, 2nd ed., Elsevier, San Diego, Calif
- Moran MA, Hodson RE (1994) Dissolved humic substances of vascular plant origin in a coastal marine environment. *Limnology and Oceanography* 39: 762-771.
- Moran MA, Zepp RG (1997) Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 42:1307-1316
- Morse JW, Arvidson RS (2002) The dissolution kinetics of major sedimentary carbonate minerals. *Earth Science Reviews* 58:51-84.
- Moyano FE, Manzoni S, Chenu C (2013) Responses of soil heterotrophic respiration to moisture availability: an exploration of processes and models. *Soil Biology and Biochemistry* 59: 72-85.
- Moyano, F. E., Manzoni, S. and Chenu, C.: Responses of soil heterotrophic respiration to moisture availability: An exploration of processes and models, *Soil Biology and Biochemistry*, 59, 72-85, doi:10.1016/j.soilbio.2013.01.002, 2013.
- Musy A, Soutter M (1991) *Physique du sol*. PPUR presses polytechniques.

N

- Naidja, A.: Oxidative Decarboxylation of Isocitric Acid in the Presence of Montmorillonite, *Clay Minerals*, 25(1), 27-37, doi:10.1180/claymin.1990.025.1.04, 1990.
- Nakano T, Kuniyoshi S, Fukuda M (2000) Temporal variation in methane emission from tundra wetlands in a permafrost area, northeastern Siberia. *Atmospheric Environment* 34: 1205-1213.
- Nannipieri P (2006) Role of stabilised enzymes in microbial ecology and enzyme extraction from soil with potential applications in soil proteomics. *Nucleic Acids and Proteins in Soil* 8:75-94.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54: 655-670.
- Nannipieri P, Kandeler E, Ruggiero P (2002) Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-33.

- Nègre M, Gennari M, Crecchio C, Ruggiero P (1995) Effect of ethylene-oxide sterilization on soil organic matter, spectroscopic analysis, and adsorption of acifluorfen. *Soil Science* 159: 199–206.
- Nelson D, Cox M (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, New York, p. 1152.

O

- Okazaki M, Hirata E, Tensho K (1983) TTC reduction in submerged soils. *Soil Science and Plant Nutrition* 29: 489–497.
- Olander LP, Vitousek PM (2000) Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry* 49: 175–190.
- Oo AZ, Nguyen L, Win KT, Cadisch G, Bellingrath-Kimura SD (2013) Toposequential variation in methane emissions from double-cropping paddy rice in Northwest Vietnam. *Geoderma* 209–210:41–49.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. and Tran, L.-S. P.: Response of plants to water stress, *Front. Plant Sci.*, 5, 86, doi:10.3389/fpls.2014.00086, 2014.
- Osono T (2007) Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research* 22: 955–97.
- Øvreås L (2000) Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environment. *Ecology Letters* 3: 236–251.

P

- Palka L (1993) The growth of protozoa in sterilized soil. II. Dynamic of the ciliate community. *European Journal of Soil Biology* 29: 67–71.
- Pancotto VA, Sala OE, Cabello M, López N, Robson TM, Ballaré CL, Caldwell MM, Scopel AL (2003) Solar UV-B decreases decomposition in herbaceous plant litter in Tierra del Fuego, Argentina: potential role of an altered decomposer community. *Global Change Biology* 9: 1465–1474.
- Pang Y, Liu X, Ma Y, Chernin L, Berg G, Gao K (2009) Induction of systemic resistance, root colonisation and biocontrol activities of the rhizospheric strain of *Serratia plymuthica* are dependent on N-acyl homoserine lactones. *European Journal of Plant Pathology* 124: 261–268.
- Pantoja S, Lee C, Marecek JF (1997) Hydrolysis of peptides in seawater and sediment. *Marine Chemistry* 57:25–40.
- Parales RE, Harwood CS (2002) Bacterial chemotaxis to pollutants and plant derived aromatic molecules. *Current Opinion in Microbiology* 5: 266–273.
- Parker FE, Vincent JM (1981) Sterilization of peat by gamma radiation. *Plant Soil* 61: 285–293.
- Parton W, Schimel DS, Cole C, Ojima D (1987) Analysis of factors controlling soil organic matter levels in Great Plains grasslands. *Soil Science Society of America Journal* 51 : 1173–1179.
- Peterson GH (1962) Respiration of soil sterilized by ionizing radiations. *Soil Science* 94: 71–74.
- Petit JR, Jouzel J, Raynaud D, Barkov NI, Barnola JM, Basile I, Bender M, Chappellaz J, Davis M, Delaygue G, Delmotte M, Kotlyakov VM, Legrand M, Lipenkov VY, Lorius C, Pépin L, Ritz C, Saltzman E, Stievenard M (1999) Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399: 429–436.
- Plestenjak G, Eler K, Vodnik D, Ferlan M, Čater M, Kanduč T, Simončič P, Ogrinc N (2012) Sources of soil CO₂ in calcareous grassland with woody plant encroachment. *Journal of Soils and Sediments*. 12: 1327–1338.
- Pohlman AA, McColl, J. G (1989) Organic Oxidation and Manganese and Aluminum Mobilization in Forest Soils. *Soil Science Society of America Journal* 53: 686–690.

- Pokrovsky OS, Golubev SV, Schott J (2005) Dissolution kinetics of calcite, dolomite and magnesite at 25°C and 0 to 50 atm pCO₂. *Chemical Geology* 217:239–255.
- Poll C, Ingwersen J, Stemmer M, Gerzabek MH, Kandeler E (2006) Mechanisms of solute transport affect small-scale abundance and function of soil microorganisms in the detritusphere. *European Journal of Soil Science* 57: 583-595.
- Popenoe H, Eno CF (1962) The effect of gamma irradiation on the microbial population of soil. *Soil Science Society of America* 26: 164–167.
- Powlson DS, Jenkinson DS (1976) The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. II. Gamma irradiation, autoclaving, air-drying and fumigation. *Soil Biology and Biochemistry* 8: 179–188.
- Prentice IC, Farquhar GD, Fasham MJR, Goulden ML and Heimann M 2001. The carbon cycle and atmospheric CO₂. The Third Assessment Report of Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), Chapter 3, Cambridge University Press, Cambridge.

Q

- Quideau SA (2002) Organic matter accumulation. In: *Encyclopedia of soil science*, pp. 891-894. New York, USA, Marcel Dekker Inc.
- Quiquampoix H (2000) Mechanisms of protein adsorption on surfaces and consequences for extracellular enzyme activity in soil. In: Bollag J, Stotzky G, editors. *Soil Biochemistry*. New York: Marcel Dekker. pp. 171–206.
- Quiquampoix H, Burns RG (2007) Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. *Elements* 3: 401-406.

R

- Raich JW, Potter CS (1995) Global patterns of carbon dioxide emissions from soils. *Global Biogeochemical Cycles* 9: 23-36.
- Raich JW, Schlesinger WH (1992) The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate. *Tellus* 44B: 81-99.
- Ramnarine R, Wagner-Riddle C, Dunfield KE, Voroney RP (2012) Contributions of carbonates to soil CO₂ emissions. *Canadian Journal of Soil Science* 92:599-607.
- Ramnarine, R., Wagner-Riddle, C., Dunfield, K. E. and Voroney, R. P.: Contributions of carbonates to soil CO₂ emissions, *Can. J. Soil. Sci.*, 92(4), 599–607, doi:10.4141/cjss2011-025, 2012.
- Ramsay AJ, Bawden AD (1983) Effects of sterilization and storage on respiration, nitrogen status and direct counts of soil bacteria using acridine orange. *Soil Biology and Biochemistry* 15 : 263–268.
- Rastetter EB, Ryan MG, Shaver GR, Melillo JM, Nadelhoffer KJ, Hobbie JE, Abet JD (1991) A general model describing the responses of the C and N cycles in terrestrial ecosystems to changes in CO₂, climate, and N deposition. *Tree Physiology* 9: 101-126.
- Ratledge C (1994) *Biochemistry of Microbial Degradation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 590 pp.
- Redfield RJ (2002) Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends in Microbiology* 10: 365-370.
- Reichstein M, Kätterer T, Andrén O, Ciais P, Schulze ED, Cramer W, Papale D, Valentini R (2005) Temperature sensitivity of decomposition in relation to soil organic matter pools: critique and outlook. *Biogeosciences* 2:317-321.
- Rice CW (2002) Organic matter and nutrient dynamics. In Rattan Lal (ed). *Encyclopedia of Soil Science*. Marcel Dekker, New York.
- Rillig MC, Mummey DL (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* 171: 41-53.

- Ritz K, McNicol JW, Nunan N, Grayston S, Millard P, Atkinson D, Gollotte A, Habeshaw D, Boag B, Clegg CD, Griffiths BS, Wheatley RE, Glover LA, McCaig AE, Prosser JI (2004) Spatial structure in soil chemical and microbiological properties in an upland grassland. *FEMS Microbiology Ecology* 49:191-205.
- Rizzuti AM, Cohen AD, Stack EM (1996) Effect of irradiating peats on their ability to extract BTEX and cadmium from contaminated water. *Journal of Environmental Science and Health A* 31: 1917-1949.
- Robert M, Chenu C (1992) Interactions between microorganisms and soil minerals. In: Stotzky, G., Bollag, J.-M. (Eds.), *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 307-404.
- Rodrigo A, Recus S, Neel C, Mary B (1997) Modelling temperature and moisture effects on carbon-N transformations in soils: Comparison of nine models. *Ecological Modelling* 102: 325-339
- Romani AM, Fund K, Artigas J, Schwartz T, Sabater S, Obst U (2008) Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microbial Ecology* 56:427-436.
- Rovira AD, Bowen GD (1969) The use of radiation-sterilized soil to study the ammonium nutrition of wheat. *Australian Journal of Soil Research* 7: 57-65.
- Rozema J, Tosserams M, Nelissen HJM, van Heerwaarden L, Broekman RA, Flierman N (1997) Stratospheric ozone reduction and ecosystem processes: enhanced UV-B radiation affects chemical quality and decomposition of leaves of the dune grassland species. *Calamagrostis epigeios*. *Plant Ecology*, 128: 285-294.
- Ruamps LS, Nunan N, Chenu C (2010) Microbial biogeography at the soil pore scale. *Soil Biology and Biochemistry* 43:280-286.
- Ruggiero P, Dec J, Bollag JM (1996) Soil as a catalytic system. In: Bollag JM, Stotzky G (Eds) *Soil biochemistry*. Marcel Dekker, New York, pp 79-122.
- Rutledge S, Campbell DI, Baldocchi D, Schipper LA (2010) Photodegradation leads to increased carbon dioxide losses from terrestrial organic matter. *Global Change Biology* 16: 3065-3074.
- Ryan MG, Law BE (2005) Interpreting, measuring, and modeling soil respiration. *Biogeochemistry* 73:3-27

S

- Salonius PO, Robinson JB, Chase FE (1967) A comparison of autoclaved and gamma-irradiated soils as media for microbial colonization experiments. *Plant Soil* 27: 239-248.
- Sanaullah, M., Chabbi, A., Girardin, C., Durand, J.-L., Poirier, M. and Rumpel, C.: Effects of drought and elevated temperature on biochemical composition of forage plants and their impact on carbon storage in grassland soil, *Plant Soil*, 374(1-2), 767-778, doi:10.1007/s11104-013-1890-y, 2013.
- Sandaa RA, Torsvik V, Enger Ø, Daae FL, Castberg T, Hahn D (1999) Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 237-251.
- Sandoli RL, Ghiorse WC, Madsen EL (1996) Regulation of microbial phenanthrene mineralization in sediment samples by sorbent-sorbate contact time, inocula and gamma irradiation induced sterilization artifacts. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15:1901-1907.
- Savage K, Davidson EA, Richardson AD, Hollinger DY (2009) Three scales of temporal resolution from automated soil respiration measurements, *Agricultural and Forest Meteorology* 14: 2012-2021.
- Sayer EJ, Heard MS, Grant HK, Marthews TR, Tanner EVJ (2011) Soil carbon release enhanced by increased tropical forest litterfall. *Nature Climate Change* 1: 304-307.
- Scharlemann JP, Tanner EV, Hiederer R, Kapos V (2014) Global soil carbon: understanding and managing the largest terrestrial carbon pool. *Carbon Management* 5: 81-91

- Scheffer F, Meyer B, Niederbudde EA (1959) Huminstoffbildung unter katalytischer Einwirkung natürlich vorkommender Eisenverbindungen im Modellversuch. *Zeit Pflanzenernaehr Dueng Boden.* 87: 26–44.
- Schimel J (1995) "Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure" in *Arctic and Alpine Biodiversity: Patterns, Causes, and Ecosystem Consequences*, Eds FS Chapin and C Korner (Berlin: Springer-Verlag), pp. 239–254.
- Schimel JP, Gullledge JM, Cleincurley JS, Lindstrom J E, Braddock JF (1999) Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 831–838.
- Schimel JP, Weintraub MN (2003) The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry* 35:549–563.
- Schimel, D. S.: Terrestrial ecosystems and the carbon cycle, *Global Change Biology*, 1(1), 77–91, doi:10.1111/j.1365-2486.1995.tb00008.x, 1995.
- Schimel, J. P., Gullledge, J. M., Clein-Curley, J. S., Lindstrom, J. E. and Braddock, J. F.: Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga, *Soil Biology and Biochemistry*, 31(6), 831–838, doi:10.1016/S0038-0717(98)00182-5, 1999.
- Schindlbacher A, Borken W, Djukic I, Brandstätter C, Spötl C, Wanek W (2015) Contribution of carbonate weathering to the CO₂ efflux from temperate forest soils. *Biogeochemistry* 124:273–290.
- Schlesinger WH (1997) *Biogeochemistry: an analysis of global change*. 2nd Ed. Academic Press, San Diego, CA, 588pp.
- Schlesinger, W. H. and Andrews, J. A.: Soil respiration and the global carbon cycle, *Biogeochemistry*, 48(1), 7–20, doi:10.1023/A:1006247623877, 2000.
- Schloss PD, Handelsman J (2006) Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Computational Biology* 2: 786–793.
- Schmidt MWI, Torn MS, Abiven S, Dittmar T, Guggenberger G, Janssens IA, Kleber M, Kögel-Knabner I, Lehmann J, Manning DAC, Nannipieri P, Rasse DP, Weiner S, Trumbore SE (2011) Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 478:49–56.
- Schneider T, Keiblinger KM, Schmid E, Sterflinger-gleichner K (2012). Who is who in litter decomposition? Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions. *The ISME Journal* 6: 1749–1762.
- Schwarz WH, Zverlov VV (2006) Protease inhibitors in bacteria: an emerging concept for the regulation of bacterial protein complexes? *Molecular Microbiology* 60:1323–1326.
- Scully NM, Cooper WJ, Tranvik LJ (2003) Photochemical effects on microbial activity in natural waters: the interaction of reactive oxygen species and dissolved organic matter, *FEMS Microbiology and Ecology* 46: 353–357.
- Seitzinger SP, Harrison JA, Dumont E, Beusen AHW, Bouwman AF (2005) Sources and delivery of carbon, nitrogen, and phosphorus to the coastal zone: an overview of Global NEWS models. *Global Biogeochemical Cycles* GB4S05
- Serrano-Ortiz P, Roland M, Sanchez-Moral S, Janssens IA, Domingo F, Goddéis Y, Kowalski AS (2010) Hidden, abiotic CO₂ flows and gaseous reservoirs in the terrestrial carbon cycle: review and perspectives. *Agricultural and Forest Meteorology* 150:321–329.
- Sexstone A, Revsbech N, Parkin T, Tiedje J (1985) Direct measurement of oxygen profiles and denitrification rates in soil aggregates. *Soil Science Society of America Journal* 49: 645–651
- Shank EA, Kolter R (2009) New developments in microbial interspecies signaling. *Current Opinion in Microbiology* 12: 205–214.
- Shields LM, Durrell LW, Sparrow AH (1961) Preliminary observations on radiosensitivity of algae and fungi from soils of the Nevada test site. *Ecology* 42: 440–442.
- Shih KL, Souza KA (1978) Degradation of biochemical activity in soil sterilized by dry heat and gamma radiation. *Origins Life* 9: 51–63.
- Shindo H (1992) Relative effectiveness of short-range ordered Mn(IV), Fe(III), Al, and Si oxides

- in the synthesis of humic acids from phenolic compounds. *Soil Science and Plant Nutrition* 38: 459-465.
- Shindo H, Huang PM (1984a) Catalytic Effects of Manganese (IV), Iron(III), Aluminum, and Silicon Oxides on the Formation of Phenolic Polymers1. *Soil Science Society of America Journal* 48: 927-934.
- Shindo H, Huang PM (1985a) Catalytic polymerization of hydroquinone by primary minerals. *Soil Science* 139: 505-511
- Siegenthaler U, Stocker TF, Monnin E, Lüthi D, Schwander J, Stauffer B, Raynaud D, Barnola JM, Fischer H, Masson-Delmotte V, Jouzel J (2005) Stable Carbon Cycle; Climate Relationship During the Late Pleistocene. *Science* 310: 1313-1317.
- Singer A, Huang PM (1990) Effects of humic acid on the crystallization of aluminum hydroxides. *Clays and Clay Minerals* 38: 47-52.
- Sinsabaugh RL (2010) Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 391-404.
- Sinsabaugh RL, Antibus RK, Linkins AE, McClaugherty CA, Rayburn L, Rebert D, Weiland T (1993) Wood decomposition: nitrogen and phosphorus dynamics in relation to extracellular enzyme activity. *Ecology* 74: 1586-1593.
- Sinsabaugh RL, Hill BH, Follstad Shah JJ (2009) Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature Reviews Microbiology* 462: 795-799.
- Sinsabaugh RL, Moorhead DL (1994) Resource allocation to extracellular enzyme production: a model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1305-1311.
- Sistla SA, Schimel JP (2012) Stoichiometric flexibility as a regulator of carbon flux in terrestrial ecosystems under change. *New Phytologist* 196:68-78.
- Six J, Bossuyt H, Degryze S, Denef K (2004) A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research* 79: 7-31
- Six J, Frey SD, Thiet RK, Batten KM (2006) Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal* 70: 555-569.
- Six J, Paustian K, Elliott ET, Combrink C (2000) Soil Structure and Organic Matter. *Soil Science Society of America Journal* 64: 681.
- Skujins JJ, McLaren AD (1968) Persistence of enzymatic activities in stored and geologically preserved soils. *Enzymologia* 34: 213-221.
- Skyring GW, Thompson JP (1966) The availability of organic matter in dried and undried soil, estimated by an anaerobic respiration technique. *Plant Soil* 24: 289-298.
- Smart DR, Peñuelas J (2005) Short-term CO₂ emissions from planted soil subject to elevated CO₂ and simulated precipitation. *Applied Soil Ecology* 28:247-57.
- Smith DR, Chapman MR (2010) Economical evolution: microbes reduce the synthetic cost of extracellular proteins. *MBIO* 1: e00131-10.
- Smith P, Fang C, Dawson JJC, Moncrieff JB (2008) Impact of global warming on soil organic carbon. *Advances in Agronomy* 97: 1-43.
- Smith WK, Gao W, Steltzer H, Wallenstein MD, Tree R (2010) Moisture availability influences the effect of ultraviolet-B radiation on leaf litter decomposition. *Global Change Biology* 16: 484-495.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 12115-12120.
- Solomon, S., Plattner, G.-K., Knutti, R. and Friedlingstein, P.: Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions, *PNAS*, 106(6), 1704-1709, doi:10.1073/pnas.0812721106, 2009.
- Song MH, Jiang J, Cao GM, Xu X (2010) Effects of temperature, glucose and inorganic nitrogen inputs on carbon mineralization in a Tibetan alpine meadow soil. *European Journal of Soil Biology* 46:375-380.

- Spaccini R, Piccolo A, Haberhauer G, Gerzabek MH (2000) Transformation of organic matter from maize residues into labile and humic fractions of three European soils as revealed by C-13 distribution and CPMAS-NMR spectra. *European Journal of Soil Science* 51:583-94.
- Sparling GP, Berrow ML (1985) The effect of air-drying, γ -irradiation and chloroform fumigation of soil on extractability of trace elements. *Journal of Agricultural Science* 104: 223-226.
- Steele HL, Streit WR (2005) Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiology Letters* 247: 105-111.
- Stevenson BA, Verburg PSJ (2006) Effluxed CO₂- ¹³C from sterilized and unsterilized treatments of a calcareous soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 1727-1733.
- Stevenson FJ (1982) *Humus Chemistry*, John Wiley & Sons, New York.
- Stevenson FJ (1994) *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York
- Stockmann U, Adams MA, Crawford JW, Field DJ, Henakaarchchi N, Jenkins M, Minasny B, McBratney AB, de Courcelles VD, Singh K, Wheeler I, Abbott L, Angers DA, Baldock J, Bird M, Brookes PC, Chenu C, Jastrow JD, Lal R, Lehmann J, O'Donnell AG, Parton WJ, Whitehead D, Zimmermann M (2013) The knowns, known unknowns and unknowns of sequestration of soil organic carbon *Agriculture Ecosystems and Environment* 164: 80-99
- Stotzky G (1986) Influence of soil mineral colloids and metabolic processes, growth adhesion, and ecology of microbes and viruses In: Huang M, Schnitzer M (eds) *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes*, special publication 17 Soil Science Society of America, Madison, pp 305-428.
- Stotzky G, Mortensen JL (1959) Effect of gamma radiation on growth and metabolism of microorganisms in an organic soil. *Proc. Soil Science Society of America* 23: 125-127.
- Streit WR, Schmitz RA (2004) Metagenomics: the key to uncultured microbes *Current Opinion in Microbiology* 7: 492-498.
- Strickland MS, Lauber C, Fierer N, Bradford MA (2009) Testing the functional significance of microbial community composition. *Ecology* 90: 441-451.
- Stroetmann I, Kämpfer P, Dott W (1994) Untersuchungen zur effizienz von sterilisationsverfahren an unterschiedlichen böden (in German, with English Abstract). *Zbl. Hyg. Umweltmed* 195: 111-120.
- Stursova, M, Sinsabaugh RL (2008) Stabilization of oxidative enzymes in desert soil may limit organic matter accumulation *Soil Biology and Biochemistry* 40: 550-553
- Swift MJ, Heal OW, Anderson JM (1979) *Decomposition in terrestrial ecosystems* Blackwell, Oxford.
- Syvitski JPM, Vörösmarty CJ, Kettner AJ, Green P (2005) Impact of humans on the flux of terrestrial sediment to the global coastal ocean. *Science* 308: 376-380.
- Szramek K, McIntosh JC, Williams EL, Kanduc T, Ogrinc N, Walter LM (2007) Relative weathering intensity of calcite versus dolomite in carbonate-bearing temperate zone watersheds: carbonate geochemistry and fluxes from catchments within the St. Lawrence and Danube river basins. *Geochemistry Geophysics Geosystems* 8:Q04002

T

- Tabatabai, MA, Dick, WA, 2002 Enzymes in soil: research and developments in measuring activities In: Burns, RG, Dick, RP (Eds), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications* Marcel Dekker, New York, pp 567-596.
- Taggart M, Heitman JL, Shi W, Vepraskas M (2012) Temperature and water content effects on carbon mineralization for sapric soil material. *Wetlands*, 32:939-944.

- Tamir G, Shenker M, Heller H, Bloom P R, Bar-Tal P (2011) Can soil carbonate dissolution lead to overestimation of soil respiration? *Soil Science Society of America Journal* 75: 1414-1422.
- Tarnocai C, Canadell JG, Schuur EAG, Kuhry P, Mazhitova G, Zimov S (2009) Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region, *Global Biogeochemical Cycles* 23: GB2023.
- Tate RL (2002) Microbiology and enzymology of carbon and nitrogen cycling. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, Inc., Basel, Switzerland, pp. 227-248.
- Tate RL (1987) *Soil organic matter: biological and ecological effects*. New York, USA, John Wiley & Sons. 291 pp.
- Tebbe CC, Reber HH (1991) Degradation of [¹⁴C] phosphinothricin (glufosinate) in soil under laboratory conditions: effects of concentration and soil amendments on ¹⁴CO₂ production. *Biology and Fertility of Soils* 11: 62-67.
- Thiessen S, Gleixner G, Wutzler T, Reichstein M (2013) Both priming and temperature sensitivity of soil organic matter decomposition depend on microbial biomass – An incubation study. *Soil Biology and Biochemistry* 57: 739-748.
- Thompson JP (1990a) Soil sterilization methods to show VA-mycorrhizae aid P and Zn nutrition of wheat in vertisols. *Soil Biology and Biochemistry* 22: 229-240.
- Thompson JP (1990b) Treatments to eliminate root-lesion nematode (*Pratylenchus Thornei* Sher & Allen) from a vertisol. *Nematologica* 36: 123-127.
- Thompson TD, Moll WF (1973) Oxidative Power of Smectites Measured by Hydroquinone. *Clays and Clay Minerals* 21: 337-350.
- Throop HL, Archer SR (2009) Resolving the dryland decomposition conundrum: some new perspectives on potential drivers. In: *Progress in Botany*, Vol. 70 (eds Lüttge U, Beyshchlag W, Büdel B, Francis D), pp. 171-194. Springer-Verlag, Berlin.
- Tibbett M (2002) Considerations on the use of the p-nitrophenol phosphomonoesterase assay in the study of the phosphorus nutrition of soil borne fungi. *Microbiological Research* 157: 221-231.
- Tiemann LK, Billings SA (2011) Changes in variability of soil moisture alter microbial community C and N resource use *Soil Biology and Biochemistry* 43: 1837-1847.
- Todd-Brown KEO, Hopkins FM, Kivlin SN, Talbot JM, Allison SD (2012) A framework for representing microbial decomposition in coupled climate models. *Biogeochemistry* 109:19-33.
- Totsche KU, Rennert T, Gerzabek MH, Kögel-Knabner I, Smalla K, Spiteller M, Vogel H-J (2010) Biogeochemical interfaces in soil: the interdisciplinary challenge for soil science. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 173 : 88-99.
- Tranvik LJ, Downing JA, Cotner JB, Loiselle SA, Striegl RG, Ballatore TJ, Dillon P, Finlay K, Fortino K, Knoll LB, Kortelainen PL, Kutser T, Larsen S, Laurion I, Leech DM, McCallister SL, McKnight DM, Melack JM, Overholt E, Porter JA, Prairie Y, Renwick WH, Roland F, Sherman BS, Schindler DW, Sobek S, Tremblay A, Vanni MJ, Verschoor AM, von Wachenfeldt E, Weyhenmeyer GA (2009) Lakes and reservoirs as regulators of carbon cycling and climate. *Limnology and Oceanography* 54:2298-2314
- Trenberth KE (1999) Conceptual Framework for Changes of Extremes of the Hydrological Cycle with Climate Change. *Climatic Change* 42: 327-339.
- Trenberth, K. E.: Conceptual Framework for Changes of Extremes of the Hydrological Cycle with Climate Change, *Climatic Change*, 42(1), 327-339, doi:10.1023/A:1005488920935, 1999.
- Treseder KK, Vitousek PM (2001) Effects of soil nutrient availability on investment in acquisition of N and P in Hawaiian Rain Forests *Ecology* 82:946-954.
- Trevors JT (1996) Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods* 26: 53-59.
- Trumbore S (2000) Age of soil organic matter and soil respiration: radiocarbon constraints on belowground C dynamics. *Ecological Applications* 10: 399-411.

- Trumbore S (2009) Radiocarbon and soil carbon dynamics. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 37:47–66.
- Tuominen L, Kairesalo T, Hartikainen H (1994) Comparison of methods for inhibiting bacterial activity in sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3454–3457.
- Turner, B. L., Kasperson, R. E., Matson, P. A., McCarthy, J. J., Corell, R. W., Christensen, L., Eckley, N., Kasperson, J. X., Luers, A., Martello, M. L., Polsky, C., Pulsipher, A. and Schiller, A.: A framework for vulnerability analysis in sustainability science, *PNAS*, 100(14), 8074–8079, doi:10.1073/pnas.1231335100, 2003.

V

- van Hees PAW, Jones DL, Finlay R, Godbold DL, Lundström US (2005) The carbon we do not see—the impact of low molecular weight compounds on carbon dynamics and respiration in forest soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1–13.
- Van-Camp L, Bujarrabal B, Gentile AR, Jones RJA, Montanarella L, Olazabal C, Selvaradjou SK (2004) Reports of the technical Working Groups Established under the Thematic Strategy for Soil Protection. Volume I-Introduction and Executive Summary. EUR 21319 EN/1.
- Voets JP, Dedeken M, Bessems E (1965) The behaviour of some amino acids in gamma irradiated soils. *Naturwissenschaften* 52: 476.
- von Bodman SB, Willey JM, Diggle SP (2008) Cell-cell communication in bacteria: united we stand *Journal of Bacteriology* 190: 4377-4391.
- von Lütow M, Kögel-Knabner I, Ekschmitt K, Matzner E, Guggenberger G, Marschner B, Flessa H (2006) Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions-a review. *European Journal of Soil Science* 57: 426-445.

W

- Wallenstein MD, Burns RG (2011) Ecology of extracellular enzyme activities and organic matter degradation in soil: a complex community-driven process In: Dick, RP (Ed), *Methods of Soil Enzymology* Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp 35-55
- Wallenstein MD, Weintraub MN (2008) Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes *Soil Biology and Biochemistry* 40:2098-2106.
- Wan S, Luo Y (2003) Substrate regulation of soil respiration in a tallgrass prairie: results of a clipping and shading experiment. *Global Biogeochemical Cycles* 17:1-12.
- Wander M (2004) Soil organic matter fractions and their relevance to soil function. In: K. Magdoff, R. R. Weil (eds.) *Soil organic matter in sustainable agriculture*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp: 67-102.
- Wang MC (1989) Pyrogallol Transformations as Catalyzed by Nontronite, Bentonite, and Kaolinite, *Clays and Clay Minerals*, 37: 525-531.
- Wang MC, Huang PM (1986) Humic macromolecule Interlayering in nontronite through interaction with phenol monomers. *Nature* 323: 529-531.
- Wang MC, Huang PM (1989) Advances in Humic Substances Research Abiotic ring cleavage of pyrogallol and the associated reactions as catalyzed by a natural soil. *Science of The Total Environment* 81: 501-510.
- Wang MC, Huang PM (1992) Significance of Mn(IV) oxide in the abiotic ring cleavage of pyrogallol in natural environments. *Science of The Total Environment* 113: 147-157.
- Wang MC, Huang PM (2000a): Characteristics of pyrogallol-derived polymers formed by catalysis of oxides. *Soil Science* 165: 737-747.
- Wang MC, Huang PM (2000b): Ring cleavage and oxidative transformation of pyrogallol

- catalyzed by Mn, Fe, Al, and Si oxides. *Soil Science* 165: 934-942.
- Wang TSC, Kao MM, Li SW (1978a): A new proposed mechanism of formation of soil humic substance. *Studies and Essays in Commemoration of the Golden Jubilee of Academia Sinica* 357-372.
- Wang TSC, Li SW (1977) Clay minerals as heterogeneous catalysts in preparation of model humic substances. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. 140: 669-676.
- Wang TSC, Li SW, Ferng YL (1978c): Catalytic polymerization of phenolic compounds by clay minerals. *Soil Science* 126: 81-86.
- Wang TSC, Li SW, Huang PM (1978b): Catalytic polymerization of phenolic compounds by latosol. *Soil Science* 126: 15-21.
- Wang TSC, Wang MC, Ferng YL, Huang PM (1983) Catalytic synthesis of humic substances by natural clays, silts, and soils. *Soil Science* 135: 350-360.
- Wang WJ, Baldock JA, Dalal RC, Moody PW (2004) Decomposition dynamics of plant materials in relation to nitrogen availability and biochemistry determined by NMR and wet-chemical analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 2045-2058.
- Ward SE, Ostle NJ, Oakley S, Quirk H, Henrys PA, Bardgett RD (2013) Warming effects on greenhouse gas fluxes in peatlands are modulated by vegetation composition. *Ecology Letters* 16: 1285-1293
- Weetall HH (1993) Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 41:157-188.
- Werth M, Kuzyakov Y (2010) ¹³C fractionation at the root-microorganisms-soil interface: a review and outlook for partitioning studies. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1372-1384.
- Werth, M. and Kuzyakov, Y.: Root-derived carbon in soil respiration and microbial biomass determined by ¹⁴C and ¹³C, *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3), 625-637, doi:10.1016/j.soilbio.2007.09.022, 2008.
- Wieder WR, Bonan GB, Allison SD (2013) Global soil carbon projections are improved by modelling microbial processes. *Nature Climate Change Advance* 3:909-912.
- Wild B, Schnecker J, Eloy Alves RJ, Barsukov P, Bárta J, Capek P, Gentsch N, Gittel A, Guggenberger G, Lashchinskiy N, Mikutta R, Rusalimova O, Santruckova H, Shibistova O, Urich T, Watzka M, Zrazhevskaya G, Richter A (2014) Input of easily available organic C and N stimulates microbial decomposition of soil organic matter in arctic permafrost soil. *Soil Biology and Biochemistry* 75: 143-151.
- Williams CH, Donald CM (1957) Changes in organic matter and pH in a podzolic soil as influenced by subterranean clover and superphosphate. *Australian Journal of Agricultural Research* 8: 179-189.
- Wingate L, Jrm Ogée, Cuntz M, Genty B, Reiter I, Seibt U, Yakir D, Maseyk K, Pendall EG, Barbour MM, Mortazavi B, Rg Burlett, Peylin P, Miller J, Mencuccini M, Shim JH, Hunt J, Grace J (2009) The impact of soil microorganisms on the global budget of $\delta^{18}\text{O}$ in atmospheric CO_2 . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:22411-22415
- Wohlfahrt G, Fenstermaker LF, Arnone JA (2008) Large annual net ecosystem CO_2 uptake of a Mojave Desert ecosystem. *Global Change Biology* 14: 1475-1487.
- Wolf DC, Dao TH, Scott HD, Lavy TL (1989) Influence of sterilization methods on selected microbiological, physical, and chemical properties. *Journal of Environmental Quality* 18: 39-44.
- Wolf DC, Skipper HD (1994) Soil sterilisation. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, P.S. (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America, Wisconsin, pp. 41-51.
- Wright SF, Upadhyaya A (1998) A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi *Plant and Soil* 198 : 97-107.

X-Z

- Xiang SR, Doyle A, Holden PA, Schimel JP (2008) Drying and rewetting effects on C and N mineralization and microbial activity in surface and subsurface California grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2281-2289.
- Xie J, Li Y, Zhai C, Li CZL (2008) CO₂ absorption by alkaline soils and its implication to the global carbon cycle. *Environmental Geology* 56: 953-961,
- Xu L, Baldocchi D, Tang J (2004) How soil moisture, rain pulses, and growth alter the response of ecosystem respiration to temperature. *Global Biogeochemical Cycles* 18: GB4002.
- Yan JH, Wang YP, Zhou GY, Zhang DQ (2006) Estimates of soil respiration and net primary production of three forests at different succession stages in South China. *Global Change Biology* 12: 810-821.
- Yardin MR, Kennedy IR, Thies JE (2000) Development of high quality carrier materials for field delivery of key microorganisms used as bio-fertilisers and bio-pesticides. *Radiation Physics and Chemistry* 57: 565-568.
- Yoo G, Spomer LA, Wander MM (2006) Regulation of carbon mineralization rates by soil structure and water in an agricultural field and a prairie-like soil *Geoderma* 135: 16-25.
- Young IM, Crawford JW (2004) Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science* 304: 1634-1637.
- Zepp RG (2003) Solar ultraviolet radiation and aquatic carbon, nitrogen, sulfur and metals cycles, p. 137-183. In E. W. Helbling and H. Zagarese [eds.], *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Comprehensive series in photosciences. European Society for Photobiology.
- Zepp RG, Erickson DJ, Paul ND, Sulzberger B (2011) Effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling: interactions and feedbacks. *Photochemical and Photobiological Sciences* 10:261-279.
- Zhang L, Ten Hagen KG (2011) The cellular microenvironment and cell adhesion: a role for O-glycosylation *Biochemical Society Transactions* 39: 378-382.
- Zhou T, Shi P, Hui D, Luo Y (2009) Global pattern of temperature sensitivity of soil heterotrophic respiration (Q₁₀) and its implications for carbon-climate feedback. *Journal of Geophysical Research* 114:G02016.
- Zoppini A, Puddu A, Fazi S, Rosati M, Sist P (2005) Extracellular enzyme activity and dynamics of bacterial community in mucilaginous aggregates of the northern Adriatic Sea *Science of the Total Environment* 353: 270-286

ANNEXES

ANNEXE : CURRICULUM VITAE

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES :

11/2015 – 2 mois



INRA – Unité de Recherche sur l'Ecosystème Prairiale

Responsable : Sébastien FONTAINE

- **Poste :** *Ingénieur d'étude*
- **Sujet :** *Impact de l'aridité sur l'expression relative des EXOMETs*

08/2012 - 3 ans



(i) **Laboratoire « Microorganismes : Géomes et Environnement » (UMR CNRS), Equipe Virus et Métabolismes Bactériens en Milieu Aquatique**

(ii) **INRA – Unité de Recherche sur l'Ecosystème Prairiale**

(Directeur de thèse : Christian AMBLARD, Co-encadrants : Anne Catherine LEHOURS, Sébastien FONTAINE)

- **Poste :** *Doctorant*
- **Sujet :** *Les Métabolismes Acellulaires dans l'Environnement : Importance pour le Cycle du Carbone*

01/2012 - 5 mois



UMR CNRS – Laboratoire « Microorganismes : Génomes et Environnement », Equipe Virus et Métabolismes Bactériens en Milieu Aquatique

(Responsables : Anne Catherine LEHOURS, Téléphore SIME-NGANDO)

- **Poste :** *Chercheur stagiaire Master 2 Recherche*
- **Mission :** *Développement d'une méthode de capture cellulaire afin d'évaluer l'importance quantitative et fonctionnelle des virus dans les sédiments lacustres.*

05/2011 - 4 mois



UMR CNRS – Laboratoire « Microorganismes : Géomes et Environnement », Equipe Biodiversité Microbienne et fonctionnement des Réseaux trophiques (Responsables : Anne Hélène LE JEUNE, Jean François CARRIAS)

- **Poste :** *Chercheur stagiaire Master 1*
- **Mission :** *Caractérisation de la diversité des communautés microbiennes aquatiques associées à des espèces épiphytes de Broméliacées en Guyane française.*

04/2010 - 6 mois



ADRIA développement (29) : Unité Interactions et Dynamique des Ecosystèmes microbiens dans les aliments – Equipe Validation de Méthodes Rapides d'Analyses (Responsable : Danielle SOHIER)

- **Poste :** *Technicien de laboratoire*
- **Equipes :** *Validation de méthodes rapides d'analyses*
- **Missions :** *Evaluation de l'efficacité de nouvelles techniques analyses microbiologiques en comparaison aux méthodes de références*

11/2009 - 6 mois

DANISCO

First you add knowledge...

DANISCO Site de Landerneau (29)

- **Poste :** *Technicien de laboratoire*
- **Missions :** *Analyses bactériologiques sur produits chimiques ; analyses de la qualité des eaux sortant de l'entreprise.*

02/2008 - 1 an

**Coopérative Agricole de Pays de Loire (49) – Minoterie du Château :**

- **Poste :** *Assistant Responsable Qualité* (Responsable : Anne RICHEUX)
- **Missions :** *Mise en place du Référentiel International Food Standard ; suivi de l'activité du laboratoire et des résultats d'analyses ; réalisation d'audits hygiène.*

FORMATIONS UNIVERSITAIRES :

2012 – 2015

**Doctorat en Ecologie Microbienne : Ecole doctorale Science de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement - Université Blaise Pascal Clermont Ferrand / Université d'Auvergne (63) (sujet cf. « Expériences Professionnelles)**

- **Modules socio-professionnels**
 - Modules « Enseignement »
 - Intégration dans la vie professionnelle après obtention d'un doctorat
- **Modules « Biologie »**
 - Membre organisateur des Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE
 - Formation à l'utilisation du logiciel R

2010 – 2012

Master Biologie et Environnement : Option *Microbiologie : Génomes, Ecologie et Biotechnologies* - Université Blaise Pascal Clermont Ferrand (63)

2007 – 2008

Licence Professionnelle, Option : *Hygiène et Sécurité des Productions Agro-alimentaires* - IUT de Laval (53)

2005 – 2007

DUT Génie Biologique, option : *Industries Agro-alimentaires et Biologiques* - IUT de Saint-Brieuc (22).**PUBLICATIONS :**

- **B. KERAVAL**, A-C. LEHOURS, J. COLOMBET, C. AMBLARD, G. ALVAREZ, S. FONTAINE : Soil carbon dioxide emissions controlled by an extracellular oxidative metabolism identifiable by its isotope signature. *Biogeosciences* (2016) doi: 10.5194/bg-2015-399
- LEHOURS AC, LE JEUNE AH, AGUER JP, CEREGHINO R, CORBARA B, **KERAVAL B**, LEROY C, PERRIERE F, JEANTHON C, CARRIAS JF, (2016). Unexpectedly high bacteriochlorophyll α concentrations in Neotropical tank bromeliads. *Environmental Microbiology Reports* doi: 10.1111/1758-2229.12426. (Article recommandé par F1000 prime)

- **B. KERAVAL**, A-C. LEHOURS, A. LALLEMENT, G. ALVAREZ, F. MAESTRE, V. OCHOA, C. AMBLARD, S. FONTAINE: Extracellular oxidative metabolisms (EXOMETs) are overall regulated by dissolved organic carbon content in physico-chemical contrasted soils. *En préparation pour The ISME journal*.
- **B. KERAVAL**, G. ALVAREZ, A-C. LEHOURS, R. MARTIN, L. ANDANSON, M. RICHEUX, S. SLOUMA C. AMBLARD, S. FONTAINE: Turnover rates of ecoenzymes in the bulk soil and soil fractions. *En préparation pour The SBB Journal*.
- **B. KERAVAL** : Des émissions de CO₂ d'origine biologique dans des environnements dépourvus de vie : Importance de ce phénomène dans le cycle du carbone. **Auvergne Sciences**. (<http://www.auvergnesciences.com/blog/2014/09/02/>)

ARTICLE D'OUVRAGE :

LEHOURS AC, BORREL G, MOREL-DESROSIERS N, BARDOT C, GROSSI V, **KERAVAL B**, ATTARD E, MOREL JP, AMBLARD C, FONTY G. (*in press*) Anaerobic microbial communities and processes in freshwater lakes – a focus on methane cycle in Lake Pavin. In: SIME-NGANDO T., AMBLARD C., BOIVIN P., CHAPRON E., JEZEQUEL D. MEYBECK M. (Editors): *Lake Pavin: History, biogeochemistry and sedimentology of a deep meromictic crater lake*, Chapter 19, Springer, The Netherlands.

COMMUNICATIONS ORALES :

- « MAGNÉTO-FISH : Principe, développement méthodologique et applications possibles en écologie microbienne », **Kéval Benoit**¹, Duffaud Emilie¹, Colombet Jonathan¹, Bardot Olivier², Anne-Catherine Lehours¹, Mary Isabelle¹. Journées Internationales de Limnologie et d'Océanographie 2012, Clermont Ferrand, 17-19/10/12.
- « Réponse et adaptation des métabolismes du carbone au changement climatique dans les sols, l'eau et les sédiments lacustres : rôle des métabolismes acellulaires », **Kéval Benoit**¹, Anne Catherine Lehours¹, Christian Amblard¹, Gael Alvarez^{2,3}, Sebastien Fontaine², Journée des Doctorants LMGE 2012, Clermont Ferrand, 07/12/12.
- « Reconstruction des métabolismes intracellulaires dans l'environnement en dehors de la cellule après lyse cellulaire : Importance pour le cycle du carbone », **Kéval Benoit**¹, Anne Catherine Lehours¹, Christian Amblard¹, Gael Alvarez^{2,3}, Sebastien Fontaine², Séminaire Science du mardi INRA, Crouel, 22/01/13.
- "MAGNÉTO-FISH : Principe, développement méthodologique et applications possibles en écologie microbienne", **Kéval Benoit**¹, Duffaud Emilie¹, Colombet Jonathan¹, Bardot Olivier², Lehours Anne-Catherine¹, Mary Isabelle¹. Rencontres des Microbiologistes Clermontois 2013, 12/04/13.
- « Reconstruction des métabolismes intracellulaires dans l'environnement en dehors de la cellule après lyse cellulaire : Importance pour le cycle du carbone », **Kéval Benoit**¹, Anne Catherine Lehours¹, Christian Amblard¹, Gael Alvarez^{2,3}, Sebastien Fontaine², Séminaire EFPA INRA, Dourdan, 14-16/01/13. Poster

- “An unknown oxidative metabolism substantially contributes to soil CO₂ emissions”, **Kéralval Benoit**¹, V. Maire¹, G. Alvarez^{1,2}, J. Colombet³, A. Comby¹, R. Despinasse⁴, E. Dubreucq⁵, M. Joly¹, A.-C. Lehours³, V. Perrier⁵, T. Shahzad¹ and S. Fontaine¹, Open Science Conference on Climate Extremes and Biogeochemical Cycles in the Terrestrial Biosphere: Impacts and Feedbacks Across Scales, Innsbruck, Austria, 02-05/04/13.
- “Acellular metabolisms in the environment: Importance for carbon cycle”, **Kéralval Benoit**¹, Anne Catherine Lehours¹, Christian Amblard¹, Gael Alvarez^{2,3}, Sebastien Fontaine², Open Science Conference on Climate Extremes and Biogeochemical Cycles in the Terrestrial Biosphere: Impacts and Feedbacks Across Scales, Innsbruck, Austria, 02-05/04/13. Poster
- « Les métabolismes acellulaires dans l’environnement – Importance dans le cycle du carbone », **Kéralval Benoit**¹, Anne Catherine Lehours¹, Christian Amblard¹, Gael Alvarez^{2,3}, Sebastien Fontaine², Journée des Doctorants LMGE 2015, Clermont Ferrand, 02/15.
- « Implication des Métabolismes Oxydatifs Extracellulaires dans le processus de minéralisation de la matière organique du sol » **Kéralval Benoit**¹, Anne Catherine Lehours¹, Christian Amblard¹, Gael Alvarez^{2,3}, Sebastien Fontaine², Journées de l’Ecole Doctorale SVSAE 2015, Clermont Ferrand, 21-22/05/15.
- “Unusual isotopic composition of C-CO₂ from sterilized soil microcosms: a new way to separate intracellular from extracellular respiratory metabolisms” **Kéralval Benoit**¹, Anne Catherine Lehours¹, Christian Amblard¹, Gael Alvarez^{2,3}, Sebastien Fontaine², General Assembly of European Geosciences Union 2015, Vienne, 12-17/04/15.

